

DOI: 10.13376/j.cbls/2018001

文章编号: 1004-0374(2018)01-0001-08

· 评述与综述 ·

胞外DNA的作用及其在生物浸矿领域的研究展望

余润兰^{1,2}, 侯春伟¹, 刘阿娟¹, 吴晓燕¹, 彭堂见¹,
吴学玲^{1,2}, 申 丽^{1,2}, 李交昆^{1,2}, 刘元东^{1,2}, 曾伟民^{1,2*}

(1 中南大学资源加工与生物工程学院, 长沙 410083; 2 中南大学生物冶金教育部重点实验室, 长沙 410083)

摘 要: 胞外 DNA 作为细菌胞外多聚物的关键组分, 对生物膜的形成和稳定有着重要的作用。正是这些作用使得胞外 DNA 成为医学、环境科学等领域的研究热点。该文从胞外 DNA 研究背景出发就其来源途径、作用, 以及研究胞外 DNA 的方法和技术手段, 包括胞外 DNA 提取和离线检测、原位观察及监测等方面进行了综述, 同时对研究胞外 DNA 遇到的问题以及在生物冶金领域未来的研究前景进行展望, 以期为今后深入开展浸矿微生物胞外 DNA 的研究提供思路, 从而提高浸矿微生物胞外 DNA 作用机理研究的深度。

关键词: 胞外多聚物; 胞外 DNA; 原位观察和监测; 生物冶金

中图分类号: Q819; TF19 **文献标志码:** A

Functions of extracellular DNA and research prospects in the field of biological leaching

YU Run-Lan^{1,2}, HOU Chun-Wei¹, LIU A-Juan¹, WU Xiao-Yan¹, PENG Tang-Jian¹,
WU Xue-Ling^{1,2}, SHEN Li^{1,2}, LI Jiao-Kun^{1,2}, LIU Yuan-Dong^{1,2}, ZENG Wei-Min^{1,2*}

(1 School of Minerals Processing and Bioengineering, Central South University, Changsha 410083, China;

2 Key Laboratory of Biometallurgy, Ministry of Education, Central South University, Changsha 410083, China)

Abstract: Extracellular DNA (eDNA) as a key component of extracellular polymeric substances (EPS) is essential in the formation and development of biofilm. These roles make the eDNA become a hot research topic in medicine, environment science and other fields. Beginning with the background of the eDNA study, this article reviews the sources and functions, the methods and techniques to study eDNA, including the extraction methods and off-line detection, *in-situ* observation and monitoring of eDNA. Meanwhile, the problems encountered in the research of eDNA and the research prospects of eDNA in the field of biohydrometallurgy are also discussed, aiming at providing insights into the future research on eDNA of bioleaching microorganisms, so as to enhance the study on-functional mechanisms of eDNA into a deeper degree.

Key words: extracellular polymeric substances; extracellular DNA; in situ observation and monitoring; bioleaching

微生物在自然界中扮演着重要的角色, 近几年对微生物生物膜的研究在各个领域已经成为热点。生物膜是一种由细胞和聚合物组成的高度结构化的组织, 参与生物和化学等环境反应过程。此外, 生物膜在医学(感染)、工业(污染)和技术(生物膜工程)等领域也很重要。在医学界, 随着对一些慢性和顽固性疾病的深入了解, 发现一些致病性细菌的生物膜是导致这些疾病难以根治的主要原因。在工业生产中, 微生物生物膜也成为真正制约膜技术发展的

最主要因素。在环境污染方面, 如生物冶金技术成本低、操作简单、环境友好^[1-2], 在当今全球高品

收稿日期: 2017-07-17; 修回日期: 2017-09-22

基金项目: 国家自然科学基金青年基金项目(31200382); 国家自然科学基金面上项目(31470230); 国家自然科学基金国际合作重大项目(51320105006); 中南大学中央高校基本科研业务费专项资金(2017zzts378)

*通信作者: E-mail: zengweimin1024@sina.com; Tel: 010-88877472

位矿产资源日益短缺的情况下,生物冶金的优势越来越明显^[3],但生物膜却影响金属离子的浸出。

微生物及其分泌的胞外多聚物 (extracellular polymeric substances, EPS) 以生物膜的形式吸附在载体表面。生物膜中的 EPS 一般由胞外多糖、胞外蛋白、胞外 DNA、脂肪酸以及一些无机质构成。微生物胞外多聚物组分的多样性也是影响微生物群体传质、表面特征、吸附能力、聚集能力等性质的原因。一般而言, EPS 的主要成分是胞外多糖和胞外蛋白,占胞外多聚物总量的 60% 以上。这些成分含量相对较高,并且易于提取和分离纯化,所以在各个领域研究较多。

