

学校编码：10384

分类号_____密级_____

学号：21620120153782

UDC __

厦 门 大 学

博 士 学 位 论 文

几种能源作物和能源微藻与微生物的生态关系研究

Ecological relationship between biofuel-producing crops,

microalgae and the corresponding microorganisms

陈章然

指导教师姓名：郑天凌 教授

Prof. James M. Tiedje

专 业 名 称：水生生物学

论文提交日期：2016年10月

论文答辩时间：2016年11月

学位授予日期：

答辩委员会主席：_____

评 阅 人：_____

2016年12月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下，独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果，均在文中以适当方式明确标明，并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范（试行）》。

另外，该学位论文为（郑天凌教授和 James M. Tiedje 教授）课题（组）的研究成果，获得（郑天凌教授和 James M. Tiedje 教授）课题（组）经费或实验室的资助，在（郑天凌教授和 James M. Tiedje 教授）实验室完成。（请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称，未有此项声明内容的，可以不作特别声明。）

声明人（签名）：

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，于 2019 年 12 月 30 日解密，解密后适用上述授权。

2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

目录

摘要.....	1
Abstract.....	3
第一章 前言.....	6
1.1 化石能源与生物能源.....	6
1.1.1 传统能源种类.....	6
1.1.2 能源危机与环境问题.....	7
1.1.3 生物能源种类及其研究现状.....	8
1.1.4 生物能源原料.....	11
1.2 能源作物与边际土地.....	13
1.2.1 能源作物种植所面临的问题.....	13
1.2.2 边际土地的定义.....	13
1.2.3 土地所有者对边际土地的态度.....	14
1.2.4 关于边际土地使用的考虑.....	15
1.3 能源作物-边际土壤-微生物之间的关系.....	16
1.3.1 能源作物与土壤微生物的相互关系.....	16
1.3.2 影响土壤微生物群落分布的因素.....	17
1.4 能源微藻的菌藻关系研究.....	20
1.4.1 溶藻微生物.....	20
1.4.2 细菌促进藻的生长.....	22
1.4.3 细菌对藻的絮凝.....	23
1.5 微生物群落分析.....	23
1.5.1 测序技术的发展.....	23
1.5.2 基于靶定基因的土壤微生物宏基因组分析.....	24
1.6 本论文的研究目的和内容.....	29
第一部分(第 2-5 章) 边际土地能源作物种植对土壤微生物群落分布的影响.....	31
第二章 边际土地不同能源作物种植系统下的土壤细菌群落分布.....	31
2.1 前言.....	31

2.2 材料与方法	32
2.2.1 边际土地位点分布及历史耕种介绍.....	32
2.2.2 边际土地样品采集.....	34
2.2.3 边际土地土壤理化参数及作物产量测定.....	35
2.2.4 边际土地土壤总 DNA 提取、DNA 质量验证及 Miseq 测序.....	36
2.2.5 细菌 16S V4 区序列处理.....	37
2.2.6 数据挖掘及统计分析.....	37
2.3 结果	38
2.3.1 边际土地土壤理化参数.....	38
2.3.2 序列处理结果统计.....	40
2.3.3 作物产量及收获时的土壤湿度.....	41
2.3.4 基于细菌 OTU 的韦恩图分析.....	42
2.3.5 细菌多样性分析.....	44
2.3.6 细菌群落结构随环境参数梯度的变化.....	48
2.3.7 细菌群落结构组成差异.....	50
2.3.8 细菌群落组成.....	59
2.4 讨论	76
2.4.1 边际土地位点对细菌群落结构的影响.....	77
2.4.2 边际土地土壤深度对细菌群落结构的影响.....	79
2.4.3 边际土地作物种植对细菌群落结构的影响.....	81
2.4.4 不同边际土地位点及深度间的细菌群落组成差异.....	83
2.5 小结	87
第三章 边际土地不同能源作物种植系统下土壤细菌的网络结构分析	88
3.1 前言	88
3.2 材料与方法	89
3.2.1 数据准备.....	89
3.2.2 网络图分析.....	89
3.3 结果	92
3.3.1 总体位点网络图的比较.....	92
3.3.2 不同作物不同深度下网络图的比较.....	95
3.3.3 不同作物不同深度下 nodes 及 links 的比较.....	97
3.3.4 Nodes 和 links 数与多样性指数的关系.....	98
3.3.5 不同作物不同深度下的关键 taxa 比较.....	100
3.4 讨论	104

