

文章编号: 1001-498(2001)04-0446-09

# 生物冰核研究与应用的现状和前景

晁龙军, 吕全, 贾秀珍, 曾大鹏

(中国林业科学研究院 森林生态环境与保护研究所, 北京 100091)

**摘要:** 引起水由液态变为固态的物质称为冰核或成核剂, 冰核是多种多样的, 可为无机物、有机物等非生物, 也可是生物, 目前已发现 4 属 23 种或变种的细菌、4 属 11 种或变种的真菌和一种病毒具成冰活性。细菌冰核是一类蛋白质, 称冰蛋白, 由细菌冰核基因编码, 已有 11 种冰核细菌的冰核基因被克隆并在大肠杆菌中得到表达, 冰核基因编码的冰蛋白成冰活性比较弱, 冰蛋白通过脂、碳水化合物等共价修饰装配成成冰活性较强的冰核。真菌冰核也可能是蛋白质, 其与细菌冰核在特性上有许多差异。影响细菌冰核成冰活性的因素较多, 主要有菌液浓度、培养基的组成、培养温度和 pH 值等。生物冰核是引起和加重植物霜害和冻害的重要因子, 并与弱寄生真菌引起的植物病害有重要的联系, 通过防除冰核生物减少霜害和冻害的发生、控制病害的发展, 在某些方面已得到显著效果。生物冰核是一类重要的资源, 已成功地应用于人工降雪、制冷和高敏检测, 在促冻杀虫方面也有广阔的应用前景。

**关键词:** 细菌冰核; 真菌冰核; 生物冰核; 冰核细菌

**中图分类号:** S718.8      **文献标识码:** A

1972 年秋, Fresh R<sup>[1]</sup> 从腐烂的薄叶桤木(*Alnus tenuifolia* Nutt.) 叶上分离到一种冰核活性强(-2.5 ~ -5 °C) 的细菌(编号为 C-9), 鉴定属于 *Pseudomonas*, 1974 年, Maki L R 等<sup>[2]</sup> 也从腐烂的薄叶桤木叶片上分离到冰核活性细菌(Ice nucleation active bacteria, 简称 INA 细菌), 鉴定为丁香假单胞菌(*Pseudomonas syringae* van Hall), 1978 年 Lindow S E<sup>[3]</sup> 又证明草生欧文氏菌[*Erwinia herbicola* (Geiling) Dye] 是一种 INA 细菌。自此, 生物冰核尤其是 INA 细菌引起许多国家不同科学家的兴趣, 并深入开展了基础理论和应用研究, 在生物冰核的种类、影响成冰活性的因素、冰核细菌分子生物学及其应用等方面取得了较大的进展。我国从 1986 年起开展 INA 细菌的研究, 明确了我国生物冰核的种类和优势种, 在冰核细菌分子生物学和应用方面也做了积极探索<sup>[4]</sup>。在林业方面, 冰核生物的研究起步晚, 1994 年曾大鹏等<sup>[5]</sup> 首先从北方杨树(*Populus* spp.) 上分离到大量 INA 细菌, 后来, 朴春根等<sup>[6]</sup> 报道了 INA 细菌造成杨树冻害的室内研究结果, 赵廷昌等<sup>[7]</sup> 鉴定了杨树 INA 细菌的主要种类, 项存悌等<sup>[8]</sup> 将杨树细菌性肿茎溃疡(*Erw. herbicola*) 更名为杨树冰核细菌溃疡病。近来, 作者在 INA 细菌与植物病害、影响冰核活性的因素和发酵技术方面作了一定研究, 现将生物冰核的国内外研究资料综述如下。

收稿日期: 2000-01-03

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(39570592)

作者简介: 晁龙军(1970-), 男, 山东菏泽人, 助理研究员, 硕士。

# 1 冰核生物的种类和来源

到目前为止, 已发现 4 个属 23 个种或变种的细菌、4 个属 11 种或变种的真菌和 1 种病毒<sup>[5]</sup> (BYDV) 具冰核活性。

INA 细菌来源多、分布广, 从小麦 (*Triticum* spp.)、白菜 [*Brassica pekinensis* (Lour.) Rupr.]、黄瓜 (*Cucumis sativus* Linn.)、胡麻 (*Sesamum indicum* L.)、大豆 [*Glycine max* (Linn.) Merr.]、苹果 (*Malus pumila* Mill.)、林蛙 (*Rana altaica* Kastschenko)、菱纹背蛾 (*Plutella xylostella* L.)、瓢虫 (*Hippodamia convergens* Guerin-Meneville) 等多种动植物上分离到冰核细菌。其中, *Ps. syringae* 是分布最广和冰核活性最强的 INA 细菌之一, 此菌在世界的不同地区的许多植物上都有分布, 它的许多菌株在 -2 ℃ 左右就能形成冰核。我国已从 17 个省、市、区的 68 种植物上分离到 250 株 INA 细菌, 鉴定属于 3 个属 17 个种或变种, 其中国内外首次记录的有 6 个种, 我国 INA 细菌的优势种为 *Erw. ananas* (Serrano) Mergaert et al. 和 *Ps. syringae*<sup>[4]</sup>。

