

# 南昌地区蔬菜冰核活性细菌分离鉴定

宋水林<sup>1</sup>, 郑春<sup>1</sup>, 颜秋梅<sup>2</sup>, 桂良杰<sup>2</sup>, 崔汝强<sup>1\*</sup>

(1. 江西农业大学 农学院, 江西 南昌 330045; 2. 吉州区农业局, 江西 吉安 343000)

**摘要:** 本研究对南昌地区蔬菜作物上的冰核活性细菌的进行分离鉴定, 得到高冰核活性细菌 3 株, 其中活性较强的初步鉴定为欧文氏菌属 (*Erwinia spp.*) 2 株, 假单胞菌属 (*Pseudomonas spp.*) 1 株。初步了解了南昌地区蔬菜上冰核活性细菌的主要种群为假单胞菌属和欧文氏菌属。

**关键词:** 蔬菜; 冰核细菌; 分离; 鉴定

中图分类号: S436.3

文献标志码: A

文章编号: 2095-3704 (2012) 02-0169-03

## Isolation and Identification of Ice Nucleating Active Bacteria on Plants in Nanchang area

SONG Shui-lin<sup>1</sup>, ZHENG Chun<sup>1</sup>, YAN Qiu-mei<sup>2</sup>, GUI Liang-jie<sup>2</sup>, CUI Ru-qiang<sup>1\*</sup>

(1. College of Agriculture, Jiangxi Agricultural University, Nanchang, 330045, China;

2. Jizhou Bureau of Agriculture, Ji'an, 343000, China)

**Abstract:** Detection of INA (ice nucleation active bacteria) population on horticulture plants in Nanchang City was carried in this study. Through isolation and identification, 3 strains of high active INA were obtained among which were 2 strains of *Erwinia spp.*, 1 strains *Pseudomonas spp.*. Among them *Pseudomonas spp.* and *E. ananas* were dominant population.

**Key words:** horticulture; ice nucleation active bacteria; isolate; identification

霜冻是一种严重的自然灾害, 能够在短短几小时内毁坏大片农作物, 给农业生产造成重大损失。长期以来人们普遍认为植物霜冻是由低温和植物的霜敏感性所决定, 但难以圆满解释霜冻的原因。自从发现冰核细菌以来, 就引起人们的关注, 世界上有美、日、中等20多个国家, 涉及10多个学科, 对冰核细菌进行了全面系统的研究, 已召开6次国际生物冰核学术研讨会。近10年来, 国内外大量研究证明<sup>[1-6]</sup>, 在自然界广泛存在着的冰核活性细菌(Ice nucleation active bacteria简称INA细菌), 它可在-2~-3℃诱发植物细胞水结冰而发生霜冻; 无INA细菌存在的植物, 一般能耐-6~-7℃的低温不发生或发

生轻微霜冻。

目前江西省在植物冰核细菌方面的研究还未见报道, 为了更好的开展霜冻害的防治工作, 本研究就南昌地区蔬菜并和细菌的种类进行调查研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 样品采集

2011年的7月从进贤县, 南昌县, 新建县, 安义县等地采集植物样品, 卷心菜 (*Brassica oleraceavar*), 白菜 (*B. pckinensis*), 青菜 (*B. chinensis*), 花椰菜 (*B.oleracea var. botrytis*), 莴苣 (*Lactuca sativa*), 刀豆 (*Canavalia gladiata*), 豌

收稿日期: 2012-05-15

基金项目: 国家科技支撑计划项目 (2012BAC11B06)

作者简介: 宋水林, 女, 实验员, 主要从事植物病理学研究。\* 通信作者: 崔汝强, 男, 副教授, 博士, 主要从事植物病害及其防治研究, Email:cuiruqiang@qq.com。

豆 (*Plum sativum*), 芹菜 (*Apium graveolens*), 韭菜 (*Allium tuberosum*), 烟草 (*Nicotiana tabacum*), 茶树 (*Thea sinensis*) 菊花 (*Chrysanthemum*), 辣椒 (*Capsicum annuum*) 装入采样袋封好袋口, 带回实验室, 于 4℃ 冰箱保存待用。

### 1.2 冰核细菌的分离<sup>[9]</sup>

采用平板稀释法分离。随机称取 1 g 样品, 用无菌剪刀剪成碎条状, 放到预先装有 9 mL 无菌蒸馏水的试管中, 于 250 r/min 摇床上室温振荡 2 h。梯度稀释后涂抹于 NA 培养基上, 20℃ (最佳培养温度为 20℃ 左右) 培养 4 d。挑取培养基上长出的各种类型的细菌菌落, 分别移植到 NA 平板上纯化。

