

УДК 577.112:576.8

А.К. Гулевский, Л.И. Релина\*

## Белки-нуклеаторы бактериального происхождения.

Сообщение III. Регуляция активности и значение  
в природе и биотехнологии

UDC 577.112:576.8

A.K. GULEVSKY, L.I. RELINA\*

## Ice-Nucleating Proteins of Bacterial Origin. Report III. Activity Regulation and Significance in Nature and Biotechnology

В обзоре представлены накопленные сведения о регуляции активности бактериальных белков-нуклеаторов, рассмотрены основные области применения биологических нуклеаторов и кодирующих их генов в биотехнологии.

**Ключевые слова:** белки-нуклеаторы, нуклеирующая активность, гены белков-нуклеаторов, психрофильные бактерии.

В обзорі наведено накоплені відомості стосовно регуляції активності бактеріальних білків-нуклеаторів, розглянуто основні галузі застосування біологічних нуклеаторів та генів, які їх кодують, в біотехнології.

**Ключові слова:** білки-нуклеатори, нуклеююча активність, гени білків-нуклеаторів, психрофільні бактерії.

The information that has been gathered so far on the regulation of bacterial nucleation protein activity is presented in the review; the main fields of applications of biological nucleators and their encoding genes in biotechnology are discussed.

**Key words:** nucleating proteins, nucleating activity, nucleating protein genes, psychrophilic bacteria.

Некоторые виды бактерий способны катализировать образование кристаллов льда в диапазоне  $-10...-2^{\circ}\text{C}$ , что гораздо выше, чем температура нуклеации большинства органических и неорганических веществ [9]. Так как эти бактерии широко распространены в природе, они существенно влияют на холодостойчивость растений. Кроме того, благодаря уникальным свойствам бактериальных нуклеаторов и особенностям структуры их генов они являются перспективным объектом для использования в различных областях биотехнологии. Для более полного понимания значения таких нуклеаторов в природе и поиска наиболее эффективных путей применения необходимо изучить механизм действия и регуляции их активности. Основные идеи [9, 39, 41, 42] мы представили в предыдущем сообщении, посвященном молекулярным основам нуклеации льда. В настоящем сообщении мы рассмотрим вопросы регуляции нуклеирующей активности, значение бактериальных нуклеаторов в природе и основные направления их использования в биотехнологии.

### Регуляция нуклеирующей активности

Как правило, культивируемые при  $30^{\circ}\text{C}$  ледонуклеирующие бактерии не обладают значимой нуклеи-

Some species of bacteria can catalyze the formation of ice crystals within the range of  $-10...-2^{\circ}\text{C}$ , which is higher than the nucleation temperature of the most organic and in-organic substances [9]. As these bacteria are widespread in nature they significantly affect plant cold resistance. In addition due to unique properties of bacterial nucleating agents and peculiarities of their gene structure they are perspective objects for using in different fields of biotechnology. For more complete understanding the significance of these nucleating agents in nature and search for the most effective ways of using them it is necessary to study their activity action and regulation mechanisms. In the previous report, concerning molecular grounds of ice nucleation, we presented the main ideas [9, 39, 41, 42]. In this report we discuss the tasks of regulation of nucleating activity, significance of bacterial nucleating agents in nature and the main directions of their application in biotechnology.

### Regulation of nucleating activity

As a rule the ice-nucleating bacteria cultured at  $30^{\circ}\text{C}$  have no significant nucleating activity, but when they're growing under temperature below  $20^{\circ}\text{C}$  it sig-

Институт проблем криобиологии и криомедицины  
НАН Украины, г. Харьков

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

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

\* 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

рующей активностью, но при выращивании их при температуре ниже 20°C, она значительно возрастает [10, 14]. Известно, что показатель выживаемости *Pseudomonas syringae* после замораживания увеличивается, если клетки, выращенные при 30°C, подвергнуть экспозиции при 12°C [1]. По-видимому, ледонуклеирующие бактерии способны к холодной акклимации. Наибольшую нуклеирующую активность проявляли *P. syringae*, выращенные при 15...20°C [10]. Снижение температуры роста до 9°C или ее увеличение свыше 25°C приводило к резкому уменьшению нуклеирующей активности (в 1000–10000 раз). Однако эти результаты противоречат экспериментальным данным, полученным на *Erwinia herbicola* [33]. Клетки *E. herbicola*, перенесенные в среду с температурой 5°C, обладали повышенной нуклеирующей активностью, но не росли при 5°C, а только "активировались". Поэтому эти данные не позволяют судить о влиянии температуры роста на нуклеирующую активность. Тем не менее для "активации" при 5°C необходим активный метаболизм, возможно синтез белка, так как этот процесс не реализуется в среде, не содержащей аминокислот [33]. Этот вывод подтверждается и тем фактом, что низкотемпературная "активация" не происходит в присутствии хлорамфеникола и стрептомицина, которые ингибируют синтез белка.

Согласно [10] количество молекул белка-нуклеатора (БН) на клетку *P. syringae* почти не варьирует при росте в диапазоне температур от 15 до 30°C, однако способность этого белка образовывать сайты нуклеации существенно меняется в зависимости от температуры роста. Температура роста в пределах 24...30°C также практически не влияет на экспрессию генов БН в трансформированной *Escherichia coli* [11]. В то же время количество сайтов нуклеации и температура, при которой они обнаруживаются, зависят от температуры роста как у ледонуклеирующих бактерий *P. syringae* и *E. herbicola*, так и у *E. coli*, несущей клонированные гены БН [31]. Температура роста может влиять на посттрансляционную модификацию БН, его стабильность и конформацию, эффективность транспорта через мембрану и размещение на поверхности мембраны. Известно, что бактерии изменяют состав жирных кислот мембран в ответ на колебания температуры роста [6], что может влиять на стабильность агрегатов БН. Возможно, крупные агрегаты чрезвычайно чувствительны к изменению физических свойств мембраны. Логично предположить, что наиболее чувствительными являются нуклеирующие агенты, активные при высоких температурах нуклеации –2...–5°C [11].

