

Leistungsbeschreibung und Wertungsmatrix für molekularbiologische und bioinformatische Analysen von Bodenproben im FORTUNA-Projekt

Verfasser: Johannes Hoffmann

Stand: 11.08.2026

1. Auftragsgegenstand und Verwendungszweck

Gegenstand des Auftrags ist die Aufbereitung sowie molekularbiologische und bioinformatische Untersuchung von Bodenproben einschließlich der Datenübergabe, einer Methodendokumentation und einer fachlichen Beratung. Die Daten dienen der wissenschaftlichen Untersuchungen zur Waldentwicklung nach borkenkäferbedingtem Fichtensterbe. Untersucht werden Pilz- und prokaryotische Gemeinschaften in lebenden Fichtenbeständen sowie auf Kalamitätsflächen unterschiedlicher Störungsintensität.

Die Kernleistungen umfassen:

- Probenaufbereitung nach Kap. 3;
- molekularbiologische Analysen nach Kap. 4 einschließlich DNA-Extraktion, ITS2- und 16S-rRNA-Gen Amplikonsequenzierung sowie qPCR;
- bioinformatische Verarbeitung sowie taxonomische und funktionelle Zuordnung nach Kap. 5;
- Datenübergabe und Dokumentation nach Kap. 6;
- fachliche Beratungen nach Kap. 7.

2. Probenmenge und Wertungspreis

Die verbindliche Mindestmenge beträgt 150 Untersuchungsproben. Der Auftraggeber kann weitere Untersuchungsproben bis zu einer Gesamtmenge von 300 beauftragen. Ein Anspruch des Auftragnehmers auf Beauftragung von mehr als 150 Untersuchungsproben besteht nicht.

Für die Mindestmenge ist ein Gesamtpreis, für jede zusätzliche Untersuchungsprobe ein Einheitspreis je Untersuchungsprobe gemäß Preisblatt anzugeben. Die Basisleistung umfasst die Leistungen nach Kap. 3 bis 8 einschließlich des in Kap 4.3 festgelegten Umfangs der Sequenzierung.

Höhere Umfänge bei einer Sequenzierung nach Kap. 4.3 können als gesonderte Zusatzoptionen ausgewiesen werden.

3. Probenaufbereitung

3.1 Untersuchungsmaterial, Eingangskontrolle und Lagerung

Die Untersuchungsproben werden in 45-ml Tubes gefroren übergeben.

Jede Untersuchungsprobe ist eine Teilprobe einer homogenisierten Mischprobe aus acht Bohrkernen. Nach Entfernung der lockeren OL-Auflage wurden je Bohrkern eine Tiefe von 0-10 cm beprobt. Diese Mischprobe umfasst damit Of-/Oh-Material sowie den innerhalb dieser Tiefe erfassten Ah-Anteil.

Die Proben-IDs sollen über alle Bearbeitungsschritte beibehalten bleiben. Bei Probeneingang sind Eingangsdatum, Zustand der Probe und Lagerbedingungen zu dokumentieren. Beschädigte, auffällige oder unklar gekennzeichnete sollen dem Auftraggeber möglichst binnen weniger Arbeitstage gemeldet und erst nach weiterer Klärung

weiter verarbeitet werden. Bis zur Verarbeitung sollen die Proben gefroren gelagert und wiederholte Auftauzyklen vermieden werden.

3.2 Masse, Trocknung und gravimetrischer Wassergehalt

Die Masse jeder Untersuchungsprobe soll vor und nach der Trocknung bestimmt und dokumentiert werden. Daraus soll der gravimetrische Wassergehalt bezogen auf die Trockenmasse und der Trockenmasseanteil der Untersuchungsprobe berechnet werden.

3.3 Entfernung von Grobbestandteilen sowie Homogenisierung und Aliquotierung

Nach der Trocknung sollen makroskopisch erkennbare und separierbare Wurzeln sowie größere Steine, Holz-, Rinden- und nicht zur Boden-/Humusmatrix gehörende Bestandteile nach einem einheitlichen Verfahren entfernt werden. Material der Of-/Oh-Anteile bleibt Bestandteil der Untersuchungsprobe.

