

# 海洋生物被膜的采集与宏基因组样品的制备

## Marine Biofilm Collection and Metagenomics Sample Preparation

张杰<sup>#</sup>, 秦澎<sup>#</sup>, 张伟鹏<sup>\*</sup>

海洋生物多样性与进化研究所, 中国海洋大学, 青岛, 山东

\*通讯作者邮箱: [zhangweipeng@ouc.edu.cn](mailto:zhangweipeng@ouc.edu.cn)

<sup>#</sup>共同第一作者

### 摘要

生物被膜 (Biofilm) 是海洋微生物重要生存方式。很多海洋微生物会定居在基质表面形成生物被膜, 其蕴含的生物量约占海洋微生物总生物量的40%。生物被膜在海水气液交界面、浮游植物、海洋雪、各种动物的体表与肠道、冷泉/热液喷口、潮间带岩石、海底、微塑料颗粒和其他人造材料表面均有分布。生物被膜以其独特的方式参与到海洋碳固定、硫氧化、氮还原等物质循环过程中, 在维持海洋生态系统稳定以及调节全球气候变化中发挥着重要的作用。收集海洋生物被膜样本可用于基于多组学和分子微生物学的物种多样性与功能特点研究。本文将介绍不同基质材料上的海洋生物被膜群落的采集与宏基因组样品的制备方法。这些方法已在本实验室的多项研究中使用。

**关键词:** 海洋生物被膜, 样品采集, 宏基因组

## 材料与试剂

1. 医用无菌棉棒
2. 灭菌海水
3. 剪刀、医用剪刀、镊子等解剖套装
4. 1.5 mL、2 mL、50 mL 离心管
5. 溶菌酶
6. DNA 提取缓冲液（500 mM NaCl、50 mM Tris-HCl [pH=8]、40 mM EDTA 和 0.75 M 蔗糖）
7. AllPrep DNA/RNA Mini Kit（QIAGEN, catalog number: 80004）
8. 1 mm 小钢珠
9. 聚碳酸酯膜（5.0  $\mu$ m 孔径）

## 仪器设备

1. Vortex-Genie 震荡仪（Scientific Industries, model: SI0236）
2. 低温高速离心机（山海天, model: TC2028R）
3. 超低温冰箱（-80 °C）（美菱, model: DW-HL528）
4. 组织破碎仪（上海净信科技发展有限公司, model: JX-FSTPRP-24）
5. 抽滤泵（KNF, model: LABOPORT® N 840 G）
6. Nanodrop device (DiaMed China Limited, Hong Kong, model: ND-1000 spectrophotometer)

## 实验步骤

### 一、岩石表面生物被膜的采集[1–3]

采用棉签刮取法采集生物被膜，具体步骤如下：

1. 选取潮间带或潮下带浸泡在海水中的石块采集其表面的生物被膜。石块大小应适中，选择能人为搬动且大部分体积沉浸在海水中的石块，应避免表面杂质污渍过多的石块。
2. 推广开来，若设  $n$  个菌株构建得到的全部可能合成菌群组合数目为  $N$ ，则由二项式定律，可推得该数目的值等于 2 的  $n$  次方（公式 2）。因此，合成菌群的组合数目会随着菌株数目的增加指数增加。鉴于此，如果采用人工操作的方法，在短时间内构建数十个不同的合成菌群可能比较容易，但是随着物种数目增加，当需要处理上百种不同的组合时，如果没有合理的设计，那么将非常容易出现错误。
3. 使用无菌海水轻柔冲洗样品表面 1–3 次，冲洗掉表面的泥沙和非紧密附着的细胞以及其它杂质。使用无菌棉签刮拭样品表面，尽量使棉签头充分蘸满生物被膜，棉签颜色明显变深。每个样品需使用 3 支以上棉签进行刮取，确保样品每一面表层生物被膜均被有效刮取，以确保取样具有代表性。岩石埋于沉积物下的部分不进行刮取。
4. 用无菌剪刀将棉签头剪下，放入含有 30 mL 无菌海水的 50 mL 离心管中，每管含 10 根左右棉签头。完成刮取后尽快将含有棉签头的离心管常温运至实验室。
5. 将离心管安装在 Vortex-Genie 震荡仪上以最大功率震荡 10 min（也可用涡旋仪或手动震荡），使棉棒上的微生物细胞充分震落至无菌海水中。
6. 将含有生物被膜微生物的海水转移至新的无菌离心管中，12,000 rpm 离心 10 min，弃上清液，收集沉淀。
7. 添加 10 mg/mL 的溶菌酶，处理 10 min。然后使用总环境 DNA 提取试剂盒（如 AllPrep DNA/RNA Mini Kit）提取沉淀中生物被膜的总 DNA，使用 Nanodrop 仪检测 DNA 浓度，确保 DNA 浓度  $>40$  ng/ $\mu$ L，总量应  $>600$  ng。总 DNA 保存于 -20 °C 冰箱中，装冰袋寄送至测序公司，用于 Illumina 平台的测序。

