

# 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**

---

<b>Inhalt</b>	<b>Seite</b>
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

<b>Anhang A (informativ) Beschreibung der wichtigsten Schritte einer TaqMan® qPCR-Analyse.....</b>	<b>27</b>
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
<b>Anhang B (informativ) Internationaler Ringversuch zur Bewertung einer qPCR zur</b>	
<b>quantitativen Bestimmung der Häufigkeit ausgewählter mikrobieller Gensequenzen aus</b>	
<b>direkt aus dem Boden extrahierter DNA .....</b>	<b>29</b>
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
<b>Anhang C (informativ) Beispiele gängiger Primer-Systeme für eine qPCR-basierte quantitative</b>	
<b>Bestimmung von Marker-Genen in Bodenproben.....</b>	<b>44</b>
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

<b>Bild 1 — Hauptaufgaben und kritische Schritte bei der Schätzung der Häufigkeit ausgewählter</b>	
<b>mikrobieller Gensequenzen mittels qPCR.....</b>	<b>12</b>
<b>Bild 2 — Ergebnisse des Hemm-Tests, durchgeführt mittels qPCR-Analyse, die auf den SP6-T7-</b>	
<b>Bereich des pGEM-T-Plasmids abzielt, das in bekannter Menge zu Boden-DNA-</b>	
<b>Extrakten hinzugegeben wurde.....</b>	<b>22</b>
<b>Bild B.1 — Box-Whisker-Plots, die die Verteilung der Parameter der Standardkurven (Steigung,</b>	
<b>Y-Achsenabschnitt und <math>r^2</math>) und der Effizienz der qPCR-Analyse darstellen, gemessen</b>	
<b>von den sechs am Ringversuch zu qPCR-Analysen für <i>16S-rRNA</i> (16S) und <i>nirK</i> (nirK)</b>	
<b>beteiligten Laboratorien .....</b>	<b>33</b>
<b>Bild B.2 — Mittelwerte plus/minus Standardabweichung der Parameter der Standardkurven</b>	
<b>(Steigung, Y-Achsenabschnitt und <math>r^2</math>) und der Effizienz der qPCR-Analyse, gemessen</b>	

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