Anschließend soll die Probe homogenisiert werden. Eine Siebung wird nicht zwingend vorgegeben. Sofern diese erfolgt, sind Maschenweite und Umgang mit Siebrückständen zu dokumentieren.

Aus dem homogenisierten Material sollen Aliquote für die DNA-Extraktion, bodenchemische Analysen und als Rückstellprobe gebildet werden. Die bodenchemischen Aliquote sollen bei Bedarf an ein anderes vom Auftraggeber benanntes Fachlabor weitergeleitet werden.

3.4 Angebotsdarstellung Q1: Probenaufbereitung

Darzustellen sind mindestens:

- Verfahren vom gefrorenen Probenmaterial bis zur Bildung der Aliquote, einschließlich des Umgangs mit Wurzeln, Steinen sowie Holz- und Rindenbestandteilen;
- gegebenenfalls vorgesehene Siebung einschließlich Maschenweite, Zeitpunkt der Siebung und Umgang mit Siebrückständen;
- Maßnahmen zur Vermeidung von Kreuzkontaminationen und Probenverwechslungen.

4. Molekularbiologische Analysen

4.1 DNA-Extraktion

Die DNA ist aus einer definierten Trockenmasse des nach Kap. 3 aufbereiteten und homogenisierten Aliquot zur DNA-Extraktion zu extrahieren. Das Verfahren muss für Proben aus humusreichen Waldböden geeignet sein.

Zu dokumentieren sind mindestens: eingesetzte Trockenmasse; Extraktionsverfahren; Elutionsvolumen; DNA-Konzentration und Messverfahren; ggf. erforderliche Verdünnungen oder Nachreinigungen; Kontrollen; technische Abweichungen und Wiederholungen.

Aus demselben primären DNA-Extrakt sollen folgende Aliquots gebildet werden:

- ITS2-Amplikonsequenzierung;
- 16S-rRNA-Gen-Amplikonsequenzierung;
- qPCR Pilze;
- qPCR Bakterien;
- Rückstellprobe.

Die Bildung von Chargen zur Verarbeitung darf nicht systematisch mit Block oder Behandlung zusammenfallen.

4.2 ITS2- und 16S-rRNA-Gen Amplikonsequenzierung

Für die Pilzgemeinschaften ist die ITS2-Region, für prokaryotische Gemeinschaften eine fachlich geeignete Zielregion des 16S-rRNA-Gens zu amplifizieren und zu sequenzieren.

Für beide Marker sollen geeignete Primerpaare mit dokumentierter Literatur- oder Validierungsgrundlage genutzt werden. Sequenziermodus und Leselänge sollen an Zielregion und Primerpaar angepasst werden und müssen eine ASV-basierte Verarbeitung ermöglichen.

Zu dokumentieren sind mindestens: Zielregion und Primer einschließlich Primersequenzen; wesentliche PCR Parameter und Bibliotheken; technische Replikate; Sequenzierplattform, Sequenziermodus und Leselänge; Kontrollen und technische Abweichungen.

4.3 Sequenzierungsumfang

Für jede Untersuchungsprobe sollten für ITS2 und 16S jeweils separate Amplikon-Bibliotheken erstellt werden. In der Basisleistung sind je Amplikon-Bibliothek mindestens 25.000 Read-Paare nach dem Demultiplexing vorgesehen.

Ein Read-Paar umfasst die Reads R1 und R2 desselben sequenzierten DNA-Fragments. Der Mindestumfang bezieht sich auf die Zahl der Read-Paare, die nach dem Demultiplexing eindeutig der jeweiligen Amplikon-Bibliothek zugeordnet sind und vor der bioinformatischen Verarbeitung (Kap. 5) vorliegen

Als optionale Zusatzleistung können höhere Umfänge an Read-Paaren angeboten werden.

Die tatsächlich erreichte Zahl dieser Read-Paare ist für jede Bibliothek zu dokumentieren. Unterschreitungen sind dem Auftraggeber unter Angabe der wahrscheinlichen Ursache mitzuteilen und das weitere Vorgehen entsprechend abzustimmen.

