

研究报告

一株亚硝酸盐降解真菌 *Aspergillus parasiticus* JFS 的
筛选及鉴定

刘冰花* 郭晓恒 杨林* 罗亚雄 蒲小龙 袁管明

(成都大学 医护学院 四川 成都 610106)

摘要:【目的】筛选可降解亚硝酸盐的菌株。【方法】利用亚硝酸盐选择培养基从水样、土样、朽木等 20 多个样品中筛选目的菌株。利用盐酸萘乙二胺法检测目的菌株在亚硝酸盐液体培养基中降解亚硝酸盐的能力, 利用镉柱还原法和试纸法鉴定亚硝酸盐被目的菌株代谢后的产物; 利用菌落形态、菌丝及分生孢子形态、ITS DNA 序列、 β -Tubulin gene 序列及 Calmodulin gene 序列分析等鉴定目的菌株。【结果】得到一株可强烈降解亚硝酸盐的真菌菌株 JFS, 其能在亚硝酸盐浓度高达 20.0 g/L 的液体培养基中很好的生长, 菌株 JFS 将亚硝酸盐降解为无毒的硝酸盐和铵根离子。结合形态学、对培养基的要求及上述 3 个基因序列的进化树分析, 该菌株属于寄生曲霉菌(*Aspergillus parasiticus*)。【结论】菌株 JFS 具有强烈的降解亚硝酸盐的能力。

关键词: 降解亚硝酸盐, 寄生曲霉, 筛选, 鉴定

Screening and identification of the nitrite-degrading
Aspergillus parasiticus JFSLIU Bing-Hua* GUO Xiao-Heng YANG Lin* LUO Ya-Xiong PU Xiao-Long
YUAN Guan-Ming

(School of Medicine and Nurse, Chengdu University, Chengdu, Sichuan 610106, China)

Abstract: [Objective] Our purpose is to screen the strains that degrade the nitrite. [Methods] We screened the target strains on plate with nitrite selective medium from more than 20 samples such as water, soil and deadwood. We tested the ability of the target strains degrades nitrite by the method of hydrochloric acid naphthalene ethylenediamine. Cadmium column reduction method and test paper method were used to detect the metabolic product of nitrite in the strains. We identified the target strains by morphological characteristics, hyphal and conidial morphology and homology of ITS rDNA sequence and β -Tubulin gene sequence and Calmodulin gene sequence. [Results] We obtained a biodegradable nitrite strains JFS. The strains JFS has a strong ability to degrade nitrite and degrade nitrite to non-toxic nitrate and NH_4^+ . Even concentration of nitrite up to 20% in medium, it also grows very well. According to the morphology, the requirement to culture medium, the 3 gene

基金项目: 四川省教育厅重点项目(No. 12ZA207); 川菜发展研究中心规划项目(No. CC12Z18)

*通讯作者: 刘冰花: Tel: 86-28-84814295; ✉: liubinghua2006.com@163.com

杨林: Tel: 86-28-84837103; ✉: linyang012000@126.com

收稿日期: 2014-04-19; 接受日期: 2014-06-05; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2014-08-20

sequences and phylogenetic studies, the strains JFS belongs to the *Aspergillus parasiticus*. We identified it as *Aspergillus parasiticus*. [Conclusion] The strains JFS has a strong ability to degrade nitrite.

Keywords: Nitrite degradation, *Aspergillus parasiticus*, Screening, Identification

亚硝酸盐是自然界中最常见的含氮化合物之一,来源十分广泛^[1],但亚硝酸盐对人类和其它动物来说是剧毒物质。随着我国水产业的迅速发展,养殖密度和规模逐渐增大,养殖水的水质污染也随之加重,其中亚硝酸盐含量过高是水质污染的主要因素之一,因为亚硝酸盐的含量超标会严重危害鱼类等水产动物的正常生长^[2-3],比如水中过多的亚硝酸钠进入鱼体内可使鱼体内的亚铁血红蛋白(Fe^{2+})氧化为高铁血红蛋白(Fe^{3+})^[4],从而抑制血液运载氧气的能力。亚硝酸盐含量过高也是食品污染的主要因素之一^[5],食品中的亚硝酸钠进入人体以后可以和体内蛋白质代谢后产生的部分胺类物质反应,生成强致癌作用的亚硝酸胺和亚硝酸酰胺^[6],同时亚硝酸钠还可能导致胎儿畸形^[7]。降低水质中以及食品中残留的亚硝酸盐含量的方法很多,比如离子交换法、反渗透法、电渗析法、微生物降解法、化学法等。其中微生物降解法具有高效低耗的优点,越来越受到人们的青睐^[8-10]。本研究是从泥土、水、朽木等样品中分离具有强降解亚硝酸钠的微生物。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品: 采自四川成都、四川宜宾及重庆荣昌等地的水样、土样、朽木等共 20 多个样品。样品采回后风干,马上使用(水样不用风干,采回后直接使用)。

