



移动扫码阅读

赖生平,杨洪伟,徐志磊,等.不同氧浓度下甲烷氧化耦合反硝化及微生物协作机制研究[J].能源环境保护,2021,35(3):46-52.

LAI Shengping, YANG Hongwei, XU Zhilei, et al. Methane oxidation coupled with denitrification and microbial cooperation mechanism under different oxygen concentrations[J]. Energy Environmental Protection, 2021, 35(3): 46-52.

不同氧浓度下甲烷氧化耦合反硝化及微生物协作机制研究

赖生平¹, 杨洪伟¹, 徐志磊², 聂明建^{1,*}

(1. 重庆德润环境有限公司, 重庆 400000; 2. 中国市政工程中南设计研究总院有限公司, 湖北 武汉 430000)

摘要:为了研究不同氧浓度条件下甲烷氧化与反硝化的耦合关系,采用三套浸出床生物反应器模拟了准好氧填埋场中的微好氧和缺氧环境,探讨了甲烷氧化与反硝化的耦合作用,分析了相关微生物群落。结果表明:微好氧系统和缺氧系统的最大反硝化率分别为100%和85.67%,最大反硝化效率分别为16.54 mmol/(L·d)和9.88 mmol/(L·d);未通甲烷的对照系统中无反硝化现象,微好氧和缺氧系统均有良好的甲烷氧化耦合反硝化相关性;30%~40%二氧化碳的通入可使两个系统的pH分别稳定在7.6和7.4,对反硝化碱度累积有良好的缓冲作用;甲烷氧化的优势菌为甲基杆菌和甲基单胞菌,耦合的反硝化菌主要为甲基芽孢杆菌。

关键词:准好氧填埋场;微氧甲烷氧化;缺氧甲烷氧化;渗滤液脱氮;微生物群落

中图分类号:X703

文献标识码:A

文章编号:1006-8759(2021)03-0046-07

Methane oxidation coupled with denitrification and microbial cooperation mechanism under different oxygen concentrations

LAI Shengping¹, YANG Hongwei¹, XU Zhilei², NIE Mingjian^{1,*}

(1. Chongqing Derun Environment Co., Ltd., Chongqing 400000, China; 2. Central and Southern China Municipal Engineering Design & Research Institute Co., Ltd., Wuhan 430000, China)

Abstract: In order to study the coupling relationship between methane oxidation and denitrification under different oxygen concentrations, three leaching bed bioreactors were used to simulate the microaerobic and anoxic environment in a semi-aerobic landfill. The coupling effect of methane oxidation and denitrification was discussed, and the related microbial communities were analyzed. The results showed that the maximum denitrification efficiencies of the microaerobic system and anoxic system were 100% and 85.67%, respectively. The maximum denitrification rates were 16.54 mmol/(L·d) and 9.88 mmol/(L·d), respectively. Denitrification process did not occur in the control system without methane. There was a good correlation between methane oxidation and denitrification in both microaerobic and anoxic systems. Introducing 30%~40% CO₂ into the above two systems will stabilize their pH at 7.6 and 7.4, respectively, and had a good buffer effect on the accumulation of denitrification alkalinity. The dominant bacteria for methane oxidation were Methylobacter and Methylomonas, and the coupled denitrifying bacteria were mainly Methylobacillus.

Key Words: Semi-aerobic landfill; Microaerobic methane oxidation; Anoxic methane oxidation; denitrification of leachate; Microbial community

收稿日期:2021-03-03;责任编辑:蒋雯婷

第一作者简介:赖生平(1966-),男,重庆人,本科,高级工程师,主要研究方向为给排水工程、废水处理。E-mail:Shengping.LAI@Derun-env.com

通讯作者简介:聂明建(1986-),男,重庆人,硕士,工程师,主要研究方向为给排水、环境工程、废弃物生物处理。E-mail:108417786@qq.com

0 引言

随着城市化和经济水平的不断提升,城市人口数量快速增长,随之而来的城市生活垃圾的污染问题日益严重,如何妥善处置城市生活垃圾是世界各国面临的难题。我国城市生活垃圾的主要处置方法有焚烧、堆肥和卫生填埋。卫生填埋是20年前垃圾处置的最主要方法,但由于其选址十分严苛,并且对地下水、土壤、大气等均具有较大的污染,给生态系统带来了极大的威胁(王传英等^[1])。为使填埋技术成为减少垃圾污染的一种技术方案,可采用准好氧填埋技术来改造老式厌氧填埋场或新建准好氧填埋场,更好地抑制垃圾填埋场中液体和气体污染物的产生。“准好氧填埋”的概念最初是由日本学者 Hanashima 教授提出的(Lee 等^[2]),近年来在中国得到广泛推广(Wu 等^[3])。这项技术从填埋场的结构设计出发,通过改造填埋场使内部存在好氧、微氧、厌氧并存的环境,促使垃圾能在不同条件下实现不同途径的污染物降解。准好氧填埋场中,空气可以通过渗滤液导排管扩散入填埋场中,使填埋场从上自下形成好氧-微氧-厌氧-好氧的分布。填埋场中厌氧层是形成甲烷和氨氮的最主要场所,而甲烷在向上扩散的过程中,在经过微氧和好氧层时,好氧甲烷氧化菌会利用其代谢特性来氧化甲烷,是垃圾填埋场中最重要的甲烷减排生物活动。氨氮在向下渗流的过程中,经过准好氧填埋场的底层好氧层,易被硝化细菌氧化为硝酸盐,渗滤液中的有机物也会部分被好氧降解。然而,渗滤液中的有机质和氮源尚未彻底去除,因此,通过渗滤液回灌的形式,将填埋场视作大型生物反应器而进一步去除污染物。回灌渗滤液中的氨氮进一步在表层好氧层中被氨氧化,和填埋场中扩散的甲烷将有可能在缺氧和微氧层相遇,实现甲烷氧化和反硝化的耦合。

