

生活垃圾填埋操作方式对覆土中 I 型甲烷氧化菌的影响研究

余婷, 何晶晶*, 吕凡, 邵立明

(同济大学环境科学与工程学院污染控制与资源化研究国家重点实验室, 长江水环境教育部重点实验室, 上海 200092)

摘要: 填埋场覆土中的甲烷氧化菌可削弱填埋场的温室气体释放, 其中 I 型甲烷氧化菌对环境条件的改变反应灵敏. 实验采用 16S rDNA 特异性聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR) 结合变性梯度凝胶电泳 (denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE) 基因指纹技术研究不同填埋操作方式, 包括高密度聚乙烯膜 (high-density polyethylene liner, HDPE) 隔离、渗滤液亚表面灌溉和植被种植, 对城市生活垃圾填埋场表层覆土中 I 型甲烷氧化菌的群落结构和多样性的影响. 16S rDNA 序列的系统发育分析结果表明, 供试土壤中的 I 型甲烷氧化菌均属于甲基杆菌属 (*Methylobacter*). 从香农-威纳多样性指数 (Shannon-Wiener diversity index) 和主成分分析的结果可以归纳得到: 渗滤液亚表面灌溉和植被种植比 HDPE 膜隔离对表层覆土中 I 型甲烷氧化菌群落结构的影响更大, 它们会降低 I 型甲烷氧化菌的多样性, 并且推测渗滤液亚表面灌溉会抑制 *Methylobacter* 的生长. 无 HDPE 膜隔离的土壤中, 即有填埋气体侵入的土壤中, 随填埋气体作用于土壤时间的延长, I 型甲烷氧化菌的群落结构会发生变化; 覆土时间分别为 3 周、1.5 a 和 5 a 的土壤中, I 型甲烷氧化菌的香农-威纳多样性指数在覆土 1.5 a 时达到最大值.

关键词: 城市生活垃圾填埋场覆土; I 型甲烷氧化菌; 16S rDNA; 变性梯度凝胶电泳; 系统发育分析

中图分类号: X705 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2008)10-2987-06

Effect of Operational Modes on Community Structure of Type I Methanotroph in the Cover Soil of Municipal Solid Waste Landfill

YU Ting, HE Pin-jing, LÜ Fan, SHAO Li-ming

(Key Laboratory of Yangtze River Water Environment, Ministry of Education, State Key Laboratory of Pollution Control and Resource Reuse, College of Environmental Science and Engineering, Tongji University, Shanghai 200092, China)

Abstract: Type I methanotroph is crucial for methane oxidization and it responses fast to the changes in environment. In this study, 16S rDNA-based denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) gene fingerprint technology was applied to investigate the effect of operational modes, i. e. high-density polyethylene liner (HDPE) isolation or subsurface irrigation of landfill leachate and vegetation, on community structure and diversity of type I methanotroph in soils covering municipal solid waste landfill. 16S rDNA based phylogenetic analysis reveals type I methanotroph in all tested soils belongs to *Methylobacter*. According to Shannon-Wiener diversity index and principal component analysis, landfill leachate subsurface irrigation and vegetation have more impact on type I methanotroph community structure and diversity than HDPE liner isolation does, and they reduce type I methanotroph diversity. Leachate irrigation is supposed to inhibit the growth of *Methylobacter* population. Community structure of type I methanotroph in landfill cover soil isolated by HDPE, i. e. invaded by landfill gas, shifts during long term gas interference. When cover age is 1.5 years old, Shannon-Wiener diversity index of type I methanotroph reaches its maximum.

Key words: landfill cover soil; type I methanotroph; 16S rDNA; denaturing gradient gel electrophoresis; phylogenetic analysis

甲烷 (CH_4) 是一种重要的温室气体, 其增温效能是 CO_2 的 21 倍; CH_4 对全球温室效应的综合贡献率可达 22%, 仅次于 CO_2 ^[1]. 据估算, 每年生活垃圾填埋场释放的甲烷为 36 ~ 73 Tg, 是全球甲烷总释放量的 6% ~ 12%^[2]. 而与此同时, 填埋场覆土中含有大量的甲烷氧化菌, 它们具有很强的甲烷氧化能力^[3,4]. 据 Reeburgh 等^[5] 估算, 每年垃圾填埋场的 CH_4 产生量为 62 Tg, 其中有 22 Tg CH_4 可被甲烷氧化菌氧化^[5].

