

DOI: 10.7524/AJE.1673-5897.20191027003

张忠云, 叶茂, 孙明明, 等. 环境胞外胞内 DNA 的行为归趋及生态功能研究进展[J]. 生态毒理学报, 2020, 15(6): 10-23

Zhang Z Y, Ye M, Sun M M, et al. Review of extracellular and intracellular DNA environmental behavior and ecological function [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2020, 15(6): 10-23 (in Chinese)

环境胞外胞内 DNA 的行为归趋及生态功能研究进展

张忠云1.2, 叶茂1,*, 孙明明3, 黄丹1.2, 张胜田4, 胡锋3, 蒋新1

1. 中国科学院南京土壤研究所,中国科学院土壤环境与污染修复重点实验室,南京 210008

2. 中国科学院大学,北京 100049

3. 南京农业大学,资源与环境科学学院土壤生态实验室,南京 210095

4. 生态环境部南京环境科学研究所,土壤污染防治研究中心,南京 210042

收稿日期:2019-10-27 录用日期:2019-12-13

摘要: 胞外 DNA(extracellular DNA, extDNA)和胞内 DNA(intracellular DNA, intDNA)广泛存在于陆生和水生生态环境系统中, 密切参与环境-微生物和微生物种间的吸附、降解和自然转化等过程,在物质循环和基因信息传递中发挥重要的生态学作用。 胞外 DNA 在环境中不易受核酸酶攻击,相对稳定,可作为历史微生物基因库,与胞内 DNA 都可反映功能基因丰度及其对应 微生物活性;同时,胞外 DNA 是细胞生物膜中的重要组分,在微生物细胞抵御抗生素、重金属和农药等外来污染物胁迫中发 挥了重要作用。本文从 ext/intDNA 环境行为、extDNA 在生物膜中的环境作用、物质信息传递和 ext/intDNA 生态学功能等角 度,综述了环境 ext/intDNA 的行为归趋及生态功能研究进展,提出了现阶段研究不足,并对未来研究方向进行了展望。本综 述可为深入理解环境 ext/intDNA 的生态功能作用机制提供新的科学认知。

关键词: 胞外 DNA; 胞内 DNA; 功能基因; 宏基因组学; 生态功能 文章编号: 1673-5897(2020)6-010-14 中图分类号: X171.5 文献标识码: A

Review of Extracellular and Intracellular DNA Environmental Behavior and Ecological Function

Zhang Zhongyun^{1,2}, Ye Mao^{1,*}, Sun Mingming³, Huang Dan^{1,2}, Zhang Shengtian⁴, Hu Feng³, Jiang Xin¹

1. CAS Key Laboratory of Soil Environment and Pollution Remediation, Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210008, China

2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

3. Soil Ecology Lab, College of Resources and Environmental Sciences, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China

4. Nanjing Institute of Environmental Sciences, Ministry of Ecology and Environment, Research Center for Soil Pollution Prevention and Control, Nanjing 210042, China

Received 27 October 2019 accepted 13 December 2019

Abstract: Extracellular DNA (extDNA) and intracellular DNA (intDNA) extensively exist in both terrestrial and a-

* 通讯作者(Corresponding author), E-mail: yemao@issas.ac.cn

基金项目:国家重点研发计划资助项目(2018FYC1803100);国家青年人才托举项目(2018QNRC001);国家自然科学基金面上项目 (41771350);江苏省优秀青年基金资助项目(BK20180110)

第一作者:张忠云(1994—),女,博士研究生,研究方向为环境分子毒理学,E-mail: zyzhang@issas.ac.cn

11

quatic environment systems, and have been found to play a significant role in the nutrient cycling and genetic information transmission between the environment and microorganisms. As inert DNA sequences, extDNA is able to present stably in the environment from the ribosome enzyme lysis, therein act as the historian genetic information archive of the microorganisms. As a consequence, both extDNA and intDNA can shed light on the functional gene variety and the corresponding microbial activity. In addition, extDNA is a ubiquitous composition of cell membrane, which exerts great impact on the resistance of outer stress from environmental pollutants, such as heavy metals, antibiotics, and pesticides, etc. This review focuses on the environmental fate and the ecological functions of the extDNA and intDNA from the perspectives of environmental behavior, genetic information transmission, and resistance to the environmental contaminants, etc. By reviewing the status quo and the future vista of the ext/intD-NAs research, this article shed light on the exploring ecological functioning of the ext/intDNAs in the environment. **Keywords:** extracellular DNA; functional gene; metagenomics; ecological function

DNA 是一种特殊形式的环境有机质组分,是生 命所有分支中遗传信息的通用存储材料,存在于细 胞内和细胞外。存在于活细胞外的 DNA 被称为细 胞外 DNA(extracellular DNA, extDNA), 是水生和陆 生生态系统中丰富的生物聚合物;存留在代谢正常 活细胞内的 DNA 则被称作细胞内 DNA(intracellular DNA, intDNA)。extDNA 分子大多与活细胞释放和 死亡细胞有关,存在于土壤、水体、沉积物和沙漠等 大部分环境中,易参与吸附、降解和自然转化等环境 过程,也可参与微生物基因传递;同时,extDNA 也 是细菌生物膜中一种重要的组成成分,参与生物膜 形成初期基质粘附及细菌聚集过程,形成后的生物 膜对抗生素、重金属和有机污染物等化合物毒性具 有一定抵御作用。intDNA 分子通常存在于活细胞 内,参与生物体内细胞自然代谢、水平及垂直基因转 移等过程;同时,微生物细胞释放 intDNA 是环境 extDNA 的主要来源之一。本文将从 ext/intDNA 在 环境中的留存及其土壤环境行为、extDNA 在模式 菌株生物膜形成中的作用及 ext/intDNA 在基因信 息传递过程中的角色等角度,综述 ext/intDNA 物 理、化学环境行为及其各自携带的生物信息差别。 本综述可为进一步探明环境中 ext/intDNAs 生态功 能的交互作用过程与机制提供科学参考。

1 extDNA 和 intDNA 环境存留及其行为归趋 (Environmental retention and fate of extDNA and intDNA)

1.1 extDNA 和 intDNA

死亡细胞裂解和活细胞分泌通常会产生 extD-NA,细胞自溶、病毒侵染和主动转运等都是 extDNA 产生的主要途径^[1-6](图 1)。环境中 extDNA 包含:游离态、松散和紧实结合态 extDNA^[7-8]。细菌可利用

游离态 extDNA 作为 C、N、P 和 O 等基本元素的能 源^[29-10],也可整合同源或异源 extDNA 进入染色体, 使其成为自身 DNA 的一部分或将其作为自身生物 膜的一种组分^[11-12]。松散及紧实结合态 extDNA 通 过磷酸基团间的无机阳离子桥或二价阳离子与有机 质结合,一般以吸附或结合态存留于环境中,不易被 核酸酶攻击,较为稳定^[13-14],但随着环境 pH、温度和 矿物性质等因素的变化,这部分 extDNA 也可以逐渐 参与解吸和降解等物质循环过程^[2,15-16]。extDNA 中 包含有大量来自细胞死亡后裂解产生的 DNA。据统 计,全球海洋沉积物中约有 0.3×10° ~0.45×10° t extD-NA,是同一环境下活细胞总 DNA 的 70% 以上^[17-18]。

intDNA 是存留在正常代谢细胞内的 DNA(图 1),活细胞主动分泌、细胞裂解和重金属/有机污染 物胁迫下细胞被动分泌等都是 intDNA 转化为 extD-NA 的方式^[19]。大多 intDNA 正常参与生态系统中元 素循环及生物体代谢,是微生物活细胞间水平及垂直 基因转移的主力军,且大多 intDNA 存在于活细胞内, 不会被土壤及沉积物颗粒吸附,与 extDNA 环境行为 及生态功能作用机制一般不同^[20-22]。

传统过滤及离心方法通常只能提取<10%总 extDNA,目前常用的 extDNA 提取方法,如醇沉法、 十六烷基三甲基溴化铵(cetyltrimethylammonium bromide, CTAB)萃取法、DNA 萃取试剂盒等通常适 用于沉积物、污泥、生物膜及含有丰富的 extDNA 的 土壤中 extDNA 提取,对于 DNA 含量较低的水体环 境却不太适用^[8,1323-25]。目前对于 ext/intDNA 的研 究大多致力于将 extDNA 和 intDNA 精准分离,探讨 extDNA 的环境行为、extDNA 在微生物群落多样性 估算中的比重、extDNA 和 intDNA 分别对物质循环 和基因传递各自的贡献机制等。



