

Белки-нуклеаторы бактериального происхождения.**Сообщение I. Общая характеристика и классификация****Ice-Nucleating Proteins of Bacterial Origin.
Report I. General Characterization and Classification**

В обзоре даны общее описание и характеристика нуклеаторов белковой природы бактерий родов *Pseudomonas*, *Erwinia*, *Flavobacterium* и *Xanthomonas*. Рассмотрены предложенные типы классификации бактериальных нуклеаторов.

Ключевые слова: нуклеирующая активность, белки-нуклеаторы, бактерии, кристаллизация.

В обзорі подані загальний опис та характеристика нуклеаторів білкової природи бактерій родів *Pseudomonas*, *Erwinia*, *Flavobacterium* і *Xanthomonas*. Розглянуто запропоновані типи класифікації бактеріальних нуклеаторів.

Ключові слова: нуклеююча активність, білки-нуклеатори, бактерії, кристалізація.

A general description and characteristics of proteinaceous nucleators, which were found in the bacteria of genera *Pseudomonas*, *Erwinia*, *Flavobacterium* and *Xanthomonas*, are presented in the review. The suggested classification types of bacterial nucleators are discussed.

Key words: nucleating activity, nucleating proteins, bacteria, crystallization.

Молекулы воды стремятся к образованию льдоподобных агрегатов вследствие электростатического притяжения их полярных участков. По мере снижения температуры и замедления теплового движения молекул воды тенденция к агрегации усиливается, а вероятность возникновения критически большого кластера молекул быстро увеличивается. Формирование зародыша кристалла достаточно большого размера в результате спонтанной агрегации самих молекул воды называется гомогенной нуклеацией. Критический размер кластера при -5°C составляет около 45000 молекул воды, а при -40°C – лишь 70 [4, 28]. Таким образом, чистая вода при охлаждении до 0°C в условиях нормального атмосферного давления не замерзает спонтанно. Такое состояние называется переохлаждением. Капля абсолютно чистой воды замерзает в процессе гомогенной нуклеации приблизительно при -40°C .

В биологических системах примеси и чужеродные частицы, содержащиеся в воде, способны связывать молекулы воды на своей поверхности. Если агрегация молекул воды катализируется каким-либо веществом, то ее считают гетерогенной. Если молекулы воды ориентированы таким образом, что их расположение напоминает таковое в зародышевом кристалле льда, а их кластер достаточно велик, то в системе индуцируется гете-

Due to the electrostatic attraction between their polar parts, water molecules tend to form ice-like aggregates. As temperature drops and the thermal movement of water molecules decreases, the tendency to aggregation becomes stronger and the likelihood that a critically large cluster of molecules will emerge increases rapidly. When a critically large nucleus is formed by spontaneous aggregation of water molecules themselves, the nucleation is called homogenous. The critical size at -5°C is about 45,000 water molecules and at -40°C only 70 molecules [4, 28]. Thus, pure water cooled at atmospheric pressure does not spontaneously freeze at 0°C . This state is called supercooling. A drop of absolutely pure water freezes by homogenous nucleation at about -40°C .

In biological systems impurities or foreign particles that are usually present in water attach to water molecules on their surfaces. If aggregation of water molecules is catalyzed by a substance other than water molecules, the nucleation is referred to as heterogenous. As water molecules may be oriented in a way such as to resemble an ice nucleus, their cluster becomes large enough, and heterogenous nucleation is induced in the system. A substance that promotes the formation of such an embryo crystal is called an ice nucleator or an ice nucleating agent [14, 35]. As a rule heterogenous nucleation occurs within the temperature range of $-2...-15^{\circ}\text{C}$ and is affected in the first place

Институт проблем криобиологии и криомедицины
НАН Украины, г. Харьков

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

* Автор, которому необходимо направлять корреспонденцию: ул. Перяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.: (+38 057) 373-41-35, факс: (+38 057) 373-30-84, электронная почта: cryo@online.kharkov.ua

* To whom correspondence should be addressed: 23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015; tel.: +380 57 373 4135, fax: +380 57 373 3084, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

рогенная нуклеация. Вещество, которое способствует формированию зародышевого кристалла, называется нуклеатором льда или ледонуклеирующим агентом [14, 35]. Как правило, гетерогенная нуклеация происходит в диапазоне температур от -2 до -15°C и на нее влияют, в первую очередь, химическая природа и содержание веществ в замораживающей системе.

