

冰核细菌的研究

刘玉焕

(中山大学生命科学学院, 广州 510275)

摘要 菌株 256 悬液的冰核实验表明: 冰核数与菌体细胞数的比率同培养温度、培养基组成、菌龄和基因型有关. 该菌冰核活性的最适培养条件是生长在内含 5% 的甘油肉汁胨琼脂培养基上在 20~24°C 时培养 6 d 时间. 物理和化学处理对菌体的冰核活性的影响各不相同.

关键词 冰核, 冰核活性

分类号 Q 935

利用冰核形成颗粒实行人工降雨改善干旱地区的气候条件增加降雨量由来已久^[1]. 目前, 通常使用人工降雨的冰核物质有两类, 一类是无机物. 主要是 AgI^[2]. 另一类是人工合成的有机物^[3]. 以上这些冰核物质与自然产生的冰核物相比无论从经济上, 还是从环保角度都是不可取的. 自从 Schnell 和 Vali 报道大气中有一部分冰核是生物体产生以来, 人们进行了深入研究后发现, 某些细菌具有相对较高的冰核性^[4-6]. 本工作是试图研究菌株 256 发挥冰核活性的最佳条件及其冰核能力的大小.

1 材料和方法

1.1 菌种

256 号菌来源于本室自己分离的菌株.

1.2 培养基

NA (Nutrient agar) 培养基: 蛋白胨 1%, 牛肉膏 0.3%, NaCl 0.5%, 琼脂 2%, pH 7.4~7.8; NAG (Nutrient glycerol agar) 培养基: NA 培养基+ 2.5% 甘油; MB (Minimal broth) 培养基: 葡萄糖 0.1%, K₂HPO₄ 0.7%, (NH)₂SO₄ 0.1%, 柠檬酸钠 0.05%, MgSO₄·7H₂O 0.01%; MA (Minimal agar) 培养基: MB 培养基+ 琼脂; NDA (Nutrient sugar agar) 培养基: NA 培养基+ 2.5% 蔗糖.

1.3 -5°C 时菌悬液冰核活性的测定

取培养好的菌体制成菌悬液, 试验温度稳定在 (-5±0.2)°C 之间, 所测样品均置于冷库中预冷 3 h. 菌悬液的冰核活性是通过微滴结冰法测定的, 单位体积内的菌悬液的冰核活性总数 $N(T)$ 是通过下列方程计算出来

$$N(T) = - \frac{1}{V} \ln f$$

f 等于在温度 T 时未结冰部分, V 是每滴体积.

2 结果与讨论

2.1 培养基成分与培养温度对冰核活性的影响

菌株 256 采用 NAG, NA, MA, MB 培养基, 分别在不同温度条件下培养 1 d, 液体培养基在摇床上振荡培养, 观察结果, 计算频率值列于表 1 中, 结果表明: 冰核菌生长受多种因素影响. 在 28°C 和 32°C 时菌体生长比 16°C 时要好, 但其冰核活性要低得多. 当 NA 中添加甘油时, 冰核频率明显提高. 固体培养基比液体培养基冰核频率要高, 可能是由于生长导致 pH 下降有关. 由此可见, 菌体生长与冰核活性所要求的条件并不一致, 冰核菌的冰核活性可能对温度敏感, 当温度超出一定范围, 冰核活性明显下降.

表 1 不同培养条件对 256 菌株冰核活性影响

生长条件		冰核频率	每个冰核所需的细胞
培养基	温度/°C		
NAG	16	1.06×10^{-2}	94
NA	16	2.05×10^{-4}	4 873
NA	32	7.7×10^{-5}	13 000
MA	28	1.2×10^{-4}	8 500
MB	28	1.96×10^{-6}	510 000

2.2 生长温度与菌龄对冰核活性影响

图 1 表明: 生长在 24°C 时 3 d 时间的冰核活性是生长在 32°C 时 3 d 时间的近 10^5 倍. 生长在 24 h 的冰核活性是生长在 12 h 的 10^5 倍, 但生长在 20~ 24°C 时, 冰核活性相差无几. 同时菌龄也对冰核活性有明显影响. 生长在 24°C 时菌龄从 1 d 到 3 d, 培养物的冰核活性提高 8 倍, 从 3 d 到 6 d 提高 7 倍, 6 d 以后活性开始下降.

