

# 冰核细菌 *Pseudomonas syringae* 是否可以影响大气的冰核化过程

王亚玲<sup>①</sup>, 杜睿<sup>①\*</sup>, 梁宗敏<sup>①</sup>, 周宇光<sup>②</sup>

① 中国科学院研究生院, 北京 100049;

② 中国科学院微生物研究所, 北京 100011

\* 联系人, E-mail: ruidu2000@yahoo.com

2012-02-20 收稿, 2012-04-26 接受

国家自然科学基金(40875081, 41175135)资助

**摘要** 近年来, 大量的研究表明: 生物气溶胶作为有效云凝结核与冰核在大气物理和化学过程中发挥着重要的作用. 环境大气和云水样品中, 冰核活性细菌 *Pseudomonas syringae* 的可培养菌株已经成功地被分离筛选出来. 其在大气云物理过程尤其是降水过程中的重要作用也已经成为当前国际大气生物气溶胶气候效应研究的热点. 本研究采用液滴冻结实验技术, 测试了当前已被确定含有冰核活性菌的3种菌属即假单胞菌属(*Pseudomonas*)、欧文氏菌属(*Erwinia*)和黄单胞菌属(*Xanthomonas*)的代表性标准菌株(*P. fluorescens*, *E. uredovora*, *X. campestris* 和 *P. syringae* pv. *panici*), 和被证实具有冰核活性的细菌菌株(*P. syringae* pv. *lachrymans*)的菌悬液液滴的冻结温度. 结果显示: 所测试的目前国际公认的冰核活性细菌属的标准菌株 *P. syringae* pv. *panici*, *P. fluorescens*, *E. uredovora*, 和 *X. campestris* 并不具备冰核活性, 被测细菌菌悬液( $OD_{600}=0.25$ , 数浓度  $10^8$  cells/mL)的液滴冻结温度分别是:  $-20.3\pm 2.3$ ,  $-21.8\pm 2.3$ ,  $-20.8\pm 3.4$  和  $-19.9\pm 3.3$ , 与超纯水液滴的冻结温度( $-20.8\pm 2.7$ )差异不大; 而相同浓度下, *P. syringae* pv. *lachrymans* (ps1-10)菌株的冻结温度是 $-5.0\pm 0.8$ , 具有显著的冰核活性. ps1-10菌株液滴平均冻结温度随着菌悬液浓度梯度降低的变化特征表明, 当菌液浓度低于  $10^5$  cells/mL 时, 菌液液滴冻结温度明显降低, 当菌液浓度低于  $10^4$  cells/mL 时, 菌液液滴与无冰核活性的液滴冻结温度接近. 由此本文提出疑问: 冰核细菌 *P. syringae* 是否能以浸润核化活性在大气真实环境中的冰核异质核化过程中起到重要作用, 还是存在其他的作用机制?

## 关键词

生物气溶胶  
冰核活性  
冰核活性细菌  
*Pseudomonas syringae*  
冻结温度

细菌气溶胶作为生物气溶胶的重要组成部分, 它的健康效应一直是人们关注的焦点. 随着人们对于全球气候变化关注度的不断增强, 关于影响和界定气候变化的大气过程的研究也变得更加深入和多样化, 由此而产生出新的研究领域即微生物在全球气候变化过程中的作用研究<sup>[1]</sup>. 冰核细菌的发现及其可能对气象过程的影响使得冰核细菌气溶胶成为全球气候变化研究中凸显潜力的研究领域.

