

一株产纤维素酶和植酸酶的米曲霉的 诱变筛选和固体发酵

管海华¹, 贾秉晟¹, 王家芳¹, 何 瑶¹, 杨启银^{1, 2, 3}

(1 南京师范大学生命科学学院, 江苏 南京 210046)

(2 南京市微生物工程技术研究中心, 江苏 南京 210046)

(3 江苏省微生物资源产业化工程技术研究中心, 江苏 南京 210046)

[摘要] 通过紫外诱变和微波辐射米曲霉菌株, 筛选出高产纤维素酶和植酸酶米曲霉菌株 ZQH48 并进行了固体发酵条件的优化. 优化后的培养基配方为: 菌渣: 麸皮 = 1: 1, 氯化铵 12%, 蛋白胨 2%, 硫酸镁 0.07%, 氯化钠 0.5%, 磷酸二氢钾 0.02%, 固水比为 1: 1; 最佳培养温度 35℃. 优化后纤维素酶活力可达 161.55 U/g, 较原始菌株提高 5.42 倍; 植酸酶活力达 1541.13 U/g, 较原始菌株提高 1.56 倍.

[关键词] 菌渣, 米曲霉, 纤维素酶, 植酸酶, 固体发酵

[中图分类号] Q936 [文献标志码] A [文章编号] 1001-4616(2011)02-0083-07

Solid-State Fermentation and Screening of a Strain of *Aspergillus Oryzae* Producing Cellulase and Phytase

Guan Haihua¹, Jia Bingsheng¹, Wang Jiafang¹, He Yao¹, Yang Qiyin^{1, 2, 3}

(1 School of Life Sciences Nanjing Normal University, Nanjing 210046, China)

(2 Nanjing Engineering and Technology Research Center for Microbiology Nanjing 210046, China)

(3 Jiangsu Provincial Engineering and Technology Research Center for Microbiology Resources Nanjing 210046, China)

Abstract The strain of *Aspergillus Oryzae* ZQH48 overproducing cellulase and phytase was isolated by UV and microwave radiation, at the same time, the cultural factors and conditions of solid-state fermentation were also optimized. The optimal culture condition was 12% ammonium chloride, 2% peptone, 0.07% magnesium sulfate, 0.5% sodium chloride, 0.02% potassium dihydrogen phosphate, ratio of liquid to material and mushroom dregs to bran 1: 1, 35℃. In this condition, the activity of cellulase and phytase of the ZQH48 strain increased by 161.55 U/g and 1541.13 U/g respectively, which was 5.42 times and 1.56 times higher than the parent strain.

Key words mushroom waste, *Aspergillus Oryzae*, cellulase, phytase, solid-state fermentation

近年来,我国食用菌产业发展迅速,食用菌总产量已超过 1400 多万 t,其副产品——食用菌菌渣也越来越多,每年产生的食用菌菌渣也在 1000 万 t 左右,这些菌渣,除部分用作饲料添加剂和肥料还田外,有相当一部分被菇农任意堆放,既污染环境又造成资源的严重浪费,面广量大的菌渣如何利用成了新的研究课题。

微生物酶在饲料工业中已得到广泛的应用. 纤维素酶可以将植物原料和真菌细胞壁中的纤维素类物质水解成简单糖^[1, 2], 植酸酶能将动物不易利用的植物蛋白的植酸中的磷释放出来供动物吸收利用^[3-5]. 用生物学方法处理纤维性物质的主要问题是筛选适宜的微生物菌种,这类菌种既能分解纤维素、半纤维素等物质,又能利用其产物大量地生长繁殖,提供动物所需的蛋白和其他营养物质^[6].

本实验对米曲霉 (*Aspergillus Oryzae*) 进行定向诱变选育,将菌渣进行微生物发酵转化,并将固体发酵条件进行优化,旨在为菌渣的综合利用提供方法和途径。

收稿日期: 2010-08-02

基金项目: 江苏省科技厅项目 (BG2005326).

