ICS 07.100.01
CCS A40

T/SSSC

中 国 土 壤 学 会 团 体 标 准

T/SSSC 0 —2026

蚯蚓肠道细菌群落组成分析技术规范

Technical Specifications for Extraction and Analysis of Gut Bacterial Communities from Earthworms

（征求意见稿）

2026-XX-XX 发布　　2026-XX-XX 实施

中 国 土 壤 学 会　发 布

目　　次

前　言 III
1 范围 1
2 规范性引用文件 1
3 术语、定义和缩略语 1
4 试剂与材料 4
5 仪器和设备 5
6 蚯蚓采集、保存、运输和交接 6
7 蚯蚓肠道内容物样品获取 8
8 细菌 DNA 提取 10
9 16S rRNA 基因扩增子测序分析 11
10 宏基因组鸟枪法测序分析 15
11 质量控制 18
12 数据记录与结果报告 20
附录 A （资料性） 蚯蚓肠道细菌提取与分析数据记录表 23
附录 B （规范性） 蚯蚓肠道细菌 Alpha 与 Beta 多样性计算方法 27
附录 C （资料性） 常规操作参数汇总 29
参考文献 30

前　言

本文件按照 GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第 1 部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由中国土壤学会提出并归口。

本文件起草单位：南京农业大学、中国科学院南京土壤研究所、中国科学院城市环境研究所、中国科学院生态环境研究中心、华东师范大学、南京大学、江苏省生态地质调查大队、江苏省海洋地质调查院。

本文件主要起草人：孙明明、吴世茂、王丹蕊、张文、范为宝、刘鹏、付玉豪、王超、陈林、朱冬、李弘哲、何尔凯、张宴、胡建、姜夏烨、徐明钻。

蚯蚓肠道细菌群落组成分析技术规范

1 范围

本文件规定了土壤蚯蚓采集、保存、运输、体表清洗、解剖、肠道内容物获取、土壤与肠道样品保存、细菌 DNA 提取、16S rRNA 基因扩增子测序分析、宏基因组测序分析及质量控制要求。

本文件适用于农田、森林、草地、湿地、污染场地及实验室培养蚯蚓的肠道细菌群落结构与功能分析，以及土壤-蚯蚓肠道细菌关联研究。本文件设置 16S rRNA 基因扩增子测序和宏基因组鸟枪法测序两条技术路线，依据研究目的选用其中一种或两种。其中，16S rRNA 基因扩增子测序主要用于细菌群落分类组成及多样性分析；宏基因组鸟枪法测序用于分类组成和功能基因潜力分析，功能注释不得直接视为基因表达或实际代谢活性。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB/T 6682 分析实验室用水

GB 19489—2008 实验室生物安全通用要求

GB 4789.1—2016 食品安全国家标准 食品微生物学检验 总则

GB/T 43459—2023 洁净室及受控环境中细胞培养操作技术规范

GB/T 27403 实验室质量控制规范

GB/T 40226—2021 环境微生物宏基因组检测 高通量测序法

HJ/T 166 土壤环境监测技术规范

HJ 710.10—2014 生物多样性观测技术导则 大中型土壤动物

3 术语、定义和缩略语

3.1 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1.1

土壤蚯蚓 soil earthworm

生活于土壤或土壤—凋落物界面，用于肠道细菌群落提取的蚯蚓。

3.1.2

蚯蚓肠道内容物或肠道内容物 earthworm gut sample or gut sample

按照规定的解剖界限，从蚯蚓体内连续取出的完整消化道样品，包括肠壁、肠腔内容物、肠道黏液及与肠道紧密结合的物质；肠壁与肠腔内容物不得分离。本文件除特别说明外，“肠道样品”均指该完整肠道样品，不等同于仅肠腔内容物；“肠腔内容物”仅用于描述该样品的组成部分。

3.1.3

四分法 quartering method

将充分混合的土壤样品堆成圆锥形，压平后通过十字划分，取对角两份合并作为保留样品的土壤缩分方法

3.1.4

16S rRNA 基因扩增子测序 16S rRNA gene amplicon sequencing

以细菌 16S rRNA 基因特定区域（如 V3-V4 区）为目标，通过 PCR 扩增和高通量测序技术分析细菌群落组成的方法。

3.1.5

宏基因组鸟枪法测序 Shotgun Metagenomic Sequencing

对样品中提取的总 DNA 进行非靶向随机片段化和高通量测序，通过对测序数据进行质量控制、序列比对、分类学注释和功能注释等生物信息学分析，获取微生物群落分类组成、基因组成及功能潜力信息的方法。

3.1.6

细菌群落组成 Bacterial Community Composition

在规定生境中，所有细菌种群的种类构成及其数量配比。其内涵包括：1）物种丰度，即样品中存在的全部细菌分类单元（通常基于 16S rRNA 基因序列按特定相似度划分的操作分类单元或扩增子序列变体）的清单；2）相对丰度，即各分类单元在该群落中所占的百分比或比例。该组成通过高

通量测序或分离培养等方法测定，并以特征表（各样本中细菌分类群及其对应的序列数或相对百分比）作为其数学表述。

3.1.7

操作分类单元 operational taxonomic unit；OTU

在 16S rRNA 基因扩增子测序分析中，按照设定的序列相似性阈值（通常为 97%）对序列进行聚类后获得的分析单元。

3.1.8

ASV：扩增子序列变体（Amplicon sequence variant）

在高通量扩增子测序（如 16S rRNA 基因测序）数据的生物信息学分析流程中，通过对原始测序序列进行质量过滤、降噪校正及嵌合体去除后，所获得的具有单核苷酸分辨率的唯一 DNA 序列标签。

3.1.9

细菌分类等级 bacterial taxonomic ranks

细菌分类学中用于描述和归类细菌的系统性等级层次，由高到低依次为：界、门、纲、目、科、属、种。在微生物群落分析中，通常基于 16S rRNA 基因序列和宏基因组序列的相似性，在各个分类等级上对细菌进行归类和丰度统计。

3.1.10

阿尔法多样性 Alpha diversity

衡量单个样品内部细菌群落物种多样性的指标，综合反映群落的丰富度（物种数量）和均匀度（各物种的相对丰度分布）。常用评价指标包括 Shannon 多样性指数、Simpson 多样性指数、Chao1 丰富度估计值、ACE 指数、Observed species（观测物种数）和 Good's coverage（测序覆盖度）等。

3.1.11

香农多样性指数 Shannon diversity index

Alpha 多样性评价中常用的综合指数，同时考虑群落中物种的丰富度和均匀度。Shannon 指数值越大，表明群落多样性越高。计算公式为：

$H' = -\Sigma（p_i \times \ln p_i）$

式中，p_i 为第 i 个 OTU/ASV 的相对丰度。

3.1.12

辛普森多样性指数 Simpson diversity index

Alpha 多样性评价中常用的优势度指数，反映群落中优势物种的集中程度。Simpson 指数值越高，表明群落多样性越高、优势物种越不集中。

3.1.13

Beta 多样性 Beta diversity

衡量不同样品之间细菌群落组成差异或相似程度的指标。常用的 Beta 多样性距离/相异度计算方法包括 Bray-Curtis 相异度、Jaccard 距离、Unweighted UniFrac 距离和 Weighted UniFrac 距离等。