不同类型的甲烷氧化耦合反硝化作用可能在不同的氧气条件下发生:(1)在含氧量约为5%的微好氧层中(Huang 等^[4]),好氧的甲烷氧化菌通过有氧呼吸氧化甲烷并产生中间有机物,进一步作为反硝化菌的电子供体来实现反硝化,这个过程称为微好氧甲烷氧化耦合反硝化(MAME-D);(2)在微好氧和缺氧层界面(IMAN),有限的氧气通过甲烷发酵或以硝酸盐为直接电子受体,执行缺氧甲烷氧化耦合反硝化(HYME-D)。

目前,大部分研究集中在好氧甲烷氧化耦合反硝化(AME-D)。AME-D、MAME-D 和 HYME-D 的主要区别在于氧气浓度比例不同会影响甲烷氧化菌的代谢类型发生变化。因此,甲烷氧化菌通过不同的甲烷氧化产生不同的中间代谢物,导致体系中反硝化菌种类和代谢的变化。此外,氧浓度也会影响甲烷的氧化效率,从而影响反硝化的效率。Werner 和 Kayser^[5]设计了一种流化床生物反应器来运行 AME-D,其最大硝酸盐去除率为 549.6 mg NO₃⁻-N/(L·d)。其他间歇式反应器的硝酸盐去除效率最高为 49.92~79.2 mg NO₃⁻-N/(L·d)(Houbron 等^[6],Thalasso^[7],Waki 等^[8])。多位研究人员(Beck 等^[9],Liu 等^[10],Yu 等^[11])指出,以 AME-D 和 MAME-D 为主的细菌是 *Methylococcaceae* 和 *Methylophilaceae*。HYME-D 的甲烷氧化和反硝化速率较低,主要是由于其氧化还原电位最低。HYME-D 的代谢与 AME-D 和 MAME-D 不同。Kits 等^[12]报道了一种新的甲基单胞菌代谢系统,该系统可以利用硝酸盐作为电子受体氧化甲烷产生 N₂O。然而,甲烷氧化的代谢途径仍未确定。Kalyuzhnaya 等^[13]研究了 I 型好氧甲烷氧化菌的 C1 同化途径,并得出结论:*Methylomicrobium* 和 *Methylomonas* 可以在氧限制的条件下进行甲烷发酵,并产生十分丰富的有机酸。Beck 等^[9]发现甲基杆菌属在缺氧条件下相对丰度低于好氧条件,但数量仍显著高于其他属。然而,由于填埋气体的成分复杂,填埋区甲烷氧化耦合反硝化的过程和微生物群落可能更加多样化。

因此,本研究在实验室模拟了准好氧填埋场中的微好氧和缺氧环境,探究了甲烷氧化与反硝化是否耦合发生,并分析了参与这些过程的主要微生物。

1 材料和方法

1.1 垃圾样品

本研究使用的垃圾样品采集自中国重庆长生桥垃圾填埋场,在5个不同的地点随机采集两个深度的样品,深度约为70 cm 和 120 cm。来自同一深度的样本被混合在塑料密封袋中,立即运回实验室。在整个实验过程中,对不同深度的样品分别进行处理。

1.2 培养基和实验用气

本实验使用的培养基为硝酸盐无机盐培养基(NMS),其组成为:KH₂PO₄ 200 mg/L、K₂HPO₄

400 mg/L、CaCl₂ · 2H₂O 500 mg/L、MgSO₄ · 7H₂O 1 000 mg/L、FeSO₄ · 7H₂O 9.1 mg/L、NaNO₃ 浓度在 200~400 mg/L 之间(Huang 等^[4])。

进口气体大约由 70% 的甲烷和 0~30% 的二氧化碳组成。微好氧反应器添加 5% 的氧气, 缺氧反应器添加 1% 的氧气, 对照组反应器不加入氧气(Huang 等^[4]), 剩下的气体比例用氩气填充。

1.3 浸出床生物反应器(LBB)的设置和运行

用于序批实验的三个等尺寸反应器主要由直径 13 cm 的柱子、上流式气体分配系统和下流式液体渗滤系统构成, 反应原理见图 1。从取样深度 70 cm 的样品中取出 4 kg 的样品接种到 LBB2 中, 富集 MAME-D 相关微生物。从取样深度 120 cm

