

VEREIN
DEUTSCHER
INGENIEURE

Monitoring der Wirkungen gentechnisch veränderter
Organismen (GVO)
Verfahren zur Extraktion von Nucleinsäuren aus Böden zur
Analyse von mikrobiellen Gemeinschaften und Nachweis
transgener DNA
Qualitätsanforderungen und Anwendungsbeispiele

Monitoring the effects of genetically modified
organisms (GMOs)
Method for extracting nucleic acids from soil for the
analysis of microbial communities and detection of
transgenic DNA
Quality requirements and applications

VDI 4331

Blatt 7 / Part 7
Entwurf / Draft

Ausg. deutsch/englisch
Issue German/English

*Die deutsche Version dieser Richtlinie ist verbindlich.
The German version of this guideline shall be taken as authoritative. No guarantee can be given with respect to the English translation.*

Einsprüche bis 2012-02-29

- *vorzugsweise in Tabellenform als Datei per E-Mail an tls@vdi.de
Die Vorlage dieser Tabelle kann abgerufen werden unter <http://www.vdi-richtlinien.de/einsprueche>*
- *in Papierform an
VDI-Gesellschaft Technologies of Life Sciences (TLS)
Fachbereich Gentechnik
Postfach 10 11 39
40002 Düsseldorf*

| Inhalt | Seite | Contents | Page |
|---|-----------|---|-----------|
| Vorbemerkung | 2 | Preliminary note | 2 |
| Einleitung | 2 | Introduction. | 2 |
| 1 Anwendungsbereich | 6 | 1 Scope | 6 |
| 2 Normative Verweise | 7 | 2 Normative references | 7 |
| 3 Begriffe | 7 | 3 Terms and definitions | 7 |
| 4 Qualitätsanforderungen für Nucleinsäureextrakte | 9 | 4 Quality requirements for nucleic acid extracts | 9 |
| 5 Materialliste | 10 | 5 List of materials | 10 |
| 6 Durchführung | 11 | 6 Procedure | 11 |
| Anhang A Protokoll 1: Extraktion von DNA aus Bodenproben. | 18 | Annex A Protokoll 1: Extraction of DNA from oil samples | 18 |
| Anhang B Protokoll 2: Spezielle Anpassung für die DNA-Extraktion aus Böden mit hohen Huminstoffgehalten. | 20 | Annex B Protocol 2: Special modification for the extraction of DNA from soils containing high concentrations of humic substances | 20 |
| Anhang C Protokoll 3: Gleichzeitige Extraktion von RNA und DNA aus Bodenproben (Methode A) | 22 | Annex C Protocol 3: Simultaneous extraction of RNA and DNA from soil samples (Method A) | 22 |
| Anhang D Protokoll 4: Gleichzeitige Extraktion von DNA und RNA aus Bodenproben (Methode B) | 24 | Annex D Protocol 4: Simultaneous extraction of DNA and RNA from soil samples (Method B) | 24 |
| Schrifttum | 26 | Bibliography | 26 |

VDI-Gesellschaft Technologies of Life Sciences (TLS)

Fachbereich Gentechnik

VDI-Handbuch GVO-Monitoring

Vorbemerkung

Der Inhalt dieser Richtlinie ist entstanden unter Beachtung der Vorgaben und Empfehlungen der Richtlinie VDI 1000.

Alle Rechte, insbesondere die des Nachdrucks, der Fotokopie, der elektronischen Verwendung und der Übersetzung, jeweils auszugsweise oder vollständig, sind vorbehalten.

Die Nutzung dieser VDI-Richtlinie ist unter Wahrung des Urheberrechts und unter Beachtung der Lizenzbedingungen (www.vdi-richtlinien.de), die in den VDI-Merkblättern geregelt sind, möglich.

An der Erarbeitung dieser VDI-Richtlinie waren beteiligt:

Dr. J. Niemeyer, Göttingen

Prof. M. Schloter, Oberschleißheim

Dr. H. Seitz, Düsseldorf

Prof. K. Smalla, Braunschweig

Prof. C. Tebbe, Braunschweig (Vorsitzender)

Dr. A. Ulrich, Münchenberg

Allen, die ehrenamtlich an der Erarbeitung dieser VDI-Richtlinie mitgewirkt haben, sei gedankt.