3.2 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

ASV：扩增子序列变体（Amplicon sequence variant）

DNA：脱氧核糖核酸（Deoxyribonucleic acid）

KEGG：京都基因与基因组百科全书（Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes）

NCBI：美国国家生物技术信息中心（National Center for Biotechnology Information）

NMDS：非度量多维尺度分析（Non-metric multidimensional scaling）

OD：光密度（Optical density）

ORF：开放阅读框（Open reading frame）

OTU：操作分类单元（Operational taxonomic unit）

PBS：磷酸盐缓冲液（Phosphate-buffered saline）

PCoA：主坐标分析（Principal coordinates analysis）

PCR：聚合酶链式反应（Polymerase chain reaction）

qPCR：实时荧光定量聚合酶链式反应（Quantitative polymerase chain reaction）

4 试剂与材料

4.1 总则

所用试剂应采用分析纯及以上等级试剂，特殊情况除外。实验用水应符合 GB/T 6682 中一级水要求。

与样品直接接触的器具和耗材应无菌。一次性耗材宜采用无 DNA 酶、无 RNA 酶和低吸附产品。

4.2 试剂

4.2.1 磷酸盐缓冲液（PBS）：应采用 1× PBS，pH 应为 7.0±0.2。实验室配制的 PBS 应经 0.22 μm 滤膜除菌，商品化 PBS 应为无菌级；使用前均应预冷至 4 ℃。

4.2.2 无水乙醇：应为分析纯及以上等级，体积分数为 75 %（v/v）用于体表消毒。

4.2.3 细菌 DNA 提取试剂盒：宜采用商业化的土壤或粪便微生物 DNA 提取试剂盒，如 FastDNA™ SPIN Kit（MP Biomedicals）、DNeasy® PowerSoil® Pro Kit（Qiagen）或性能相当的同类产品。

4.2.4 PCR 引物：16S rRNA 基因 V3-V4 区扩增引物序列应为 341F（5′-CCTAYGGGRBGCASCAG-3′）和 806R（5′-GGACTACNNGGGTATCTAAT-3′），或经验证性能相当的引物对。

4.2.5 PCR 预混液：应采用含高保真 DNA 聚合酶的商业化 PCR 预混液。

4.2.6 DNA 凝胶提取试剂盒：应使用 AxyPrep DNA 凝胶提取试剂盒或性能相当的产品，用于 PCR 产物纯化。

4.2.7 消毒试剂：蚯蚓体表、操作台面和不耐高温器具外表面消毒应使用 75 %（v/v）乙醇。75 %（v/v）乙醇应密闭保存，使用后应待器具表面乙醇挥发后再接触样品。

4.3 材料

4.3.1 采样和运输容器：应采用洁净、无毒、耐低温且抗挤压的聚丙烯（PP）硬质样品盒，盒盖应设置通气孔并能够防止蚯蚓逸出。不同平行样方应使用独立容器。

4.3.2 土壤样品保存容器：应采用无菌、密封性良好的聚丙烯（PP）自封袋或样品瓶。

4.3.3 离心管和冻存管：应采用无菌、耐低温、密封性良好的聚丙烯（PP）低吸附产品；用于 DNA 样品保存的冻存管宜采用低核酸吸附产品。

4.3.4 移液吸头和样品接收容器：应采用无菌聚丙烯（PP）材质产品，一次性耗材宜为无 DNA 酶、无 RNA 酶和低吸附型。

5 仪器和设备

5.1 蚯蚓采集器具：包括样方框、铁锹、土铲和镊子。与土壤和蚯蚓直接接触的金属器具宜采用不锈钢材质，并应洁净、耐腐蚀和易清洗。

5.2 解剖器具：应包括不锈钢解剖剪、不锈钢尖头镊子、手术刀柄及一次性无菌刀片、玻璃或聚丙烯培养皿和可清洗消毒的解剖垫。可重复使用的金属器具应能够进行压力蒸汽灭菌。

5.3 体视显微镜：用于蚯蚓观察和解剖。

5.4 生物安全柜或洁净操作台：用于体表清洗、解剖、样品转移和 DNA 提取操作。

5.5 电子天平：感量不低于 0.01 g。

5.6 涡旋振荡器：最高转速不低于 2500 rpm。

5.7 组织匀浆或研磨装置：用于蚯蚓肠道内容物的充分混匀。

5.8 高速冷冻离心机：离心温度应可调至 4 ℃，最大离心力不低于 15000 ×g。

5.9 核酸蛋白分析仪：如 NanoDrop ND-1000 紫外-可见分光光度计或性能相当的产品，用于 DNA 浓度和纯度检测。

5.10 PCR 扩增仪：应能够精确控制温度循环。

5.11 凝胶电泳仪：用于 PCR 产物检测，应包括电泳槽、电源和凝胶成像系统。

5.12 高通量测序平台：应配备 Illumina MiSeq、NovaSeq 或性能相当的高通量测序平台。

5.13 低温保存设备：应配备 2 ℃～8 ℃冰箱、−20 ℃冰箱和 −80 ℃超低温冰箱。

5.14 pH 计：最小分度值不大于 0.1 pH 单位。

6 蚯蚓采集、保存、运输和交接

6.1 蚯蚓采集

6.1.1 采样点位应根据研究目的、土地利用方式、植被类型、土壤类型和污染状况等因素设置。样点应具有代表性，能够反映目标区域蚯蚓群落分布特征。

6.1.2 常规表层采样时，每个样点宜设置不少于 3 个独立平行样方，常用样方规格为 1 m×1 m。各平行样方应独立采集、编号和保存，不得相互混合。用于验证性比较时，应依据预调查结果、预期效应量和样本变异确定所需独立生物学重复数。

6.1.3 常规表层样方宜采用手拣法采集 0 cm～20 cm 土层中的蚯蚓。采样前去除样方内地表植物、凋落物和其他非目标覆盖物，将土体置于洁净防水布上轻柔拍散并逐层分拣。以深层活动蚯蚓或特殊

生境为对象时，应依据研究目的和预调查结果调整采样深度、方法与采样努力量，并记录调整依据；组间比较应保持方法一致或评价方法差异的影响。

6.1.4 每个样方应收集其中发现的全部完整活体蚯蚓。用于后续肠道细菌群落提取的样品量应保证解剖后可获得不少于 0.50 g 完整肠道湿重；单个平行样方样品量不足时，应如实记录，不得与其他平行样方混合。如需要独立提取技术重复或留样，应按每次 DNA 提取取样量核算总湿重，样品不足时记录限制，不得跨独立样方合并。

6.1.5 应剔除死亡、严重损伤、体表破裂或状态异常的个体。采样时截断或挤压破损的个体不得用于肠道细菌群落提取。

6.1.6 采集后的蚯蚓应按平行样方分别置于 4.3.1 规定的运输容器中，并加入原位土壤保持湿度和活性，原位土壤体积宜占容器容积的 1/4～1/3。

6.1.7 用于肠道细菌群落提取的蚯蚓应保持活体，不得采用乙醇、甲醛或其他固定剂固定保存。

6.1.8 开展土壤—蚯蚓肠道细菌群落关联分析时，应在同一独立样方同步采集对应土壤样品，采样层次与蚯蚓采集层次相匹配，并建立可追溯的一一对应编号；不得跨独立样方混合。应采用洁净、无菌器具取样，记录取样点、深度、取样量、混合方式、运输时长及保存条件；采后应尽快分装并按经验证的条件低温保存。