Fig. 1 Environmental behaviors of extracellular DNA and intracellular DNA

1.2 extDNA 和 intDNA 的环境相对丰度

extDNA 和 intDNA 在不同环境体系中普遍存 在。通常条件下,土壤及沉积物环境中 extDNA 丰 度较 intDNA 高,水体中 intDNA 丰度较高;土壤及 沉积物中 extDNA 丰度比水体中 extDNA 丰度 高^[26]。据统计,extDNA 在沉积物中的浓度是水体 中浓度的3倍~4倍^[27],沉积物中 extDNA 的半衰期 也比在水体系中长,这可能与沉积物的特殊环境及 沉积物对 extDNA 的吸附等作用有关^[28-30]。土壤中 也含有丰富的 extDNA 且多集中在土壤表层^[31]。 Lennon 等^[18]使用 DNA 酶(DNase)去除土壤样品中 的 extDNA,发现 extDNA 约占据土壤总 DNA 的 0%~83%; Carini 等[32] 使用叠氮溴化丙锭去除土壤 中的 extDNA,发现这部分 DNA 约占据土壤总 DNA 的 40%: 不同的比例可能与 extDNA 去除方法及土 壤性质等环境因素密切相关^[33]。去除方法若不足以 消除土壤有机质、pH、阳离子类型与浓度等土壤性 质对 DNA 吸附的影响,则去除方法并不能将吸附 态 extDNA 全部去除,吸附态 extDNA 的存在降低 了可提取态 extDNA 的有效性,从而减少可估计的 extDNA 比例^[32]。目前文献中已有的不同环境体系 中 ext/intDNA 的检出浓度如表1 所示。

由表1可知,不同环境体系中 ext/intDNA 检出 浓度并不相同,土壤和沉积物是 ext/intDNA 重要的 储库;目前能够得到的土壤中 extDNA 浓度范围在

0.0047~41.1 μg·g⁻¹,深海沉积物上层达到119.1 μg ·g⁻¹;不同的环境体系中,intDNA 检出范围在 0.8~ 2 047.4 μg·g⁻¹。

1.3 extDNA 和 intDNA 的环境归趋

ext/intDNA 在土壤环境中的归趋,决定于 ext/ intDNA 和土壤环境体系的生物和物理特性。目前, 关于 ext/intDNA 在土壤中的环境行为研究主要集 中于 ext/intDNA 在土壤中的吸附、降解代谢及基因 传递等。extDNA 不被细胞膜保护,在土壤环境中 可游离存在,也可与土壤矿物质及腐殖质相结合。 游离态及结合态 extDNA 都可以作为植物与微生物 生长的营养来源,同时还能成为细菌生长时的基因 组来源。intDNA 被细胞膜包被,在土壤中的环境行 为更多依赖于动物、微生物摄食作用及 intDNA 向 extDNA 的转化过程。

1.3.1 吸附

细胞裂解后产生的 extDNA 易被环境中大量存 在的核酸酶攻击,破碎成为小分子 extDNA,被砂 砾、矿物吸附或通过与有机质结合后免受核酸酶攻 击^[2,45];据统计,>80%的海洋沉积物中 DNA 为 extDNA,且>95% extDNA 被沉积物所吸附,只有少 于 5% 为游离态 extDNA^[2,17,19]。土壤中 extDNA 被 土壤矿物质、腐殖质及有机质吸附,得以免受微生物 DNA 酶的快速降解作用^[46]。Blum 等^[47]研究发现, 在砂土及沙壤土中添加 300 ng ³H 标记的外源 extDNA,通过探究吸附位点有效性发现,extDNA进入土壤1h后即达到吸附最大值,80% extDNA都被吸附;土壤吸附位点保护 extDNA免受 DNA 酶攻击可能是在土壤颗粒的吸附作用下,削弱了 DNA 酶与 extDNA 直接反应的能力和概率^[48]。但是,也有相关研究表明,若 DNA 酶饱和占据与吸附态 extDNA 相邻的土壤矿物吸附位点,则这部分 extD-NA 依旧会被 DNA 酶降解^[46]。

土壤矿物组成、土壤 pH、腐殖质含量和阳离子 含量等因素都会交互影响土壤中 extDNA 的吸附过 程。土壤矿物成分和阳离子含量对 extDNA 的吸附 和结合量差异较大^[49-50]。Hou 等^[51]探究游离态鲑鱼 精子 DNA 在 3 种原始粘土(辉长岩、蒙脱石和绢云 母)上的吸附规律,发现 DNA 吸附量大小顺序为辉 长岩>蒙脱石>绢云母;pH=7.0 时向体系中分别加 入无机离子 Na⁺、Mg²⁺和 Al³⁺,发现 Al³⁺体系中, DNA 吸附量增加最明显,这可能的原因是当 pH= 7.0 时,粘土矿物表面为负电荷表面,高价阳离子更

易与负电荷 DNA 分子和负电荷矿物表面以阳离子 桥相结合: Franchi 等^[52]将吸附体系中的 Na⁺替换成 Mg²⁺和 Al³⁺,发现蒙脱石、高岭石和针铁矿中 DNA 吸附量明显上升,这说明粘土矿物中高价阳离子吸 附带负电荷 DNA 效果更显著。不同土壤 pH 也会 影响土壤中 extDNA 吸附量。Cai 等^[53]使用鲑鱼精 子 DNA 探究其在褐土和粘土矿物等 4 种不同胶体 上的吸附和解吸,发现体系 pH 由 2.0 升至 5.0 时,有 机粘土及蒙脱石上吸附 extDNA 量显著减少, pH 高 于5.0时,有机粘土上吸附的 extDNA 可忽略不计; 在无机矿物和高岭石上, pH 由 2.0 升至 9.0 时, extDNA 吸附量缓慢减少,这说明有机矿物和蒙脱 石中静电相互作用对 extDNA 吸附影响较大。但是 有学者提出,已有的 extDNA 吸附试验一般人为控 制矿物粒径大小和粘土颗粒表面电荷,这种处理会 使 DNA 吸附量增加,试验中的土壤体系与实际环境 并不相同^[54]:Gardner 和 Gunsch^[54]使用不经过表面修 饰的模式牛胸腺 extDNA 和转基因玉米 extDNA,探

	14 1	1,101 % 1,25C	仲亦て判加	371 48 501	DELJ DI		川口小十皮	
-						 		

不同环接体系由细胞体和细胞内 DNA (avt/intDNA) 相对主度

环境介质			参考文献
Environment	exiDina	IntDNA	Reference
污泥 Sludge	$10.5 \sim 119.1 \ \mu g \cdot g^{-1}$	$335.4 \sim 2 \ 047.4 \ \mu g \cdot g^{-1}$	[34]
猪粪 Swine manure	$8.6 \sim 9.7 \ \mu g \cdot g^{-1}$	$179.0 \sim 295.4 \ \mu g \cdot g^{-1}$	[34]
城市湖水沉积物 Urban lake sediment	$5.6 \sim 11.4 \ \mu g \cdot g^{-1}$	$24.9 \sim 46.2 \ \mu g \cdot g^{-1}$	[34]
森林土壤 Forest soil	$2.2 \sim 41.1 \ \mu g \cdot g^{-1}$	NA	[35]
污水处理厂污泥 Livestock waste management structures sediment	$0.6 \sim 9.2 \ \mu g \cdot g^{-1}$	$190.0 \sim 1 \ 005.3 \ \mu g \cdot g^{-1}$	[36]
沉积物 Aquatic sediment	$6.7 \sim 24.3 \ \mu g \cdot g^{-1}$	$0.31 \sim 0.67 \ \mu g \cdot g^{-1}$	[27]
沉积物 Aquatic sediment	$77 \sim 116.8 \ \mu g \cdot g^{-1}$	$63.7 \sim 89.7 \ \mu g \cdot g^{-1}$	[13]
沉积物 Aquatic sediment	$2.3 \sim 57.7 \ \mu g \cdot g^{-1}$	NA	[19]
海洋沉积物 Marine sediment	$0.03 \sim 4.45 \ \mu g \cdot cm^{-3}$	$0.03 \sim 5.84 \ \mu g \cdot cm^{-3}$	[23]
海水 Seawater	$(5.1 \pm 0.6) \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$	NA	[26]
沉积物 Surface sediments	$(9.4\pm3.0) \sim (22.5\pm4.8) \ \mu g \cdot g^{-1}$	NA	[37]
海水微粒 Sea water particulates	568 ~ 3 163 ng·mL ⁻¹	NA	[38]
海洋沉积物 Sea sediments	1 460 ~1 690 $ng \cdot g^{-1}$	NA	[29]
湖水 Lakes water	5 000 ~ 7 000 $\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$	NA	[39-40]
森林土壤 Forest soils	$460 \sim 1\ 590\ \mathrm{ng} \cdot \mathrm{g}^{-1}$	NA	[41]
森林湖水 Forest lake water	$9 \sim 11 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$	NA	[42]
湖水沉积物 Forest lake sediment	$69 \sim 520 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$	NA	[43]
铁质湖水沉积物 Ferruginous lake sediment	$0.3 \sim 0.6 \ \mu g \cdot g^{-1}$	$0.3 \sim 0.9 \ \mu g \cdot g^{-1}$	[44]
海洋沉积物 Marine sediment	$(3.3\pm0.9) \sim (21.2\pm1.3) \ \mu g \cdot g^{-1}$	NA	[30]