引用格式：张杰，秦澎，张伟鹏. (2024). 海洋生物被膜的采集与宏基因组样品的制备. *Bio-101* e2405459. Doi: 10.21769/BioProtoc. 2405459.

How to cite: Zhang, J., Qin, P. and Zhang, W. P. (2024). Marine Biofilm Collection and Metagenomics Sample Preparation. *Bio-101* e2405459. Doi: 10.21769/BioProtoc.2405459. (in Chinese)

## 二、颗粒和碎片表面生物被膜的采集[4]

当待采集的生物被膜附着于小体积物体的表面时，采用涡旋震荡法采集生物被膜，例如海洋微塑料或塑料碎片表面生物被膜、人为施放的微塑料表面生物被膜等。具体步骤如下：

1. 采集潮间带或潮下带中浸泡于海水中的塑料片。包括不同类型、不同颜色、不同形态的塑料块，塑料袋，塑料绳等，使用剪刀将过大的塑料块剪成小块。使用无菌海水轻柔冲洗塑料表面 1–3 次，用无菌镊子夹取转移至含有 30 mL 无菌水的 50 mL 离心管中，收集到离心管三分之二的体积。尽快将离心管低温运送回实验室。在 Vortex-Genie 震荡仪上以最大功率震荡 10 min（也可用涡旋仪或超声震荡），使碎片上的微生物充分震落至无菌海水中。离心、总 DNA 提取、测序的步骤同第一部分的 5, 6。
2. 乘船使用拖网采集海面漂浮的微塑料颗粒。拖网孔径根据情况设置为 100–300  $\mu\text{m}$ ，拖网时间设置为一次 30 min 左右。拖网完成后，用无菌药匙挖取网底管中的微塑料转移至含有适量的 DNA 提取缓冲液的 50 mL 离心管中，尽量避免挖取非微塑料的颗粒。离心管保存于液氮中运送回实验室。样品在 4  $^{\circ}\text{C}$  环境中解冻后，使用震荡仪，涡旋仪或超声震荡以震落碎片上的微生物。离心、总 DNA 提取、测序步骤同第一部分的 5, 6。
3. 采集人为施放的微塑料颗粒样品。将不同聚合物类型和不同粒径的灭菌微塑料或其它装入 50 目的尼龙网袋中，将网袋固定于潮下带海水以下 2 m 位置。待生物被膜发育成熟（一般 10 天以上）后取出网袋中的微塑料颗粒，将其浸泡于原位海水中尽快运送回实验室。使用无菌海水轻柔冲洗颗粒表面 1–3 次，用无菌药匙转移至含有 30 mL 无菌水的 50 mL 离心管中，收集到离心管三分之二的体积。在 Vortex-Genie 震荡仪上以最大功率震荡 10 min（也可用涡旋仪或超声震荡），使碎片上的微生物充分震落至无菌海水中。离心、总 DNA 提取、测序步骤同第一部分的 5, 6。

