《蚯蚓肠道细菌群落组成分析技术规范》编制说明

一、工作简况

（一）任务来源

1. 行业计划立项情况：本标准由南京农业大学牵头申报中国土壤学会团体标准制定项目，编制类型为“制定”。现有材料未载明正式立项文号和项目编号，最终以中国土壤学会正式立项文件为准。
2. 提出与归口单位：本标准由中国土壤学会提出并归口管理。
3. 立项依据：依据《中华人民共和国标准化法》《团体标准管理规定》等有关要求，针对目前土壤蚯蚓肠道细菌群落提取与分析中蚯蚓采集、保存运输、体表清洗、无菌解剖、肠道内容物获取、DNA 提取、16S rRNA 基因扩增子测序、宏基因组鸟枪法测序及质量控制等方面方法多样、不同实验室技术口径不一致的问题，结合土壤微生物生态学、土壤动物生态学、环境微生物监测和土壤—蚯蚓肠道细菌关联研究的实际需求，制定覆盖样品采集、保存运输与交接、体表清洗、无菌解剖、肠道内容物样品获取、细菌 DNA 提取、16S rRNA 基因扩增子测序分析、宏基因组鸟枪法测序分析和数据记录与结果报告的统一技术规范。

（二）协作 / 起草单位

1. 牵头起草单位：南京农业大学。

2.参编单位：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

（三）主要工作过程

1、成立标准编制项目组

2025 年 7 月，南京农业大学围绕土壤蚯蚓肠道细菌群落提取与分析的技术需求，组织开展标准编制工作，明确标准的基本框架、主要内容和工作任务，制定标准编制工作计划。标准编制工作以提高蚯蚓肠道细菌群落提取与分析方法的规范性、可重复性和结果可比性为目标，确定了标准编制的主要技术内容和工作

方向。

2、数据和资料收集

本标准在现有土壤微生物群落分析技术和蚯蚓肠道微生物研究成果的基础上，结合相关实验室常用技术方法及国内外研究文献编制。

2025 年 10 月—2026 年 7 月，南京农业大学联合中国科学院南京土壤研究所等单位系统收集和整理了蚯蚓采集、保存运输、体表清洗、无菌解剖、肠道内容物获取、DNA 提取、16S rRNA 基因扩增子测序、宏基因组鸟枪法测序及质量控制等方面的技术资料，重点分析了不同土壤类型、蚯蚓物种及实验条件对肠道样品质量、DNA 提取效果和测序分析结果的影响。

同时，参考 GB/T 6682、GB 19489—2008、GB 4789.1—2016、GB/T 43459—2023、GB/T 27403、GB/T 40226—2021、HJ/T 166、HJ 710.10—2014 等相关标准文件，梳理样品采集与保存、实验室生物安全、核酸提取、高通量测序及数据质量控制等技术要求，为标准技术内容的确定提供依据。

3、标准起草与立项

2026 年 10 月，标准编制组根据前期技术研究成果，结合相关文献及实验室操作经验，研究确定标准的基本框架、主要内容和关键技术要求，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》的要求编写形成标准草案及编制说明，并按照中国土壤学会团体标准制定程序提交立项申请。2026 年 10 月 22 日，根据立项函评专家评审同意立项，标准编制工作启动。

4、征求意见与完善

标准立项后，编制组根据立项函评专家意见修改完善标准草案，完成征求意见初稿。2026 年 10 月 25 日，向 7 家单位专家征集意见，共收到反馈意见 35 项，其中采纳 29 项、部分采纳 6 项、未采纳 0 项。2026 年 11 月 5 日，编制组根据征集意见对标准文本逐条修订，完成征求意见稿和编制说明，提交中国土壤学会。

（四）起草组成员及其所做的主要工作

1. 孙明明：项目总负责人，负责标准总体技术路线、框架设计、关键内容统筹、起草组协调及全过程质量控制，重点把关标准定位、适用范围以及 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的设置。

2.吴世茂、张文：负责术语和定义、缩略语、规范性引用文件梳理及标准文本规

范性校核；负责数据记录与结果报告、附录记录表、结果核查与记录确认内容编制。重点核对“肠道内容物”“肠道样品”“肠腔内容物”等术语的一致性，以及正文、附录和编制说明的前后对应关系。

3.王丹蕊、付玉豪：负责蚯蚓采集、保存、运输和交接条款编制，参与采样点位设置、平行样方设置、活体保存运输条件、蚯蚓种类鉴定信息、采样努力量、异常样品弃用记录及样品交接记录表的设计与资料汇总。

4.范为宝、姜夏烨：负责蚯蚓体表清洗、无菌解剖和肠道内容物样品获取条款编制，参与体表清洗空白、解剖空白、解剖有效性判定、肠道内容物完整性控制及不同蚯蚓物种和土壤类型下样品处理条件适用性评价。

5.刘鹏、徐明钻：负责土壤—蚯蚓肠道细菌关联研究中对应土壤样品采集、保存、编号对应和追溯条款编制；参与野外采样、样品交接、原始数据归档、公共数据库提交及实验室间比对组织工作。

6.王超、陈林：负责细菌 DNA 提取、样品前处理、样品称量、合并规则、DNA 质量检测及提取空白条款编制，参与 DNA 提取试剂盒适用性、试剂批次记录、提取技术重复设置和防交叉污染措施的内容编写。

7.朱冬、李弘哲：负责 16S rRNA 基因扩增子测序分析条款编制，参与 PCR 引物、扩增体系、PCR 重复、阴性对照、PCR 产物检测、测序数据处理、去噪与 ASV 生成、SILVA 注释、decontam 污染识别及 Alpha/Beta 多样性分析等内容编写。