的样品中取出 4 kg 的样品接种到 LBB3 中, 富集 HYME-D 相关微生物。对照试验中, 将 70 cm 深度的 2 kg 样品和 120 cm 深度 2 kg 样品混合后加入 LBB1 中。将接种物在浸出床生物反应器中驯化培养 60 d, 使可溶性有机物消耗尽。在此之后, 用氩气吹脱浸出床生物反应器中的空气, 并通入设置比例的甲烷/二氧化碳/氧气, 正式进行序批实验, 实验运行参数设置详见表 1。根据 200~400 mg/L 的进水硝酸盐负荷设置三个实验阶段, 总共运行近 50 d, 每天 6 个循环, 每个循环包括 2 min 的同时进水和曝气, 56 min 的渗滤和 2 min 的出水。培养基进水为 2 L/d。温度控制在 30±1 °C。压力保持在大气压力。每天收集一次气体和液体样本。

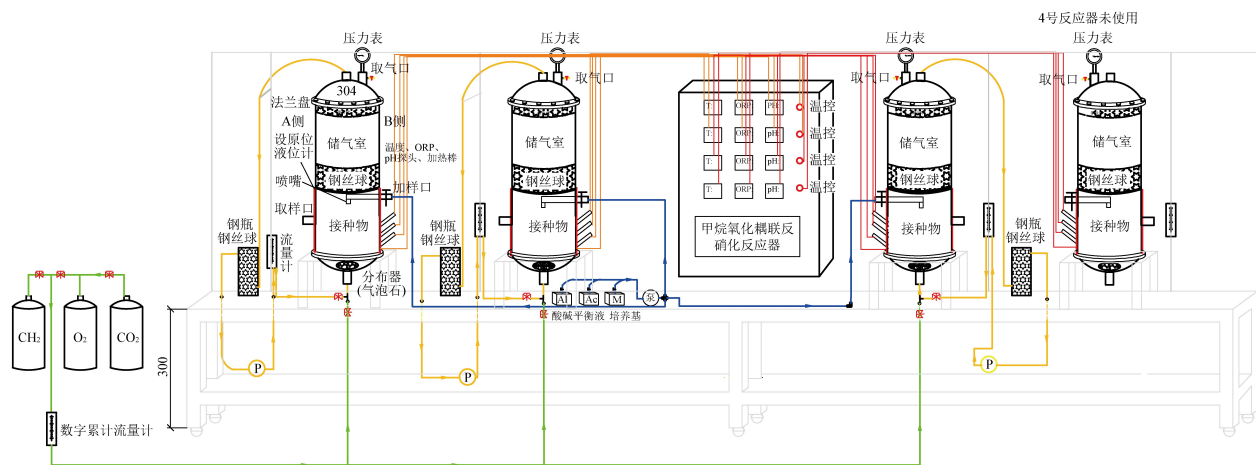


图 1 生物反应器设计图

Fig.1 Design drawing of bioreactors

表 1 实验各阶段运行参数设置

Table 1 Operation parameters of each stages of the experiment

运行设置	Run 1	Run 2	Run 3
运行时间/d	12	14	21
进水硝酸盐负荷(mg N/L) (LBB1,2,3)	200	300	400
对照实验 Ar/CO ₂ (LBB1)	85/15	85/15	60/40
MAME-D 的气体比例/% CH ₄ /CO ₂ /O ₂ /Ar(LBB2)	70/15/5/10	70/15/5/10	60/30/5/5
HYME-D 的气体比例/% CH ₄ /CO ₂ /Ar(LBB3)	70/15/15	70/15/15	60/40/0

1.4 分析方法

气体样品中 CH₄、O₂、CO₂ 和 N₂ 的浓度、液体样品中 NO₃⁻-N、NO₂⁻-N 和 NH₄⁺-N 的浓度以及 COD 的测定方法参考曹沁等^[14], pH 值和温度均在线显示。

1.5 DNA 提取、PCR 扩增以及高通量测序

从序批实验开始到结束, 分别取三个反应器各阶段样本各一个进行 DNA 分离。使用

TOYOBO KOD-Plus-Neo DNA 聚合酶和细菌通用引物 515F(5'-GTGYCAGCMGCCGCGGTAA-3') 和 806R(5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3') 进行 PCR 扩增细菌 16S rRNA 基因。最后, 用罗宁生物有限公司高通量测序仪对文库进行配对测序(2×250 bp)。

2 结果与讨论

2.1 甲烷氧化与反硝化耦合的证据

三阶段运行期间三套反应器中硝酸盐和甲烷浓度变化如图 2 所示。总体来说, 在 LBB2 和 LBB3 中成功地实现了甲烷氧化耦合硝酸盐反硝化。在 LBB2 中, 观察到大量的甲烷消耗, 并且硝酸盐的消耗程度与甲烷消耗程度保持一致。每阶段运行的反硝化率均达到 100%, 并且第三阶段运行的反硝化效率达到最大, 其效率为 16.54 mmol/d。运行过程中检测到少量亚硝酸盐, 范围为 0.01~0.98 mmol, 在每阶段的初期少量累积, 后期下降。在 MAME-D 系统中, 最大反硝化效率为 16.54 mmol/d, 相当于 4.82 mg N/(L·d), 高于许