Появление БН и сопутствующий ему фенотип активной нуклеации у различных бактерий проявляются по-разному. Так, продукт гена *inaZ* *P. syrin-*

nificantly increases [10, 14]. It has been known that post-thaw integrity of *Pseudomonas syringae* increases, if the cells, cultivated at 30°C, underwent a 12°C exposure [1]. Seemingly ice-nucleating bacteria are capable of cold acclimation. The *P. syringae*, grown at 15...20°C [10], manifested the highest nucleating activity. Decrease of growth temperature down to 9°C or its increase above 25°C resulted in sharp reduction of nucleating activity (in 1,000–10,000 times). However, these results are in conflict with experimental data, derived in *Erwinia herbicola* [33]. The *E. herbicola* cells, transferred into the medium with 5°C temperature had increased nucleating activity, they did not grow at 5°C, but only were "activated". Therefore these data do not enable to estimate the effect of growth temperature on nucleating activity. Nevertheless an active metabolism, probably protein synthesis, are necessary for "activation" at 5°C, as this process is not realized in medium without amino acids [33]. This conclusion is confirmed with that fact that low-temperature "activation" does not occur in the presence of chloramphenicol and streptomycin, inhibiting protein synthesis.

As reported in [10] a number of ice nucleating protein (INP) molecules per *P. syringae* cell almost does not vary within the range of temperatures from 15 to 30°C, however the ability of this protein to form the nucleation sites significantly changes in dependence on growth temperature. The growth temperature within the ranges of 24...30°C also almost does not affect the INP genes' expression in transformed *Escherichia coli* [11]. At the same time a number of nucleation sites and temperature, within which they are observed, depend on growth temperature not only in ice-nucleating *P. syringae* and *E. herbicola* bacteria, but also in *E. coli*, carrying the cloned INP genes [31]. The growth temperature may affect the post-translated modification of INP, its stability and conformation, transportation efficiency through membrane and location on membrane surface. It has been known that bacteria change the composition of fatty acids in membranes in response to variations of growth temperatures [6], likely affecting the stability of INP aggregates. Probably the large aggregates are extremely sensitive to the change of membrane physical properties. The most sensitive ones may be logically supposed to be the nucleating agents, active at high temperatures of nucleation 2...–5°C [11].

The appearance of INP and accompanying phenotype of active nucleation in various bacteria are differently manifested. Herewith the *P. syringae inaZ* gene product appears in stationary phase, that is accompanied by growth of nucleating activity, and *Pseudomonas fluorescens inaW* gene product

*gae* появляется во время стационарной фазы, что сопровождается ростом нуклеирующей активности, а продукт гена *inaW Pseudomonas fluorescens* присутствует на относительно постоянном уровне в течение всех фаз роста, нуклеирующая активность также сохраняется на постоянном уровне [7].

Трансгенным растениям требуется по крайней мере 2-дневная экспозиция при околонулевых температурах для максимального накопления БН [38]. Хотя количество мРНК БН не зависит от температуры, наиболее эффективно БН накапливается после холодной "закалки". Авторы предполагают, что БН более стабилен при низких температурах.

Для каждого этапа формирования сложного липогликопротеинового комплекса требуется отдельный фермент, а, следовательно, возникает вопрос об источнике информации для этих ферментов. Сами гены БН, особенно когда они локализируются в плаزمиде трансформированных клеток *E. coli*, не могут обеспечить информацию для целого ряда новых ферментов. Не исключено, что протеиновые продукты генов БН активируют другие бактериальные гены, которые в норме являются криптическими [12, 20], и таким образом готовят биохимический аппарат для формирования всего нуклеирующего липогликопротеинового комплекса.

Стабильность нуклеаторов во времени существенно отличается. Так, нуклеирующие агенты *E. herbicola* демонстрировали неизменную активность от эксперимента к эксперименту [33], тогда как нуклеаторы *P. syringae* оказались нестабильными [28].

### **Значение бактериальных нуклеаторов в природе**

Описанные бактерии с ледонуклеирующей активностью принадлежат к психрофильным или мезофильным эпифитам [15], поэтому кристаллизация, вызванная бактериями может причинять вред многим видам растений. Большинство растительных тканей хорошо переохлаждается, в то время как повреждения в результате замораживания происходят при температуре выше  $-5^{\circ}\text{C}$  [24], то есть именно присутствие бактериальных нуклеаторов является самой вероятной причиной расхождения между точкой переохлаждения растительных тканей и температурой, при которой возникают повреждения. При заражении растений всего лишь  $10^3$  нуклеирующих клеток на грамм ткани пороговая температура нуклеации резко возрастает [9]. В природе нуклеирующие бактерии часто встречаются в количестве  $10^6$  нуклеирующих клеток на грамм ткани [8]. Бактерицидные средства могут снизить риск повреждений растений в результате замерзания [22].

С другой стороны, ледонуклеирующие бактерии могут играть положительную роль для морозоустойчивых видов растений, которые способны выживать

presents at relatively steady level during the all phases of growth; nucleating activity is also preserved at steady level [7].

Transgenic plants need at least 2-days' exposure at about-zero temperatures for maximum accumulation of INP [38]. Though an amount of INP mRNA does not depend on temperature, the most effectively INP is accumulated after cold "hardiness". The authors suggest that INP is more stable at low temperatures.

The certain enzyme is required for each stage of lipoglycoprotein complex formation, therefore this brings up the question about the source of information for these enzymes. INP genes by themselves, especially when they are localized in plasmids of *E. coli* transformed cells, can not provide the information for a number of new enzymes. It could not be excluded that protein products of INP genes activate other bacterial genes, which are cryptic in the norm [12, 20], herewith the biochemical preparation is prepared for formation of the whole nucleating lipoglycoprotein complex.

Stability of nucleating agents in time significantly differs. For example *E. herbicola* nucleating agents demonstrated permanent activity during series of experiments [33], whereas *P. syringae* ones were non-stable [28].

### **Significance of bacterial nucleating agents in nature**

The described bacteria with ice-nucleating activity are of psychrophilic or mesophilic epiphytes [15], therefore crystallization, induced by bacteria may injure many species of plants. Most of vegetative tissues are well supercooled, whereas freeze-damages occur under temperature above  $-5^{\circ}\text{C}$  [24], that is exactly the presence of bacterial nucleating agents is the probable reason of the difference between supercooling point of vegetative tissues and temperature, at which damages appear. Contamination of plants with just  $10^3$  of nucleating cells per gram of tissue cause the sharp increase of nucleation threshold temperature [9]. The nucleating bacteria are common in nature in amounts of  $10^6$  nucleating cells per gram of tissue [8]. Bactericidal agents may reduce the freeze-damage risk of plants [22].

Herewith the ice-nucleating bacteria may play a positive role for the frost-hardy plant species, which can survive under slow crystal-formation in tissues. Deep supercooling is usually followed by a rapid crystallization with intracellular crystal formation, that is lethal for vegetative cells [32]. In transgenic potato derived by transformation of wild *Solanum commersonii*, ice crystal nuclei are formed at  $-3^{\circ}\text{C}$  [4]. Probably limitation of this supercooling may be perspective for increase of vegetative frost-hardiness.

