

蜂粮中芽孢杆菌的分离鉴定及其耐酸耐高糖特性的分析

张言周, 王 爽, 李韵雅, 蔡宇杰, 廖祥儒*

(江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122)

摘要: 为丰富人工发酵蜂花粉生产蜂粮的菌种资源, 从天然蜂粮中筛选芽孢杆菌。通过平板涂布法从中蜂蜂粮样品中分离产芽孢的细菌, 利用 16S rRNA 基因同源比对及系统发育分析对其进行初步鉴定, 并分析其耐酸耐高糖特性。共分离到 16 株隶属于 *Bacillus tequilensis*、*Bacillus aerophilus*、*Fictibacillus nanhaiensis*、*Bacillus sonorensis*、*Lysinibacillus xylanilyticus*、*Lysinibacillus fusiformis*、*Bacillus invictus*、*Bacillus methylotrophicus* 的芽孢杆菌。其中 10 株菌能在低酸和高糖条件下正常生长, 菌株 Br7、Br9 和 Br11 的芽孢生成量较少, 有潜力应用于人工发酵蜂花粉制备蜂粮。

关键词: 芽孢杆菌; 蜂粮; 蜂花粉

中图分类号: Q 81 文献标志码: A 文章编号: 1673—1689(2017)04—0410—06

Isolation and Identification of *Bacillus* Strains From Bee Bread and Their Tolerance to Acid and Glucose

ZHANG Yanzhou, WANG Shuang, LI Yunya, CAI Yujie, LIAO Xiangru*

(Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: *Bacillus* strains were isolated from natural bee bread to enrich microbes producing bee bread from the fermentation of bee pollen. Strains were isolated based on the homologous alignment using spread plate method and preliminarily identified using phylogenetic analysis of the 16S rRNA genes. Their tolerance to acid and glucose was also discussed. Sixteen spore-forming bacteria were totally isolated from bee bread of Apissinensis and identified as the genus of *Bacillus tequilensis*, *Bacillus aerophilus*, *Fictibacillus nanhaiensis*, *Bacillus sonorensis*, *Lysinibacillus xylanilyticus*, *Lysinibacillus fusiformis*, *Bacillus invictus* and *Bacillus methylotrophicus*, respectively. However, only ten *Bacillus* strains could grow vigorously at low pH (4.0) with high glucose concentration (30%). Fewer spores were produced by the strain Br7, Br9 and Br11, which were suggested as the potential strains used for artificial fermentation of bee pollen.

Keywords: *Bacillus*, bee bread, bee pollen

收稿日期: 2015-04-27

基金项目: 江苏省产学研前瞻项目(BY2014023-28); 无锡市科技发展农业支撑项目(CLE01N1310); 中央高校基本科研业务费专项资金资助项目。

* 通信作者: 廖祥儒(1964—), 男, 江西南康人, 教授, 博士研究生导师, 主要从事资源微生物的筛选及工业应用研究。

E-mail: liaoxiangru@163.com

引用本文: 张言周, 王爽, 李韵雅, 等. 蜂粮中芽孢杆菌的分离鉴定及其耐酸耐高糖特性的分析[J]. 食品与生物技术学报, 2017, 36(04): 410-415.

蜂粮作为一种纯天然的发酵食品,营养丰富,风味独特,目前已经成为一种极具开发前景的保健食品,具有抗疲劳、美容保健、增强免疫力和记忆力等生理功能^[1]。蜂粮也称蜂巢花粉,是雄蜂和工蜂的主要营养供给,是蜂花粉经过一系列复杂的过程转化而成,包括蜂花粉的采集、乳糜状花粉团的调制以及花粉团的微生物发酵酿制^[2-3]。其中花粉团的微生物发酵酿制是蜂粮形成的关键,也是影响蜂粮品质的决定因素,蜂粮具有复杂的微生物系统^[4-5]。天然蜂粮仅能在蜂巢中由微生物发酵产生,产量有限,而且又是蜂群幼虫的食物,大量采取会对蜂群的繁殖产生严重影响,因此天然蜂粮至今无法在市场上大规模的销售^[1]。