生物气溶胶(如细菌、真菌和藻类)<sup>[2]</sup>可作为云凝

结核(cloud condensation nuclei, CCN)和冰核(ice nuclei, IN), 促使过饱和水汽凝结形成液滴或诱导过冷却水滴发生冻结形成冰晶, 改变大气化学和物理过程而影响大气降水<sup>[3-5]</sup>. 原生生物气溶胶颗粒在粒径范围  $0.2\sim 50$   $\mu\text{m}$  内的大气颗粒物中质量(或数浓度)比例接近 25%, 而且生物冰核是自然界活性最强的冰核<sup>[6]</sup>. 可以在 $-10$  以上较温暖的条件下催化过冷水产生冰核的细菌被称为冰核细菌<sup>[7]</sup>. 实验室研究发现植物致病菌 *P. syringae* 在 $-2$  可以催化冰的形成, 是已发

现的活性最强的冰核细菌<sup>[8]</sup>.

自 1957 年 Soulage<sup>[9]</sup>在云室实验中发现霉菌孢子可以作冰晶的核心之后,不断有研究人员在雨水<sup>[10]</sup>、冰雹<sup>[11]</sup>、云雾<sup>[12]</sup>观察到细菌的存在.科学家在海拔 80 km 高层大气中检测到了可培养细菌<sup>[13]</sup>,Amato 等人<sup>[14]</sup>从云水样品中分离到的 71 种细菌中经鉴定发现了 *P. syringae* 细菌,Christner 等人<sup>[15]</sup>在 *Science* 杂志发表的文章指出环境降雪中普遍存在生物冰核,Morris 等人<sup>[16]</sup>也撰文提出了在不同生态系统中受水循环所驱动的 *P. syringae* 生活史,相关的研究逐渐接受 *P. syringae* 可能确实参与了大气云中的冰核化和降水过程的假说,使之成为了当前该研究领域的主流观点.然而由于目前对于大气冰核化的物理、化学过程的外场原位观测试验还存在着众多的不确定性和技术难题,对生物冰核化过程的了解更是极为有限.

当前国际上鉴定生物冰核有效活性的较常用的实验室测试方法是改进后的 Vali 液滴冻结法<sup>[17]</sup>,通过比较液滴的不同冻结温度和液滴在特定温度下冰核累积浓度,表征其冰核活性的强弱.本研究拟以目前已经证实具有冰核活性的最常见的菌种 *P. syringae* 为研究对象,采用液滴冻结法,通过测试液滴冻结温度与菌液数浓度的定量关系,推测其在大气环境冰核异质核化过程中可能产生的作用,为今后大气生物冰核的核化过程的模式参数化研究提供试验依据.

## 1 材料和方法

自 Maki 等人<sup>[7]</sup>1974 年分离到冰核活性细菌 *Pseudomonas syringae*, 并提出冰核细菌的概念后,许多科研人员投入到了该领域的研究,时至今日,在数千种植物致病菌中发现仅有假单胞菌属(*Pseudomonas*)、欧文氏菌属(*Erwinia*)和黄单胞菌属(*Xanthomonas*)3 个菌属不超过 20 个菌种和变种的细菌是冰核细菌,且均是 G<sup>-</sup>细菌,分布在世界各地,受地理环境和区域气候以及植被类型的影响,各地分布的冰核细菌的优势菌种也不相同.国际公认 *Pseudomonas syringae* 是分布最广和冰核活性最强的冰核细菌模式菌种,其他优势菌种分别是: *Erwinia herbicola*, *Pseudomonas fluorescences*, *Erwinia ananas*, *Xanthomonas campestris*<sup>[18,19]</sup>.

(i) 实验菌种. 实验采用由中国科学院微生物研究所中国普通微生物保藏中心和中国农业科学院

植物保护研究所植物病虫害生物学国家重点实验室所提供冻干管保存的纯种菌(表 1),编号为菌种提供单位所编码,其中前 4 种菌是由微生物保藏中心提供的,是所保藏该菌的不同变种菌株的标准菌,其菌种来源、生理特性和分布特征,网站均有相应文献资料,本文不再赘述. ps1-10 为中国农业科学院植物保护研究所植物病虫害生物学国家重点实验室所筛选出的,我国冰核活性最强的冰核细菌 *Pseudomonas syringae* 的变种代表菌株,为下文讨论方便,分别取其拉丁学名首字母缩写为各自代码见表 1.