Все белки взаимодействуют с водой, но лишь две их группы имеют специфические функции, связанные с образованием льда – антифризные белки, способные ингибировать рост кристаллов льда [1, 2], и белки-нуклеаторы (БН), которые инициируют образование кристаллов льда. В настоящей работе будет описан только один класс веществ, влияющих на процесс кристаллизации – БН.

В табл. 1 приведена сравнительная характеристика нуклеирующей активности различных веществ [20].

Первые сведения о биологических нуклеаторах появились в 1974 году [18]. В гниющих листьях обнаружены бактерии, способные инициировать нуклеацию *Pseudomonas syringae*. В дальнейшем установлено, что нуклеирующая активность присуща еще 10 видам бактерий: *Pseudomonas viridiflava*, [21], *Pseudomonas fluorescens* [22], *Pseudomonas antarctica* [19], *Pseudomonas borealis* [31], *Pseudomonas putida* [15], *Flavobacterium sp.* [31], *Xanthomonas campestris* [9], *Erwinia herbicola* [17], *Erwinia ananas* [9], *Erwinia uredovora* [23].

Нуклеирующие лед бактерии встречаются в почве и на поверхности растений, распространены в умеренном климате и полярных зонах [6, 31].

Бактериальная нуклеация – необычный фазовый переход, катализируемый живыми организмами. Нуклеирующая активность присуща лишь некоторым грамотрицательным бактериям, но поскольку они широко распространены в природе, то это явление можно считать обычным. В то же время среди представителей рода *Pseudomonas* встречаются как с положительным, так и негативным по этому признаку фенотипом [11].

Агенты, ответственные за нуклеацию льда, расположены на внешней стороне мембраны бактериальных клеток (рисунок). Burke M.J. и Lindow S.E. предположили, что нуклеатором может быть цилиндр высотой 7,5 нм с дископодобной структурой на верхушке [4].

Температура нуклеации зависит не от концентрации бактерий и объема образца, а от количества бактерий в образце [34], что обусловлено локализацией БН бактерий на внешней поверхности мембраны и размером агрегатов БН (роль агрегации в катализе кристаллизации будет описана в следующем сообщении). В таком случае вероятность

by chemical nature and contents of substances that are present in a freezing system.

All proteins interact with water, but only two classes of proteins, antifreeze proteins, which are able to inhibit ice crystal growth [1, 2], and ice-nucleation proteins (INPs) inducing ice crystal formation, have functions that specifically relate to ice. In this work only one class of substances influencing crystallization – INPs is discussed.

The comparative description of ice-nucleating activities of various reagents is presented in Table 1 [20].

Biological nucleators were first reported in 1974 [18]. Ice-nucleating bacteria *Pseudomonas syringae* were found in rotten leaves. Thereafter 10 more species were demonstrated to have ice-nucleating activity: *Pseudomonas viridiflava*, [21], *Pseudomonas fluorescens* [22], *Pseudomonas antarctica* [19], *Pseudomonas borealis* [31], *Pseudomonas putida* [15], *Flavobacterium sp.* [31], *Xanthomonas campestris* [9], *Erwinia herbicola* [17], *Erwinia ananas* [9], *Erwinia uredovora* [23].

Таблица 1. Сравнение температур нуклеации различных субстанций

Table 1. Comparison of the ice-nucleating temperatures of various substances

| Субстанция (0,22 мг белка/мл) Substance (0.22 mg protein/mg) | Температура нуклеации, °C* Ice-nucleating temperature, °C* | | |
|--|---|-----------------|-----------------|
| | T ₁₀ | T ₅₀ | T ₉₀ |
| Внеклеточные ледонуклеирующие структуры Extracellular ice-nucleating structures | -3,0 | -3,2 | -3,4 |
| БН INP | -8,7 | -9,6 | -10,1 |
| Иодид серебра (оптическая плотность при 660 нм составляет 0,1) Silver iodide (optical density at 660 nm is 0.1) | -7,0 | -7,8 | -8,2 |
| α -амилаза α -amilase | -17,5 | -19,7 | -21,3 |
| Казеин Casein | -17,5 | -21,1 | -22,0 |
| Каталаза Catalase | -18,6 | -19,8 | -21,7 |
| Альбумин Albumin | -18,6 | -19,5 | -22,0 |
| β -галактозидаза β -galactosidase | -16,0 | -19,9 | -22,0 |
| 10 мМ фосфатный буфер, pH 7,0 10 mM potassium phosphate buffer (pH 7.0) | -20,0 | -21,1 | -20,0 |

Примечание: * – температура, необходимая для замораживания: 10 % материала – T₁₀, 50% – T₅₀ и 90% – T₉₀.

