

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

利用 DGGE-PCR 放大 DNA 技術探討土壤環境因子對掩埋場甲 烷氧化菌多樣性之影響 研究成果報告(精簡版)

計畫類別：個別型
計畫編號：NSC 95-2313-B-041-005-
執行期間：95年08月01日至96年07月31日
執行單位：嘉南藥理科技大學環境資源管理系

計畫主持人：劉瑞美
共同主持人：陳世雄、洪睦雅
計畫參與人員：碩士班研究生-兼任助理：吳恬宜、周于博、薛匡鈞、黃傳富



處理方式：本計畫涉及專利或其他智慧財產權，1年後可公開查詢

中華民國 96 年 10 月 31 日

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫成果報告

利用 DGGE-PCR 放大 DNA 技術探討土壤環境因子對掩埋 場甲烷氧化菌多樣性之影響

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC 95-2313-B-041-005

執行期間：95 年 08 月 01 日至 96 年 07 月 31 日

計畫主持人：劉瑞美

共同主持人：陳世雄

計畫參與人員：吳恬宜、周于博、薛匡均、黃傳富

成果報告類型：精簡報告

處理方式：涉及專利或其他智慧財產權，一年後可公開查詢

執行單位：嘉南藥理科技大學環境工程與科學系

中 華 民 國 96 年 07 月 31 日

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

利用 DGGE-PCR 放大 DNA 技術探討土壤環境因子對掩埋場甲烷氧化菌多樣性之影響

計畫編號：NSC 95-2313-B-041-005-

執行期限：95 年 08 月 01 日至 96 年 07 月 31 日

主持人：劉瑞美

嘉南藥理科技大學環境工程與科學系

共同主持人：陳世雄

嘉南藥理科技大學環境工程與科學系

計畫參與人員：吳恬宜、周于博

一、中文摘要

甲烷為能吸收輻射的遠紅外線、熱能而增加地球的溫室效應。掩埋場是甲烷重要來源之一，本研究由台南南沙崙掩埋場篩出 8 株甲烷氧化菌，由 16S rDNA 親緣樹狀圖可知，SA2、SA4 及 SC2 為甲烷氧化菌 Type I 及 Type II 之外的單系群，由 *mxoF* 特定功能基因之親緣樹狀圖佐證 SA6、SA9、SA14、SA15 及 SD1 為甲烷氧化菌 Type II 之 *Methanobacterium* sp.。另探討土壤環境因子之影響，包括：甲烷濃度變化、溫度變化及含水率之變化，結果得知當溫度 30℃、低甲烷濃度 5% 及含水率為 20% 時，其甲烷氧化效果較佳；而利用優勢因子添加菌株時，也可加速甲烷之氧化。

關鍵詞：掩埋場、土壤、甲烷氧化菌、親緣關係、接種

Abstract

Methane is an important greenhouse gas. Landfill is an important biogenic methane source. Methanotrophs are important regulators of methane fluxes from the landfill to atmosphere. There is limited information presently available on the community structure of methanotrophs in landfills in Taiwan. The study is an investigation on the community structure of methanotrophs as revealed by molecular method in Nan-Sa-Lun landfill in Taiwan. Phylogenetic analysis of the 7 test strains were identified by 2 primers specific for the 16S rDNA and *mxoF* gene by NCBI database and MEGA software. Database searches indicated that SA2, SA4 and SC2 are monophyly from the phylogenetic tree constructed by 16S rDNA and would not hybridize to the Type I and Type II methanotrophs. SA6, SA9, SA14, SA15 and SD1 are most closely related to a group *Methanobacterium* sp. (Type II) by phylogenetic analysis of partial DNA sequence of *mxoF*.

Changes in various factors of CH₄ concentration, soil water content and incubation temperature will also be estimated based on incubation experiments. The maximum oxidation rates for CH₄ were found in 30℃, 5% CH₄ and moisture content of 20%. Inoculation of methanotrophic isolates would also promote the oxidation rate of CH₄.