2.3 最佳培养基的选择

从表 1 或可以看出, 不同培养基对冰核活性有较大影响, 考虑到菌体生长情况, 我们采用 NAG, NDA, NA 三种培养基作对比性试验, 结果见图 2. NAG 和 NDA 培养基差别不大, 出现冰核活性温度分别 - 2.3°C 和 - 2.4°C, NA 培养基则为 - 4.2°C. 因此, 对 256 号菌种来说, NAG 是最好培养基.

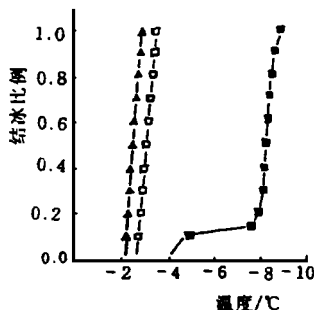
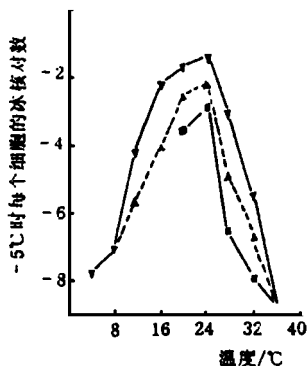


图 1 256 号菌的生长温度与时间对冰核活性影响

图 2 培养基组成 256 菌的冰核活性影响

▼-▼-▼- 6d ▲-▲-▲- 3d ■-■-■- 1d ▲-▲-▲- NAG □-□-□- NDA ■-■-■- NA

2.4 培养基中甘油作碳源的最佳配比

综合 NAG, NDA, NA, MA, MB 培养基的试验结果, 可以发现甘油对冰核活性的影响. 因为碳源是培养基中的主要组成成分, 对冰核菌的冰核活性有重要影响. 因此, 试验用不同含量的甘油加入培养基中测定冰核活性. 图 3 表明随着甘油含量增加到 5%, 冰核活性不再增加.

2.5 不同 pH 的影响

任何细菌的生长都有一个 pH 范围, 太高或太低对生长都不利, 相应地也会对菌体的冰核活性产生影响. 图 4 表明, 生长在 pH 7~8 之间时, 菌株 256 的冰核活性最高, 在高于 pH 8 或低于 pH 6 时, 其生长情况和冰核活性都受到影响, 可能是因为生长受到抑制而导致冰核活性下降, 尤其是在 pH 5.5 时, 随着 pH 降低, 冰核活性的降幅更大.