6.1.9 应记录样品编号、采样日期、地点、GPS 坐标、样方面积、采样深度、土地利用方式、土壤类型、蚯蚓数量、总鲜重和采样人员。应记录蚯蚓种类或鉴定信息、采样季节、土壤含水状态、采样方法及采样努力量，调整常规方案时应记录原因。

6.2 保存、运输和交接

6.2.1 蚯蚓采集后应使用 4.3.1 规定的聚丙烯带通气孔样品盒避光运输，容器内保留 6.1.6 规定量的原位土壤，并防止挤压、积水和蚯蚓逸出。

6.2.2 运输温度应保持在 4 ℃±2 ℃，冷源不得与蚯蚓样品直接接触，样品不得冻结；从采集结束至到达实验室的时间不应超过 24 h。应记录运输过程实测温度及起止时间；对不同物种和处理时限的适用性应经方法确认，异常温度、冻结或死亡个体应记录并评估其可用性。

6.2.3 蚯蚓到达实验室后应在 12 h 内完成体表清洗和解剖；暂存期间应在 4 ℃±2 ℃、避光和通气条件下保存。应优先缩短采集结束至解剖的总时长，逐样记录采集结束、到样、暂存与解剖开始时间；

24 h 运输和 12 h 暂存不得不经适用性验证简单叠加作为不同研究对象的通用允许时限。

6.2.4 本文件规定的完整肠道细菌提取样品不进行排空处理。采集后不得将蚯蚓转移至滤纸、无菌土或其他基质中排空。

6.2.5 样品交接时应核对编号、数量、状态、包装完整性和运输条件。出现死亡、泄漏、温度异常或标签缺失时，应记录异常情况并判定是否接收。

7 蚯蚓肠道内容物样品获取

7.1 总则

7.1.1 体表清洗、解剖和样品转移应在II级生物安全柜或洁净操作台内进行。操作前应使用 75 %（v/v）乙醇擦拭台面并静置 10 min。

7.1.2 同一批样品应采用一致的清洗、解剖、称量、洗脱、离心和过滤条件。不同平行样品应独立操作，并保持处理顺序和操作时间尽量一致。

7.1.3 除体表乙醇消毒外，缓冲液、完整肠道内容物样品保持在 0 ℃～4 ℃；单批样品连续室温暴露时间不应超过 15 min。

7.2 技术要求

7.2.1 与蚯蚓、完整肠道内容物样品直接接触的器具、容器和耗材应无菌。一次性耗材应符合第 4 章规定。

7.2.2 可重复使用的不锈钢解剖剪、镊子和手术刀柄应采用压力蒸汽灭菌；不耐高温的器具外表面应使用 75 %（v/v）乙醇充分擦拭，并待乙醇挥发后使用。

7.2.3 无菌水、PBS 和柠檬酸钾洗脱缓冲液使用前应预冷至 4 ℃并充分混匀。出现沉淀、浑浊、絮状物或明显 pH 变化的缓冲液不得使用。

7.2.4 样品处理过程中应尽量减少夹持、挤压和转移次数。不得采用可能造成肠道组织严重破碎损失的强烈珠磨、长时间高速匀浆和强超声处理。

7.2.5 不同样品之间应更换无菌离心管、移液吸头和接收容器；可重复使用的解剖器具应重新灭菌后再用于下一样品。

7.3 体表清洗

7.3.1 将活体蚯蚓置于冰上 10 min，使个体活动明显降低；随后用预冷无菌水逐只漂洗 5 次，直至体

表无可见土壤和植物残体。

7.3.2 将初洗后的蚯蚓完全浸入 75 %（v/v）乙醇 30 s 进行体表消毒，取出后立即用预冷无菌水连续漂洗 5 次，每次均更换新的清洗液。

7.3.3 体表清洗和消毒过程中不得挤压或刺破体壁。出现体壁破裂、肠内容物外泄或明显损伤的个体应弃用。

7.3.4 每批样品应收集末次漂洗液不少于 1.0 mL 作为体表清洗空白，并与实际样品同步完成后续质量控制处理。

7.4 无菌解剖与肠道内容物样品获取

7.4.1 每个样品应使用一套独立的灭菌解剖器具或一次性无菌解剖器具；不同样品之间不得直接共用未重新灭菌的器具。

7.4.2 在体视显微镜下沿腹侧或背侧体壁纵向剪开，自咽部后端至肛门端连续分离完整消化道；同一比较任务的解剖界限应保持一致。本文件的完整消化道取样范围包括上述界限内可辨识的嗉囊、砂囊及肠管等区段；针对特定肠段的研究应另行明确分段解剖方法，不得与完整肠道内容物样品直接合并比较。

7.4.3 连续取出完整消化道后，应使用无菌镊子去除明显附着的体壁、体腔组织和生殖组织；肠壁与肠腔内容物不可去除。取样时不得刮取、吸取或单独收集肠腔内容物，不得剥离肠壁，不得对肠腔内部进行冲洗。

7.4.4 完整消化道取出后宜置于预冷无菌 PBS 中轻柔漂洗 1 次，漂洗仅用于去除肠道外表面明显体腔液和组织残留，不得冲洗肠腔内部；漂洗次数、时间和缓冲液条件同批样品应保持一致；不得反复夹持或长时间浸洗。若出现肠道破裂或肠道内容物明显外泄，应记录并弃用该样品。

7.4.5 应记录解剖界限、肠壁与肠腔内容物未分离确认结果、肠道内容物样品完整性、肠道湿重、合并个体数和异常情况。应同时记录蚯蚓物种或分类鉴定结果、成熟状态、各区段实际纳入情况，以及未能完整分离时的弃用或偏离处理情况。

7.4.6 每批样品应设置解剖空白。解剖空白不加入蚯蚓样品，应使用同批解剖器具、培养皿和缓冲液，并与实际样品同步进行后续处理。

7.4.7 解剖有效性判定：每份肠道内容物样品应在体视显微镜下确认：a）肠道连续、管状结构完整；

b）肠壁与肠腔内容物未分离；c）无肠内容物明显外泄；d）表面无明显体壁、体腔组织和生殖组织残留。任一条件不满足，应弃用该样品并记录。

7.4.8 解剖一致性控制：同一比较任务应固定解剖界限、漂洗次数与时间、称量方式、合并个体数规则及操作温度和时间；解剖人员应经培训，同一批样品宜由同一人员完成，多人操作时应统一解剖界限和判定标准。平行样品应独立操作，但解剖和取样条件应一致。