8.何尔凯、张宴：负责宏基因组鸟枪法测序分析条款编制，参与文库构建、测序策略、数据过滤、宿主序列去除、分类学注释、KEGG/UniRef90/MetaCyc 功能注释、组成型数据差异分析、多重比较校正及结果解释边界等内容编写。

9.胡建：质量控制专项负责人，负责质量控制条款编制，统筹体表清洗空白、解剖空白、DNA 提取空白、PCR 阴性对照、阳性质控、平行样品、污染负荷控制、测序质量控制和结果判定等指标设置，并汇总各双人组合质量控制要求的衔接。

二、标准编制原则及主要内容确定依据

（一）编制原则

1.依法合规、规范编制：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》组织标准文本，符合团体标准管理要求，并与实验室生物安全、实验室质量控制、土壤环境监测和生物多样性观测等现

行标准相衔接。

2.科学性原则：以蚯蚓肠道内容物样品获取、细菌 DNA 提取、16S rRNA 基因扩增子测序和宏基因组鸟枪法测序为技术主线，采用空白样品、平行样品、阳性质控、污染控制和测序质量指标评价方法性能。标准明确 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。

3.针对性与适应性原则：充分考虑农田、森林、草地、湿地、污染场地及实验室培养蚯蚓等不同对象，以及不同蚯蚓物种、土壤类型和实验条件差异，设置可操作的采样、解剖、提取和测序分析要求，并允许在经验证的前提下进行参数调整。

4.科学性与可操作性并重：优先采用体视显微镜、生物安全柜或洁净操作台、常规冷冻离心、核酸蛋白分析仪、PCR 扩增仪、凝胶电泳和 Illumina 测序平台等科研和检测实验室可获得的技术，避免设置不必要的高设备门槛。16S rRNA 基因扩增子测序和宏基因组鸟枪法测序两条路线可依据研究目的选用其中一种或两种。

5.全流程闭环质量控制：从蚯蚓采集、保存运输、体表清洗、无菌解剖、肠道内容物获取、样品保存、DNA 提取、PCR 扩增、文库构建、测序到数据分析，设置体表清洗空白、解剖空白、DNA 提取空白、PCR 阴性对照、阳性质控、平行样品、污染控制和测序质量控制要求，形成可追溯质量控制链。

6.协调互补原则：与 GB/T 6682、GB 19489—2008、GB 4789.1—2016、GB/T 43459—2023、GB/T 27403、GB/T 40226—2021、HJ/T 166、HJ 710.10—2014 等现有文件形成衔接，对其已规定的通用要求不重复替代，重点补充土壤蚯蚓肠道细菌群落提取与分析这一专门技术环节。

（二）标准核心内容及确定依据

本标准为全新制定的中国土壤学会团体标准，无旧版标准，不涉及新旧版本技术条款对比。标准围绕“蚯蚓样品—完整肠道内容物样品—细菌 DNA—测序数据—结果报告”的前处理和分析链条设置技术要求，各章节主要内容及确定依据如下：

1. 范围（第 1 章）

规定土壤蚯蚓采集、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、宏基因组鸟枪法测序分析及质量控制要求。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。标准设置 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。上述设置用于明确标准边界，避免将肠道细菌群落提取分析与前处理、测序和生物信息分析以外的环节混淆。

2. 规范性引用文件（第 2 章）

引用 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》等文件，为实验用水、生物安全、微生物检验总则、洁净操作、实验室质量管理、土壤采样、土壤动物观测及后续分子分析提供通用依据。

3. 术语、定义和缩略语（第 3 章）

设置土壤蚯蚓、蚯蚓肠道内容物或肠道内容物、四分法、16S rRNA 基因扩增子测序、宏基因组鸟枪法测序、细菌群落组成、操作分类单元、扩增子序列变体、细菌分类等级、Alpha 多样性、Shannon 多样性指数、Simpson 多样性指数、Beta 多样性等术语，统一不同实验室在样品形态、处理过程和结果表达方面的技术口径。其中特别明确“肠道内容物”或“肠道样品”指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；“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。该定义为后续解剖、DNA 提取和结果报告口径提供了统一基础。

4. 试剂与材料（第 4 章）

规定分析纯及以上试剂、符合 GB/T 6682 一级水要求的实验用水，以及与样

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。规定 PBS 应采用 1×PBS，pH 为 7.0±0.2，实验室配制 PBS 应经 0.22 μm 滤膜除菌，商品化 PBS 应为无菌级，使用前预冷至 4 ℃；75%乙醇用于体表消毒；细菌 DNA 提取宜采用商业化土壤或粪便微生物 DNA 提取试剂盒，如 FastDNA™ SPIN Kit、DNeasy® PowerSoil® Pro Kit 或性能相当产品；16S rRNA 基因 V3—V4 区扩增引物为 341F 和 806R，或经验证性能相当的引物对；PCR 预混液应采用含高保真 DNA 聚合酶的商业化预混液；PCR 产物纯化可使用 AxyPrep DNA 凝胶提取试剂盒或性能相当产品；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硬质样品盒，盒盖设置通气孔并防止蚯蚓逸出；DNA 样品保存冻存管宜采用低核酸吸附产品。上述规定用于保证样品完整性、DNA 质量和测序分析可比性。