(ii) 菌种的活化. 将冻干管保存菌种用适量无菌水混匀,用滴管吸出转移至试管斜面 NA 培养基中,30℃培养 24 h,经至少 2 次转接活化后,在 NA 培养皿上培养纯化分离,再转接试管斜面培养基作为常用菌种 4℃保存.实验用营养琼脂 NA-CM107 培养基,由北京陆桥技术有限公司生产.

(iii) 测试菌液的配制. 将接种培养并在 4℃冰箱冷藏保存至少 1 周以上的细菌培养皿取出,在无菌操作台用无菌菌环刮取培养基上的菌落,移到无菌超纯水中,震荡摇匀,根据前期测定好的菌悬液 OD<sub>600</sub> 值与细菌数浓度平板计数关系式,配制成 OD<sub>600</sub> 值所对应的菌悬液浓度.由于紫外分光光度计的测量灵敏度的影响,浓度较低的菌悬液,是通过梯度稀释法将已知浓度的菌悬液移液稀释配制所需浓度的菌悬液.

(iv) 菌液液滴冻结温度的测定. 本实验采用由中国气象科学研究院杨绍忠和酆大雄<sup>[20]</sup>依据 Vali 均匀液滴冻结实验原理研制并改进的水滴冻结测试仪. McDonald<sup>[21]</sup>估算实际大气中典型云滴粒径范围是 10~50 μm,许多液滴冻结实验采用的液滴体积分别是 5 和 10 μL<sup>[17,19,22,23]</sup>.根据本研究有关液滴冻结温度与液滴大小关系的预实验结果,我们选择 10 μL 作为液滴测试体积.液滴滴定前按文献描述的处理在

表 1 实验用 5 种菌种

编号	菌种	拉丁学名	代码
1.1802	荧光假单胞菌	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	PF
1.1215	噬夏孢欧文氏菌	<i>Erwinia uredovora</i>	EU
1.1781	野油菜黄单胞菌	<i>Xanthomonas campestris</i>	XC
1.1727	丁香假单胞菌黍离致病变种	<i>Pseudomonas syringae</i> <i>pv. panici</i>	PS <sup>0</sup>
ps1-10	丁香假单胞菌黄瓜致病变种	<i>Pseudomonas syringae</i> <i>pv. lachrymans</i>	PS

冷台上均匀分布的 47 个感应位点上滴加憎水膜, 随后采用大龙医疗设备(上海)有限公司生产的 5~50  $\mu\text{L}$  微量大龙移液枪依次将 10  $\mu\text{L}$  溶液液滴滴定在已形成憎水膜的感应位点上, 仪器线性降温速率设定为 2 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ . 从 0 $^{\circ}\text{C}$  开始以 2 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$  匀速降温, 液滴冻结, 脉冲信号被检测器自动记录并输出检测结果, 测量精度 0.2 $^{\circ}\text{C}$ . 如遇降温曲线非线性或在仪器降温范围 (0~30 $^{\circ}\text{C}$ ) 内液滴仍不冻结, 记录并舍弃这些液滴数据, 统计时调整冻结液滴总数; 为保证数据的统计意义, 上述操作至少重复 5 次, 使检测结果有效数据保持在 200 个以上, 同时确保检测器在线输出的冻结温度谱曲线(即每批次冻结液滴随温度的变化)趋势一致性较好, 以此控制结果的科学性与可靠性.