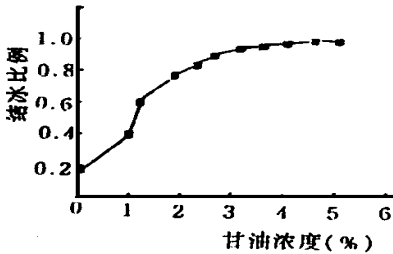


图 3 甘油对 256 菌株的冰核活性影响

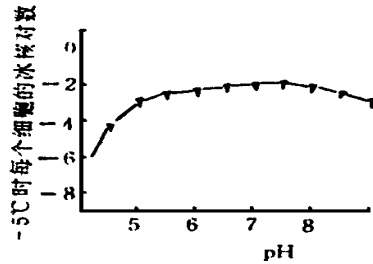


图 4 生长 pH 对冰核活性影响

2.6 理化因素对冰核活性的影响

为了进一步了解冰核活性菌的特点, 掌握冰核菌的活动规律, 让其冰核活性以最佳状态发挥出来. 参考 Vali 等人的方法, 对一些理化因子作了如下试验. 从表 2 中可以看出, 通过加热、超声波破碎细胞使该菌在 -5°C 时失去冰核活性. 通过膜过滤和离心处理, 冰核活性只存在于膜上和离心沉淀物中, 而滤液和上清液在 -5°C 时不具有冰核活性. 因此, 菌体冰核活性与细胞的完整性有关. 进一步试验表明菌体冰核活性物质可能存在于细胞壁上. 因为象结晶紫、美兰等染料之类的大分子物质通过与细胞壁结合, 破坏了冰核菌的冰核活性. 但是象刚果红这类染料因不与细胞壁结合, 所以并未损害冰核活性. 同样象青霉素等抗生素类物质, 在细胞生长过程中, 能抑制细胞壁合成, 但是对未生长繁殖细胞并不影响细胞壁合成, 所以也不影响冰核菌的冰核活性.

2.7 冰核菌的结冰试验

将菌株 256 和对照 A° S1° 1238 *Escherichia coli* 按要求配制成一定浓度进行试验. 从表 3 中可以看出: 对 10 mL 的 256 号菌悬液三个稀释度与自来水相比, 完全结冰比自来水分别快 58 min, 51 min, 和 46 min. 而 10 mL 的 A° S1° 1238 菌悬液比自来水仅快 11 min. 因此, A° S1° 1238 菌悬液在水结冰过程中只起到普通物质的颗粒作用, 由此可见并不是任何细菌都有冰核活性. 但菌株 256 悬液对水结冰确实起到的催化作用.

综上所述: 初步确定菌株 256 冰核活性菌发挥冰核活性的最佳条件, 并探讨了一些影响冰核活性的因素, 结冰试验表明利用菌株 256 冰核菌进行大量制冰可能是一条崭新的节省能源的路子.

表 2 一些理化因子对 256 菌株冰核活性的影响

处 理 方 式	超声波处理		离心处理		过滤处理			其它因素处理						
	对照	超声波处理	对照	离心沉淀	离心上清液	对照	滤液	膜上沉淀物	对照	青霉素处理	热处理	结晶紫处理	美兰处理	刚果红处理
每个冰核所需的菌数	197.5	17702	232	289	> 10 ⁷	227	> 10 ⁷	341	234	353	> 10 ⁷	> 10 ⁷	83736	297

表 3 冰核活性的结冰试验

项 目	菌悬液浓度 个 /mL	10 mL菌悬液完全 结冰时间 (min)	30 mL菌悬液完全 结冰时间 (min)
256菌株	10 ⁷	91	138
	10 ⁶	98	147
	10 ⁵	103	150
A° S1° 1238	10 ⁷	138	207
自来水	-	149	230

参 考 文 献

- 1 Battan L J inc Harvesting the clouds. Advances in Weathermodification. New York Doubleday and Co, Garden city. 1969
- 2 Cadle R D. Particles in the atmosphere and space. New York Reinhold publishing Corp. 1966
- 3 Head R A. Steroids as ice nucleators. Nature (London), 1961, 191: 1058- 1059
- 4 Lindow S E, Army D C, Upper C S. Erwinia herbi colá An active ice nucleus incites frost damage to Maize. phytopathology, 1978, 68: 523- 527
- 5 Lindow S E. Bacterial ice nuclei as incitants of warm temperature frost damage. Am phytopathol Soc Proc, 3: 224
- 6 Lindow S E. Increased frost Sensitivity of maize in the presence of pseudomonas syringae. Proc Am Phytopathol Soc. 2: 57 (Abstr)

Studies on Ice Nucleation Activity of a Bacterium

Liu Yuhuan*

Abstracts Ice nucleation test of bacterial suspension of Erwinia sp strain 256 indicated the ratio between of the number of ice nuclei and number of bacterial cells in a culture was found to vary with incubation temperature, growth medium and composition, culture age. optimal condition for ice- nucleus production of ice nucleus bacterium included: incubation of the bacterial cells at 20~ 24°C on nutrient agar containing 3% glycerol by 6 days. physical and chemical agents have different effect on ice nucleation activity

Keywords ice nucleus, ice nucleation activity

* School of Life Sciences, Zhongshan University, Guangzhou 510275