

## 冰核细菌的分离和鉴定<sup>\*</sup>

刘玉焕

(中山大学生命科学学院, 广州 510275)

**摘要** 于不同季节采集样品 181 种, 分离获得 375 株细菌并采用经 Lindow 修改的方法进行冰核活性测定, 结果有 20 株活性较高, 并对其活性最高的 256 号菌株进行分类鉴定, 归类为欧文氏菌的草生群。

**关键词** 冰核活性, 冰核细菌

**分类号** Q 93. 331

早在 1972 年, 随着 Schnell 和 Vali 报道大气中有一部分冰核是生物体产生以来, 人们对大气中生物产生冰核现象产生了极大的兴趣<sup>[1-3]</sup>。霜冻损害是植物一种非常严重的非生物损害。通过深入研究, 人们认识到附生在霜冻敏感植物上的某些细菌可以诱导异质冰核形成。因此, 人们研究冰核菌, 一方面是想办法采取措施抑制冰核菌的霜冻损害, 提高农业产量。另一方面是想利用它的冰核活性, 实现高效安全经济的人工降雨。本工作是在研究冰核菌在广东地区植物中分布的同时, 从中分离出 1 株冰核活性较高的菌株, 并对它进行分类鉴定。

### 1 材料和方法

- 1.1 菌种来源 广东地区于不同季节采集的植物花样中分离筛选出来的。
- 1.2 培养基 蛋白胨 1%, 牛肉膏 0.3%, NaCl 0.5%, 甘油 2.5%, 琼脂 2%, pH7.4~7.8。
- 1.3 菌种的分离与纯化 用已消毒的镊子从植物上取花样, 放入盛有 3 mL 已灭菌的内含 0.1% 蛋白胨的磷酸缓冲液中 (12.5 mmol/L pH7.2), 制成菌悬液于培养基划线分离, 挑取有代表性菌落进一步纯化, 移接斜面, 编号保存。
- 1.4 冰核活性的测定 ① 冰核活性测定方法: 在一个大型冷库中放置一个微型冷热半导体两用箱中进行了。这样通过双层控制可使测定的温度误差范围保持在实验允许范围 ( $\pm 0.1^{\circ}\text{C}$ ) 内。两用箱内盛有 2 L 的酒精和水 (1:1) 的混合液, 液体中放有一个支持测定点样铝板的长方体铁块 (18 cm $\times$  10 cm $\times$  3 cm)。试验之前, 在铝板上面涂上一层 (4 mm) 含有二甲苯的石蜡油, 置 55 $^{\circ}\text{C}$  烘箱中, 将二甲苯挥发掉, 这样石蜡就均匀地涂在铝板上面, 然后平放在长方体铁块上面。先将冷库的温度控制在 0.3 $^{\circ}\text{C}$  左右, 最后将两用箱的温度调节到试验所需的温度。② -5 $^{\circ}\text{C}$  时菌悬液的冰核活性定量测定: 经 Lindow 修改而成, 每种样品取样 40 滴, 观察在 2 min 内结冰的滴数。单位体积内菌悬液的冰核活性总数  $N(T)$ , 是通过下列方程计算出来<sup>[2]</sup>。

\* 收稿日期: 1995-11-06 刘玉焕, 男, 32 岁, 讲师

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

其中,  $f$  是在温度  $T$  时未结冰部分,  $v$  是每滴体积.

1.5 冰核活性菌的鉴定 筛选出的高活性菌株采用文献 [4] 的方法进行鉴定.

## 2 结果与讨论

2.1 冰核活性菌的分布 于不同的季节, 从广东省的不同地点进行采样, 在 181 种植物花样品中分离并纯化 375 个菌株, 且进行了冰核活性测定. 从冰核活性菌的分布看, 本研究所采集的大量植物样本中都有冰核菌存在, 根据分离得到的细菌菌落形态来看为草生欧文氏菌和假单胞菌类, 其中, 65% 为圆形, 边缘整齐, 黄色菌落, 并产淡蓝色色素. 其余为圆形, 边缘整齐, 乳白色菌落并产生蓝色荧光色素.

通过不同季节和不同地区的采样分析表明, 冰核菌在季节上的分布有明显区别. 最高的是在植物发芽与开花的凉爽与湿润的春季, 其冰核菌约占总菌数的 20% 左右. 其中象菊科、玄参科等植物中冰核菌所占比例在某些植物中达 60%. 因此, 冰核微生物作为植物的一种附生生物, 几乎到处都存在, 只不过随着季节和植物种类不同存在数量上的差异. 从我们所研究的结果看, 在广东地区, 冰核菌的种类以草生欧文氏菌为主要类群.

2.2 高冰核活性菌的筛选 根据 Vali 等提出的公式  $N(T) = -\frac{1}{v} \ln f$  计算. 在  $-5^{\circ}\text{C}$  时按每个冰核所需的菌数来确定菌株冰核活性的高低.