Keywords: landfill, soil, methanotroph, phylogenetic relationship, inoculation

二、緣由與目的

溫室效應氣體可分為六類，即二氧化碳 (CO₂)、甲烷 (CH₄)、氧化亞氮 (N₂O)、氫氟碳化物 (HFCs)、氟碳化物 (PFCs) 與六氟化硫 (SF₆)。甲烷 (Methane, CH₄) 對全球溫室效應之影響約佔 15%，其生命週期約 12~17 年，且其吸收輻射之潛勢為二氧化碳之 30 倍，在工業化之前其大氣中甲烷濃度為 0.70 ppmv，目前已提高到至 1.78 ppmv，平均每年約以 1% 的速度在增加中^(1,2,3)。

甲烷為大氣中主要的有機性碳氫化合物氣體，其產生源主要來自於水稻田、反芻動物、濕地、工廠排放、掩埋場等，就全球而言，每年約有 653 Tg 的廢棄物是經由掩埋法來處理⁽⁴⁾，1999 年台灣地區以掩埋法(包括：一般掩埋場與衛生掩埋法)處理者佔總垃圾量之 70~90%，以 1998 年的垃圾量來估算，台灣地區甲烷總排放量為 913 千公噸，其中甲烷排放源以垃圾衛生掩埋場為最大宗(佔 73%)。而在本人負責的 93 年國科會/環保署計畫中測定台南地區二處垃圾掩埋場之溫室氣體排放，其中南沙崙掩埋場之甲烷濃度介於 2.39~1074.3 ppmv⁽⁵⁾。

垃圾衛生掩埋時，覆土可防止蚊蠅滋生之衛生問題，並可提供土壤微生物，加速垃

圾分解，亦可提供甲烷氧化菌降低掩埋場之甲烷排放，覆土厚度、垃圾之水份含量、基質成分及掩埋時間皆會對甲烷排放量產生影響甚大^(6,7)。甲烷氧化現象是由 *Methylocystis* sp. 等微生物所造成⁽⁸⁾，甲烷氧化菌可利用甲烷做為其生長時所需之碳源與能量來源⁽⁹⁾，在溼地與淡水系統中一年約可生物性氧化700 Tg 的甲烷⁽¹⁰⁾。在有氧的狀態下，甲烷氧化菌利用甲烷單氧化酶(CH₄ monooxygenase, MMO)將甲烷代謝成甲醇，再利用其他的酵素將甲醇代謝為甲醛、甲酸，最後成為二氧化碳^(11,12,13)。

台灣目前有關甲烷氧化菌微生物生態的研究仍相當貧乏。本研究以台南縣南沙崙衛生掩埋場不同掩埋齡區覆土作為篩選與分離甲烷氧化菌之來源，進而探討土壤環境因子(如：甲烷濃度、溫度、土壤含水率等)對掩埋場甲烷氧化菌族群之菌數與甲烷氧化能力之影響。並利用分子生物技術進一步分析研究中分離之甲烷氧化菌純菌，以建立甲烷氧化菌資料庫，並進行親緣關係的比對和甲烷氧化菌社會結構的研究，以建立台灣本土掩埋場甲烷氧化菌的資料庫。

三、材料與方法

1. 採樣區之選擇

本研究以台南地區南沙崙作為研究試區。此掩埋場屬於二仁溪流域，於民國64年進行掩埋，大部分場區為低窪地，以掩埋生垃圾為主。因掩埋場規模小，故掩埋覆土之作業亦較為簡單，並無妥善規劃土地之再利用。各樣區之使用狀況示於表1。

表 1. 南沙崙垃圾掩埋場現況

樣區	掩埋齡	使用狀況
A區	0~2年	現使用中
B區	3年	已完成封閉覆土
C區	5年	已完成封閉覆土

2. 採集土樣之前處理

採集掩埋場覆土，土樣採集回研究室之後，先去除小草、石頭等雜物後，攤平、風乾，並避免陽光直射。將風乾後的土壤充分碾碎，再以篩網(2mm)過篩後，裝入夾鏈袋於4°C下妥善保存。

3. 土壤基本性質分析

土壤之基本理化性質參考土壤分析手冊進行之。

4. 甲烷濃度分析

使用氣相層析儀/火焰離子偵測器(GC/FID)測之。

5. 甲烷氧化菌之分離與純化

配置無菌之無機鹽液體培養基，分別將各掩埋齡區土壤加入20 mL的無機鹽液體培養基，注入1%甲烷，置於25°C恆溫培養箱中，培養7~8天，以GC-FID測甲烷濃度。

以連續稀釋塗抹於固體無機鹽培養基上，將菌點劃在固體無機鹽培養基上，置於4°C下保存。將菌落植入25 mL無機鹽液體培養基中，並注入1%甲烷濃度，確認各菌株之甲烷化能力。

6. 菌種分子生物鑑定

(1). DNA 萃取

本實驗利用 Wizard genomic DNA purification kit (Promega Co.)進行試驗菌株DNA之萃取。

(2). DNA 萃取濃度測試

將萃取出之DNA利用核酸分光光度計(Biotech Photometer UV1101)，計算O.D.260吸光值及O.D.260/O.D.280比值。

(3). 聚合酶連鎖反應

本實驗針對細菌的16S rDNA保守性區域及特定功能基因加以設計，引子序列示如表2。其中16S rDNA的引子為Uni27f + 1492r【Holmes et al.,1995】，可選取出1465bp的PCR片段產物。特定功能基因則選擇具有甲醇去氫酶(MDH)(McDonald et al.,1997; Horz et al.,2001; Thilo et al.,2001)的引子為 *mx*aF(f1003 + r1561)，可選取出558bp的PCR片段產物(表2)。