胞外 DNA 存在于一些革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌以及古生菌等的 EPS 中。在医学微生物研究领域,研究人员发现,胞外 DNA 是胞外多糖和胞外蛋白等骨架成分之间的“桥梁”,是众多致病微生物生物膜保持高强度和高稳定性的关键组分。另外研究人员还发现,当微生物细胞浓度较高时,某些细胞与细胞之间存在一段主要由胞外 DNA 组成的连接体,因此认为胞外 DNA 可能还具有细胞间信号转导等功能。近年来,随着荧光标记、激光共聚焦显微镜、原子力显微镜、基因组学和蛋白质组学等新兴技术的发展^[4],有关 EPS 中胞外 DNA 结构和功能等的研究逐渐深入^[5-7],这也为胞外 DNA 在其他领域的研究打开了大门。

在生物冶金领域,生物膜在微生物-载体-溶液三相界面间发挥着独特的重要作用,已成为生物冶金领域的研究热点^[8-9]。生物冶金典型菌种主要包括嗜酸氧化亚铁硫杆菌、嗜酸氧化硫硫杆菌、氧化亚铁钩端螺菌和嗜热硫氧化硫化杆菌等菌种。浸矿微生物胞外多聚物是微生物吸附到矿物表面且发生氧化溶解作用的关键媒介,是影响生物浸出效率和浸出率的关键因素。已有研究发现,胞外多聚物的关键组分胞外 DNA 的含量受多种因素的影响,如培养基类型、外界环境介质 pH 值、氧化还原电位等条件。通过不同酶处理提取胞外 DNA 的研究过程中发现^[10],胞外 DNA 和其他聚合物(包括蛋白质和多糖)相互结合,形成三维网络结构支撑生物膜的形成和稳定。由此可知,研究生物浸出过程中产生的胞外 DNA 对理解浸矿微生物生物膜的功能作用有着非常重要的意义。

1 胞外DNA的定义

在科学文献中^[11-13],胞外 DNA 这一术语常被

用作不封闭在活细胞内的 DNA 的代名词。Torti 等^[14]曾根据 DNA 的存在形式不同对胞外 DNA 和胞内 DNA 进行区分,由此可以清楚看到胞外 DNA 和胞内 DNA 的区别,具体总结如图 1 所示。关于胞外 DNA 的定义,不同的人有不同的描述。但最初胞内 DNA 和胞外 DNA 基于是否在胞内或胞外被简单定义,并不是根据它的生理状态(活的、休眠体、死的)而确定。eDNA 可以单链或双链形式存在,多数以微囊泡、凋亡小体、外泌体及组蛋白复合物等形式存在,具有双螺旋结构。

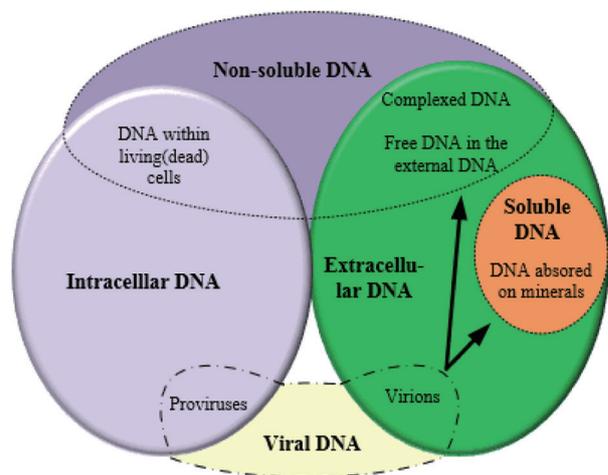


图1 DNA的存在形式^[14]

2 胞外DNA的研究历史

其实,早在 1907 年 Bergamini 等^[15]就发现了外周血中有游离核酸,但在当时因核酸是否是遗传物质还没有定论,更没有胞外 DNA 这一说法,所以并没有引起人们的关注。1956 年, Catlin^[16]描述了胞外基质中胞外 DNA 的存在,并发现胞外 DNA 是细菌生物膜的结构成分。1965 年, Bendich 等^[17]研究认为, DNA 可能作为一种致癌基因的功能因子发挥作用。1980 年, Anker 等^[18]在研究有 T、B 淋巴细胞参与的人体免疫应答过程时发现,胞外 DNA 存在且在细胞间进行信息传递。1987 年, Paul 等^[19]发现海洋沉积物中含有大量胞外 DNA,且这些胞外 DNA 在物质循环中有重要作用。

这些早期的研究证明了胞外 DNA 确实是存在的,随着技术的发展,胞外 DNA 的相关研究也越来越多,对其作用的研究也不断深入。1998 年, Watanabe 等^[20]采用 DNA 裂解酶研究了胞外 DNA