Note: * – temperatures required to freeze 10% (T₁₀), 50% (T₅₀), and 90% (T₉₀) of the material.



Трансмиссионная электронная микроскопия ледонуклеирующей бактерии *P. viridiflava* KUIN-3. Стрелки указывают на нуклеирующие агенты. Отрезок на фотографии соответствует 0,5 мкм [12].

Transmission electron micrograph of the ice-nucleating bacterium *P. viridiflava* KUIN-3. The arrows show ice-nucleating agents. The bar indicates 0.5 μm [12].

зарождения кристалла льда определяется количеством и качеством агрегатов, а не объемом, в котором они распределены.

Кроме того, существуют штаммы *P. fluorescens* [24], *E. uredovora* [13], *E. herbicola* [25] и *Erwinia carotovora* [8], которые экскретируют нуклеирующие агенты в культуральную жидкость.

Выделяют 3 класса нуклеирующих агентов, продуцируемых бактериями. Клетки, активные при -5°C или выше, от $-5\text{...}-8$ и -10°C , произвольно обозначены как тип активности I, II и III соответственно (табл. 2). Однако причины таких различий окончательно не выяснены. Кроме того, в литературе также используют термины “теплые” и “холодные” нуклеирующие агенты для нуклеаторов, способных инициировать кристаллизацию при температурах выше -5°C и ниже -8°C соответственно [6].

При исследовании культур бактерий с ледонуклеирующей активностью отмечено, что небольшая часть клеток в культуре способна инициировать нуклеацию при температуре выше -5°C . Например, при -2°C менее 10^{-6} от всех клеток в культуре содержат зародышевые кристаллы льда [5], количество которых при понижении температуры увеличивается, однако даже в очень активных культурах бактерий не каждая клетка содержит зародыш кристалла льда в конкретный момент времени. Это можно интерпретировать как “временной срез” динамической ситуации, при которой клетки время от времени обладают ледонуклеирующей активностью, или как способность только части клеток популяции производить функциональный зародышевый кристалл [6]. Накопленная информация свидетельствует в пользу первого предположения,

Ice-nucleating bacteria are identified in soil and on plants; they are spread both in the temperate climate and in the polar zones [6, 31].

Bacterial ice nucleation represents an unusual case of a phase transition catalyzed by biological entities. Although bacterial ice nucleation is limited to some gram-negative species, they are ubiquitously spread in nature, which makes this phenomenon common. At the same time there are both ice-nucleating-positive and ice-nucleating-negative bacteria among the specimens of the genera *Pseudomonas* [11].

Agents located on the outer membrane of the bacterial cells are responsible for the ice nucleation (Figure). Burke M.J. and Lindow S.E. proposed that the most likely nucleation structure consisted of a disk-like ice nucleator on top of a cylinder that is 7.5 nm high [4].

The nucleation temperature depends not on bacterium concentration or on a sample volume, but on the quantity of bacteria in the sample [34], which is likely to be due to location of INPs on the bacterial surface and INP aggregate sizes (the role of aggregation in crystallization catalysis will be described in the next report). The probability of nucleation is then related to numbers and quality of aggregates and not to the volume in which the aggregates are distributed.

Besides, the strains *P. fluorescens* [24], *E. uredovora* [13], *E. herbicola* [25] and *Erwinia carotovora* [8] were reported to release the extracellular nucleating materials into the culture fluid.

Bacterial nucleating agents were classified in 3 types. Cells active at -5°C or warmer, at $-5\text{...}-8^{\circ}\text{C}$ or at -10°C were arbitrarily assigned as type I, type II, or type III activity, respectively (Table 2). Nevertheless roots of these differences were still unclear. Also, the terms “warm” and “cold” nucleating agents capable for initiating crystallization at the temperatures warmer than -5°C and colder than -8°C , respectively, are used in literature [6].

The studies in ice-nucleating bacterium cultures revealed that few cells in the culture were active as ice catalysts at temperatures warmer than -5°C . For example, less than 10^{-6} of all cells in a culture contain ice nuclei at -2°C [5]. Ice nuclei active at colder temperatures are much more numerous, however even in very active cultures not every cell contains an ice nucleus at a given time. It can be interpreted either as a “snapshot” of a dynamic situation whereby cells only transiently express ice nucleation activity or as ability of only a small subset of the cell population to produce a functional ice nucleus [6]. All available information suggests that the former hypothesis is correct, since subtle changes in the environment of cells can cause preformed INPs in cells to rapidly produce ice-nucleating sites [16, 26]. In addition to it different strains of a bacterial species differ greatly in their ability to

так как при небольших изменениях в окружающей среде заранее накопленные БН начнут быстро производить сайты нуклеации [16, 26]. Кроме того, различные штаммы могут существенно отличаться способностью формировать зародыши кристаллов льда. В одних штаммах практически каждая клетка активна при -10°C , а в других при той же температуре на каждые 10 млн клеток не всегда встречается клетка с нуклеирующей активностью [10].