Eine Liste der aktuell verfügbaren Blätter dieser Richtlinienreihe ist im Internet abrufbar unter www.vdi.de/4331.

Einleitung

Böden sind typischer Weise durch eine große Vielfalt unterschiedlicher Mikroorganismen (Bakterien, Archaeen, Pilze, Protozoen) gekennzeichnet. Mikrobielle Gemeinschaften liefern durch ihre Stoffwechsellaktivitäten einen wichtigen Beitrag zu ökosystemaren Funktionen und zur nachhaltigen Nutzung von Böden. Außerdem sind sie für Pflanzenwachstum und -gesundheit von großer Bedeutung. In ihrer Zusammensetzung reagieren mikrobielle Gemeinschaften auf verschiedene abiotische und biotische Umweltfaktoren, wodurch sich Änderungen in ihren Funktionen ergeben können. Veränderungen der mikrobiellen Gemeinschaften können daher unter Umständen auch ökologische und ökonomische Schäden herbeiführen. Diese können auf Ebene von biogeochemischen Kreisläufen liegen (z.B. durch erhöhte Emissionen von Treibhausgasen, wie Methan oder Stickoxiden) oder in der Anreicherung von pflanzen-, tier- und humanpathogenen Mikroorganismen bestehen.

Da eine Veränderung per se nicht als negativ gewertet werden kann, müssen mögliche Effekte von definierten Einflussfaktoren (z.B. gentechnisch veränderten Organismen (GVO), Bodenbearbeitung, Pflanzen-

Preliminary note

The content of this guideline has been developed in strict accordance with the requirements and recommendations of the guideline VDI 1000.

All rights are reserved, including those of reprinting, reproduction (photocopying, micro copying), storage in data processing systems and translation, either of the full text or of extracts.

The use of this guideline without infringement of copyright is permitted subject to the licensing conditions specified in the VDI Notices (www.vdi-richtlinien.de).

Contributions to this VDI Guideline were made to:

Dr. J. Niemeyer, Göttingen

Prof. M. Schloter, Oberschleißheim

Dr. H. Seitz, Düsseldorf

Prof. K. Smalla, Braunschweig

Prof. C. Tebbe, Braunschweig (Vorsitzender)

Dr. A. Ulrich, Münchenberg

We wish to express our gratitude to all honorary contributors to this guideline.

A catalogue of all available parts of this series of guidelines can be accessed on the internet at www.vdi.de/4331.

Introduction

Soil typically contains a high diversity of microorganisms (bacteria, archaea, fungi, protozoa) which live in communities. Such microbial communities make a significant contribution to ecosystem processes and sustainable soil use through their metabolic activities. They are also very important for plant growth and health. Microbial communities can change their composition in response to various abiotic and biotic environmental factors, which may also result in functional changes. In some circumstances, changes to microbial communities may also result in ecological and economic damage. This may occur at the level of biogeochemical cycles (e.g., due to increased emissions of greenhouse gases such as methane or nitrogen oxides) or by increasing the presence of plant, animal and human pathogens.

Since a change in the microbial community structure cannot be interpreted as negative per se, the possible effects of defined influencing factors (e.g. genetically modified organisms (GMOs), soil cultivation, pesti-

schutzmittel, organischen Schadstoffe, Schwermetalle) auf die mikrobielle Gemeinschaft von ihrer natürlichen Dynamik abgegrenzt werden. Ebenso kann das Maß einer Veränderung in der Zusammensetzung einer mikrobiellen Gemeinschaft nicht direkt mit dem Maß eines Schadens korreliert werden, da natürliche Schwankungen, z. B. im Wassergehalt eines Bodens oder durch die kurzfristige Verfügbarkeit von Nährstoffen z. B. nach einer Düngung, erhebliche Verschiebungen der mikrobiellen Vielfalt hervorrufen können. Zur Schadensindikation ist vielmehr die Nachhaltigkeit einer Veränderung der mikrobiellen Vielfalt z. B. über einen mehrjährigen Zeitraum zu berücksichtigen. Die Veränderlichkeit in der Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaft hat auch Konsequenzen für die Probenahme, die z. B. nicht unmittelbar nach Düngungsereignissen erfolgen dürfen (siehe Abschnitt 6.1 und Abschnitt 6.2).