甲烷氧化菌利用甲烷作为唯一的碳源和能源. 根据碳代谢途径以及细胞膜结构的差异, 甲烷氧化

菌可分为 I 型和 II 型^[6,7]. I 型属于变形菌纲 (Proteobacteria) γ 亚纲中的甲基球菌科 (Methylococcaceae), 它包括甲基单胞菌属 (*Methylomonas*), 甲基杆菌属 (*Methylobacter*), 甲基微菌属 (*Methyломicrobiu*), 甲基八叠球菌属 (*Methylosarcina*), 甲基球形菌属 (*Methylosphaera*), 甲

收稿日期: 2007-10-10; 修订日期: 2007-11-05

基金项目: 国家自然科学基金重点项目 (50538080); 国家高新技术研究发展计划 (863) 项目 (2003AA644020); 国家科技支撑计划项目 (2006BAC06B05)

作者简介: 余婷 (1983 ~), 女, 硕士研究生, 主要研究方向为环境微生物分子生物学, E-mail: yttracy1983@yahoo.com.cn

* 通讯联系人, E-mail: solidwaste@mail.tongji.edu.cn

基 球 菌 属 (*Methylococcus*), 甲 基 暖 菌 属 (*Methylocaldum*) 和 甲 基 热 菌 属 (*Methylothermus*)^[7,8]. II 型属于变形菌纲(Proteobacteria)α 亚纲中的甲基孢囊菌科(*Methylocystaceae*), 它包括甲基弯曲菌属(*Methylosinus*), 甲基孢囊菌属(*Methylocystis*), 甲基帽菌属(*Methylocapsa*) 和 甲 基 细 胞 菌 属 (*Methylocella*)^[9]. 高氧低 CH₄ 的环境有利于 I 型生长, 而低氧高 CH₄ 的环境更适合 II 型生长^[10,11]. Henckel 等^[11]研究通入不同比例的 CH₄/O₂ 混合气体的水稻土中甲烷氧化菌的活性和群落结构, 发现 I 型比 II 型的生长速度快, 并且对环境改变的反应更灵敏. 因此, 研究填埋操作方式对甲烷氧化菌群落结构的影响时, 可选择 I 型甲烷氧化菌作为研究对象.

本研究采用 16S rDNA 特异性聚合酶链式反应(*polymerase chain reaction*, PCR) 结合变性梯度凝胶电泳(*denaturing gradient gel electrophoresis*, DGGE) 基因指纹技术, 分析不同填埋操作方式, 包括高密度聚乙烯膜(*high-density polyethylene liner*, HDPE) 隔离、渗滤液亚表面灌溉和植被种植, 对填埋场表层覆土中 I 型

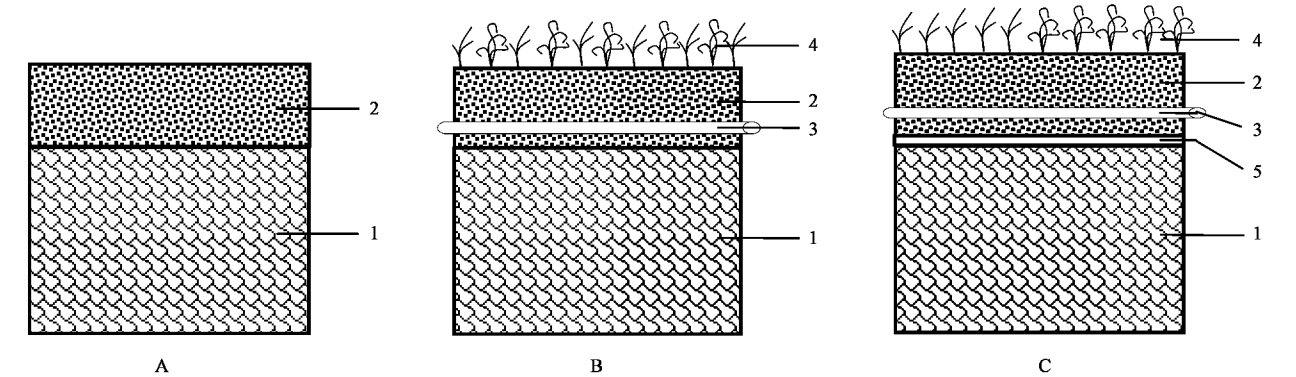
甲烷氧化菌的群落结构和多样性的影响, 以期为填埋场甲烷气体释放的控制提供微生物学依据.