Зависимость локусов замерзания, нормированная на количество клеток, от температуры называется кумулятивным спектром [29]. После исследования кумулятивных спектров некоторых бактериальных культур было отмечено, что в спектре присутствуют три четко различимые области, что подразумевает существование трех классов нуклеирующих структур [27] (табл. 2). Было предложено разделить ледонуклеирующие структуры на классы А, В и С на основании изучения физических свойств и химической природы. Соответствие структур, обозначенных как тип I, и структур, входящих в класс А неоспоримо, однако классификация на основе температурных диапазонов нуклеации несовершенна, поскольку при таком подходе компоненты с характеристиками, промежуточными между свойствами структур классов А и В, трудно различить. Поэтому Turner M.A. *et al.* считают, что предложенная ими классификация имеет преимущество, так как она базируется на основном различии физических свойств представителей разных классов: способности вызывать нуклеацию тяжелой воды, которая определяется как разница между температурой замерзания D_2O и H_2O [27]. Существенным фактором является более высокая способность D_2O (по сравнению с H_2O) взаимодействовать с гидрофобными областями белковых молекул [3]. Структуры класса А, которые в большей степени способны нуклеировать D_2O , более гидрофобны, чем структуры класса В [27]. Структуры класса С достаточно эффективно нуклеируют D_2O и, воз-

produce ice nuclei. In some strains, nearly every bacterial cell is active at -10°C ; in other strains fewer than one in 10^7 of the cells are active at the same temperature [10].

A plot of freezing nucleus units *per* bacterial cell *versus* temperature is called a cumulative nucleation spectrum [29]. After cumulative spectra of several bacterial cultures had been investigated, it became apparent that there were three distinguishable areas in them, which implied existence of three classes of nucleating structures [27] (Table 2). It was proposed to divide ice-nucleating structures into classes A, B and C on the grounds of studies of their physical properties and chemical nature. Although there is irrefutable correspondence, for example, between type I and class A structures, classification based on nucleation temperature diapasons is imperfect, since this approach makes discrimination of components that have properties midway between those of class A and class B structures difficult. That is why Turner M.A. *et al.* think that the classification proposed by them has an advantage, as it is based on the main difference in physical properties of specimens from the different classes: capacity for nucleation of heavy water, which is defined as difference between freezing temperatures of D_2O and H_2O [27]. The most pertinent for this

Таблица 2. Классификация БН бактериального происхождения
Table 2. Bacterial INPs classification

| Тип классификации и свойства нуклеаторов Classification and nucleator properties | Описание нуклеаторов Description of nucleators | | |
|---|---|---|---|
| Классификация нуклеирующих бактерий/агентов [33] Classification of nucleating bacteria/agents [33] | Тип I Type I | Тип II Type II | Тип III Type III |
| Классификация нуклеирующих агентов [27] Classification of nucleating agents [27] | Класс А Class A | Класс В Class B | Класс С Class C |
| Температура, при которой активны представители данного класса Temperature, at which specimens of this class are active | $-5...-4,5^{\circ}\text{C}$ и выше $-5...-4,5^{\circ}\text{C}$ and warmer | $-5...-8^{\circ}\text{C}/$ $-6...-7^{\circ}\text{C}$ | $-8...-10^{\circ}\text{C}$ и ниже $-8...-10^{\circ}\text{C}$ and colder |
| Способность к нуклеации переохлажденной D_2O Capacity for nucleation of supercooled D_2O | Высокоактивные Highly active | Слабоактивные Low active | Среднеактивные Medium active |
| Химическая природа Chemical nature | Липогликопротеид Lipoglycoprotein | Гликопротеид Glycoprotein | Протеин Protein |
| Молекулярная масса Molecular weight | 155 кДа (образуют агрегаты с молекулярной массой около 8,7 МДа) 155 kDa (form aggregates with molecular weight of about 8.7 MDa) | | 120 кДа (образуют агрегаты с молекулярной массой свыше 1000 кДа) 120 kDa (form aggregates with molecular weight more than 1,000 kDa) |

можно, являются более гидрофобными по сравнению со структурами класса В. Хотя данный метод не позволяет выявить отличия классов А и С, их структуры характеризуются различной чувствительностью к изменению рН, органическим растворителям и гидролазам.