5. 仪器和设备（第 5 章）

规定蚯蚓采集器具、解剖器具、体视显微镜、生物安全柜或洁净操作台、感量不低于 0.01 g 的电子天平、最高转速不低于 2500 rpm 的涡旋振荡器、组织匀浆或研磨装置、可调至 4 ℃且最大离心力不低于 15000×g 的高速冷冻离心机、核酸蛋白分析仪、PCR 扩增仪、凝胶电泳仪、Illumina MiSeq、NovaSeq 或性能相当的高通量测序平台、2 ℃～8 ℃冰箱、−20 ℃冰箱和−80 ℃超低温冰箱、最小分度值不大于 0.1 pH 单位的 pH 计等。根据蚯蚓肠道样品处理特点，强调体视显微镜用于观察和解剖，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。

6. 样品采集、保存、运输和交接（第 6 章）

规定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。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。常规表层样方宜采用手拣法采集 0 cm～20 cm 土层中的蚯蚓；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。应剔除死亡、严重损伤、体表破裂或状态异常的个体。采集后的蚯蚓应按平行样方分别置于带通气孔的聚丙烯硬

质样品盒中，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。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。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。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；蚯蚓到达实验室后应在 12 h 内完成体表清洗和解剖；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。上述条件定位为常规推荐要求，特殊物种、特殊生境或偏离推荐条件时应通过方法确认并记录依据。

7. 蚯蚓肠道内容物样品获取（第 7 章）

规定体表清洗、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，操作前使用 75%乙醇擦拭台面并静置 10 min；除体表乙醇消毒外，缓冲液和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。体表清洗时，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；将初洗后的蚯蚓完全浸入 75%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，每次更换新的清洗液；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；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。无菌解剖时，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；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；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；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。每批样品应设置解剖空白。解剖有效性判定包括肠道连续、管状结构完整，肠壁与肠腔内容物未分离，无肠内容物明显外泄，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。上述设置用于保证“完整肠道内容物样品”定义的可操作性

和不同实验室结果可比性。

8. 细菌 DNA 提取（第 8 章）

规定 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；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；DNA 提取过程应在洁净区域进行，避免外源 DNA 污染。样品前处理时，从−80 ℃取出肠道内容物样品，在冰上解冻；每份样品称取 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；不得将不同样方混合视为同一生物学重复。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。DNA 提取应采用商业化土壤或粪便微生物 DNA 提取试剂盒，推荐 FastDNA™ SPIN Kit、DNeasy® PowerSoil® Pro Kit 或性能相当产品，并严格按照制造商操作说明书进行。为评价提取过程技术重复性，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；DNA 提取过程中应同步设置提取空白对照。DNA 质量检测规定 A260/A280 比值应在 1.8～2.0 之间，A260/A230 比值应不低于 1.8；DNA 完整性应通过 1%～2%琼脂糖凝胶电泳检测，应出现清晰主条带，无明显降解。DNA 样品应置于无菌、低吸附、密封性良好的冻存管中，于−20 ℃或−80 ℃保存，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（第 9 章）

规定 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；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参照样品并评价批次效应。PCR 扩增以提取的总 DNA 为模板，对细菌 16S rRNA 基因 V3—V4 区域进行扩增，引物序列为 341F 和 806R。标准给出 25 μL 反应体系作为待验证示例，并明确具体体系、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，同一比较任务的循环数应保持一致，调整时应记录依据。每个样品应设置 3 个 PCR 重复，PCR 扩增应设置阴性对照。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；纯化后应采用 Qubit® 3.0 或性能相当荧光定量仪定量；在 Illumina 平台进行双端测序，读长 2×250 bp 或 2×300 bp。测序数据处理应依次进行质量评估、接头及引物去除、截断与过滤、去噪、双端合并及嵌合体去除，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；宜采用 DADA2 等经验证去噪流程生成 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。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，按空白类型和实验批次分别评估，阈值应依据空白数量、污染背景及方法验证确定，不得机械采用统一阈值，并应进行保留与剔除两种处理的敏感性分析。分类学注释以 SILVA 数据库（SSU138.1）为参考，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。数据分析规定 Alpha 多样性包括 Observed species、Chao1、ACE、Shannon 和 Simpson 等指数，Beta 多样性包括 Bray-Curtis 相异度、Jaccard 距离、Unweighted UniFrac 距离和 Weighted UniFrac 距离等，组间差异可采用 Wilcoxon 秩和检验、Kruskal-Wallis 检验、t 检验和 PERMANOVA 等方法，多重比较应采用 FDR 等方法校正，并报告效应量、原始 P 值和校正后 P 值。

10. 宏基因组鸟枪法测序分析（第 10 章）

规定本章适用于基于第 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；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。文库构建与测序规定用于宏基因组文库构建的 DNA 应符合第 8 章质量要求，DNA 投入量应满足所用文库构建试剂及测序平台技术要求；应根据样品 DNA 质量和测序平台要求选择适宜文库构建方法，完成 DNA 片段化、末端处理、接头添加、纯化及必要文库扩增；构建后文库应检测浓度、插入片段长度及分布，评估接头二聚体污染，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；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。测序数据处理规定原始双端 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；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 或其他等效工具识别并去除宿主来源序列，记录参考基因组来源、版本、比对参数及宿主序列去除比例；缺乏适用宿主参考基因组时，应采用其他适宜方法评估宿主序列潜在影响，记录方法并说明局限性，不应将来源未明确的序列直接判定为细菌序列。数据分析规定分类学注释可采用 Kraken2、MetaPhlAn 或经验证等效方法，参考数据库宜采用 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。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流程；基于序列的功能分析宜使用 UniRef90 和 MetaCyc 等数据库，开展 KEGG Orthology 或通路注释时应说明映射方法；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。群落比较与统计分析规定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转换、ANCOM-BC 等考虑组成效应的方法；应基于细菌分类组成数据计算 Alpha 多样性和 Beta 多样性，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；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，对多重假设检验进行校正并报告原始 P 值、校正后 P 值或 q 值及效应量；每组仅有 3 个独立平行样品时，组间差异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。

