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 *16S-rRNA* und *nirK* 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 *16S-rRNA*- und *nirK*-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 *16S-rRNA* (16S) und *nirK* (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 *16S-rRNA* in den sechs untersuchten Böden durch die sechs Laboratorien (A bis F) 39

Bild B.4 — Quantitative Bestimmung der Kopienzahl der *nirK*-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, *16S-rRNA* und *nirK* durch qPCR verwendet wurden 31

Tabelle B.4 — Statistische Analysen der Wiederholpräzision von qPCR-Analysen für *16S-rRNA* (unabhängig von der betrachteten Boden-DNA) 35

Tabelle B.5 — Statistische Analysen der Wiederholpräzision von qPCR-Analysen für *nirK* (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 *16S-rRNA* 41

Tabelle B.7 — Einstufung der Böden in eine Rangordnung entsprechend den von den verschiedenen Laboratorien ermittelten *nirK*-Häufigkeiten (A bis E) 42

Tabelle C.1 — Einzelheiten zu den vorgeschlagenen Primer-Systemen zum Erhalt ausgewählter Marker-Gene 46