为了满足蜂粮的巨大市场需求,众多研究者试图利用从天然蜂粮中分离的关键微生物发酵蜂花粉来实现蜂粮的规模化生产,这就需要全面分析蜂粮发酵中的微生物组成及变化。天然蜂粮是一个复杂的微生物体系,从中已分离到多种微生物,包括乳酸菌、酵母菌、霉菌以及芽孢杆菌等。过去对巢房中蜂粮发酵过程中微生物活动的分析表明:第一阶段为乳酸菌、酵母菌以及某些好氧细菌利用花粉中丰富的营养物质大量繁殖;第二阶段厌氧乳酸菌(如链球菌)利用酵母菌产生的生长素生长繁殖,引起花粉团的 pH 降低并产生 B 族维生素;第三阶段,乳链球菌消失,能产更多酸的乳酸杆菌开始生长;第四阶段由于积累的乳酸浓度过高,从而抑制了乳酸菌和酵母菌的生长,乳酸菌和某些酵母菌开始消失。此时蜂花粉 pH 接近 4,蜂粮酿制完成^[6-7]。但这一过程中并未见到芽孢杆菌活动情况的分析,而在成熟蜂粮中已有不少芽孢杆菌被分离到,例如, Gilliam 等(1989)从杏仁花粉、蜂花粉和 1、3、6 周蜂粮样品中分离到芽孢杆菌属的 6 种芽孢杆菌 41 个菌落^[8]。其中,枯草芽孢杆菌是蜂粮中常见的细菌,可能是蜜蜂在酸制过程中添加到蜂粮中的^[6,9]。

在人工生产蜂粮的探索中,主要是应用从天然蜂粮中筛选的乳酸菌或酵母菌来发酵蜂花粉^[10-12]。与天然蜂粮的发酵相比,微生物菌种过于单一,无论是营养以及风味均与天然蜂粮相去甚远。尤其是天然蜂粮中的芽孢杆菌,其在蜂粮的发酵酿制中可能发挥着重要作用。但是,尚没有将芽孢杆菌应用到人工发酵蜂花粉的实践中。同时,为提高人工发酵蜂粮的品质,除了常用的乳酸菌及酵母菌,需要

筛选更加丰富的菌种应用到蜂粮的人工发酵中,而天然蜂粮中丰富的芽孢杆菌将是不错的选择。因此,作者将从采自广西某蜂场的中蜂蜂粮中筛选芽孢杆菌,并对筛选到的芽孢杆菌进行初步的分子鉴定,分析其系统发育关系。并对这些芽孢杆菌的耐酸、耐高糖特点及低酸高糖条件下芽孢的生成进行了分析,为人工发酵蜂花粉生产蜂粮奠定丰富的芽孢杆菌菌种资源,对于蜂花粉的深加工及蜂粮制品的开发具有重要的实践意义。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 蜂粮样品 采自广西巴马某蜂场的蜂巢,蜂种为东方蜜蜂(中蜂, *Apis cerana cerana*),采收季节为秋季。采收的蜂粮样品置于预先准备的无菌样品瓶,于室温条件下放置于阴凉通风处。

1.1.2 培养基 营养肉汤培养基(NB):牛肉膏 5 g;蛋白胨 10 g;氯化钠 5 g;pH 7.0~7.2;NB 琼脂培养基:牛肉膏 5 g;蛋白胨 10 g;氯化钠 5 g;琼脂 20 g;pH 7.0~7.2;耐高糖检验培养基:含葡萄糖的 NB 培养基,葡萄糖质量分数分别为 20%、30%、40%、50%;耐酸检验培养基:不同 pH 值的营养肉汤培养基,pH 分别为 4.5、4.0、3.5;种子培养基:营养肉汤培养基。

1.2 实验方法

1.2.1 菌种筛选 称取 2 g 蜂粮样品,用灭菌生理盐水稀释到质量分数 75%,取 200 μ L 稀释液涂布在营养肉汤琼脂培养基上,于超净工作台静置 30 min 后 30 $^{\circ}$ C 倒置培养 48 h。挑取合适尺寸的菌落,通过划线分离纯化单菌落,转接并保藏菌种^[13]。