冰核真菌 (INA 真菌) 的发现较晚, 1988 年 Kieft<sup>[9]</sup> 首次报道红脐鳞菌 (*Rhizoplaea chrysoleuca*) 在 -1.9 ℃ 具有冰核活性, 此后研究者又从昆虫、植物体及土壤中分离到多种 INA 真菌, 除 3 种为地衣真菌外, 其余 8 种均属镰刀菌属 (*Fusarium*)。我国已分离和收集到 6 个在 -5 ℃ 具冰核活性的真菌菌株, 其中禾赤色镰刀菌 (*F. graminearum* Schwabe) F9502 菌株的活性最强、最稳定, 结冰点为 -2.7 ℃<sup>[10]</sup>。

## 2 细菌冰核

### 2.1 冰核基因

大量研究表明细菌冰核的表现型是由冰核基因决定的, 该基因的缺失导致冰核活性的完全丧失, 冰核基因较小, 长度在 4.0 ~ 7.5 kb 左右, 有高度的重复性, 由一系列的 24、48、144 个核苷酸重复单位组成, 这一有规律的重复可能是将水分子排列成冰网格 (ice lattice) 而发生冰核作用的原因<sup>[11, 12]</sup>。目前已有 10 种 INA 细菌菌株的冰核活性基因 [*Erw. ananas* (*inaA*)<sup>[13]</sup>, *Erw. herbicola* (*iceE*, *unnamde*)<sup>[14]</sup>, *Erw. uredovora* (Pon et al.) Dye (*inaU*)<sup>[15]</sup>, *Ps. fluorescens* (Trevisaqn) Migula (*inaW*)<sup>[16]</sup>, *Ps. syringae* (*inaZ*, *inaV*, *iceC*)<sup>[11]</sup>, *Ps. viridiflava* (Burkholder) Clara (*inaC*)<sup>[17]</sup>, *X. campestris* (Pammel) Dowson (*inaW*)<sup>[18]</sup> 被克隆并在大肠杆菌 [*Escherichia coli* (Migula) Castellani et Chalmers] 中得到表达, 且有的冰核基因 (*inaZ*) 已成功地被克隆到植物 [烟草 (*Nicotiana tabacum* L.) 和 *Solanum commersonii*] 中并得到表达<sup>[19]</sup>。

### 2.2 冰核的组分和结构

冰核活性不同, 其冰核的大小也不一样。比较强的冰核具有一个较大的尺寸, 用  $\gamma$  射线研究表明, -12 ℃ 才有活性的冰核其大小在 150 KD 左右, -2 ℃ 有活性的冰核, 其大小在 19 000 KD 左右<sup>[20]</sup>。而一个冰核蛋白单体的大小约为 120 KD, 因此, 冰核基因编码的冰蛋白要经过修饰、组装, 形成复合物, 才可能有强的冰核活性。细菌冰核相对其冰核活性的 3 种类型: 类型 (-4.5 ℃ 以上)、类型 (-4.8 ~ -5.7 ℃) 和类型 (-7.6 ℃ 以下), 有三级结构 (A 级、B 级和 C 级), C 级结构是冰核基因的产品: 蛋白, C 级结构通过脂、碳水化合物等共价修饰

装配成 B 级,再装配成 A 级。A 级结构冰核是活性最强的冰核,其可能由 3 种组成成分构成,一种是冰蛋白,一种为碳水化合物<sup>[21]</sup>,可能为葡萄糖苷或甘露糖苷;另一种为磷酸脂<sup>[22]</sup>。Kozoloff<sup>[23]</sup>在自己试验和总结前人研究的基础上,提出 C B A 级冰核结构形成的模型。

### 2.3 冰蛋白

如前所述,A 型和 B 型冰核除含蛋白外,还含有糖和脂,尤其是 A 型冰核,其可能是一种脂糖蛋白复合体,这种复合体具强的冰核活性,是一种最有效的冰核。脂和糖的缺失,冰核活性会明显降低<sup>[24,25]</sup>。因此,要获得具有高活性的冰核,在提取冰蛋白的过程中,不能破坏冰核的组分:蛋白、脂和糖。另外,冰核的几个组分通过组装形成一个基本的结构,破坏其基本结构,也导致冰核活性的降低<sup>[26]</sup>。