11. 质量控制（第 11 章）

规定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；每批样品应设置空白样品、平行样品和

阳性质控样品，质控样品应与实际样品同步处理并采用相同 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，尽量避免处理组与批次完全重合。空白样品规定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；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 阴性对照及适用操作空白进行序列层面污染评估。平行样品规定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；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。阳性质控规定每批 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；阳性质控 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，具体可接受偏差应通过方法确认确定。测序质量控制规定 16S rRNA 基因扩增子测序的优质序列数应不少于 20000 条/样品；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；测序质量得分 Q30 应不低于 80%。污染控制规定若某一样品中经 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%，应重新评估该批次空白设置、试剂批次和操作环境，而非仅作数据层面去污染处理。结果判定规定符合各类空白样品未检出目标扩增产物或信号低于检出限、技术重复及适用平行质控符合经验证分析精密度要求、独立样方真实生物学变异得到合理评价、阳性质控样品扩增和测序结果符合预期、测序数据量满足最低要求且 Q30 不低于 80%、宏基因组满足经验证去宿主后有效数据量及分析充分性要求、关键过程参数和异常情况记录完整等条件时，可判定分析过程有效。

12.数据记录与结果报告（第 12 章）

规定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；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；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；DNA提取记录应包括DNA提取方法、试剂盒信息、样品量、DNA浓度、A260/A280比值和DNA产量；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；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。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，并说明采用16S或宏基因组路线、测序深度与有效读数、空白和阳性质控检测结果、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。16S rRNA基因扩增子测序结果应报告Alpha多样性指数、Beta多样性分析结果、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；宏基因组测序结果应报告物种组成和相对丰度、基于KEGG数据库的功能基因组成和代谢通路分析结果、各样品间功能基因组成差异分析结果。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”；报告应注明肠壁和肠腔未去除，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；未按本文件执行的步骤和调整的参数应在报告中说明；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）并获得相应登录号。

13.附录A～C

附录A为资料性附录，提供样品基本信息、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。附录B为规范性附录，规定蚯蚓肠道细菌Alpha多样性与Beta多样性计算方法。附录C为资料性附录，汇总常规操作参数。附录设置用于统一计算和记录口径，并为不同实验室提供可操作参数选择依据。

（三）主要技术参数的论据与设置思路

1.活体与低温原则：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；运输温度 4 ℃±2 ℃，从采集结束至到达实验室不超过 24 h，到样后 12 h 内完成体表清洗和解剖；除体表乙醇消毒外，缓冲液和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超过 15 min；肠道内容物样品于−80 ℃保存。核心目的是减少蚯蚓死亡、肠道微生物群落偏移、核酸降解和反复冻融造成的影响。

2.体表清洗与消毒：采用预冷无菌水漂洗 5 次、75%乙醇 30 s、预冷无菌水连续漂洗 5 次，并收集末次漂洗液不少于 1.0 mL 作为体表清洗空白。该设置用于在去除体表土壤和植物残体、降低外源污染的同时，避免挤压或刺破体壁造成肠内容物外泄。

3.无菌解剖与完整肠道内容物定义：解剖界限为自咽部后端至肛门端连续分离完整消化道，肠壁与肠腔内容物不得分离，不得刮取、吸取或单独收集肠腔内容物，不得剥离肠壁，不得冲洗肠腔内部。该定义和操作要求用于保证样品代表完整肠道内容物整体细菌群落，并支撑结果报告中“不得表述为单纯肠腔内容物或单纯肠壁细菌群落”的要求。

4.样品量与合并规则：解剖后应保证可获得不少于 0.50 g 完整肠道湿重；DNA 提取每份样品称取 0.25 g～0.50 g 鲜重；肠道内容物不足 0.25 g 时，可合并同一平行样方内多个完整个体至 0.25 g 左右，并记录合并个体数，小型蚯蚓合并数不超过 30 条；不得将不同样方混合视为同一生物学重复。该设置用于在样品量受限条件下保持生物学重复的独立性。

DNA 质量阈值：A260/A280 为 1.8～2.0，A260/A230 不低于 1.8，琼脂糖凝胶电泳出现清晰主条带且无明显降解。该设置与常规分子生物学质量控制要求一致，用于保证后续 PCR 扩增和测序文库构建质量。

5.16S rRNA 基因扩增子测序参数：采用 341F/806R 引物扩增 V3—V4 区，目标条带约 460 bp；25 μL PCR 配方作为待验证示例，具体体系、退火温度和循环数应按所用试剂及引物验证结果确定；每样品设置 3 个 PCR 重复并设置阴性对照；宜采用 DADA2 生成 ASV，如采用 97%相似性 OTU 聚类应另行记录，不得

将 ASV 与 OTU 结果未经方法验证直接合并比较；分类注释采用 SILVA SSU138.1 并报告至可靠最低分类等级。上述设置用于兼顾方法通用性、分辨率和不同实验室可比性。