1.1.2 培养基: 亚硝酸盐选择培养基(g/L): NaNO_2 20.0, K_2HPO_4 3.0, KH_2PO_4 1.0, 安琪酵母 2.5, 琼脂粉 16.0, pH 7.22。察氏培养基^[11](液体培养基不加琼脂粉)。亚硝酸盐培养基①-⑥为:以 NaNO_2 替换 NaNO_3 的察氏培养基,其中 NaNO_2 的浓度依次为 0、800、1 600、2 400、3 200、4 000 $\mu\text{g/L}$ 。所有的培养基配好后均 1×10^5 Pa 灭菌 25 min。

1.1.3 主要试剂及仪器: 试剂: *Taq* PCR Master Mix, 北京庄盟国际生物基因科技有限公司。

仪器: PCR 反应扩增仪,加拿大 BBI 公司;凝胶成像系统, Gene Genius 公司; U-3010 紫外-可见分光光度计, Hitachi 公司; JSM-7500F 扫描电子显微镜, 日本电子。

1.2 菌株的筛选

将采集回来的水样、土样及朽木分别放入亚硝酸盐选择培养基平板上, 30 °C 恒温培养, 并挑取平板上长出的单菌落, 转接于新的亚硝酸盐选择培养基平板上, 继续置 30 °C 恒温培养, 反复转接, 直至目测单一菌落为止, 然后将目的菌株接种到察氏培养基斜面上, 于 4 °C 保存。

1.3 菌株降解亚硝酸盐的能力测定

1.3.1 菌株的液体培养: 将菌株由察氏斜面转接入 100 mL 察氏种子培养基中, 30 °C、150 r/min 培养 48 h。然后将菌株由种子培养基分别转接入装有 100 mL 亚硝酸盐培养基①-⑥的 250 mL 锥形瓶中, 接种量为 3%, 30 °C、150 r/min 培养。每天在无菌操作的情况下从锥形瓶①-⑥中各取出 4 mL 培养液, 标记为①-⑥, 然后把锥形瓶放入摇床中继续 30 °C、150 r/min 培养。

1.3.2 亚硝酸盐标准曲线的制作: 参照文献[12]中的盐酸萘乙二胺法制作亚硝酸盐含量标准曲线。

1.3.3 培养液中亚硝酸盐含量的测定: 分别将 1.3.1 中取出的 4 mL 目的菌株培养液①-⑥ 4 000 r/min 离心 30 min, 使上清液和菌体沉淀分离, 弃沉淀。分别向上清液中加入 0.5 mL 饱和硼酸溶液, 于沸水中加热 15 min 后冷却至室温, 再分别加入 0.2 mL 亚铁氰化钾和 0.2 mL 乙酸锌溶液, 摇匀后静置 30 min, 然后 4 000 r/min 离心 30 min, 弃沉淀, 收集上清液, 记录体积。取 3 mL 上清液于 50 mL 比

色管中,向其中再加入 2 mL 4 g/L 的对氨基苯磺酸溶液,混匀,静置 5 min 后加入 1 mL 2 g/L 盐酸萘乙二胺溶液,然后加蒸馏水至 50 mL 刻度线,摇匀,静置 15 min,以①管为对照管调零,用分光光度计于波长 538 nm 处测吸光度。每一管平行作 3 管,取其平均值。

1.3.4 回收率的试验:为了验证仪器和测定方法的准确性和可靠性,用培养时间为 0 h 的②-⑥共 5 个锥形瓶中的样品通过标准亚硝酸钠加入法进行亚硝酸钠回收率实验,亚硝酸盐含量的测定方法同 1.3.3。每一管平行作 3 管,取其平均值。

1.4 亚硝酸盐代谢产物的初步确定

1.4.1 用镉柱还原法测定代谢产物中是否有硝酸盐:将目的菌株分别由察氏培养基斜面上直接转入含有不同浓度的亚硝酸盐培养基中,30 °C、150 r/min 培养 4 d 后,4 000 r/min 离心 30 min,使上清液和菌体沉淀分离,弃沉淀。然后参考文献[12]的镉柱还原法使上清液经过还原性镉柱,从而将其中的硝酸盐还原为亚硝酸盐,分别测定还原前和还原后上清液中的亚硝酸盐含量。如果经过镉柱后溶液中的亚硝酸盐含量多于过柱前的上清液中亚硝酸盐含量,说明过柱前上清液中含有硝酸盐,继而说明目的菌株在代谢过程中将一部分亚硝酸盐转变成了硝酸盐。