1 材料与方法

1.1 样品采集与理化性质测定

1.1.1 样品采集

土壤样品取自杭州某城市生活垃圾填埋场表层覆土. 采样点如图 1 所示, 点 A 处覆土直接置于填埋垃圾之上, 垃圾所产生的填埋气体可以直接侵入覆土, 该处土壤无渗滤液亚表面灌溉和植被种植; 点 B 处覆土也直接置于填埋垃圾之上, 填埋气体也可以直接侵入, 但该处实施了渗滤液亚表面灌溉和植被种植; 点 C 处覆土与填埋垃圾间被 HDPE 膜(*high-density polyethylene liner*) 隔开, 覆土没有填埋气体侵入, 但是有渗滤液亚表面灌溉和植被种植. 样品 A1、A2、A3 采集于点 A, 覆土时间分别为 3 周、1.5 a 和 5 a; 样品 B1、B2、B3 采集于点 B, 覆土时间均为 1 a; 样品 C1、C2 采集于点 C, 覆土时间均为 1 a. 每个样品采集 3 个平行样, 采样深度为 0~10 cm.



1. 城市生活垃圾; 2. 覆土; 3. 渗滤液亚表面灌溉管; 4. 植被; 5. 高密度聚乙烯膜(HDPE)

图 1 采样点的结构示意

Fig.1 Structure model of sampling sites

1.1.2 样品理化性质测定

测定土壤样品的含水率、pH、氨氮、总氮、土壤有机物和土壤质地, 其中含水率、pH、氨氮的测定方法参见文献[12]; 总氮、土壤有机物和土壤质地的测定方法参见文献[13].

1.2 分子生物学分析

1.2.1 DNA 提取

样品基因组 DNA 的提取参见文献[14]中的方法(略作修改). 称取 0.5 g 样品与 600 μL 提取缓冲液混合, 加入等质量的玻璃珠, 混匀后加入 60 μL SDS, 65℃ 水浴 1 h, 收集上清液; 用 200 μL 提取缓冲

液再次提取沉淀中的 DNA; 收集 2 次上清液, 用聚乙二醇沉淀粗提 DNA; 采用苯酚-氯仿-异戊醇(25:24:1)和氯仿/异戊醇(24:1)纯化粗提 DNA, 最后将纯化、风干的 DNA 样品溶于 50 μL TE.

1.2.2 PCR 扩增

以所提样品基因组 DNA 为模板, 选用 Meth1R 和 533f 引物对(上海生工生物工程技术有限公司合成)扩增 I 型甲烷氧化菌^[15]. 为了使后续 DGGE 能更好地分离扩增产物, 上游引物 Meth1R 的 5'端加有 GC 夹^[16]. PCR 反应体系为: 引物 Meth1R-GC 和 533f 分别为 25 μmol·L⁻¹, 200 μmol·L⁻¹ dNTP, 5 μL 10 ×

PCR buffer, 3 mmol·L⁻¹ MgCl₂, 4 U *Taq* 酶(购自上海申能博彩生物科技有限公司), 5 μL DNA 模板, 加超纯水至 50 μL. PCR 反应程序为: 94℃ 5 min; 35 个循环 94℃ 45 s, 55℃ 30 s, 72℃ 1 min; 72℃ 5 min. 扩增产物用 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳检测.

1.2.3 变性梯度凝胶电泳(DGGE)

采用 Dcode™ 全能型基因突变检测系统(Bio-Rad, USA)进行变性梯度凝胶电泳. 变性梯度为 40% ~ 60% [6% 丙烯酰胺(37.5:1)], PCR 产物在 100 V, 60℃ 下, 电泳 16 h, 电泳缓冲液为 1 × TAE. 电泳结束后, 凝胶用溴化乙锭染色 20 min, 将染色后的凝胶用去离子水清洗, 置于紫外灯下, 用 SmartView 成像系统(FR-980 生物电泳图像分析系统, 上海复日科技有限公司)成像.