## 三、极微小颗粒表面生物被膜的采集[5]

当待采集的生物被膜附着于极微小颗粒的表面时（直径  $<100\ \mu\text{m}$ ），采用膜过滤法采集生物被膜，例如悬浮的藻类颗粒表面的生物被膜、生物残骸颗粒表面的生物被膜、矿物碎屑表面的生物被膜等。具体步骤如下：

1. 使用不锈钢桶收集 5 L 表层海水，或使用深海采水器收集深层海水。将海水储存在干净的棕色玻璃瓶中带回实验室。
2. 使用真空抽滤器过滤海水。将 5  $\mu\text{m}$  的滤膜安装于已灭菌的过滤器上，连好抽滤管，打开负压泵进行过滤。每过滤完一次海水观察滤膜的颜色变化，多次过滤直到滤膜颜色明显变深出现沉淀。
3. 使用灭菌的镊子从边缘夹起滤膜，滤膜变色面朝内卷成圆筒状，使用灭菌的剪刀将其剪成细条，放入含有 30 mL 无菌海水的 50 mL 离心管中，充分震荡，使滤膜上的微生物充分震落至无菌海水中。
4. 离心、总 DNA 提取、测序步骤同第一部分的 5, 6。

## 四、软体动物类及无法解剖的小型节肢动物肠道的生物被膜的采集[6]

软体动物身体柔软，桡足类动物体长一般在 1–4 mm，均无法通过刮取法获得生物被膜样本，通常采用整体研磨法来获取生物体表面的微生物样本。具体步骤如下：

1. 海洋浮游生物样本使用 25 号浮游生物网在透明度 3 倍以内的水深进行多次拖网，将浮游动物样品收集到无菌的 50 mL 离心管中。海绵等软体动物从海底采集后使用灭菌海水清洗表面细菌 3 遍，转移到 50 mL 离心管中。
2. 向 50 mL 离心管中加入适量的 DNA 提取缓冲液，将完整的生物样本在干冰中运输到实验室，并在 -80  $^{\circ}\text{C}$  冰箱中储存。
3. 微生物组 DNA 的提取：实验室内将样品在 4  $^{\circ}\text{C}$  解冻后，低速（1,000 rpm，10 min）离心去除 DNA 提取缓冲液。然后向 50 mL 离心管中加入 1 mL 无钙无镁的无菌海水缓冲液，震荡重悬生物样本，并转移至无菌的 1.5 mL 离心管中。
4. 离心管静止沉淀 5 min 后，用移液器吸取上层多余的海水，并向每个 1.5 mL 离心管中添加 10–20 颗 1 mm 的无菌小钢珠。将离心管放置在组织破碎仪中，以研磨 20 s，停 10 s，频率为 45 Hz 的条件下研

磨 5 min，获得糊状样本。也可以使用灭菌玻璃杵直接在 1.5 mL 离心管中将生物样本匀浆（生物样本量需约 1 g[湿重]）。

5. 收集浮游生物细胞和原核细胞的混合物，并使用聚碳酸酯膜（5.0  $\mu\text{m}$  孔径）过滤。收集流出物（富集的原核细胞），并将细胞以  $10,000\times g$  离心 5 min。去上清液，保留样本沉淀。
6. 核酸的提取、检测和测序送样要求同第一部分棉签刮取法的步骤 6。