对生物膜结构稳定的影响, 认为可能是 DNA 裂解酶破坏了生物膜中的胞外 DNA, 从而导致生物膜的不稳定。2002 年, Whitchurch 等^[21]还发现, 在 *Paeruginosa* 菌株生物膜形成过程中或新的细胞吸附到生物膜上时, 细胞与细胞之间存在一段主要由胞外 DNA 组成的连接体, 认为胞外 DNA 可能还具有细胞间信号传导等功能。2010 年, Garciaolmo 等^[22]发现肿瘤患者的血样(不含癌细胞)可使培养的细胞癌化, 因而推测, 胞外 DNA 可作为一种遗传信息传递的信使, 实现基因转移。同年, 通过 Flemming 和 Wingender^[23]的研究, 认为胞外 DNA 在生物膜中具有结构组成和胞间连接等作用。近几年关于胞外 DNA 的研究越来越多, 不管是工业、农业, 还是医学领域, 胞外 DNA 都成为了研究热点。

3 胞外DNA的来源

研究人员通过 PCR 等技术发现, 生物膜中胞外 DNA 和染色体 DNA 具有同源性, 胞外 DNA 的释放有着复杂的机制, 因细菌种属不同而不同, 并且有些细菌生物膜中的胞外 DNA 来源途径不止一条。目前, 胞外 DNA 的来源机制并不明确, 科学家们认为的可能途径有细菌裂解释放、活细菌的主动分泌、含有 DNA 的膜囊泡释放等三种。

3.1 细菌裂解释放

在表皮葡萄球菌中, 自溶素 *altE* 基因被激活后, 诱导细菌裂解释放出 DNA。血链球菌通过代谢物控制蛋白 A 来调控细胞的死亡裂解, 最终导致 DNA 的释放。还有些细菌, 以肺炎链球菌为例^[24], 其胞外 DNA 的释放依赖胞壁质水解酶, 如自溶酶、酰胺酶等, 这一释放过程是感受态形成过程中的一部分, 并被群体感应系统信号传导过程所控制, 当肺炎链球菌产生的感受态刺激肽达到一定浓度时, 胞壁质水解酶就会使部分细胞裂解释放 DNA 等内容物。有些细菌, 如铜绿假单胞菌胞外 DNA 的来源途径不止一种, 其释放机制会随着生物膜形成的不同阶段而变化^[25]。

3.2 活细菌的主动分泌

细菌分泌系统参与细菌物质转运, 是细菌蛋白或 DNA 胞外分泌的主要途径, 目前已发现了 I-VII 型分泌系统。淋病奈瑟菌可通过 Gonococcal Genetic Island (GGI) 编码的蛋白所构成的一种特殊的 IV 型分泌系统分泌 DNA 到细胞外。还有些细菌存在群体感应现象, 根据细胞密度变化产生并释放一些信号分子与周围环境进行信息交流, 并随细胞浓度的

增加而增加, 当积累到一定浓度时可调控蛋白结合从而启动细菌中特定基因的表达, 产生并分泌胞外 DNA 等物质, 参与生物膜的形成。研究发现, 浸矿微生物嗜酸氧化亚铁硫杆菌有一个典型的 I 型群体感应系统 (QS), 能产生 N-酰基高丝氨酸内酯 (AHL) 作为信号分子, 对黄铁矿上生物膜的形成有影响, 矿物表面胞外 DNA 分泌量的增多也与之有关^[26]。

3.3 释放含有DNA的膜囊泡

膜囊泡是一种在革兰氏阴性菌, 甚至某些革兰氏阳性菌中普遍存在的包含生物学活性物质的囊泡状结构。细菌产生包裹生物大分子的膜囊泡是一种普遍现象, 大肠杆菌、流感嗜血杆菌、铜绿假单胞菌等都可以分泌含有 DNA 的膜囊泡。如铜绿假单胞菌分泌的膜囊泡可被自溶素裂解并释放 DNA 到细胞外^[27], 释放的胞外 DNA 可被其他细菌吸收。细菌通过膜囊泡分泌 DNA 是有一定优势的^[28], 这样可以避免核酸外切酶的破坏, 另外膜囊泡易于与受体细胞融合, 提高受体细胞吸收胞外 DNA 的速率, 一定程度上使非感受态细胞克服吸收胞外 DNA 的障碍。

4 胞外DNA的作用

随着对胞外多聚物关键组分的深入研究, 发现胞外多聚物在微生物生物膜中有重要作用。其中有胞外 DNA 参与的几种功能已被确定^[23], 如加强细菌初始黏附和聚集、影响生物膜的形成和稳定、传递遗传信息等功能, 如表 1 所示。

4.1 加强细菌在固体表面的初始黏附和聚集

很多细菌在自然环境下容易形成生物膜。在实验室中, 细菌也常常形成团状聚集在一起。初始黏附取决于细菌、矿物及介质的物理化学性质, 根据 DLVO 理论^[29], 细菌和矿物的表面物理化学性质可以用表面热力学参数表征, 胞外 DNA 为细菌创造了一个高度疏水的细胞表面, 而疏水等短程相互作用为细菌在固体表面的黏附和聚集创造了热力学上的条件, 这也揭示了细菌-矿物相互作用的热力学本质。一些研究还发现, 除去胞外 DNA 后黏附到玻片等材料上的细胞明显减少, 形成的生物膜也受到一定程度的影响。