## 2 结果和讨论

### 2.1 相同浓度下不同细菌菌悬液的冻结温度

图 1 是经活化培养后, 再次接种纯培养后并在 4 $^{\circ}\text{C}$  冷藏保存至少 1 周以上的 5 种细菌菌悬液的液滴平均冻结温度, 误差线为测试液滴总数 ( $n=235$ ) 结果的标准偏差. 4 种细菌 (PF, EU, XC, PS<sup>0</sup>) 是当前已被确认具有冰核活性的菌属中冰核细菌种类的标准菌株, 在相同菌液浓度  $\text{OD}_{600}=0.25$  (经平板计数法测定其菌数浓度均为  $10^8$  cells/mL, PS<sup>0</sup> 菌数浓度稍低), 以 10  $\mu\text{L}$  液滴所测得的冻结温度均在 -20 $^{\circ}\text{C}$  ( $n=235$ ) 附近, 与作为对照的超纯水 (C.K.) 10  $\mu\text{L}$  液滴冻结温度没有明显差异, 并未显示出冰核活性和促进冰核冻结的趋势, 但作为 *Pseudomonas syringae* 的另一变种 *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* (代码 PS) 在同等浓度和测试条件下显示出明显的冰核活性, 可将超纯水液滴的冻结温度提升至 -5 $^{\circ}\text{C}$  附近 (见图 1). 虽然文献报道

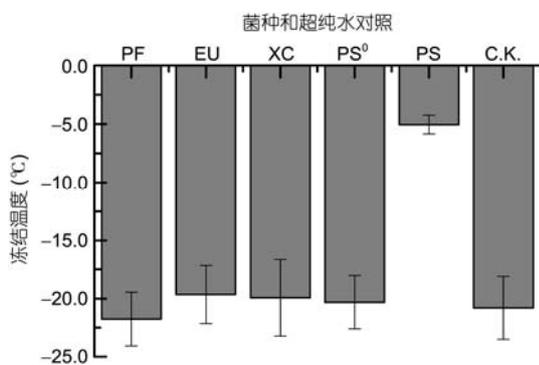


图 1 相同浓度下不同细菌菌悬液的液滴冻结温度

Maki 等人<sup>[8]</sup>测得 *P. syringae* ( $10^7\sim 10^8$  cells/mL) 的冻结温度达到 -2 $^{\circ}\text{C}$ ; Kozloff 等人<sup>[24]</sup>在 pH 7.5 磷酸盐缓冲液中测得 *P. syringae* ( $10^5$  cells/mL) 冻结温度是 -8.5 $^{\circ}\text{C}$ , 而 *E. herbicola* ( $10^8$  cells/mL) 的冻结温度是 -4 $^{\circ}\text{C}$ ; Nejad 等人<sup>[25]</sup>采用管测法测得 *P. syringae*,  $10^2$  cells/mL 核化温度是 -4.5 $^{\circ}\text{C}$ ,  $10^9$  cells/mL 冻结温度是 -2.5 $^{\circ}\text{C}$ , *P. fluorescens*  $10^5$  cells/mL 冻结温度是 -5.5 $^{\circ}\text{C}$ ,  $10^9$  cells/mL 冻结温度是 -3.5 $^{\circ}\text{C}$ . 我国赵荣艳等人<sup>[26]</sup>也测定发现 *Erwinia uredovora* ( $10^8$  cells/mL) 在 -5 $^{\circ}\text{C}$  液滴具有冰核活性, 最早分离出冰核细菌的 Maki 在实验观测中发现 *P. syringae* 和 *P. fluorescens* 经多次接种培养后, 其冰核活化能力在最初可使水滴在 -2 或 -3 $^{\circ}\text{C}$  冻结, 但如果所配置的菌悬液放置 1 或 2 天后, 该冰核活性便会丧失<sup>[7]</sup>. 已有的分子生物学研究显示冰核细菌的冰核活性是由细菌的冰核基因所编码的冰蛋白的成冰活性决定的, 而冰蛋白的成冰活性又受多种外界因素和细菌自身生理条件所调控, 只要冰蛋白能够正常表达, 即使细菌死亡, 残存的冰蛋白未被破坏, 仍会具有冰核活性. 我们的测试结果表明即使是已经被鉴定具有冰核活性的菌种, 其不同变种菌株也完全可能不具备冰核活性. 而 Ahern 等人<sup>[27]</sup>在研究另一种代表性较强的冰核细菌 *Pseudomonas fluorescens* 时同样发现, 他们从苏格兰岛西北部的 Hebridean 山头所采集的云水和雨水样品中所分离的 *Pseudomonas fluorescens* 细菌并不具备冰核活性, 其液滴冻结温度在 -20~-28 $^{\circ}\text{C}$  之间, 比用做实验对照的具冰核活性的 *P. fluorescens* 的平均冻结温度 (-4.75 $^{\circ}\text{C}$ ) 要低 16~24 $^{\circ}\text{C}$ ; 而且进一步的分子生物学基因测序分析表明, 从样品分离出的 *P. fluorescens* 细菌不具备冰核基因. 这也许是本研究中所测试的 4 种细菌 (PF, EU, XC, PS<sup>0</sup>) 不具备冰核活性的重要原因之一.