7.5 肠道内容物样品保存

7.5.1 解剖获取的肠道内容物样品应立即置于无菌、低吸附冻存管中，于 −80 ℃保存，用于后续 DNA 提取和分析。

7.5.2 每份样品应记录肠道内容物湿重、保存温度、保存位置和操作者。

7.5.3 样品应按单次使用量分装，避免反复冻融。−80 ℃样品解冻后应一次使用完毕，不得再次冻存。

8 细菌 DNA 提取

8.1.1 细菌 DNA 提取对象为第 7 章获取的蚯蚓肠道内容物样品及第 6 章采集的对应土壤样品。

8.1.2 不同样品应采用相同的 DNA 提取方法、试剂盒批次和操作流程。用于组间比较的不同处理组样品应在提取批次中随机或均衡分配，并记录试剂批号及提取批次。

8.1.3 DNA 提取过程应在洁净区域进行，避免外源 DNA 污染。

8.2 样品前处理

8.2.1 从 −80 ℃取出肠道内容物样品，在冰上解冻。

8.2.2 每份样品称取肠道内容物样品 0.25 g～0.50 g（鲜重）用于 DNA 提取。肠道内容物不足 0.25 g 时，可合并同一平行样方内的多个完整个体至 0.25 g 左右，并记录合并个体数。合并个体数上限以蚯蚓大小与湿重为参考，小型蚯蚓合并数不超过 30 条。此处每份样品指同一独立样方内按既定合并规则形成的生物学样品；应记录实际称量与合并个体数，不得将不同样方混合视为同一生物学重复。

8.2.3 开展土壤与蚯蚓肠道细菌群落组成比较或关联分析时，应对同一样方内采集的对应土壤样品进行 DNA 提取。每份土壤样品宜称取 0.25 g～0.50 g 用于 DNA 提取，并记录 DNA 提取方法及相关质量控制信息。仅开展蚯蚓肠道细菌群落分析时，可不进行土壤 DNA 提取。

8.3 DNA 提取

8.3.1 应采用商业化土壤或粪便微生物 DNA 提取试剂盒进行总 DNA 提取。推荐使用 FastDNA™ SPIN Kit（MP Biomedicals, Santa Ana, CA, USA）、DNeasy® PowerSoil® Pro Kit（Qiagen）或性能相当的产品。

8.3.2 DNA 提取应严格按照制造商提供的操作说明书进行。

8.3.3 为评价提取过程的技术重复性，每个提取批次宜选择具有足够样品量的代表性生物学样品，从充分混匀的样品中独立称样并进行不少于 3 次独立 DNA 提取；技术重复应单独标识，不得作为增加生物学重复数的依据。

8.3.4 DNA 提取过程中应同步设置提取空白对照，以监测试剂和耗材的污染情况。

8.4 DNA 质量检测

8.4.1 提取的 DNA 应采用核酸蛋白分析仪（如 NanoDrop ND-1000）检测浓度和纯度。A_{260}/A_{280} 比值应在 1.8～2.0 之间，A_{260}/A_{230} 比值应不低于 1.8。

8.4.2 DNA 完整性应通过 1 %～2 % 琼脂糖凝胶电泳进行检测，应出现清晰的主条带，无明显降解。

8.4.3 DNA 浓度检测合格后，应根据后续测序要求进行适当稀释或归一化处理。

8.5 DNA 样品保存

8.5.1 提取的 DNA 应置于无菌、低吸附、密封性良好的冻存管中，并进行唯一性标识。

8.5.2 DNA 样品应于 −20 ℃或 −80 ℃保存。

8.5.3 DNA 样品应按单次使用量分装，避免反复冻融。

9 16S rRNA 基因扩增子测序分析

9.1 总则

9.1.1 16S rRNA 基因扩增子测序用于分析蚯蚓肠道及土壤样品中细菌群落的物种组成和多样性。

9.1.2 同一比较任务的全部样品应采用相同的引物对、PCR 条件和测序平台。不同处理组样品宜在 PCR 板位、建库及测序批次中随机或均衡安排；跨批次比较应设置适宜的参照样品，并评价批次效应。

9.2 PCR 扩增

9.2.1 以提取的总 DNA 为模板，对细菌 16S rRNA 基因 V3-V4 区域进行 PCR 扩增。

9.2.2 引物序列应为 341F（5′-CCTAYGGGRBGCASCAG-3′）和 806R（5′-GGACTACNNGGGTATCTAAT-3′）。

9.2.3 PCR 反应体系应明确总体积、DNA 模板投入量与浓度、引物终浓度、预混液组成和体积，并记录聚合酶及试剂批次。以下 25 μL 配方仅为待验证示例：2×高保真 PCR 预混液 12.5 μL、10 μmol/L 正向和反向引物各 0.5 μL、DNA 模板 1.0 μL、无核酸酶水 10.5 μL。具体体系、退火温度和扩增循环数应按所用试剂及引物的验证结果确定，温度程序可参照表 1；同一比较任务的循环数应保持一致，调整时应记录依据。

表 1 16S rRNA 基因 PCR 扩增条件

步骤	温度	时间	循环数
初始变性	95℃	3min	1
变性	95℃	30s	25~35
退火	55℃	30s	25~35
延伸	72℃	45s	25~35
终延伸	72℃	5min	1
保存	4℃	∞	-

9.2.4 每个样品应设置 3 个 PCR 重复。PCR 扩增应设置阴性对照（以无菌水代替 DNA 模板）。

9.3 PCR 产物检测与纯化

9.3.1 PCR 产物应采用 1 %～2 % 琼脂糖凝胶电泳检测，应出现目标条带（约 460 bp）。

9.3.2 PCR 产物应采用 AxyPrep DNA 凝胶提取试剂盒或性能相当的产品进行纯化。

9.3.3 纯化后的 PCR 产物应采用 Qubit® 3.0 或性能相当的荧光定量仪进行定量检测。

9.4 文库构建与测序

9.4.1 纯化后的 PCR 产物应送至具备高通量测序资质的商业公司或公共平台，在 Illumina 平台（双端测序，2×250 bp 或 2×300 bp）上构建 DNA 文库并进行测序。

9.4.2 文库构建和测序应按照测序平台的标准操作流程进行。

9.5 测序数据处理

9.5.1 16S rRNA 基因扩增子原始 FASTQ 序列应依次进行质量评估、接头及引物去除、按读段质量和目标扩增片段长度确定截断与过滤参数、去噪、双端合并及嵌合体去除，形成用于后续分析的特征序列与丰度表；质量过滤应记录序列长度、质量得分、歧义碱基、重叠长度等实际判定阈值。

9.5.2 可使用 QIIME2、DADA2、Trimmomatic 等适当软件完成相应步骤；应逐步记录软件版本、过滤参数、原始与保留读段数、合并率、嵌合体剔除比例及异常情况。

9.5.3 宜采用 DADA2 等经验证的去噪流程生成扩增子序列变体（ASV）；如采用 97 %相似性 OTU 聚类路线，应另行记录序列预处理、聚类算法和阈值，不得将 ASV 与 OTU 结果未经方法验证直接合并比较。

9.5.4 应结合体表清洗空白、解剖空白、DNA 提取空白及 PCR 阴性对照识别低丰度污染特征。可使用 decontam R 包等适用方法，以 ASV 或 OTU 丰度表及匹配的阴性对照元数据为输入，按空白类型和实验批次分别评估；使用 prevalence 等模式时，应依据空白数量、污染背景及方法验证确定判定阈值，不得机械采用统一阈值。应记录软件版本、模式、阈值依据、污染特征清单及剔除前后结果；不能可靠判断时宜保留疑似标记，并进行保留与剔除两种处理的敏感性分析。