6.宏基因组鸟枪法测序参数：采用非靶向随机片段化和高通量测序，双端 150 bp 测序时目标插入片段长度可参考 300 bp～500 bp；数据过滤可采用 fastp，宜去除不确定碱基、长度＜50 bp 和平均质量＜20 的序列；有可靠宿主参考基因组时采用 Bowtie2 或 BWA 去宿主，缺乏参考基因组时应评估宿主序列潜在影响并说明局限性；分类注释采用 Kraken2、MetaPhlAn 或经验证等效方法，功能分析采用 HUMANN 或组装 ORF 流程；功能注释结果仅反映功能基因组成与代谢潜力，不得直接解释为基因表达或实际代谢通量。

7.质量控制阈值：16S 优质序列数不少于 20000 条/样品；Q30 不低于 80%；宏基因组原始数据量 10 Gb/样品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判定标准；decontam 低污染特征占总优质序列比例超过 10%时标记污染负荷偏高，批次因低丰度污染剔除 ASV/OTU 比例超过 20%时重新评估空白、试剂批次和操作环境。上述阈值定位为推荐控制值或设计参考值，正式报批前应结合代表性样品验证结果确认。

8.不同土壤类型和蚯蚓物种的参数适配：标准覆盖农田、森林、草地、湿地、污染场地及实验室培养蚯蚓，强调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；偏离常规方案时应记录原因和调整依据。对于不同蚯蚓物种、不同土壤基质和不同研究目的，应通过方法确认评价体表清洗、解剖、DNA 提取、PCR 抑制、宿主 DNA 比例和测序深度等因素的影响。

三、试验验证分析、技术经济论证、预期综合效益

（一）主要试验验证综述报告

标准关键参数需要由代表性蚯蚓样品和土壤样品的方法验证结果予以支撑。现有编制材料已经形成蚯蚓采集保存运输、体表清洗、无菌解剖、肠道内容物获取、DNA 提取、16S rRNA 基因扩增子测序、宏基因组鸟枪法测序和质量控制的技术框架，但未提供完整的验证地点、蚯蚓物种、土壤类型、样本量、重复数、原始数据和统计结果。因此，本编制说明对现有材料能够支持的验证内容进行归

纳，不虚构具体效应量或统计结论；正式报批前应将完整验证结果作为技术佐证材料补充。

建议开展的验证内容包括：

1.体表清洗与消毒效果验证：比较不同清洗次数、75%乙醇消毒时间和末次漂洗液空白对体表土壤残留、外源 DNA 污染和蚯蚓存活状态的影响，用于验证体表清洗空白设置和消毒条件。

2.无菌解剖与肠道内容物完整性验证：比较不同解剖界限、镊子操作、PBS 轻柔漂洗条件对肠道完整性、肠壁与肠腔内容物未分离状态和肠内容物外泄的影响，用于验证解剖有效性判定指标和解剖空白设置。

3.样品量与合并规则验证：比较不同蚯蚓物种、个体大小和肠道湿重条件下 0.50 g 完整肠道湿重、0.25 g～0.50 g DNA 提取称样量以及小型蚯蚓合并数不超过 30 条的适用性，用于验证样品量不足时的合并规则。

4.DNA 提取方法验证：比较 FastDNA™ SPIN Kit、DNeasy® PowerSoil® Pro Kit 或性能相当试剂盒对蚯蚓肠道内容物和对应土壤 DNA 浓度、纯度、完整性和重复性的影响，评价不少于 3 次独立 DNA 提取技术重复的可行性。

5.16S rRNA 基因扩增子测序验证：比较 341F/806R 引物、PCR 循环数、3 个 PCR 重复、ASV 与 OTU 分析路线、SILVA 注释和 decontam 污染识别阈值对细菌群落组成和多样性结果的影响，用于验证 PCR 条件和生物信息分析参数。

6.宏基因组鸟枪法测序验证：比较不同 DNA 投入量、文库插入片段长度、测序深度、宿主序列去除方法和功能注释流程对分类组成和功能基因潜力结果的影响，用于验证去宿主参数、数据量参考值和功能分析流程。

6.质量控制适用性验证：采用模拟菌群 DNA、标准菌株 DNA 或已知组成质控样品开展阳性质控，评价体表清洗空白、解剖空白、DNA 提取空白、PCR 阴性对照、平行样品和污染控制阈值在不同蚯蚓物种和土壤类型中的适用性，并据此建立实验室内部控制范围。

正式报批材料建议至少报告蚯蚓物种及鉴定依据、土壤类型及主要理化性质、样品数量、独立生物学重复和技术重复、对照设置、DNA 提取和测序方法、16S 或宏基因组路线、数据量、Q30、宿主序列比例、污染特征处理、统计方法、均

值和变异指标、异常值处理原则以及关键参数最终被采纳的依据。

（二）技术经济论证

1.技术成本：本标准采用体视显微镜、生物安全柜或洁净操作台、常规冷冻离心、核酸蛋白分析仪、PCR 扩增仪、凝胶电泳和 Illumina 测序平台等成熟技术，不要求所有实施单位同时配置全部设备。仅开展细菌群落分类组成和多样性分析时，可优先采用 16S rRNA 基因扩增子测序路线；需要分析分类组成和功能基因潜力时，可采用宏基因组鸟枪法测序路线，从而为不同实验室提供分层技术路线。

2.耗材与试剂可获得性：PBS、乙醇、商业化 DNA 提取试剂盒、PCR 预混液、凝胶提取试剂盒、PES？此处不涉及 PES；常规离心管、冻存管、移液吸头和测序服务均为科研和检测实验室常用材料或服务，市场供应成熟；标准推荐 FastDNA™ SPIN Kit、DNeasy® PowerSoil® Pro Kit 等产品，但未限定特定品牌和型号，有利于控制实施成本。