1.4.2 用试纸法确定代谢产物中是否有 NH_4^+ :将目的菌株由察氏培养基斜面转接入 100 mL 由 2.0% (质量体积比) NaNO_2 代替 0.2% NaNO_3 (质量体积比)的察氏液体培养基中,30 °C、150 r/min 培养 7 d 后,4 000 r/min 离心 30 min,将上清液转入 250 mL 锥形瓶中,往其中加入 2 mL 40% (质量体积比)的 NaOH 溶液,摇匀,然后在锥形瓶口放一条用去离子水润湿的 pH 试纸,加热锥形瓶,观察 pH 试纸是否变为蓝色,如果 pH 试纸变为蓝色,则证明目的菌株的培养液中存在 NH_4^+ ,说明目的菌株可将亚硝酸钠转变为 NH_4^+ 。如果 pH 试纸不变色,则证明目的菌株并没有将亚硝酸钠转变为 NH_4^+ 。

1.5 菌株的鉴定

1.5.1 平板观察:将菌株接种在察氏平板上,将平板置于 30 °C 恒温培养,观察菌落的特征。

1.5.2 载玻片温室培养显微观察^[13]和电子显微镜观察:在培养皿底部铺一张圆形滤纸片,其上放一“U”玻璃棒,在玻璃棒上放一洁净的载玻片和两片盖玻片,1×10⁵ Pa 消毒 25 min。然后从未使用过的察氏平板上切取 1 cm² 大小的两块琼脂块,放置在载玻片的两端,用接种针从察氏培养基平板的菌落上挑取少许菌体,接种在琼脂块的边缘,盖上盖玻片,倒入约 30 mL 20% (质量体积比)的无菌甘油溶液,30 °C 恒温培养,分别用光学显微镜和扫描电子显微镜观察其形态特征。

1.5.3 分子鉴定:将菌株在察氏平板上培养 3-6 d 后,提取其基因组 DNA。分别以真菌核糖体 ITS rDNA 区通用引物 ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') 和 ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')^[14]、真菌 β -Tubulin gene 通用引物 Bt2a (5'-GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC-3') 和 Bt2b (5'-ACCCCTCAGTGTAGTGACCCCTGGC-3')^[15]、真菌 Calmodulin gene 通用引物 CF1L (5'-GCCGACTCTTTGACYGARGAR-3') 和 CF4 (5'-TTTGTGATCATRAGYTGGAC-3')^[16]为引物,以菌株的基因组 DNA 为模板,对该菌株的 ITS1-5.8S-ITS2 rDNA 全序列及部分 18S rDNA 序列和 28S rDNA 序列、 β -Tubulin gene 序列和 Calmodulin gene 序列进行 PCR 扩增,采用 25 μ L (10 μ mol/L 的上游引物 1 μ L, 10 μ mol/L 的下游引物 1 μ L, 2×Taq PCR Master Mix 12.5 μ L, 超纯水 8.5 μ L, 基因组 DNA 原液 2 μ L)反应体系,反应条件为:98 °C 3 min; 98 °C 25 s, 55 °C 25 s, 72 °C 1 min, 30 个循环;72 °C 10 min。扩增结束后,分别用琼脂糖凝胶电泳对 PCR 产物进行检测,切割所需 DNA 目的条带,送上海生工公司测序。然后分别将该菌株的 ITS rDNA 序列、 β -Tubulin gene 序列和 Calmodulin gene 序列在 NCBI GenBank 中

进行 BLAST 检索，用 DNAMAN 软件比对并计算菌株之间的相似度，用 MEGA 5.2.1 软件进行多序列匹配排列，用 Neighbor-Joining 法构建系统发育树，用 Bootstrap (重复抽样 1 000 次)分析评估树的稳定性^[14,17-18]。

2 结果与分析

2.1 菌株降解亚硝酸盐的能力

从 20 多个样品中分离出 1 株可降解亚硝酸盐的真菌菌株 JFS，菌株 JFS 具有很强的降解亚硝酸盐的能力，其在亚硝酸钠浓度高达 2.0% (质量体积比)的培养基中生长得很好，其来自于重庆市荣昌县金佛镇的一个鱼池水样。

2.1.1 亚硝酸盐标准曲线的绘制：以亚硝酸钠的浓度为横坐标，以波长 538 nm 处的吸光度 OD 为纵坐标作图，绘制亚硝酸盐浓度标准曲线，如图 1 所示。

从图 1 可知，在波长 538 nm 处当亚硝酸钠浓度在 0–0.25 mg/L 范围内时，亚硝酸钠浓度 *C* 和吸光度 *OD* 值成良好的线性关系，满足方程 $OD=0.712\ 5C+0.000\ 6$ ， $R^2=0.999\ 6$ 。