表2. 試驗中所使用之引子序列

Target gene	Primer set	Sequence (5' to 3')	Reference
16S rDNA	Uni27f	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	(4)
	1492R	TACGGTTACCTTGTACACT	
<i>mx</i> aF	f1003	GCGGCACCAACTGGGGCTGGT	(5,6,7)
	r1561	GGGCAGCATGAAGGGCTCCC	

7. 瓊脂膠體電泳

使用0.8% Agarose gel進行電泳來確認萃取的基因組DNA含量及純度。利用1.5%瓊脂膠片分析聚合酶連鎖反應後之產物，以100伏特進行電泳後，將膠片放置EtBr溶液，染色15分鐘，再以二段水清洗數次後，放置於紫

外光箱觀察，亮帶出現的位置與同時進行電泳的DNA 標準品比對即可知道產物之純度與分子量大小。

8. DNA定序分析與繪製親緣樹狀圖

待菌體把 DNA 抽出後，經進行 PCR 反應後，再將 PCR 產物送交至「波仕特生物科技公司」代為定序，待取得利用各段引子 (primer)所定序之結果，用 SeqMan 軟體將其序列做重複檢查及連接，再將連接好之 DNA 序列上網至 NCBI，利用 Nucleotide Blast 查詢並與已發表的序列進行比對。並用 EditSeq 軟體儲存網路已知序列，再利用 BioEdit 之 Clustal Multiple alignment 軟體整理序列，以 MEGA 4 軟體計算遺傳距離並架構親緣圖。

9. 甲烷氧化菌數測量

本實驗則採最大可能數(MPN)法一測甲烷消耗量法。

10. 環境影響因子

(1). 甲烷濃度之變化

取5g掩埋區土壤，加入裝有45 mL液體培養基的血清瓶，一組打入5%濃度的甲烷氣體，另一組打入20%濃度的甲烷氣體，並各做一組空白組來做對照，於25℃下恆溫培養，測定甲烷濃度並計數甲烷氧化菌。

(2). 溫度之變化

取5g掩埋區土壤，加入裝有45 mL液體培養基的血清瓶，打入20%濃度的甲烷氣體並分成兩組，並做一組空白對照組，分別孵育在20與30℃下，測定甲烷濃度並計數甲烷氧化菌。

(3). 含水率之變化

取5g掩埋區土壤，加入裝有45 mL液體培養基的血清瓶，打入20%濃度的甲烷氣體並分成兩組，並做一組空白對照組，分別以液體培養基做含水率之變化，含水量分別為20%、40%、60%，培養在25℃下，測定甲烷濃度並計數甲烷氧化菌。

(4). 添加菌種試驗

取5g掩埋區土壤，加入裝有44 mL液體培養基的血清瓶，將以事先培養在NB無機鹽液體培養基中2~3天之菌種，分別取1mL之菌液加入44 mL液體培養基中，另外做一組無菌種添加及土壤未滅菌之對照組，及無菌種添加土壤已滅菌之空白組，打入5%濃度的甲烷氣體並培養在30℃下，固定時間點測其甲烷濃度並計數甲烷氧化菌。

四、結果與討論

1. 南沙崙掩埋場之土壤性質

南沙崙掩埋場土壤質地為砂質壤土。各採樣區之EC值大約在0.05-0.67ds/m之間，以B區之EC值較高。土壤pH值約為7.4-8.4之間，呈現偏鹼性。有機質含量約在0.66-9.9%之間，其中以B區土壤之有機質含量較高。有效磷含量約為8-18mg/kg之間，各樣區差異不大。而有效性鉀之含量約在35-379 mg/kg之間，則B區之有效鉀略高於其他樣區。總氮含量約為0.39-0.87g/kg之間，吹氣口之總氮含量較低於其他樣區，其次以A區之總氮含量較多。微量元素方面，包括：Cu、Fe、Mn及Zn，以A區之微量元素含量較高於其他樣區。

2. 甲烷氧化菌之分離

在台南南沙崙衛生掩埋場土壤中分離出20株甲烷氧化菌，將20株菌落分別植入無機鹽液體培養基，注入1%甲烷濃度，測其初始濃度，置入25℃恆溫培養箱培養7~8天再測其甲烷濃度，其中現齡掩埋區所分離的菌株有較好的甲烷代謝能力。將菌體抽DNA送定序鑑定並上網做比對，發現有5株菌並非屬甲烷氧化菌。