1.2.4 割胶和测序

对 DGGE 凝胶上的条带进行割胶, 割下的条带用 1 mL 去离子水清洗, 然后置于 200 μL 去离子水中, 30℃ 水浴 1 h, 取 5 μL 样品作为 PCR 模板, PCR 扩增步骤同上. 割胶的 PCR 产物与土壤样品的 PCR 产物一同再次进行 DGGE, 条件同 1.4 节. 对 2 种 PCR 产物在 DGGE 凝胶上迁移位置相同的条带再次割胶. 割胶后的条带在测序之前进行最后一次 PCR 扩增, 此次扩增中上游引物不带 GC 夹. 采用 ABI LR-377 DNA 测序仪(Applied Biosystem, USA)测序.

1.2.5 系统发育分析

测出的序列与 GenBank 中的序列比对. 使用 Mega 3.0 软件中的邻接法(Neighbor-Joining)对测出序列和从 GenBank 中比对所得的序列构建系统发育

树. 对所构建的树进行自展检验($n = 1\,000$), 自展值标于树的结点处, 以百分数表示, < 50% 的自展值不显示.

1.2.6 DGGE 图谱分析和数据处理

DGGE 图谱分析采用 Quantity One 4.5.2 图像分析软件(Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). 香农-威纳多样性指数(Shannon-Wiener diversity index, H')可用于评估样品中 I 型甲烷氧化菌的多样性, 其计算公式为:

$$H' = - \sum (n_i/N) \lg(n_i/N)$$

式中, n_i 是条带光密度曲线上的峰高, N 是样品中所有条带峰高之和.

主成分分析(principal component analysis, PCA)可获得样品间 I 型甲烷氧化菌群落结构差异的信息. 将 Quantity One 4.5.2 软件计算出的条带光密度及位置作为分析参数, 采用 Statistica 7.0.61(StatSoft, Inc., OK, USA)软件进行 PCA 分析.

2 结果与分析

2.1 供试土壤理化性质

供试土壤物理和化学性质见表 1. 仅有填埋气体侵入的土壤偏中性, pH 均值范围为 5.8 ~ 7.0; 有渗滤液灌溉和植被种植的土壤偏弱酸性, pH 均值范围为 5.0 ~ 6.6. 土壤总氮含量的均值为 0.02% ~ 0.05%. B2 样品中氨氮的含量最高(均值为 171.2 μg·g⁻¹), 其次为 B3(均值为 123.7 μg·g⁻¹), A2 样品中氨氮含量最低(均值为 58.7 μg·g⁻¹).

表 1 供试土壤的物理化学性质($n = 3$)
Table 1 Physical and chemical characteristics of tested soils

土样	采样点填埋操作方式			覆土时间 /a	含水率 /%	pH	TN /%	NH ₄ ⁺ -N /μg·g ⁻¹	有机物 /%	土壤 质地
	HDPE 膜隔离	渗滤液亚 表面灌溉	植被 种植							
A1	无	无	无	0.06	9.4 ± 2.7	5.8 ± 1.3	0.02 ± 0.01	77.8 ± 18.3	0.5 ± 0.1	面沙土
A2	无	无	无	1.5	18.1 ± 3.4	7.3 ± 0.2	0.05 ± 0.03	58.7 ± 55.8	1.1 ± 0.9	细沙土
A3	无	无	无	5	14.8 ± 1.1	7.0 ± 0.6	0.04 ± 0.00	105.2 ± 12.2	1.2 ± 0.7	细沙土
B1	无	有	有	1	13.6 ± 1.5	5.2 ± 0.5	0.02 ± 0.01	88.6 ± 18.8	0.3 ± 0.3	粉壤土
B2	无	有	有	1	15.2 ± 0.9	5.5 ± 0.4	0.02 ± 0.01	171.2 ± 71.3	0.4 ± 0.1	粉壤土
B3	无	有	有	1	14.4 ± 1.5	6.6 ± 0.04	0.04 ± 0.00	123.7 ± 92.5	0.7 ± 0.1	粗沙土
C1	有	有	有	1	17.0 ± 1.9	5.4 ± 1.1	0.04 ± 0.01	82.6 ± 29.8	0.8 ± 0.1	粉壤土
C2	有	有	有	1	16.9 ± 0.2	5.0 ± 0.2	0.05 ± 0.01	64.0 ± 20.6	1.4 ± 0.2	粉壤土