1.2.2 产芽孢菌株的鉴定 将保存的菌株用 NB 琼脂培养基培养至 48 h,挑取少许菌落进行革兰氏染色和芽孢染色,显微镜下观察染色结果并确定有无芽孢的产生。

1.2.3 菌株 16S rRNA 基因扩增 利用 NB 培养基过夜培养保存的菌株,收集菌体,利用生工细菌基因组提取试剂盒提取菌株基因组 DNA,以引物 27F:5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'、1492R:5'-CGGTTACCTTGTACGACTT-3'为上下游引物,通过 PCR 扩增各菌株的 16S rRNA 基因^[14]。PCR 反应体系为:DNA 模板 2 μ L、10 $\times$ PCR Buffer 5 μ L、2.5 mM dNTP 4 μ L、10 μ M 上下游引物各 2 μ L、Taq 酶

2 μ L, 双蒸水 35 μ L。PCR 反应条件为: 95 $^{\circ}$ C 5 min, 94 $^{\circ}$ C 30 s, 55 $^{\circ}$ C 40 s, 72 $^{\circ}$ C 90 s, 72 $^{\circ}$ C 5 min, 32 个循环。取 5 μ L PCR 产物电泳检测, 其余产物纯化后与克隆载体 pMD 18T 载体相连, 转入大肠杆菌 JM109 中并送往上海生工进行测序。

1.2.4 系统发育树的构建 将各菌株 16S rRNA 基因测序数据在 NCBI 网站进行 BLASTN 比对, 检索同源序列, 并用 MEGA 4.0.2 软件采用邻接法 (Neighbor-Joining method) 进行系统进化树的构建, 以确定菌种在进化中的位置。并将各菌株的 16S rRNA 基因序列数据提交到 GenBank 数据库。

1.2.5 菌株耐高糖特性的检验 由于天然蜂粮混有蜂蜜, 且经发酵之后其含糖量较高, 所以其含有的原生菌株应该在发酵过程中能够忍耐高浓度糖的胁迫。因此, 用含不同浓度葡萄糖的 NB 培养基检验各菌株耐高糖特性, 记录各菌株在不同糖浓度的培养基中培养 24 h 后的菌体浓度 (以培养液在 600 nm 的吸光值表示)。以过夜培养的各菌株为种子液, 以体积分数 2% 接种量转接入不同糖浓度的 3 mL NB 培养基中培养 24 h。

1.2.6 菌株耐酸性检验 由于天然蜂粮发酵中最明显的变化就是蜂花粉 pH 的降低, 因此用不同 pH 的 NB 培养基检验各菌株的生长极限 pH。以过夜培养的各菌株为种子液, 以体积分数 2% 接种量转接入不同 pH 的 3 mL NB 培养基中培养 24 h, 记录各菌株的菌体浓度 (以培养液在 600 nm 的吸光值表示)。

1.2.7 菌株在低酸高糖条件下形成芽孢的特性 主要考察各菌株在低酸高糖 (pH 4.0, 30% 糖质量分数) 条件下培养 24 h 形成芽孢的情况, 因为在酸性和高渗透压 (高糖浓度引起) 条件下, 芽孢杆菌会通过形成芽孢以耐受低酸高糖的胁迫, 但芽孢是休眠体, 无法作用于蜂粮的发酵。因此, 只有那些在低酸高糖条件下能正常生长, 芽孢生成量较小的菌株才有可能在蜂粮的发酵中发挥作用。芽孢生成量的测定采用分光光度法测定芽孢中的吡啶二羧酸 (DPA) 的含量进行, 芽孢量用单位质量菌体 DPA 含量的多少表示即每毫克菌体干质量含有多少微克 (μ g) DPA^[15]。测定原理是芽孢在萌芽、水解, 或加热过程释放 DPA。利用二价铁离子和 DPA 形成的复合物形成的颜色, 在 440 nm 有吸收, 对芽孢进行检测。但这种复合物不稳定, 可加入还原剂如抗坏血酸可

使复合物稳定 2 h。其变色范围在 pH 4.0~6.0。芽孢中 DPA 的释放采用 121 $^{\circ}$ C 高温高压灭菌的方法进行^[16]。

2 结果与分析

2.1 16S rRNA 基因扩增与测序

经革兰氏染色和芽孢染色检验, 共从蜂粮样品中筛选到 16 株产芽孢的细菌, 编号为 Br1-16。对这 16 株菌的 16S rRNA 基因进行了 PCR 扩增, 利用 1 g/dL 琼脂糖凝胶对 PCR 产物进行了电泳分析, 大小如图 1 所示, 16 株菌的扩增序列条带大小介于 1 000 于 1 500 bp 之间。对这 16 个 PCR 产物进行了测序, 得到的序列已提交至 GenBank 数据库, 序列号如表 1 所示。