3.工作效率：统一蚯蚓采集、保存运输、体表清洗、无菌解剖、肠道内容物获取、DNA 提取、16S 和宏基因组测序分析及记录要求，可减少因方法不一致导致的重复摸索、样品损失和返工，提高批量样品处理的一致性。

4.技术成熟度：标准所采用的主要方法均为土壤动物微生物生态学和环境微生物测序中常用技术，实施单位可根据研究目的、样品数量、设备条件和预算选择 16S 或宏基因组路线。正式技术经济论证中仍建议补充典型批次的耗材、工时、测序服务及设备使用成本，以形成更完整的成本依据。

（三）预期效益

1. 科学与技术效益：推动土壤蚯蚓肠道细菌群落提取与分析由不同实验室自定义流程向可记录、可验证、可比较的标准化流程转变，为土壤动物微生物生态学、土壤—蚯蚓肠道细菌关联研究和环境微生物监测提供统一前处理与测序分析基础。

2.质量管理效益：建立体表清洗空白、解剖空白、DNA 提取空白、PCR 阴性对照、阳性质控、平行样品、污染控制和测序质量控制链条，提升结果可追溯性和异常处置能力。

3.应用效益：通过覆盖农田、森林、草地、湿地、污染场地及实验室培养蚯蚓，设置 16S rRNA 基因扩增子测序和宏基因组鸟枪法测序两条路线，提高标准

在不同研究目的和应用场景中的可实施性。

4.经济效益：统一流程和记录要求有望减少重复试验、重复采样和样品损失，降低跨单位方法比对与协作沟通成本。现有材料不足以支持具体百分比或金额，因此本说明不设置未经验证的量化经济收益指标。

四、与国际、国外同类标准技术内容对比情况

（一）国外相关标准现状

1. 现有编制材料中引用 ISO 11063:2020《Soil quality — Direct extraction of DNA from soil samples》，其技术对象为土壤 DNA 的直接提取，与本标准规定的“蚯蚓采集—体表清洗—无菌解剖—肠道内容物获取—DNA 提取—16S/宏基因组测序分析—质量控制”技术链不同，不能直接替代本标准。

2.现有编制材料未提供与“土壤蚯蚓肠道细菌群落提取与分析”完全对应的国际或国外完整标准。正式报批前应继续检索 ISO、ASTM、EN/BS、US EPA 及环境 DNA、土壤动物微生物组、微生物高通量测序前处理相关文件，形成检索记录，并对命中文件的适用对象、技术步骤和质量控制要求进行核对。

3.蚯蚓肠道细菌群落提取与分析具有明显的动物组织、肠道内容物和土壤基质混合特征。蚯蚓体表清洗、无菌解剖、完整肠道内容物获取和肠道内容物样品保存等环节，现有针对土壤 DNA 直接提取、水体微生物浓缩或一般环境微生物测序的通用技术不能完整覆盖，因此需要形成面向该细分技术环节的专门规范。现有编制材料中引用 ISO 11063:2020《Soil quality — Direct extraction of DNA from soil samples》，其技术对象为土壤 DNA 的直接提取，与本标准规定的“病毒颗粒洗脱—过滤—富集—质量控制”技术链不同，不能直接替代本标准。

（二）技术差异对比

1.技术对象：本标准直接针对蚯蚓完整肠道内容物样品中的细菌群落，关注体表清洗、无菌解剖、肠壁与肠腔内容物不分离、肠道内容物样品完整性和外源污染控制，而非仅从土壤中提取总 DNA。

2.适用基质与对象：本标准覆盖农田、森林、草地、湿地、污染场地及实验室培养蚯蚓，强调不同蚯蚓物种、土壤类型和实验条件对样品质量和测序分析结果的影响。

3.技术路线：本标准同时规范 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，并明确 16S 主要用于细菌群落分类组成及多样性分析，宏基因组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。

4.质量控制：本标准以体表清洗空白、解剖空白、DNA 提取空白、PCR 阴性对照、阳性质控、平行样品、污染负荷控制、测序深度和 Q30 等构成全流程质控体系，强调技术重复与生物学重复区分、污染特征识别和参数调整需有验证依据及全过程记录。

五、采用国际标准情况及未采用原因说明

1.本标准未等同采用（IDT）或修改采用（MOD）某一项完整国际标准，而是根据我国土壤蚯蚓肠道细菌群落提取与分析的技术对象和实验室应用需求自主制定。

2.未直接采用国际标准的主要原因是：现有编制材料中未发现可完整覆盖蚯蚓采集、体表清洗、无菌解剖、肠道内容物获取、DNA 提取、16S rRNA 基因扩增子测序、宏基因组鸟枪法测序和质量控制的对应国际标准；ISO 11063:2020 关注土壤 DNA 直接提取，技术对象和过程边界不同；水体微生物浓缩或一般环境微生物测序方法亦不能直接解决蚯蚓体表清洗、无菌解剖、完整肠道内容物获取和宿主序列去除等问题。

3.本标准在编制过程中参考现行国际标准的通用原则，并与国内土壤监测、实验室质量控制、生物安全和后续分子分析要求保持协调。正式报批前应对国际标准检索结果进行更新，确保相关描述与最新文件状态一致。