冰蛋白是冰核结构的核。冰蛋白还没有以冰核活性的形式被充分纯化,像其它蛋白一样,许多冰蛋白的研究是推测性的和基于从编码基因序列推导出的结构。每个冰蛋白序列包含一个非重复的 N-端,约 161~203 个残基,一个重复的核心,约 960~1296 个残基,和一个非重复的 C-端,约 41~68 个残基<sup>[14]</sup>。重复性的部分由含 8 或 16 个残基单位组成,其周期性在整个蛋白中不被破坏,48 个残基单位在大多重复性部位存在,其周期性在 InaZ、InaW 和 InaV 中有 1 处被破坏,在 InaA 中有 3 处被破坏<sup>[27]</sup>。

通过缺失突变证明,N-端和 C-端对较强活性的冰核都是必需的,但 N-端结构对 A 型和 B 型冰核是绝对不可缺少的,原因是 N-端缺失,A 型和 B 型及 B-C 型中间体的冰核活性丧失,只剩下部分 C 型冰核。

### 2.4 影响冰核活性的因素

并不是属于 INA 细菌种类的所有菌株都具有冰核活性,实际上,大多种类的多数菌株不具冰核活性,即使是同一 INA 细菌的菌株,在一般情况下,也不是所有的细菌细胞都表现冰核活性<sup>[28]</sup>,如 *Ps. syringae* 的许多菌株根本无冰核活性,有冰核活性的菌株,冰核活性强弱也有差异。影响细菌冰核活性的因素主要有:菌液浓度、培养基组成、培养温度、生长阶段和 pH 等。

2.4.1 菌液浓度 温度为 -2~-7 ℃,菌液浓度在  $5 \times 10^2 \sim 5.4 \times 10^9$  cells · mL<sup>-1</sup> 范围内,成冰活性随菌液浓度的提高而增强,随温度的升高而降低,当温度一定时,菌液浓度大则成冰活性强,当浓度大于  $10^8$  cells · mL<sup>-1</sup> 时成冰活性达到饱和<sup>[29]</sup>。

2.4.2 培养基 培养基的种类和组分对 INA 细菌的成冰活性有较明显的影响。培养基中含有甘油或蔗糖组分时,会提高细菌的成冰活性<sup>[29]</sup>。作为细菌生长的 C 源最利于 A 型冰核诱导的为山梨醇(sorbitol),其次为甘露醇(mannitol)、半乳糖(galactose)和柠檬酸(citrate)<sup>[30]</sup>。培养基中的一些组分和没有被完全利用的一些营养对细菌冰核活性可能有抑制作用<sup>[31]</sup>。N 源和一些微量元素是细菌生长必需的,但当细菌旺盛生长结束进入稳定生长期时,N、P、S、Fe 和 N 与 P 联合缺乏能诱导高的冰核活性,尤其是低 N 和低 P 水平能最有效的诱导 A 型冰核的表达。如用化学合成培养基,通过化学计算限定培养基中 N 源的量,用这种方法获得的最大冰核率(-5 ℃)达 0.1~1.0。而作者的研究发现,无机 N 没有有机 N 利于丁香假单胞细菌生长,所以 INA 细菌发酵必须解决产量和活性之间的矛盾,以便在高产量的条件下又保持高的冰核活性,这种矛盾可通过流加发酵的途径来解决。

2.4.3 生长阶段 一般 INA 细菌的冰核活性在细菌的对数生长后期和稳定生长前期冰核活性最大<sup>[32]</sup>,如 *Ps. syringae* 冰核活性随细菌培养时间的延长而增加,直到细菌的生长达到稳定

生长阶段,冰核活性达到最大,INA 细菌生长至稳定阶段以后,随培养时间的延长,A型和B型冰核活性降低,而C型冰核活性变化不大,这可能是细菌内源的蛋白裂解酶降解冰蛋白造成的。不过也有例外,如*Ps. fluorescens*随培养时间的延长,冰核活性变化不大,冰核率与细菌的生长阶段没有重要的联系,可能是由于细菌的内源蛋白裂解酶的量 and 活性随时间的延长而提高,大量的冰蛋白被降解。作者在INA细菌的对数生长后期把蛋白酶抑制剂加入培养液,定期测量冰核活性,发现冰核活性与对照无差别,所以关于冰核活性降低的原因还要进一步研究。

2.4.4 培养温度 细菌的最适生长温度一般在28℃左右,但高温对冰核活性有较大的影响,研究表明,温度超过25℃时,随温度的升高INA细菌冰核活性逐渐丧失。INA细菌液在4℃保存20d,其冰核活性稳定不变,20~25℃保存2d后,其冰核活性开始逐渐丧失,超过25℃,随温度升高和时间的延长冰核活性加速丧失,如在37℃保存24h,其冰核活性就全部丧失。因此,INA细菌一般在20℃培养<sup>[29]</sup>。

