

DIN EN ISO 17601:2026-06 (D)

Bodenbeschaffenheit - Ermittlung der Häufigkeit ausgewählter mikrobieller Gensequenzen durch quantitative PCR aus DNA-Boden-Extrakten (ISO 17601:2025); Deutsche Fassung EN ISO 17601:2025

Inhalt	Seite
Europäisches Vorwort.....	7
Vorwort.....	8
Einleitung.....	9
1 Anwendungsbereich.....	10
2 Normative Verweisungen.....	10
3 Begriffe.....	10
4 Kurzbeschreibung.....	11
5 Prüfmaterialien.....	13
5.1 DNA.....	13
5.2 Bakterien.....	13
5.3 Plasmid.....	13
5.4 Enzyme.....	13
5.5 Chemikalien.....	14
5.6 Komponenten für ein Bakterien-Nährmedium.....	14
5.7 Pufferlösungen und Reagenzien.....	14
6 Prüfeinrichtung.....	15
7 Durchführung.....	15
7.1 Herstellung des qPCR-Standards und Kalibrierung der qPCR-Analyse (Aufgabe 1).....	15
7.1.1 Allgemeines.....	15
7.1.2 Amplifikat-Entwicklung (Aufgabe 1, Schritt 1).....	16
7.1.3 Herstellung des qPCR-Standards (Aufgabe 1, Schritt 2).....	16
7.1.4 DNA aus Bakterien-Isolaten und Umweltproben, künstliche DNA.....	16
7.1.5 Kalibrierung der qPCR-Analyse (Aufgabe 1, Schritt 3).....	19
7.2 Herstellung der Boden-DNA-Matrize und Hemm-Test (Aufgabe 2).....	20
7.2.1 Allgemeines.....	20
7.2.2 Aufbereitung von Boden-DNA (Aufgabe 2, Schritt 4).....	20
7.2.3 Hemm-Test (Aufgabe 2, Schritt 5).....	21
7.3 qPCR-Analyse (Aufgabe 3).....	23
7.3.1 Allgemeines.....	23
7.3.2 qPCR (Aufgabe 3, Schritt 6).....	23
7.4 Validierung und Analyse der qPCR-Analyse (Aufgabe 4).....	23
7.4.1 Allgemeines.....	23
7.4.2 Validierung der qPCR-Analyse (Aufgabe 4, Schritt 7).....	23
7.4.3 Berechnung der Kopienzahl des interessierenden Gens im Boden-DNA-Extrakt (Aufgabe 4, Schritt 8).....	24
8 Untersuchung der kritischen Schritte der qPCR-Analyse.....	25
9 Angabe der Ergebnisse der qPCR-Analyse.....	25
10 Internationaler Ringversuch.....	25
11 Prüfbericht.....	25

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 Allgemeines.....	27
A.2.2 Amplifikat-Entwicklung (Aufgabe 1, Schritt 1).....	27
A.2.3 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.....	43
B.5.1 Schlussfolgerungen.....	43
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 Allgemeines.....	44
C.2 Marker-Gene zur quantitativen Bestimmung wichtiger struktureller Komponenten und	
wichtiger funktioneller Gruppen des Boden-Mikrobioms	44
C.2.1 Marker-Gene für wichtige funktionelle Gruppen, die am Stickstoffumsatz im Boden	
beteiligt sind	44
C.2.2 Marker-Gene zur quantitativen Bestimmung von Bakterien und Archaea.....	45
C.3 Zusammenfassung der wichtigsten Merkmale der Analysen	45
Literaturhinweise	47

Bilder

Bild 1 — Hauptaufgaben und kritische Schritte bei der Schätzung der Häufigkeit ausgewählter	
mikrobieller Gensequenzen mittels qPCR.....	12
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.....	22
Bild B.1 — Box-Whisker-Plots, die die Verteilung der Parameter der Standardkurven (Steigung,	
Y-Achsenabschnitt und r^2) und der Effizienz der qPCR-Analyse darstellen, gemessen	
von den sechs am Ringversuch zu qPCR-Analysen für <i>16S-rRNA</i> (16S) und <i>nirK</i> (nirK)	
beteiligten Laboratorien	33
Bild B.2 — Mittelwerte plus/minus Standardabweichung der Parameter der Standardkurven	
(Steigung, Y-Achsenabschnitt und r^2) und der Effizienz der qPCR-Analyse, gemessen	

von den sechs am Ringversuch zu qPCR-Analysen für 16S-rRNA und nirK beteiligten Laboratorien	34
Bild B.3 — Quantitative Bestimmung der Kopienzahl von <i>16S-rRNA</i> in den sechs untersuchten Böden durch die sechs Laboratorien (A bis F)	39
Bild B.4 — Quantitative Bestimmung der Kopienzahl der <i>nirK</i> -Sequenz in den sechs untersuchten Böden durch die sechs Laboratorien (A bis F)	40
Tabellen	
Tabelle B.1 — Liste von verwendeten Thermocyclern, qPCR-Kits und der Verwendung von T4gp32 durch die jeweiligen am Ringversuch beteiligten Laboratorien.....	29
Tabelle B.2 — Physikalisch-chemische Eigenschaften von für den Ringversuch verwendeten Böden.....	30
Tabelle B.3 — Primerpaare, die zur Amplifikation der Sequenzen von pGEM-T, <i>16S-rRNA</i> und <i>nirK</i> durch qPCR verwendet wurden.....	31
Tabelle B.4 — Statistische Analysen der Wiederholpräzision von qPCR-Analysen für <i>16S-rRNA</i> (unabhängig von der betrachteten Boden-DNA).....	35
Tabelle B.5 — Statistische Analysen der Wiederholpräzision von qPCR-Analysen für <i>nirK</i> (unabhängig von der betrachteten Boden-DNA).....	36
Tabelle B.6 — Einstufung der Böden in eine Rangordnung entsprechend den von den verschiedenen Laboratorien (A bis F) erhaltenen Häufigkeiten von <i>16S-rRNA</i>	41
Tabelle B.7 — Einstufung der Böden in eine Rangordnung entsprechend den von den verschiedenen Laboratorien ermittelten <i>nirK</i> -Häufigkeiten (A bis E).....	42
Tabelle C.1 — Einzelheiten zu den vorgeschlagenen Primer-Systemen zum Erhalt ausgewählter Marker-Gene	46