3. 菌株之分類鑑定

萃取出DNA濃度則可利用核酸分光光度計(Biotech Photometer UV1101)，顯示O.D.260/O.D.280比值範圍約在1.467~2.056，即不受蛋白質干擾，DNA濃度範圍約在1100~2150 µg/mL，其中以SC2的濃度為最低，SA14的濃度為最高。

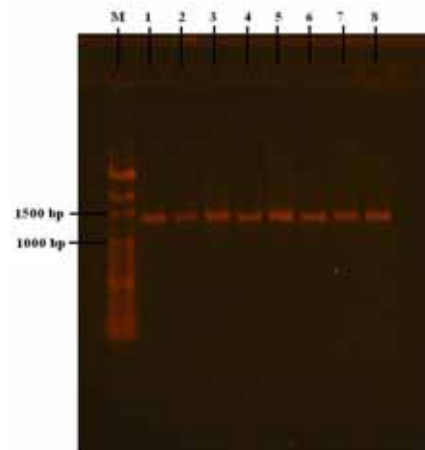


圖 1.16S rDNA 保守片段 PCR 之結果
M：Marker (Bio-100 Ladder , Cat# M1-100T)

Land 1-8 : SA9、SA2、SD1、SC2、SA4、SA6、SA14、SA15

本研究利用 16S rDNA 保守片段及特定功能基因引子探討甲烷氧化菌，將 PCR 產物片段於 1.5 % agarose 進行膠體電泳，16S rDNA 保守片段之電泳圖如圖 1 所示，8 株菌皆有 1500 bp 左右的 DNA 產物。而特定功能基因 *mxoF* 之電泳圖如圖 2 所示，其中 SA2、SC2 及 SA4 菌株並無 DNA 產物，其餘五株菌之 DNA 片段約在 500 bp 左右，推測 SA2、SC2 及 SA4 等菌株，可能是 Type X 或是別種型態的甲烷氧化菌。

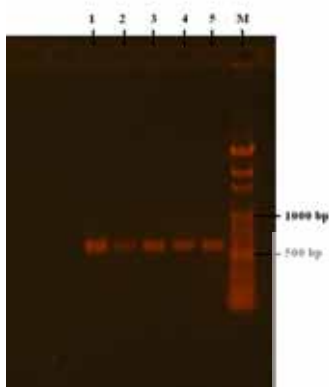


圖 2. *mxoF* 特定功能基因 PCR 之結果

M : Marker (Bio-100 Ladder , Cat# M1-100T)

Land 1、2、3、4、5 : SA9、SD1、SA6、SA14、SA15

4. 定序結果

4-1 16S rDNA 親緣關係

以 16S rDNA 保守片段序列所架構之 NJ 樹狀圖如圖 3，其中有 10 種不同屬的甲烷氧化菌分別有 Type I 的 *Methylomonas*, *Methylosarcina*, *Methylocaldum*, *Methylobacter*, *Methylochromium*, *Methylothermus* ; Type II 的 *Methylocella*、*Methylosinus*、*Methylocystis* ; 未命名的甲烷氧化菌及 *Methanobacterium*, *Methanobrevibacter*，因為甲烷菌是較甲烷氧化菌早存在之古生細菌，故以甲烷菌用來做為比較之外群。

由樹狀圖發現，所有甲烷氧化菌為一單系群(monophyly group)，SA6、SA9及SA15是比較靠近屬 Type II 的甲烷氧化菌，而SA2、SA4及SC2卻介於Type I及Type II之間，推測SA2、SA4及SC2可能是Type X或是其他新屬種，而SD1及SA14因送定序之結果不理想，故此2株菌在樹狀圖位置亦屬合理。Kightly等學者⁽¹⁴⁾也指出在高甲烷濃度之土壤，如掩埋

場覆土、水稻田、產天然氣上的土壤、溼地等，其菌群有較高的甲烷氧化能力，但其親和力較低，此菌群已在細菌學中被發現，且以Type II 甲烷氧化菌居多。SC2是介於Type I 與Type II二單系群之外的另一單系群的甲烷氧化菌，且SC2菌株是從封閉已久的掩埋場所篩出的菌種，而SA4、SA2卻存在於現齡掩埋區中，故此單系群可能為文獻上較少討論之Type X。