### 1.3 冰核活性的测定

采用 Vall 发明<sup>[10]</sup>, 后由 Lindow 改进的小液滴冻结法测定冰核活性<sup>[11]</sup>。将新鲜培养的待测菌用无菌水配制成浓度约为 10<sup>8</sup> cfu/mL 的细菌悬浮液。用移液器吸 10ul 滴到 -5℃ 的测试表面上, 每个样品测 20 滴, 以无菌水作对照。如在 30 s 内有 4 滴以上的小液滴冻结成冰, 记下冻滴数, 换算成冻滴率。重复测一次进行确认。保藏有冰核活性的细菌。

测试表面的制作方法: 将铝箔纸预先用 1% 的二甲苯加 99% 的液体石蜡配制成的溶液喷洒淋湿, 放到 50℃ 左右的恒温烘箱中烘干。此法处理的目的是增加滴加到其上的测试液体的表面张力, 使之滴下后不易散开而保持液滴状, 易于观察和计数冻滴数。使用时, 将铝箔纸叠置成四周封口不漏水状, 大小约为 10 cm×15 cm, 置入 -5℃ 的酒精溶液中, 使之漂浮在酒精液面上<sup>[12]</sup>。

### 1.4 冰核细菌的鉴定

1.4.1 菌落形态观察 将冰核细菌接种在 NA 培养基上, 在 24℃ 下培养 72 h 后观察菌落的形态特征, 包括形状、大小、透明度、边缘和表面隆起等。

1.4.2 菌体形态特征观察 新鲜培养菌体进行革兰氏染色, 以枯草芽孢杆菌为对照, 在普通光学显微

镜下观察革兰氏反应结果, 是否有芽孢, 细胞的形态、大小等。

1.4.3 常规生理生化鉴定 参照东秀珠等 (2001) 编著的《常见细菌系统鉴定手册》<sup>[13]</sup>对菌株进行葡萄糖发酵, 运动性, 接触酶, 氧化酶, 硝酸盐, 苯丙氨酸脱氨酶, H<sub>2</sub>S, 生长温度等测定试验。参比菌株为大肠杆菌。

## 2 结果与分析

### 2.1 细菌分离

从 13 种霜冻害植物样品中共分离到细菌菌株 89 个。经冰核活性测定后, 有 18 个菌株表现出具有冰核活性, 其中 3 个冰核活性强, 冻滴率 100%。

### 2.2 冰核细菌鉴定

对冰核活性强的 3 个菌株进行了鉴定。

#### 2.2.1 培养性状

3 个菌株均能在 20℃ KKB 培养基上生长, 2~3 天长出肉眼可见菌落, 4 天后逐步表现出菌落的基本特征。菌落培养特征见表 1。

#### 2.2.2 生理生化特征

3 个菌株革兰氏染色均为阴性, 菌体杆状, 无芽孢。

菌株 BH-2-3 发酵型, 能运动, 氧化酶阴性, 接触酶阳性, 葡萄糖产气, 硝酸盐还原阴性, 苯丙氨酸脱氨酶阳性, 不产生 H<sub>2</sub>S, 5℃ 能生长, 40℃ 能生长。

菌株 BH-7-1 发酵型, 能运动, 氧化酶阴性, 接触酶阳性, 葡萄糖产气, 硝酸盐还原阴性, 苯丙氨酸脱氨酶阴性, 不产生 H<sub>2</sub>S, 5℃ 能生长, 40℃ 能生长。

菌株 BH-13-5 非发酵型, 能运动, 氧化酶阳性, 接触酶阳性, 葡萄糖产气阴性, 还原硝酸盐, 苯丙氨酸脱氨酶阳性, 不产生 H<sub>2</sub>S, 5℃ 能生长, 40℃ 不能生长。

表 1 冰核细菌菌落形态特征

菌株	菌落形态	隆起形状	直径 mm	颜色	质地	边缘	KB 产荧光	水溶色素
BH-2-3	圆形	中央突起	2~4	蜜黄	致密不透明	整齐	-	-
BH-7-1	近圆形	扁圆	8~12	黄	粘稠不透明	不整齐	-	-
BH-13-5	圆形	平隆	2~4	乳白	湿润半透明	整齐	+	-