通讯联系人: 杨启银, 副教授, 研究方向: 应用微生物技术. E-mail: yangqiyin@163.com

1 材料和方法

1.1 材料

菌渣为金针菇菌渣,由金坛农林局食用菌协会提供.米曲霉 (*Aspergillus Oryzae*) CICC2197 由工业微生物菌种保藏中心提供.

培养基包括以下几种:

A: 诱变筛选培养基:

① 燕麦片固体培养基: 燕麦片 60 g 600mL 水煮沸 10min 后过滤,取滤液定容至 1L

② 纤维素酶诱导培养基^[7]: NaNO_3 2 g K_2HPO_4 1 g KCl 0.5 g MgSO_4 0.5 g FeSO_4 0.01 g 羧甲基纤维素钠 10 g 琼脂 15~20 g 水 1 L; pH 自然.

③ 植酸酶诱导培养基^[8]: 植酸钙 1%; 葡萄糖 3%; KCl 0.05%; NH_4NO_3 0.5%; MgSO_4 0.05%; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.003%; pH 5.7.

B: 菌种保存(基础)培养基: PDA 琼脂培养基.

C: 种子液培养基: 燕麦片液体培养基.

D: 固体发酵基础培养基: 菌渣 70%; 麸皮 30%; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 3%; 固水比为 1:0.8 250 mL 三角瓶装干料 30 g

1.2 方法

1.2.1 刚果红染色法^[9]

纤维素诱导培养基培养米曲霉,菌落长成后,往平板中加入适量 1×10^{-3} g/mL 的刚果红溶液,染色 1 h 弃去染液,加 1 mol/L 的 NaCl 溶液,洗涤 2 次,每次 5 min 菌体若能分泌纤维素酶,则在菌落周围出现清晰的透明水解圈.

1.2.2 紫外和微波诱变处理^[10-12]

将出发菌株斜面用无菌生理盐水洗涤制成孢子悬浮液 (10^6 个/mL).在 30W 紫外灯下,距 30 cm,照射 2~16 min 各吸取 0.2 mL 涂布燕麦片培养基,即刻放入 37℃ 培养箱避光培养.并采用格兰仕微波炉(输出功率 800W),微波诱变时采用低火档,计算不同辐照时间的致死率.致死率(%) = (对照菌落数 - 处理菌落数) / 对照菌落数 $\times 100\%$ ^[13].挑取致死率在 85% 左右的平板上的单菌落打孔分别接入纤维素酶诱导培养基和植酸酶诱导培养基,观察透明圈和菌落直径大小,挑取 HC 值 (HC = 透明圈直径 / 菌落圈直径)和菌落较大的菌株进行固体发酵,并测定其植酸酶和纤维素酶酶活.

1.2.3 粗酶液的提取^[11, 14-15]

将其发酵后的固体曲取出,低温烘干后^[16],称取 1.00 g 干曲,加 10 mL pH 5.5 的乙酸缓冲液,冰浴研磨,4 500 r/min 10 min 弃去沉淀,将上清液定容至 50 mL,此为粗酶液.

1.2.4 纤维素酶活力测定方法^[9]

在用 pH 5.5 的乙酸缓冲液适当稀释后的 2 mL 酶液中加入 2 mL CMCA (羧甲基纤维素钠)溶液,于 37℃ 水浴中保温 30 min 再向其中加入 DNS (3,5-二硝基水杨酸) 5 mL,于沸水浴中煮沸 5 min 立即冷却至室温,定容至 25 mL,测其 A_{540} .

1.2.5 植酸酶活力测定方法^[8, 17]

在用 pH 5.5 乙酸缓冲液适当稀释后的 30 μL 酶液中加入 170 μL 的 1 mmol/L 的植酸钠溶液,于 37℃ 水浴中保温 30 min 再向其中加入 30 mL 蒸馏水,2 mL 钼酸铵 - H_2SO_4 溶液,混匀后,逐滴加入 30 μL SnCl_2 溶液,边加边震荡,定容至 50 mL,继续显色 40 min 后测定其 A_{660} .

1.2.6 酶活力定义

在 37℃、pH 值 5.5 的条件下,每分钟从浓度为 4 mg/mL 的羧甲基纤维素钠溶液中降解释放 1 μmol 还原糖(葡萄糖)所需要的酶量为一个纤维素酶活力单位 (U),每分钟从浓度为 0.5 mmol/L 植酸钠溶液中释放 1 μmol 无机磷为一个植酸酶活力单位 (U).