4.2 影响生物膜的形成和稳定

大量的研究表明, 不同的 DNase 酶能抑制不同微生物的生物膜的形成或分散生物膜。如不同浓度的 DNase I 对金黄色葡萄球菌的生长无影响, 然而能显著抑制细菌生物膜的形成, 并呈浓度依赖性。

表1 胞外多聚物在细菌生物膜中的作用^[23]

作用	与生物膜相关	EPS的相关组分
黏附	允许浮游细胞在非生物和生物表面初步定植, 以及整个生物膜在表面的长期附着	多糖、蛋白质、DNA及两性分子
聚集	使细胞间进行桥联, 临时固定和细胞间识别	多糖、蛋白质和DNA
连接生物膜	形成水合聚合物网状结构(生物膜基质), 介导生物膜的稳定(常与多价阳离子结合) 并通过EPS结构(囊泡、黏液或鞘) 确定生物膜结构以及允许细胞间交流	中性和带电多糖、蛋白质(如淀粉样蛋白和凝集素)、DNA
传递遗传信息	促进细胞生物膜间的基因转移	DNA

另一方面, 当细菌发生裂解或自溶时, 胞内 DNA 释放出来后与核酸结合型胞外蛋白结合, 这样不仅有效维持生物膜结构的致密性和稳定性, 还可防止遗传物质的丢失^[23]。

4.3 螯合二价阳离子, 提高细菌的耐药性

eDNA 螯合二价阳离子, 诱导相关基因表达, 从而改变细胞表面特性, 提高细菌的耐药性^[30]。如在抗菌药物存在的情况下^[31-33], Ca^{2+} 与细胞膜表面负电荷以及生物膜基质中的 eDNA 及其他聚合物相互作用, 稳定细胞壁, 提高细菌细胞之间的离子桥连作用, 进而提高细菌的黏附和形成生物膜的能力。这说明 eDNA 在提高菌种抗性方面也起到了一定作用。

4.4 传递遗传信息

在微生物群落中常常会发现, 一种细菌可以摄取并整合另一种细菌的特异性基因到其染色体, 如口腔中缓症链球菌可摄取并整合殊异韦荣菌 DNA 的抗四环素标志性基因到其染色体^[34], 有利于细菌生存。研究发现, 处于感受态的细胞可以摄取环境中的 DNA, 而胞外 DNA 也是具有一定长度的 DNA 片段, 因此胞外 DNA 或许可以进行基因水平转移, 传递遗传信息^[35]。

微生物胞外 DNA 的来源与作用一直备受关注, 由于浸矿微生物种类较多, 有高温、中温和低温之分, 还有古菌、细菌和真菌之分, 不同种类的浸矿微生物胞外 DNA 的来源方式可能不同, 这使来源

机制的研究变得复杂。在研究浸矿微生物胞外 DNA 作用时发现, 胞外 DNA 对微生物在矿物表面的吸附及生物膜的形成有重要作用。但胞外 DNA 的含量相对较少, 使得提取分离纯化实验重复性差, 这对胞外 DNA 作用和来源的研究产生了一定阻碍。浸矿微生物胞外 DNA 的来源及其作用及分析方法等方面还有待进一步的探究。

5 研究胞外DNA的方法和技术手段

5.1 胞外DNA的提取及其离线检测

由浸矿细菌胞外 DNA 分析的技术路线(图2)可知, EPS 的提取是实验的第一步。微生物胞外多聚物的提取方法共分为物理方法、化学方法和酶学方法三大类。不同提取方法对 EPS 各成分的提取量影响很大, 胞外 DNA 的提取也是依据这三类方法。物理方法主要是利用各种外力, 如重力、离心力增加其溶解度; 又如高速离心法、超声波法。化学方法是利用离子或分子的作用增加成分的溶解性, 如 EDTA 法、 H_2SO_4 法、NaOH 法、SDS 法等^[36], 提取方法总结如表 2 所示。常青等^[37]采用超声波-高速离心法, He 等^[38]采用 EGTA/Tris-HCl 法, 提取浸矿微生物胞外多聚物等成分, 且提取的胞外 DNA 量很小。这些提取方法一定程度上会使细胞破碎释放基因组 DNA, 从而不能获得高纯度的胞外 DNA。虽然提取生物膜基质中的胞外 DNA 有很多方法,