2.1.2 菌株 JFS 在含有亚硝酸钠的液体培养基中降解亚硝酸钠的能力：菌株 JFS 在不同初始亚硝酸钠浓度的液体培养基中经过不同时间的旋转培养后，培养基中亚硝酸钠含量的变化如图 2 所示。

从图 2 可知，随着培养时间的延长，培养基中的亚硝酸钠含量都会迅速减少，亚硝酸钠初始浓度最低的培养瓶② 24 h 亚硝酸钠的降解率为 82.9%，72 h 亚硝酸钠的降解率为 100%，亚硝酸钠初始浓度稍高的培养瓶③–⑤ 24 h 亚硝酸钠的降解率分

别为 73.4%、71.9%和 60.0%，120 h 亚硝酸钠的降解率均为 100%，亚硝酸钠初始浓度最高的培养瓶⑥ 24 h 亚硝酸钠的降解率为 53.0%，120 h 亚硝酸钠的降解率为 99.8%。这些数据说明该菌株具有非常强的利用亚硝酸盐的能力。

2.1.3 回收率试验：以培养时间为 0 h 的②–⑥共 5 个锥形瓶中的样品，通过标准亚硝酸钠加入法进行亚硝酸钠回收率实验的结果如表 1 所示。

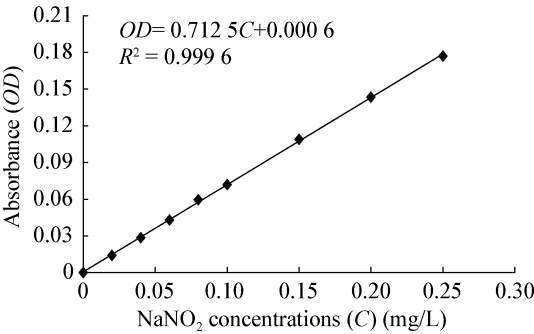


图 1 亚硝酸钠浓度标准曲线
Figure 1 Standard curve of nitrite content

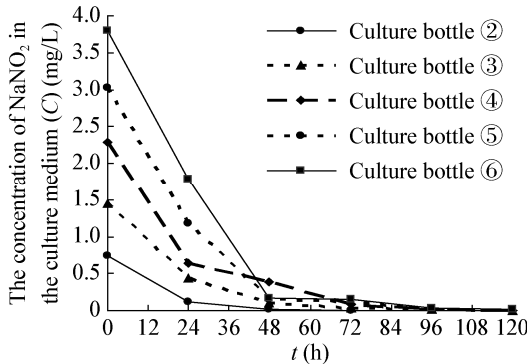


图 2 培养液中亚硝酸钠浓度随培养时间变化趋势
Figure 2 Variation of sodium nitrite concentration with time in culture

表 1 亚硝酸盐的回收率 Table 1 Recovery rate of the nitrite			
样品 Sample	添加的 NO ₂ ⁻ 浓度 The true NO ₂ ⁻ concentration (mg/L)	测得的 NO ₂ ⁻ 浓度 The measured concentration of NO ₂ ⁻ (mg/L)	NO ₂ ⁻ 的回收率 The recovery rate of NO ₂ ⁻ (%)
Culture bottle ②	0.8	0.735	91.88
Culture bottle ③	1.6	1.441	90.06
Culture bottle ④	2.4	2.278	94.92
Culture bottle ⑤	3.2	3.026	94.56
Culture bottle ⑥	4.0	3.799	94.98

从表 1 可以看出,5 个样品中亚硝酸盐的回收率均在 90.06%–94.98%之间,接近 100%,说明用该方法测样品中亚硝酸盐的含量准确可行。

2.2 亚硝酸盐在目的菌株体内代谢产物的初步判定

2.2.1 代谢产物中硝酸盐的含量:目的菌株在含有不同浓度亚硝酸钠的液体培养基中培养 4 d 后,测得的培养基上清液经过还原性镉柱前后的亚硝酸钠浓度如表 2 所示。

从表 2 可知,培养基上清液流经镉柱以后其中的亚硝酸钠含量均有所增加,说明培养基上清液中含有一定浓度的硝酸钠,进而说明目的菌株在培养过程中将一部分亚硝酸钠转变成了硝酸钠。

2.2.2 代谢产物中 NH_4^+ 的确定:目的菌株在以 NaNO_2 为唯一氮源的液体培养基中培养 7 d,上清液在加入 NaOH 溶液后加热,瓶口的湿润 pH 试纸很快变为明显的蓝色,说明有氨气从瓶里放出,进而说明目的菌株将一部分 NO_2^- 代谢成了 NH_4^+ 。