Im Rahmen dieser VDI-Richtlinie werden Grundprinzipien erläutert und Beispielprotokolle zur Extraktion von Nukleinsäuren aus Böden gegeben. Derartige Protokolle wurden erstmals Ende der 1980er Jahre publiziert und werden seitdem zunehmend in Forschungslaboratorien – bis heute aber nicht in der Praxis der Bodenanalytik – eingesetzt.

Extrahierte Nukleinsäuren stammen im Wesentlichen aus Bodenmikroorganismen, können aber auch Anteile aus Pflanzenresten enthalten. Die Nukleinsäuren dienen als Ausgangsmaterial zum Nachweis von Mikroorganismen und zur Ermittlung ihrer Vielfalt. Zusätzlich können die Bodennukleinsäuren auch zum Nachweis pflanzlicher Gene genutzt werden, z. B. um transgene DNA (rekombinante Gene) aus gentechnisch veränderten Pflanzen zu detektieren. Die Nachweise der jeweiligen Zielgene, sei es für die Charakterisierung der mikrobiellen Vielfalt oder für den GVO-Nachweis, erfolgt dabei vor allem mithilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) aus den bodenextrahierten Nukleinsäuren.

Kultivierungsunabhängige Verfahren zur Charakterisierung der mikrobiellen Vielfalt aus Bodenproben sind in jedem Fall den klassischen Verfahren, die sich durch Anreicherung von Mikroorganismen auf Nährböden auszeichnen, vorzuziehen. Nur ein geringer Anteil (häufig weniger als 1 %) der Bodenmikroorganismen, ist zum Wachstum unter herkömmlichen Laborbedingungen befähigt. Die großen Potenziale der kultivierungsunabhängigen Nachweismethoden zeigen jedoch auch deutlich die allgemeinen Limitierungen, wenn es um die Ermittlung der tatsächlichen mikrobiellen Vielfalt in Böden geht. Die natürliche Vielfalt einer mikrobiellen Gemeinschaft im Boden ist so groß, dass sie mit einer praktikablen Monitoring-Methode bis heute nicht vollständig erfasst wer-

cides, organic pollutants, heavy metals) must be seen in relation to their natural dynamics. Equally, the extent of change in the composition of a microbial community does not directly relate to the degree of damage, since natural fluctuations, e.g., in the water content of the soil or due to the short-term availability of nutrients after fertilizing, can cause significant fluctuations in microbial diversity. The persistence of changes in microbial diversity (e.g., over a period of several years) provides a much better indicator of damage. Variability in the composition of microbial communities has also practical consequences when it comes to developing soil sampling strategies, e.g., should not be undertaken immediately after soil fertilization (see Section 6.1 and Section 6.2).

This VDI guideline sets out the basic principles and provides sample protocols for the extraction of nucleic acids from soil. Protocols with such an objective were first published in the late 1980s and have since been used increasingly in research laboratories, although they are still not widely applied for soil analysis in general.

Extracted nucleic acids are largely derived from soil microorganisms, but they may also contain fractions obtained from plant residues. Soil nucleic acids provide the source material for detecting microorganisms and determining their diversity but they can also be used to detect plants genes, for example transgenic DNA (recombinant genes) from genetically modified plants. For the purposes of characterising microbial diversity or detecting recombinant genes from GMOs, the nucleic acids extracted from the soil initially undergo polymerase chain reaction (PCR) analysis to amplify the respective targets of analysis.