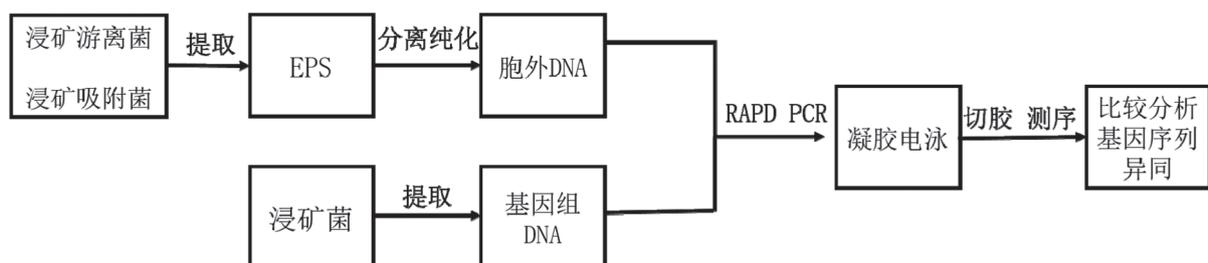


图2 胞外DNA分析的技术路线

表2 胞外DNA的提取方法一览表

提取方法	属性	作用	参考文献
离心	物理方法	离心力	[36]
超声	物理方法	剪切力	[37]
水浴	物理方法	增加水溶性	[39]
H ₂ SO ₄	强酸	结合金属离子	[36-37]
NaOH	强碱	电离多糖和蛋白质中的带电基团	[36,40]
EDTA	螯合剂	螯合二、三价金属离子	[31,41]
SDS	阳离子型表面活性剂	使蛋白质变性	[31,35]
CER	离子交换	除去阳离子	[42]
N-Glycanase	酰胺酶	释放N-聚糖和糖蛋白	[43]
Dispersin B	糖基水解酶	水解 N-乙酰葡糖胺	[44]
Proteinase K	蛋白酶	非特异性水解蛋白	[40]

但是要保证不受细胞内基因组 DNA 的污染是很难的。

生物膜中的 EPS 是由一些高分子化合物组成, 包括蛋白质、多糖、DNA 等, 其中大部分的胞外蛋白与 Ca²⁺ 和 Mg²⁺ 等二价离子桥联, 一部分的胞外 DNA 又会与这些二价离子连接, 还有一部分胞外 DNA 可能会与胞外其他多聚物结合在一起。推测, EPS 中的多糖和蛋白质的一些复合结构可能阻止了 DNA 从 EPS 基质中释放出来, 所以用以上物理或化学等方法来提取胞外 DNA 并不理想, 不能获得大量的高纯度的胞外 DNA, 所以 Wu 和 Xi^[40] 比较了化学法和酶解法提取生物膜中的胞外 DNA, 并通过检测提取液中的 6-磷酸葡萄糖脱氢酶酶活来分析细胞破裂程度。与简单的过滤等方法相比, 化学法和酶处理获得更多的胞外 DNA, 但化学法处理检测到有大量细胞破裂, 而通过酶法提取时没有检测到破裂的细胞。总的来说, 不管是物理还是化学方法, 好的提取方法总是要做到提取率高、细胞破碎程度小以及不改变 EPS 的性质。

提取液中胞外 DNA 的含量测定有多种方法, 常用的有紫外分光光度法、琼脂糖凝胶电泳测量法、二苯胺显色法、Qubit 荧光检测法以及 Pico Green 荧光分光光度法等。紫外分光光度法和凝胶电泳法测定 DNA 含量时, 要求样品浓度较高和体积较大; 二苯胺显色法测 DNA 浓度时对样品纯度要求较高, 因为提取液中的糖类、蛋白质等物质会干扰 DNA 的测定; 荧光检测法灵敏度高, 适合测量低浓度和微量 DNA, 但是需要荧光检测仪器, 而且检测试剂较昂贵。当然, 随着分子生物学技术的发展, 一系列的检测试剂盒也可以用来测定 DNA 的含量。虽然 DNA 含量测定方法有多种, 但不同的 DNA