低温诱导作用(low-temperature conditioning): Rogers JS<sup>[33]</sup>研究发现*Erw. herbicola*在30℃培养24h(此时细菌的生长处于对数生长期的后期),然后在5℃下贮存2h,冰核活性明显提高。Neumwck-Marshall M<sup>[30]</sup>指出*Ps. syringae*在30℃的条件下培养只能产生C型冰核,若在细菌的稳定生长期,把细菌低温(14~18℃)处理30min,能诱导A型冰核的出现,若低温处理是在细菌的对数生长期,无此现象发生,并认为当低温信号出现后,一套低温基因和冰核基因在变速箱式启动子(gearbox-type promoter)的控制下被启动,A型冰核被装配。

A型冰核低温诱导现象的存在和发现,无疑为高产量高冰核活性的INA细菌发酵指明了途径,发酵的前期,INA细菌处于最适生长温度(一般28℃左右),使细菌的浓度在较短的时间内达到最大,然后通过低温处理,诱导冰核基因的表达,使产品具有高的冰核活性。1992年,美国已成功地利用变温发酵进行细菌冰核的生产<sup>[34]</sup>。

2.4.5 酸碱度 INA细菌生长的pH值范围为5.0~9.0,最适pH值为7.0左右。pH2~4的酸性溶液和pH10以上的碱性溶液对细菌冰核都有破坏作用<sup>[35]</sup>。INA细菌在生长的过程中,有的产碱,有的产酸,因此,在发酵的过程中,必须控制发酵液的pH值。

2.4.6 其它因子 除以上因子外,许多化学制剂对冰核活性也有不同程度的破坏和增强作用,如铜类、硫类、尿类、重金属离子和生物素等都不同程度地破坏细菌冰核成冰活性,而Mn<sup>2+</sup><sup>[23]</sup>、myo-inositol和丝裂霉素C<sup>[35]</sup>等能成倍地提高细菌冰核的成冰活性,但对不同菌种和菌株冰核活性的影响有差异,作者研究发现Mn<sup>2+</sup>和丝裂霉素C不能提高*Ps. syringae* C9401菌株的冰核活性。

### 3 真菌冰核

真菌冰核可能也是蛋白质,例如地衣真菌冰核经链酶蛋白酶、木瓜蛋白酶处理后冰核活性显著降低,蛋白变性剂如盐酸胍和脲可以使其丧失活性<sup>[36]</sup>,这些都说明地衣真菌冰核的主要成分可能是蛋白质。

同细菌冰核相比,真菌冰核有一些独特的性质,首先表现在耐热性上,如地衣冰核60℃处理后仍有冰核活性,这可能与地衣生长的环境条件有关,细菌冰核不耐热,40℃下活性很快就丧失;第二,地衣冰核在很宽的pH范围内活性稳定,Kieft<sup>[37]</sup>发现红脐鳞菌冰核提取物的结

冰点在 pH 2~11 的范围内保持稳定,这一特性真菌冰核中不带电荷的氨基酸所占的比例较高,而细菌冰核在 pH 4 以下和 pH 9 以上的条件下活性就丧失或极大地削弱;第三,真菌和细菌冰核的最大差异在对脂类物质的需求上,细菌冰核的成冰活性需脂类物质的参与,而地衣真菌冰核用氯仿去脂后,冰核活性仍较高,另外,巯基和碳水化合物可能不直接参与地衣真菌冰核的组成或与其活性的表达无关。真菌冰核的这些特性为其应用提供了广阔的前景,如真菌冰核热稳定性好,这使其冰核产品易于储藏、货架寿命长,活性发挥不需脂类、糖类和巯基基团的参与,尤其适于在食品行业和免疫学上的应用。不过,关于真菌冰核的基础理论和应用研究资料较少,在许多方面还是空白,如遗传学、食品冷藏保鲜、高敏检测和报告基因等,但由于真菌冰核的独特性和应用上的优点,真菌冰核的研究可能将成为以后生物冰核研究的热点。

## 4 冰核生物与植物霜冻和病害

70 年代初,美国玉米发生大面积的冻害,Lindow S E<sup>[3]</sup> 研究发现是由于 *Erw. herbicola* 的存在提高了玉米的霜冻敏感性所致。后来,许多研究者<sup>[38,39]</sup> 通过人工模拟霜箱和自然诱发霜冻等方法都充分证明 INA 细菌是诱发和加重植物霜冻的重要因素。这为防除 INA 细菌从而减轻植物霜冻提供了科学依据。近年来对与控制 INA 细菌的成霜冻作用进行了一些有益的探索,筛选或研制杀菌剂、抗菌剂、抑制剂、拮抗菌和基因工程菌来减轻或控制植物霜冻,取得了成效。如 Lindow 等<sup>[40]</sup> 获得了一个缺失了冰核基因的丁香假单胞菌突变株用于防霜试验取得了良好的效果。Kozoloff<sup>[41]</sup> 分离到对 *Erw. herbicola* 的特异噬菌体用于防治 INA 细菌进而防霜,使霜害减轻了 40%~50%。