六、与法律法规、现行相关标准的协调关系

（一）与法律法规协调

1.本标准作为推荐性团体标准，编制和实施应符合《中华人民共和国标准化法》及团体标准相关管理规定。

2.涉及蚯蚓活体处理、来源不明土壤样品、潜在病原宿主、气溶胶风险及污染废弃物处置时，应遵循实验室生物安全相关法律法规和管理要求，不降低法定安全底线。

3.本标准规定的技术要求用于土壤蚯蚓肠道细菌群落提取与分析前处理及测序分析，不改变生态环境、自然资源、农业等部门现行土壤采样、污染防

治和实验室管理规定的适用范围。

（二）与国家标准协调

1. GB 19489《实验室生物安全通用要求》：本标准在生物安全柜使用、个人防护、风险评估和污染废弃物处置方面与其衔接。
2. GB/T 6682《分析实验室用水》：本标准规定缓冲液配制用水符合相应实验用水要求。
3. GB/T 27403《实验室质量控制规范》：本标准通过空白样、平行样、加标回收、过程记录和结果复核等要求实现质量控制衔接。
4. GB/T 40226—2021《环境微生物宏基因组检测 高通量测序法》：本标准主要规定测序前的病毒颗粒富集过程，后续涉及环境微生物高通量测序时可执行其适用要求。

（三）与行业及国际相关文件协调

1.HJ/T 166《土壤环境监测技术规范》：本标准沿用其土壤采样和环境监测的一般原则，在此基础上细化蚯蚓采集、体表清洗、无菌解剖、低温保存和防交叉污染要求。

2.HJ 710.10—2014《生物多样性观测技术导则 大中型土壤动物》：本标准在蚯蚓采集、样方设置和样品记录方面参考其通用原则，并补充肠道细菌群落提取与分析所需的无菌操作和分子生物学质量控制要求。

3.ISO 11063:2020《Soil quality — Direct extraction of DNA from soil samples》：其适用于土壤 DNA 直接提取，本标准侧重蚯蚓肠道内容物样品中细菌群落提取与分析，二者技术对象不同，可作为相关土壤分子分析技术的互补文件。

总体而言，本标准与现行法律法规及相关标准在适用范围上不存在替代关系，主要补充土壤蚯蚓肠道细菌群落提取与分析这一细分技术环节。当本标准条款与法律法规或强制性标准要求存在差异时，应优先执行法律法规和强制性标准。

七、重大分歧意见的处理经过和依据

（一）立项函评与征求意见阶段意见处理

现有材料未载明立项函评和征求意见阶段的具体专家意见、日期及处理记录，本编制说明不虚构相关意见和处理结论。建议正式报批前补充立项函评意见汇总处理表、征求意见汇总处理表，并对下列当前需关注事项逐条说明处理情况：

1.标准名称和术语统一：草案标题中“土壤蛔肠道细菌群落提取与分析技术规范”与正文“土壤蚯蚓肠道细菌提取与分析技术规范”表述不一致，建议统一为“土壤蚯蚓肠道细菌群落提取与分析技术规范”；同时统一“肠道内容物”“肠道样品”“肠腔内容物”的使用口径，并在结果报告中明确肠壁和肠腔未去除、结果反映肠道内容物样品整体细菌群落。

2.关键参数依据：体表清洗次数、75%乙醇消毒时间、解剖界限、0.50 g 完整肠道湿重、0.25 g～0.50 g DNA 提取称样量、小型蚯蚓合并数不超过 30 条、16S PCR 循环数、宏基因组测序深度等参数，现有材料尚未提供完整验证数据。建议将相关条件明确为推荐起始参数或设计参考值，并要求偏离时通过方法验证确认，记录调整依据。

3.16S PCR 体系：草案中 25 μL 配方已明确为“待验证示例”，建议保留该定位，正式报批前补充所用试剂、引物和循环条件的验证结果，避免将未验证配方作为统一强制要求。

4.宏基因组数据量：原始数据量 10 Gb/样品已明确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判定标准。建议正式报批前补充不同蚯蚓物种、宿主 DNA 比例和研究目的下的数据量充分性评估。

5.污染控制阈值：decontam 低污染特征占比超过 10%标记、批次剔除 ASV/OTU 比例超过 20%重新评估等阈值，建议结合空白数量、污染背景和方法验证确定，并在报告中记录阈值依据和敏感性分析结果。

（二）当前尚需进一步论证的事项

1.不同蚯蚓物种、不同个体大小和不同土壤类型下 0.50 g 完整肠道湿重、0.25 g～0.50 g DNA 提取称样量及小型蚯蚓合并数不超过 30 条的适用性，仍需补充代表性样品验证数据。

2.体表清洗空白、解剖空白、DNA 提取空白和 PCR 阴性对照在不同实验室操作条件下的污染背景和控制限，需通过实验室间比对或方法验证进一步明确。

3.16S rRNA 基因扩增子测序 ASV 与 OTU 两条分析路线的结果可比性、decontam 污染识别阈值、宏基因组宿主序列去除方法和功能注释流程，需结合多批次样品验证形成实验室或方法控制范围。

4.宏基因组测序原始数据量 10 Gb/样品、去宿主后有效数据量和分类/功能注

释覆盖情况，应结合研究目的、蚯蚓物种宿主 DNA 比例和预期分析要求进一步评估。

（三）总体说明

目前现有材料未显示存在涉及标准定位、核心流程或基本质量控制原则的不可协调重大分歧。相关意见主要集中在技术参数证据、方法选择、生物安全、适用范围、记录量化和文本规范性等方面，均可通过补充验证依据、细化条款或明确适用条件予以协调。

八、涉及专利的有关说明

1.本标准规定的蚯蚓采集、体表清洗、无菌解剖、肠道内容物获取、DNA 提取、16S rRNA 基因扩增子测序、宏基因组鸟枪法测序、污染控制和数据记录等均属于公开通用实验技术，标准文本未限定特定品牌、专利设备型号或独占性商业试剂。标准中推荐 FastDNA™ SPIN Kit、DNeasy® PowerSoil® Pro Kit 等产品，但明确“或性能相当的产品”，不构成对特定品牌的排他性限定。