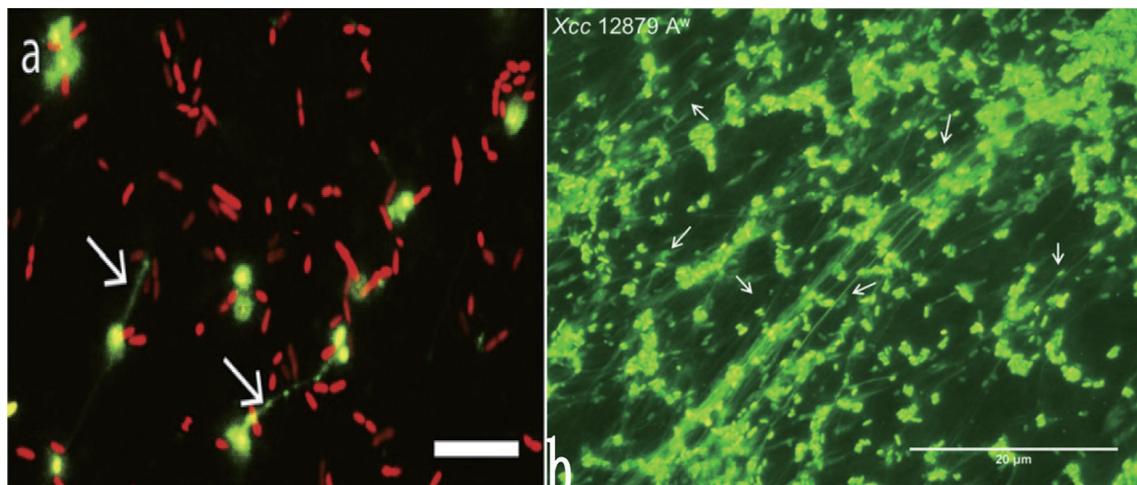
提取液, 应根据其特点选择合适的测定方法, 保证测定的准确性和灵敏性。

5.2 胞外DNA的原位观察及监测

在过去的十几年中, 各个领域的研究已经证明胞外 DNA 在细菌生物膜中扮演着重要角色, 但是并没有观察到生物膜中胞外 DNA 的原位分布情况及存在状态。近几年随着科技的发展, 多种方法用来研究生物膜, 如激光共聚焦显微镜 (CLSM)、环境扫描电镜 (ESEM)、原子力显微镜 (AFM) 和荧光显微镜 (EFM) 等, 这些技术广泛用于各种领域。Zhang 等^[45] 采用 CLSM 和 AFM 等研究了生物浸出过程中浸矿菌在矿物表面的聚集现象和生物膜的形成情况, 可以清楚地观察到生物膜的形成及 EPS 的产量。Okshevsky 和 Meyer^[46] 通过荧光染料 TOTO-1 (绿色荧光) 和 SYTO-60 (红色荧光) 分别对铜绿假单胞菌形成的生物膜中胞外 DNA 和胞内 DNA 染色, 用 CLSM 对胞外 DNA 进行可视化研究, 可以清晰地看到胞外 DNA 的存在状态 (图 3a) 所示。Sena-Vélez 等^[47] 用荧光显微镜和透射电镜考察柑橘溃疡病菌胞外 DNA 在生物膜形成的不同时期的作用时发现, 生物膜中的纤维状结构中含有大量胞外 DNA (图 3b)。还有些研究通过指纹图谱分析肠道细菌群胞外 DNA 和胞内 DNA 的构成差异。

6 总结与展望

随着分子生物学技术以及一些荧光显微技术的发展, 胞外 DNA 的作用不断被认识。目前 eDNA 的研究主要集中在临床医学应用方面, 并且在一些疾病的治疗上取得了很好的效果。在生物冶金领域, 胞外 DNA 的研究也有所进展, 如生物浸矿过程中不同时期胞外 DNA 的提取及含量测定; 比较用



(a. Scalebars = 10 μm ; b. Scalebars = 20 μm)

图3 胞外DNA的可视化

DNaseI 除去胞外 DNA 前后对细菌在矿物表面吸附以及对金属离子浸出过程等的影响。但在生物冶金领域,对浸矿菌胞外多聚物关键组分胞外 DNA 的研究也存在着一些困难。作者本人在相关研究中发现,冶金领域胞外 DNA 的相关研究存在以下几个问题:(1) 仍然局限在对生物膜的观测、EPS 提取方法探讨和组成成分,特别是胞外多糖的分析等方面,而对其关键组分胞外 DNA 的作用及其机理研究较少;(2) 由于胞外 DNA 的含量相对较少,而提取方法较多且不统一,国际上没有统一标准,所以导致研究结果存在差异;(3) 浸矿微生物胞外多聚物本身较少,从提取液中分离纯化得到胞外 DNA 就更加困难,若分离纯化方法不当,会严重影响对胞外 DNA 的研究,无法进行分子实验;(4) 不同的菌种胞外 DNA 的来源机制可能不同,生物浸出过程中,哪些基因参与浸矿微生物胞外 DNA 的释放,是主动释放还是死亡裂解后释放,细胞裂解释放基因组 DNA 到胞外后有没有发生物理或化学变化,产生的胞外 DNA 在整个浸矿过程中有哪些作用,对于这一系列问题还不能从机理上给出解释。

这一系列问题的存在不利于 EPS 在生物冶金过程中作用机制的阐明,阻碍了生物冶金理论向更深的分子层次发展。所以,通过考察各个领域胞外 DNA 的研究技术与手段,分析生物浸出过程中胞外 DNA 的原位分布、含量变化、对微生物浸矿行为以及对生物膜形成情况的影响,有利于揭示浸矿微生物胞外多聚物关键组分——胞外 DNA 的作用机理。今后,基于 EPS 生物膜的生物冶金界面作用研究,不仅需要对外 DNA 进行定量和定性研究,