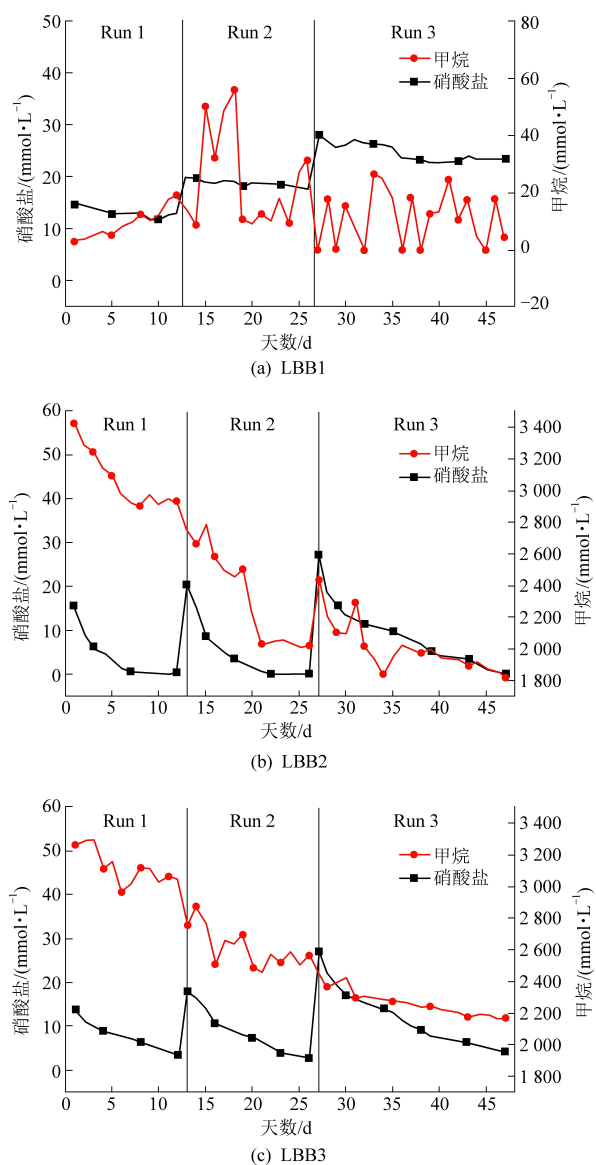


图2 三阶段运行期间 LBB1、LBB2 和 LBB3 中硝酸盐和甲烷的浓度变化

Fig.2 Concentration changes of nitrate and methane in LBB1, LBB2 and LBB3 during three operation phases

多报导的 MAME-D 体系中的反硝化率 (Houbron 等^[6], Thalasso 等^[7], Waki 等^[8], Werner 和 Kayser^[5])。然而,本系统的反硝化率低于 Werner 和 Kayser^[5]报导的流化床生物反应器的反硝化率。在 LBB3 中也观察到甲烷和硝酸盐的消耗,最大反硝化率和反硝化效率分别为 85.67% 和 9.88 mmol/d。亚硝酸盐的积累在第二阶段开始时最高(约为 0.42 mmol),然后慢慢下降到 0。在不含甲烷的对照试验组 LBB1 中,由于接种剂中的有机残渣和硝酸盐的同化作用导致硝酸盐浓度有少量的下降。

与对照组 LBB1 相比,微氧和缺氧反应器均表现出较高的甲烷氧化和反硝化活性。此外, MAME-D 比 HYME-D 具有更高的甲烷氧化和反

硝化活性。这可能是由于氧气比硝酸盐具有更低的氧化电位,使其能够更快更容易地实现电子传输。

2.2 CO₂对 pH 的影响

在实验中还观察到了反硝化作用引起的 pH 升高和 CO₂调节 pH 的缓冲作用,结果如图 3 所示。在 LBB2 的第二阶段运行中,当混合气体中的 CO₂浓度在 600 mmol/L 以下时,由于反硝化作用 pH 迅速上升到 8。第二阶段运行到 21 天时, pH 开始下降(从 7.97 到 7.77),应该是由于硝酸盐的消耗殆尽导致反硝化停止。在 LBB3 的第二阶段运行中,由于反硝化作用持续到第二阶段运行结束, pH 从 7.38 一直增加到 7.88。可见,反硝化作用与 pH 值变化呈明显的负相关性。据报道, MAME-D 和 HYME-D 的最佳 pH 值为 7~8 (He 等^[15], Sun 等^[16])。因此,持续的反硝化作用可能导致 pH 超出最佳反应 pH 范围。CO₂是垃圾填埋场厌氧发酵的天然产物,占准好氧垃圾填埋场沼气成分的 19%~28% (Huang 等^[5])。因此,二氧化碳可以是一个重要的反硝化 pH 缓冲物。从第三阶段运行可以看出,当 CO₂的浓度从 250 mmol/L 提高到 1 297.31 mmol/L (LBB2) 和从 590 mmol/L 提高到 1 552.69 mmol/L (LBB3) 时, pH 出现明显下降,在 LBB2 中从 7.77 下降到 7.21,在 LBB3 中从 7.88 下降到 6.91。在第三阶段运行中,虽然 LBB2 和 LBB3 的 pH 值仍有明显的上升,但在后期稳定在 7.6 和 7.4 的水平,说明 CO₂有很好的缓冲作用。