Cultivation-independent approaches for characterizing microbial diversity from soil samples are always preferred to classic methods in which microorganisms are grown in or on nutrient containing media. Only a minor fraction (often less than 1 %) of soil microorganisms is capable of growing under conventional laboratory conditions. However, the significant potential of cultivation-independent detection methods also causes problems when the aim is to determine the total microbial diversity in the soil. The natural diversity of soil microbial communities is, in fact, so huge that no practical monitoring method has yet been devised to allow their complete determination. The detection of microorganisms which do not contribute to the dominant population is particularly

den kann. Insbesondere der Nachweis von Mikroorganismen, die nicht zu den dominanten Populationen gehören, ist problematisch und bleibt eine methodische Herausforderung. Im Rahmen dieser Richtlinie werden Verfahren vorgestellt, die es ermöglichen, die dominanten Bodenmikroorganismen sowie ausgewählte phylogenetische, also eng verwandte Gruppen, zu erfassen (siehe Abschnitt 6.5). Eine weitere für die Dateninterpretation zu berücksichtigende Limitierung besteht darin, dass die bodenextrahierten Nukleinsäuren auch aus ruhenden bzw. bereits abgestorbenen Zellen stammen können und somit ein Nachweis bestimmter Organismen aus einer Bodenprobe nicht automatisch ein Hinweis auf ihre in situ-Aktivität gibt.

Da die aus Boden extrahierten Nukleinsäuren im Prinzip die gesamte genetische Information der mikrobiellen Gemeinschaften beinhalten, kann mithilfe der PCR jedes beliebige Gen aus diesem genetischen Pool (dem Bodenmetagenom) nachgewiesen werden. Derartige Gene können als Indikatoren für die strukturelle oder funktionelle Vielfalt dienen. Die am häufigsten für die Untersuchung der strukturellen Vielfalt eingesetzten Zielgene sind die SSU-rRNA-Gene, die Bausteine für Ribosomen liefern. Ribosomen kommen in allen lebenden Organismen vor, da sie ein unverzichtbarer Bestandteil für die Proteinbiosynthese sind. Die SSU-rRNA-Gene aus verschiedenen Organismen zeigen eine relativ große Ähnlichkeit und der Vergleich der Gene mit Sequenzdaten bereits sequenzierter Mikroorganismen gibt Aufschluss über deren Verwandtschaft. Für Bakterien sind z.B. bis heute mehr als eine Million rRNA-Gene beschrieben, die in öffentlichen Datenbanken für Vergleichsuntersuchungen zur Verfügung stehen [1; 2]. Für die Charakterisierung der Vielfalt von Bodenpilzen empfehlen sich andere Zielgene oder andere genomische Abschnitte (z.B. sogenannte ITS-Region), da die SSU-rRNA-Gene verschiedener Arten sich nur geringfügig unterscheiden und damit keine genaue Zuordnung möglich ist [3]. Während sich aus der extrahierten Boden-DNA theoretisch alle vorhandenen Organismen nachweisen lassen, ermöglicht es die Analyse von RNA-Extrakten bevorzugt die stoffwechselaktiven und wachsenden Organismen nachzuweisen. Solche Organismen beherbergen in der Regel (aber nicht immer) deutlich mehr Ribosomen (und damit rRNA) in ihren Zellen als inaktive.

Ziel dieser Richtlinie ist es, die besonderen Anforderungen an Verfahren zur Extraktion von Bodennukleinsäuren für eine nachfolgende PCR-basierende Analytik herauszustellen. Auf die Bedeutung des Probenahmezeitpunkts wurde bereits hingewiesen. Außerdem ist eine einheitliche Probenaufbereitung und La-

problematic and remains a methodological challenge. This guideline presents methods for the detection of dominant soil microorganisms and selected phylogenetic (closely related) groups (see Section 6.5). A further limitation, which must be kept in mind when interpreting data, is that nucleic acids extracted from the soil may also be derived from resting cells or those which have already died, and therefore detection of specific genes from an organism in a soil sample does not automatically indicate its in situ activity.