曾大鹏等<sup>[42]</sup> 研究发现我国东北三省的杨树上普遍存在 INA 细菌,且 INA 细菌加重了杨树的冻害;冻害发生的主要时期是在早春杨树萌芽阶段,此时杨树已解除休眠,抗冻性差,在遇到晚霜的条件下,INA 细菌在杨树干部造成冻伤或死芽。接种试验证明 INA 细菌引起的冻害增加了聚生小穴壳菌(*Dothiorella gregaria* Sacc.) 的侵染,形成大斑型溃疡斑。这为杨树真菌性溃疡病的防治提供了新途径和科学依据。许多 INA 细菌也是病原菌(如 *Ps. viridiflava*、*Ps. syringae* pv. *coronafaciens*、*Erw. ananas* 等),是否冻害的发生为细菌的侵染和加重病害的发生提供了条件和可能,这是值得研究的问题。也许能为病害的防治时期的确定提供新的科学依据和提供新的防治途径。

## 5 生物冰核的应用

生物冰核的发现和研究的意义是生物冰核是一种有广泛作用的资源。生物冰核的研究已从 INA 细菌的种类、与植物霜害冻害的关系的研究转向冰核资源的开发与应用,主要表现在以下几个方面。

### 5.1 人工降雪

1980 年, Woerpel M D 用冰核细菌研制成冰蛋白人工降雪催化剂,于 1980 年在美国申请专利<sup>[43]</sup>,1985 年由美国的 Advanced Genetic Sciences Co. 生产了商品名为 Snomax<sup>®</sup> 的冰蛋白人工降雪催化剂,1985 年首先在美国 18 个滑雪场中使用,获得巨大成功。

### 5.2 食品浓缩

冰核细菌应用于食品冷冻浓缩中,可在零下较高的温度迅速促进冰晶的生成,形成较大尺

寸的冰晶,使结晶所需能源的成本和分离操作所需的费用降低,又可使溶质损失减少,大大降低了生产成本,而且浓缩产品的质量非常好。冰核细菌及其胞外冰核应用于食品冷冻浓缩、冷冻干燥和冷冻结构中已有一些报道<sup>[44,45]</sup>。

我国正在进行 INA 细菌发酵工艺和冰蛋白降雪催化剂的研制,作者已研究成功 INA 细菌的发酵工艺,但还有一些技术正在研究之中。

### 5.3 促冻杀虫

1990年 Strong-Gunderson 等<sup>[46]</sup>用 INA 细菌饲养昆虫,发现 INA 细菌能提高昆虫的结冰温度。Lee 等<sup>[47]</sup>用 INA 细菌饲养谷蠹(*Rhizopertha dominica* Fabricius)和拟谷盗(*Tribolium* spp.),孙福在<sup>[48,49]</sup>用 INA 细菌饲养光肩星天牛[*Anoplophora glabripennis* (Motschulsky)]和棉铃虫[*Heliothis armigera* (Hübner)],冯玉香等<sup>[50]</sup>用 INA 细菌饲养印度谷螟[*Plodia interpunctella* (Hübner)]都证明昆虫的结冰温度能提高 7~13℃。这些研究表明 INA 细菌能在虫体上起到异源冰核作用,提高过冷却点而结冰,延长了结冰时间,破坏细胞组织,造成昆虫死亡。利用 INA 细菌促冻杀虫,提高害虫越冬死亡率,减轻下一年危害,为控制害虫危害提供了一条生防新途径。这在理论上是可行的,但在实际应用上存在着一些问题,影响生物冰核成冰活性的因素较多,如温度、紫外线、金属离子等,致使冰核活性丧失快,有效期短,而防治田间越冬害虫必须在越冬前害虫取食期喷洒冰核生物,再等低温天气的到来,约间隔 30 d 以上,此时冰核活性已基本丧失,难以起到促冻杀虫的作用。再者,细菌冰核不能在害虫体内定殖,易排泄到体外。

### 5.4 冰核基因的应用

利用冰核活性检测方便、灵敏等优点,冰核基因作为报道基因和高敏检测手段已得到成功的应用。如首先将成冰核基因整合到沙门氏菌(*Salmonella* spp.)特异性的噬菌体中,然后将噬菌体加到待测的蛋、乳、肉类、其它食品和水,培养后测冰核活性。如用细菌冰核基因转导的噬菌体检测蛋、乳、肉类、其它食品和水对人和动物致病的沙门氏菌,利用这种方法可检测到  $10^7$  个杂菌中或 1 mL 水中含 10 个沙门氏菌,成功率高,且操作远比现行方法快速,从耗时 5~6 d 减为 2~6 h<sup>[12]</sup>。Lindgren<sup>[51]</sup>利用 InaZ 作报道基因研究 *Ps. pv. phaseodocola* 的诱变致病性基因,认为 InaZ 熔合系统为研究细菌的基因表达,特别是在植物发病期内提供了一种灵敏、方便的工具。我国正在进行冰核基因克隆的研究,在冰核基因的应用方面远远落后于国外。