Чтобы агент был способен формировать зародышевый кристалл необходимы следующие условия: пространственное сходство с кристаллической решеткой льда; небольшой поверхностный заряд и высокая гидрофобность [7]. Наиболее полно этим требованиям отвечают структуры класса А.

Таким образом, нуклеаторы бактерий – это агенты, инициирующие кристаллизацию при высоких отрицательных температурах (–5...–4,5°C и выше) (табл. 2) и расположенные либо на внешней стороне мембран бактерий, либо экскретируемые в культуральную среду. В настоящее время их принято подразделять на 3 класса в зависимости от активности и природы составляющих компонентов. Биологическая функция БН определена их структурой. При исследовании этих соединений возникла нестандартная ситуация: гены БН ряда бактерий охарактеризованы детально в ранних работах [30, 32], а вторичная и третичная структуры БН оставались долгое время предметом теоретических предположений и лишь сравнительно недавно появились экспериментальные работы по этим проблемам. Вопросы, связанные со структурой БН и организацией их генов, будут освещены в следующем сообщении.

system factor is the increased ability of D₂O (as compared to H₂O) to interact with hydrophobic domains of proteins [3]. The class A structures, which nucleate D₂O to a greater extent, are more hydrophobic than the class B structures are [27]. The class C structures can rather effectively nucleate D₂O and appear to be more hydrophobic than the class B structures are. While this approach does not distinguish class A from class C, their structures differ by pH, organic solvent and hydrolase sensitivities.

The following conditions are necessary for an agent to form an embryo crystal: spatial likeness to ice crystal lattice; little surface charge and high hydrophobicity [7]. The class A structures are best suited for these requirements.

Thus, bacterial ice nucleators are agents initiating crystallization at warm negative temperatures (–5...–4.5°C and warmer) (Table 2) located either on outer membranes of bacterial cells or released into culture media. At present it is accepted to subdivide them into 3 classes depending on their activity and identity of their components. Biological function of INPs is determined by their structure. An atypical situation arose when these compounds were studied: INP genes of a number of bacteria were characterized in the early works [30, 32], while secondary and tertiary structures of INPs remained a subject of theoretical assumptions for a long time, and only recently experimental researches in these problems were reported. The issues concerning INP structure and their gene organization will be discussed in the next report.

Литература

1. Гулевский А.К., Релина Л.И. Антифризные белки. Сообщение I. Классификация и механизм действия // Пробл. криобиологии.– 2009.– Т. 19, №1.– С. 18–24.
2. Гулевский А.К., Релина Л.И. Антифризные белки. Сообщение II. Распространение в природе // Пробл. криобиологии.– 2009.– Т. 19, №2.– С. 121–136.
3. Ahmed A.I., Osuga D.T., Feeney R.E. Anti-freeze protein from fishes: freezing behavior in H₂O and D₂O // Biochem. Int.– 1980.– Vol. 1, N1.– P. 41–46.
4. Burke M.J., Lindow S.E. Surface properties and size of the ice nucleation site in ice nucleation active bacteria: Theoretical considerations // Cryobiology.– 1990.– Vol. 27, N1.– P. 80–84.
5. Govindarajan A.G., Lindow S.E. Size of bacterial ice-nucleation sites measured *in situ* by radiation inactivation analysis // Proc. Natl. Acad. Sci. USA.– 1988.– Vol. 85, N5.– P. 1334–1338.
6. Gurian-Sherman D., Lindow S.E. Bacterial ice nucleation: significance and molecular basis // FASEB J.– 1993.– Vol. 7, N14.– P. 1338–1343.
7. Franks F. Biophysics and biochemistry at low temperatures.– Tokyo: Japan UNI Agency, 1985.– P. 36–37.
8. Fukuoka S., Kamishima H., Tamiya E., Karube I. Spontaneous release of outer membrane vesicles by *Erwinia carotovora* // Microbios.– 1992.– Vol. 72, N292–293.– P. 167–173.
9. Hew C.L., Yang D.S. Protein interaction with ice // Eur. J. Biochem.– 1992.– Vol. 203, N1–2.– P. 33–42.