Since the nucleic acids extracted from the soil basically contain the complete genetic information for the microbial communities, any gene from this genetic pool, which is today called the soil metagenome, can be detected by PCR analysis. Such genes can be used as indicators of structural and functional diversity. SSU rRNA genes, the building blocks of ribosomes, are the target genes most commonly used for investigating structural diversity. Ribosomes are found in all living organisms, as they are an essential component for protein biosynthesis. Since SSU rRNA genes from different organisms are largely similar, comparison of the genes with sequence data from microorganisms that have already been sequenced provides an indication of their phylogenetic relationship. For bacteria, for example, more than one million rRNA genes have been sequenced to date. These are stored in public databases and are available for comparative studies [1; 2]. It is advisable to use other target genes or other genomic segments (e. g. ITS region) to characterise the diversity of soil fungi, since the SSU rRNA genes of different species differ only slightly, making accurate classification impossible [3]. Whilst in theory it is possible to detect the presence of any organism from the DNA extracted from soil, analysis of RNA extracts is the preferred method for detecting metabolically active and growing organisms. The cells of these organisms generally (but not always) contain significantly more ribosomes (and therefore rRNA) than those of inactive organisms.

This guideline aims to describe the particular requirements of methods for extracting soil nucleic acids for subsequent PCR analysis. The importance of choosing the right the sampling time has already been mentioned. Consistent sample preparation and storage also has considerable consequences on the quality

gerung für die Qualität und Quantität der extrahierten Nukleinsäuren von großer Bedeutung. Weitere kritische Schritte beziehen sich auf den mikrobiellen Zellaufschluss und die Reinigung der Nukleinsäuren. Aufgrund der komplexen Anwendungsmöglichkeiten zur Untersuchung der Boden-Nukleinsäuren, die neben DNA auch RNA beinhalten können (siehe Abschnitt 6.3 und Abschnitt 6.4), ist es von zentraler Bedeutung, dass die Verfahren die Nukleinsäuren so wenig wie möglich zerstören. Fragmentierungen der DNA sind aufgrund des makromolekularen Aufbaus unvermeidbar, jedoch sollten Mindestanforderungen an die DNA-Fragmentgrößen beachtet werden.

Die Richtlinie bezieht sich auf die Untersuchung typischer landwirtschaftlich genutzter Böden, wie sie in Deutschland und vergleichbaren klimatischen Regionen in Europa vorkommen. Sie berücksichtigt im Detail nicht die Extraktion aus Böden oder Bodenkompartmenten mit einem sehr hohen Anteil an organischem Kohlenstoff (z. B. Streuschicht von Wald-Böden), einer besonders niedrigen Biomasse (z. B. tieferen Bodenhorizonten), hohen Salzgehalten, extremen pH-Werten oder Kontaminationen wie Schwermetallen. Auch aus derartigen Böden können Nukleinsäuren extrahiert werden, jedoch erfordert der Anspruch an eine zufriedenstellende Ausbeute und Qualität besondere methodische Anpassungen, auf die hier nicht eingegangen wird.

Zur Extraktion von Nukleinsäuren aus Bodenproben sind prinzipiell zwei methodische Alternativen anwendbar: Die direkte Extraktion und die Zellextraktion. Bei der direkten Extraktion werden die Zellen der Mikroorganismen zur Freisetzung ihrer Nukleinsäuren bereits direkt in der Bodenmatrix aufgeschlossen (lysiert), wobei die Nukleinsäuren anschließend von den übrigen Bodensubstanzen, insbesondere von Huminsäuren aufgrund ihrer Interferenz mit molekularen Nachweismethoden, zu reinigen sind [4]. Bei der Zellextraktion werden zunächst die Mikroorganismen-Zellen vom Bodenmaterial abgelöst und erst danach die Nukleinsäuren extrahiert. Diese Richtlinie gibt vor, dass bei Untersuchungen von Bodenproben die direkte Extraktion aufgrund ihrer hohen Ausbeute und Praktikabilität vorzuziehen ist. Eine Ausnahme bilden Untersuchungen von Pflanzenwurzel-assoziierten Bodenmikroorganismen (Rhizosphäre). Hier empfiehlt es sich, die Mikroorganismen zunächst durch mechanische Behandlung der in Wasser oder Puffern resuspendierten Wurzeln mit anhaftendem Boden abzulösen und vor der Nukleinsäure-Extraktion durch Zentrifugation als Mikroorganismen-pellet zu sammeln. Auch bei Untersuchungen von Böden, die mit Schwermetallen kontaminiert sind, ist die Zellextraktionsmethode vorzuziehen. Ansonsten