4.4 Quantitative Echtzeit-PCR (qPCR)

Aus dem DNA-Extrakt jeder Untersuchungsprobe soll eine qPCR zur Quantifizierung pilzlicher und bakterieller Zielsequenzen durchgeführt werden. Die Assays sollen eine Kalibrierung, technische Replikate, Kontrollen sowie eine Prüfung auf PCR-Inhibition umfassen.

Zu übergeben sind mindestens die Cq-Werte der Einzelreaktionen und die daraus ermittelten Kopienzahl der jeweiligen Zielsequenz. Die Ergebnisse sind unter Berücksichtigung von der eingesetzten Trockenmasse, des Templatevolumens und ggf. Verdünnungen als Zielsequenzkopien pro Gramm Trockenmasse anzugeben.

Für jeden Assay sollen mindestens dokumentiert werden: Zielregion und Primer; Anzahl technischer Replikate; Kalibrierstandard und Kalibrierkurve einschließlich der Kennwerte; Inhibitionsprüfung; Wiederholungen und Ausschlüsse.

4.5 Angebotsdarstellung (Q2): molekularbiologische Analysen

Im Angebot soll die vorgesehene Umsetzung der Anforderungen aus den Abschnitten 4.1 bis 4.4 dargestellt werden. Mindestens anzugeben sind:

- DNA-Extraktion: Extraktionsverfahren einschließlich der Menge je Extraktion, Eignung für die in Kapitel 3 definierten Untersuchungsproben, Umgang mit möglicher PCR-Inhibition;

- ITS2- und 16S-rRNA-Gen Amplikonsequenzierung: Zielregionen und Primerpaare einschließlich Literatur- oder Validierungsgrundlage, technische PCR-Replikate, Sequenzierplattform, Sequenziermodus, Leselänge und Kontrollen;
- Sequenzierungsumfang: Mindestumfang an Read-Paaren nach dem Demultiplexing je Amplikon-Bibliothek (Definition Kap 4.3) sowie angebotene Optionen für höhere Mindestumfänge.
 - Falls bereits als Basisleistung höhere Werte als die geforderte Mindestzahl an Read-Paaren vorgesehen sind, ist dieser anzugeben. Eine Unterschreitung der Mindestzahl ist fachlich zu begründen.
 - Nach Möglichkeit kann eine erwartete Zahl der Sequenzen angegeben werden, die in die finale ASV-Tabelle eingehen.
- qPCR: vorgesehene Assays einschließlich Zielregion, Primer, Literatur- oder Validierungsgrundlage, technische Replikate, Kalibrierungsstrategie sowie Vorgehen bei PCR-Inhibition und technisch nicht belastbaren Messungen.

5. Bioinformatik, taxonomische und ökologische Annotation

Die Sequenzdaten sind mit einem fachlich geeigneten ASV-basierten Verfahren weiter zu verarbeiten (z.B. DADA2). Das verwendete Verfahren ist einschließlich Software, Versionen und wesentlicher Parameter nachvollziehbar darzustellen. Die Verarbeitung muss eine Erstellung der ASV-Tabelle sowie die Prüfung auf Kontamination und Nicht-Zielsequenzen umfassen.

Für jede Probe soll ein Read-Tracking über alle Verarbeitungsschritte erstellt werden inkl. relevanter Verluste im Verlauf und die finale Summe der Reads in der ASV-Tabelle.

Für die taxonomische Zuordnung sind aktuelle und fachlich geeignete Referenzdatenbanken zu verwenden (z.B. UNITE). Verwendete Datenbanken bzw. Versionen sollen dokumentiert werden. Für die Pilzdaten sind zusätzlich ökologische Annotationen vorzunehmen (z.B. FUNGuild, FungalTraits oder fachlich vergleichbare Datenbanken). Mindestens berücksichtigt werden sollen dabei Mykorrhiza (inkl. Ekto- und Endomykorrhiza), saprotrophe und pathogene Pilze.

Weitere Filter (z.B. Entfernung von nicht Ziel-Sequenzen) sind im Read-Tracking zu berücksichtigen. Proben mit auffällig hohen Read-Verlusten im Verlauf der Verarbeitung bzw. Proben mit einer auffällig geringen finalen Read-Zahl sollten gekennzeichnet, geprüft und ggf. erneut sequenziert werden.