还需要结合基因组学、蛋白质组学、转录组学和微生物代谢组学,更深层次地探讨胞外多聚物中 eDNA 等关键组分产生的途径及其作用机理,这将有助于科学地、深入地揭示微生物浸矿界面作用行为,进一步发展生物冶金理论,这些也有助于对胞外 DNA 在各个领域进行全面深入研究。

[参 考 文 献]

- [1] Rawlings DE. Heavy metal mining using microbes. *Annu Rev Microbiol*, 2002, 56: 65-91
- [2] 冯光志, 石玉, 舒玉凤. 微生物浸出技术及其在尾矿开发中的应用. *生物学杂志*, 2016, 33: 92-7
- [3] Brierley JA, Brierley CL. Present and future commercial applications of biohydrometallurgy. *Hydrometallurgy*, 1999, 9: 81-9
- [4] Feng GZ, Shi Y, Qiu CK, et al. Application of metagenomic technique in biological metallurgy. *Modern Agri Sci Technol*, 2015: 304-6
- [5] Jakubovics NS, Shields RC, Rajarajan N, et al. Life after death: the critical role of extracellular DNA in microbial biofilms. *Lett Appl Microbiol*, 2013, 57: 467-75
- [6] Das T, Sehar S, Manefield M. The roles of extracellular DNA in the structural integrity of extracellular polymeric substance and bacterial biofilm development. *Env Microbiol Rep*, 2013, 5: 778-86
- [7] Okshesky M, Meyer RL. The role of extracellular DNA in the establishment, maintenance and perpetuation of bacterial biofilms. *Crit Rev Microbiol*, 2015, 41: 341-52
- [8] Zeng WM, Qiu GZ, Zhou HB, et al. Characterization of extracellular polymeric substances extracted during the bioleaching of chalcopyrite concentrate. *Hydrometallurgy*, 2010, 100: 177-80
- [9] Yu ZJ, Yu RL, Liu AJ, et al. Effect of pH values on extracellular protein and polysaccharide secretions of *Acidithiobacillus ferrooxidans*, during chalcopyrite