2.3 菌株 JFS 的形态特征

菌株 JFS 在察氏平板上 30 °C 恒温培养,4 d 时菌落直径为 2.6 cm。此时,菌落正面呈现出 4 个同心圈形,菌落最中间是乳白色菌丝状,由里向外第 2 层有很多金黄色孢子,第 3 层有很多白色孢子,最外层是乳白色菌丝,菌落背面为浅棕色。9 d 时菌落直径 5.0 cm。此时,平板上有很多白色孢子和墨绿色孢子,同时平板上出现了很多棕黑色液滴,平板背面为深棕色。孢子的颜色随着培养时间

延长由浅到深,最初为淡黄色,然后变为绿色,最后变为棕黑色。营养菌丝有隔、分枝、透明,分生孢子梗自菌丝生出,可单生或对生,直立,细长,大都简单,顶端渐粗,末端扩展成由一系列小梗排列成木栅状的顶囊,顶囊球形,小梗上有成串的 2.81–3.60 μm 的球形分生孢子,分生孢子头犹如花菜样、表面不光滑,产生棕色分泌液。菌落特征及菌丝和产孢结构、分生孢子形状特征如图 3 所示。形态学研究结果显示菌株 JFS 与 *Aspergillus parasiticus* 相似。

2.4 菌株 ITS rDNA 序列、 β -Tubulin gene 序列、Calmodulin gene 序列分析及系统发育学分析

对菌株 JFS 的 ITS rDNA 序列、 β -Tubulin gene 序列和 Calmodulin gene 序列的 PCR 产物测序后发现,其 ITS rDNA 序列共有 576 bp, β -Tubulin gene 序列共有 522 bp,Calmodulin gene 序列共有 749 bp。分别将其 ITS rDNA 序列、 β -Tubulin gene 序列和 Calmodulin gene 序列输入 NCBI GenBank 中 BLAST,用 MEGA 5.2.1 软件构建系统发育树,如图 4、5、6 所示。在图 4、5、6 中,菌株 JFS 均与 *Aspergillus parasiticus* 和 *Aspergillus arachidicola* (目前种 *Aspergillus arachidicola* 的概念还不清楚)聚到了同一个分支,亲缘关系最近。结合菌株的菌体及菌落形态、培养条件与 ITS rDNA 序列、 β -Tubulin gene 序列、Calmodulin gene 序列的系统学分析结果,进一步确定该真菌菌株 JFS 为散囊菌目发霉科曲霉属中的寄生曲霉^[15,19],即 *Aspergillus parasiticus* (命名人:刘冰花)。

表 2 经过镉柱前后培养基上清液的 NaNO_2 浓度
Table 2 The concentration of NaNO_2 in the supernatant before cadmium column and after cadmium column

不同阶段 The different stages	NaNO_2 浓度 The concentration of NaNO_2 (mg/L)		
	Culture bottle ①	Culture bottle ②	Culture bottle ③
NaNO_2 content before culture in culture medium	2.000	4.000	6.000
NaNO_2 content in the supernatant before the cadmium column	0.009	0.033	0.050
NaNO_2 content in the supernatant after the cadmium column	0.204	0.220	0.228