and quantity of the extracted nucleic acids. Microbial cell disruption and nucleic acid purification are also critical steps. Due to the complex range of applications associated with investigating soil nucleic acids, some of which may involve RNA as well as DNA (see Section 6.3 and Section 6.4), it is essential to ensure that the methods cause minimum damage to the nucleic acids. Fragmentation of the DNA is unavoidable due to its macromolecular structure, but nevertheless, there are minimum requirements for the length of DNA fragments.

The guideline relates to the analysis of typical agricultural soil as found in Germany and comparable climatic zones in Europe. It does not provide a detailed consideration of adjustments required for extraction of nucleic acids from soils or soil compartments containing particularly high levels of organic carbon (e.g. litter layer on forest floors), particularly low biomass (e.g. lower soil horizons), high salt levels, extreme pH values or heavy metal contamination.

For extracting nucleic acids from soil, two different methodological approaches can be distinguished: direct extraction and cell extraction. With “direct extraction”, the microbial cells are disrupted (lysed) directly in the soil matrix to release their nucleic acids. The nucleic acids are subsequently purified to remove residual soil substances, particularly humic acids, which interfere with molecular detection methods [4]. With “cell extraction” the microbial cells are separated from the other soil constituents before the nucleic acid is extracted. This guideline recommends using “direct extraction” for analysing soil samples because it produces higher yields and is more practical. Analyses of soil microorganisms associated with plant roots (rhizosphere) are an exception. In this case we recommend removing the microorganisms by resuspending the roots with adherent soil in water or buffers and pelletizing the microorganism by centrifugation prior to extracting the nucleic acid. “Cell extraction” is also the preferred option for analysing soils contaminated with heavy metals. Otherwise, heavy metals, which may be unavoidably co-extracted, make it difficult or even impossible to perform subsequent PCR analysis by inhibiting the enzymes, i.e., DNA polymerases [5].

können die möglicherweise unvermeidlich mitextrahierten Schwermetalle die anschließende PCR-Analytik durch Hemmungen der DNA-Polymerasen erschweren oder gänzlich verhindern [5].

Abschließend wird darauf hingewiesen, dass für die Extraktion von Bodennukleinsäuren eine Reihe von Aufarbeitungs-Kits mit entsprechenden Protokollen kommerziell zur Verfügung steht, und diese im angewandten Forschungs- und Analysebereich die herkömmlichen Protokolle mit selbst hergestellten Lösungen praktisch vollständig verdrängt haben. Um dem Anspruch an eine Praxistauglichkeit zu genügen, werden daher in dieser Richtlinie insbesondere derartige Kits berücksichtigt. Dem Anwender wird empfohlen, sich unabhängig von den in den hier beschriebenen Protokollen genutzten Kits einen aktuellen Marktüberblick zu verschaffen, um das für die vorgegebenen Untersuchungsziele beste Produkt zu identifizieren.

1 Anwendungsbereich

Die Richtlinie beschreibt Qualitätsanforderungen für die Untersuchung von landwirtschaftlich genutzten Böden, um die Wirkungen einer Freisetzung oder eines Anbaus von GVO und damit verbundener Landnutzungsänderungen auf Struktur und Funktion mikrobieller Gemeinschaften zu erfassen. Darüber hinaus kann die durch GVO in Böden eingetragene transgene DNA (mit rekombinanten Genen) qualitativ oder quantitativ nachgewiesen werden.