Table 1 Relative abundances of extracellular and intracellular DNA (ext/intDNA) in different environments

注:NA 表示数据未获得。

Note: NA stands for not available.

究其在高岭石、蒙脱石及3种土壤混合物(砂壤土、 粘土和粉砂壤土)中的吸附,实验结果表明,纯蒙脱 石和高岭石吸附能力比和 Demanèche^[46]等和 Khanna 等^[50]报道过的吸附能力低1至2个数量级,但是 吸附量仍然可以达到200 mg·g⁻¹(粘土)DNA;粘土 含量较高的土壤往往可以吸附更多量的游离态 extDNA。因而,粘土颗粒可能是外源微生物重要的 游离态 extDNA来源。

1.3.2 降解

extDNA 进入土壤环境中,DNA 自身性质和土 壤环境因素都会对 extDNA 降解产生影响^[2846]; DNA 自身性质包括 DNA 来源、DNA 中 G+C 碱基 含量、分子纯度以及分子重量。土壤环境因素包括 土壤矿物组成、有机质含量、温度、静电作用和土壤 湿度等。Sirois 和 Buckley^[55]将人工合成的变形链球 菌 extDNA 施加进入土壤,探究了土壤湿度、温度、 农业管理措施和栖息地类型等因素对土壤环境中 extDNA 降解动力学的影响。研究结果表明,extD-NA 在土壤中迅速降解,extDNA 降解速率与湿度及 温度呈正相关,与土壤有机质含量呈负相关;extD-NA 在耕种土壤中比在休耕土壤中有更高的降解率 和更低的固定率,只有极少部分 extDNA 能够在土 壤中相对持久存在。

在不同的环境介质中, extDNA 的降解速率并 不相同。Dell'Anno 和 Corinaldesi^[66]探究在海洋水 体及沉积物中游离态 extDNA 的降解及转化率,发 现沉积物中 extDNA 降解速率较快,是水体中的 7 倍~100倍,这与沉积物中含大量 DNA 酶有关;同 时,由于沉积物中 extDNA 样品含量较多,约为水体 中含量的 4.3倍,不平衡的含量供应-降解率使得沉 积物中 extDNA 的转化率比水体中 extDNA 的转化 率低得多,因而半衰期更长,沉积物中 extDNA 半衰 期 29~93 d 不等,而水体中只有 10 h 左右。

Torti 等^[23]采集丹麦奥胡斯湾中约海底以下 10 m 沉积物,分离样品中的 extDNA 和 intDNA,发现, 近半数 DNA 都为 extDNA;同时,实验中还探究了> 600 碱基对(bp)的高分子量 extDNA 和<600 bp 的低 分子量 extDNA 占据的比例,发现随着沉积物深度 增加,小分子量 extDNA 含量由占总 extDNA 的 15%上升至40%,这说明沉积物深度增加,extDNA 降解量增加。这可能因为即使在生物活性较低的深 层沉积物中,DNA 酶含量依旧很高。同时,Gulden 等^[56]探究了温度对 DNA 降解动力学产生的影响, 发现土壤下渗液中 extDNA 半衰期随着温度上升而 缩短,这说明 DNA 降解也是一个基于反应速率的 酶促反应。Henriksen 和 Breland^[57]发现当环境温度 低于0℃时,依旧可以检测到显著的微生物活性, DNA 依旧会缓慢降解;这可能是尽管 DNA 酶促反 应减少,但是化学水解、化学氧化和 DNA 交联等作 用依旧会降解 DNA。

1.3.3 转化

自然转化是 ext/intDNA 环境行为的重要部分, 同时, extDNA 自然转化也是原核生物摄取、整合、 使 extDNA 表达的主要机制。自然转化,或称为遗 传转化,是指能够从环境中获取游离态 DNA 分子 的感受态微生物细胞,吸收整合 extDNA 进入自己 基因组的过程。自然转化过程不需要特殊的蛋白机 制,因而在环境中频繁发生,尤其是自然感受态微生 物细胞。自然转化包括 4 个关键步骤:感受态微电 物细胞。自然转化包括 4 个关键步骤:感受态细胞 表面结合 extDNA→细胞壁/细胞膜吸收 extDNA→ extDNA 整合进入细菌基因组→extDNA 表达^[1](图 2)。extDNA 成功整合进入细菌基因组后,会通过细 胞间的结合及转导作用传播,进而进入基因传递网 络^[58]。extDNA 整合进入细菌基因组并引起表达是 extDNA 自然转化的关键步骤,细胞质中未被整合 的 extDNA 会很快被降解并进入 DNA 代谢循环^[1]。

但是,并不是所有的 ext/intDNA 都能够成功整 合进入细菌基因组,这取决于外源链和染色体 DNA 之间的同源区域。片段大小在 20~200 bp 的 DNA 片段更容易成功整合并引起表达^[58]; de Vries 等^[59] 研究发现,外源 DNA 分子链不符合不动杆菌属 (Acinetobacter sp.)菌株 BD413 目标受体染色体 DNA 之间的同源区域时,其整合效率比更适同源区 域 DNA 外源链的整合效率低 10° 数量级;当其外源 片段 DNA 符合受体染色体 DNA 同源区时,其整合 效率提高了5个数量级以上。成功进入细菌基因组 并实现表达的 ext/intDNA 片段则可能进入细菌基 因循环。新霉素磷酸转移酶 II 基因(npt II)是一类调 控植物对卡那霉素产生抗性的基因,但是在土壤非 目标细菌中检测到了这一类基因存在,如感受态细 菌 Acinetobacter sp. BD413, BD413 通过同源重组获 取 npt II 基因,从而产生对卡那霉素的抗生素抗 性[60-61]。尽管土壤中大部分细菌都对卡那霉素产生 抗性,但是土壤细菌通过同源重组获取抗性基因产 生新的抗性细菌,尤其是抗性致病细菌的环境风险 值得重视。



图 2 环境胞外 DNA 自然转化过程 Fig. 2 Natural transformation of extracellular DNA

土壤中 extDNA 其他环境行为也会影响参与自 然转化过程的有效态 extDNA。Khanna 和 Stotzky^[50]探究了吸附于矿物和砂砾等物质表面的 extD-NA 自然转化效率,发现 extDNA 从土壤颗粒中解吸 并不能直接引起自然转化发生,但是 extDNA 吸附 于土壤颗粒时的确降低了自然转化发生的频次,枯 草芽孢杆菌(B. subtilis)在灭菌土壤体系中的自然转 化频次比纯水体系中降低了一个数量级。同时,土 壤种类也会影响自然转化频次。Nielsen 等^[62]研究 发现, Acinetobacter sp. BD413 在未添加营养物质的 壤土及砂土中自然转化发生的频率并不相同,在砂 土中 BD413 的自然转化频率是 10⁻⁴, 壤土中为 10⁻⁷,砂土中 BD413 自然转化发生的频率比壤土中 的频次高3个数量级以上。通常情况下,土壤中热 点区域如根际、细菌生物膜和营养物质流动区等, extDNA 自然转化发生的频次相对较高[63-64];自然转 化过程一旦发生, extDNA 的遗传物质信息即会通 过接合和传导成功进入土壤微生物群落。因而, extDNA 作为一种遗传物质信息,其在物质循环及 生态功能中的作用更应该受到关注^[31]。

ext/intDNA 在细菌生物膜形成中的作用(The Role of ext/intDNA in biofilms formation)