9.5.5 以 SILVA 数据库（SSU138.1）为参考，对 OTU/ASV 的物种进行分类学注释。 分类学结果应报告至具有可靠注释支持的最低分类等级，无法可靠注释到种水平时，不得强行赋予种名。。

9.6 数据分析

9.6.1 Alpha 多样性分析

9.6.1.1 应基于 OTU/ASV 丰度矩阵计算各样品的 Alpha 多样性指数，包括但不限于：

a)Observed species（观测物种数）：样品中实际观测到的 OTU/ASV 数量，反映物种丰富度；

b)Chao1 指数：用于估计样品中物种总数（Richness）的指标，数值越大代表物种总数越多。计算公式为 $Chao1 = S_{obs} + (n_1^2)/(2n_2)$，其中 S_{obs} 为观测到的 OTU 数量，n_1 为仅含 1 条序列的 OTU 数量（singletons），n_2 为仅含 2 条序列的 OTU 数量（doubletons）；

c)ACE 指数（Abundance-based Coverage Estimator）：基于丰度的覆盖度估计值，用于评估物种丰富度；

d)Shannon 多样性指数：综合反映物种丰富度和均匀度的多样性指数；

e)Simpson 多样性指数：反映群落中优势物种集中程度的多样性指数；

f)Good's coverage：测序覆盖度指数，反映测序深度对群落代表的充分程度；

g)$PD_{whole\ tree}$：基于系统发育树的谱系多样性指数。

9.6.1.2 Alpha 多样性指数的计算可采用 QIIME2（q2-diversity 插件）或 R 软件（vegan 包等）完成。

9.6.1.3 应使用适当的统计学方法（如 Wilcoxon 秩和检验、Kruskal-Wallis 检验或 t 检验）进行组间 Alpha 多样性指数的差异显著性分析。分析前应说明独立生物学样本数、数据标准化及模型假设；开展多指标或多类群检验时应采用 FDR 等方法校正多重比较，并报告效应量、原始 P 值和校正后 P 值。

9.6.2 Beta 多样性分析

9.6.2.1 应基于 OTU/ASV 丰度矩阵计算样品间的 Beta 多样性距离/相异度矩阵，常用方法包括：

a)Bray-Curtis 相异度：基于物种丰度数据的相异度指数，计算公式为 $BC_{ij} = 1 - (2C_{ij})/(S_i + S_j)$，其中 C_{ij} 为样品 i 和样品 j 共有的物种丰度之和，S_i 和 S_j 分别为两样品的总丰度；

b)Jaccard 距离：基于物种有无（presence/absence）的相异度指数；

c)Unweighted UniFrac 距离：基于系统发育树、仅考虑物种有无（不考虑丰度）的相异度指数；

d)Weighted UniFrac 距离：基于系统发育树、同时考虑物种丰度的相异度指数。

9.6.2.2 Beta 多样性距离矩阵的计算可采用 QIIME2（q2-diversity 插件）或 R 软件（vegan 包等）完成。组间 Beta 多样性差异可采用 PERMANOVA 等方法检验，并应检查组内离散度差异，报告置换策略和协变量设置；采样点、土壤性质及实验批次等混杂因素应视研究设计纳入分析。

9.6.3 物种组成分析

9.6.3.1 应按门、纲、目、科、属等分类等级上统计和比较各样品中细菌群落组成及相对丰度。仅当参考数据库、目标扩增区域及分类置信度支持时，方可报告种水平结果，其他结果应标记为未分类或未确定。

9.6.3.2 应通过物种累积曲线（Species Accumulation Curve） 评估测序深度是否足以反映样品中细菌群落的真实多样性。

9.6.3.3 需要筛选候选差异分类群时，可使用线性判别分析效应量（LEfSe，Linear Discriminant Analysis Effect Size） 或随机森林（Random Forest） 等方法，上述方法并非所有研究的必选分析。应结合适宜的统计检验、多重比较校正及效应量进行解释，不得仅依据模型重要性指标认定统计学显著差异。每组独立生物学样本数较少时，差异分类群筛选宜定位为探索性分析，并报告效应量和不确定性，不得将未检出显著差异解释为组间等同。

9.6.4 常用软件与参数

16S rRNA 基因扩增子测序数据分析推荐使用 QIIME2 流程：应遵循 9.5 规定的引物去除、去噪与嵌合体控制顺序，并完整记录版本及参数；采用 OTU 流程时应另行说明。

a)数据导入：将原始测序数据（FASTQ 格式）以 QIIME2 支持的格式导入；

b)质量评估：使用 q2-demux 插件评估原始数据质量；

c)去噪与特征生成：使用 DADA2 方法去除测序误差，生成高分辨率的特征序列（ASV）；

d)物种注释：以 SILVA 数据库（SSU138.1）为参考，使用 q2-feature-classifier 插件进行物种分类学注释。

10 宏基因组鸟枪法测序分析

10.1 总则

10.1.1 本章适用于基于第 8 章获得的蚯蚓肠道样品，采用非靶向宏基因组鸟枪法测序，分析细菌群落分类组成和功能基因潜力。

10.1.2 同一比较任务应统一样品前处理、DNA 提取、文库构建策略、测序平台、数据过滤规则、参考数据库和分析流程。发生变更时应说明并评估批次效应。

10.2 文库构建与测序

10.2.1 用于宏基因组文库构建的 DNA 应符合 8.4 的规定，DNA 投入量应满足所用文库构建试剂及测序平台的技术要求。

10.2.2 应根据样品 DNA 质量和测序平台要求选择适宜的文库构建方法，并按所用试剂的技术要求完成相应的 DNA 片段化、末端处理、接头添加、纯化及必要的文库扩增等步骤。

10.2.3 构建后的文库应采用适宜的定量和片段分析方法检测文库浓度、插入片段长度及其分布，并评估接头二聚体污染；采用 PCR 扩增的文库应记录扩增循环数。采用双端 150 bp 测序策略时，目标插入片段长度可参考 300 bp～500 bp，具体范围应根据试剂盒和测序平台要求及方法验证结果确定。应在上机前明确文库浓度、片段分布和接头二聚体等质量判定限值；不符合要求的文库应重新纯化或构建。

10.2.4 宏基因组测序应按 11.2 设置和处理空白对照，其结果应纳入污染评估。

10.2.5 应采用 Illumina NovaSeq 等符合研究目的且经过方法适用性验证的高通量测序平台，宜采用双端 150 bp 或具有相当有效数据质量的测序策略。应记录平台类型、测序读长及试剂版本；采用其他测序策略时应说明其适用性。

10.2.6 测序深度应结合研究目的、样品宿主 DNA 比例及预期分析要求确定，其数据量与充分性判定应符合 11.5 的规定。

10.3 测序数据处理

10.3.1 原始双端 FASTQ 数据应进行接头去除、低质量序列过滤和质量统计，可采用 fastp 或性能相当的软件。宜去除含有不确定碱基的序列、过滤后长度＜50 bp 的序列及平均质量得分＜20 的序列，并记录实际过滤参数。