2.3 MAME-D 和 HYME-D 的群落多样性和功能微生物

从 LBB1、LBB2 和 LBB3 的富集培养物中提取全基因组 DNA,构建 16S rRNA 基因克隆文库。图 4 系统发育树显示了丰度较高的前 28 个菌株。由图 4 可知,大多数菌株种类属于变形杆菌门。γ-变形杆菌门中的甲基双球菌科 (*Methylococcaceae*) 和 β-变形杆菌门中的 *Methylophilaceae* 在科水平上分别在 LBB2 和 LBB3 中占优势。此外, *Methylophilaceae* 中的甲基菌属 (*Methylobacillus*) 在 LBB2 和 LBB3 的末期分别占有 1 646 和 11 051 个 OTUs,相对丰度分别为 6.3% 和 10.05%。甲基杆菌属 (*Methylobacter*) 属于甲基双球菌科 (*Methylococcaceae*), OTUs 分别为 1 172 和 8 475,在 LBB2 和 LBB3 中分别占末期相对丰度的 4.11% 和 7.55%。甲基单胞菌 (*Methylomonas*) 在甲基双球菌科 (*Methylococcaceae*) 中,共有 1 250 和 8 747 个 OTUs,最终分别占 LBB2 和 LBB3 中相对丰度的

4.78%和8.0%。这三种细菌在两种体系中均显著

富集,在LBB3中更为丰富。

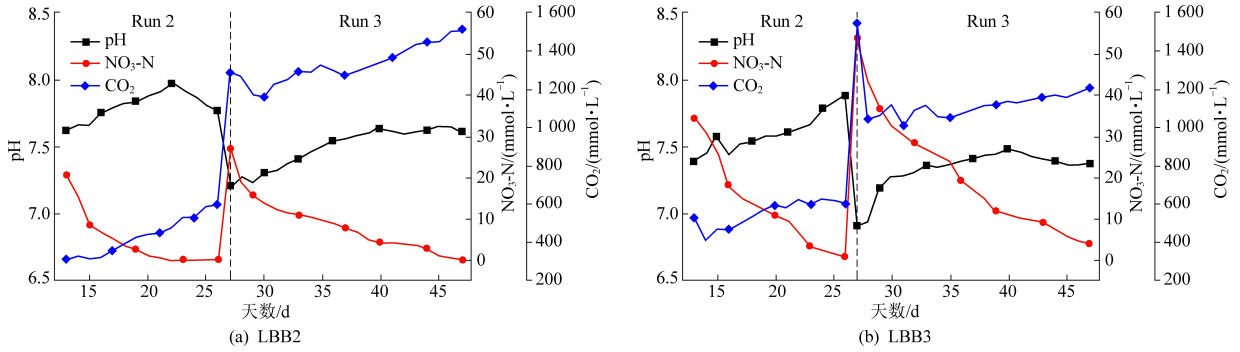


图3 LBB2和LBB3中第二和第三阶段的pH、硝酸盐浓度和二氧化碳浓度变化

Fig.3 Changes of pH, nitrate and CO₂ concentrations in LBB2 and LBB3 during the second and third stages