## 6 展望

自 70 年代生物冰核发现以来,美国、日本和加拿大等 30 多个国家对其进行了研究,召开了 7 次国际生物冰核研讨会,在生物冰核的种类、影响成冰活性的因素、冰核基因、冰蛋白以及生物冰核与植物霜冻和病害、生物冰核的应用等方面取得了较大进展,但还有一些问题需要进一步研究和突破。第一,目前所发现的冰核生物主要是从植物上分离到的,从昆虫等动物体上分离到的较少,是否从昆虫体表或体内也有大量的生物冰核,从目前的研究看,这是可能的,加强此方面的研究,将为促冻杀虫提供理论依据和应用基础;第二,生物冰核成冰位点的结构、定位及组成、冰蛋白的结构和功能等方面的测定和研究将是以后生物冰核基础理论研究的重点之一;第三,真菌冰核的基础理论和应用研究资料较少,在许多方面还是空白,如遗传学、食品

冷藏保鲜、高敏检测和报告基因等,由于真菌冰核的独特性和应用上的优点,其研究可能会是以后生物冰核研究的热点之一;第四,生物冰核是重要的资源,有广阔的应用前景,目前的开发和应用还远远不够,所以其应用基础和应用技术将继续是研究的热点,如食品冷冻浓缩和促冻杀虫等。

我国生物冰核的研究较晚,在生物冰核的基础理论和应用研究上远远落后于美国、日本等国家,如生物冰核分子生物学、冰核细菌的发酵工艺、冰核细菌的浓缩和干燥技术,生物冰核在降雪和制冷方面的应用技术、在食品冷冻浓缩中的应用技术等,这些方面的研究不足,严重限制了我国生物冰核资源的开发和应用。

## 参考文献:

- [1] Fresh R W. Ice nucleation produced by a *Pseudomonas* isolate, Strain C-9[D]. Laramie: University of Wyoming, 1972.
- [2] Maki L R, Galyan E L, Chang-Chien M M, et al. Ice nucleation induced by *Pseudomonas syringae*[J]. Appl Microbiol, 1974, 28: 456 ~ 459.
- [3] Lindow S E, Arny D C, Upper C D. *Erwinia herbicola*: a bacterial ice nucleus active in increasing frost injury to corn [J]. Phytopathology, 1978, 68: 523 ~ 527.
- [4] 孙福在. 我国生物冰核研究进展[J]. 中国农业科学, 1996, 29(5): 62 ~ 67.
- [5] 曾大鹏, 张永祥, 晁龙军, 等. 北方杨树上冰核活性细菌的研究[J]. 林业科学研究, 1994, 7(5): 488 ~ 491.
- [6] 朴春根, 晁龙军, 曾大鹏, 等. 冰核活性细菌引致杨树冻伤的初步研究[J]. 林业科学研究, 1996, 9(专刊): 15 ~ 18.
- [7] 赵廷昌, 孙福在, 张文蔚, 等. 北方杨树上冰核细菌种类鉴定及其引致杨树冻伤的初步研究[A]. 植物病害研究与防治[C]. 北京: 中国农业科技出版社, 1998. 141 ~ 145.
- [8] 项存悌, 宋富强, 原树忠, 等. 杨树冰核细菌溃疡病发病主导因素的研究[A]. 全国阔叶树病害学术讨论会论文集[C]. 南京: 南京林业大学, 1999.
- [9] Kieft T L. Ice nucleation activity in lichens[J]. App Environ Microbiol, 1988, 54: 1678 ~ 1681.
- [10] 孙福在, 赵廷昌, 张敏, 等. 冰核真菌的冰核活性及其种类鉴定[J]. 菌物系统, 1999, 18(2): 149 ~ 153.
- [11] Green R, Warren G. Physical and functional repetition in a bacterial ice nucleation gene[J]. Nature, 1985, 317: 645 ~ 648.
- [12] Wolber P K. Bacterial ice nucleation[J]. Adv Microbiol Physiol, 1993, 34: 203 ~ 237.
- [13] Abe K, Watabe S, Emori Y, et al. An ice nucleation active gene of *Erwinia ananas*: sequence similarity to those of *Pseudomonas* species and regions required for ice nucleation activity[R]. FEBS Lett, 1989, 258: 297 ~ 300.
- [14] Warren G, Corotto L. The consensus sequence of ice nucleation proteins from *Erwinia herbicola*, *Pseudomonas fluorescens*, and *Ps. syringae*[J]. Gene, 1989, 85: 239 ~ 242.
- [15] Michigami Y, Watabe S, Abe K, et al. Cloning and sequencing of an ice nucleation active gene of *Erwinia uredovora* [J]. Biosci Biotech Biochem, 1994, 58, 762 ~ 764.
- [16] Warren G, Corotto L, Wolber P. Conserved repeats in diverged ice nucleation structural genes from two species of *Pseudomonas*[J]. Nucl Acids Res, 1986, 14: 8047 ~ 8060.
- [17] Hasegawa Y, Saki N, Yashitome H, et al. Cloning of bacterial ice nucleation genes of *Pseudomonas viridiflava* in *Escherichia coli* [J]. J Ferment Bioeng, 1990, 70: 143 ~ 146.
- [18] Zhao J, Orser C S. Conserved repetition in the ice nucleation gene *inaX* from *Xanthomonas campestris* pv. *translucens* [J]. Mol Gen Genet, 1990, 223, 163 ~ 166.
- [19] Baertlein D A, Lindow S E, Panopoulos N J, et al. Expression of a bacterial ice nucleation gene in plants [J]. Plant Physiol, 1992, 100: 1730 ~ 1731.
- [20] Govindarajan A G, Lindow S E. Size of bacterial ice-nucleation sites measured in situ by radiation inactivation analysis [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1988, 85: 1334 ~ 1338.
- [21] Turner M A, Arellano F, Warren G J. Three separate classes of bacterial ice nucleation structures[J]. J Bacteriol,

