



Institut luxembourgeois de la normalisation
de l'accréditation, de la sécurité et qualité
des produits et services

ILNAS-EN ISO 21286:2020

Bodenbeschaffenheit - Identifizierung der Testorganismenarten für ökotoxikologische Tests mit Hilfe von DNA-Barcoding (ISO 21286:2019)

Soil quality - Identification of
ecotoxicological test species by DNA
barcoding (ISO 21286:2019)

Qualité du sol - Identification des espèces
par codes-barres ADN dans les essais
d'écotoxicologie (ISO 21286:2019)

04/2020



Nationales Vorwort

Diese Europäische Norm EN ISO 21286:2020 wurde als luxemburgische Norm ILNAS-EN ISO 21286:2020 übernommen.

Alle interessierten Personen, welche Mitglied einer luxemburgischen Organisation sind, können sich kostenlos an der Entwicklung von luxemburgischen (ILNAS), europäischen (CEN, CENELEC) und internationalen (ISO, IEC) Normen beteiligen:

- Inhalt der Normen beeinflussen und mitgestalten
- Künftige Entwicklungen vorhersehen
- An Sitzungen der technischen Komitees teilnehmen

<https://portail-qualite.public.lu/fr/normes-normalisation/participer-normalisation.html>

DIESES WERK IST URHEBERRECHTLICH GESCHÜTZT

Kein Teil dieser Veröffentlichung darf ohne schriftliche Einwilligung weder vervielfältigt noch in sonstiger Weise genutzt werden - sei es elektronisch, mechanisch, durch Fotokopien oder auf andere Art!

EUROPÄISCHE NORM

ILNAS-EN ISO 21286:2020

EN ISO 21286

EUROPEAN STANDARD

NORME EUROPÉENNE

April 2020

ICS 13.080.30

Deutsche Fassung

Bodenbeschaffenheit - Identifizierung der Testorganismenarten für ökotoxikologische Tests mit Hilfe von DNA-Barcoding (ISO 21286:2019)

Soil quality - Identification of ecotoxicological test
species by DNA barcoding (ISO 21286:2019)

Qualité du sol - Identification des espèces par codes-
barres ADN dans les essais d'écotoxicologie (ISO
21286:2019)

Diese Europäische Norm wurde vom CEN am 13. April 2020 angenommen.

Die CEN-Mitglieder sind gehalten, die CEN/CENELEC-Geschäftsordnung zu erfüllen, in der die Bedingungen festgelegt sind, unter denen dieser Europäischen Norm ohne jede Änderung der Status einer nationalen Norm zu geben ist. Auf dem letzten Stand befindliche Listen dieser nationalen Normen mit ihren bibliographischen Angaben sind beim CEN-CENELEC-Management-Zentrum oder bei jedem CEN-Mitglied auf Anfrage erhältlich.

Diese Europäische Norm besteht in drei offiziellen Fassungen (Deutsch, Englisch, Französisch). Eine Fassung in einer anderen Sprache, die von einem CEN-Mitglied in eigener Verantwortung durch Übersetzung in seine Landessprache gemacht und dem Management-Zentrum mitgeteilt worden ist, hat den gleichen Status wie die offiziellen Fassungen.

CEN-Mitglieder sind die nationalen Normungsinstitute von Belgien, Bulgarien, Dänemark, Deutschland, Estland, Finnland, Frankreich, Griechenland, Irland, Island, Italien, Kroatien, Lettland, Litauen, Luxemburg, Malta, den Niederlanden, Norwegen, Österreich, Polen, Portugal, der Republik Nordmazedonien, Rumänien, Schweden, der Schweiz, Serbien, der Slowakei, Slowenien, Spanien, der Tschechischen Republik, der Türkei, Ungarn, dem Vereinigten Königreich und Zypern.