### 2.2 *Pseudomonas syringae* 菌液浓度对液滴冻结温度的影响

图 2 显示了 PS (*Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*) 菌悬液液滴的冻结温度与菌液浓度的关系, 图示误差线为液滴 ( $n=235$ ) 测试结果的标准偏差, 菌液浓度的大小决定着液滴的冻结温度, 这与已有的研究结果一致. 但是本研究所测试的冰核活性菌 PS, 当菌悬液浓度低于  $10^5$  cells/mL 后, 液滴的冻结温度会显著降低, 而菌悬液浓度在  $10^2\sim 10^3$  cells/mL 时, 液滴冻结温度与对照的超纯水 (C.K.) 的液滴冻结温度

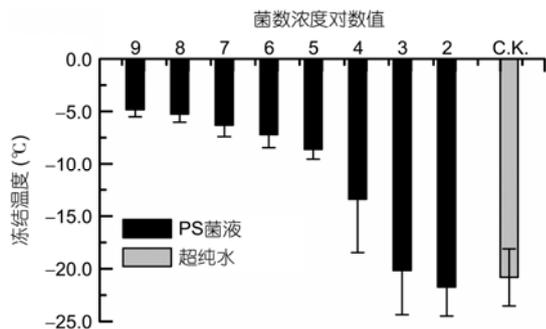


图2 冰核细菌 *P.syringae* pv. *lachrymans* 菌液浓度对液滴冻结温度的影响

没有显著差别. 这种现象与 Mortazavi 等人<sup>[19]</sup>报道的菌悬液浓度在  $10^2 \sim 10^8$  cells/mL 时液滴冻结温度的范围是  $-7.9 \sim -3.0$  °C 有较大的出入. 首先可能与测试的菌种的冰核活性有关, 虽然使用的菌种都是 *Pseudomonas syringae*, 由于即便由同一菌落生长的菌株细胞, 冰核活性也会因外界环境因素和自身生理代谢过程而发生改变, 所以不同的变种菌株间的冰核活性差异则会更加明显, 作者在文中没有关于所采用测试方法的介绍, 从相关的有限描述中可以推断文中的测试结果可能并非来自液滴冻结试验法. 不同的检测方法对结果会有一定的影响, Nejad 等人<sup>[25]</sup>用管测法测得 *P. syringae*  $10^2$  cells/mL 和  $10^9$  cells/mL 菌液液滴的冻结温度分别是  $-4.5$  和  $-2.5$  °C. 而早期 Maki 等人<sup>[8]</sup>用液滴测试法发现: 当菌悬液浓度低于  $10^6$  cells/mL 时, 液滴在  $-2.0$  °C 就不可能发生冻结. 本研究测试的较高浓度菌液  $10^9 \sim 10^5$  cells/mL 相当于  $10^7 \sim 10^3$  cells/ $10 \mu\text{L}$  液滴, 该浓度菌液表现出冰核活性, 冻结温度都在  $-10$  °C 以上, 这与研究所发现由于冰核活性的变化, 细菌细胞浓度至少 100 个以上才有可能表现冰核活性的结论<sup>[28]</sup>是一致的. 但当菌悬液浓度是  $10^4$  cells/mL 时, 相当于  $10 \mu\text{L}$  液滴中只有 100 个细菌细胞或更少, 而浓度是  $10^2$  cells/mL 则  $10 \mu\text{L}$  液滴中的细菌细胞数仅是 1 个甚至可能没有, 这或许是此类液滴与无菌对照超纯水液滴的冻结温度无差别的主要原因.