Die beschriebenen Methoden dienen der kultivierungsunabhängigen Analyse mikrobieller Gemeinschaften. Durch geeignete Extraktionsverfahren sollen die zu untersuchenden Nukleinsäuren in möglichst hochmolekularer Form aus unterschiedlichen Böden isoliert und von Begleitsubstanzen, die eine molekularbiologische Analyse hemmen können, gereinigt werden. Extraktionsverfahren müssen gegebenenfalls den spezifischen Eigenschaften eines Bodens angepasst werden. Die Definition eines Standardprotokolls für die Extraktion von DNA aus Boden erscheint nicht sinnvoll, denn oftmals variieren in Abhängigkeit von den Bodeneigenschaften die Ausbeute der extrahierten Nukleinsäuren, deren Molekulargewicht und die Konzentration mitextrahierter Bodeninhaltsstoffe. Diese Richtlinie beschreibt daher den modularen Aufbau von Extraktions- und Reinigungsprotokollen in Abhängigkeit der spezifischen Eigenschaft eines Bodens. Weiterhin ist es die Intention, für kritische Parameter der Extraktion und Reinigung Lösungsvorschläge zu liefern.

Für die Extraktion aus Böden kommen direkte Verfahren zum Einsatz, bei denen die Nukleinsäuren aus

In conclusion it should be noted that a range of soil nucleic acid extraction and purification kits with corresponding protocols are commercially available, and that in the field of applied research and analysis, these have almost entirely replaced conventional protocols using solutions that have been prepared in-house. To address the need for practical feasibility, this guideline will therefore focus primarily on such kits. Regardless of the kits used in the protocols described here, the user should first gain an overview about products on the market to identify the best the particular analytical requirements.

1 Scope

This guideline describes the quality requirements for the analysis of agricultural soils in order to determine the effects of the release or cultivation of GMOs and the associated changes in land use on the structure and function of microbial communities. Methods described also have the capacity to detect transgenic DNA (recombinant genes) entering soil through GMOs by qualitative or quantitative means.

The methods described relate to the cultivation-independent analysis of microbial communities. The aim is to isolate the nucleic acids with the highest possible molecular weight from different soils using suitable extraction methods and to purify them by removing any accompanying substances, which could impede molecular detection methods. Extraction methods must be adapted to the specific characteristics of the soil if necessary. We do not feel that it would be particularly helpful to define one standard protocol for the extraction of DNA from soil, since the yield of extracted nucleic acids, their molecular weight and the concentration of co-extracted soil components often vary depending on the soil characteristics. This guideline therefore describes in a modular structure the extraction and purification steps and protocols based on the specific characteristics of a given soil. It further aims to put forward proposals for dealing with critical extraction and purification parameters.

Direct nucleic acid extraction methods are used in this guideline for extraction from the soil matrix. This

der Bodenmatrix isoliert werden. Somit werden sowohl die mikrobielle zelluläre DNA bzw. rRNA als auch zellfreie DNA, die auch solche aus Pflanzenresten beinhalten kann, extrahiert. Um mikrobielle Gemeinschaften in der Rhizosphäre auf Grundlage ihrer SSU-rRNA-Gene zu untersuchen, wird die mikrobielle Fraktion zunächst durch Zentrifugation gewonnen und anschließend für die Nukleinsäureextraktion genutzt (Zellextraktion). Dadurch lässt sich eine Kontamination mit pflanzlichen Plastiden, die auch SSU-rRNA-Gene enthalten, weitgehend vermeiden. Der Nachweis anderer bakterieller Gene aus der Rhizosphäre kann auch mit direkt extrahierter DNA erfolgen.

approach includes the extraction of microbial cellular DNA and rRNA as well as cell-free DNA, including those originating from plant debris. In order to investigate microbial communities in the rhizosphere on the basis of their SSU rRNA genes, the microbial fraction is first obtained through centrifugation and subsequently used for nucleic acid extraction (indirect extraction, cell extraction method). This approach largely prevents contamination with plant plastids, which also contain SSU rRNA genes. Other bacterial genes from the rhizosphere can also be detected using directly extracted DNA.