- 1990, 172: 2521 ~ 2526.
- [ 22 ] Govindarajan A G, Lindow S E. Phospholipid requirement for expression of ice nuclei in *Pseudomonas syringae* and in vitro[J]. J Biol Chem, 1988, 263: 9333 ~ 9338.
- [ 23 ] Turner M A, Arellano F, Kozloff L M. Components of ice nucleation structures in bacteria[J]. J Bacteriol, 1991, 173: 6515 ~ 6527.
- [ 24 ] Lindow S E, Lahue E, Govindarajan A G, et al. Localization of ice nucleation activity and the iceC gene product in *Pseudomonas syringae* and *Escherichia coli*[J]. Mol Plant-Microbe Interact, 1989, 2: 262 ~ 272.
- [ 25 ] Yankofsky S A, Levin Z, Bertold T, et al. Some basic characteristics of bacterial freezing nuclei[J]. J Appl Meteorol, 1981, 20: 1013 ~ 1019.
- [ 26 ] Obata H. Culture conditions of *Erwinia uredovora* in reference to its high ice-nucleating activity of the culture supernatant[J]. Agric Biol Chem, 1990, 54: 2171 ~ 2174.
- [ 27 ] Richard E L, Gareth J W, Gusta L V. Biological ice nucleation and its applications[M]. Minnesota: The American Phytopathological Society, 1994.
- [ 28 ] Pooley L, Brown T A. Preparation of active cell-free ice nuclei from *Pseudomonas syringae* [C]. Proc R Soc Lond Ser B Biol Sci, 1990, 241: 112 ~ 115.
- [ 29 ] 孙福在, 朱红, 何礼远, 等. 影响冰核细菌成冰活性的因素研究[J]. 中国农业科学, 1991, 24(3): 57 ~ 64.
- [ 30 ] Neumwck-Marshall M, LaDuca R, Fall R. High level expression of ice nuclei in a *Pseudomonas syringae* strain is induced by nutrient limitation and temperature[J]. J Bacteriol, 1993, 175: 4062 ~ 4070.
- [ 31 ] Pooley L, Brown T A. Effects of culture conditions on expression of the ice nucleation phenotype of *Pseudomonas syringae*[R]. FEMS Microbiol Lett, 1991, 77: 2 ~ 3.
- [ 32 ] Yankofsky S A, Levin Z, Bertold T, et al. Some basic characteristics of bacterial freezing nuclei[J]. J Appl Meteorol, 1981, 20: 1013 ~ 1019.
- [ 33 ] Rogers J S, Stall R E, Burke M J. Low temperature conditioning of the ice nucleation active bacterium, *Erwinia herbicola*[J]. Cryobiology, 1987, 24: 270 ~ 279.
- [ 34 ] Lawless R J, LaDuca R J. Fermentation of microorganisms having ice nucleation activity using a temperature shift[P]. U S Patent, 1992, 5, 153, 134.
- [ 35 ] Yankofsky S A, Nadler T N, Levin Z. Induction of latent freezing nucleus capability in an ice nucleation-active bacterium[J]. Curr Microbiol, 1983, 9: 263 ~ 268.
- [ 36 ] 张敏, 孙福在, 赵廷昌. 冰核真菌成冰生物学特性研究[J]. 中国农业科学, 1998, 31(6): 50 ~ 55.
- [ 37 ] Kieft T L, Ruscetti T. Characterization of biological ice nuclei from a lichen[J]. J Bacteriol, 1990, 172: 3519 ~ 3523.
- [ 38 ] 冯玉香. 黄瓜霜冻与冰核活性细菌的关系[J]. 园艺学报, 1990, 17(3): 211 ~ 216.
- [ 39 ] 刘健华, 何维勋, 冯玉香, 等. 冰核活性细菌与玉米和大豆霜冻关系的研究[J]. 中国农业气象, 1990, 11(1): 1 ~ 6.
- [ 40 ] Lindow S E. Competitive exclusion of epiphytic bacteria by ice-mutants of *Pseudomonas syringae* [J]. Appl and Environ Microbiol, 1987, 53: 2520 ~ 2527.
- [ 41 ] Kozloff L M, Turner M A, Arellano F. Formation of bacterial membrane ice-nucleating lipoglycoprotein complexes [J]. J Bacteriology, 1991, 173(20): 6528 ~ 6536.
- [ 42 ] 曾大鹏, 晁龙军, 孙福在, 等. 杨树上的冰核细菌及其在引起杨树冻害和诱发真菌溃疡病过程中的作用[J]. 林业科学, 1999, 35(3): 53 ~ 57.
- [ 43 ] Woerpel M D. Snow making[P]. U S Patent, 1978, 4, 200, 228.
- [ 44 ] Watanabe M, Watanabe J, Kumeno K, et al. Freeze concentration of some foodstuffs using ice nucleation-active bacterial cells entrapped in calcium alginate gel[J]. Agric Biol Chem, 1989, 53: 2731 ~ 2735.
- [ 45 ] Zasytkin D V, Tung-ching L. Extracellular ice nucleators from *Pantoea ananas*: effects on freezing of model foods [J]. Journal of Food Science 1999, 64(3): 473 ~ 478.
- [ 46 ] Strong-Gunderson J M, Lee R E, Lee M R. Ingestion of ice nucleation active bacteria increases the supercooling point of the lady beetle *Hippodamia convergens*[J]. J Insect Physiol, 1990, 35: 153 ~ 157.