10.3.2 应评估并报告低复杂度序列、宿主来源序列和外源污染序列对结果的影响。当存在适用于所研究蚯蚓物种的可靠参考基因组时，应采用 Bowtie2、BWA 或其他等效的序列比对工具识别并去除宿主来源的序列，并记录参考基因组来源、版本、比对参数及宿主序列去除比例；缺乏适用的宿主参考基因组时，应采用其他适宜的方法评估宿主序列的潜在影响，记录所采用的方法并说明其局限性，不应将来源未明确的序列直接判定为细菌序列。

10.3.3 应统计原始序列数、质量过滤后序列数及保留率、Q20、Q30、可识别或估计的宿主来源序列比例，以及非宿主质控合格序列数和数据量。无法可靠估计宿主来源序列比例时，应说明原因并记录替代评估措施。各类质控样品的数据处理日志应保留。

10.4 数据分析

10.4.1 物种组成分析

10.4.1.1 应以经过质量控制及宿主序列处理的宏基因组序列为输入，采用 Kraken2、MetaPhlAn 或经验证的等效方法进行分类学注释。不同分类算法或参考数据库所得的相对丰度不应直接合并或比较。

10.4.1.2 分类学注释宜采用 RefSeq、GTDB 或与所用软件相匹配的数据库。使用 Kraken2 时应合理设置分类置信度、最低序列支持数等参数；采用 Bracken 进行丰度重估时，应明确其计算方法。同一比较任务应保持一致的注释方法和参考数据库。

10.4.1.3 应统计细菌在门、纲、目、科、属、种等分类等级上的组成和相对丰度；对于无法可靠注释的分类等级，应以未分类或未确定标识，不应强行赋予种名。开展种水平分析时应评价参考数据库覆盖情况及分类置信度。

10.4.1.4 本文件报告的细菌分类群相对丰度应以同一样品归属于细菌的分类群丰度之和为分母；采用其他归一化口径时应说明。应根据所用分类方法的输出特点说明分类学注释覆盖情况，并在能够可靠计算时报告未分类序列及非细菌来源序列的比例，不得将全部非宿主序列直接视为细菌序列。

10.4.1.5 应结合同批 DNA 提取空白和文库空白的分类学注释结果，识别潜在污染分类群。可采用 decontam 等适用的污染识别方法或预先设定的背景阈值进行标记、剔除或敏感性分析，并记录所用方法、阈值及处理前后的变化；不应将空白分类群的丰度直接从实际样品中机械扣除。

10.4.2 功能基因与通路分析

10.4.2.1 功能分析可采用基于序列的 HUMAnN 等流程，或采用序列组装、开放阅读框预测和蛋白功能注释等经验证的流程。分析方法应与研究目的相适应，不同流程的结果不应未经说明地合并比较。

10.4.2.2 基于序列的功能分析宜使用 UniRef90（基因家族）及 MetaCyc（代谢通路）等数据库；开展 KEGG Orthology（KO）或通路注释时，应说明映射方法。基于组装的流程应记录组装及基因预测方法、功能比对阈值。

10.4.2.3 应根据所采用的分析方法及研究目的，输出相应的功能基因家族、功能类别或代谢通路丰度矩阵，并报告注释覆盖情况及丰度归一化方法。

10.4.2.4 功能注释结果反映样品中的功能基因组成与代谢潜力，不得直接解释为基因表达量、酶活性或实际代谢通量；如需作此解释，应提供独立实验证据。

10.4.3 群落比较与统计分析

10.4.3.1 细菌分类群相对丰度属于组成型数据。开展差异分析时，应说明归一化、零值处理和统计模型，可采用适当伪计数后的中心化对数比（CLR）转换、ANCOM-BC 等考虑组成效应的方法；采用 MaAsLin2 等多变量模型时，应说明所用转换、协变量及方法局限。功能丰度的处理也应与数据类型和分析目的相适应，不应仅以测序深度差异解释分类群变化。

10.4.3.2 应基于细菌分类组成数据计算 Alpha 多样性指标（如 Shannon 指数、Simpson 指数）和 Beta 多样性距离（如 Bray–Curtis 相异度或适用的 Aitchison 距离）。分析前应采用相同测序深度抽平或适用于该数据类型的标准化方法，并报告处理方式。组间 Beta 多样性差异可采用置换多元方差分析（PERMANOVA），并检查组内离散度差异；两种测序路线的指数数值不应未经方法学验证直接合并比较。

10.4.3.3 开展差异分类群或差异功能分析时，应预先确定效应量、最低丰度、检出率及统计显著性判定规则；对多重假设检验应进行校正（如 Benjamini–Hochberg 假发现率校正），并报告原始 P 值、校正后 P 值或 q 值及效应量。不得仅依据未经校正的 P 值作出确定性结论。

10.4.3.4 每组仅有 3 个独立平行样品时，组间差异分类群和差异功能分析宜限于探索性描述，应报告效应量、不确定性及统计效能局限，不应将未检出显著差异解释为两组等同。拟进行验证性差异分析时，应根据预期效应量、样本变异和研究设计进行样本量估算，并适当增加独立生物学重复数。

11 质量控制

11.1 总则

11.1.1 质量控制应覆盖采集、运输、体表清洗、解剖、样品保存、DNA 提取、PCR 扩增、测序和数据分析等全部环节。

11.1.2 每批样品应设置空白样品、平行样品和阳性质控样品。各类质量控制样品的设置数量、处理方法和判定要求应分别符合 12.2～12.5 的规定。

11.1.3 质量控制样品应与实际样品同步处理，并采用相同的 DNA 提取、PCR 扩增和测序条件。应记录各处理组在提取、PCR、建库和测序批次中的分配情况，并尽量避免处理组与批次完全重合。

11.1.4 质量控制结果应结合空白、平行、阳性质控和污染控制结果综合判定，不应以单一指标代替全过程质量控制。

11.2 空白样品

11.2.1 每批样品应至少设置 1 个体表清洗空白、1 个解剖空白、1 个 DNA 提取空白和 1 个 PCR 阴性对照。

11.2.2 体表清洗空白应按 7.3.4 设置；解剖空白应按 7.4.6 设置；DNA 提取空白应在 DNA 提取过程中以无菌水代替样品进行同步提取；PCR 阴性对照应以无菌水代替 DNA 模板进行同步扩增。

11.2.3 DNA 提取空白和 PCR 阴性对照在凝胶电泳检测中不应出现目标条带。若出现目标条带，该批样品应判为污染待复核。仅以凝胶电泳未见目标条带，不足以排除高通量测序中的低丰度污染；应对同步测序的提取空白、PCR 阴性对照及适用的操作空白进行序列层面污染评估，保存空白读段统计及污染特征处理记录。

11.2.4 空白样品超出控制限时，应检查操作环境、解剖器具、缓冲液、试剂和移液操作等污染来源，并复核或重新处理同批样品。

11.3 平行样品

11.3.1 每个比较组应设置足够的独立生物学重复；常规探索性研究宜不少于 3 个独立样方。独立样方从体表清洗开始应分别完成解剖、保存、DNA 提取和测序分析，不得将同一样品的技术重复计为独立生物学重复。