2.2 I 型甲烷氧化菌的群落结构

Meth1R 和 533f 引物对扩增的产物经变性梯度凝胶电泳后所得 DGGE 图谱如图 2 所示. 其中条带

经测序后发现, 一些条带数目较少的样品, 如 A1、B3、C1、C2, 扩增出了非甲烷氧化菌序列. 这说明当样品中 I 型甲烷氧化菌含量较少时, Meth1R 和 533f

引物对会产生非特异性扩增.

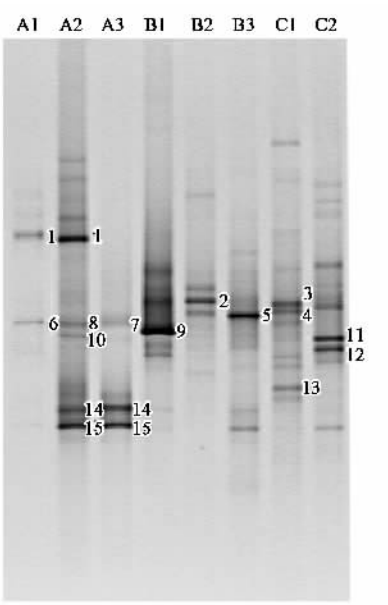


图 2 填埋场覆土 I 型甲烷氧化菌 16S rDNA-DGGE 图谱
Fig.2 16S rDNA-DGGE profile of type I methanotroph in tested soils

本实验中测出序列对应 DGGE 图谱中的条带亮度和位置见图 3.其中“×”代表非甲烷氧化菌条带,其它为 I 型甲烷氧化菌条带.从中可以看出,A2 具有的 I 型甲烷氧化菌条带数目最多,其次为 A3,而在 B3 和 C2 中没有检测出 I 型甲烷氧化菌.采样点 A、B 和 C 样品之间不存在共有条带.Band 1 只在覆土时间为 3 周和 1.5 a 的采样点 A 样品中出现,在覆土时间为 1.5 a 的 A2 中条带最亮,而覆土 5 a 的 A3 中该条带消失.Band 14 和 Band 15 出现于覆土时间为 1.5 a 的 A2 中,并且在覆土时间为 5 a 的 A3 中仍维持较强的亮度.

2.3 I 型甲烷氧化菌多样性

样品中 I 型甲烷氧化菌的香农-威纳多样性指数(Shannon-Wiener diversity index, H')见图 4.对于多样性指数 H' ,当样品间菌种数目一定时,菌种个体数量越多, H' 值越大;当样品间菌种个体分布均匀时,菌种数量越多, H' 值越大.

对于仅有填埋气体侵入的土壤,A2 的多样性指数最大,为 2.1;A3 的值仅次于 A2,为 1.4;A1 的多样性指数为 0.在有填埋气体侵入、渗滤液表面灌溉和植被种植的土壤中,虽然 B1、B2 中发现了 I 型甲烷氧化菌,但菌种单一,因此它们的多样性指数和 B3 一样都为 0.无填埋气体侵入、有渗滤液表面灌溉和植被种植的土壤中,C1 的多样性指数为 1.0,C2 的多样性指数为 0.