各菌株之遺傳間距相差多少，其屬內間距範圍在 0.000~0.036 之間，可用來作為判別是否可成為同屬之基礎，間距差若在 0.036 以內便有機會視為同屬，若相差大於 0.036 則為不同屬，SA9 跟 SA6 之遺傳間距只有 0.030，極可能為同屬株菌，也發現作為外群的甲烷菌遺傳距離都非常大，皆在 0.7 以上。而 SA2、SC2 及 SA4 與任何一屬之間距都差異很大，可確定 SA2、SC2 及 SA4 極有可能是 Type X 或是其他新屬種；雖然 SA6、SA9 及 SA15 在 Type II 之單系群中，但也獨立為一小分支，無法斷定屬於何分類群，故此 6 者皆需更進一步研究，已確定分類定位。

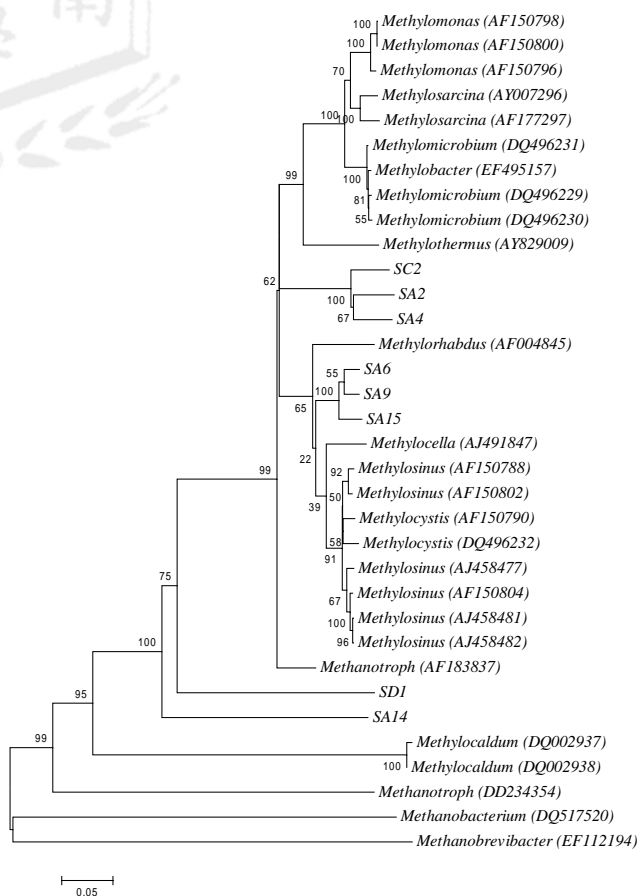


圖 3. 16S rDNA 保守片段之親緣樹狀圖

4-2 *mxoF* 特定功能基因親緣關係

在 *mxoF* 特定功能基因所做出之結果，有 8 種不同屬的甲烷氧化菌及三株未命名的甲烷菌，8 種不同屬的甲烷氧化菌分別有 Type I 的 *Methylocaldum*；Type II 的 *Methylobacillus*, *Methylosinus*, *Methylocystis*；未命名的甲烷氧化菌、*Methylobacterium*, *Methylorhabdus*, *Methylolipal*, *Methylolalomonas*。

由圖 4 可知，樹形圖的上半部皆屬 *Methylobacterium* 之單系群，故可確定 SA6、SA9、SD1、SA14、SA15 皆應為同屬之菌種。進一步觀察菌株間之遺傳間距，雖然 SA6 與 SA14 的遺傳間距為 0.000，但由於 *mxoF* 特定功能基因片段太短，所以不能判斷菌株是否為同一菌種，此 2 菌株之 16S rDNA 保守片段中仍有所差異。而 SA9 與 *Methylobacterium* (EF030548) 之遺傳間距也非常的近，SA15 與 *Methylobacterium* (EF031552) 較接近，可推測 *Methylobacterium* 的屬內間距有所差異，四個屬的屬內間距差異都不小，其範圍大約從 0.029~0.289，若以 *mxoF* 特定功能基因做分屬的話，其差異性會較高。