2 结果与分析

2.1 紫外和微波诱变对米曲霉孢子致死率的影响

以米曲霉原始菌株为出发菌株,用UV对单孢子悬浮液进行辐射处理,辐照时间 2 m in 4 m in 6 m in 8 m in 12 m in 14 m in 16 m in 从图 1可知,紫外照射米曲霉 6m in 致死率达 87.8%,从照射 14 m in开始,致死率达 100%,因此取照射 6m in的平板单菌落进行初筛,得到一株植酸酶和纤维素酶产量较高的诱变株 ZQV16 再通过微波辐射单孢子悬浮液,辐照时间 5 s 20 s 30 s 40 s 50 s 60 s 70 s 80 s 从图 1可知,微波照射 ZQV16菌株 60 s时,致死率达 88.37%,以 60 s为微波辐射剂量,进行复筛.

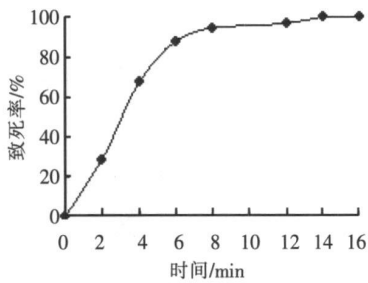


图 1 紫外照射对米曲霉孢子的影响
Fig.1 Effect of UV on spore of *A.oryzae*

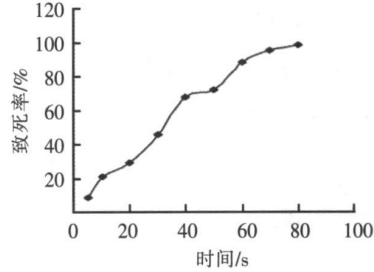


图 2 微波诱变对 ZQV16 菌株孢子的影响
Fig.2 Effect of microwave on spore of ZQV16

2.2 ZQH48突变菌株产酶能力

采用紫外线诱变处理,得到 100 多个突变株,从中挑取具典型特征的菌株菌落再通过微波辐射得到米曲霉突变株 ZQH48 并进行传代活化及酶活测定,选出酶活较高的菌株进行培养,挑取 HC 值和透明圈较大菌落 6 株并测定其酶活力.从图 3可知,出发菌株的植酸酶酶活为 987.85 U /g 纤维素酶酶活 29.82U /g 紫外线处理后, ZQV16菌株的植酸酶酶活为 1 130.53 U /g 纤维素酶酶活 48.23 U /g 微波辐射处理 ZQH48菌株的植酸酶活 1 207.42 U /g 纤维素酶活为 72.15 U /g 图 4 5 为: ZQH48在纤维素酶和植酸酶诱导培养基上透明圈清晰.

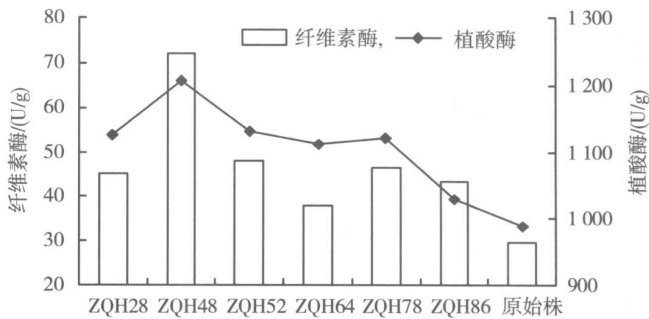


图 3 部分突变株与原始菌株产酶活力的比较
Fig.3 The content of enzyme of mutations and start strain

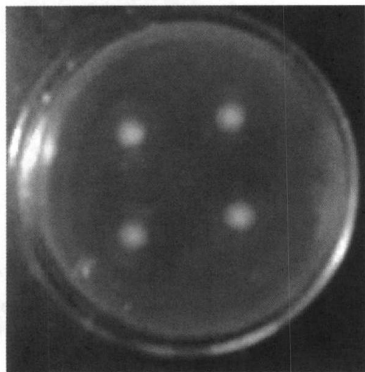


图 4 ZQH48 菌株在纤维素酶诱导培养基透明圈
Fig.4 Transparent ring of strain ZQH48 on induced substrate of CMCase