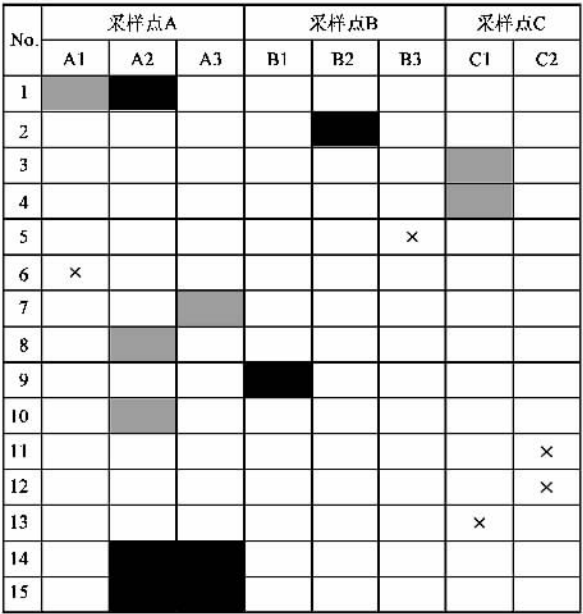


图 3 DGGE 条带分布表
Fig.3 DGGE banding distribution

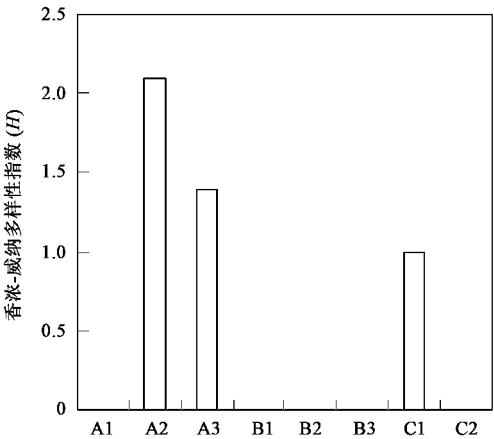


图 4 供试土壤 I 型甲烷氧化菌香农-威纳多样性指数(H')
Fig.4 Shannon-Weaver diversity index of type I methanotroph in tested soils

2.4 主成分分析

主成分分析结果可以反映样品间 I 型甲烷氧化菌的群落结构差异.如图 5,样品点之间的距离越大,表明样品间 I 型甲烷氧化菌的群落结构差异越大.

在仅有填埋气体侵入的土壤中,不同覆土时间的样品点在图中呈发散分布,并且覆土时间仅 3 周的 A1 样品点与有填埋气体侵入和植被种植的样品点之间的距离很近;在有渗滤液灌溉和植被种植的土壤中,无论是否有填埋气体侵入,样品点呈聚集状

态.由此可见,在仅有填埋气体侵入的土壤中, I 型甲烷氧化菌的群落结构会随覆土时间的延长而发生变化;渗滤液亚表面灌溉和植被种植,比填埋气体对土壤中 I 型甲烷氧化菌的群落结构影响更大.结合样品中 I 型甲烷氧化菌多样性结果进行分析可以得出:对于只有填埋气体侵入的表层覆土,随填埋气体作用时间的延长, I 型甲烷氧化菌的多样性呈现先增加后减少的趋势;渗滤液亚表面灌溉和植被种植共同作用于表层土壤的结果,是表层土壤中 I 型甲烷氧化菌多样性减少.

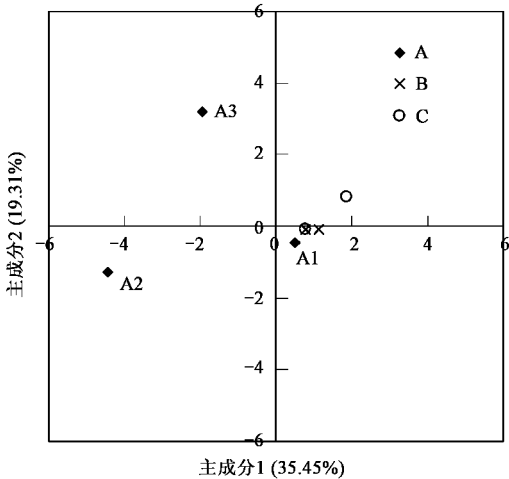


图 5 DGGE 图谱信息主成分分析

Fig.5 Principal component analysis of DGGE profile

2.5 系统发育分析

I 型甲烷氧化菌 16S rDNA 序列的系统发育分析表明(见图 6):除了非特异扩增出的 *Pseudomonas* 菌和 *Alteromonas* 菌外,所发现的其它菌都属于 I 型甲烷氧化菌中的 *Methylobacter*. Band 1 序列与 *Methylobacter* sp. LW1 序列同源性可达 99%; Band 9 序列与 Rahalkar 在海底沉积物中发现的 uncultured I 型甲烷氧化菌菌株(EF101324, GenBank)序列的同源性为 98%^[17]; Band 2 序列与从 Washington Lake 沉积物中得到的 *Methylosarcina lacus* 序列的同源性为 97%^[18].