细菌生物膜是由微生物、有机质和一些非有机 固体组成的混合物,有机质组成中包含多糖、脂质、 蛋白质和核酸,尤其是 extDNA 等^[5,65]。生物膜在水 体环境中十分丰富,可以保护细菌免受不适环境的 影响,如抗生素、重金属及农药污染胁迫;且由于细 菌生物膜具有细胞密度较高的内聚三维网络结构, 更容易发生细胞间的相互作用,促使基因信息在 extDNA 等移动遗传元件中积累,并通过群体感应 和水平基因交换等过程实现遗传信息的交流^[66-68]。

对基质表面的初始粘附和细菌的聚集是生物膜 形成中的重要步骤^[69]。Das 等^[70]发现,细胞表面存 在的 extDNA 一方面参与酸碱相互作用,另一方面 为细菌粘附到疏水表面提供热力学有利条件,能够 增强细菌生物膜形成时的粘附及细菌表面聚集作 用,因而, extDNA 是细菌生物膜形成中的重要介 质^[71]。目前,铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*, PAO1)和葡萄球菌(*Staphylococcus*)常被用于探究 extDNA 在细菌生物膜形成中的作用。

2.1 Pseudomonas aeruginosa extDNA 与其生物膜 形成

PAO1 是一种致病力较低,但抗药性较强的杆菌,属于革兰氏阴性菌,广泛分布于自然界及正常人皮肤、肠道和呼吸道,是临床上较常见的条件致病菌之一。

extDNA 是 P. aeruginosa 生物膜形成中的重要 结构前体^[72]。前人研究证实, extDNA 在 P. aeruginosa 生物膜中是作为细胞-细胞互连基质的化合 物^[73]; P. aeruginosa 是通过外膜释放小囊泡的方式形 成 extDNA,群体感应也在生物膜形成中起重要作 用^[74-75]。假单胞菌喹诺酮信号传导分子(Pseudomonas quinolone signaling, PQS)诱导原噬菌体侵染 浮游生物释放 extDNA, extDNA 与细胞形成冠状结 构后, 细胞再通过IV型菌毛发生移动, 并与 extDNA 相互作用慢慢聚集到冠状结构顶部。Whitchurch 等^[76]发现在实验体系中添加 DNA 酶后,PAO1 生物 膜形成被抑制,这说明 extDNA 是生物膜形成中的 一种重要结构成分;同时,实验中还设计在已经形成 12、36、60 和 84 h 的生物膜中加入 DNA 酶,发现形 成 84 h 后的生物膜受影响程度最低,这说明形成时 间较久的生物膜不易被 DNA 酶影响,可能的原因 是 extDNA 在此过程中被其他物质强化或生物膜产 生了局部灭活 DNA 酶的蛋白外酶。

extDNA 也能够保护 PAO1 生物膜抵御外部污染物质影响。extDNA 可以结合带正电荷的抗菌剂,如氨基糖苷类和抗微生物肽,使得 PAO1 生物膜免受氨基糖苷类的影响^[77]。有研究表明,extDNA 能够与阳离子结合,创造阳离子限制型环境,诱导 PAO1 产生 pmr 基因,增强其对氨基糖苷类和抗微 生物肽抗性^[73];Chiang 等^[78]设计流动室生物膜实验 证实,外源补充的 extDNA 能够整合进入 PAO1 生物膜,并增加 PAO1 对氨基糖苷类的耐受性;同时,缺失释放 extDNA 能力的 PAO1 群体,形成的生物 膜比野生型生物膜更容易受到氨基糖苷类影响, 但是补充外源 extDNA 后又能使其对氨基糖苷类 药物耐受,这种耐受性可能来自于 extDNA 的保护 作用。

2.2 Staphylococcus extDNA 与其生物膜形成

Staphylococcus 是一类革兰氏阳性球菌,需氧或 兼性厌氧,少数专性厌氧,是医院交叉感染的重要来 源^[79]。金黄色葡萄球菌(Staphylococcus aureus)、表 皮葡萄球菌(Staphylococcus epidermidis)和腐生葡萄 球菌是葡萄球菌的3种主要类别。

S. aureus 和 S. epidermidis 都能够形成生物 膜^[79-81]。生物膜会保护细菌细胞免受抗生素侵染及 宿主防御机能的杀伤,前人研究证实生物膜形成在 金黄色葡萄球菌伤口感染和骨髓炎及表皮葡萄球菌 导管感染中发挥作用。胞外前聚体在 S. aureus 和 S. epidermidis 生物膜形成中发挥了重要作用,如 extDNA 和聚(1,6)-N-乙酰基-D-葡萄糖胺。extDNA 是 S. aureus 和 S. epidermidis 生物膜形成中的重要 胞外前聚体,能够介导表面附着和细胞间粘附作用。 Izano 等^[80]使用 DNase I 在 96 孔微量滴定板中抑 制 S. aureus 和 S. epidermidis 生物膜形成,分离抑制 条件下形成生物膜,测定生物膜对阳离子洗涤剂氯 化十六烷基吡啶(cetylpyridinium chloride, CPC)的敏 感性。研究发现,DNase I 会破坏 S. aureus 生物膜 形成使其对 CPC 敏感,但对 S. epidermidis 生物膜作 用不显著,这表明 extDNA 在 2 种菌株生物膜形成 中发挥着不同的结构作用, extDNA 是 S. aureus 生 物膜形成及抵御 CPC 杀伤主导的结构成分,而在 S. epidermidis 生物膜中, extDNA 可能与其他胞外前聚 体协同影响生物膜形成。S. epidermidis 生物膜中 extDNA 的产生主要由自溶素 AtlE 控制,自溶素 AtlE能够引起生物膜细胞亚群裂解,导致 DNA 释 放到基质中^[79]。extDNA 可在基质中作为结构组 分、细胞间聚集的促进因子、表面结构粘附素、N/P 营养源,调控微生物群落中的遗传信息交换。缺乏 AtlE 基因的 S. epidermidis 菌株形成的生物膜具有 比野生型更低的 extDNA 丰度,并且能够引起体内 感染的能力显著降低,表明 extDNA 在生物膜的致 病机制中发挥重要作用^[81]。此外, S. epidermidis 生 物膜中 extDNA 对二价阳离子的螯合作用可能导致 生物膜抗生素耐受性提高。Doroshenko 等^[82]探究 发现,在亚抑菌浓度万古霉素的影响下, S. epidermidis 生物膜 RP62A 中万古霉菌的迁移被抑制,使用 DNase 处理生物膜,发现亚抑菌浓度万古霉素能够 延长生物膜的持久性;试验结果表明,在亚抑菌浓 度万古霉素影响下,生物膜中的 extDNA 的浓度上 升,这说明,生物膜中 extDNA 可能抑制了万古霉 素的活性;同时添加外源 extDNA 和万古霉素, S. epidermidis生物膜中浮游生物的半数致死浓度增 加,这验证了外源 DNA 保护生物膜中的细胞免受 抗生素攻击。

3 ext/intDNA 生物功能信息传递(Biological functions and information transmission of ext/intDNA)

3.1 ext/intDNA 与营养元素循环

extDNA 在降解后基因信息可能不被保存,但 是其降解后的元素,如 C、N、P 和 O 等元素依旧存 在于环境体系,可以用于从头合成 DNA,或者可以 离开 DNA 循环进入它们各自的元素营养循环,即 参与食物链中的元素大循环^[1,83]。

DNA 是一种重要的 P 元素来源, DNA 分子中 10%的质量为 P 元素, Turner 等^[84-85]发现, 自然湿地 土壤中以 DNA 形式存在的可提取态 P 占 22% ~ 53%, 苔原土壤中则占 9% ~13%。 Dell'Anno 和 Danovaro^[17]通过比较总 DNA 及 intDNA 的方法测 量出深海沉积物中 90%以上 DNA 都为 extDNA; 使 用 extDNA 专性降解酶, 发现 60% ±4% 的 DNA 均 可降解, 这说明只有部分 extDNA 能够被降解。据 统计,沉积物来自于 extDNA 中的 P 源占总有机 P 的 3%,高脱氧核糖核酸酶活性能够证明 extDNA 是 P 循环的重要推动者,沉积物表层 10 cm 中 extDNA 再矿化占总有机 P 再矿化的 17%。同时,Dell'An-no 和 Danovaro^[17]还发现对浮游生物来说,extDNA 降解能够为其提供 4% C 源、7% N 源和 47% P 源。 其中,已有研究表明,流感嗜血杆菌(*Haemophilis influenza*)和淋病奈瑟菌(*Nesseria gonorrhoeae*)都能够 通过膜蛋白吸收同源和异源 extDNA 用于自然转 化,修复自身基因组 DNA 损伤或将 extDNA 作为自 身营养来源^[51]。