EUROPÄISCHES KOMITEE FÜR NORMUNG
EUROPEAN COMMITTEE FOR STANDARDIZATION
COMITÉ EUROPÉEN DE NORMALISATION

CEN-CENELEC Management-Zentrum: Rue de la Science 23, B-1040 Brüssel

Inhalt

	Seite
Europäisches Vorwort	4
Vorwort	5
Einleitung	6
1 Anwendungsbereich	8
2 Normative Verweisungen	8
3 Begriffe	8
4 Grundsatz	9
5 Reagenzien und Materialien	10
5.1 Biologisches Material	10
5.2 Enzym	10
5.3 Oligonukleotid-PCR-Primer	11
5.4 Reagenzien	11
6 Prüfeinrichtung	12
7 Allgemeine Anforderungen	12
7.1 Gute Laborpraxis und Vermeidung von Verunreinigungen	12
7.2 Sicherheitsvorkehrungen	13
7.2.1 Chemische Gefährdungen	13
7.2.2 Physikalische Gefährdungen	13
8 Durchführung	13
8.1 DNA-Isolierung	13
8.2 Quantifizierung	14
8.3 PCR	14
8.3.1 Ziel-Genomregion	14
8.3.2 Primer-Entwicklung	15
8.3.3 Primer-Synthese	15
8.3.4 PCR	15
8.4 Prüfen der Amplikon-Größe	17
8.5 Reinigung	17
8.6 Sequenzierung	17
8.7 Bioinformatik	18
8.7.1 Allgemeines	18
8.7.2 Qualitätsprüfung des Elektropherogramms oder Rohdatensequenzen	18
8.7.3 Ausschneiden von Regionen schlechter Qualität und von Primer-Sequenzen	18
8.7.4 Sequenz-Überlappung	19
8.7.5 Sequenz-Verifizierung	19
8.7.6 Überprüfen der editierten Sequenz	19
8.7.7 Arten-Zuordnung	20
8.7.8 Qualität der Referenzdatenbanken	21
9 Berechnung und Darstellung der Ergebnisse	22
10 Gültigkeit der Prüfung	22
11 Prüfbericht	22

Anhang A (informativ) Die <i>Eisenia</i> Barcoding Initiative: Ringversuch zur Beurteilung der Anwendbarkeit des DNA-Barcodings für die Identifizierung von <i>Eisenia</i>-Arten.....	24
Literaturhinweise.....	28

Europäisches Vorwort

Der Text von ISO 21286:2019 wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 190 „Soil quality“ der Internationalen Organisation für Normung (ISO) erarbeitet und als EN ISO 21286:2020 durch das Technische Komitee CEN/TC 444 „Prüfverfahren für die umweltbezogene Charakterisierung fester Matrices“ übernommen, dessen Sekretariat von NEN gehalten wird.

Diese Europäische Norm muss den Status einer nationalen Norm erhalten, entweder durch Veröffentlichung eines identischen Textes oder durch Anerkennung bis Oktober 2020, und etwaige entgegenstehende nationale Normen müssen bis Oktober 2020 zurückgezogen werden.

Es wird auf die Möglichkeit hingewiesen, dass einige Elemente dieses Dokuments Patentrechte berühren können. CEN ist nicht dafür verantwortlich, einige oder alle diesbezüglichen Patentrechte zu identifizieren.

Entsprechend der CEN-CENELEC-Geschäftsordnung sind die nationalen Normungsinstitute der folgenden Länder gehalten, diese Europäische Norm zu übernehmen: Belgien, Bulgarien, Dänemark, Deutschland, die Republik Nordmazedonien, Estland, Finnland, Frankreich, Griechenland, Irland, Island, Italien, Kroatien, Lettland, Litauen, Luxemburg, Malta, Niederlande, Norwegen, Österreich, Polen, Portugal, Rumänien, Schweden, Schweiz, Serbien, Slowakei, Slowenien, Spanien, Tschechische Republik, Türkei, Ungarn, Vereinigtes Königreich und Zypern.

Anerkennungsnotiz

Der Text von ISO 21286:2019 wurde von CEN als EN ISO 21286:2020 ohne irgendeine Abänderung genehmigt.

Vorwort

ISO (die Internationale Organisation für Normung) ist eine weltweite Vereinigung nationaler Normungsinstitute (ISO-Mitgliedsorganisationen). Die Erstellung von Internationalen Normen wird üblicherweise von Technischen Komitees von ISO durchgeführt. Jede Mitgliedsorganisation, die Interesse an einem Thema hat, für welches ein Technisches Komitee gegründet wurde, hat das Recht, in diesem Komitee vertreten zu sein. Internationale staatliche und nichtstaatliche Organisationen, die in engem Kontakt mit ISO stehen, nehmen ebenfalls an der Arbeit teil. ISO arbeitet bei allen elektrotechnischen Normungsthemen eng mit der Internationalen Elektrotechnischen Kommission (IEC) zusammen.

Die Verfahren, die bei der Entwicklung dieses Dokuments angewendet wurden und die für die weitere Pflege vorgesehen sind, werden in den ISO/IEC-Direktiven, Teil 1 beschrieben. Es sollten insbesondere die unterschiedlichen Annahmekriterien für die verschiedenen ISO-Dokumentenarten beachtet werden. Dieses Dokument wurde in Übereinstimmung mit den Gestaltungsregeln der ISO/IEC-Direktiven, Teil 2 erarbeitet (siehe www.iso.org/directives).

Es wird auf die Möglichkeit hingewiesen, dass einige Elemente dieses Dokuments Patentrechte berühren können. ISO ist nicht dafür verantwortlich, einige oder alle diesbezüglichen Patentrechte zu identifizieren. Details zu allen während der Entwicklung des Dokuments identifizierten Patentrechten finden sich in der Einleitung und/oder in der ISO-Liste der erhaltenen Patenterklärungen (siehe www.iso.org/patents).

Jeder in diesem Dokument verwendete Handelsname dient nur zur Unterrichtung der Anwender und bedeutet keine Anerkennung.