11.3.2 生物学重复应采用一致的取样、DNA 提取、PCR 和测序方法以支持组间比较；独立 DNA 提取、PCR 或重复测序形成的技术重复应单独标注，用于评价技术过程精密度。

11.3.3 独立样方属于生物学重复，用于反映自然变异，不应仅因 Bray-Curtis 等群落距离较大而判定分析无效；技术重复宜按经验证的精密度指标评价实验重复性。

11.3.4 技术重复差异异常时应排查提取、扩增、污染及测序批次等原因；生物学重复差异明显时应结合真实生态异质性与技术因素分析，记录复核结果，不得仅凭生物学差异直接弃用样品。

11.4 阳性质控样品

11.4.1 每批 PCR 扩增应设置阳性质控（如已知组成的模拟菌群 DNA 或标准菌株 DNA）。

11.4.2 阳性质控样品的 PCR 扩增应成功获得目标条带，且测序结果应与预期组成一致。对模拟菌群阳性质控宜报告检出组成和偏离预期的情况，具体可接受偏差应通过方法确认确定。

11.4.3 阳性质控失败时，应检查 PCR 反应体系、引物、聚合酶和循环条件，并重新进行 PCR 扩增。

11.5 测序质量控制

11.5.1 16S rRNA 基因扩增子测序的优质序列数应不少于 20000 条/样品。

11.5.2 宏基因组测序应统计并报告原始数据量、质控后数据量、宿主序列比例、去宿主后有效数据量及分类与功能注释覆盖情况。原始数据量 10 Gb/样品可作为经方法确认的设计参考值，不得单独作为测序充分性或结果放行的判定标准；应结合研究目标开展数据量充分性或稳定性评估。

11.5.3 测序质量得分 Q30 应不低于 80 %。

11.6 污染控制

11.6.1 若某一样品中经 decontam 判定为低污染的特征占其总优质序列的比例超过 10%，该样品应标记为“污染负荷偏高”，并按 11.7 进行复核或在结果报告中说明；若某批次中因低丰度污染剔除的 ASV/OTU 比例超过该批次总 ASV/OTU 数的 20%，应重新评估该批次的空白设置、试剂批次和操作环境，而非仅作数据层面的去污染处理。

11.7 结果判定

11.7.1 符合下列条件时，可判定分析过程有效：

a）各类空白样品未检出目标扩增产物或信号低于检出限；

b）技术重复及适用的平行质控结果符合经验证的分析精密度要求；独立样方的真实生物学变异已得到合理评价；

c）阳性质控样品扩增和测序结果符合预期；

d）测序数据量满足最低要求，Q30 不低于 80 %；宏基因组还应满足经验证的去宿主后有效数据量及分析充分性要求；

e）关键过程参数和异常情况记录完整。

11.7.2 出现空白污染、技术重复差异异常或生物学重复存在待核查偏离、阳性质控失败或测序数据质量不达标时，应复核、重新处理或在结果报告中说明。

12 数据记录与结果报告

12.1 数据记录

12.1.1 数据记录应覆盖样品信息、采集运输、体表清洗、解剖、样品保存、DNA 提取、PCR 扩增、测序、质量控制和异常情况。

12.1.2 样品编号、平行样方、蚯蚓个体、肠道内容物样品、DNA 样品、测序批次和保存位置应可追溯。

12.1.3 解剖记录应包括解剖界限、肠道完整性、肠道内容物湿重、合并个体数、漂洗条件和异常情况。

12.1.4 DNA 提取记录应包括 DNA 提取方法、试剂盒信息、样品量、DNA 浓度、A_{260}/A_{280} 比值和 DNA 产量。

12.1.5 测序记录应包括测序平台、测序策略、数据量、Q30 值和原始数据存储位置。还应记录提取批次、试剂批号、PCR 板位、文库编号、测序批次及适用的批次效应评价结果。

12.1.6 质量控制记录应包括空白样品、平行样品、阳性质控样品、测序质量和污染控制结果。

12.2 结果报告

12.2.1 结果报告应包括样品基本信息、肠道内容物获取方法、DNA 提取方法、测序分析方法、质量控制结果、异常情况和结果判定。报告还应说明采用 16S 或宏基因组路线、测序深度与有效读段数、空白和阳性质控的检测结果、数据过滤及去污染阈值、参考数据库名称和版本、功能注释流程及分析有效性判定依据。

12.2.2 16S rRNA 基因扩增子测序结果应报告：

a）样品中细菌群落的 Alpha 多样性指数（Shannon 指数、Simpson 指数、Chao1 指数、Observed species 等）；

b）样品间细菌群落结构的 Beta 多样性分析结果（PCoA/NMDS 排序图）；

c）报告至具有可靠分类学注释支持的最低分类等级的细菌群落组成和相对丰度；对不能可靠注释至种水平的分类单元，应标注为未分类或未确定；

12.2.3 宏基因组测序结果应报告：

a）样品中微生物群落的物种组成和相对丰度（门、纲、目、科、属、种各分类水平）；

b）基于 KEGG 数据库的功能基因组成和代谢通路分析结果；

c）各样品间功能基因组成的差异分析结果。

12.2.4 结果宜表述为“蚯蚓肠道细菌群落组成”或“规定方法条件下获得的蚯蚓肠道相关细菌群落信息”。

12.2.5 报告应注明肠壁和肠腔未去除，且结果反映的是肠道内容物样品整体细菌群落，不得将结果表述为单纯“肠腔内容物”或单纯“肠壁”细菌群落。

12.2.6 未按本文件执行的步骤和调整的参数应在报告中说明。

12.2.7 原始数据、质量控制记录和结果报告应归档保存。原始测序数据应提交至公共数据库（如NCBI SRA）并获得相应的登录号。

附录 A

（资料性）

蚯蚓肠道细菌提取与分析数据记录表

A.1 本附录给出了样品基本信息、采样区域与环境信息、蚯蚓采集保存运输和交接、体表清洗与无菌解剖、样品保存、DNA 提取、PCR 扩增、测序、质量控制、异常情况、结果报告核查和记录确认的记录表样式，格式参照《土壤蚯蚓肠道细菌提取与技术规范》附录 A 执行。

表 A.1　样品基本信息与采样记录表

项目	记录内容	项目	记录内容
样品编号		样品来源	
采样地点		采样日期	
GPS 坐标		土地利用方式	
土壤类型		样方面积	
采样深度		蚯蚓数量	
完整蚯蚓活体数量		总鲜重	
平行样方与 DNA 样品对应编号		采样人员及签字	
对应土壤编号		测序批次	
原始数据登录号（若有）		备注	

表 A.2　蚯蚓保存运输和交接记录表

项目	记录内容	项目	记录内容
样品编号		样方编号	
采样时间		保存方式	
运输温度		运输时间	
到样状态		到样时间	
交接人员		交接确认	
备注			

表 A.3　蚯蚓体表清洗和解剖记录表

项目	记录内容	项目	记录内容
样品编号		样品数量	
体表清洗液		清洗次数	
体表消毒		消毒时间	
解剖界限	咽部后端至肛门端	肠道内容物湿重	
合并蚯蚓个体数		肠道是否完整	
异常样品弃用数		解剖空白编号	
体表清洗空白编号		备注	