3.5 小结.....	106
第四章 边际土地不同能源作物种植系统下的土壤真菌群落分布 ...	107
4.1 前言.....	107
4.2 材料与方法.....	108
4.2.1 边际土地位点分布及历史耕种介绍.....	108
4.2.2 边际土地样品采集.....	108
4.2.3 边际土地土壤理化参数及作物产量测定.....	108
4.2.4 边际土地土壤总 DNA 提取、DNA 质量验证及 Miseq 测序.....	108
4.2.5 真菌 ITS2 序列处理及统计分析.....	109
4.3 结果.....	109
4.3.1 序列处理结果统计.....	109
4.3.2 基于 OTU 的韦恩图分析.....	110
4.3.3 真菌多样性分析.....	112
4.3.4 真菌群落结构随环境参数梯度的变化.....	115
4.3.5 真菌群落结构组成差异.....	119
4.3.6 真菌群落组成.....	128
4.4 讨论.....	144
4.4.1 位点的影响.....	145
4.4.2 深度的影响.....	146
4.4.3 作物的影响.....	147
4.4.4 真菌的群落组成.....	148
4.5 小结.....	152
第五章 边际土地不同能源作物种植系统下土壤真菌的网络结构分析	154
.....	154
5.1 前言.....	154
5.2 材料与方法.....	155
5.2.1 数据准备.....	155
5.2.2 网络图分析.....	155
5.3 结果.....	155
5.3.1 总体位点网络图的比较.....	155
5.3.2 不同位点不同深度下的网络图比较.....	157
5.4 讨论.....	171

5.5 小结.....	174
参考文献.....	175
第二部分(第 6-9 章) 海洋能源微藻与微生物的生态关系研究.....	190
第六章 一种对能源微藻自养小球藻具有裂解功能的原生动	
<i>Pseudobodo.sp</i> 的发现.....	190
6.1 前言.....	190
6.2 材料与方法.....	191
6.2.1 藻种与培养条件.....	191
6.2.2 自养小球藻杀藻微生物的分离.....	191
6.2.3 杀藻微生物的大小分析.....	192
6.2.4 裂解液总 DNA 的提取.....	192
6.2.5 PCR 及系统发育树构建分析.....	193
6.2.6 杀藻微生物对自养小球藻的杀藻活性.....	193
6.2.7 扫描电镜观察.....	194
6.2.8 溶藻微生物的杀藻谱分析.....	194
6.2.9 理化参数对溶藻微生物溶藻活性的影响.....	194
6.3 结果.....	195
6.3.1 溶藻微生物的分离.....	195
6.3.2 溶藻微生物的大小及溶藻方式.....	195
6.3.3 裂解液对自养小球藻的杀藻活性.....	196
6.3.4 杀藻微生物的分子特征.....	197
6.3.5 杀藻微生物的形态特征.....	198
6.3.6 <i>Pseudobodo sp.</i> KD51 的杀藻谱.....	199
6.3.7 理化参数对杀藻微生物杀藻活性的影响.....	200
6.4 讨论.....	201
6.5 小结.....	204
参考文献.....	205
第七章 一株对能源微藻三角褐指藻具有裂解功能细菌的发现与分离	
.....	210
7.1 前言.....	210
7.2 材料与方法.....	211

7.2.1 藻种与生长条件.....	211
7.2.2 特殊空斑微生物的分离.....	211
7.2.3 裂解微生物的大小分析.....	212
7.2.4 抗生素测试.....	212
7.2.5 杀藻过程中三角褐指藻及细菌的动态过程计数.....	213
7.2.6 杀藻过程中样品的 DGGE 分析.....	213
7.2.7 分离和培养裂解性细菌.....	214
7.2.8 对裂解微生物的分子鉴定.....	215
7.3 结果.....	215
7.3.1 空斑纯化.....	215
7.3.2 空斑形成微生物的大小及其杀藻方式.....	216
7.3.3 裂解微生物的抗生素敏感性.....	217
7.3.4 PtV1 裂解液感染三角褐指藻后的数量动态变化.....	218
7.3.5 感染过程中的 DGGE 分析.....	219
7.3.6 空斑形成菌的鉴定.....	220
7.4 讨论.....	222
7.4.1 三角褐指藻空斑微生物的发现.....	222
7.4.2 空斑形成微生物的尺寸和性质.....	223
7.4.3 在感染过程中探究微生物的分子信息.....	223
7.4.4 空斑微生物的特殊营养需求和潜在用途.....	224
7.5 小结.....	224
参考文献.....	225
第八章 <i>Labrenzia</i> 属细菌对三角褐指藻的裂解性及趋化性特点.....	230
8.1 前言.....	230
8.2 材料与方法.....	231
8.2.1 藻种与细菌的准备.....	231
8.2.2 KD531 裂解液杀藻活性的稳定性测试.....	231
8.2.3 细菌 KD531 的杀藻谱范围探讨.....	232
8.2.4 不同空斑区域的扫描电镜与透射电镜观察.....	232
8.2.5 KD531 细菌对三角褐指藻生物量的影响.....	233
8.2.6 KD531 细菌对三角褐指藻营养的趋化性特点研究.....	234
8.3 实验结果.....	234
8.3.1 温度对 KD531 裂解液的杀藻活性的影响.....	234
8.3.2 光照及 pH 对 KD531 裂解液的杀藻活性的影响.....	235
8.3.3 KD531 裂解液的杀藻谱.....	236
8.3.4 空斑不同区域的电镜观察.....	238