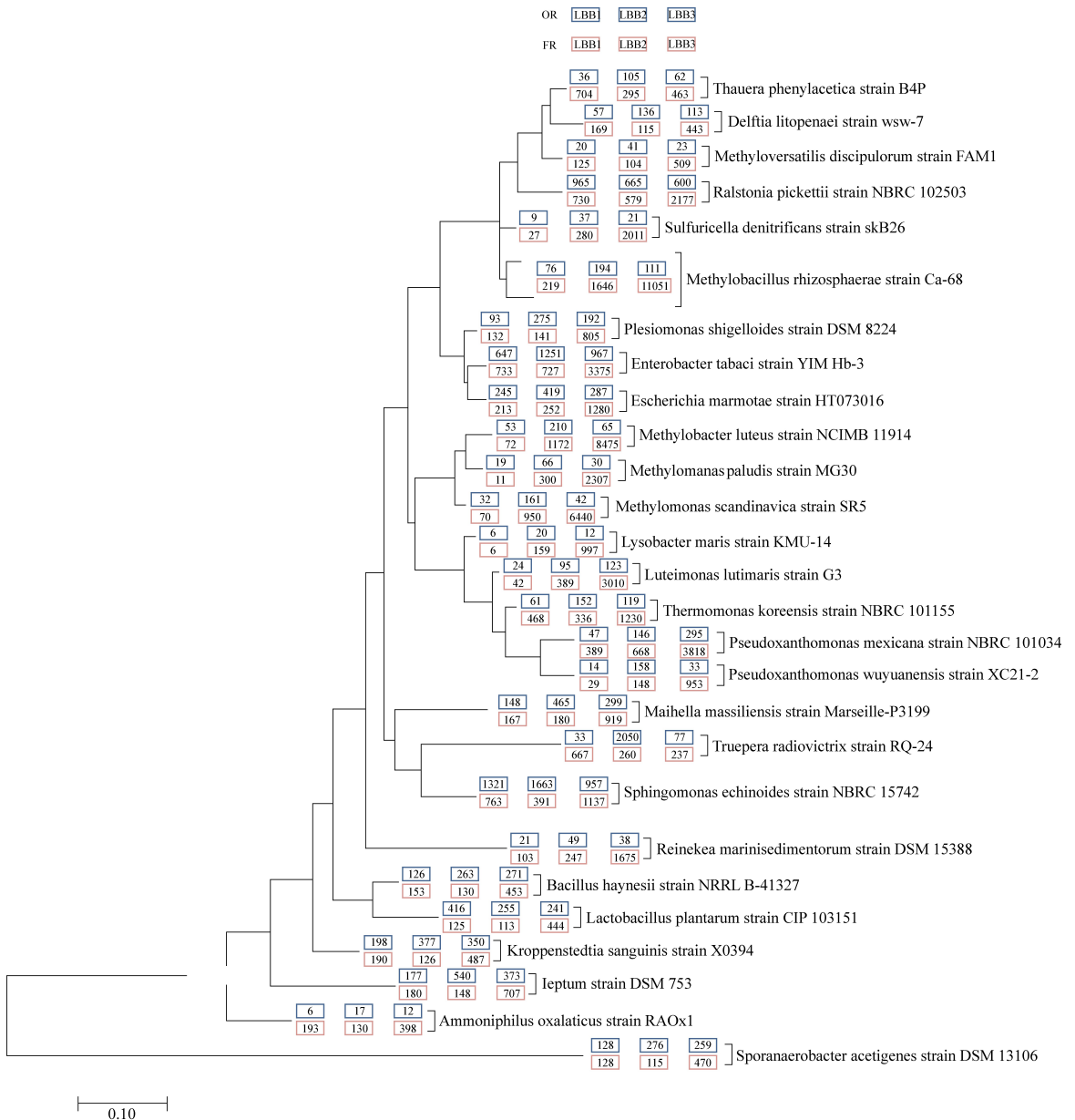


图4 富集培养样品的系统发育关系

Fig.4 Phylogenetic relationships of enrichment culture samples

该系统发育树中显示了相对丰度最高的28个序列。蓝盒子表示从3个LBBs原始样本中克隆的OTUs。红色方框代表序批实验结束时三个LBBs样品的OTUs,依次为LBB1、LBB2、LBB3(对照、微氧和缺氧)

Wei 等^[17] 报道甲基杆菌属是低氧(O_2 5% ~ 20%)环境中最重要的甲烷氧化菌之一。甲基单胞菌还具有将甲烷好氧化或缺氧氧化成有机化合物的重要潜力(Ogiso 等^[18])。甲烷氧化产生的主要有机中间体有甲醇、乙酸盐(Costa 等^[19])、柠檬酸盐和蛋白质(Eisentraeger 等^[20])。据报道,甲基杆菌属可以利用甲基营养物的甲醇基和甲胺基作为碳源来进行硝酸盐反硝化作用(Doronina 等^[21])。因此,可以确定甲基杆菌、甲基单胞菌和甲基杆菌属的结合可以实现微氧环境下的甲烷氧化耦合反硝化。此外,有多项研究报导,在甲烷和硝酸盐充足的情况下,甲基单胞菌在好氧和厌氧环境的界面处(IMAN)丰富而活跃,这与在 LBB3 中

观察到的现象一致。它们在缺氧条件下丰富的原因可能是甲烷发生了发酵,为甲烷氧化菌的生存提供了能量。甲烷发酵产生的中间体比甲烷氧化产生的中间有机物更加丰富(Kalyuzhnaya 等^[13])。因此,大量的电子供体被运送到甲基营养性反硝化菌(如甲基杆菌属),从而发生反硝化作用。这也可以解释为什么甲基杆菌属在 LBB3 中的相对丰度高于 LBB2。

2.4 准好氧垃圾填埋场碳氮共循环系统假设

研究表明,气体扩散、液体渗滤、反硝化和甲烷氧化之间存在相关性,这在准好氧垃圾填埋场具有很好的适用性,详见图 5。这些过程还可能与氨氧化、硝化、有机降解和厌氧消化有关。