References

1. Gulevsky A.K., Relina L.I. Antifreeze proteins. Report I. Classification and mechanism of action // Problems of Cryobiology.– 2009.– Vol. 19, N1.– P. 18–24.
2. Gulevsky A.K., Relina L.I. Antifreeze proteins. Report II. Occurrence in nature // Problems of Cryobiology.– 2009.– Vol. 19, N2.– P. 121–136.
3. Ahmed A.I., Osuga D.T., Feeney R.E. Anti-freeze protein from fishes: freezing behavior in H₂O and D₂O // Biochem. Int.– 1980.– Vol. 1, N1.– P. 41–46.
4. Burke M.J., Lindow S.E. Surface properties and size of the ice nucleation site in ice nucleation active bacteria: Theoretical considerations // Cryobiology.– 1990.– Vol. 27, N1.– P. 80–84.
5. Govindarajan A.G., Lindow S.E. Size of bacterial ice-nucleation sites measured *in situ* by radiation inactivation analysis // Proc. Natl. Acad. Sci. USA.– 1988.– Vol. 85, N5.– P. 1334–1338.
6. Gurian-Sherman D., Lindow S.E. Bacterial ice nucleation: significance and molecular basis // FASEB J.– 1993.– Vol. 7, N14.– P. 1338–1343.
7. Franks F. Biophysics and biochemistry at low temperatures.– Tokyo: Japan UNI Agency, 1985.– P. 36–37.
8. Fukuoka S., Kamishima H., Tamiya E., Karube I. Spontaneous release of outer membrane vesicles by *Erwinia carotovora* // Microbios.– 1992.– Vol. 72, N292–293.– P. 167–173.
9. Hew C.L., Yang D.S. Protein interaction with ice // Eur. J. Biochem.– 1992.– Vol. 203, N1–2.– P. 33–42.