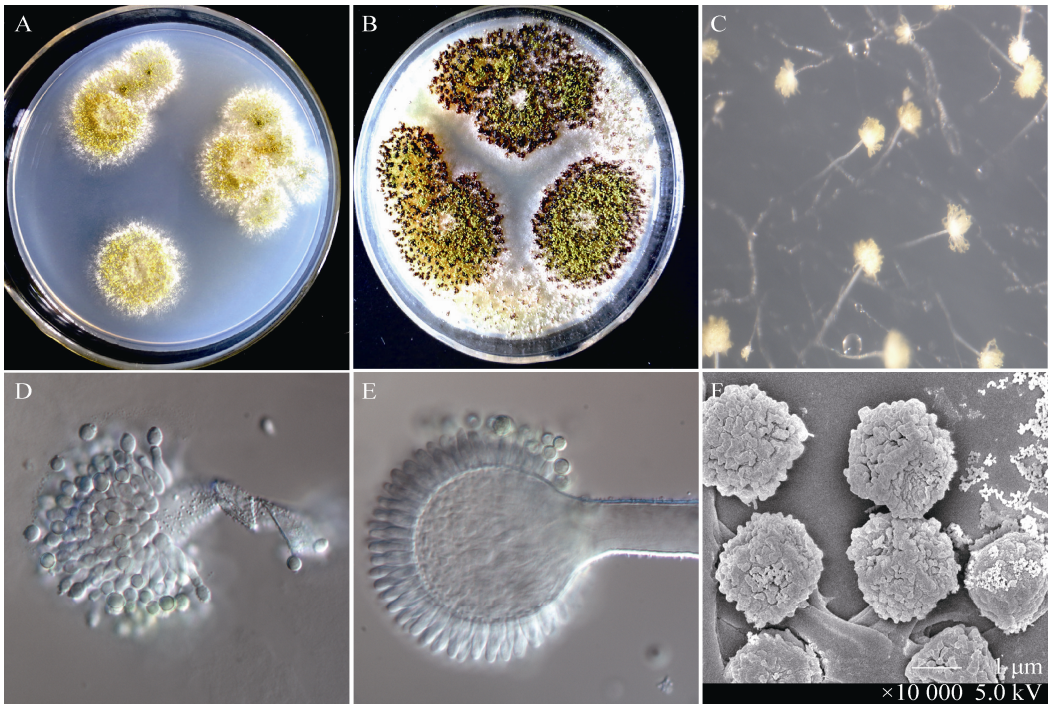


图 3 菌株 JFS 的形态特征

Figure 3 Morphological characteristics of the strains JFS on Czapek medium

Note: A: Colonies of 4 days; B: Colonies of 9 days; C: Conidiophore and conidial head (80×); D: Conidial head (1 000×); E: Conidial head (1 000×); F: Conidial head (10 000×).

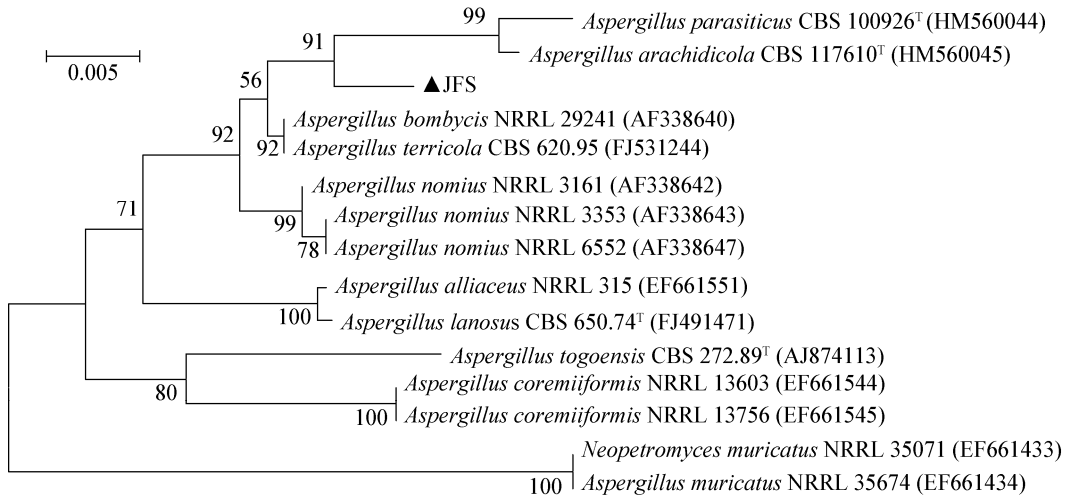


图 4 菌株 JFS 基于 ITS rDNA 序列的基因同源性的系统发育树

Figure 4 The phylogenetic position on ITS rDNA sequence data of the strains JFS

Note: The sequences used in the analysis were obtained from the GenBank Database (accession numbers is given parentheses). The number at branch nodes are the percentage bootstrap support based on Neighbor-Joining analysis of 1 000 resample data sets. The scale bar corresponds to 0.005 substitutions per nucleotide position.