при условии медленного кристаллообразования в тканях. После глубокого переохлаждения обычно следует быстрая кристаллизация с образованием внутриклеточных кристаллов, что является летальным для растительных клеток [32]. У созданного путем трансформации трансгенного картофеля дикорастущего *Solanum commersonii* зародышевые кристаллы льда образуются при  $-3^{\circ}\text{C}$  [4]. Возможно, ограничение переохлаждения таким путем может быть перспективным для повышения морозоустойчивости растений.

Адаптивное преимущество нуклеирующей активности для самих бактерий может рассматриваться с разных позиций. Прежде всего, нуклеаторы, локализованные на внешней стороне мембраны или секретруемые в культуральную жидкость, индуцируют кристаллизацию во внеклеточной среде и тем самым предотвращают летальное для клеток внутриклеточное кристаллообразование [15]. Однако есть и другая точка зрения на биологическое значение нуклеаторов. Нуклеаторы приводят к повреждению тканей растений в результате замерзания, тем самым предоставляя бактериальным клеткам доступ к питательным веществам растений [5].

Нуклеаторы, являющиеся частью стратегии холодоустойчивости и дающие преимущество в процессе естественного отбора, принято называть адаптивными нуклеаторами [27]. При этом нуклеирующие агенты выявлены и у организмов, для которых замерзание не является адаптивным преимуществом. Такие нуклеаторы называются случайными. Примером таких нуклеаторов могут служить липопротеины человека низкой плотности, индуцирующие кристаллизацию в диапазоне  $-4,9...-9,4^{\circ}\text{C}$ . Эти белки выполняют другие важные функции в организме, а нуклеирующая активность для них лишь побочный эффект. Бактериальные нуклеаторы, очевидно, являются адаптивными, так как обеспечивают бактериям доступ к питательным веществам и защищают клетки от повреждений из-за внутриклеточной кристаллизации.

### **Значение бактериальных нуклеаторов в биотехнологии**

Бактериальные нуклеирующие агенты применяются при производстве искусственного снега, в метеорологии и для хранения некоторых продуктов питания. В коммерческих целях в производстве искусственного снега используются лиофилизированные штаммы *P. syringae* [29]. Плотность искусственного снега меньше, чем плотность снега, образовавшегося естественным путем, а количество ледяных частичек, которые может произвести аппарат в единицу времени, возрастает при использовании бактерий-нуклеаторов. *P. syringae* не является пато-

Адаптивное преимущество нуклеирующей активности для бактерий может быть рассмотрено в разных аспектах. Во-первых, нуклеаторы, локализованные на внешней поверхности мембраны или секретируемые в культуральную жидкость, индуцируют кристаллизацию в экстраклеточной среде и тем самым предотвращают летальное для клеток внутриклеточное образование кристаллов [15]. Однако, существует и другая точка зрения на биологическое значение нуклеаторов. Нуклеаторы вызывают повреждение вегетативных тканей растений из-за замерзания, тем самым предоставляя бактериям доступ к питательным веществам растений [5].

Нуклеаторы, являющиеся частью стратегии холодоустойчивости и дающие преимущество в процессе естественного отбора, принято называть адаптивными нуклеаторами [27]. При этом нуклеирующие агенты выявлены и у организмов, для которых замерзание не является адаптивным преимуществом. Такие нуклеаторы называются случайными. Примером таких нуклеаторов могут служить липопротеины человека низкой плотности, индуцирующие кристаллизацию в диапазоне  $-4,9...-9,4^{\circ}\text{C}$ . Эти белки выполняют другие важные функции в организме, а нуклеирующая активность для них лишь побочный эффект. Бактериальные нуклеаторы, очевидно, являются адаптивными, так как обеспечивают бактериям доступ к питательным веществам и защищают клетки от повреждений из-за внутриклеточной кристаллизации.

### **Significance of bacterial nucleating agents in biotechnology**

Бактериальные нуклеирующие агенты используются при производстве искусственного снега, в метеорологии и для хранения некоторых продуктов питания. В коммерческих целях в производстве искусственного снега используются лиофилизированные штаммы *P. syringae* [29]. Плотность искусственного снега меньше, чем плотность снега, образовавшегося естественным путем, а количество ледяных частичек, которые может произвести аппарат в единицу времени, возрастает при использовании бактерий-нуклеаторов. *P. syringae* не является патогенным для человека и его уровень эндотоксинов в искусственном снегу не превышает естественный уровень в природе [18]. Несмотря на регулярные операции с *P. syringae* штаммами, существует определенная опасность для здоровья работников, непосредственно занятых производством. Хотя специалисты пренебрегают этой опасностью, если соблюдаются правила безопасности, существует возможность развития аллергических реакций у некоторых людей и также вероятность возникновения новых мутаций, что может привести к изменению патогенности бактерий.

Бактериальные клетки, перенесенные в верхние слои атмосферы, могут инициировать кристаллизацию в облаках, и впоследствии атмосферные осадки [19]. Для небольшого изменения погоды требуется огромное количество клеток, и для их распространения в атмосфере необходимо применение специальных методов, однако нуклеирующие бактерии могут использоваться для "смягчения" таких опасных атмосферных осадков, как град.

генной для человека, и уровень ее эндотоксинов в искусственном снеге не превышает их естественное количество в природе [18]. Тем не менее постоянная работа со штаммами *P. syringae* может представлять определенный риск для здоровья работников, непосредственно занятых в производстве снега. Хотя по оценкам специалистов этим риском при соблюдении техники безопасности можно пренебречь, нельзя исключать возможность развития аллергических реакций у отдельных людей, а также вероятность возникновения новых мутаций, которые могут привести к изменению уровня патогенности бактерии.

Клетки бактерий, внесенные в верхние слои атмосферы, могут инициировать кристаллизацию в облаках и, следовательно, выпадение осадков [19]. Для небольшого изменения погоды потребуется огромное количество клеток, а для их распределения в атмосфере – разработка специальных методов, однако нуклеирующие бактерии все же могут использоваться для "смягчения" таких опасных атмосферных осадков, как град.

Добавление бактериальных нуклеирующих агентов в продукты питания может менять характер кристаллизации, приводя к более желаемой консистенции замороженного продукта, например мороженого [2, 34]. Была предпринята попытка создания трансгенных дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* [13]. Генетически модифицированные дрожжи несут ген БН *E. herbicola* и их суспензии имеют температуру нуклеации  $-6^{\circ}\text{C}$  (для немодифицированных дрожжей эта температура составляет  $-13^{\circ}\text{C}$ ). Модифицированные *S. cerevisiae* влияют на процесс замораживания пищевых субстанций и изменяют текстуру замороженных продуктов.