3.2 ext/intDNA 的基因信息传递

Steinberger 和 Holden^[21]使用随机扩增多态性 DNA 分析(RAPD)比较了多物种生物膜中 extDNA 与 intDNA 的指纹图谱,发现 extDNA 中的物种信息 与总 DNA 和 intDNA 中的物种信息并不相同;近年 来,随着高通量测序技术及宏基因组技术的发展,更 多研究使用 16S rRNA 高通量测序技术比较分析 ext/intDNA 中物种多样性信息^[20,34,43,86]。结果显示, 环境中 ext/intDNA 都来源于多种物种,一方面, extDNA 可在环境中持久存在,其对应物种可以包 含历史变迁物种^[35];另一方面,并不是所有的物种分 泌的 extDNA 都能够在环境中保存,因而,intDNA 和 extDNA 分别对应的物种信息并不一一对应,有 其相似性,也有不同。

Corinaldesi 等^[19]使用 16S rDNA 和 18S rDNA 技术探究了厌氧深海沉积物中 extDNA 的来源、保 存情况和遗传印记等信息,发现尽管在深海沉积物 中 DNA 酶活性非常高,但是依旧检测到大量 extD-NA 存在,16S rDNA 和 18S rDNA 基因拷贝数很高, 分别为 10⁹~10¹⁰ copies · g⁻¹(沉积物)和 10⁹~10¹¹ copies · g⁻¹(沉积物),说明其中 extDNA 含有大量基 因序列。因而,从这些环境体系分离得到 extDNA 和 intDNA,并对其对应的物种信息和基因信息进行 判定是近年来关于 ext/intDNA 的研究热点之一。

3.2.1 ext/intDNA 与功能基因

功能基因(fuctional genes)是一类能够调控 C、 N、P、S 和 Fe 元素循环、指示环境微生物功能的基 因,广泛存在于土壤、水体和沉积物等环境体系中, 通常与元素循环和蛋白调控等功能相关联。

常见的功能基因有四大类,一类是生物地球化 学循环基因(biogeochemical cycle genes, BCGs),通 常与 C、N、P、S 和 Fe 等元素转化有关,如 N 硝化基 因 amoA、N 反硝化基因 nosZ、nirK/S等,其与 N 硝 化/反硝化过程紧密结合,通常基因丰度与反应过程 快慢密切相关;第二类是抗生素抗性基因类(antibiotic resistance genes, ARGs),抗性基因是抗性遗传信 息的载体,通常与抗生素种类有关,如四环素类抗性 基因 tetW、tetM 和 tetQ等,目前关于抗性基因与 ext/intDNA 相互关系的研究较多;第三类功能基因 与系统发育标记有关(phylogenetic marker genes, PMGs),代表基因有指示 GTP 结合蛋白的基因 lepA、蛋白质翻译延伸因子 G 基因 fusA等;第四类 功能基因是植株致病基因(plant pathogenicity genes, PPGs),代表基因有与生物合成和调节 thaxtomin(植 物毒素,一种含有4-硝基吲哚的二肽分子)相关的基 因 txtA、txtB等。这里介绍 BCGs 与 ext/intDNA 的 相互关系。

目前,关于 extDNA 和 intDNA 分离后各自体系 中含有的 BCGs 的研究较少,多数研究利用荧光定 量 PCR 技术和宏基因组学技术探究总 DNA 中含有 的 BCGs^[83,87]; Gómez-Brandón 等^[83] 使用荧光定量 PCR 技术,选择 C-循环基因引物(cell、xyl、alfagluc 和 betagluc)、P-循环基因引物(acP、alkP、bisP、leu 和 lys)、S-循环基因引物(aryS)以表征森林不同土壤类 型和不同土壤深度下 ext/intDNA 中含有的基因对 应酶活性及其对应细菌-真菌-古菌物种,并使用 extDNA 与 intDNA 比值表征生物活性,发现 ext/ intDNA 中表征的基因类型、对应物种组成均不相 同;覆盖有地被植物的森林土壤比草地和落叶覆盖 的森林土壤具有更高的酶活性:草地覆盖的深层土 壤具有较高的 extDNA/intDNA,这表明,随着土层深 度增加土壤生物活性较低且 extDNA 更容易降解。 值得注意的是,沉积物和土壤中的 extDNA 含量高 于 intDNA, extDNA 含有丰富的 C、N、P 和 O 等元 素,在16S rDNA 和18S rDNA 基因拷贝数中也占据 较高比例,并且微生物释放的 extDNA 积极参与吸 附、降解和自然转化等环境过程,是环境中不可忽视 的营养元素、基因信息来源[88]。因而,上述环境样 品中分别来源于 extDNA 和 intDNA 的 BCGs 比 例、以及这些 BCGs 是否会通过自然转化被其他微 生物获取整合、并参与微生物功能注释直至影响 微生物群落物质转化与能量传递,依旧是值得深 入探究的问题。

3.2.2 ext/intDNA 与抗性基因

中国是世界上最大的抗生素使用国之一。医疗

及畜禽养殖中使用的抗生素通常不会被人体及畜禽 完全代谢吸收,超过90%抗生素会通过排泄等进入 环境,进而在长期的自然筛选中,诱发环境中抗性细 菌的富集,引发过量抗性基因的表达^[89]。抗性基因 可能位于染色体和一些移动遗传元件上,如质粒、转 座子或整合子,在环境中作为细胞内抗性基因(intracellular antibiotic resistance genes, iARGs)和细胞外抗 性基因 (extracellular antibiotic resistance genes, eARGs)存在^[13,34]。iARGs 可通过自我复制传递给后 代,也能够通过水平基因转移(接合或传导)等方式 传递给其他物种; eARGs 则可能通过自然转化被细 菌吸收^[13,90]。已有的研究表明,缓症链球菌(S. mitis) 和口腔链球菌(S. oralis)这2种菌株具有盘尼西林抗 生素抗性,其抗性基因 pbp2x 能够传递给肺炎链球 菌(S. pneumoniae)菌株,使后者也具有盘尼西林抗 性;前者也能从非典型韦荣菌(Veillonella dispar)菌 株处获取四环素抗性。因而, e/iARGs 在环境中的 存留和传播值得探究, eARGs 由于能够通过转化进 入细菌体内,其对人体健康及生态系统造成的威胁 更应该受到关注[1]。

已有学者研究发现,在河流、湖泊、沼泽及极少 受人为干扰的地下水、冰川和水库等水体环境中都 分别检测到了 i/eARGs 的存在^[13,24,90-93]。Zhang 等^[94] 采集渤海海岸附近的水体及沉积物样品,使用荧光 定量 PCR 检测样品中的 sull、sull、tetM、tetB、bla_{TEM} 和 qnrS 等抗性基因,发现水体中 eARGs 相对丰度 为(4.30±1.30)×10⁻¹ 基因拷贝数,沉积物中则为(2.60 ±0.30)×10⁻³ 基因拷贝数;同时,样品中 eARGs 丰度 显著高于 iARGs。Guo 等^[24]采集了来自长江口的自 然水体、沉积物及生物膜样品,探究5类22种 ARGs 的检出率及丰度,大部分基因的检出率及丰 度高低依次是:生物膜>沉积物>水体;这归因于环 境中高浓度的抗生素,加速了生物膜中 ARGs 的产 生及传播;同时大多数来自于生物膜及沉积物中的 ARGs为 eARGs, eARG 占总 ARGs 60% 以上, 且与 生物膜及沉积物中总有机碳(TOC)显著正相关, eARGs 在生物膜-水中的分配系数>沉积物-水中的 分配系数,充分说明生物膜是水体环境中重要的 ARGs 来源。Dong 等^[34]检测了来自医疗废水、制药 业、污水处理厂和猪粪的污泥样品,以及城市湖泊沉 积物中的 10 类抗性基因 sull、sull、tetW、tetX、 *erm*A、*erm*B、*bla*_{TEM}、*amp*C、cat、cmr 和一类转座子 (*intI*1),发现 eARGs 丰度检测范围在 7.31×10³ ~1.16 ×10¹⁰ copies · g⁻¹(干重污泥), iARGs 变化范围在 1.04 ×10⁵ ~ 2.74×10¹² copies · g⁻¹(干重污泥); 研究使用携 带 β -内酰胺抗性基因(*bla*_{SHV})的质粒 pMD20-T 作为 一种 eARG, 大肠杆菌 *E. coli* DH 5 α 作为受体, 探究 eARG 在环境中的转化能力, 发现沉积物吸附态 eARG 和游离态 eARGs 的转化效率分别为每微克 质粒 DNA 中含(1.21±0.19)×10³ 转化体和(6.67± 0.53)×10² 转化体,并且与游离态 extDNA 相比, 吸 附态 extDNA 更容易与感受态细胞耦合, 这与前人 的研究结果^[95-96]一致, 可能与 DNA 的构象有关, 具 体机制还有待探明。