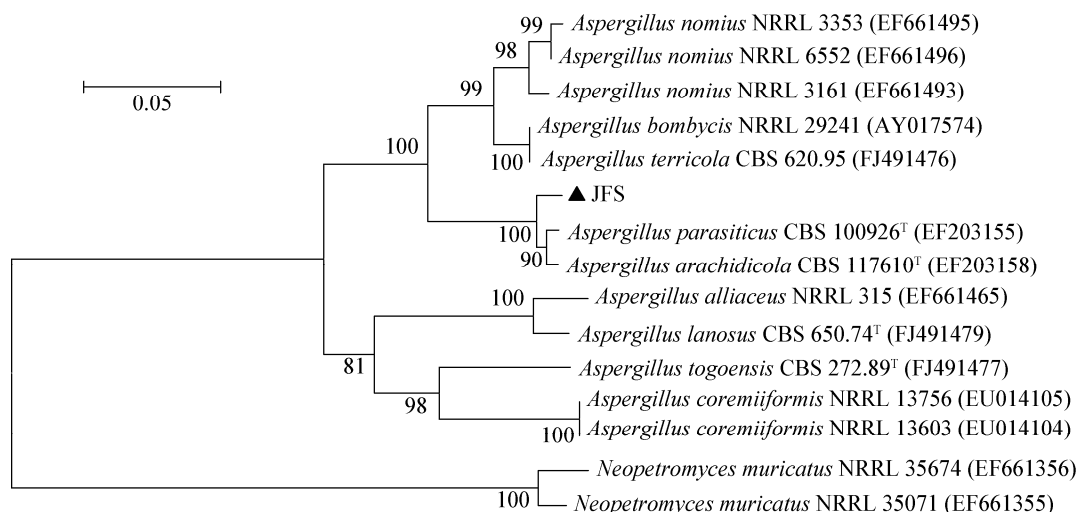


图5 菌株 JFS 基于 β -Tubulin 基因序列的基因同源性的系统发育树

Figure 5 The phylogenetic position on β -Tubulin gene sequence data of the strains JFS

Note: The sequences used in the analysis were obtained from the GenBank Database (accession numbers is given parentheses). The number at branch nodes are the percentage bootstrap support based on Neighbor-Joining analysis of 1 000 resample data sets. The scale bar corresponds to 0.05 substitutions per nucleotide position.

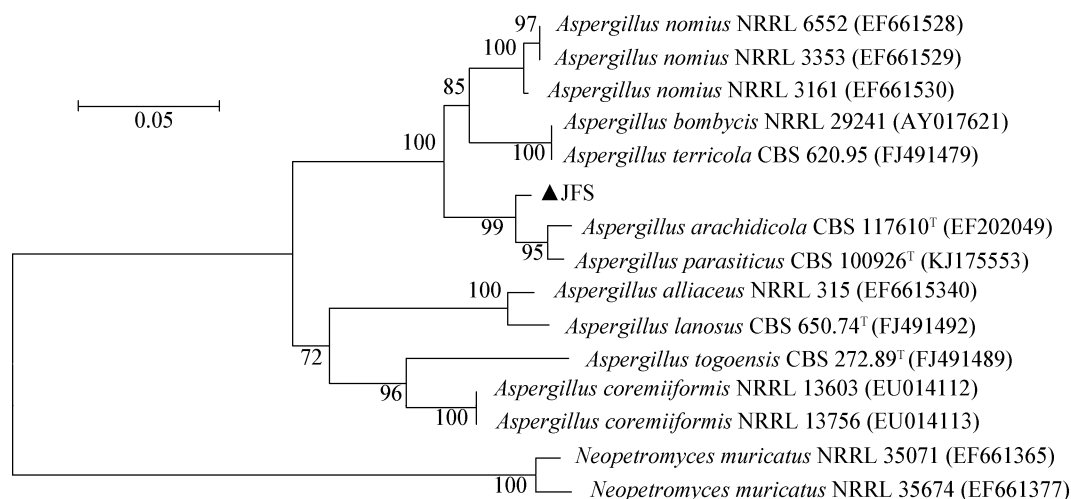


图6 菌株 JFS 基于 Calmodulin 基因序列的基因同源性的系统发育树

Figure 6 The phylogenetic position on Calmodulin gene sequence data of the strain JFS

Note: The sequences used in the analysis were obtained from the GenBank Database (accession numbers is given parentheses). The number at branch nodes are the percentage bootstrap support based on Neighbor-Joining analysis of 1 000 resample data sets. The scale bar corresponds to 0.05 substitutions per nucleotide position.

3 讨论

本实验从重庆市荣昌县金佛镇的一个鱼池水样中分离到一株可以降解亚硝酸盐的真菌,综合菌落形态、菌丝形态、分生孢子形态、培养条件及分子生物学鉴定结果,该菌株属于真子囊菌亚纲散囊菌目

发霉科曲霉属的寄生曲霉(*Aspergillus parasiticus*),该菌株现保存在中国典型培养物保藏中心,保藏号为 CCTCC M 2013662, GenBank 登录号为 KJ847706、KJ847707 和 KJ847708。菌株 JFS 能在亚硝酸盐为唯一氮源的培养基中较好地生长,有很

强、很快降解亚硝酸盐的能力,在初始浓度为 4 mg/L 的亚硝酸钠培养液中 120 h 的亚硝酸钠降解率为 99.8%,在亚硝酸钠的浓度高达 20.0 g/L 时仍能较好的生长,并且发现亚硝酸钠的浓度越高该菌株生长得越好,在有氧和无氧条件下该菌株均能较好的生长。菌株 JFS 除了利用亚硝酸盐合成自身的结构蛋白及功能蛋白以外,还将有毒的亚硝酸盐降解为无毒的硝酸盐和 NH_4^+ ,同时该菌株还可以继续利用产物硝酸盐。