Нуклеаторы бактериального происхождения предлагается также использовать в пищевой промышленности при криоконсервировании суспензий микроорганизмов. Грибок *Geotrichum candidum* широко применяют в процессе созревания некоторых сортов сыра. Для оптимизации криоконсервирования этого микроорганизма к суспензии добавляют БН *P. syringae* [30], что повышает температуру замерзания, синхронизирует нуклеацию в различных образцах, сопровождающуюся более гомогенным замораживанием и значительно повышает показатель выживаемости клеток *G. candidum* после цикла замораживания-оттаивания.

Гены БН не имеют промоторов, поэтому они перспективны в создании химерных генов [9]. Мониторинг нуклеирующей активности выполнить легко, поэтому отследить транскрипцию химерного гена несложно. Экспрессия БН не требует больших метаболических затрат: лишь 300 молекул БН продуцируются даже в нуклеационно активных клетках *P. syringae* [25]. Таким образом, экспрессия БН не

Adding bacterial nucleating agents into foods can change crystallization character, resulting in required consistence of frozen product, as an ice-cream [2, 34]. There is a report about an attempt to derive transgenic *Saccharomyces cerevisiae* yeasts [13]. Genetically modified yeasts carry *E. herbicola* INP gene and their suspensions have  $-6^{\circ}\text{C}$  nucleation temperature (for non-modified yeasts this temperature makes  $-13^{\circ}\text{C}$ ). Modified *S. cerevisiae* affect freezing the nutritional substances and change a structure of frozen foods.

Nucleating agents of bacterial origin are also suggested to be used in food-processing industry during cryopreservation of microorganism suspensions. *Geotrichum candidum* fungi are widely used during maturation of some cheese varieties. For optimization of this microorganism cryopreservation the *P. syringae* INP is added to suspension [30], that increases freezing temperature, synchronizes nucleation in different samples, accompanied with more homogenous freezing and significantly increases survival of *G. candidum* cells after freeze-thawing.

INP genes do not have promoters, therefore they are perspective in development of chimeric genes [9]. Monitoring the nucleating activity is easy to perform, therefore it is not difficult to trace a transcription of chimeric gene. INP expression does not require high metabolic inputs: only 300 INP molecules are produced even in nucleation-active *P. syringae* cells [25]. Therefore INP expression does not require a high activity of metabolism in the cells and does not affect the cell growth or their survival in medium deficient by any component. In the presence of INP gene sequence in chimeric gene the monitoring of transcriptional activity is  $10^5$ – $10^6$  times more sensitive if compared with previously used *lacZ* [21]. For the first time this approach was used when studying genes, involved in vegetative pathogenesis [21]. The other field of INP gene application is rapid and sensitive analysis of pathogenic bacteria presence. In these cases the recombinant bacteriophage is used, which is specific to target bacteria, carries the INP gene and is able to change bacteria phenotype to nucleation active one [41]. Whereas the most samples of water and food, which are usually analyzed for the presence of human pathogens, are deprived of nucleating activity under the temperatures above  $-5^{\circ}\text{C}$  even a little number of pathogenic bacteria may be detected by the production of ice crystal nuclei by bacteria, infected by recombinant phage. This approach was used for detecting *Salmonella* in foods and water [40].

N-terminal anchor domain of INP was used for disposition of chitinase on the surface of *E. coli* cells [43]. Chimeric chitinase was characterized by high

требует от клеток повышенной активности метаболизма и не влияет на рост клеток или их выживаемость в среде с дефицитом какого-либо компонента. При наличии последовательности гена БН в химерном гене мониторинг транскрипционной активности в  $10^5$ – $10^6$  раз более чувствителен по сравнению с использовавшимся ранее *lacZ* [21]. Такой подход был впервые применен при изучении генов, вовлеченных в патогенез растений [21]. Другая область применения генов БН – быстрый и чувствительный анализ присутствия патогенных бактерий. В этих случаях использовали способность специфичного к бактерии-мишени рекомбинантного бактериофага, несущего ген БН, изменять ее фенотип на активный в отношении нуклеации [41]. Поскольку большинство образцов воды и пищи, которые обычно анализируются на присутствие патогенов человека, лишены нуклеирующей активности при температурах выше  $-5^\circ\text{C}$ , даже небольшое количество патогенных бактерий можно определить по продукции зародышевых кристаллов льда бактериями, инфицированными рекомбинантным фагом. Такой подход был применен для выявления *Salmonella* в продуктах и воде [40].

N-концевой "якорный" домен БН был использован для размещения на поверхности клеток *E. coli* хитиназы [43]. Химерная хитиназа характеризовалась высокой каталитической активностью по отношению к коллоидному хитину и, более того, ингибировала рост мицелия патогенных грибов *Fusarium decemcellulare*, *Fusarium oxysporum*, *Sclerotium rolfsii*, *Rhizoctonia solani kuhn*. Такие разработки могут быть основой эффективных методов биозащиты от патогенных грибов.

Другой пример использования "якорной" системы на основе БН – химерная органофосфатгидролаза [35]. Органофосфатгидролаза (катализирует гидролиз фосфорорганических соединений, к числу которых относятся пестициды и боевые отравляющие вещества), размещенная на поверхности *Pseudomonas putida*, имела высокую ферментативную активность. Возможность размещения фермента на поверхности полноценной в функциональном аспекте и неагрессивной по отношению к окружающей среде *P. putida* может открыть новые перспективы для внедрения биологической очистки *in situ*.

"Якорь" БН может применяться для поверхностной экспрессии синтетических фитохелатинов [3], состоящих из  $(\text{Glu}-\text{Cys})_n\text{Gly}$ . Они являются белковыми аналогами фитохелатина (полипептида, связывающего тяжелые металлы) и превосходят металлотионины (белки, способные связываться с цинком, медью, кадмием, ртутью, висмутом и другими ионами) по своей активности по отношению к

catalytic activity in relation to colloidal chitin, moreover it inhibited mycelia growth of *Fusarium decemcellulare*, *Fusarium oxysporum*, *Sclerotium rolfsii*, *Rhizoctonia solani kuhn* pathogenic fungi. These findings may be the base for effective methods of bioprotection against pathogenic fungi.

Another example of INP based anchor system is chimeric organophosphate hydrolase [35]. Organophosphate hydrolase (catalyzes hydrolysis of phosphoorganic compounds, including pesticides and chemical warfare agents), placed on the surface of *Pseudomonas putida*, had a high enzymatic activity. Possibility of enzyme disposition on surface of functionally complete and environmentally non-aggressive *P. putida* can open the new prospects for introduction of bioremediation *in situ*.