- bioleaching. *Trans Nonferrous Met Soc*, 2017, 27: 406-12
- [10] Böckelmann U, Janke A, Kuhn R, et al. Bacterial extracellular DNA forming a defined network-like structure. *Fems Microbiol Lett*, 2006, 262: 31-8
- [11] Corinaldesi C, Beolchini F, Dell'Anno A. Damage and degradation rates of extracellular DNA in marine sediments: implications for the preservation of gene sequences. *Mol Ecol*, 2008, 17: 3939-51
- [12] Danovaro R, Middelboe M. Separation of free virus particles from sediments in aquatic systems [M]//Manual of Aquatic Viral Ecology. ASLO, 2010: 74-81
- [13] Nielsen KM, Johnsen PJ, Bensasson D, et al. Release and persistence of extracellular DNA in the environment. *Environ Biosafety Res*, 2007, 6: 37-53
- [14] Torti A, Lever MA, Jørgensen BB. Origin, dynamics, and implications of extracellular DNA pools in marine sediments. *Mar Genom*, 2015, 24: 185-96
- [15] Bergamini L, Ghuyssen JM, Welsch M. *Comptes Rendus des Séances de la Société de Biologie et de ses Filiales. Anlisis Econmico*, 1907, xxiv(57)
- [16] Catlin BW. Extracellular deoxyribonucleic acid of bacteria and a deoxyribonuclease inhibitor. *Science*, 1956, 124: 441-2
- [17] Bendich A, Wilczok T, Borenfreund E. Circulating DNA as a possible factor in oncogenesis. *Science*, 1965, 148: 374-6
- [18] Anker P, Jachertz D, Stroun M, et al. The role of extracellular DNA in the transfer of information from T to B human lymphocytes in the course of an immune response. *Int J Immunogenet*, 1980, 7: 475-81
- [19] Paul JH, Jeffrey WH, DeFlaun MF. Dynamics of extracellular DNA in the marine environment. *Appl Environ Microb*, 1987, 53: 170-9
- [20] Watanabe M, Sasaki K, Nakashimada Y, et al. Growth and flocculation of a marine photosynthetic bacterium *Rhodovulum* sp. *Appl Microbiol Biot*, 1998, 50: 682-1
- [21] Whitchurch CB, Tolker-Nielsen T, Ragas PC, et al. Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation. *Science*, 2002, 295: 1487
- [22] Garcíaolmo DC, Domínguez C, Garcíaarranz M, et al. Cell-free nucleic acids circulating in the plasma of colorectal cancer patients induce the oncogenic transformation of susceptible cultured cells. *Cancer Res*, 2010, 70: 560-7
- [23] Flemming H, Wingender J. The biofilm matrix. *Nat Rev Microbiol*, 2010, 8: 623-33
- [24] Steinmoen H, Knutsen E, Håvarstein LS, et al. Induction of natural competence in *Streptococcus pneumoniae* triggers lysis and DNA release from a subfraction of the cell population. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99: 7681-6
- [25] Allesen-Holm M, Barken KB, Yang L, et al. A characterization of DNA release in *Pseudomonas aeruginosa* cultures and biofilms. *Mol Microbiol*, 2006, 59: 1114-28
- [26] Farah C, Vera M, Morin D, et al. Evidence for a functional quorum-sensing type AI-1 system in the extremophilic bacterium *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Appl Environ Microb*, 2005, 71: 7033-40
- [27] Lewenza S. Extracellular DNA-induced antimicrobial peptide resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa*. *Front Microbiol*, 2013, 4: 21
- [28] Renelli M, Matias V, Lo RY, et al. DNA-containing membrane vesicles of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 and their genetic transformation potential. *Microbiology*, 2004, 150: 2161-9
- [29] 荣兴民, 黄巧云, 陈雯莉, 等. 细菌在两种土壤矿物表面吸附的热力学分析. *土壤学报*, 2011, 48: 331-7
- [30] Das T, Sehar S, Manefield M. The roles of extracellular DNA in the structural integrity of extracellular polymeric substance and bacterial biofilm development. *Env Microbiol Rep*, 2013, 5: 778-86
- [31] Chen CZ, Cooper SL. Interactions between dendrimer biocides and bacterial membranes. *Biomaterials*, 2002, 23: 3359-68
- [32] Kerchova AJ, Elimelech M. Calcium and magnesium cations enhance the adhesion of motile and nonmotile *Pseudomonas aeruginosa* on alginate films. *Langmuir*, 2008, 24: 3392-9
- [33] Cruz LF, Cobine PA, De LFL. Calcium increases *Xylella fastidiosa* surface attachment, biofilm formation, and twitching motility. *Appl Environ Microb*, 2012, 78:1321-31
- [34] Hannan S, Ready D, Jasni AS, et al. Transfer of antibiotic resistance by transformation with eDNA within oral biofilms. *Fem Immunol Med Mic*, 2010, 59: 345-9
- [35] 刘敏, 王琳, 郝玉庆, 等. 格氏链球菌胞外DNA释放的研究进展. *国际口腔医学杂志*, 2013, 40: 533-6
- [36] Sun LP, Chen L, Guo WZ, et al. Extraction of extracellular polymeric substances in activated sludge using sequential extraction. *J Chem Technol Biot*, 2015, 90: 1448-54
- [37] 常青, 王彬斌, 彭党聪, 等. 基于粒度分布的活性污泥胞外聚合物提取及凝聚特性分析. *环境工程学报*, 2015, 9: 2284-90
- [38] He ZG, Yang YP, Zhou S, et al. Effect of pyrite, elemental sulfur and ferrous ions on EPS production by metal sulfide bioleaching microbes. *T Nonferr Metal Soc*, 2014, 24: 1171-8
- [39] Zhang W, Cao B, Wang D, et al. Variations in distribution and composition of extracellular polymeric substances (EPS) of biological sludge under potassium ferrate conditioning: effects of pH and ferrate dosage. *Biochem Eng J*, 2016, 106: 37-47
- [40] Wu J, Xi C. Evaluation of different methods for extracting extracellular DNA from the biofilm matrix. *Appl Environ Microb*: 2009, 75: 5390-5
- [41] Lu Q, Chang M, Yu Z, et al. The effects of three commonly used extraction methods on the redox properties of extracellular polymeric substances from activated sludge. *Environ Technol*, 2015, 36: 2884-91
- [42] Jia C, Li X, Allinson G, et al. Composition and morphology characterization of exopolymeric substances produced by the PAH-degrading fungus of *Mucor mucedo*. *Environ Sci Pollut R*, 2016, 23: 8421-30
- [43] Tarentino AL, Plummer TH. Enzymatic deglycosylation of asparagine-linked glycans: purification, properties, and

- specificity of oligosaccharide-cleaving enzymes from *Flavobacterium meningosepticum*. *Methods Enzymol*, 1994, 230: 44-57
- [44] Kaplan JB, Rangunath C, Velliyagounder K, et al. Enzymatic detachment of *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother*, 2004, 48: 2633-6
- [45] Zhang R, Bellenberg S, Castro L, et al. Colonization and biofilm formation of the extremely acidophilic archaeon *Ferroplasma acidiphilum*. *Hydrometallurgy*, 2014, 150: 245-52
- [46] Okshevsky M, Meyer RL. Evaluation of fluorescent stains for visualizing extracellular DNA in biofilms. *J Microbiol Meth*, 2014, 105: 102-4
- [47] Sena-Vélez M, Redondo C, Graham JH, et al. Presence of extracellular DNA during biofilm formation by *Xanthomonas citri* subsp. *citri* strains with different host range. *PLoS One*, 2016, 11: e0156695