10. Hirano S.S., Maher E.A., Kelman A. et al. Ice nucleation activity of fluorescent plant pathogenic pseudomonads // In: Proceedings of the 4th International conference on Plant Pathogenic Bacteria, Angers, France.– Beaucouze, France, 1978.– Vol. 2.– P. 717–725.
11. Hwang M.S., Morgan R.L., Sarkar S.F. et al. Phylogenetic characterization of virulence and resistance phenotypes of *Pseudomonas syringae* // Appl. Environ. Microbiol.– 2005.– Vol. 71, N9.– P. 5182–5191.
12. Kawahara H. The structures and functions of ice crystal-controlling proteins from bacteris // J. Biosci. Bioeng.– 2002.– Vol. 94, N6.– P. 492–496.
13. Kawahara H., Mano Y., Obata H. Purification and charectirization of extracellular ice-nucleating matter from *Erwinia uredovora* KUIN-3 // Biosci. Biotechnol. Biochem.– 1993.– Vol. 57, N6.– P. 1429–1432.
14. Knight C.A. The freezing of supercooled liquids.– London: Princeton, Van Nostrand Momentum Books, 1967.– 145 p.
15. Lee M.R., Lee R.E.Jr., Strong-Gunderson J.M. et al. Isolation of ice-nucleating active bacteria from the freeze-tolerant frog, *Rana sylvatica* // Cryobiology.– 1995.– Vol. 32, N4.– P.358–365.
16. Lindow S.E. Kinetics of changes in ice nucleation activity of *Pseudomonas syringae* following temperature shifts // Phytopathology.– 1983.– Vol. 73, N7.– P. 809.
17. Lindow S.E., Army D.C., Upper C.D. Distribution of ice nucleation active bacteria on plants in nature // Appl. Environ. Microbiol.– 1978.– Vol. 36, N6.– P. 831–838.
18. Maki L.R., Galyan E.L., Chang-Chein M. et al. Ice nucleation induced by *Pseudomonas syringae* // Appl. Microbiol.– 1974.– Vol. 28, N3.– P. 456–460.
19. Muryoi N., Kawahara H., Obata H. Properties of a novel extracellular cell-free ice nuclei from ice-nucleating *Pseudomonas antarctica* IN-74 // Biosci. Biotechnol. Biochem.– 2003.– Vol. 67, N9.– P. 1950–1958.
20. Muryoi N., Matsukawa K., Yamade K. et al. Purification and properties of an ice-nucleating protein from an ice-nucleating bacterium, *Panthoea ananatis* KUIN-3 // J. Biosci. Bioeng.– 2003.– Vol. 95, N2.– P. 157–163.
21. Obata H., Nakai T., Tanishita J. et al. Identification of an ice-nucleating bacterium and its ice nucleation properties // J. Ferment. Bioeng.– 1989.– Vol. 67, Issue 3.– P. 143–147.
22. Obata H., Saeki Y., Tanishita J. et al. Identification of an ice-nucleating bacterium KUIN-1 as *Pseudomonas fluorescens* and its ice nucleation properties // Agric. Biol. Chem. 1987.– Vol. 51, N7.– P. 1761–1766.
23. Obata H., Takinami K., Tanishita J. et al. Identification of a new ice-nucleating bacterium and its ice nucleation properties // Agric. Biol. Chem.– 1990.– Vol. 54, N3.– P. 725–730.
24. Obata H., Tanaka T., Kawahara H. et al. Properties of cell-free ice nuclei from ice nucleation-active *Pseudomonas fluorescens* KUIN-1 // J. Ferment. Bioeng. – 1993. – Vol. 76, Issue 1.– P. 19–24.
25. Phelps P., Giddings T.H., Prochoda M. et al. Release of cell-free ice nuclei by *Erwinia herbicola* // J. Bacteriol.– 1986.– Vol. 167, N2.– P. 496–502.
26. Rogers J.S., Stall R.E., Burke M.J. Low temperature conditioning of the ice nucleation active bacterium, *Erwinia herbicola* // Cryobiology.– 1987.– Vol.24, N3.– P. 270–279.
27. Turner M.A., Arellano F., Kozloff L.M. Three separate classes of bacterial ice nucleation structures // J. Bacteriol.– 1990.– Vol. 172, N5.– P. 2521–2526.
28. Vali G. Principles of ice nucleation: In Biological ice nucleation and its applications / Ed. by R.E. Lee Jr., G.J. Warren, L.V. Gusta.– St. Paul: APS Press, 1995.– P. 1–28.
29. Valli G., Stansbury E.J. Time dependent characteristics of the heterogeneous nucleation of ice // Can. J. Phys.– 1966.– Vol. 44, N8.– P. 477–502.
30. Warren G.J., Corroto L.V., Wolber P.K. Conserved repeats in diverged ice nucleation structural genes from two species
10. Hirano S.S., Maher E.A., Kelman A. et al. Ice nucleation activity of fluorescent plant pathogenic pseudomonads // In: Proceedings of the 4th International conference on Plant Pathogenic Bacteria, Angers, France.– Beaucouze, France, 1978.– Vol. 2.– P. 717–725.
11. Hwang M.S., Morgan R.L., Sarkar S.F. et al. Phylogenetic characterization of virulence and resistance phenotypes of *Pseudomonas syringae* // Appl. Environ. Microbiol.– 2005.– Vol. 71, N9.– P. 5182–5191.
12. Kawahara H. The structures and functions of ice crystal-controlling proteins from bacteris // J. Biosci. Bioeng.– 2002.– Vol. 94, N6.– P. 492–496.
13. Kawahara H., Mano Y., Obata H. Purification and charectirization of extracellular ice-nucleating matter from *Erwinia uredovora* KUIN-3 // Biosci. Biotechnol. Biochem.– 1993.– Vol. 57, N6.– P. 1429–1432.
14. Knight C.A. The freezing of supercooled liquids.– London: Princeton, Van Nostrand Momentum Books, 1967.– 145 p.
15. Lee M.R., Lee R.E.Jr., Strong-Gunderson J.M. et al. Isolation of ice-nucleating active bacteria from the freeze-tolerant frog, *Rana sylvatica* // Cryobiology.– 1995.– Vol. 32, N4.– P.358–365.
16. Lindow S.E. Kinetics of changes in ice nucleation activity of *Pseudomonas syringae* following temperature shifts // Phytopathology.– 1983.– Vol. 73, N7.– P. 809.
17. Lindow S.E., Army D.C., Upper C.D. Distribution of ice nucleation active bacteria on plants in nature // Appl. Environ. Microbiol.– 1978.– Vol. 36, N6.– P. 831–838.
18. Maki L.R., Galyan E.L., Chang-Chein M. et al. Ice nucleation induced by *Pseudomonas syringae* // Appl. Microbiol.– 1974.– Vol. 28, N3.– P. 456–460.
19. Muryoi N., Kawahara H., Obata H. Properties of a novel extracellular cell-free ice nuclei from ice-nucleating *Pseudomonas antarctica* IN-74 // Biosci. Biotechnol. Biochem.– 2003.– Vol. 67, N9.– P. 1950–1958.
20. Muryoi N., Matsukawa K., Yamade K. et al. Purification and properties of an ice-nucleating protein from an ice-nucleating bacterium, *Panthoea ananatis* KUIN-3 // J. Biosci. Bioeng.– 2003.– Vol. 95, N2.– P. 157–163.
21. Obata H., Nakai T., Tanishita J. et al. Identification of an ice-nucleating bacterium and its ice nucleation properties // J. Ferment. Bioeng.– 1989.– Vol. 67, Issue 3.– P. 143–147.
22. Obata H., Saeki Y., Tanishita J. et al. Identification of an ice-nucleating bacterium KUIN-1 as *Pseudomonas fluorescens* and its ice nucleation properties // Agric. Biol. Chem. 1987.– Vol. 51, N7.– P. 1761–1766.
23. Obata H., Takinami K., Tanishita J. et al. Identification of a new ice-nucleating bacterium and its ice nucleation properties // Agric. Biol. Chem.– 1990.– Vol. 54, N3.– P. 725–730.
24. Obata H., Tanaka T., Kawahara H. et al. Properties of cell-free ice nuclei from ice nucleation-active *Pseudomonas fluorescens* KUIN-1 // J. Ferment. Bioeng. – 1993. – Vol. 76, Issue 1.– P. 19–24.
25. Phelps P., Giddings T.H., Prochoda M. et al. Release of cell-free ice nuclei by *Erwinia herbicola* // J. Bacteriol.– 1986.– Vol. 167, N2.– P. 496–502.
26. Rogers J.S., Stall R.E., Burke M.J. Low temperature conditioning of the ice nucleation active bacterium, *Erwinia herbicola* // Cryobiology.– 1987.– Vol. 24, N3.– P. 270–279.
27. Turner M.A., Arellano F., Kozloff L.M. Three separate classes of bacterial ice nucleation structures // J. Bacteriol.– 1990.– Vol. 172, N5.– P. 2521–2526.
28. Vali G. Principles of ice nucleation: In Biological ice nucleation and its applications / Ed. by R.E. Lee Jr., G.J. Warren, L.V. Gusta.– St. Paul: APS Press, 1995.– P. 1–28.
29. Valli G., Stansbury E.J. Time dependent characteristics of the heterogeneous nucleation of ice // Can. J. Phys.– 1966.– Vol. 44, N8.– P. 477–502.
30. Warren G.J., Corroto L.V., Wolber P.K. Conserved repeats in diverged ice nucleation structural genes from two species