INP "anchor" may be used for surface expression of synthetic phytochelatin, containing  $(\text{Glu}-\text{Cys})_n\text{Gly}$ . They are protein analogues of phytochelatin (polypeptide, bonding heavy metals) and surpass metallothioneins (proteins, which are capable of binding with zinc, cuprum, cadmium, mercury, bismuth and other ions) by their activity in relation to heavy metal ions. Expression of synthetic phytochelatin on the surface of *E. coli* with INP anchor system enabled to carry-out effective biobinding cadmium and mercury. For further increase of heavy metal binding efficiency the synthetic phytochelatin was expressed on *Moraxella sp.* surface known by its ability to survive in highly polluted environment. It was found that *Moraxella sp.* cells produced chimeric phytochelatin in 3 times more than *E. coli* cells. Herewith *Moraxella sp.* bonded mercury in 10 times more than *E. coli* that open a new possibilities for solving the problem of environmental pollution by heavy metals.

There was constructed a chimeric protein from the main surface antigen of hepatitis B virus (HBsAg) and *P. syringae* INP [16]. The recombinant protein was expressed on exterior membrane of bacterial cells that was confirmed by the methods of immuno-fluorescence microscopy, Western blotting *etc.* It is possible that "living" vaccines would be constructed on the base of transgenic bacteria. The similar procedure has been carried-out for *gp120* HIV-1 antigen [17]. The authors consider the possibility of these systems using for development of new methods of diagnostics and oral vaccines.

Another field of potential application of such systems is development of biological sensors. Ferric ion sensitive biosensor was constructed on the base of *inaZ* gene and  $\text{Fe}^{3+}$ -regulated promotor, taking part in synthesis of pioverdin (yellow-green fluorescent pigment of bacteria) in *P. syringae* [26]. The

ионам тяжелых металлов. Экспрессия синтетического фитохелатина на поверхности *E. coli* с помощью "якорной" системы БН позволила осуществить эффективное биосвязывание кадмия и ртути. Для дальнейшего повышения эффективности связывания тяжелых металлов синтетический фитохелатин был экспрессирован на поверхности *Moraxella sp.*, известной своей способностью выживать при высокой степени загрязнения окружающей среды. Оказалось, что клетки *Moraxella sp.* производят в 3 раза больше химерного фитохелатина, чем клетки *E. coli*. В результате *Moraxella sp.* связывала в 10 раз больше ртути, чем *E. coli*, что открывает новые возможности для решения проблемы загрязнения окружающей среды тяжелыми металлами.

Был создан химерный белок из основного поверхностного антигена вируса гепатита В (HBsAg) и БН *P. syringae* [16]. Рекомбинантный белок экспрессировался на внешней мембране бактериальных клеток, что подтверждено методами иммунофлуоресцентной микроскопии, Вестерн-блоттинга и др. Возможно, на основе трансгенных бактерий будут разрабатываться "живые" вакцины. Аналогичная разработка осуществлена и для антигена *gp120* ВИЧ-1 [17]. Авторы рассматривают возможность использования таких систем для создания новых методов диагностики и оральных вакцин.

Еще одна область потенциального использования подобных систем – разработка биологических сенсоров. Биосенсор, чувствительный к ионам железа, был сконструирован на основе гена *inaZ* и  $Fe^{3+}$ -регулируемого промотора, участвующего в синтезе пиовердина (желто-зеленый флуоресцирующий пигмент бактерий) у *P. syringae* [26]. Клетки *P. fluorescens*, несущие химерный ген, характеризовались  $Fe^{3+}$ -зависимой нуклеирующей активностью как в культуре, так и в ризосфере и филосфере. Добавление ионов железа к почве или листьям снижало транскрипцию химерного гена. Таким образом, такая система способна выявлять биодоступные ионы железа в культуре и естественных условиях. Подобные биосенсоры открывают новые возможности для характеристики химических составляющих сред обитания микроорганизмов.

Трансгенные бактерии могут оказаться полезными при создании новых биологических способов борьбы с насекомыми-вредителями. Ген *inaA* из *Erwinia ananas* был встроен в хромосомы двух штаммов *Enterobacter cloacae* [36]. Температура нуклеации трансгенных *E. cloacae* была даже на 7–8°C выше, чем у родительских штаммов, а после инфицирования ими личинок мотылька кукурузного *Ostrinia nubilalis* и совки хлопковой *Helicoverpa armigera* Hub. средняя температура кристаллизации

*P. fluorescens* cells, carrying chimeric gene were characterized by  $Fe^{3+}$ -dependent nucleating activity both in culture, and in rhizosphere and phyllosphere. Adding the ferric ions into soil and leaves reduced the transcription of chimeric gene. Thus, this system is able to reveal bioaccessible ferric ions in culture and in natural conditions. Such biosensors open new possibilities to characterize the chemical components of microorganisms' habitat.

Transgenic bacteria may be useful when developing new biological methods of insect pest control. *InaA* gene from *Erwinia ananas* was inserted into chromosomes of two strains of *Enterobacter cloacae* [36]. The nucleation temperature of transgenic *E. cloacae* was by 7–8°C higher, than in parental strains, and after its contamination of *Ostrinia nubilalis* corn borer larvae and *Helicoverpa armigera* Hub. cotton bollworm the average temperature of crystallization of larva body fluids increased up to –3...–4°C. It has been established that 95% of infected larvae died during 12 hrs under –5°C though non-treated larvae did not freeze and die under the same conditions. In addition, the transgenic *E. cloacae* grow slower on corn leaves if compared with wild type of *E. ananas*. Thus, stable colonization of intestine of freeze-sensitive borers by transgenic *E. cloacae* can protect agricultural lands.

Biotechnology may benefit from obtaining active INP, by-passing their isolation from cells. For that matter the *Halomonas elongata* recombinants, in which *P. syringae inaZ* gene [37] was actively expressed, were derived. Transgenic *H. elongata* secrete lipid free nucleating agents into cultural medium. Probably, the release by *H. elongata* cells of nucleating agents into the medium is occurred due to unstable bonding of INP aggregates with exterior membrane. Threshold nucleation temperature was below –7°C that confirms affiliation of these nucleating agents to C class.

Thus, there are many possibilities for using the biological nucleating agents. For optimization of the practical application of nucleating agents of bacterial origin it is necessary to imagine clearly the formation and mechanism of nucleating agent action. First of all it concerns the nucleating agents, being active under high negative temperatures (–5...–2°C), as they meet rarely and possess the lowest stability [23]. Herewith, exactly this class of nucleating agents is mostly interesting in applied aspect. Whereas the action mechanism and stability are determined by structure, so the main efforts of researchers in the nearest future will be directed to study of INP spatial organization.