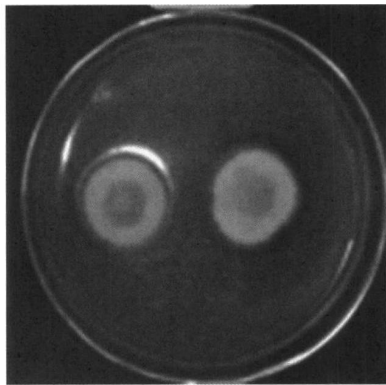


图 5 ZQH48 菌株在植酸酶诱导培养基透明圈
Fig.5 Transparent ring of strain ZQH48 on induced substrate of phytase

2.3 ZQH48突变菌株的遗传稳定性的测定

ZQH48突变菌株传代 15 代后测定纤维素酶和植酸酶的酶活力. 由图 6 可知, ZQH48 突变菌株在传代 15 代过程中纤维素酶和植酸酶的酶活力与诱变后的菌株的酶活力比较, 变化不显著 ($p < 0.05$), 说明 ZQH48 突变菌株遗传性能较稳定.

2.4 不同碳源比例和不同氮源对产纤维素酶和植酸酶酶活的影响

固体发酵培养基的基础成分不变, 改变菌渣和麸皮的比列, 37℃ 培养 70 h, 测定酶活. 从图 7 可知, 纤维素酶酶活在菌渣和麸皮 1:1 比例时最高, 随着麸皮的比列增大, 纤维素酶酶活增高, 分析是麸皮中的淀粉和微量生长因子刺激所致. 而植酸酶酶活在前五组比列中均无显著差异, 表明菌渣和麸皮的比列对植酸酶活性影响不大. 综合考虑在碳源的配比中, 确定以菌渣和麸皮比列为 1:1 时为最佳碳源配比. 适宜的氮源有利于微生物的生长繁殖和酶系的形成, 实验比较了几种常见的成本较低的氮源: 工业蛋白胨、尿素、硝酸钠、氯化铵、硫酸铵. 从图 8 可知, 蛋白胨、氯化铵和硫酸铵相对尿素和硝酸钠对产酶活的影响更大, 其中以氯化铵为氮源时, 纤维素酶和植酸酶活力最高, 分别为 83.61 U/g 和 1432.61 U/g

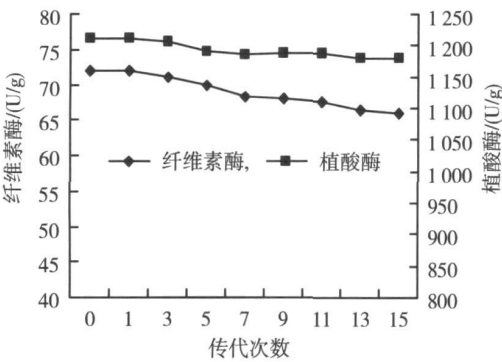


图 6 ZQH48 菌株的遗传稳定性
Fig.6 The heredity stability of ZQH48

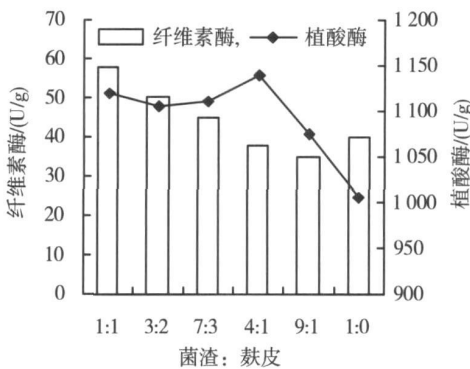


图 7 不同碳源比例对产酶活力的影响
Fig.7 Effect of carbon sources proportion on production of enzyme activity