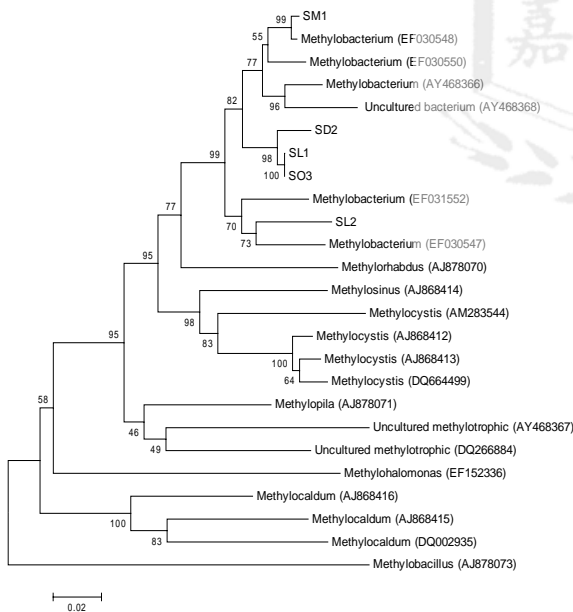


圖 5. *mxoF* 特定功能基因之親緣樹狀圖

5. 影響甲烷氧化之因子

5-1 甲烷濃度變化

當在低濃度的時候甲烷氧化菌較不受抑制(圖 5)，濃度低，甲烷氧化也較快，甲烷為 5% 時，大約 14 天其甲烷氧化率約為 99%，而當甲烷濃度為 20% 時，要到 21 天甲烷氧化率才約 98~99%。在高、低濃度下，Bender 學者指出會有下列兩種不同的甲烷氧化菌群：(1) 高甲烷濃度下，其菌群有較高的甲烷氧化能

力。(2) 低甲烷濃度下，其菌群有較低的甲烷氧化能力。且從 20% 甲烷濃度的菌數中可看出，會因起始甲烷濃度較高時，甲烷氧化菌的遲滯期也會較久一點，而最後的菌數突然驟降的推測可能原因：可能是因為沒有足夠的營養鹽及甲烷碳源，導致菌數衰減。也有可能是因為瓶子裡的甲烷量不足而導致菌數衰減。

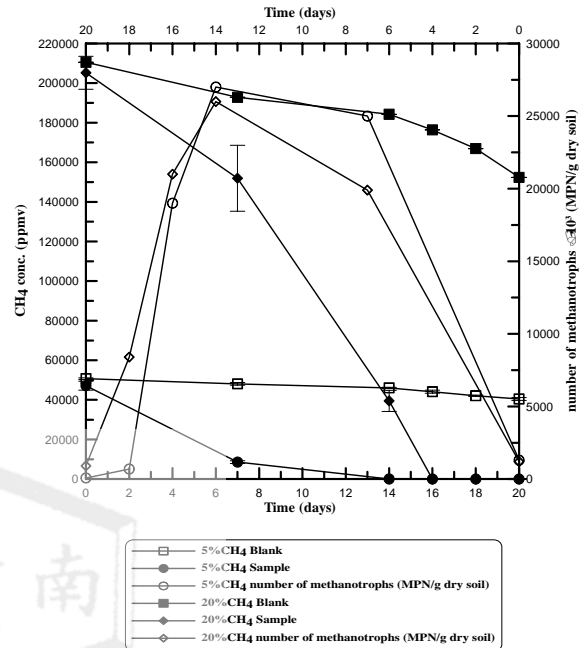


圖 5. 甲烷濃度變化之結果

5-2 溫度變化

掩埋場中溫度的高低，主要受各種熱源之消長而變化，其熱源包括有機物分解或燃燒，及來自於太陽輻射，一般而言，影響掩埋場產氣之熱源以掩埋垃圾所產生之熱為主，垃圾所產生之熱源消散緩慢，使得掩埋場內部溫度可達 40 以上。

本試驗分別以 20 及 30 作溫度變化測試，由結果(圖 6)發現，溫度較低時其甲烷氧化速率較慢，當控制溫度為 20 時，需要約 25 天甲烷氧化率才可達到 98~99%，而溫度為 30 時，則只需 21 天甲烷氧化率就可達到 99%，推測其原因可能是因為掩埋場長期處於中高溫狀態，使得掩埋場中幾乎以中高溫菌居多。根據 Börjesson and Svensson⁽¹⁷⁾ 於研究掩埋場甲烷排放量之季節性變化以及日變化，發現其受到甲烷氧化作用的調節而變化，排放量與溫度呈現負相關，高溫時甲烷氧化菌有較高的活性，因此造成甲烷的消耗，使得其淨排放通量減少。且由菌數可知，30 的溫度比較容易適合菌數增長，而 20 卻會稍微延遲菌數生長。