of *Pseudomonas* // Nucleic Acids Res.– 1986.– Vol. 14, N20. – P. 8047–8060.

31. Wilson S.L., Kelley D.L., Walker V.K. Ice-active characteristics of soil bacteria selected by ice-affinity // Environ. Microbiol.– 2006.– Vol. 8, N10.– P. 1816–1824.
32. Wu Z., Qin L., Walker V.K. Characterization and recombinant expression of a divergent ice nucleation protein from *Pseudomonas borealis* // Microbiology.– 2009.– Vol. 155, Pt. 4.– P. 1164–1169.
33. Yankovsky S.A., Levin Z., Bertold T. et al. Some basic characteristics of bacterial freezing nuclei // J. Appl. Meteorol.– 1981.– Vol. 20, Issue 9.– P. 1013–1019.
34. Zachariassen K.E., Hammel H.T. The effect of ice nucleating agents on ice nucleating activity // Cryobiology.– 1988.– Vol. 25, N2.– P. 143–147.
35. Zachariassen K.E., Kristiansen E. Ice nucleation and anti-nucleation in nature // Cryobiology.– 2000.– Vol. 41, N4.– P. 257–279.

Поступила 29.12.2009
Рецензент В.В. Рязанцев

of *Pseudomonas* // Nucleic Acids Res.– 1986.– Vol. 14, N20. – P. 8047–8060.

31. Wilson S.L., Kelley D.L., Walker V.K. Ice-active characteristics of soil bacteria selected by ice-affinity // Environ. Microbiol.– 2006.– Vol. 8, N10.– P. 1816–1824.
32. Wu Z., Qin L., Walker V.K. Characterization and recombinant expression of a divergent ice nucleation protein from *Pseudomonas borealis* // Microbiology.– 2009.– Vol. 155, Pt. 4.– P. 1164–1169.
33. Yankovsky S.A., Levin Z., Bertold T. et al. Some basic characteristics of bacterial freezing nuclei // J. Appl. Meteorol.– 1981.– Vol. 20, Issue 9.– P. 1013–1019.
34. Zachariassen K.E., Hammel H.T. The effect of ice nucleating agents on ice nucleating activity // Cryobiology.– 1988.– Vol. 25, N2.– P. 143–147.
35. Zachariassen K.E., Kristiansen E. Ice nucleation and anti-nucleation in nature // Cryobiology.– 2000.– Vol. 41, N4.– P. 257–279.

Accepted in 29.12.2009