2.5 温度对产纤维素酶和植酸酶酶活的影响

分别选取 20℃、25℃、28℃、31℃、35℃、37℃、42℃为温度梯度进行培养, 由图 9 可知, 该菌株在 35℃ 培养时两种酶活均最高, 因此选取 35℃ 为最适培养温度. 在此培养温度下纤维素酶和植酸酶活力分别为 108.75 U/g 和 1374.00 U/g

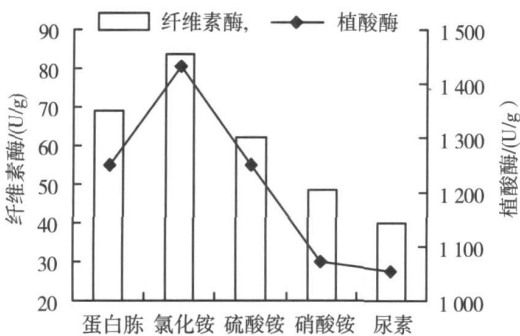


图 8 不同氮源对产酶活力的影响
Fig.8 Effect of nitrogen sources on production of enzyme activity

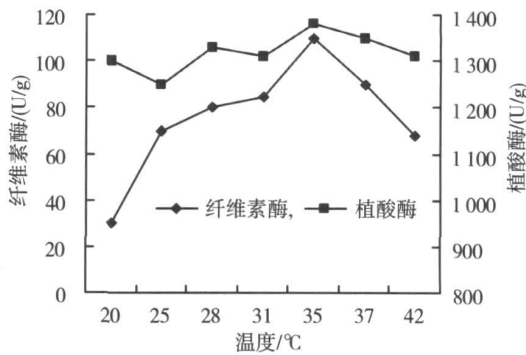


图 9 温度对产酶活的影响
Fig.9 Effect of temperature on production of enzyme activity

2.6 固水比对产纤维素酶和植酸酶酶活的影响

固体培养基中水分含量直接影响通气性及热量, 水分占的比例越高, 培养过程中培养基容易产生高温, 不利于菌丝生长, 在固水比 1:1、1:1.2 和 1:1.4 时, 纤维素酶和植酸酶的酶活均无显著性差异 (图 10), 选择固水比 1:1 时其疏松度较合适, 为最佳培养条件. 纤维素酶和植酸酶活力分别为 101.70 U/g 和 1484.43 U/g

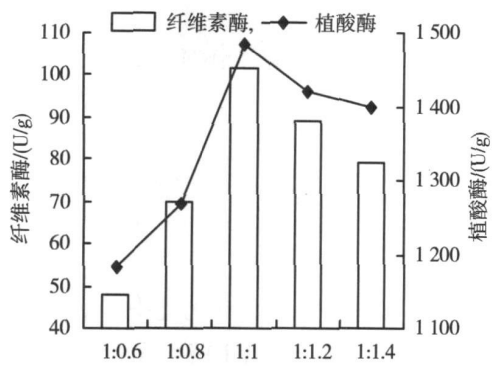


图 10 固水比对酶活的影响

Fig.10 Effect of solid-water ratio on production activity

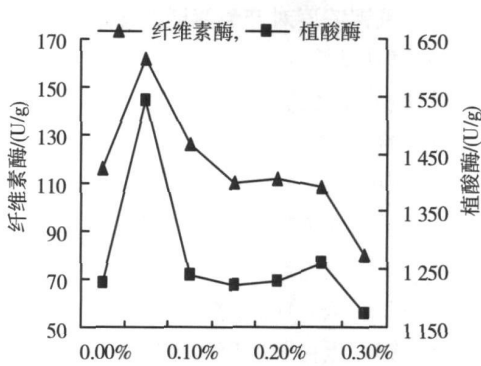


图 11 不同磷酸二氢钾浓度对产酶活的影响

Fig.11 Effect of phosphorus concentration on production of enzyme activity

表 1 正交实验因素水平设置

Table 1 The settings for factors and levels of orthogonal test

水平	因 素				
	硫酸铵 (A)	氯化铵 (B)	蛋白胨 (C)	硫酸镁 (D)	氯化钠 (E)
1	2%	10%	2%	0.01%	0.23%
2	3%	12%	3%	0.03%	0.5%
3	4%	14%	4%	0.05%	0.73%
4	5%	16%	5%	0.07%	1%