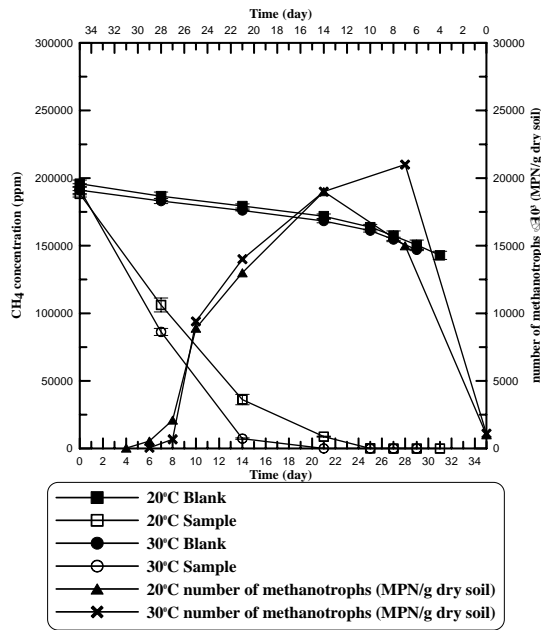


圖 6.溫度變化之結果

5-2 含水率變化之結果

掩埋場垃圾分解屬於固態發酵，而非一般厭氣環境含水率達飽和之情形，其含水率從零到飽和之狀態皆有，因此含水率多寡對微生物生長有絕對之關係，另水分之多寡也會影響有機物之傳輸。

本實驗分別利用含水率為 20%、40%、60% 作為試驗，結果如圖 7 所示，當含水率為 60% 時其甲烷氧化率為最慢，而含水率為 20%、40% 時其甲烷氧化效率相近，但仍以含水率為 20% 時最快，其甲烷氧化率在 21 天時約為 97~99%。甲烷氧化菌生長之最適含水率因受土壤質地之不同而不同，但大致上來說，含水率太高或太低都會降低甲烷氧化菌之活性，間接影響了甲烷之氧化率及逸散量。Whalen 等⁽¹⁸⁾指出在 San Francisco 的市立掩埋場的覆土中，其最大的甲烷氧化速率在重量含水量為 11%，而 Bender and Conrad^(15,16)在德國和義大利所取的四種土樣（草原土、耕地土、森林土、稻田土）指出最適甲烷氧化反應的含水量範圍為 20~35%，由此可知其差異性。

6. 菌株接種試驗

當甲烷濃度為 5% 時、溫度為 30 °C、含水率為 20% 時，有較好的甲烷氧化效率。以 5% 甲烷濃度、30 °C 之溫度作為基本條件，加入 5g 土壤與 44 mL 液體培養基的血清瓶，植入事先培養於 NB 液體培養基中 2~3 天之菌種，分別取 1mL 之菌液加入 44 mL 液體培養基中，並以 MPN 法計數甲烷氧化菌數，並以含

滅菌土組做為空白組。

由圖 8 可知，接種 SD1 及 SC2 培養至第 13 天其甲烷氧化率可達 99%，其他五株菌皆在第 10 天就可達甲烷氧化率 99%，且 SA6 氧化最快。與不加菌株和含未滅菌土狀態的對照組比較，含未滅菌土組需 15 天才可達甲烷氧化率 99% 以上。

