

# E DIN EN ISO 17601:2024-09 (D/E)

Erscheinungsdatum: 2024-08-09

**Bodenbeschaffenheit - Ermittlung der Häufigkeit ausgewählter mikrobieller Gensequenzen durch quantitative PCR aus DNA-Boden-Extrakten (ISO/DIS 17601:2024); Deutsche und Englische Fassung prEN ISO 17601:2024**

**Soil quality - Estimation of abundance of selected microbial gene sequences by quantitative PCR from DNA directly extracted from soil (ISO/DIS 17601:2024); German and English version prEN ISO 17601:2024**

---

<b>Inhalt</b>	<b>Seite</b>
Europäisches Vorwort.....	8
Vorwort.....	9
Einleitung.....	10
1 Anwendungsbereich.....	11
2 Normative Verweisungen.....	11
3 Begriffe.....	11
4 Kurzbeschreibung.....	12
5 Prüfmaterialien.....	14
5.1 DNA.....	14
5.2 Bakterien.....	14
5.3 Plasmid.....	14
5.4 Enzym.....	14
5.5 Chemikalien.....	15
5.6 Komponenten für ein Bakterien-Nährmedium.....	15
5.7 Pufferlösungen und Reagenzien.....	15
6 Prüfeinrichtung.....	16
7 Durchführung.....	17
7.1 Herstellung des qPCR-Standards und Kalibrierung der qPCR-Analyse (Aufgabe 1).....	17
7.1.1 Allgemeines.....	17
7.1.2 Amplifikat-Entwicklung (Aufgabe 1, Schritt 1).....	17
7.1.3 Herstellung des qPCR-Standards (Aufgabe 1, Schritt 2).....	17
7.1.4 DNA aus Isolaten und Umweltproben, künstliche DNA.....	18
7.1.5 Kalibrierung der qPCR (Aufgabe 1, Schritt 3).....	20
7.2 Herstellung der Boden-DNA-Matrize und Hemm-Test (Aufgabe 2).....	21
7.2.1 Allgemeines.....	21
7.2.2 Aufbereitung von Boden-DNA (Aufgabe 2, Schritt 4).....	21
7.2.3 Hemm-Test (Aufgabe 2, Schritt 5).....	21
7.2.4 Verdünnung der DNA-Matrize.....	23
7.3 qPCR-Analyse (Aufgabe 3).....	23
7.3.1 Allgemeines.....	23
7.3.2 qPCR.....	24
7.4 Validierung und Analyse der qPCR-Analyse (Aufgabe 4).....	24
7.4.1 Allgemeines.....	24
7.4.2 Validierung der qPCR-Analyse.....	24
7.4.3 Berechnung der Kopienzahl des interessierenden Gens im Boden-DNA-Extrakt.....	24
8 Untersuchung der kritischen Schritte der qPCR-Analyse.....	25

9	Angabe der Ergebnisse der qPCR-Analyse .....	26
10	Internationaler Ringversuch .....	26
11	Prüfbericht .....	26
Anhang A (informativ) Beschreibung der wichtigsten Schritte einer TaqMan® qPCR-Analyse.....		27
A.1	Allgemeines.....	27
A.2	Herstellung des qPCR-Standards und Kalibrierung (Aufgabe 1).....	27
A.2.1	Amplifikat-Entwicklung (Aufgabe 1, Schritt 1).....	27
A.2.2	Kalibrierung der qPCR-Analyse (Aufgabe 1, Schritt 3).....	27
A.3	qPCR-Analyse (Aufgabe 3).....	28
A.4	Validierung und Analyse der qPCR-Analyse (Aufgabe 4).....	28
Anhang B (informativ) Internationaler Ringversuch zur Bewertung einer qPCR zur quantitativen Bestimmung der Häufigkeit ausgewählter mikrobieller Gensequenzen aus direkt aus dem Boden extrahierter DNA .....		29
B.1	Am Ringversuch beteiligte Laboratorien .....	29
B.2	Organisation des Ringversuchs .....	29
B.3	Material und Verfahren.....	30
B.3.1	Böden .....	30
B.3.2	Extraktion, Aufreinigung und quantitative Bestimmung von Boden-DNA sowie Hemm- Test .....	30
B.3.3	Quantitative qPCR-Analyse .....	31
B.3.4	Statistische Analysen .....	32
B.4	Ergebnisse .....	32
B.4.1	Analyse der Standardkurven für die qPCR von <i>16S-rRNA</i> und <i>nirK</i> .....	32
B.4.2	Wiederholpräzision von qPCR-Analysen.....	35
B.4.3	Vergleichpräzision von qPCR-Analysen.....	38
B.4.4	Vergleich der in den verschiedenen Böden quantitativ bestimmten Kopienzahlen der <i>16S-rRNA</i> - und <i>nirK</i> -Sequenz .....	41
B.5	Schlussfolgerungen und Empfehlungen.....	42
B.5.1	Schlussfolgerungen.....	42
B.5.2	Empfehlungen .....	43
Anhang C (informativ) Beispiele gängiger Primer-Systeme für eine qPCR-basierte quantitative Bestimmung von Marker-Genen in Bodenproben.....		44
C.1	Anwendungsbereich.....	44
C.2	Marker-Gene zur quantitativen Bestimmung wichtiger struktureller Komponenten des Boden-Mikrobioms .....	44
C.2.1	Marker-Gene zur quantitativen Bestimmung von Bakterien und Archaea.....	44
C.3	Marker-Gene zur quantitativen Bestimmung von wichtigen funktionellen Gruppen.....	44
C.3.1	Marker-Gene für wichtige funktionelle Gruppen, die am Stickstoffumsatz im Boden beteiligt sind .....	44
C.4	Zusammenfassung der wichtigsten Merkmale der Analysen .....	45
Literaturhinweise .....		48
<b>Bilder</b>		
<b>Bild 1 — Hauptaufgaben und kritische Schritte bei der Schätzung der Häufigkeit ausgewählter mikrobieller Gensequenzen mittels qPCR.....</b>		<b>13</b>
<b>Bild 2 — Ergebnisse des Hemm-Tests, durchgeführt mittels qPCR-Analyse, die auf den SP6-T7- Bereich des pGEM-T-Plasmids abzielt, das in bekannter Menge zu Boden-DNA- Extrakten hinzugegeben wurde.....</b>		<b>23</b>
<b>Bild B.1 — Box-Whisker-Plots, die die Verteilung der Parameter der Standardkurven (Steigung, Y-Achsenabschnitt und R<sup>2</sup>) und der Effizienz der qPCR-Analyse darstellen, gemessen</b>		