4 研究不足与研究展望(Research disadvantages and prospect)

目前,关于环境中 ext/intDNA 较为全面的研究 主要集中于 ext/intDNA 环境行为、extDNA 在不同 模式菌株生物膜形成中的表面粘附及聚集细菌等作 用、不同环境体系中 e/iARGs 的丰度及其与对应微 生物的生态关系等内容。但是, ext/intDNA 环境功 能及生态效应研究依旧是值得关注的问题。

(1)精准分离环境中不同形态 ext/intDNA 及对 其精准定量是研究 ext/intDNA 环境功能及生态效 应的技术基础^[7-8,13,97]。现行的提取土壤/水体/沉积 物等体系中 ext/intDNA 的方法是使用磷酸盐缓冲 溶液提取,难以区分游离态、松散结合态及紧密结合 态 extDNA,提取效率不稳定,因而难以区分不同形 态 extDNA 的具体环境效应;同时,环境中 ext/intD-NA 来源广泛,包括细菌、真菌、放线菌和噬菌体等, 同时 0% ~83% extDNA 来源于死亡微生物,细菌、 真菌等微生物对 extDNA 的贡献比例及不同环境体 系 extDNA 来自死亡微生物的比例依旧值得探索。

(2)验证 ext/intDNA 中功能基因含量及其是否 作为活跃的基因携带者积极参与环境过程是探究 ext/intDNA 环境功能及生态效应的理论基础。目前 常使用荧光定量 PCR 检测技术判定 ext/intDNA 功 能基因含量,使用高通量测序技术分析功能基因携 带者;宏基因组学分析能够同时测定功能基因含量, 鉴定功能基因携带者。因而,ext/intDNA-宏基因组 学分析可能是同时判定环境体系 ext/intDNA 不同 微生物群落组成、基因丰度及其功能的更为有效的 检测技术。

(3)探明 ext/intDNA 对植株-动物-微生物病原体的抵御机制是拓展 ext/intDNA 环境功能及生态效应研究的重要依据。extDNA 是植株根冠粘液基质

中的一种重要组分,在植株抵御病原体的过程中发挥重要作用^[98];但是植株 extDNA 产生的来源及 extDNA 在植株体内对病原体的抵御机制尚不明确。植株 extDNA 的获取来源、抵御机制以及这种 抵御机制与植株体内其他抵御机制的合作关系等,都有待深入探明。

(4)ext/intDNA 环境功能及生态效应研究最终落 脚于探究 ext/intDNA 在生态群落多样性中发挥的 作用。ext/intDNA 中包含的功能基因及其指示微生 物种群各自参与环境过程并不相同,对生态系统的 调控作用也有差别;因而,为探明 ext/intDNA 在生 态功能多样性中的重要作用,还应理解 ext/intDNA 营养元素物质循环、功能微生物种群历史变迁和功 能微生物生态位等过程。

综上,ext/intDNA 在环境中参与吸附、降解和自然转化等环境过程,extDNA 帮助形成细菌生物膜及在细菌生物膜中为微生物缓冲来自抗生素、农药和重金属等污染物的环境压力,ext/intDNA 在物质传递、功能基因水平转移过程中都有其独特的环境功能及生态意义,但环境中 ext/intDNA 定量及其生态功能多样性依旧值得进一步探索。

通讯作者简介:叶茂(1985—),男,博士,副研究员,硕士生导师,主要研究方向为污染土壤生态毒理学机制。

参考文献(References):

- [1] Levy-Booth D J, Campbell R G, Gulden R H, et al. Cycling of extracellular DNA in the soil environment [J]. Soil Biology and Biochemistry, 2007, 39(12): 2977-2991
- [2] Pietramellara G, Ascher J, Borgogni F, et al. Extracellular DNA in soil and sediment: Fate and ecological relevance
 [J]. Biology and Fertility of Soils, 2009, 45(3): 219-235
- [3] DeFrancesco A S, Masloboeva N, Syed A K, et al. Genome-wide screen for genes involved in eDNA release during biofilm formation by *Staphylococcus aureus* [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2017, 114(29): E5969-E5978
- [4] Wang F, Che R X, Xu Z H, et al. Assessing soil extracellular DNA decomposition dynamics through plasmid amendment coupled with real-time PCR [J]. Journal of Soils and Sediments, 2019, 19(1): 91-96
- [5] Flemming H C, Wingender J. The biofilm matrix [J]. Nature Reviews Microbiology, 2010, 8(9): 623-633
- [6] Choi J J, Reich C F 3rd, Pisetsky D S. The role of macrophages in the *in vitro* generation of extracellular DNA

from apoptotic and necrotic cells [J]. Immunology, 2005, 115(1): 55-62

- [7] Nagler M, Podmirseg S M, Griffith G W, et al. The use of extracellular DNA as a proxy for specific microbial activity [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2018, 102(6): 2885-2898
- [8] Yuan Q B, Huang Y M, Wu W B, et al. Redistribution of intracellular and extracellular free & adsorbed antibiotic resistance genes through a wastewater treatment plant by an enhanced extracellular DNA extraction method with magnetic beads [J]. Environment International, 2019, 131: 104986
- [9] Morrissey E M, McHugh T A, Preteska L, et al. Dynamics of extracellular DNA decomposition and bacterial community composition in soil [J]. Soil Biology and Biochemistry, 2015, 86: 42-49
- [10] Sutherland I W. The biofilm matrix—An immobilized but dynamic microbial environment [J]. Trends in Microbiology, 2001, 9(5): 222-227
- [11] Pietramellara G, Ceccherini M T, Ascher J, et al. Persistence of transgenic and not transgenic extracellular DNA in soil and bacterial transformation [J]. Rivista Di Biologia, 2006, 99(1): 37-68
- [12] Zawadzki P, Cohan F M. The size and continuity of DNA segments integrated in *Bacillus* transformation [J]. Genetics, 1995, 141(4): 1231-1243
- [13] Mao D Q, Luo Y, Mathieu J, et al. Persistence of extracellular DNA in river sediment facilitates antibiotic resistance gene propagation [J]. Environmental Science & Technology, 2014, 48(1): 71-78
- [14] Ranjard L, Richaume A. Quantitative and qualitative microscale distribution of bacteria in soil [J]. Research in Microbiology, 2001, 152(8): 707-716
- [15] Vlassov V V, Laktionov P P, Rykova E Y. Extracellular nucleic acids [J]. BioEssays, 2017, 29: 654-667
- [16] Corinaldesi C, Beolchini F, Dell' Anno A. Damage and degradation rates of extracellular DNA in marine sediments: Implications for the preservation of gene sequences [J]. Molecular Ecology, 2008, 17(17): 3939-3951
- [17] Dell' Anno A, Danovaro R. Extracellular DNA plays a key role in deep-sea ecosystem functioning [J]. Science, 2005, 309(5744): 2179
- [18] Lennon J T, Muscarella M E, Placella S A, et al. How, when, and where relic DNA affects microbial diversity [J]. mBio, 2018, 9(3): e00618-e00637
- [19] Corinaldesi C, Barucca M, Luna G M, et al. Preservation, origin and genetic imprint of extracellular DNA in perma-