5.1 Angebotsdarstellung (Q3): Bioinformatik und taxonomische Zuordnung

Im Angebot darzustellen sind u.a.:

- Vorgesehenes Verfahren und Arbeitsablauf der bioinformatischen Auswertung;
- Prüfung von Kontaminationen und Nicht-Zielsequenzen;
- Vorgesehene Read-Tracking;
- Vorgesehene Referenzdatenbanken und Verfahren der taxonomischen Zuordnung
- Vorgehen für ökologische Annotationen

6. Datenübergabe und Dokumentation von Methoden

6.1 Datenübergabe

Alle Ergebnis-, Prozess- und Qualitätsdaten sind anhand Proben-, Marker-, Bibliotheks- und ASV-Kennung zu kennzeichnen und zu übergeben. Alle in den vorangegangenen Kapiteln beschriebenen probenspezifischen Daten sind mit einzubeziehen.

Darunter fallen beispielsweise:

- FASTQ-Dateien je Amplikon-Bibliothek;
- ASV-Sequenzen im FASTA-Format und eine ASV-Tabelle mit nicht normalisierten Reads;
- taxonomische Zuordnungen bzw. ökologische Annotationen einschließlich verfügbarer Konfidenzangaben;
- Read-Tracking und Ergebnisse der Kontrollen einschließlich Bewertung potenzieller Kontamination;
- qPCR-Rohdaten einschließlich Cq-Werten und Kalibrierungsdaten
- Mess- und Prozessdaten nach Kap. 3 und 4;
- Zuordnungstabelle, über die Proben, Marker, Bibliotheken, Kontrollen und Dateien.

Tabellarische Daten sollen in offenen Formaten wie CSV übergeben werden.

6.2 Methoden- und Qualitätsbericht

Die in Kap. 3 bis 5 erwarteten Leistungen sollen in einem Methoden- und Qualitätsbericht zusammen dargestellt werden. Dieser muss den tatsächlich durchgeführten Arbeitsablauf nachvollziehbar dokumentieren, einschließlich relevanter Abweichungen, Wiederholungen und Ausschlüsse. Probenbezogene Mess- und Prozessdaten sind zusätzlich tabellarisch zu übergeben.

6.3 Angebotsdarstellung (Q4): Datenübergabe sowie Dokumentation von Methoden und Qualität.

Im Angebot sind die vorgesehenen Datenübergabe sowie Form und Umfang der Methoden- und Qualitätsdokumentation darzustellen.

7. Fachliche Beratung

Die fachliche Beratung umfasst mindestens ein Auftaktgespräch, eine Zwischenbesprechung und ein Abschlussgespräch über insgesamt mindestens sechs Stunden.

Darin sollen die Methoden, Datenqualität, technische Auffälligkeiten, Interpretationsgrenzen der molekularbiologischen und bioinformatischen Ergebnisse, Unsicherheiten taxonomischer und ökologischer Zuordnungen sowie die fachliche Eignung der bereitgestellten Daten für die vorgesehene ökologische Auswertung besprochen werden.

7.1 Angebotsdarstellung (Q5):

Im Angebot soll der Umfang der fachlichen Beratung dargestellt werden, die vorgesehenen Besprechungsformate und die fachlichen Schwerpunkte.

8. Auftragsbezogene Erfahrung und Qualifikation

Mindestens drei geeignete Referenzen müssen über vergleichbare molekularbiologische Untersuchungen nachgewiesen werden. Die Referenzen sollen insbesondere Erfahrungen mit DNA-Metabarcoding von Boden- oder vergleichbaren Umweltproben, Pilz- und/oder prokaryotischen Gemeinschaften sowie bioinformatischer Auswertung in Waldökosystemen,

einschließlich taxonomischer, funktioneller und ökologischer Interpretation der Ergebnisse nachweisen. Erfahrungen aus Großschutzgebieten, Nationalparks, Naturwaldreservaten oder vergleichbaren naturnahen Waldkontexten sind gesondert anzugeben.