### 3 结论

上述试验现象引发我们进一步的思考, 尽管科

学试验已经证实 *Pseudomonas syringae* 之类的冰核细菌能够在较高的温度下促使过冷水结冰, 这为解释积云能在较高温度下形成降水提供了很好的证据. Amato 等人<sup>[14]</sup>从云水样品中以及 Morris 等人<sup>[16]</sup>从降水样品中也确实分离到了 *P. syringae* 细菌并经测试发现分离到的菌种具有冰核活性, 且他们室内测试试验的菌液浓度大都在  $10^6 \sim 10^8$  cells/mL 范围. 与此同时, 也有研究人员如 Mortazavi 等人<sup>[19]</sup>和 Christner 等人<sup>[15]</sup>未在降雪样品中分离到 *Pseudomonas syringae* 细菌; 而且 Lannone 和她的同事们通过多次室内模拟实验发现<sup>[29]</sup>: 在大气中分布最为丰富的一类真菌 *Cladosporium*, 其孢子并不具备有效冰核活性, 其冻结温度仅分布在  $-25 \sim -35$  °C 范围内. 我们的试验也表明在冰核细菌属中普遍存在并不具备冰核活性的菌株, 即便是具备冰核活性的菌株, 菌液浓度若低于  $10^5$  cells/mL, 低浓度菌液的微小液滴可能并不显示冰核活性. 由于真实大气中的细菌浓度常常是低于此浓度的, 而且恶劣的生存环境对冰核活性的正常表达是否产生正面或负面的影响, 我们对这些都所知有限, 但当前却以冰核细菌的冻结活性为重要依据解释生物气溶胶的高效核化性能; 另外一些研究人员认为大气中的生物冰核相当丰富<sup>[30]</sup>, 重要证据之一是利用分子生物学的 Sanger DNA 测序技术分析, 测试所采集的生物气溶胶中细菌群落中的确存在假单胞菌科与黄单胞菌科, 我们的试验再次表明即使是同一菌种的不同变种间的冰核活性都存在质的差异, 这些表型差异仅从基因测序分析是无法判明的, 因此当前仅以冰核细菌的高冻结温度来推测并解释其在大气中的高效冰核特性还存在着很大的不确定性.

而 Ahern 等人<sup>[27]</sup>研究从云中所分离的 *Pseudomonas fluorescens* 冰核活性时发现, 尽管菌株不具冰核活性, 但其低温代谢产物中有表面活性剂, 这或许是生物气溶胶作为高效冰核与云凝结核的原因. 但目前由于测试技术的限制, 生物气溶胶在真实大气中的核化过程中的真正作用和机制还有待于大气物理学家、化学家和微生物学家之间开展更为紧密的合作才可能取得新的进展, 这也是当前大气生物气溶胶研究所面临的新的挑战与机遇.