nently anoxic deep-sea sediments [J]. Molecular Ecology, 2011, 20(3): 642-654

- [20] Ramírez G A, Jørgensen S L, Zhao R, et al. Minimal influence of extracellular DNA on molecular surveys of marine sedimentary communities [J]. Frontiers in Microbiology, 2018, 9: 2969
- [21] Steinberger R E, Holden P A. Extracellular DNA in single- and multiple-species unsaturated biofilms [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2005, 71(9): 5404-5410
- [22] Whitchurch C B, Tolker-Nielsen T, Ragas P C, et al. Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation [J]. Science, 2002, 295(5559): 1487
- [23] Torti A, Jørgensen B B, Lever M A. Preservation of microbial DNA in marine sediments: Insights from extracellular DNA pools [J]. Environmental Microbiology, 2018, 20(12): 4526-4542
- [24] Guo X P, Yang Y, Lu D P, et al. Biofilms as a sink for antibiotic resistance genes (ARGs) in the Yangtze Estuary[J]. Water Research, 2018, 129: 277-286
- [25] Zhang Y, Li A L, Dai T J, et al. Cell-free DNA: A neglected source for antibiotic resistance genes spreading from WWTPs [J]. Environmental Science & Technology, 2018, 52(1): 248-257
- [26] Dell' Anno A, Corinaldesi C. Degradation and turnover of extracellular DNA in marine sediments: Ecological and methodological considerations [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2004, 70(7): 4384-4386
- [27] Corinaldesi C, Danovaro R, Dell' Anno A. Simultaneous recovery of extracellular and intracellular DNA suitable for molecular studies from marine sediments [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2005, 71(1): 46-50
- [28] Aardema B W, Lorenz M G, Krumbein W E. Protection of sediment-adsorbed transforming DNA against enzymatic inactivation [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1983, 46(2): 417-420
- [29] Dell' Anno A, Stefano B, Danovaro R. Quantification, base composition, and fate of extracellular DNA in marine sediments [J]. Limnology and Oceanography, 2002, 47(3): 899-905
- [30] Corinaldesi C, Beolchini F, Dell' Anno A. Damage and degradation rates of extracellular DNA in marine sediments: Implications for the preservation of gene sequences [J]. Molecular Ecology, 2008, 17(17): 3939-3951
- [31] Nielsen K M, Johnsen P J, Bensasson D, et al. Release and persistence of extracellular DNA in the environment
 [J]. Environmental Biosafety Research, 2007, 6(1-2): 37-53

- [32] Carini P, Marsden P J, Leff J W, et al. Relic DNA is abundant in soil and obscures estimates of soil microbial diversity [J]. Nature Microbiology, 2016, 2(3): 1-6
- [33] Gustave W, Yuan Z F, Sekar R, et al. Relic DNA does not obscure the microbial community of paddy soil microbial fuel cells [J]. Research in Microbiology, 2019, 170(2): 97-104
- [34] Dong P Y, Wang H, Fang T T, et al. Assessment of extracellular antibiotic resistance genes (eARGs) in typical environmental samples and the transforming ability of eARG [J]. Environment International, 2019, 125: 90-96
- [35] Agnelli A, Ascher J, Corti G, et al. Distribution of microbial communities in a forest soil profile investigated by microbial biomass, soil respiration and DGGE of total and extracellular DNA [J]. Soil Biology and Biochemistry, 2004, 36(5): 859-868
- [36] Zhang Y P, Snow D D, Parker D, et al. Intracellular and extracellular antimicrobial resistance genes in the sludge of livestock waste management structures [J]. Environmental Science & Technology, 2013, 47(18): 10206-10213
- [37] Corinaldesi C, Tangherlini M, Manea E, et al. Extracellular DNA as a genetic recorder of microbial diversity in benthic deep-sea ecosystems [J]. Scientific Reports, 2018, 8(1): 1839
- [38] Bailiff M D, Karl D M. Dissolved and particulate DNA dynamics during a spring bloom in the Antarctic Peninsula region, 1986—1987 [J]. Deep Sea Research Part A Oceanographic Research Papers, 1991, 38(8-9): 1077-1095
- [39] Siuda W, Chróst R J, Güde H. Distribution and origin of dissolved DNA in lakes of different trophic states [J]. Aquatic Microbial Ecology, 1998, 15(1): 89-96
- [40] Siuda W, Chróst R J. Concentration and susceptibility of dissolved DNA for enzyme degradation in lake watersome methodological remarks [J]. Aquatic Microbial Ecology, 2000, 21: 195-201
- [41] Blagodatskaya E V, Blagodatskii S A, Anderson T H. Quantitative isolation of microbial DNA from different types of soils of natural and agricultural ecosystems [J]. Microbiology, 2003, 72(6): 744-749
- [42] England L S, Pollok J, Vincent M, et al. Persistence of extracellular baculoviral DNA in aquatic microcosms: Extraction, purification, and amplification by the polymerase chain reaction (PCR) [J]. Molecular and Cellular Probes, 2005, 19(2): 75-80
- [43] Niemeyer J, Gessler F. Determination of free DNA in soils [J]. Journal of Plant Nutrition and Soil Science, 2002, 165(2): 121

- [44] Vuillemin A, Horn F, Alawi M, et al. Preservation and significance of extracellular DNA in ferruginous sediments from Lake Towuti, Indonesia [J]. Frontiers in Microbiology, 2017, 8: 1440
- [45] Xue J, Feng Y. Determination of adsorption and desorption of DNA molecules on freshwater and marine sediments [J]. Journal of Applied Microbiology, 2018, 124(6): 1480-1492
- [46] Demanèche S, Jocteur-Monrozier L, Quiquampoix H, et al. Evaluation of biological and physical protection against nuclease degradation of clay-bound plasmid DNA [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2001, 67 (1): 293-299
- [47] Blum S A E, Lorenz M G, Wackernagel W. Mechanism of retarded DNA degradation and prokaryotic origin of DNases in nonsterile soils [J]. Systematic and Applied Microbiology, 1997, 20(4): 513-521
- [48] Crecchio C, Stotzky G. Binding of DNA on humic acids: Effect on transformation of *Bacillus subtilis* and resistance to DNase [J]. Soil Biology and Biochemistry, 1998, 30(8-9): 1061-1067
- [49] Pietramellara G, Franchi M, Gallori E, et al. Effect of molecular characteristics of DNA on its adsorption and binding on homoionic montmorillonite and kaolinite [J]. Biology and Fertility of Soils, 2001, 33(5): 402-409
- [50] Khanna M, Stotzky G. Transformation of *Bacillus subtilis* by DNA bound on montmorillonite and effect of DNase on the transforming ability of bound DNA [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1992, 58(6): 1930-1939
- [51] Hou Y K, Wu P X, Zhu N W. The protective effect of clay minerals against damage to adsorbed DNA induced by cadmium and mercury [J]. Chemosphere, 2014, 95: 206-212
- [52] Franchi M, Bramanti E, Bonzi L M, et al. Clay-nucleic acid complexes: Characteristics and implications for the preservation of genetic material in primeval habitats [J]. Origins of Life and Evolution of the Biosphere, 1999, 29 (3): 297-315
- [53] Cai P, Huang Q, Zhang X, et al. Adsorption of DNA on clay minerals and various colloidal particles from an Alfisol [J]. Soil Biology and Biochemistry, 2006, 38(3): 471-476
- [54] Gardner C M, Gunsch C K. Adsorption capacity of multiple DNA sources to clay minerals and environmental soil matrices less than previously estimated [J]. Chemosphere, 2017, 175: 45-51
- [55] Sirois S H, Buckley D H. Factors governing extracellular

DNA degradation dynamics in soil [J]. Environmental Microbiology Reports, 2019, 11(2): 173-184