Für eine Erläuterung des freiwilligen Charakters von Normen, der Bedeutung ISO-spezifischer Begriffe und Ausdrücke in Bezug auf Konformitätsbewertungen sowie Informationen darüber, wie ISO die Grundsätze der Welthandelsorganisation (WTO, en: World Trade Organization) hinsichtlich technischer Handelshemmnisse (TBT, en: Technical Barriers to Trade) berücksichtigt, siehe www.iso.org/iso/foreword.html.

Dieses Dokument wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 190, *Soil quality*, Unterkomitee SC 4, *Biological characterization* erarbeitet.

Rückmeldungen oder Fragen zu diesem Dokument sollten an das jeweilige nationale Normungsinstitut des Anwenders gerichtet werden. Eine vollständige Auflistung dieser Institute ist unter www.iso.org/members.html zu finden.

Einleitung

Die Identifizierung von Prüfarten beruht derzeit üblicherweise auf morphologischen Merkmalen. Dies bringt jedoch nicht immer eindeutige Ergebnisse, weil

- a) nur wenige taxonomische Experten verfügbar sind;
- b) eng verwandte Arten sich durch einige wenige, leicht übersehene Merkmale unterscheiden können, und
- c) was noch wichtiger ist, da mehrere Testarten Komplexe von kryptischen Arten sind.

Ein gutes Beispiel dafür ist der Kompostwurm *Eisenia fetida/andrei* (in ISO 11268-1, ISO 11268-2 und ISO 17512-1 verwendet), bei dem morphologische Eigenschaften allein möglicherweise nicht ausreichen, um zwischen beiden Arten zu unterscheiden [5], [36]. Ein anderes, wohlbekanntes Beispiel ist die Raubmilbe, *Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer* [50], die mit *H. miles* verwechselt werden kann, die in der biologischen Schädlingsbekämpfung häufig eingesetzt wird [31].

Die fehlerhafte Identifizierung von Arten, die Verwendung einer Morphospezies, die eigentlich ein Komplex kryptischer Arten ist, oder die Durchmischung von Arten in Laborkulturen können für die Zuverlässigkeit der ökotoxikologischen Prüfungen ein ernsthaftes Problem darstellen. Geschwister-Arten in einem morphologischen Komplex können ökologische, verhaltensbezogene und physiologische Unterschiede aufweisen und sich auch in ihrer Reaktion auf Giftstoffe unterscheiden (z. B. [2], [17], [35], [40]). Dies scheint auch der Fall zu sein beim Springschwanz *Folsomia candida* (in ISO 11267 und ISO 17512-2 verwendet), bei dem in natürlichen Populationen von *F. candida* und in Laborstämmen genetische Differenzen in erheblichem Umfang festgestellt wurden [9], [19], [41]. Zwar wurden bei verschiedenen Laborstämmen nur geringe Unterschiede in der Empfindlichkeit gegenüber bestimmten Chemikalien gefunden [12], [9], in anderen Studien wurden aber signifikante Veränderungen im Phenmedipham-Vermeidungsverhalten und unterschiedliche Eignungsreaktionen auf Cadmiumbelastung zwischen genetisch differenzierten Stämmen erkannt [14], [30]. Auch wenn zwei Arten in ähnlicher Weise auf Giftstoffe reagieren, kann ferner das Vorhandensein beider Arten in einer Laborkultur zur Produktion steriler Hybriden führen, die das Ergebnis der Reproduktionsprüfungen verfälschen [36].

Durch die Identifizierung von Arten mittels DNA-Barcoding können diese Probleme beseitigt und sichergestellt werden, dass die für Tests verwendeten Arten oder Stämme korrekt charakterisiert sind. Dadurch kann die Qualitätssicherung verbessert werden, da die Ergebnisse aus unterschiedlichen ökotoxikologischen Labors wesentlich zuverlässiger und besser vergleichbar sind. Für *Eisenia fetida/E. andrei* wurde diese Arbeit, einschließlich eines internationalen Ringversuchs, bereits durchgeführt ([36], siehe Anhang A). Die Ergebnisse dieses Ringversuchs lassen sich wie folgt zusammenfassen:

- Das DNA-Barcoding ist ein zuverlässiges und praktisches Verfahren für die Identifizierung von *Eisenia*-Arten.
- Nur 17 von 28 Ökotoxikologie-Labors erzielten mittels morphologischer Methoden die richtige taxonomische Zuordnung. In den meisten Labors mit falscher oder unbekannter Zuordnung wird mit *E. andrei* gearbeitet.
- Das Vorhandensein eines kryptischen Artenpaars in *E. fetida* ist eine plausible Hypothese.
- Wichtig ist, dass Regenwürmer für ökotoxikologische Prüfungen regelmäßig anhand von DNA-Barcoding identifiziert bzw. neu identifiziert werden.