von den sechs am Ringversuch zu qPCR-Analysen für <i>16S-rRNA</i> (16S) und <i>nirK</i> (nirK) beteiligten Laboratorien .....	32
<b>Bild B.2</b> — Mittelwerte der Parameter der Standardkurven (Steigung, Y-Achsenabschnitt und R <sup>2</sup> ) und der Effizienz der qPCR-Analyse, gemessen von den sechs am Ringversuch zu qPCR-Analysen für <i>16S-rRNA</i> (blau) und <i>nirK</i> (braun) beteiligten Laboratorien.....	35
<b>Bild B.3</b> — Quantitative Bestimmung der Kopienzahl von <i>16S-rRNA</i> in den sechs untersuchten Böden (Viseu, Gargalianoi, La Piacenza, Limagne, Pierrelaye und Thessaloniki) durch die sechs Laboratorien (A bis F) .....	39
<b>Bild B.4</b> — Quantitative Bestimmung der Kopienzahl der <i>nirK</i> -Sequenz in den sechs untersuchten Böden (Viseu, Gargalianoi, La Piacenza, Limagne, Pierrelaye und Thessaloniki) durch die sechs Laboratorien (A bis F).....	39
 <b>Tabellen</b>	
<b>Tabelle B.1</b> — Liste von verwendeten qPCR-Geräten, qPCR-Kits und der Verwendung von T4Gp32 durch die jeweiligen am Ringversuch zu ISO 17601 beteiligten Laboratorien.....	29
<b>Tabelle B.2</b> — Physikalisch-chemische Eigenschaften von für den Ringversuch zu ISO 17601 verwendeten Böden.....	30
<b>Tabelle B.3</b> — Primerpaare, die zur Amplifikation der Sequenzen von pGEM-T, <i>16S-rRNA</i> und <i>nirK</i> durch qPCR verwendet wurden.....	31
<b>Tabelle B.4</b> — Statistische Analysen der Wiederholpräzision von qPCR-Analysen für <i>16S-rRNA</i> (unabhängig von der betrachteten Boden-DNA), durchgeführt mittels ANOVA ( $\alpha = 0,05$ ) an den Mittelwerten des log (Kopienzahl von <i>16S-rRNA</i> je 0,2 ng Boden-DNA).....	35
<b>Tabelle B.5</b> — Statistische Analysen der Wiederholpräzision von qPCR-Analysen für <i>nirK</i> (unabhängig von der betrachteten Boden-DNA), durchgeführt mittels ANOVA ( $\alpha = 0,05$ ) an den Mittelwerten des log (Kopienzahl von <i>nirK</i> je 0,2 ng Boden-DNA).....	37
<b>Tabelle B.6</b> — Einstufung des Bodens in eine Rangordnung entsprechend den von den verschiedenen Laboratorien (A bis F) erhaltenen Häufigkeiten von <i>16S-rRNA</i> [vom niedrigsten (oben in der Tabelle) bis zum höchsten (unten in der Tabelle) Wert]. Der in Klammern angegebene Buchstabe gibt die statistische Gruppe an .....	41
<b>Tabelle B.7</b> — Einstufung des Bodens in eine Rangordnung entsprechend den von den verschiedenen Laboratorien (A bis F) erhaltenen Häufigkeiten von <i>nirK</i> [vom niedrigsten (oben in der Tabelle) bis zum höchsten (unten in der Tabelle) Wert]. Der in Klammern angegebene Buchstabe gibt die statistische Gruppe an; unterschiedliche Buchstaben weisen auf signifikante Unterschiede hin.....	42
<b>Tabelle A.1</b> — Einzelheiten zu den vorgeschlagenen Primer-Systemen zum Erhalt ausgewählter Marker-Gene .....	46