- [47] Lee R E, Strong-Gunderson J M, Lee M R, et al. Ice-nucleating active bacteria decrease the coldhardiness of stored grain insects[J]. J Econ Entomol, 1992, 85(2): 371 ~ 374.
- [48] 孙福在, 邢炜, 张永祥, 等. 冰核细菌对光肩星天牛幼虫促冻杀虫的初步研究[J]. 林业科学研究, 1997, 10(1): 96 ~ 99.
- [49] 朱红, 孙福在, 张永祥, 等. 冰核细菌对棉铃虫结冰温度的研究[A]. 植物病虫害生物学研究进展[C]. 北京: 中国农业科技出版社, 1995.
- [50] 冯玉香, 何维勋. 细菌冰核提高印度谷螟过冷却点的研究[J]. 昆虫学报, 1996, 39(1): 53 ~ 57.
- [51] Lindgren P B, Frederick R, Govindarajan A D, et al. An ice nucleation reporter gene system: identification of inducible pathogenicity genes in *Pseudomonas syringae* pv. *Phaseolocola*[J]. EMBO-Journal, 1989, 8(5): 1291 ~ 1301.

## Study on Biological Ice Nucleation and Its Applications ——Situation and Prospect

CHAO Long-jun, LU Quan, GIA Xiu-zhen, ZENG Da-peng

(Research Institute of Forest Ecology Environment and Protection, CAF, Beijing 100091, China)

**Abstract:** It have been proved that 4 genera 23 species or varieties bacteria, 4 genera 11 species or varieties fungi and a virus have ice nucleation activity. Bacterial ice nuclei are proteins, named ice nucleating proteins, coded by ice nucleating genes. Ice nucleating genes of 11 species bacteria have been cloned, sequenced and expressed in *Escherichia coli*. Ice nucleation activity of ice protein is very weak, ice protein is decorated and assembled into powerful active ice nucleation by lipids and carbohydrates. Fungal ice nuclei are possibly protein, it differs from bacterial ice nuclei in some basic characteristics. Bacterial ice nucleation activity is influenced by some factors, such as cell consistence, growth medium composition, incubation temperature, culture age and pH value, et al. Biological ice nuclei are important factors causing and increasing plant frost and freezing injury, and inducing plant disease. Treatments that reduce the numbers or the ice nucleation activity (or both) of ice nucleation active microorganisms on plant are effective in decreasing plant frost and freezing injury, and controlling plant disease. Biological ice nuclei are significant natural resources, it have been used in man-made snow, refrigeration and diagnostic. It will be also wide prospective taking advantage of biological ice nuclei in preventing insect pests by accelerating insect body freezing.

**Key words:** bacterial ice nuclei; fungal ice nuclei; biological ice nuclei; ice nucleation active bacteria