表 2 氮源和无机盐正交 L16(4⁵)实验设计方案与实验结果

Table 2 The projects and results of orthogonal test L16(4⁵) of nitrogen sources and inorganic salts

实验号	A	B	C	D	E	实验结果	
						纤维素酶 c/(U/g)	植酸酶 p/(U/g)
1	1	1	1	1	1	52.50	1255.53
2	1	2	2	2	2	57.38	1236.60
3	1	3	3	3	3	53.92	1246.07
4	1	4	4	4	4	40.93	1145.69
5	2	1	2	3	4	50.56	1151.36
6	2	2	1	4	3	56.92	1225.23
7	2	3	4	1	2	61.69	1181.67
8	2	4	3	2	1	41.85	1084.13
9	3	1	3	4	2	60.81	1300.05
10	3	2	4	3	1	52.52	1270.69
11	3	3	1	2	4	55.27	1185.46
12	3	4	2	1	3	25.74	1170.31
13	4	1	4	2	3	42.27	1202.50
14	4	2	3	1	4	58.92	1251.75
15	4	3	2	4	1	47.40	1261.22
16	4	1	1	3	2	40.27	1221.44
Kc1	51.18	51.54	51.24	49.72	48.57		
kc2	52.75	56.43	45.27	49.19	55.04		
kc3	48.59	54.57	53.87	49.32	44.71		
kc4	47.22	37.2	49.35	51.51	51.42		
kp1	1 220.97	1 227.36	1 221.92	1 241.82	1 217.89		
kp2	1 160.6	1 246.07	1 204.87	1 177.17	1 234.94		
kp3	1 231.63	1 218.6	1 220.5	1 222.39	1 211.03		
kp4	1 234.23	1 155.39	1 200.14	1 233.05	1 183.56		
Rc	5.54	19.24	8.6	2.32	10.32		
Rp	73.63	90.67	21.78	55.87	51.38		

注: kc、kp分别为纤维素酶和植酸酶的各水平的实验指标和, Rc、Rp分别为纤维素酶和植酸酶的极差.

2.7 磷酸二氢钾浓度对产酶酶活的影响

固体发酵基础培养基中添加不同浓度的磷酸二氢钾,从图 11 可知:磷酸二氢钾用量为 0.02% 时,纤维素酶和植酸酶酶活最高,分别为 161.55 U/g 和 1 541.13 U/g

2.8 正交试验

通过氮源单因素分析和无机盐单因素分析,选择蛋白胨作为有机氮源,选择氯化铵和硫酸铵作为无机速效氮源,促进菌体前期的生长,选择硫酸镁和氯化钠作为无机盐进行正交实验.以正交设计表 $L_{16}(4^5)$ 进行实验^[18].

对正交实验(表 4)的实验结果进行分析.根据各因素水平间极差大小,氮源和无机盐对纤维素酶活性影响为:氯化铵 > 蛋白胨 > 硫酸铵 > 氯化钠 > 硫酸镁,对植酸酶活性影响为:氯化铵 > 硫酸铵 > 硫酸镁 > 氯化钠 > 蛋白胨.

实验的最佳组合为纤维素酶 A2B2C3D4E2 即硫酸铵 3%,氯化铵 12%,蛋白胨 4%,硫酸镁 0.07%,氯化钠 0.5%;植酸酶 A4B2C1D1E2 即硫酸铵 3%,氯化铵 12%,蛋白胨 2%,硫酸镁 0.01%,氯化钠 0.5%.综合考虑,总氮含量和无机盐的最佳配比选择为:氯化钠 0.5%、硫酸镁 0.07%、蛋白胨 2%,硫酸铵 3%,氯化铵 12%.固定氯化铵作无机氮源,硫酸铵和蛋白胨做氮源实验,结果无显著差异,因此选择氯化铵作无机氮源,蛋白胨做有机氮源进行后续实验.