**致谢** 真诚地感谢中国气象科学研究院杨绍忠研究员在整个实验期间所给予的热心帮助和建议; 同时也衷心地感谢中国科学院研究生院张元勋教授在论文写作中所给予的帮助与指导.

## 参考文献

- 1 Morris C E, Sands D C, Bardin M, et al. Microbiology and atmospheric processes: Research challenges concerning the impact of airborne microorganisms on the atmosphere and climate. *Biogeosciences*, 2011, 8: 17–25
- 2 Burge H A. *Bioaerosols*. Boca Raton, FL: Lewis, 1995. 16–23
- 3 Bauer H, Giebl H, Hitzemberger R, et al. Airborne bacteria as cloud condensation nuclei. *J Geophys Res*, 2003, 108: AAC2/1–AAC2/5
- 4 Franc G D, Demott P J. Cloud activation of airborne *Erwinia carotovora* cells. *J Appl Meteor*, 1998, 37: 1293–1300
- 5 Morris C E, Georgakopoulos D G, Sands D C. Ice nucleation active bacteria and their potential role in precipitation. *J Phys*, 2004, 121: 87–103
- 6 Jaenicke R. Abundance of cellular material and proteins in the atmosphere. *Science*, 2005, 308: 73
- 7 Maki L R, Willoughby K J. Bacteria as biogenic sources of freezing nuclei. *Appl Meteor*, 1978, 17: 1049–1053
- 8 Maki L R, Galyan E L, Chang-Chien M M, et al. Ice nucleation induced by *Pseudomonas syringae*. *Appl Microbiol*, 1974, 28: 456–459
- 9 Soulage F B. Les noyaux de congélation de l'atmosphère. *Ann Geophys*, 1957, 13: 103–134
- 10 Parker B C. Rain as a source of vitamin B. *Nature*, 1968, 219: 617–618
- 11 Mandrioli P, Puppi G, Bagni N, et al. Distribution of microorganisms in hailstones. *Nature*, 1973, 246: 416–417
- 12 Fuzzi S, Mandrioli P, Perfetto A. Fog droplets—An atmospheric source of secondary biological aerosol particles. *Atmos Environ*, 1997, 31: 287–290
- 13 Imshenetsky A, Lysenko S, Kazakov G. Upper boundary of the biosphere. *Appl Environ Microbiol*, 1978, 35: 1–5
- 14 Amato P, Parazols M, Sancelme M, et al. Microorganisms isolated from the water phase of tropospheric clouds at the Puy de Dôme: Major groups and growth abilities at low temperatures. *FEMS Microbiol Ecol*, 2007, 59: 242–254
- 15 Christner B C, Morris C, Foreman C M, et al. Ubiquity of biological ice nucleators in snowfall. *Science*, 2008, 319: 1214
- 16 Morris C E, Sands D C, Vinatzer B A, et al. The life history of the plant pathogen *Pseudomonas syringae* is linked to the water cycle. *ISME J*, 2008, 2: 321–334
- 17 Vali G. Quantitative evaluation of experimental results on the heterogeneous freezing nucleation of supercooled liquids. *Atmos Sci*, 1971, 28: 402–409
- 18 孙福在. 我国生物冰核研究进展. *中国农业科学*, 1996, 29: 62–67
- 19 Mortazavi R, Hayes C T, Ariya P A. Ice nucleation activity of bacteria isolated from snow compared with organic and inorganic substrate. *Environ Chem*, 2008, 5: 373–381
- 20 杨绍忠, 酆大雄. 一个检测水中冻结核含量的新装置. *气象学报*, 2007, 65: 976–982
- 21 McDonald J E. The physics of cloud modification. *Adv Geophys*, 1958, 5: 223–303
- 22 杜睿, Ariya P A. 实验测得的 C2-C6 二元羧酸溶液的冻结温度: 冰核化过程中的重要指标. *科学通报*, 2008, 53: 1961–1966
- 23 Vali G, Stansbury E J. Time dependent characteristics of the heterogeneous nucleation of ice. *Can J Physiol*, 1966, 44: 447–502
- 24 Kozloff L M, Schofield M A, Lute M. Ice nucleating activity of *Pseudomonas syringae* and *Erwinia herbicola*. *J Bacteriol*, 1983, 153: 222–231
- 25 Nejad P, Granhall U, Ramstedt M. Factors influencing pathogenic ice nucleation active (INA) bacteria isolated from *Salix* plants, soil and litter. *J Agric Technol*, 2005, 1: 207–222
- 26 赵荣艳, 徐曼, 付占芳, 等. 北京地区杏树冰核活性菌种类及其消长动态规律的研究. *中国农业科学*, 2007, 40: 1174–1180
- 27 Ahern H E, Walsh K A, Hill T C, et al. Fluorescent *pseudomonas* isolated from Hebridean cloud and rain water produce biosurfactants but do not cause ice nucleation. *Biogeosciences*, 2007, 4: 115–124
- 28 Hirano S S, Baker L S, Upper C D. Ice nucleation temperature of individual leaves in relation to population sizes of ice nucleation-active bacteria and frost injury. *Plant Physiol*, 1985, 77: 259–265
- 29 Lannone R, Chernoff D I, Pringle A, et al. The ice nucleation ability of one of the most abundant types of fungal spores found in the atmosphere. *Atmos Chem Phys Discuss*, 2010, 10: 24621–24650
- 30 Bowers R M, Lauber C L, Wiedinmyer C, et al. Characterization of airborne microbial communities at a high elevation site and their potential to act as atmospheric ice nuclei. *Appl Environ Microbiol*, 2009, 75: 5121–5130