## 五、大型海洋动物的肠道生物被膜样本的采集——解剖震荡法[7–11]

对于大型海洋动物的肠道生物被膜样本的采集，通常使用解剖震荡法。具体步骤如下：

1. 鱼体样本采用冷冻或头部敲击处死，装于无菌采样袋中冰浴转运回实验室进行解剖。虾蟹等甲壳类及扇贝、牡蛎等双壳类动物可直接冰浴运送回实验室再解剖。
2. 在无菌操作台中解剖样品，先用 75%酒精棉球擦拭鱼体样品外表，用灭菌后的解剖剪从肛门处朝前向上呈弧形剪开鱼体。再用 75%酒精擦拭消化道外侧的血液，用 0.9%的生理盐水反复冲洗腹腔部位数遍。用解剖剪分离出消化道并剪短，剪至 1 cm 长的小段，并存放于 2 mL 的离心管中。注意保留消化道内容物。
3. 双壳类生物需要用小刀插入壳内隔断一侧的闭壳肌，打开一侧外壳。用灭菌解剖剪沿一侧剪开外套膜，并用镊子剥离外套膜。用 0.9%的生理盐水反复冲洗数遍。再用解剖剪剪断胃肠道部分，收集于 2 mL 离心管中。
4. 每管加入 1.5 mL 的 DNA 提取缓冲液，将离心管放置在 Vortex-Genie 的水平震荡盘上，以最大功率震荡 30 min。震荡完成后，以 12,000 rpm 离心收集菌体沉淀。
5. 核酸的提取、检测和测序送样要求同第一部分棉签刮取法的步骤 6。

## 六、深海海洋生物被膜的采集[12–14]

1. 采用生物被膜发生装置来采集深海海水中形成的生物被膜：使用下面特殊的生物被膜发生装置放置到海洋中特定的位置，装置图（图 1）如下：

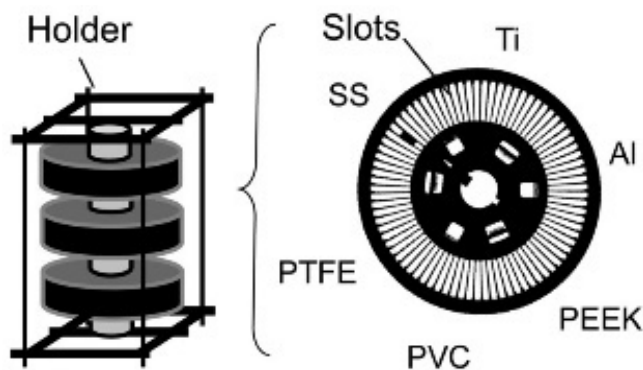


图 1. 生物被膜发生装置

采样器可包含多种生物被膜附着材料，图中仅展示铝（Al）、聚醚醚酮（PEEK）、聚氯乙烯（PVC）、聚四氟乙烯（PTFE）、不锈钢（SS）和钛（Ti）这 6 种材料。材料卡片嵌入在转盘的插槽中。将三个转盘容器固定在钢制框架中，然后浸入水中，乘采样船用缆绳将装置下沉至指定位置。

2. 待生物被膜发育成熟后，回收装置。清理装置表面吸附的大块杂质后，将转盘从框架内拆除。
3. 用无菌海水轻轻清理材料卡片表面的泥沙。使用无菌棉签刮取材料卡片表面的生物被膜，具体方法同第一部分大体积物体表面生物被膜的采集方法。