### 2.2.3 菌株初步鉴定

3 个菌株的主要生理生化特征的比较见表 2。参

照《常见细菌系统鉴定手册》<sup>[13]</sup>菌株 BH-2-3 和 BH-7-1 初步鉴定为肠杆菌科欧文氏菌属不同种, 菌

株 BH-13-5 初步鉴定为假单胞菌属。还有待进一步鉴定。

表2 3个菌株与2个已知对照菌株表型特征的比较

表型特征	BH-2-3	BH-7-1	BH-13-5	大肠杆菌
革兰氏染色	-	-	-	-
有无芽孢	-	-	-	-
菌体形状	杆状	杆状	杆状	杆状
菌落颜色	蜜黄	黄	乳白	黄
KB产荧光	-	-	+	/
水溶色素	-	-	-	-
葡萄糖发酵	+	+	-	+
葡萄糖产气	-	-	-	-
氧化酶	-	-	+	-
接触酶	+	+	+	+
运动	+	+	+	+
硝酸盐还原	-	-	+	-
淀粉水解	-	-	-	-
H <sub>2</sub> S	-	-	-	-
苯丙氨酸脱氨酶	+	-	+	-
生长温度 5℃	+	+	+	-
生长温度 40℃	+	+	-	+

+: 阳性; -: 阴性

### 3 讨论

江西处于北回归线附近, 全省气候温暖, 日照充足, 雨量充沛, 无霜期长, 为亚热带湿润气候, 十分有利于农作物生长。春季回暖较早, 但天气易变, 乍暖乍寒, 易造成霜冻害。近年来气温升降异常, 受霜冻灾害影响, 江西部分地区农作物受灾严重, 赣南脐橙、蔬菜育苗、茶叶等农作物直接经济损失每年 20 多亿元人民币。据农业部门统计, 2011 年江西全省果树受冻面积 420 万亩, 预计减产 40 万吨, 直接经济损失超过 8 亿元人民币。随着江西现代化建设步伐的加快, 以及全球气候变化不稳定性的加剧, 霜冻害已成为我省一种严重的自然灾害。研究发现冰核细菌是诱发和加重农作物霜冻的重要因素。目前江西省在植物冰和细菌方面的研究还未见报道, 为了更好的开展霜冻害的防治工作, 本研究就南昌地区蔬菜冰核细菌的种类进行调查研究。作者从南昌市周围 4 个县市采集到了 13 种受霜冻害植物样品, 共分离到 89 株细菌, 其中有 18 个菌株具有冰核活性, 3 株细菌的冰核活性很高, 冻滴率为 100%。经革兰氏染色、形态培养特征观察和生

理生化试验, 将菌株 BH-2-3 和 BH-7-1 初步鉴定为肠杆菌科欧文氏菌属不同种, 菌株 BH-13-5 初步鉴定为假单胞菌属。

就本实验分离结果来看, 冰核活性强的主要是欧文氏菌属和假单胞菌属的细菌, 这与我国南方冰核细菌的种类基本一致。然而分离到的种类和数量偏少, 可能与分离的时间与分离的地点相对集中有关。本试验结果为南昌地区蔬菜霜冻害的防治工作提供了一定的理论依据。

### 参考文献:

- [1] 孙福在. 我国生物冰核研究进展[J]. 中国农业科学, 1996, 29(5): 62-68.
- [2] 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.
- [3] 刘建华, 陶毓汾, 何维勋, 等. 冰核活性细菌与玉米和大豆霜冻害关系[J]. 中国农业气象, 1990, 11(1): 1-5.
- [4] 孙福在, 赵廷昌, 杨建民, 等. 杏树上冰核细菌种类及其冰核活性与杏花霜冻关系研究[J]. 中国农业科学, 2000, 33(6): 50-58.
- [5] Lindow S E. *Erwinia herbicola*: a bacteria ice nucleus active in increasing frost injury to corn [J]. Phytopathology, 1978, 68: 523-527.
- [6] Lindow S E. Relationship between ice nucleation frequency of bacteria and frost injury [J]. Plant Physiology, 1982, 70: 1090-1093.
- [7] 孙福在, 朱红, 何礼远. 我国植物上冰核细菌种类鉴定[J]. 自然科学进展, 1994, 4(4): 449-556.
- [8] 孙福在, 韦建福. 我国冰核活性细菌的优势种群调查与研究[J]. 中国农业科学, 1991, 24(3): 57-64.
- [9] Goto M, Goto T. Identification of ice Nucleation-Active Bacteria Isolated from Frost-Damaged Vegetable Leaves [J]. Ann phytopath Soc Japan, 1989, 55: 3340-3351.
- [10] 孙福在, 何礼远. 冰核细菌与植物霜冻研究概况[J]. 植物保护, 1989, 15(4): 41-43.
- [11] 后腾正夫. 野菜分离冰核活性细菌分类学研究[J]. 日本植物病理学报, 1988, 54(2): 189-197.
- [12] 韦建福. 云南冰核活性细菌的鉴定、种类、分布及防霜新技术研究[D]. 云南农业大学, 1994.
- [13] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌体统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001, 1-419.