## Do ice nucleation active bacteria effect on ice nucleation in the real atmosphere: *Pseudomonas syringae*

WANG YaLing<sup>1</sup>, DU Rui<sup>1</sup>, LIANG ZongMin<sup>1</sup> & ZHOU YuGuang<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Graduate University of Chinese Academy of Science, Beijing 100049, China;

<sup>2</sup> Institute of microorganism, Chinese Academy of Science, Beijing 100011, China

In recent years, numerous investigations have highlighted the importance of bioaerosols in the atmosphere as effective cloud condensation nuclei (CCN) or ice nuclei (IN) during atmospheric physics and chemistry processes. Culturable strains of the ice nuclei active (INA) bacteria *Pseudomonas syringae* have been isolated from cloud water samples. This has led to an increase in research on bioaerosols associated with climatic effects. Such research is important because of the impacts that bacteria have in certain atmospheric cloud physical processes, especially in precipitation processes. This paper reports freezing temperatures, measured via Vali's even drops freezing method, of water droplets containing representative strains of three commonly recognized INA bacterial genera. These strains are *Pseudomonas fluorescens*, *Erwinia uredovora*, *Xanthomonas campestris*, *Pseudomonas syringae* pv. *panici* and *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*. Results show that the first four bacteria strains do not have expected IN activity – freezing temperatures were  $-20.3\pm 2.3^{\circ}\text{C}$ ,  $-21.8\pm 2.3^{\circ}\text{C}$ ,  $-20.8\pm 3.4^{\circ}\text{C}$ ,  $-19.9\pm 3.3^{\circ}\text{C}$ , respectively, when the concentration of the bacterial suspension was  $10^8$  cells/mL ( $\text{OD}_{600}=0.25$ ). These are not significantly different from the freezing temperature of ultrapure water droplets,  $-20.8\pm 2.7^{\circ}\text{C}$ . However, a higher freezing temperature of  $-5.0\pm 0.8^{\circ}\text{C}$  was observed from measurement of *P. syringae* pv. *lachrymans* (ps1-10) contained in water droplets with the same bacterial suspension concentration. Additionally, average freezing temperatures of the water droplets are correlated with bacterial concentration. With a concentration lower than  $10^5$  cells/mL, droplet freezing temperature decreased significantly, and was even close to that of ultrapure water when the concentration was less than  $10^4$  cells/mL. This seems to indicate there was no IN activity for bacteria at such a low concentration. Based on the results, a question is raised that should be verified in the real atmosphere with lower bacterial concentrations. That is, can impacts of *P. syringae* on heterogeneous nucleation be attributed to their IN activity, or to some other unverified mechanisms?

**bioaerosol, ice nucleation-active, INA bacteria, *Pseudomonas syringae*, freezing temperature**

doi: 10.1360/972011-2233