表 A.4　提取扩增测序记录表

项目	记录内容	项目	记录内容
样品编号		提取日期	
DNA 提取试剂盒		浓度（ng/μL）	
A_{260}/A_{280}		A_{260}/A_{230}	
PCR 引物		PCR 预混液	
循环数		PCR 重复数	
PCR 阴性对照编号		提取扩增备注	
测序公司/平台		测序策略	
建库方法、文库编号		文库输入量、浓度、片段分布	
建库阴性/阳性对照编号		测序批次编号	
原始数据量		质控软件	
有效数据量		去噪/聚类方法	
物种注释参考数据库		注释软件	
未注释序列比例		组装/ORF 预测参数	
功能数据库版本/注释比例		Alpha/Beta 多样性软件	
LEfSe 或随机森林软件版本		测序对接人	

表 A.5　质量控制与异常情况记录表

项目	记录内容	项目	记录内容
体表清洗空白编号		是否检出目标条带	
解剖空白编号		是否检出	
DNA 提取空白编号		是否检出	
PCR 阴性对照		是否检出	
平行样品数		平行样间 Bray-Curtis 相异度	
模拟菌群批号		PCR 条带是否清晰	
测序结果是否符合预期		测序有效序列数判定	
Q30 判定		分析过程是否有效	
异常环节	□采集　□运输　□解剖　□提取　□PCR　□测序　□分析　□其他		
异常描述			
原因分析			
处理措施			
记录人		日期	

表 A.6　结果核查与记录确认表

表 A.6.1　结果核查与记录确认表

核查板块	核查内容
结果报告	□基本信息　□提取方法　□测序方法　□质控结果　□异常情况及判定
16 S 分析结果	□Alpha 多样性　□Beta 多样性　□各分类水平相对丰度图　□差异显著类群
宏基因组结果	□物种组成　□KEGG 功能基因及代谢通路　□组间功能差异

表 A.6.2　数据归档确认表

数据内容	是否包含	归档内容	记录内容
原始测序数据提交 NCBI SRA	□是　□否	登录号	
原始数据本地归档	□是　□否	路径	
质控记录本地归档	□是　□否	路径	
结果报告本地归档	□是　□否	路径	

表 A.6.3　责任确认表

人员	签字	日期
操作人		
复核人		
项目负责人		

附录 B

（规范性）

蚯蚓肠道细菌 Alpha 与 Beta 多样性计算方法

B.1 Alpha 多样性

B.1.1 Shannon 多样性指数（H′）按公式（B.1）计算：

$$H' = -\Sigma（p_i \times \ln p_i） \quad .....（B.1）$$

式中：

H′ —— Shannon 多样性指数；

p_i —— 第 i 个 OTU/ASV 的相对丰度。

B.1.2 Simpson 多样性指数（D）按公式（B.2）计算：

$$D = 1 - \Sigma（p_i^2） \quad .....（B.2）$$

式中：

D —— Simpson 多样性指数；

p_i —— 第 i 个 OTU/ASV 的相对丰度。

B.1.3 Chao1 丰富度估计值按公式（B.3）计算：

$$Chao1 = S_{obs} + (n_1^2)/(2n_2) \quad .....（B.3）$$

式中：

S_{obs} —— 观测到的 OTU/ASV 数量；

n_1 —— 仅含 1 条序列的 OTU/ASV 数量（singletons）；

n_2 —— 仅含 2 条序列的 OTU/ASV 数量（doubletons）。

B.2 Beta 多样性

B.2.1 Bray-Curtis 相异度按公式（B.4）计算：

$$BC_{ij} = 1 - (2C_{ij})/(S_i + S_j) \quad .....（B.4）$$

式中：

C_{ij} —— 样品 i 和样品 j 共有的物种丰度之和；

S_i —— 样品 i 中所有物种的总丰度；

S_j —— 样品 j 中所有物种的总丰度。

附录 C

（资料性）

常规操作参数汇总

C.1 常规操作参数

步骤	常规操作参数	备注
土壤样品采集	0 cm～20 cm 表层土壤	去除石粒及其他杂物
土壤样品缩分	四分法	充分混合后缩分
土壤样品保存	−80 ℃	不同处理各保留 3 份
蚯蚓体表清洗	无菌水漂洗 5 次→75 %乙醇 30 s→无菌水漂洗 5 次	不得挤压体壁
消化道解剖	沿腹侧或背侧体壁纵向剪开，自咽部后端至肛门端	肠壁与肠腔内容物不去除
肠道内容物样品保存	−80 ℃	按单次使用量分装
DNA 提取样品量	肠道内容物 0.25 g～0.50 g（鲜重）	不足时可合并同一样方个体
DNA 提取方法	FastDNA™ SPIN Kit 或 DNeasy® PowerSoil® Pro Kit	严格按说明书操作
DNA 质量要求	A_{260}/A_{280} 1.8～2.0；A_{260}/A_{230} ≥1.8	琼脂糖凝胶电泳检测完整性
16S 扩增引物	341F / 806R（V3-V4 区）	扩增产物约 460 bp
16S 测序平台	Illumina MiSeq（2×250 bp 或 2×300 bp）	—
宏基因组测序平台	Illumina NovaSeq（2×150 bp）	全基因组鸟枪法
OTU/ASV 聚类阈值	97 %序列相似性（OTU）或 DADA2 去噪（ASV）	—
16S 参考数据库	SILVA 数据库（SSU138.1）	—
功能注释数据库	KEGG	宏基因组

参考文献

[1] Chao H, Kong L, Zhang H, et al. Metaphire guillelmi gut as hospitable micro-environment for the potential transmission of antibiotic resistance genes. Science of The Total Environment, 2019, 669: 353-361.

[2] Zhu D, Delgado-Baquerizo M, Su J Q, et al. Deciphering potential roles of earthworm gut microbiome in the soil ecosystem. Soil Biology and Biochemistry, 2022.

[3] Bolger A M, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. Bioinformatics, 2014, 30(15): 2114-2120.

[4] Pruesse E, Quast C, Knittel K, et al. SILVA: a comprehensive online resource for quality checked and aligned ribosomal RNA sequence data compatible with ARB. Nucleic Acids Research, 2007, 35(21): 7188-7196.

[5] Moriya Y, Itoh M, Okuda S, et al. KAAS: an automatic genome annotation and pathway reconstruction server. Nucleic Acids Research, 2007, 35(suppl_2): W182-W185.

[6] Li H, Durbin R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. Bioinformatics, 2009, 25(14): 1754-1760.

[7] Menzel P, Ng K L, Krogh A. Fast and sensitive taxonomic classification for metagenomics with Kaiju. Nature Communications, 2016, 7: 11257.

[8] Klindworth A, Pruesse E, Schweer T, et al. Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. Nucleic Acids Research, 2013, 41(1): e1.

[9] Bolyen E, Rideout J R, Dillon M R, et al. Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. Nature Biotechnology, 2019, 37: 852-857.