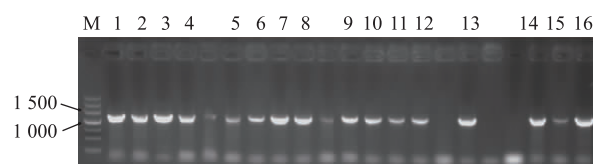


图 1 分离自蜂粮的产芽孢细菌 16S rRNA 基因 PCR 扩增产物电泳图谱

Fig. 1 Electrophoretogram of PCR products of 16S rRNA genes from spore-forming bacteria isolated from bee bread

2.2 16S rRNA 基因同源性比对及系统发育分析

利用 BLASTN 将 16 株细菌的 16S rRNA 基因序列与数据库中的序列进行比对, 序列同源性达大于 98% 的模式菌, 将是判断 16 株细菌归属的重要依据。如表 1 所示, 菌株 Br1, Br6 和 Br11 的 16S rRNA 基因均与模式菌 *Bacillus tequilensis* KCTC 13622^T 的同源性大于 99%, 但系统发育分析 (图 2) 表明这 3 株菌是不同的, 菌株 Br11 比 Br1 和 Br6 与模式菌有着更近的系统发育关系。与另外 13 株菌相比, 这 3 株菌与枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis* NCIB 3610^T) 有着较近的系统发育关系。菌株 Br2、Br3、Br10 与模式菌株 *Bacillus aerophilus* 28K^T 的 16S rRNA 基因相似度均大于 99%, 但只有菌株 Br10 与模式菌处在同一系统进化树分支上 (图 2)。尽管同源比对表明菌株 Br12 与模式菌 *Bacillus invictus* Bi.FFUPI^T 有着较高的同源性, 但系统发育分析显示 Br12 与模式菌 *Bacillus aerophilus* 28K^T 可能有着更近的发育关系。

表 1 分离自蜂粮的产芽孢细菌 16S rRNA 基因序列同源性
比对结果

Table 1 Homologous analyses of 16S rRNA gene
sequences of spore-forming bacteria isolated
from bee bread

菌株	序列号	同源性最高模式菌	相似 度/%
Br1	KF863809	<i>Bacillus tequilensis</i> KCTC 13622 ^T	99.6
Br2	KF863811	<i>Bacillus aerophilus</i> 28K ^T	99.9
Br3	KF863812	<i>Bacillus aerophilus</i> 28K ^T	99.1
Br4	KF863814	<i>Fictibacillus nanhaiensis</i> JSM 082006 ^T	99.4
Br5	KF863815	<i>Bacillus sonorensis</i> NBRC 101234 ^T	98.6
Br6	KF863816	<i>Bacillus tequilensis</i> KCTC 13622 ^T	99.2
Br7	KF863817	<i>Lysinibacillus xylanilyticus</i> XDB9 ^T	98.6
Br8	KF863818	<i>Lysinibacillus fusiformis</i> NBRC 15717 ^T	99.1
Br9	KF863819	<i>Lysinibacillus xylanilyticus</i> XDB9 ^T	98.8
Br10	KF863820	<i>Bacillus aerophilus</i> 28K ^T	99.4
Br11	KF863823	<i>Bacillus tequilensis</i> KCTC 13622 ^T	99.2
Br12	KF863824	<i>Bacillus invictus</i> Bi.FFUP1 ^T	99.5
Br13	KF863826	<i>Lysinibacillus xylanilyticus</i> XDB9 ^T	99.3
Br14	KF863827	<i>Lysinibacillus fusiformis</i> NBRC 15717 ^T	98.8
Br15	KF863833	<i>Bacillus methylotrophicus</i> CBMB205 ^T	99.4
Br16	KF863834	<i>Bacillus methylotrophicus</i> CBMB205 ^T	99.6