жидкостей тела личинок поднялась до  $-3...-4^{\circ}\text{C}$ . Установлено, что 95% зараженных личинок гибли в течение 12 ч при  $-5^{\circ}\text{C}$ , хотя ни одна из необработанных личинок не замерзла и не погибла в тех же условиях. При этом трансгенные *E. cloacae* гораздо медленнее растут на листьях кукурузы по сравнению с диким типом *E. ananas*. Таким образом, стабильная колонизация кишечника чувствительных к заморозанию вредителей трансгенными *E. cloacae* может защищать от них сельскохозяйственные угодья.

Для биотехнологии может быть удобно получать активные БН, минуя процесс их выделения из клеток. С этой целью созданы рекомбинанты *Halomonas elongata*, в которых активно экспрессировался ген *inaZ* *P. syringae* [37]. Трансгенные *H. elongata* выделяли в культуральную среду нуклеирующие агенты, лишённые липидного компонента. Вероятно, высвобождение нуклеаторов в среду клетками *H. elongata* происходит в результате недостаточно прочной связи агрегатов БН с внешней мембраной. Пороговая температура нуклеации была ниже  $-7^{\circ}\text{C}$ , что подтверждает принадлежность данных нуклеирующих агентов к классу С.

Таким образом, существует множество возможностей использования биологических нуклеаторов. Для оптимизации практического применения нуклеаторов бактериального происхождения необходимо четко представлять процесс формирования и механизм действия нуклеирующих агентов. Прежде всего, это касается нуклеаторов, активных при высоких отрицательных температурах ( $-5...-2^{\circ}\text{C}$ ), так как они встречаются наиболее редко и отличаются наименьшей стабильностью [23]. При этом именно этот класс нуклеаторов представляет наибольший интерес в прикладном аспекте. Поскольку как механизм действия, так и стабильность определяются структурой, то основные усилия исследователей в ближайшем будущем будут направлены на изучение протрансгенной организации БН.

## Литература

1. Anderson J.A., Buchanan D.W., Stall R.E. et al. Frost injury of tender plants increased by *Pseudomonas syringae* van Hall // J. Am. Soc. Hort. Sci.— 1982.— Vol. 107, N1.— P. 123–125.
2. Arai S., Watanabe M. Freeze texturing of food materials by ice-nucleation with the bacterium *Erwinia ananas* // Agric. Biol. Chem.— 1986.— Vol. 50, N1.— P. 169–175.
3. Bae W., Mulchandani A., Chen W. Cell surface display of synthetic phytochelators using ice nucleation protein for enhanced heavy metal bioaccumulation // J. Inorg. Biochem.— 2002.— Vol. 88, N2.— P. 223–227.
4. Baertlein D.A., Lindow S.E., Panopolous N.J. et al. Expression of a bacterial ice nucleation gene in plants // Plant Physiol.— 1992.— Vol. 100, N4.— P. 1730–1736.

## References

1. Anderson J.A., Buchanan D.W., Stall R.E. et al. Frost injury of tender plants increased by *Pseudomonas syringae* van Hall // J. Am. Soc. Hort. Sci.— 1982.— Vol. 107, N1.— P. 123–125.
2. Arai S., Watanabe M. Freeze texturing of food materials by ice-nucleation with the bacterium *Erwinia ananas* // Agric. Biol. Chem.— 1986.— Vol. 50, N1.— P. 169–175.
3. Bae W., Mulchandani A., Chen W. Cell surface display of synthetic phytochelators using ice nucleation protein for enhanced heavy metal bioaccumulation // J. Inorg. Biochem.— 2002.— Vol. 88, N2.— P. 223–227.
4. Baertlein D.A., Lindow S.E., Panopolous N.J. et al. Expression of a bacterial ice nucleation gene in plants // Plant Physiol.— 1992.— Vol. 100, N4.— P. 1730–1736.
5. Buttner M.P., Amy P.S. Survival of ice nucleation-active and genetically engineered non-ice-nucleating *Pseudomonas syringae* strains after freezing // Appl. Environ. Microbiol.— 1989.— Vol. 55, N7.— P. 1690–1694.
6. Cronan J.E. Jr., Gelmann P.E. Physical properties of membrane lipids: Biological relevance and regulation // Bacteriol. Rev.— 1975.— Vol. 39, N3.— P. 232–256.
7. Deininger C.A., Mueller G.M., Wolber P.K. Immunological characterization of ice nucleation proteins from *Pseudomonas syringae*, *Pseudomonas fluorescens*, and *Erwinia herbicola* // J. Bacteriol.— 1988.— Vol. 170, N2.— P. 669–675.
8. Gross D.C., Cody Y.S., Proebsting E.L. et al. Distribution, population dynamics, and characteristics of ice nucleation active bacteria in deciduous fruit tree orchards // Appl. Environ. Microbiol.— 1983.— Vol. 46, N6.— P. 1370–1379.
9. Gurian-Sherman D., Lindow S.E. Bacterial ice nucleation: significance and molecular basis // FASEB J.— 1993.— Vol. 7, N14.— P. 1338–1343.
10. Gurian-Sherman D., Lindow S.E. Differential effects of growth temperature on ice nuclei active at different temperatures that are produced by cells of *Pseudomonas syringae* // Cryobiology.— 1995.— Vol. 32, N2.— P. 129–138.
11. Gurian-Sherman D., Lindow S.E., Panopoulos N.J. Isolation and characterization of hydroxylamine-induced mutations in the *Erwinia herbicola* ice nucleation gene that selectively reduce warm temperature ice nucleation activity // Mol. Microbiol.— 1993.— Vol. 9, N2.— P. 383–391.
12. Hall B.G., Yokoyama S., Calhoun D. Role of cryptic genes in microbial evolution // Mol. Biol. Evol.— 1983.— Vol. 1, N1.— P. 109–124.
13. Hwang W.Z., Coetzer C., Tumer N.E. et al. Expression of a bacterial ice nucleation gene in a yeast *Saccharomyces cerevisiae* and its possible application in food freezing processes // J. Agric. Food Chem.— 2001.— Vol. 49, N10.— P. 4662–4666.
14. Kaneda T. Seasonal population changes and characterization of ice-nucleating bacteria in farm fields of central Alberta // Appl. Environ. Microbiol.— 1986.— Vol. 52, N1.— P. 173–178.
15. Kawahara H. The structures and functions of ice crystal-controlling proteins from bacteris // J. Biosci. Bioeng.— 2002.— Vol. 94, N6.— P. 492–496.
16. Kim E.J., Yoo S.K. Cell surface display of hepatitis B virus surface antigen by using *Pseudomonas syringae* ice nucleation protein // Lett. Appl. Microbiol.— 1999.— Vol. 29, N5.— P. 292–297.
17. Kwak Y.D., Yoo S.K., Kim E.J. Cell surface display of human immunodeficiency virus type 1 gp120 on *Escherichia coli* by using ice nucleation protein // Clin. Diagn. Lab. Immunol.— 1999.— Vol. 6, N4.— P. 499–503.
18. Lagriffoul A., Boudenne J.L., Absi R. et al. Bacterial-based additives for the production of artificial snow: What are the risks to human health? // Sci. Total. Environ.— 2010.— Vol. 408, N7.— P. 1659–1666.
19. Levin Z., Yankofski S.A., Pardes D. et al. Possible application of bacterial condensation freezing to artificial rainfall enhancement // J. Climate Appl. Meteorol.— 1987.— Vol. 26, Issue 9.— P. 1188–1197.