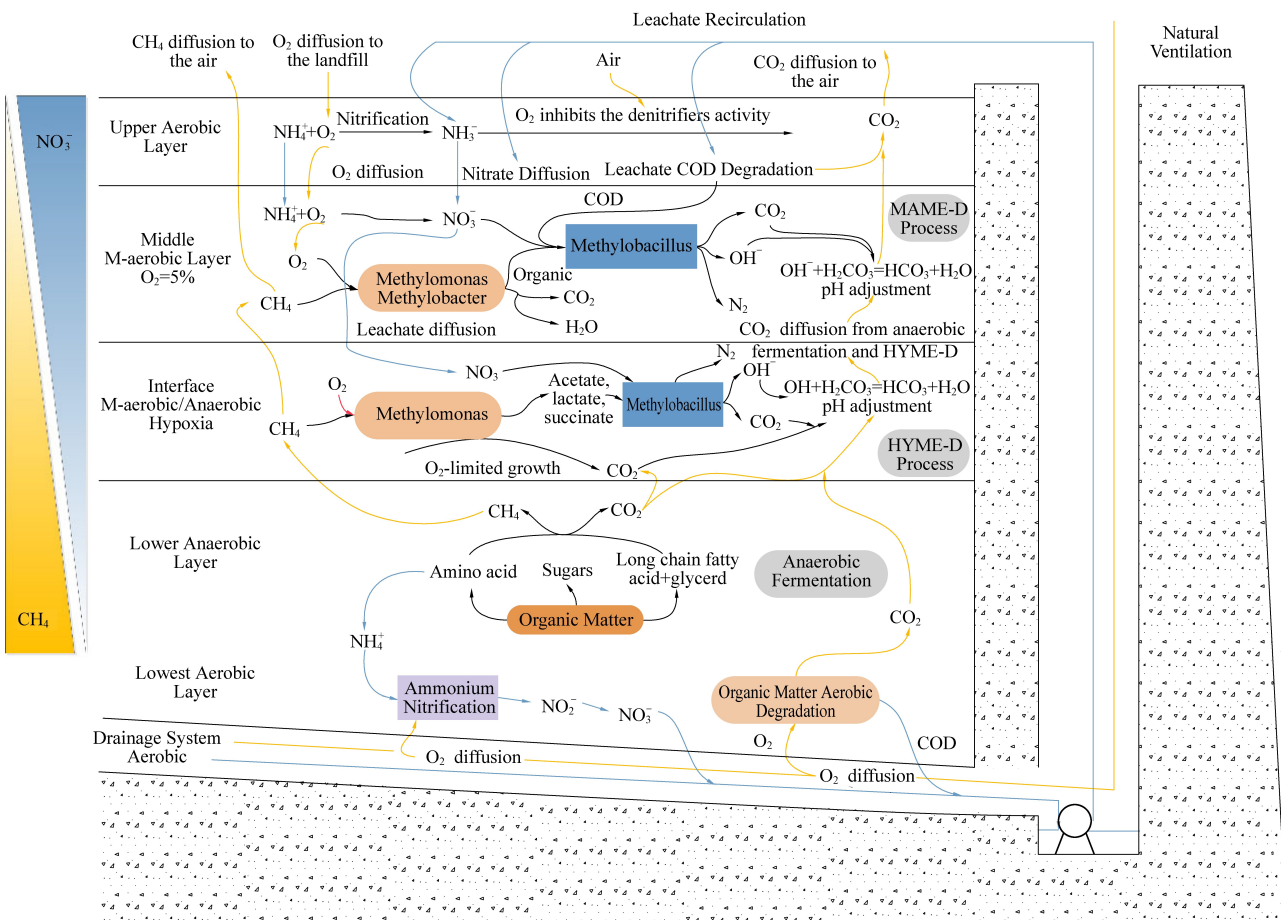


图 5 准好氧垃圾填埋场氮碳共循环系统假设

Fig.5 Hypothesis of nitrogen and carbon co-cycling system in semi-aerobic landfills

由图 5 可以看出,在准好氧垃圾填埋场中,空气被动扩散到渗滤液排水系统,导致 COD 下降,氨氮被硝化。因此,低 COD 负荷和高硝酸盐浓度的再循环渗滤液渗透到上部好氧区。在这一领域,有机残留物可以进一步降解,但高氧浓度抑制反硝化菌的活性。因此,硝态氮不能在表层土壤中被反硝化。

在中微好氧层中,LBB2 中发现的甲基单胞菌和甲基杆菌属等细菌在 5% 的氧条件下将甲烷氧化为有机化合物。随后,本研究鉴定的甲基杆菌将硝酸盐和有机化合物转化为 CO₂、N₂ 和 OH⁻。在 IMAN 层中,厌氧层中产生的甲烷和残留的硝酸盐可以通过甲基单胞菌甲烷发酵和甲基杆菌还原硝酸盐发生 Hyme-D。这两个过程都会产生二

氧化碳和 OH^- , 它们同时起缓冲作用, 维持系统的中性条件。

3 结论

采用 MAME-D 和 HYME-D 系统在浸出床生物反应器中进行了脱氮、甲烷氧化的实验研究, 得出以下结论:

(1) 与 HYME-D 工艺相比, MAME-D 工艺具有更高的反硝化效率和甲烷氧化效率;

(2) 注入体系的 CO_2 作为良好的缓冲液维持 pH 的稳定;

(3) 细菌群落系统发育分析揭示了甲基杆菌属和甲基单胞菌分别在微氧和缺氧条件下的甲烷氧化和甲烷发酵功能。同时, 甲基菌属消耗中间有机物并完成反硝化;

(4) 基于上述结论, 在准好氧垃圾填埋场中提出了一种基于 MAME-D 和 HYME-D 的新型氮碳循环系统: 在准好氧填埋场微好氧层中, 甲烷氧化的有机物供给反硝化菌碳源发生反硝化作用; 在缺氧层, 甲烷通过甲基单胞菌发生甲烷发酵作用, 并和甲基菌属作用进行反硝化。

参考文献

[1] 王传英. 城市生活垃圾填埋场渗滤液回灌处理技术实验研究 [D]. 西安: 长安大学, 2011: 1-2.