8.3.5 KD531 裂解液对三角褐指藻生物量的影响.....	240
8.3.6 KD531 菌的趋化特点.....	241
8.4 讨论.....	242
8.5 小结.....	244
参考文献.....	244
第九章 一株分离自三角褐指藻 <i>Phaeodactylum tricornutum</i> 藻液的新	
属细菌的鉴定	248
9.1 前言.....	248
9.2 材料与方法.....	248
9.2.1 菌株及培养条件准备.....	248
9.2.2 表型特征观察.....	249
9.2.3 脂肪酸及醌的测定.....	249
9.2.4 系统进化树的构建及 G+C 含量的测定.....	250
9.3 结果.....	250
9.3.1 表型特征.....	250
9.3.2 化学分类学特点.....	255
9.3.3 分子特征分析.....	257
9.3.4 对 <i>Phaeodactylibacter</i> gen. nov. 的描述.....	258
9.3.5 对 <i>Phaeodactylibacter xiamenensis</i> sp. nov 的描述.....	259
9.4 小结.....	260
参考文献.....	261
第十章 结论与展望	263
10.1 结论.....	263
10.2 创新点.....	264
10.3 展望.....	265
附录一 附录图和表.....	267
附录二 缩写词列表.....	274

附录三 参与的科研课题、发表及待发表学术论文、专利、国内外会议及获奖.....	277
1. 参与的科研课题.....	277
2. 发表与待发表论文.....	277
3. 专利申请.....	279
4. 参加国内外学术会议.....	279
5. 获奖情况.....	280
致谢.....	281

Table of contents

Chinese abstract	1
English abstract	3
Chapter 1 Introduction	6
1.1 Fossil fuels and Biofuels	6
1.1.1 Traditional fuel	6
1.1.2 Energy crisis and Environmental issue	7
1.1.3 Biofuels and Research status	8
1.1.4 Biofuel feedstock	11
1.2 Biofuel crops and marginal land	13
1.2.1 Problems caused biofuel crops	13
1.2.2 Definition of marginal land	13
1.2.3 Landowners' attitude toward marginal land	14
1.2.4 Consideration of use of marginal land	15
1.3 The biofuel crops-marginal soil-soil microbe relationship	16
1.3.1 Interrelation between biofuel crops and soil microbe	16
1.3.2 The factor that influence the distribution of soil microbe	17
1.4 The relationship between microalgae and bacteria	20
1.4.1 Algicidal microbe	20
1.4.2 The beneficial effect from bacteria	22
1.4.3 The flocculation of microalgae by bacteria	23
1.5 Microbial community structure analysis	23
1.5.1 Development of sequencing technique	23
1.5.2 Gene-targeted metagenome analysis of soil microbe	24
1.6 Objective and content	29
Part 1(Chapter 2-5) Microbial distribution under biofuel plants grown in marginal soil	31
Chapter 2 Biofuel crops' influence on bacteria spacial distribution in marginal land	31
2.1 Introduction	31
2.2 Materials and methods	32
2.2.1 Marginal sites and historical crop cultivation	32
2.2.2 Sampling	34
2.2.3 Soil physicochemical properties and crop yield	35
2.2.4 DNA extraction and Miseq sequencing	36
2.2.5 Sequence process	37