5. Buttner M.P., Amy P.S. Survival of ice nucleation-active and genetically engineered non-ice-nucleating *Pseudomonas syringae* strains after freezing // Appl. Environ. Microbiol.– 1989.– Vol. 55, N7.– P. 1690–1694.
6. Cronan J.E. Jr., Gelmann P.E. Physical properties of membrane lipids: Biological relevance and regulation // Bacteriol. Rev.– 1975.– Vol. 39, N3.– P. 232–256.
7. Deininger C.A., Mueller G.M., Wolber P.K. Immunological characterization of ice nucleation proteins from *Pseudomonas syringae*, *Pseudomonas fluorescence*, and *Erwinia herbicola* // J. Bacteriol.– 1988.– Vol. 170, N2.– P. 669–675.
8. Gross D.C., Cody Y.S., Proebsting E.L. et al. Distribution, population dynamics, and characteristics of ice nucleation active bacteria in deciduous fruit tree orchards // Appl. Environ. Microbiol.– 1983.– Vol. 46, N6.– P. 1370–1379.
9. Gurian-Sherman D., Lindow S.E. Bacterial ice nucleation: significance and molecular basis // FASEB J.– 1993.– Vol. 7, N14.– P. 1338–1343.
10. Gurian-Sherman D., Lindow S.E. Differential effects of growth temperature on ice nuclei active at different temperatures that are produced by cells of *Pseudomonas syringae* // Cryobiology.– 1995.– Vol. 32, N2.– P. 129–138.
11. Gurian-Sherman D., Lindow S.E., Panopoulos N.J. Isolation and characterization of hydroxylamine-induced mutations in the *Erwinia herbicola* ice nucleation gene that selectively reduce warm temperature ice nucleation activity // Mol. Microbiol.– 1993.– Vol. 9, N2.– P. 383–391.
12. Hall B.G., Yokoyama S., Calhoun D. Role of cryptic genes in microbial evolution // Mol. Biol. Evol.– 1983.– Vol. 1, N1.– P. 109–124.
13. Hwang W.Z., Coetzer C., Tumer N.E. et al. Expression of a bacterial ice nucleation gene in a yeast *Saccharomyces cerevisiae* and its possible application in food freezing processes // J. Agric. Food Chem.– 2001.– Vol. 49, N10.– P. 4662–4666.
14. Kaneda T. Seasonal population changes and characterization of ice-nucleating bacteria in farm fields of central Alberta // Appl. Environ. Microbiol.– 1986.– Vol. 52, N1.– P. 173–178.
15. Kawahara H. The structures and functions of ice crystal-controlling proteins from bacteria // J. Biosci. Bioeng.– 2002.– Vol. 94, N6.– P. 492–496.
16. Kim E.J., Yoo S.K. Cell surface display of hepatitis B virus surface antigen by using *Pseudomonas syringae* ice nucleation protein // Lett. Appl. Microbiol.– 1999.– Vol. 29, N5.– P. 292–297.
17. Kwak Y.D., Yoo S.K., Kim E.J. Cell surface display of human immunodeficiency virus type 1 gp120 on *Escherichia coli* by using ice nucleation protein // Clin. Diagn. Lab. Immunol.– 1999.– Vol. 6, N4.– P. 499–503.
18. Lagriffoul A., Boudenne J.L., Absi R. et al. Bacterial-based additives for the production of artificial snow: What are the risks to human health? // Sci. Total. Environ.– 2010.– Vol. 408, N7.– P. 1659–1666.
19. Levin Z., Yankofski S.A., Pardes D. et al. Possible application of bacterial condensation freezing to artificial rainfall enhancement // J. Climate Appl. Meteorol.– 1987.– Vol. 26, Issue 9.– P. 1188–1197.
20. Li W.H. Retention of cryptic genes in microbial populations // Mol. Biol. Evol.– 1984.– Vol. 1, N2.– P. 213–219.
21. Lindgren P.B., Frederick R., Govindarajan A.G. et al. An ice nucleation reporter gene system: identification of inducible pathogenicity genes in *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* // EMBO J.– 1989.– Vol. 8, N5.– P. 1291–1301.
22. Lindow S.E. Methods of preventing frost injury caused by epiphytic ice nucleation active bacteria // Plant Dis.– 1983.– Vol. 67, N3.– P. 327–333.
23. Lindow S.E. Kinetics of changes in ice nucleation activity of *Pseudomonas syringae* following temperature shifts // Phytopathology.– 1983.– Vol. 73, N7.– P. 809.
24. Lindow S.E., Arny D.C., Upper C.D. Bacterial ice nucleation: a factor in frost injury to plants // Plant Physiol.– 1982.– Vol. 70, N4.– P. 1084–1089.
25. Lindow S.E., Lahue E., Govindarajan A.G. et al. Localization of ice nucleation activity and the *iceC* gene product in *Pseudomonas syringae* and *Escherichia coli* // Molec. Plant-Microbe Interactions.– 1989.– Vol. 2, N5.– P. 262–272.
26. Loper J.E., Lindow S.E. A biological sensor for iron available to bacteria in their habitats on plant surfaces // Appl. Environ. Microbiol.– 1994.– Vol. 60, N6.– P. 1934–1941.
27. Lundheim R. Physiological and ecological significance of biological ice nucleators // Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.– 2002.– Vol. 357, N1423.– P. 937–943.
28. 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.
29. Margaritis A., Bassi A.S. Principles and biotechnological applications of bacterial ice nucleation // Crit. Rev. Biotechnol.– 1991.– Vol. 11, N3.– P. 277–295.
30. Missous G., Thammavongs B., Dieuleveux V. et al. Improvement of the cryopreservation of the fungal starter *Geotrichum candidum* by artificial nucleation and temperature downshift control // Cryobiology.– 2007.– Vol. 55, N1.– P. 66–71.
31. Orser C., Staskawicz B.J., Panopoulos N.J. et al. Cloning and expression of bacterial ice nucleation genes in *Escherichia coli* // J. Bacteriol.– 1985.– Vol. 164, N1.– P. 356–366.
32. Rajashekar C., Li P.H., Carter J.V. Frost injury and heterogeneous ice nucleation in leaves of tuber-bearing *Solanum* species // Plant Physiol.– 1983.– Vol. 71, N4.– P. 749–755.
33. 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.
34. Russel N.J. Molecular adaptations in psychrophilic bacteria: potential for biotechnological application // Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.– 1998.– Vol. 61.– P. 1–21.
35. Shimazu M., Nguyen A., Mulchandani A. et al. Cell surface display of organophosphorus hydrolase in *Pseudomonas putida* using an ice-nucleation protein anchor // Biotechnol. Prog.– 2003.– Vol. 19, N5.– P. 1612–1614.
36. Tang C., Sun F., Zhang H. et al. Transgenic ice nucleation-active *Enterobacter cloacae* reduces cold hardiness of corn borer and cotton bollworm larvae // FEMS Microbiol. Ecol.– 2004.– Vol. 51, N1.– P. 79–86.
37. Tegos G., Vargas C., Perysinakis A. et al. Release of cell-free ice nuclei from *Halomonas elongata* expressing the ice nucleation gene *inaZ* of *Pseudomonas syringae* // J. Appl. Microbiol.– 2000.– Vol. 89, N5.– P. 785–792.
38. van Zee K., Baertlein D.A., Linsow S.E. et al. Cold requirement for maximal activity of the bacterial ice nucleation protein INAZ in transgenic plants // Plant Mol. Biol.– 1996.– Vol. 30, N1.– P. 207–211.
39. Wolber P.K. Bacterial ice nucleation // Adv. Microbiol. Physiol.– 1992.– Vol. 34.– P. 203–237.
40. Wolber P.K., Green R.L. New rapid method for the detection of *Salmonella* in foods // Trends Food Sci. Technol.– 1990.– Vol. 1.– P. 80–82.