## 参考文献

1. Zhang, W., Wang, Y., Lee, O. O., Tian, R., Cao, H., Gao, Z., Li, Y., Yu, L., Xu, Y., Qian, P. Y., et al. (2013). Adaptation of intertidal biofilm communities is driven by metal ion and oxidative stresses. *Sci Rep.* 3(1): 3180. <https://doi.org/10.1038/srep03180>
2. Zhang, W., Ding, W., Li, Y. X., Tam, C., Bougouffa, S., Wang, R., Pei, B., Chiang, H., Leung, P., Lu, Y., et al. (2019). Marine biofilms constitute a bank of hidden microbial diversity and functional potential. *Nat Commun.* 10(1): 517. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-08463-z>
3. Ding, W., Wang, S., Qin, P., Fan, S., Su, X., Cai, P., Lu, J., Cui, H., Wang, M., Shu, Y., et al. (2023). Anaerobic thiosulfate oxidation by the Roseobacter group is prevalent in marine biofilms. *Nat Commun.* 14(1): 2033. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-37759-4>
4. Qin, P., Cui, H., Li, P., Wang, S., Fan, S., Lu, J., Sun, M., Zhang, H., Wang, S., Su, X., et al. (2023). Early stage of biofilm assembly on microplastics is structured by substrate size and bacterial motility. *Imeta.* 2(3): e121. <https://doi.org/10.1002/imt2.121>
5. Zheng, Y., Li, J., Sun, C., Cao, W., Wang, M., Jiang, F. and Ju, P. (2021). Comparative study of three sampling methods for microplastics analysis in seawater. *Sci Total Environ.* 765: 144495. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.144495>
6. Tian, R. M., Zhang, W., Cai, L., Wong, Y. H., Ding, W. and Qian, P. Y. (2017). Genome Reduction and Microbe-Host Interactions Drive Adaptation of a Sulfur-Oxidizing Bacterium Associated with a Cold Seep Sponge. *mSystems.* 2(2): e00184–16. <https://doi.org/10.1128/msystems.00184-16>
7. Zhang, W., Tian, R. M., Sun, J., Bougouffa, S., Ding, W., Cai, L., Lan, Y., Tong, H., Li, Y., Jamieson, A. J., et al. (2018). Genome Reduction in *Psychromonas* Species within the Gut of an Amphipod from the Ocean's Deepest Point. *mSystems.* 3(3): e00009–18. <https://doi.org/10.1128/msystems.00009-18>
8. Zhang, W., Watanabe, H. K., Ding, W., Lan, Y., Tian, R. M., Sun, J., Chen, C., Cai, L., Li, Y., Oguri, K., et al. (2019). Gut Microbial Divergence between Two Populations of the Hadal Amphipod *Hirondellea gigas*. *Appl Environ Microbiol.* 85(1): e02032–18. <https://doi.org/10.1128/aem.02032-18>
9. Chen, L., Zhang, W., Hua, J., Hu, C., Lok-Shun Lai, N., Qian, P. Y., Lam, P. K. S., Lam, J. C. W. and Zhou, B. (2018). Dysregulation of Intestinal Health by Environmental Pollutants: Involvement of the Estrogen Receptor and Aryl Hydrocarbon Receptor. *Environmental Science & Technology* 52(4): 2323–2330. <https://doi.org/10.1021/acs.est.7b06322>
10. Wei, Z., Zhao, L., Wang, S., Chang, L., Shi, J., Kong, X., Li, M., Lin, J., Zhang, W., Bao, Z., et al. (2024). Paralytic shellfish toxins producing dinoflagellates cause dysbacteriosis in scallop gut microbial biofilms. *Ecotoxicol Environ Saf.* 273: 116146. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2024.116146>
11. Gao, N., Shu, Y., Wang, Y., Sun, M., Wei, Z., Song, C., Zhang, W., Sun, Y., Hu, X., Bao, Z., et al. (2024). Acute Ammonia Causes Pathogenic Dysbiosis of Shrimp Gut Biofilms. *Int J Mol Sci.* 25(5): 2614. <https://doi.org/10.3390/ijms25052614>
12. Zhang, W. P., Wang, Y., Tian, R. M., Bougouffa, S., Yang, B., Cao, H. L., Zhang, G., Wong, Y. H., Xu, W., Batang, Z., et al. (2014). Species sorting during biofilm assembly by artificial substrates deployed in a cold seep system. *Sci Rep.* 4(1): 6647. <https://doi.org/10.1038/srep06647>
13. Zhang, W., Wang, Y., Bougouffa, S., Tian, R., Cao, H., Li, Y., Cai, L., Wong, Y. H., Zhang, G., Zhou, G., et al. (2015). Synchronized dynamics of bacterial niche-specific functions during biofilm development in a cold seep brine pool. *Environ Microbiol.* 17(10): 4089–4104. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12978>
14. Zhang, W., Tian, R., Bo, Y., Cao, H., Cai, L., Chen, L., Zhou, G., Sun, J., Zhang, X., Al-Suwailem, A., et al. (2016). Environmental switching during biofilm development in a cold seep system and functional determinants of species sorting. *Mol Ecol.* 25(9): 1958–1971. <https://doi.org/10.1111/mec.13501>