综合以上,优化的米曲霉突变株 ZQH48 固体发酵产纤维素酶和植酸酶的条件为:菌渣:麸皮 = 1:1,氯化铵:蛋白胨 = 6:1,氯化铵占固体培养基总量的 12%,蛋白胨占固体培养基总量的 2%,硫酸镁 0.07%,氯化钠 0.5%,磷酸二氢钾 0.02%,固水比为 1:1,35℃ 培养 60 h

3 讨论

王金华等^[19]利用紫外线对米曲霉原生质体进行诱变,从中获得的高产纤维素酶的突变株,产纤维素酶酶活达 1 996 $\mu\text{g}/(\text{g} \cdot \text{min})$ [即 11.09 $\mu\text{mol}/(\text{g} \cdot \text{min})$ 即 11.09 U/g];屈二军等利用紫外诱变,筛选出高产纤维素酶的米曲霉菌株 MN1,产纤维素酶活为 1.559 U/mL^[12];李秀婷等对米曲霉沪酿 3.042 进行了固态发酵,在最适条件下,其产纤维素酶酶活为 367 U/g^[15].杨平等通过微板培养法对植酸酶产生菌菌种进行筛选,选育出植酸酶酶活达 297 $\mu\text{mol}/(\text{g} \cdot \text{min})$ (即 297 U/g) 的菌株^[20];石星明等通过对黑曲霉菌株的筛选和固体发酵产植酸酶酶活力的研究,获得高产植酸酶的突变株,其酶活力为 2 050 $\mu\text{g}/(\text{g} \cdot \text{min})$ [66.13 $\mu\text{mol}/(\text{g} \cdot \text{min})$ 即 66.13 U/g]^[21].

本实验通过紫外诱变获得的米曲霉突变株 ZQH48 对其固体培养条件进行优化后,固体发酵转化物纤维素酶活性为 161.55 U/g 较原始菌株 29.82 U/g 提高了 5.42 倍;固体发酵转化物植酸酶酶活为 1541.13 U/g 较原始菌株 987.85 U/g 提高了 1.56 倍.与文献报道比较,为王金华等^[19]测定的诱变菌株纤维素酶活的 14.57 倍,为杨平等^[20]所测菌株植酸酶酶活的 5.19 倍,为屈二军等^[12]所测纤维素酶活的 103.62 倍,不及李秀婷等^[15]所测纤维素酶酶活,为其酶活量的 44.02%.可能由于不同文献报道所选用的发酵菌种、培养条件、测定方法及单位等不同,导致酶活结果的差别,具体原因需要进一步研究.

[参考文献]

- [1] 刁一民,张雄伟,熊亚,等.微生物纤维素酶在饲料工业中的生产现状及应用[J].青海草业,2006,15(3):15-20
- [2] 邱立友,顾溯海,崔继科,等.黑曲霉纤维素酶高产固态培养基的快速优选研究[J].生物数学学报,1999,14(3):365-370
- [3] 马玺,单安山.植酸酶研究进展及其在饲料工业中的应用[J].粮食与饲料工业,2001,4:27-30
- [4] 王康宁,方热军.植物性饲料中植酸磷和植酸酶的研究进展[J].中国饲料,2002,20:4-6
- [5] 许晖,曹珂课,王娣,等.微生物植酸酶的研究进展[J].农产品加工·学刊,2008,9:17-21
- [6] 宋金昌,范莉.利用微生物提高秸秆粗蛋白粗蛋白质的试验[J].动物科学与动物医学,2002,19(1):46-49
- [7] 傅力,丁友昉,张箴.纤维素酶测定方法的研究[J].新疆农业大学学报,2000,23(2):45-48
- [8] 杨平平,王燕,史宝军,等.植酸酶酶活测定方法的研究[J].饲料工业,2003,24(8):34-36
- [9] 王淑军,扬从发,陈静.用于降解秸秆的纤维素酶产生菌的筛选研究[J].粮食与饲料工业,2001,12:21-23