3 讨论

在有填埋气体侵入、植被种植和渗滤液亚表面灌溉的表层土壤中, *Methylobacter* 多样性不如仅有填埋气体侵入的表层土壤中 *Methylobacter* 的多样性丰富.但是 Bodeliera 等^[19]发现,根际土壤中 I 型甲烷氧化菌以 *Methylobacter* 为主,而 Pavese 等^[20]指出通入填埋气体的表层根际土壤最适宜 I 型甲烷氧化菌

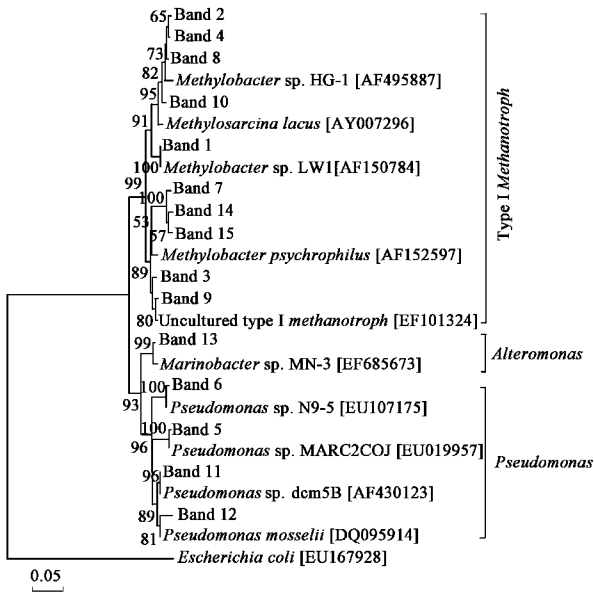


图 6 I 型甲烷氧化菌 16S rDNA 基因片段的系统发育树

Fig.6 Phylogenetic tree of type I methanotroph based on 16S r DNA gene fragment

中 *Methylobacter* 生长.由此推测,是渗滤液亚表面灌溉而非植被种植导致了表层土壤中 *Methylobacter* 多样性的降低.这可能是由于渗滤液中的氨氮浓度过高抑制了表层土壤中 *Methylobacter* 的生长. Bédard 等^[21]曾指出,氨氮会抑制甲烷氧化菌的甲烷单加氧酶活性. Adamsen 等^[22]研究发现,向亚北极区森林土壤中添加 $1\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ 氨氮就会产生强烈的甲烷氧化抑制效果.

Methylobacter 多样性在只有填埋气体侵入的表层土壤中最丰富,但它会随填埋气体作用于土壤时间的延长而发生改变,这可能与填埋垃圾的甲烷产量有关.在垃圾填埋初期,填埋层还未进入产甲烷阶段,填埋垃圾的甲烷产量较低,因此这时 I 型甲烷氧化菌的多样性不丰富;当垃圾填埋龄为 1.5 ~ 2 a 时,填埋垃圾进入产甲烷高峰期,甲烷气体充足, I 型甲烷氧化菌快速增长达到繁盛;随着垃圾填埋龄继续地增加,用于产甲烷的底物逐渐消耗殆尽,甲烷产量不足, I 型甲烷氧化菌开始衰减.

4 结论

(1)本研究在城市生活垃圾填埋场表层覆土中所发现的 I 型甲烷氧化菌均属于 *Methylobacter*.

(2)渗滤液亚表面灌溉和植被种植比填埋气体侵入对表层覆土中 I 型甲烷氧化菌的群落结构影响更大,它们会降低 *Methylobacter* 的多样性,且推测渗滤液亚表面灌溉会抑制表层覆土中 *Methylobacter* 的

生长.

(3) 仅有填埋气体侵入的表层土壤中 *Methylobacter* 多样性最丰富,但它会随填埋气体作用于土壤时间的延长而发生改变.