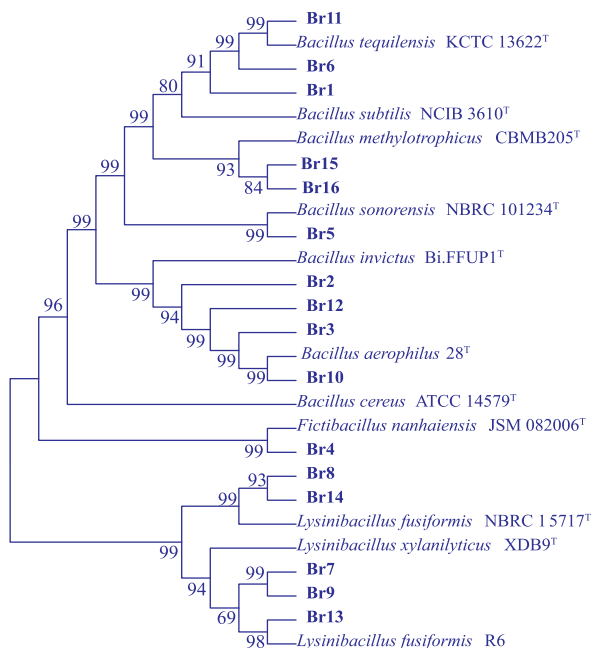


图 2 蜂粮中产芽孢细菌的系统发育分析

Fig. 2 Phylogenetic analysis of the spore-forming bacteria
isolated from bee bread

16S rRNA 基因同源比对分析表明,菌株 Br7、Br9 和 Br13 与模式菌 *Lysinibacillus xylanilyticus* XDB9^T 同源性均在 99% 左右,Br8 和 Br14 与模式菌

Lysinibacillus fusiformis NBRC 15717^T 的同源性约为 99%。但是,系统发育分析表明,菌株 Br13 与非模式菌 *Lysinibacillus fusiformis* R6 有着更近的系统发育关系。Br7 和 Br9 处在同一个系统进化树分支上,Br8 和 Br14 也处在同一分支上,它们极有可能是来自于同一株菌的不同菌落,这需要通过以后的生理生化实验去验证。相似的情况也出现在菌株 Br15 和 Br16 上,它们均与模式菌 *Bacillus methylotrophicus* CBMB205^T 有着大于 99% 的 16S rRNA 基因相似度。最后,同源比对及系统发育分析均表明菌株 Br4 和 Br5 分别与模式 *Fictibacillus nanhaiensis* JSM 082006^T 和 *Bacillus sonorensis* NBRC 101234^T 有着相同的归属关系。

通过以上的分析表明,从蜂粮样品中分离到的 16 株能形成芽孢的细菌均是芽孢杆菌,这 16 株芽孢杆菌隶属于 8 个不同的种,这需要生理生化鉴定去进一步验证。

2.3 菌株耐高糖特性

如表 2 所示,16 株菌在含不同浓度葡萄糖的 NB 培养基中的生长情况用培养物在 600 nm 的吸光值表示。与不含葡萄糖时相比,质量分数 20% 的葡萄糖不同程度地促进了 16 株芽孢杆菌的生长。当葡萄糖质量分数升高至 30% 时,16 株菌的生长明显受到抑制。当葡萄糖质量分数继续升高至 40% 时,共有 5 株菌 (Br6、Br10、Br11、Br12、Br15) 的 OD₆₀₀ 低于 1,而菌株 Br7 和 Br9 生长受到抑制的较轻。在 50% 的糖浓度下,16 株芽孢杆菌均不能生长。

表 2 分离自蜂粮的芽孢杆菌在不同浓度葡萄糖下的生长差异
Table 2 Growth difference of *Bacillus* strains isolated
from bee bread under different
glucose concentration

菌株	葡萄糖质量分数/%				
	0	20	30	40	50
Br1	2.16	2.98	1.79	1.27	—
Br2	2.52	3.24	2.17	1.84	—
Br3	1.98	2.34	1.54	1.45	—
Br4	4.02	4.87	3.21	2.13	—
Br5	3.07	3.87	2.47	1.87	—
Br6	2.08	2.98	1.56	0.98	—
Br7	10.44	14.36	8.67	5.27	—
Br8	4.31	5.23	3.21	2.24	—
Br9	6.33	7.68	4.67	3.12	—
Br10	1.72	2.56	1.03	0.57	—

菌株	葡萄糖质量分数/%				
	0	20	30	40	50
Br11	2.13	2.87	1.65	0.87	—
Br12	2.72	3.24	1.98	0.74	—
Br13	3.65	4.75	2.34	1.54	—
Br14	4.17	5.12	3.15	1.87	—
Br15	1.52	2.68	1.02	0.97	—
Br16	4.82	5.66	3.87	2.46	—