- [10] 郭继平,马莺. 紫外诱变选育米曲霉高产蛋白酶菌株 [J]. 微生物学通报, 2007, 34(2): 246-250
- [11] 兰时乐,李立恒,王晶,等. 微波诱变结合化学诱变选育 纤维素酶高产菌的研究 [J]. 微生物学杂志, 2007, 27(1): 22-25
- [12] 屈二军,王晓涛,李文建,等. 一株高产纤维素酶的米曲霉菌种的选育 [J]. 中国酿造, 2008, 14: 47-49.
- [13] 沈萍,范秀容. 微生物实验 [M]. 北京: 高等教育出版社, 2000: 124-127
- [14] 陆文清,李德发,武玉波. 液态发酵饲用酶制剂的研究与生产 [J]. 饲料研究, 2000, 11: 1-4
- [15] 李秀婷,赵进,鲁绯,等. 米曲霉固态发酵产酶条件及酶活力研究 [J]. 中国酿造, 2009, 2: 26-28
- [16] 兰时乐,李立恒,王晶,等. 微波诱变结合化学诱变选育 纤维素酶高产菌的研究 [J]. 微生物学杂志, 2007, 27(1): 22-25
- [17] 周建琴. 植酸酶产生菌的选育及产酶条件的初步研究 [J]. 广州食品工业科技, 2004, 20(4): 41-42
- [18] 李春喜,姜丽娜,邵云. 生物统计学 [M]. 北京: 科学出版社, 2005: 334
- [19] 王金华,李睿,邱雁临. 原生质体诱变提高米曲霉产纤维素酶活力的研究 [J]. 湖北农业科学, 2006(2): 123-125
- [20] 杨平平,许正宏,王艳,等. 植酸酶菌种筛选方法的研究 [J]. 工业微生物, 2004, 34(3): 12-15
- [21] 石星明,倪宏波,王冰,等. 产植酸酶的黑曲霉菌株的筛选与诱变 [J]. 黑龙江八一农垦大学学报, 2004, 16(3): 69-73

[责任编辑: 孙德泉]

(上接第 77页)

- [12] Allan J R, Orosz A, Badhan A, et al The development of birdstrike risk assessment procedures, their use on airports and the potential benefits to the aviation industry [C]. International Bird Strike Committee Warsaw: IBSC26/WP - OS7, 2003
- [13] 赵凯,陈建琴,张晨岭,等. 奔牛机场植被现状调查及鸟类适宜指数评估 [J]. 南京师大学报: 自然科学版, 2009, 32(4): 83-88
- [14] 李晓娟,周材权,胡锦鑫,等. 南充高坪机场土壤及草丛动物群落特征和鸟类的关系 [J]. 生态学报, 2009, 29(2): 706-713
- [15] 赵云龙,唐思贤,王群,等. 上海虹桥机场土壤及草丛动物群落特征和鸟类关系研究 [J]. 生态学报, 2004, 24(6): 1219-1224
- [16] Mecislovas Zalakevicius Global climate change, bird migration and bird strike problems[C]. International Bird Strike Committee Amsterdam: IBSC25/WP-RS10, 2000
- [17] 朱世杰,常弘. 广东佛山机场鸟类群落生态及鸟撞预防的研究 [J]. 应用与环境生物学报, 2005, 11(5): 180-183
- [18] 张志强,杨道德,胡毛旺,等. 长沙黄花国际机场鸟类群落物种多样性分析 [J]. 动物学杂志, 2007, 42(1): 112-120
- [19] 吴少斌,吴法清,刘家武,等. 湖北老河口机场鸟类区系的初步研究 [J]. 华中师范大学学报: 自然科学版, 2004, 38(3): 362-366
- [20] 闫啸,付令. 空管中的鸟击防治系统策略分析 [J]. 中国科技成果, 2006(21): 44-45
- [21] Sutherland W J 生态学调查方法手册 [M]. 北京: 科学技术文献出版社, 1997
- [22] 郑作新. 中国鸟类种与亚种分类名录大全 [M]. 北京: 科学出版社, 1994
- [23] 郑作新. 中国鸟类系统检索 [M]. 3版. 北京: 科学出版社, 2002
- [24] MacKinnon J, Phillipps K, He F Q. A Field Guide to the Birds of China[M]. Changsha Hunan Education Press, 2000
- [25] 孙儒泳. 动物生态学原理 [M]. 3版. 北京: 北京师范大学出版社, 2001

[责任编辑: 顾晓天]