参考文献:

- [1] de Visscher A, van Cleemput O. Simulation model for gas diffusion and methane oxidation in landfill cover soils[J]. Waste Management, 2003, **23**(7):581-591.
- [2] Stralis-Pavese N, Sessitsch A, Weilharter A, *et al.* Optimization of diagnostic microarray for application in analysing landfill methanotroph communities under different plant covers [J]. Environmental Microbiology, 2004, **6**(4):347-363.
- [3] Whalen S C, Reebergh W S, Sandbeck K A. Rapid methane oxidation in a landfill cover soil [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1990, **56**(11):3405-3411.
- [4] Jones H A, Nedwell D B. Methane emission and methane oxidation in land-fill cover soil [J]. FEMS Microbiology Ecology, 1993, **102**(3-4):185-195.
- [5] Reebergh W S. 'Soft spots' in the global methane budget [M]. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1996.
- [6] Hanson R S, Hanson T E. Methanotrophic bacteria [J]. Microbiology Reviews, 1996, **60**(2):439-471.
- [7] Wise M G, Mearthur J V, Shinkets L J. *Methylosarcina fibrata* gen. nov., sp. nov. & *Methylosarcina quisquiliarum* sp. nov., novel type 1 methanotrophs [J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2001, **51**: 611-621.
- [8] Bodrossy L, Holmes A J, Kovacs K L, *et al.* Analysis of 16S rDNA and methane monooxygenase gene sequences reveals a novel group of thermotolerant and thermophilic methanotrophs, *Methylocaldum* gen. nov. [J]. Archives of Microbiology 1997, **168**(6):493-503.
- [9] Bowman J P. The *Prokaryotes* [M]. New York: Springer Verlag, 1999.
- [10] Amaral J A, Knowles R. Growth of methanotrophs in methane and oxygen counter gradients [J]. FEMS Microbiology Letters 1995, **126**(3):215-220.
- [11] Henckel T, Roslev P, Conrad R. Effects of O₂ and CH₄ on presence and activity of the indigenous methanotrophic community in rice field soil [J]. Environmental Microbiology, 2000, **2**(6):666-679.
- [12] Clesced L S, Greenberg A E, Eaton A D. Standard methods for the examination of water and wastewater [M]. New York: American Water Works Association, 1998.
- [13] Lu R K. Methods for soil agrochemistry analysis [M]. Beijing: China Agricultural Science and Technology Press, 2000.
- [14] Ye N F, Li F, Shao L-M, *et al.* Bacterial community dynamics and product distribution during pH-adjusted fermentation of vegetable wastes [J]. Journal of Applied Microbiology, 2007, **103**(4):1055-1065.
- [15] Bodelier P L E, Meima-Franke M, Zwart G, *et al.* New DGGE strategies for the analyses of methanotrophic microbial communities using different combinations of existing 16S rRNA-based primers [J]. FEMS Microbiology Ecology, 2005, **62**(2):163-174.
- [16] Muyzer G, De Waal E C, Uitterlinden A G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1993, **59**(3):659-700.
- [17] Rahalkar M, Schink B. Comparison of aerobic methanotrophic community in littoral and profundal sediments of Lake Constance by a molecular approach [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2007, **73**(13):4389-4394.
- [18] Auman A J, Stolyar S, Costello A M, *et al.* Molecular characterization of methanotrophic isolates from freshwater lake sediment [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2000, **66**(12):5259-5266.
- [19] Bodelier P L E, Peter R, Thilo H, *et al.* Stimulation by ammonium-based fertilizers of methane oxidation in soil around rice roots [J]. Nature, 2000, **403**(6768):421-424.
- [20] Stralis-Pavese N, Bodrossy L, Reichenauer T G, *et al.* 16S rRNA based T-RFLP analysis of methane oxidizing bacteria-Assessment, critical evaluation of methodology performance and application for landfill site cover soils [J]. Applied Soil Ecology, 2006, **31**(3):251-266.
- [21] Bédard C, Knowles R. Physiology, biochemistry, and specific inhibitors of CH₄, NH₄⁺, and CO consumption by methanotrophs and nitrifiers [J]. Microbiology Reviews, 1989, **53**:68-84.
- [22] Adamsen A P S, King G M. Methane consumption in temperate and subarctic forest soils: rates, vertical zonation, and responses to water and nitrogen [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1993, **59**(2):485-490.