- [56] Gulden R H, Lerat S, Hart M M, et al. Quantitation of transgenic plant DNA in leachate water: Real-time polymerase chain reaction analysis [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2005, 53(15): 5858-5865
- [57] Henriksen T M, Breland T A. Decomposition of crop residues in the field: Evaluation of a simulation model developed from microcosm studies [J]. Soil Biology and Biochemistry, 1999, 31(10): 1423-1434
- [58] Thomas C M, Nielsen K M. Mechanisms of, and barriers to, horizontal gene transfer between bacteria [J]. Nature Reviews Microbiology, 2005, 3(9): 711-721
- [59] de Vries J, Wackernagel W. Integration of foreign DNA during natural transformation of *Acinetobacter* sp. by homology-facilitated illegitimate recombination [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2002, 99(4): 2094-2099
- [60] Nielsen K M, van Elsas J D. Stimulatory effects of compounds present in the rhizosphere on natural transformation of *Acinetobacter* sp. BD413 in soil [J]. Soil Biology and Biochemistry, 2001, 33(3): 345-357
- [61] Iwaki M, Arakawa Y. Transformation of *Acinetobacter* sp. BD413 with DNA from commercially available genetically modified potato and papaya [J]. Letters in Applied Microbiology, 2006, 43(2): 215-221
- [62] Nielsen K M, van Elsas J D, Smalla K. Transformation of Acinetobacter sp. strain BD413 (pFG4ΔnptII) with transgenic plant DNA in soil microcosms and effects of kanamycin on selection of transformants [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2000, 66(3): 1237-1242
- [63] Flury M, Flühler H, Jury W A, et al. Susceptibility of soils to preferential flow of water: A field study [J]. Water Resources Research, 1994, 30(7): 1945-1954
- [64] Bundt M, Widmer F, Pesaro M, et al. Preferential flow paths: Biological 'hot spots' in soils [J]. Soil Biology and Biochemistry, 2001, 33(6): 729-738
- [65] Gloag E S, Turnbull L, Huang A, et al. Self-organization of bacterial biofilms is facilitated by extracellular DNA
 [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2013, 110 (28): 11541-11546
- [66] Pammi M, Liang R, Hicks J, et al. Biofilm extracellular DNA enhances mixed species biofilms of *Staphylococcus epidermidis* and *Candida albicans* [J]. BMC Microbiology, 2013, 13: 257
- [67] Böckelmann U, Janke A, Kuhn R, et al. Bacterial extracel-

lular DNA forming a defined network-like structure [J]. FEMS Microbiology Letters, 2006, 262(1): 31-38

- [68] Mah T F C, O' Toole G A. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents [J]. Trends in Microbiology, 2001, 9(1): 34-39
- [69] Okshevsky M, Meyer R L. The role of extracellular DNA in the establishment, maintenance and perpetuation of bacterial biofilms [J]. Critical Reviews in Microbiology, 2015, 41(3): 341-352
- [70] Das T, Sharma P K, Busscher H J, et al. Role of extracellular DNA in initial bacterial adhesion and surface aggregation [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2010, 76(10): 3405-3408
- [71] Sutherland I. Biofilm exopolysaccharides: A strong and sticky framework [J]. Microbiology, 2001, 147(Pt 1): 3-9
- [72] Mulcahy H, Charron-Mazenod L, Lewenza S. Extracellular DNA chelates cations and induces antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms [J]. PLoS Pathogens, 2008, 4(11): e1000213
- [73] Dominiak D M, Nielsen J L, Nielsen P H. Extracellular DNA is abundant and important for microcolony strength in mixed microbial biofilms [J]. Environmental Microbiology, 2011, 13(3): 710-721
- [74] Allesen-Holm M, Barken K B, Yang L, et al. A characterization of DNA release in *Pseudomonas aeruginosa* cultures and biofilms [J]. Molecular Microbiology, 2006, 59 (4): 1114-1128
- [75] Das T, Manefield M. Pyocyanin promotes extracellular DNA release in *Pseudomonas aeruginosa* [J]. PLoS One, 2012, 7(10): e46718
- [76] Whitchurch C B, Tolker-Nielsen T, Ragas P C, et al. Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation [J]. Science, 2002, 295(5559): 1487
- [77] Montanaro L, Poggi A, Visai L, et al. Extracellular DNA in biofilms [J]. The International Journal of Artificial Organs, 2011, 34(9): 824-831
- [78] Chiang W C, Nilsson M, Jensen P Ø, et al. Extracellular DNA shields against aminoglycosides in *Pseudomonas* aeruginosa biofilms [J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2013, 57(5): 2352-2361
- [79] Moscoso M, García E, López R. Biofilm formation by *Streptococcus pneumoniae*: Role of choline, extracellular DNA, and capsular polysaccharide in microbial accretion [J]. Journal of Bacteriology, 2006, 188(22): 7785-7795
- [80] Izano E A, Amarante M A, Kher W B, et al. Differential roles of poly-N-acetylglucosamine surface polysaccharide and extracellular DNA in *Staphylococcus aureus* and

Staphylococcus epidermidis biofilms [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2008, 74(2): 470-476

- [81] Qin Z Q, Ou Y Z, Yang L, et al. Role of autolysin-mediated DNA release in biofilm formation of *Staphylococcus epidermidis* [J]. Microbiology, 2007, 153 (Pt 7): 2083-2092
- [82] Doroshenko N, Tseng B S, Howlin R P, et al. Extracellular DNA impedes the transport of vancomycin in *Staphylococcus epidermidis* biofilms preexposed to subinhibitory concentrations of vancomycin [J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2014, 58(12): 7273-7282
- [83] Gómez-Brandón M, Ascher-Jenull J, Bardelli T, et al. Ground cover and slope exposure effects on micro- and mesobiota in forest soils [J]. Ecological Indicators, 2017, 80: 174-185
- [84] Turner B L, Baxter R, Mahieu N, et al. Phosphorus compounds in subarctic Fennoscandian soils at the mountain birch (*Betula pubescens*)—tundra ecotone [J]. Soil Biology and Biochemistry, 2004, 36(5): 815-823
- [85] Turner B L, Newman S. Phosphorus cycling in wetland soils: The importance of phosphate diesters [J]. Journal of Environmental Quality, 2005, 34(5): 1921-1929
- [86] Sakcham B, Kumar A, Cao B. Extracellular DNA in monochloraminated drinking water and its influence on DNA-based profiling of a microbial community [J]. Environmental Science & Technology Letters, 2019, 6(5): 306-312
- [87] Guardiola M, Uriz M J, Taberlet P, et al. Deep-sea, deepsequencing: Metabarcoding extracellular DNA from sediments of marine canyons [J]. PLoS One, 2015, 10(10): e0139633
- [88] Vorkapic D, Pressler K, Schild S. Multifaceted roles of extracellular DNA in bacterial physiology [J]. Current Genetics, 2016, 62(1): 71-79
- [89] Zhang Q Q, Ying G G, Pan C G, et al. Comprehensive evaluation of antibiotics emission and fate in the river basins of China: Source analysis, multimedia modeling, and linkage to bacterial resistance [J]. Environmental Science & Technology, 2015, 49(11): 6772-6782
- [90] Liu S S, Qu H M, Yang D, et al. Chlorine disinfection increases both intracellular and extracellular antibiotic resistance genes in a full-scale wastewater treatment plant [J]. Water Research, 2018, 136: 131-136
- [91] Czekalski N, Sigdel R, Birtel J, et al. Does human activity impact the natural antibiotic resistance background? Abundance of antibiotic resistance genes in 21 Swiss lakes [J]. Environment International, 2015, 81: 45-55

- [92] Luo Y, Mao D Q, Rysz M, et al. Trends in antibiotic resistance genes occurrence in the Haihe River, China [J]. Environmental Science & Technology, 2010, 44 (19): 7220-7225
- [93] Wang D N, Liu L, Qiu Z G, et al. A new adsorption-elution technique for the concentration of aquatic extracellular antibiotic resistance genes from large volumes of water [J]. Water Research, 2016, 92: 188-198
- [94] Zhang Y P, Niu Z G, Zhang Y, et al. Occurrence of intracellular and extracellular antibiotic resistance genes in coastal areas of Bohai Bay (China) and the factors affecting them [J]. Environmental Pollution, 2018, 236: 126-136
- [95] Lorenz M G, Wackernagel W. Natural genetic transformation of *Pseudomonas stutzeri* by sand-adsorbed DNA [J]. Archives of Microbiology, 1990, 154(4): 380-385
- [96] Lorenz M G, Aardema B W, Wackernagel W. Highly efficient genetic transformation of *Bacillus subtilis* attached to sand grains [J]. Journal of General Microbiology, 1988, 134(1): 107-112
- [97] Liang Z B, Keeley A. Filtration recovery of extracellular DNA from environmental water samples [J]. Environmental Science & Technology, 2013, 47(16): 9324-9331
- [98] Wen F S, White G J, VanEtten H D, et al. Extracellular DNA is required for root tip resistance to fungal infection
 [J]. Plant Physiology, 2009, 151(2): 820-829 ◆