2.标准前言设置“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”的专利风险提示。

3.正式报批前，起草组仍应按照中国土壤学会团体标准知识产权管理要求开展必要专利检索和声明核查，形成是否涉及必要专利的结论。

4.如发现标准实施不可避免地使用某项有效专利，应按照中国土壤学会相关程序取得专利权人声明并明确许可条件。

九、标准实施要求、组织 / 技术措施及过渡期建议

（一）实施组织措施

1.标准发布后建议由中国土壤学会组织面向科研院所、高校、检测机构和相关应用单位的标准宣贯和技术培训，重点讲解蚯蚓采集保存运输、体表清洗、无菌解剖、肠道内容物样品获取、DNA 提取、16S 和宏基因组两条技术路线及质量控制要求。

2.由起草单位核心人员组成技术答疑和实施支持团队，为样品前处理、体表清洗与解剖、DNA 提取、测序分析、质量控制异常和结果记录等提供技术咨询。

3.鼓励具有土壤动物微生物生态学和环境微生物检测基础的实验室开展试点应用和实验室间比对，逐步建立不同蚯蚓物种和土壤类型下 DNA 质量、空白

污染、测序质量和分析重复性的参考范围。

4.建立标准实施反馈机制，持续收集不同蚯蚓物种、不同土壤类型、不同设备条件和不同研究用途下的应用情况，为后续复审和修订提供依据。

（二）技术保障措施

1.配套完善标准操作程序、样品采集与交接记录表、体表清洗与解剖记录表、DNA 提取与 PCR 扩增记录表、测序与质量控制记录表和结果报告模板，方便实施单位直接使用。

2.组织代表性蚯蚓物种和土壤类型的比对验证，进一步完善体表清洗、无菌解剖、样品量、DNA 提取、16S 和宏基因组测序分析及质量控制范围。

3.对 16S rRNA 基因扩增子测序和宏基因组鸟枪法测序建立可追溯的试剂批次、PCR 板位、文库编号、测序批次和设备运行记录，必要时采用模拟菌群 DNA 或标准菌株 DNA 开展实验室间能力验证。

4.建立实施案例和常见问题库，对低 DNA 产量、PCR 抑制、空白污染、宿主 DNA 比例偏高、去宿主不充分、测序深度不足和污染特征处理等常见问题提供标准化处置建议。

（三）过渡期与实施日期建议

1.建议标准发布之日起设置 6 个月过渡期，供实施单位完成文件转化、人员培训、仪器状态确认和实验室内部方法验证。

2.过渡期内可将原有实验室流程与本标准并行开展比对，重点确认体表清洗空白、解剖空白、DNA 质量、PCR 阴性对照、阳性质控、测序质量和污染控制结果的一致性。

3.建议标准实施日期由中国土壤学会结合发布安排确定；正式发布后，相关科研和检测项目可根据合同、课题或质量体系要求逐步采用。

（四）配套实施建议

1.配套文件：建议同步发布或提供标准记录表电子模板、方法验证记录模板和典型质量控制案例。

2.能力建设：鼓励相关实验室完善低温保存、体视显微镜、生物安全柜或洁净操作台、冷冻离心、PCR 扩增、核酸定量和测序数据分析等基础条件，并建立样品分区、耗材批次、试剂批次和设备运行记录。

3.后续标准化：可根据技术发展和实际需求，进一步研究蚯蚓不同肠段细菌群落分析、绝对定量、宿主 DNA 去除、RNA 分析、培养验证及宏基因组功能验证等配套技术文件。

十、其他应予说明的事项

1.标准属性：本文件为推荐性中国土壤学会团体标准，由相关科研、检测和应用单位自愿采用，不具有替代法律法规和强制性标准的效力。

2.标准适用地域：标准针对土壤蚯蚓肠道细菌群落提取与分析的一般技术过程制定，不限定具体行政区域；不同地区和不同土壤类型可依据方法验证结果调整参数后使用。

3.附录性质：附录 A“蚯蚓肠道细菌提取与分析数据记录表”为资料性附录；附录 B“蚯蚓肠道细菌 Alpha 与 Beta 多样性计算方法”为规范性附录；附录 C“常规操作参数汇总”为资料性附录。

4.标准复审：建议在标准实施后根据土壤蚯蚓肠道细菌群落提取与分析技术发展、实验室间比对结果和实际应用反馈，按照中国土壤学会有关要求适时开展复审；可参考团体标准常规复审周期，在实施约 5 年后重点评估修订需求。

5.数据与记录保存：标准要求原始记录、质量控制记录和结果报告归档保存，但现有材料未规定统一保存年限。实施单位应依据项目合同、实验室质量体系和档案管理要求确定保存期限。

6.无涉密内容：本标准规定内容为公开的土壤蚯蚓肠道细菌群落提取与分析技术，不涉及国家秘密或其他需保密的技术信息。

7.无替代废止文件：现有材料未显示存在与本标准技术对象完全相同、需由本标准替代或废止的中国土壤学会团体标准，本标准按新制定项目组织实施。

8.关键证据补充：正式报批前仍应补充能够支撑体表清洗与消毒条件、解剖有效性判定、样品量与合并规则、DNA 质量阈值、16S PCR 条件、ASV/OTU 分析路线、宏基因组去宿主和功能注释流程、测序深度及质量控制阈值的验证报告，并与征求意见处理表、标准正文和编制说明保持一致。