[2] Lee N, Kusuda T, Shimaoka T, et al. Pollutant transformations in landfill layers [J]. Waste Management Research, 1994, 12: 33-48.

[3] Wu X H, Yue B, Huang Q F, et al. Spatial-temporal variation of landfill gas in pilot-scale semi-aerobic and anaerobic landfills over 5 years [J]. Journal of Environmental Sciences, 2017, 54: 288-297.

[4] Huang Q F, Yang Y F, Pang X R, et al. Evolution on qualities of leachate and landfill gas in the semi-aerobic landfill [J]. Journal of Environmental Sciences, 2008, 20: 499-504.

[5] Werner M, Kayser R. Denitrification with biogas as external carbon source [J]. Water Science Technology, 1991, 23: 701-708.

[6] Houbron E, Torrijos M, Capdeville B. An alternative use of biogas applied at the water denitrification [J]. Water Science and Technology, 1999, 40: 115-122.

[7] Thalasso F. Biological gas treatment: General aspects [J]. Water Research, 1997, 2 (34): 149-158.

[8] Waki M, Suzuki K, Osada T, et al. Methane-dependent denitrification by a semi-partitioned reactor supplied separately with methane and oxygen [J]. Bioresource Technology, 2005, 96: 921-927.

[9] Beck DAC, Kalyuzhnaya MG, Malfatti S, et al. A metagenomic insight into freshwater methane-utilizing communities and evidence for cooperation between the Methylococcaceae and the Methylophilaceae [J]. Peerj, 2013, 1. DOI: 10.7717/peerj.23.

[10] Liu J J, Sun F Q, Wang L, et al. Molecular characterization of a microbial consortium involved in methane oxidation coupled to denitrification under micro-aerobic conditions [J]. Microbial Biotechnology, 2014, 7: 64-76.

[11] Yu Z, Beck DAC, Chistoserdova L. Natural selection in synthetic communities highlights the roles of Methylococcaceae and Methylophilaceae and suggests differential roles for alternative methanol dehydrogenases in methane consumption [J]. Frontier Microbiology, 2017, 8: 123-129.

[12] Kits K D, Klotz M G, Stein L Y. Methane oxidation coupled to nitrate reduction under hypoxia by the Gammaproteobacterium Methylomonas denitrificans, sp nov type strain FJG1 [J]. Environmental Microbiology, 2015, 17: 3219-3232.

[13] Kalyuzhnaya M G, Yang S, Rozova O N, et al. Highly efficient methane biocatalysis revealed in a methanotrophic bacterium [J]. Nature Communication, 2013, 4: 1789-1794.

[14] Cao Q, Liu X F, Ran Y, et al. Methane oxidation coupled to denitrification under microaerobic and hypoxic conditions in leach bed bioreactors [J]. Science of the Total Environment, 2019, 649: 1-11.

[15] He Z, Cai C, Geng S, et al. Modeling a nitrite-dependent anaerobic methane oxidation process: Parameters identification and model evaluation [J]. Bioresource Technology, 2013, 147: 315-320.

[16] Sun F Y, Dong W Y, Shao M F, et al. Aerobic methane oxidation coupled to denitrification in a membrane biofilm reactor: treatment performance and the effect of oxygen ventilation [J]. Bioresource Technology, 2013, 145: 2-9.

[17] Wei M, Qiu Q F, Qian Y X, et al. Methane oxidation and response of Methylobacter/Methylosarcina methanotrophs in flooded rice soil amended with urea [J]. Applied Soil Ecology, 2016, 101: 174-184.

[18] Ogiso T, Ueno C, Dianou D, et al. Methylomonas koyamae sp nov., a type I methane-oxidizing bacterium from floodwater of a rice paddy field [J]. International Journal of Systematic & Evolutionary Microbiology, 2012, 62: 1832-1837.

[19] Costa C, Dijkema C, Friedrich M, et al. Denitrification with methane as electron donor in oxygen-limited bioreactors [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2000, 53: 754-762.

[20] Eisentraeger A, Klag P, Vansbotter B, et al. Denitrification of groundwater with methane as sole hydrogen donor [J]. Water Research, 2001, 35: 2261-2267.

[21] Doronina N V, Trotsenko Y A, Kolganova T V, et al. Methylobacillus pratensis sp nov., a novel non-pigmented, aerobic, obligately methylotrophic bacterium isolated from meadow grass [J]. International Journal of Systematic & Evolutionary Microbiology, 2004, 54: 1453-1457.