2.4 菌株耐酸特性

如表 3 所示,16 株芽孢杆菌在不同 pH 条件下的生长差异用培养物在 600 nm 的吸光值表示。菌株 Br8、Br13 和 Br14 在 pH4.5 的条件下完全不能生长,当 pH 值降低至 4.0 时菌株 Br3、Br10 和 Br12 的生长也完全被抑制。当 pH 继续降低至 3.0 时,只有 Br2、Br7、Br9 和 Br11 生长的较好。而 Br4、Br5 和 Br6 3 株菌在 pH 3.0 时,其培养物在 600 nm 的吸光值均小于 1。

表 3 分离自蜂粮的芽孢杆菌在不同 pH 条件下的生长差异
Table 3 Growth difference of *Bacillus* strains isolated from bee bread under pH 4.5,4.0 and 3.5

菌株	pH		
	4.5	4.0	3.5
Br1	3.18	1.98	—
Br2	3.01	2.78	1.52
Br3	2.16	—	—
Br4	2.02	1.25	0.87
Br5	1.15	1.04	0.54
Br6	2.08	1.23	0.98
Br7	3.71	2.16	1.49
Br8	—	—	—
Br9	2.33	1.68	1.24
Br10	1.72	—	—
Br11	3.13	2.76	1.85
Br12	2.72	—	—
Br13	—	—	—
Br14	—	—	—
Br15	1.51	0.98	—
Br16	0.81	0.58	—

2.5 菌株在低酸高糖条件下形成芽孢的特性

天然蜂粮的酸度一般在 pH 4.0 左右,糖质量分数一般在 30%左右,所以选择在 pH 4.0 和 30%糖质量分数的条件下,考察 10 个菌株在培养 24 h 后芽孢生成量的差异,芽孢量的差异以每毫克菌体干重中所含 DPA 量的差异表示。如图 3 所示,菌株 Br7、Br9 和 Br11 在培养 24 h 后生成的芽孢量远小于其它菌株,菌株 Br4 和 Br15 生成的芽孢量最多。

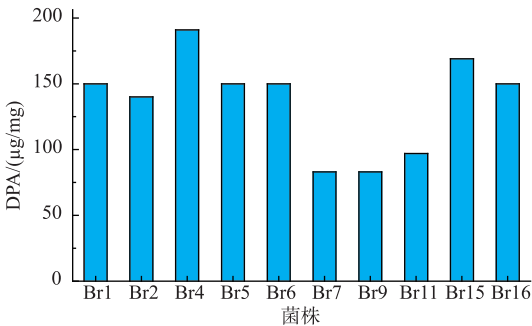


图 3 10 株芽孢杆菌在低酸 (pH 4.0) 高糖 (30%) 条件下培养 24 h 后形成芽孢量的差异

Fig. 3 Difference of spore production of ten *Bacillus* strains cultured for 24 h under pH 4.0 and 30% of glucose

3 结 语

从采自广西某蜂场的中蜂蜂粮中共筛选到 16 株产芽孢的细菌,经 16S rRNA 基因同源比对及系统发育分析,这 16 株菌分别隶属于 *Bacillus tequilensis*、*Bacillus aerophilus*、*Fictibacillus nanhaiensis*、*Bacillus sonorensis*、*Lysinibacillus xylanilyticus*、*Lysinibacillus fusiformis*、*Bacillus invictus*、*Bacillus methylotrophicus*。通过对 16 株菌的耐高糖及耐酸特性的对比,结合天然蜂粮低酸高糖的特点,共挑选出 10 株菌检验其在 pH4.0 和 30%糖浓度的条件下生成芽孢量的差异。结果表明菌株 Br7、Br9 和 Br11 在低酸高糖的条件下芽孢生成量较低,因此,作者认为这 3 株菌可能在天然蜂粮的发酵中发挥着重要作用,它们将作为候选菌株用于蜂花粉的人工模拟发酵。下一步的重点将是考察它们的安全性及探索其应用于蜂花粉发酵的条件。

参考文献:

- [1] DUAN Chuanren,BAO Jiafang,SHI Yisong,et al. Isolation and identification of microbe in loquat flower and rape flower bee bread[J]. **Science and Technology of Food Industry**,2015,36(5):175-180. (in Chinese)
- [2] NAGAI T,NAGASHIMA T,NAGAI T,et al. Preparation and functional properties of extracts from bee bread [J]. **Food / Nahrung**,2004,48(3):226-229.
- [3] O'TOOLE C,RAW A. Bees of the World[M]. Blandford Press,1991.
- [4] HUANG Wencheng. Microorganism is important for nutrition and health of swarm[J]. **Apiculture of China**,2010,61(4):54-55. (in Chinese)
- [5] BRINDZA J,GROF J,BACIGALOVA K,et al. Pollen microbial colonization and food safety[J]. **Acta Chimica Slovaca**,2010,3(1):95-102.
- [6] HAYDEN C. Microbiology of pollen and bee bread; The genus *Bacillus*[J]. **Apidologie**,1979,10(3):269-275.
- [7] ISIDOROVA V A,ISIDOROVAB A G,SCZCZEPANIAKA L,et al. Gas chromatographic-mass spectrometric investigation of the chemical composition of beebread[J]. **Food Chemistry**,2009,115:1056-1063.
- [8] GILLIAM M,PREST D B,LORENZ B J. Microbiology of pollen and bee bread;taxonomy and enzymology of molds [J]. **Apidologie**,1989,20:53-68.
- [9] SU Songkun,CHEN Shenglu,YU Xuping,et al. Isolation and identification of bacteria from pollen and bee bread [J]. **Journal of Zhejiang University (Agric. & Life Sci.)**,2001,27(6):627-630. (in Chinese)
- [10] FOOTE H L. Possible use of microorganisms in synthetic bee bread production[J]. **Amer Bee J**,1957,97:476-478.
- [11] HAYDEN C. Microbiology of pollen and bee bread; The Genus *Bacillus*[J]. **Apidologie**,1979,10(3):269-275.
- [12] JI Baozhong,LIU Shuwen,XU Lina,et al. Advances on the bee bread research [J]. **Chinese Agricultural Science Bulletin**,2006,22(8):165-169. (in Chinese)
- [13] WEI Juan,HE Dongxu,LI Guohong,et al. Isolation and identification of endophytic bacteria in *Paris polyphylla* Smith var. *yunnanensis* (Franch) and phylogenetic analysis[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**,2015,34(2):165-169. (in Chinese)
- [14] HAN Huili,CAI Yujie,GUAN Zhengbing,et al. Screening and identification and study on antimicrobial activity of bacterial isolates from honey[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**,2013,32(2):148-154. (in Chinese)
- [15] GHOSH J,LARSSON P,SINGH B,et al. Sporulation in mycobacteria [J]. **Proceedings of the National Academy of Sciences**,2009,106(26):10781-10786.
- [16] WANG L,LIN Y M. Spore detection in aerobic granules by different dipicolinic acid releasing methods [J]. **Bioresource Technology**,2007,98:3164-3167.

会议消息

会议名称(中文):“3Rs 原则与实验数据质量”专题学术研讨会

开始日期:2017-07-09

结束日期:2017-07-12

所在城市:江苏省 南京市

具体地点:南京银城皇冠假日酒店

主办单位:中国毒理学会毒理学替代法与转化毒理学专业委员会 中国环境诱变剂学会毒性测试与替代方法专业委员会 中华预防医学会卫生毒理分会

会议主席:贺争鸣(中国食品药品检定研究院) 邱璐(上海市出入境检验检疫局)

摘要截稿日期:2017-05-20

全文截稿日期:2017-05-20

联系人:徐菠

联系电话:18262636117,025-86868317 E-MAIL:tatt2015@163.com

会议网站: <http://www.labagd.com/Item/25738.aspx>

会议背景介绍:“2017(第三届)毒性测试替代方法与转化毒理学(国际)学术研讨会”将于2017年7月9-12日期间在江苏·南京银城皇冠假日酒店(南京市江宁区佳湖东路9号)召开。会议设主旨报告、大会报告、专题报告、壁报交流等,同时还将开展“青年优秀论文奖”评选活动。会议设置6个主题。其中,3Rs原则与实验数据质量是毒性测试替代方法与转化毒理学领域中的重要内容,本次会议将设置“3Rs原则与实验数据质量”专题研讨会。热忱欢迎毒理学、环境科学、实验动物科学等相关学科的工作者积极参会。