8.1 Angebotsdarstellung (Q6): Erfahrung und Qualifikation

Für die Qualitätsbewertung sind drei für den vorliegenden Auftrag fachlich relevantesten Referenzprojekte nach Kap. 8 darzustellen. Bewertet werden die fachliche Vergleichbarkeit und Relevanz der Referenzprojekte für den vorliegenden Auftrag sowie die Erfahrung der vorgesehenen fachlich verantwortlichen Personen. Dabei werden insbesondere Erfahrungen berücksichtigt:

- mit DNA-Metabarcoding von Bodenproben und den relevanten Organismengruppen;
- mit Bodenpilzen/Mykorrhiza und Waldökosystemen;
- mit Waldstörung, Sukzession und Totholz;
- mit taxonomischer Auswertung sowie funktioneller bzw. ökologischer Annotation und Interpretation;
- in Großschutzgebieten oder vergleichbaren naturnahen Waldkontexten.

Teil C – Wertungsmatrix

	Max. Rohpunkte	Gewichtung / %	Max. Gesamtpunkte
Wertungspreis	5	20	20
Q1 (Kap. 3) Proben- aufbereitung	5	5	5
Q2 (Kap. 4) molekularbiol. Analysen	5	15	15
Q3 (Kap. 5) Bioinformatik & Taxonomie	5	15	15
Q4 (Kap. 6) Datenübergabe & Dokumentation	5	5	5
Q5 (Kap. 7) fachliche Beratung	5	20	20
Q6 (Kap. 8) Erfahrung und Qualifikation	5	20	20
Gesamt		100	100

Preiswertung

Für die Preiswertung werden der Gesamtpreis für die verbindliche Mindestmenge von 150 Untersuchungsproben mit 40 % und der rechnerische Gesamtpreis bei vollständigem Abruf von 300 Untersuchungsproben mit 60 % berücksichtigt.

Der Wertungspreis ergibt sich aus:

$$P_{\text{Wertung}_i} = 0,4 \cdot P_{150_i} + 0,6 \cdot P_{300_i}$$

mit

$$P_{300_i} = P_{150_i} + 150 \cdot EP_{151-300_i} \quad (EP := \text{Einzelpreis für 151 – 300 Proben})$$

Das Angebot mit dem niedrigsten Wertungspreis erhält 5 Rohpunkte. Die übrigen Angebote erhalten proportional:

$$\text{Rohpunkte}_{\text{Preis}_i} = 5 \cdot \frac{P_{\text{Wertung}_{\min}}}{P_{\text{Wertung}_i}}$$

Die gewichteten Punkte für das Zuschlagskriterium Preis berechnen sich anschließend wie bei den Qualitätskriterien:

$$GP_{\text{Preis},i} = \frac{RP_{\text{Preis},i}}{5} \cdot 20$$

Qualitäts-Kriterien (Q1-Q6)

Die Rohpunkte bewerten die Qualität der im jeweiligen Zuschlagskriterium Q1-Q8 geforderten Darstellung bzw. angebotenen Umsetzung. Jedes Qualitätskriterium wird mit 0 bis 5 Rohpunkten bewertet. Maßgeblich sind die jeweiligen beschriebenen Bewertungsmerkmale und der dort angegebene Erwartungshorizont.

5 Rohpunkte = Die Bewertungsmerkmale sind vollständig, fachlich überzeugend, konkret und auftragsbezogen dargestellt. Es bestehen keine relevanten qualitativen Einschränkungen

4 Rohpunkte = Die Bewertungsmerkmale werden weitgehend überzeugend dargestellt. Es bestehen nur geringfügige qualitative Einschränkungen.

3 Rohpunkte = Die Darstellung ist insgesamt fachlich schlüssig und erfüllt die Bewertungsmerkmale, weist jedoch erkennbare qualitative Einschränkungen auf.

2 Rohpunkte = Die Darstellung erfüllt die Bewertungsmerkmale teilweise, weist jedoch deutliche qualitative Schwächen, Lücken oder Unklarheiten auf.

1 Rohpunkt = Die Darstellung weist erhebliche qualitative Schwächen, Lücken oder Unklarheiten auf und erfüllt den Erwartungshorizont nur in geringem Umfang

0 Rohpunkte = Die Darstellung lässt keine Bewertung anhand der beschriebenen Bewertungsmerkmale zu