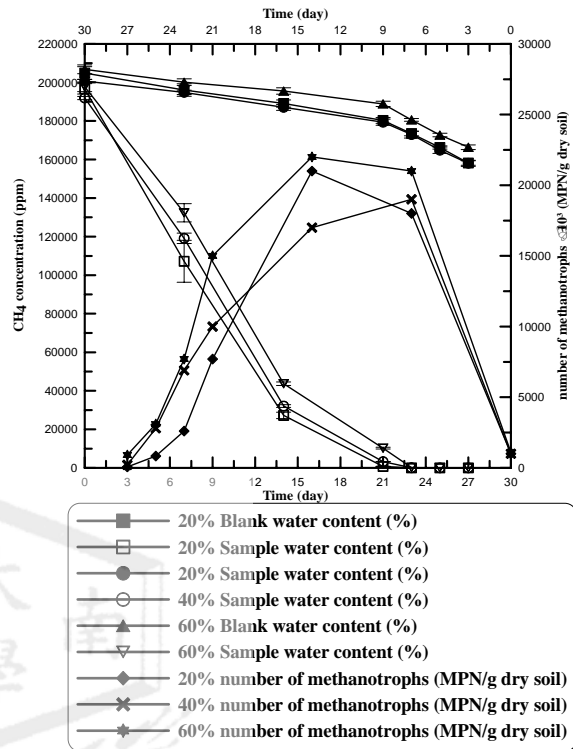


圖 7. 含水率變化之結果

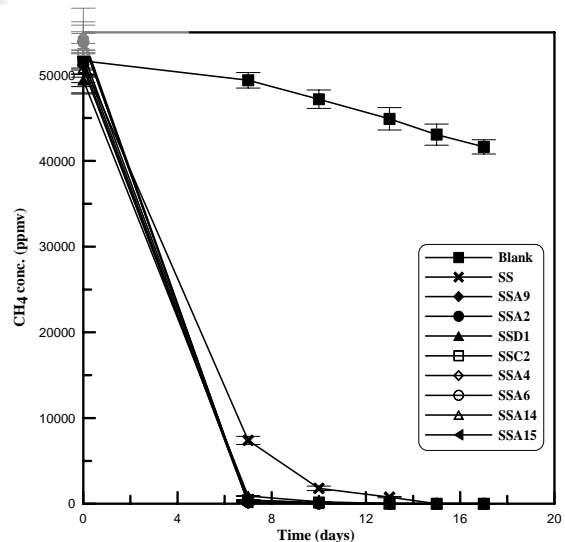


圖 8. 控制因子添加菌數試驗結果

五、參考文獻

1. 陳永和，八十七年版環境白皮書。行政院環保署。台北，1998。
2. Segers, R. 1998. Methane production and methane consumption: a review of processes underlying wetland methane fluxes. *Biogeochemistry* 41: 23-51.

3. Shipham, M., K. Bartlett, P. Crill, R. Harris, and D. Blaha. 1998. Atmospheric methane measurements in central New England : an analysis of the long term trend and the seasonal and diurnal cycles. *J. Geophysical Research* 103 : 10621-10630.
4. Thorneloe, S. A., M. A. Baralaz, R. Peer, L. C. Huff, L. Devis and J. Mangino. 1993. Waste management. *In Atmospheric Methane Sources, Sinks and Role in Global Change*, Khalil M.A.K. (ed.), NATO, ASI series, 13, 360-398, Springer-Verlag, Berlin, Heildeberg, Germany.
5. 劉瑞美。2004。農(工)業生產及廢棄物處理溫室氣體排放現況、減量潛力及減量成本分析評估--台灣南部二處垃圾掩埋場之溫室氣體排放現況。國科會/環保署研究計畫成果報告。嘉南藥理科技大學，台南，台灣。
6. Whalen, S. C., W. S. Reeburgh and K. A. Sandbeck. 1990. Rapid methane oxidation in a landfill cover soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 3405-3411.
7. Hegde, U., T. C., Chang and S. S. Yang. 2003. Methane and carbon dioxide emissions from Shan-Chu-Ku landfill site in northern Taiwan, *Chemosphere*, 52,1275-1285.
8. Horz, H.P., A.S. Raghubanshi, J. Heyer, C. Kammann and R. Conrad. 2002. Activity and community structure of methane-oxidising bacteria in a wet meadow soil. *FEMS Microbiol. Ecol.* 41:247-257.
9. Hanson, R.S., and T.E. Hanson. 1996. Methanotrophic bacteria. *Microbiological Reviews.* 60: 439-455.
10. Watanabe, I., T., Hashimoto, and A. Shimoyama. 1997. Methane-oxidizing activities and methanotrophic populations associated with wetland rice plants. *Biology and Fertility of Soil* 24: 261-265.
11. Brusseau, G.A., H.C. Tsien, R.S. Hanson, and L.P. Wackett. 1990. Optimization of trichloroethylene oxidation by methanotrophs and use of an colorimetric assay to detect soluble methane monooxygenase activity. *Biodegradation.* 1:19-29.
12. Richard, S.H. and T.E. Hanson. 1996. Methylophilic Bacteria. *Microbiol. Rev.* 60: 439-471.
13. Semrau, J. D., A. Chistoserdov, J. Lebron, A. Costello, J. Davagnino, E. Kenna, A.J. Holmes, R. Finch, J.C. Murrell, and M.E. Lidstrom. 1995. Particulate methane monooxygenase genes in methanotrophs. *J. Bacteriol.* 177: 3071-3079.
14. Kightley, D., D.B. Nedwell, and M. Cooper. 1995. Capacity for methane oxidation in landfill cover soils measured in laboratory-scale soil microcosms. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 592-601.
15. Bender, M. and R. Conrad. 1994. Methane oxidation activity in various soils and freshwater sediment, occurrence characteristic vertical profiles and distribution on grain size fractions. *J. Geophys. Res.* 99:16531-16540.
16. Bender, M. and R. Conrad. 1995. Effect of CH₄ concentrations and soil conditions on the induction of CH₄ oxidation activity. *Soil Biol. Biochem.* 27:1517-1527.
17. Börjesson, G. and Svensson, B.H. 1997. Seasonal and diurnal methane emission from a landfill and their regulation by methane oxidation. *Waste Management&Research* 15: 33-54.
18. Whalen, S.C., W.S. Reeburch, and K.A. Sandbeck. 1990. Rapid methane oxidation in a landfill cover soil. *American Society for Microbiology* 56:3404-3411.