本实验重点研究了菌株 JFS 的筛选,对亚硝酸盐的降解能力,确定了亚硝酸盐的降解产物及对菌株 JFS 的鉴定结果。由于之前未发现过针对真菌降解亚硝酸盐的报道,所以菌株 JFS 的发现填补了真菌在降解亚硝酸盐方面的空白。该菌株对亚硝酸盐有很强的降解能力,有望应用于水质净化工程或基因工程。但该菌株的最佳培养条件、对污水的实际净化能力以及降解亚硝酸盐的分子机制等还有待进一步研究。

致谢:在此文完成及相关研究过程中,得到了中国科学院微生物研究所真菌学国家重点实验室的大力支持,同时还得到中国科学院微生物研究所庄文颖院士、王龙博士和新疆石河子大学倪永清教授的很多帮助,谨此致谢。

参 考 文 献

- [1] 陈卫民,戴树桂,张清敏. 水环境中亚硝酸盐聚集的原因及其对动植物的影响[J]. 安全与环境学报, 2011, 11(6): 9-15.
- [2] 李波,樊启学,张磊,等. 不同溶氧水平下氨氮和亚硝酸盐对黄颡鱼的急性毒性研究[J]. 淡水渔业, 2009, 39(3): 31-35.
- [3] 胡静荣. 降解亚硝酸盐菌种的诱变纯化及培养基筛选研究[J]. 安徽农业科学, 2010, 38(31): 17741-17743.
- [4] 熊焰,刘力源,罗睿,等. 1株亚硝酸盐降解菌的筛选、鉴定、降解条件及效果[J]. 中国水产科学, 2010, 17(6): 1-8.
- [5] 韩梅,王衍强,彭帅,等. 降解亚硝酸盐乳酸菌的分离与鉴定[J]. 沈阳农业大学学报, 2011, 42(2): 216-219.
- [6] 孙敬,詹文圆,陆瑞琪,等. 肉制品中亚硝胺的形成机理及其影响因素分析[J]. 肉类研究, 2008(1): 18-23.
- [7] Mueller BA, Searles Nielsen S, Preston-Martin S, et al. Household water source and the risk of childhood brain tumours: results of the SEARCH International Brain Tumor Study[J]. International Journal of Epidemiology, 2004, 33(6): 1209-1216.
- [8] 杨家澍,王留成,李国顺,等. 水中亚硝酸盐净化处理研究进展[J]. 郑州大学学报: 工学版, 2002, 23(4): 102-106.
- [9] 杜伟,张振中,郭海英. 降低火腿肠中亚硝酸钠含量的研究[J]. 肉类研究, 2003(4): 5-8.
- [10] Wu YY, Liu FJ, Li LH, et al. Isolation and identification of nitrite-degrading lactic acid bacteria from salted fish[J]. Advanced Materials Research, 2011(393/395): 828-834.
- [11] 杨革. 微生物学试验教程[M]. 第1版. 北京: 科学出版社, 2005: 143-152.
- [12] 中华人民共和国卫生部. GB 5009.33-2010食品安全国家标准食品中亚硝酸盐与硝酸盐的测定[S]. 中国标准出版社, 2010: 1-17.
- [13] 周德庆. 微生物学实验教程[M]. 第2版. 北京: 高等教育出版社, 2010: 60-63.
- [14] 刘韬,肖荣凤,刘波,等. 台湾引进甜杨桃的两种真菌病原鉴定[J]. 福建农业学报, 2011, 26(3): 409-414.
- [15] Varga J, Frisvad JC, Samson RA. Two new aflatoxin producing species, and an overview of *Aspergillus* section Flavi[J]. Studies in Mycology, 2011, 69: 57-80.
- [16] Palumbo JD, O'Keeffe TL, Vasquez SJ, et al. Isolation and identification of ochratoxin A-producing *Aspergillus* section *Nigri* strains from California raisins[J]. Letters in Applied Microbiology, 2011, 52(4): 330-336.
- [17] Peterson SW. Phylogenetic analysis of *Aspergillus* species using DNA sequences from four loci[J]. Mycologia, 2008, 100(2): 205-226.
- [18] Pildain MB, Frisvad JC, Vaamonde G, et al. Two novel aflatoxin-producing *Aspergillus* species from Argentinean peanuts[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2008, 58(3): 725-735.
- [19] 魏景超. 真菌鉴定手册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1979: 132-134.