表 1 高活性冰核菌的特性

Tab. 1 Characteristics of highly active ice-nucleation bacteria

菌号	每个冰核所需要菌数	菌体来源植物的科	菌号	每个冰核所需要菌数	菌体来源植物的科
256	234	木樨科 Oleaceae	352	1401	绣球科 Hydrangeaceae
317	621	唇形科 Labiatae	272	1487	玄参科 Scrophulariaceae
134	768	芸香科 Rutaceae	206	1742	苋科 Amaranthaceae
1062	849	茜草科 Rubiaceae	461	1770	冬青科 Aquifoliaceae
356	896	绣球科 Hydrangeaceae	182	1786	芸香科 Rutaceae
1161	1167	菊科 Compositae	359	1976	绣球科 Hydrangeaceae
653	1207	藤黄科 Hypericaceae	334	2124	十字花科 Cruciferae
173	1278	野牡丹科 Melastomataceae	621	4210	紫茉莉科 Nyctaginaceae
25	1289	菊科 Compositae	1071	5216	仙人掌科 Cactaceae
316	1339	唇形科 Labiatae	230	8563	仙人掌科 Cactaceae

2.3 高冰核活性菌的鉴定 通过冰核活性的测定, 我们筛选出高活性冰核菌 256 号菌株. 为了进一步弄清楚该菌的特点, 故进行下列形态和生化特征研究, 其结果如下. ① 形态特征: 256 号菌为革兰氏阴性, 短杆状, 单个排列为主, 菌体大小为  $0.67\mu\text{m} \times 2.5\mu\text{m}$ . 以周生鞭毛运动. 菌落形态为圆形, 湿润有光泽, 边缘整齐, 中央隆起, 黄色, 有粘液, 菌落直径为 4~5.0 mm. ② 生化特征: 接触酶阳性, 氧化酶阴性, 能液化明胶, 可水解淀粉成糊精, 不产脲酶, 能在 5% NaCl 培养基中生长, 兼性厌氧, 营呼吸代谢, 能从果糖、葡萄糖、蔗糖中产酸. 能利用醋酸盐、柠檬酸盐、苹果酸盐, 但不利用草酸盐、丙二酸盐、酒石酸盐. 能形成 2, 3- 丁二醇. 可利用的糖有葡萄糖、海藻糖、肌醇、蜜二糖、甘油、木糖、棉子糖、七叶灵、鼠李糖、甘露

糖、甘露醇等。

根据《伯捷氏手册》第八版的分类特征,可将 256号菌归为欧文氏菌。由于该菌能利用葡萄糖产气,能液化明胶,氧化葡萄糖酸盐,该菌似乎可以列入欧文氏菌的草生群。但它又与已知的欧文氏菌的草生群的某些特征不尽相同,具体区别见表 2。因此,256号菌可能是欧文氏菌草生群的新种。

表 2 256菌株与欧文氏菌的草生群的生理生化特征比较

Tab. 2 Comparison of physiological and biochemical characteristics of strain 256 and *Erwinia herbicola*

菌株	从半胱氨酸 产生 H <sub>2</sub> S	3-羟基丁酮	粘液状 生长	运动性	硝酸盐 还原	明胶 液化	苯丙氨酸 脱氨酶	吲哚
256	-	+	+	+	+	+	-	+
草生欧文氏菌草生变种	+	+	+	+	+	+	+	-
草生欧文氏菌菠萝变种	+	+	+	+	-	+	-	+
斯氏欧文氏菌	-	-	+	-	-	-	-	-
食夏孢欧文氏菌	-	+	-	+	+	+	-	+

## 参 考 文 献

- 1 Mak L R, Galyon E L, Chang Chien M. Ice nucleation induced by pseudomonas syringae. Appl Microbiol, 1974, 28 456~ 460
- 2 Vali G, Christensen M, Fresh R W. Biogenic ice nuclei part 2 Bacterial sources. J Atmos, 1976, 33 1565~ 1570
- 3 Army D C, Lindow S E, Upper C D. Frost sensitivity of Zea Mays increased by application of pseudomonas syringae. Nature, 1976, 262 282~ 284
- 4 中国科学院微生物研究所细菌分类组. 一般细菌常用鉴定方法. 北京: 科学出版社. 1978

## Isolation and Identification of Ice-Nucleus Bacterium

Liu Yuhuan\*

**Abstract** 375 Bacterial strains isolated from 181 plant samples of different areas of Guangdong province at different seasons were examined for ice nucleus activity by means of method modified by Lindow et al. Twenty of them are more active. The most active strain 256 was identified as *Erwinia* sp.

**Keywords** ice-nucleus activity, ice-nucleus bacterium

\* School of Life Sciences, Zhongshan University, Guangzhou 510275