24. Lindow S.E., Arny D.C., Upper C.D. Bacterial ice nucleation: a factor in frost injury to plants // *Plant Physiol.*– 1982.– Vol. 70, N4.– P. 1084–1089.
25. Lindow S.E., Lahue E., Govindarajan A.G. et al. Localization of ice nucleation activity and the *iceC* gene product in *Pseudomonas syringae* and *Escherichia coli* // *Molec. Plant-Microbe Interactions.*– 1989.– Vol. 2, N5.– P. 262–272.
26. Loper J.E., Lindow S.E. A biological sensor for iron available to bacteria in their habitats on plant surfaces // *Appl. Environ. Microbiol.*– 1994.– Vol. 60, N6.– P. 1934–1941.
27. Lundheim R. Physiological and ecological significance of biological ice nucleators // *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.*– 2002.– Vol. 357, N1423.– P. 937–943.
28. 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.
29. Margaritis A., Bassi A.S. Principles and biotechnological applications of bacterial ice nucleation // *Crit. Rev. Biotechnol.*– 1991.– Vol. 11, N3.– P. 277–295.
30. Missous G., Thammavongs B., Dieuleveux V. et al. Improvement of the cryopreservation of the fungal starter *Geotrichum candidum* by artificial nucleation and temperature downshift control // *Cryobiology.*– 2007.– Vol. 55, N1.– P. 66–71.
31. Orser C., Staskawicz B.J., Panopoulos N.J. et al. Cloning and expression of bacterial ice nucleation genes in *Escherichia coli* // *J. Bacteriol.*– 1985.– Vol. 164, N1.– P. 356–366.
32. Rajashekar C., Li P.H., Carter J.V. Frost injury and heterogeneous ice nucleation in leaves of tuber-bearing *Solanum* species // *Plant Physiol.*– 1983.– Vol. 71, N4.– P. 749–755.
33. 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.
34. Russel N.J. Molecular adaptations in psychrophilic bacteria: potential for biotechnological application // *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*– 1998.– Vol. 61.– P. 1–21.
35. Shimazu M., Nguyen A., Mulchandani A. et al. Cell surface display of organophosphorus hydrolase in *Pseudomonas putida* using an ice-nucleation protein anchor // *Biotechnol. Prog.*– 2003.– Vol. 19, N5.– P. 1612–1614.
36. Tang C., Sun F., Zhang H. et al. Transgenic ice nucleation-active *Enterobacter cloacae* reduces cold hardness of corn borer and cotton bollworm larvae // *FEMS Microbiol. Ecol.*– 2004.– Vol. 51, N1.– P. 79–86.
37. Tegos G., Vargas C., Perysinakis A. et al. Release of cell-free ice nuclei from *Halomonas elongata* expressing the ice nucleation gene *inaZ* of *Pseudomonas syringae* // *J. Appl. Microbiol.*– 2000.– Vol. 89, N5.– P. 785–792.
38. van Zee K., Baertlein D.A., Linsow S.E. et al. Cold requirement for maximal activity of the bacterial ice nucleation protein INAZ in transgenic plants // *Plant Mol. Biol.*– 1996.– Vol. 30, N1.– P. 207–211.
39. Wolber P.K. Bacterial ice nucleation // *Adv. Microbiol. Physiol.*– 1992.– Vol. 34.– P. 203–237.
40. Wolber P.K., Green R.L. New rapid method for the detection of *Salmonella* in foods // *Trends Food Sci. Technol.*– 1990.– Vol. 1.– P. 80–82.
41. Wolber P.K., Green R.L. Detection of bacteria by transduction of ice nucleation genes // *Trends Biotechnol.*– 1990.– Vol. 8, N10.– P. 276–279.
42. Wolber P.K., Warren G.J. Bacterial ice-nucleation proteins // *Trends Biochem.*– 1989.– Vol. 14, N5.– P. 179–182.
43. Wu M.L., Tsai C.Y., Chen T.H. Cell surface display of *Chi92* on *Escherichia coli* using ice nucleation protein for improved catalytic and antifungal activity // *FEMS Microbiol. Lett.*– 2006.– Vol. 256, N1.– P. 119–125.

Accepted in 06.04.2010

Поступила 06.04.2010  
Рецензент В.В. Рязанцев