2.2.6 Data mining and statistic analysis	37
2.3 Results	38
2.3.1 Soil properties	38
2.3.2 Sequence statistics	40
2.3.3 Harvest yield and soil humidity	41
2.3.4 Venn diagram based on OTU	42
2.3.5 Bacterial diversity	44
2.3.6 Bacterial community structure along with environmental gradient.....	48
2.3.7 Ordination analysis of bacterial community	50
2.3.8 Bacterial composition	59
2.4 Discussion	76
2.4.1 Influence of location on bacterial community	77
2.4.2 Influence of depth on bacterial community	79
2.4.3 Influence of crops on bacterial community	81
2.4.4 Comparison of bacterial community among location and depth	83
2.5 Summary	87
Chapter 3 The bacterial network analysis under different biofuel crops	
in marginal land	88
3.1 Introduction	88
3.2 Materials and methods	89
3.2.1 Data preparation	89
3.2.2 Network analysis.....	89
3.3 Results	92
3.3.1 General comparison of bacterial network	92
3.3.2 Comparison of network under different depth and crop	95
3.3.3 Comparison of nodes and links under different depth and crop	97
3.3.4 The correlation between links/nodes and diversity index.....	98
3.3.5 Keystone taxa comparison among varied crops and depth.....	100
3.4 Discussion	104
3.5 Summary	106
Chapter 4 Biofuel crops' influence on fungal spacial distribution in	
marginal land	107
4.1 Introduction	107
4.2 Materials and methods	108
4.2.1 Historical crop.....	108
4.2.2 Sampling	108
4.2.3 Soil properties and crop yield	108
4.2.4 DNA extraction and Miseq sequencing	108
4.2.5 Data mining and data analysis	109
4.3 Results	109

4.3.1 Sequence statistics	109
4.3.2 Venn giagram based on fungal OTU	110
4.3.3 Fungal diversity	112
4.3.4 Fungal community structure along with environmental gradient	115
4.3.5 Ordination analysis of fungal community.....	119
4.3.6 Fungal composition.....	128
4.4 Discussion.....	144
4.4.1 Influence of location on fungal community.....	145
4.4.2 Influence of depth on fungal community.....	146
4.4.3 Influence of crop on fungal community.....	147
4.4.4 Fungal composition.....	148
4.5 Summary.....	152
Chapter 5 The fungal network analysis under different biofuel crops	
in marginal land	154
5.1 Introduction.....	154
5.2 Materials and methods	155
5.2.1 Data preparation.....	155
5.2.2 Fungal network analysis	155
5.3 Results	155
5.3.1 General comparison of fungal network.....	155
5.3.2 Fungal network comparison under different crop and depth	157
5.4 Discussion.....	171
5.5 Summary.....	174
Reference.....	175
Part 2 (Chapter 6-9) The ecological relationship between marine	
biofuel-producing microalgae and microorganism.....	190
Chapter 6 First report of <i>Pseudobodo</i> sp, a new pathogen for a	
potential energy-producing algae: <i>Chlorella vulgaris</i> cultures.....	190
6.1 Introduction.....	190
6.2 Material and methods.....	191
6.2.1 Algal cultures and growth conditon	191
6.2.2 Isolation of a predatory microbes	191
6.2.3 Pathogen size	192
6.2.4 DNA extraction	192
6.2.5 PCR and phylogenetic tree constrcution.....	193
6.2.6 Impact and predatory activity of lysate on <i>C.vulgaris</i> cultures	193
6.2.7 Electron microscopy	194
6.2.8 Predation range of <i>Pseudobodo</i> sp.KD51	194

6.2.9 Stability of predatory activity	194
6.3 Results	195
6.3.1 Isolation of the predatory pathogen	195
6.3.2 Size of the pathogen and its alga-lytic mode	195
6.3.3 The predatory effect of lysate on <i>C.vulgaris</i> cultures	196
6.3.4 Molecular data concerning the pathogen	197
6.3.5 Morphology.....	198
6.3.6 Predatory range of <i>Pseudobodo</i> sp. KD51	199
6.3.7 Stability of predatory activity	200
6.4 Discussion	201
6.5 Summary	204
Reference	205
Chapter 7 A lytic bacterium's potential application in biofuel production through directly lysing the diatom <i>Phaeodactylum tricornutum</i> cell	210
7.1 Introduction	210
7.2 Materials and methods	211
7.2.1 Algal cultures and growth conditions	211
7.2.2 Discovery of the special plaque-forming microorganism	211
7.2.3 The lytic microbe size	212
7.2.4 Antibiotic tests	212
7.2.5 The dynamics of bacterial and <i>P.tricornutum</i> cell	213
7.2.6 PCR and Denaturing gradient gel electrophoresis	213
7.2.7 Isolation and cultivation of lytic bacteria.....	214
7.2.8 DNA extraction,PCR and phylogeny construction	215
7.3 Results	215
7.3.1 Purification of the plaque.....	215
7.3.2 Size of the plaque-forming microorganism and its alga-lytic mode... ..	216
7.3.3 Antibiotic tests	217
7.3.4 The dynamics of <i>P.tricornutum</i> and bacterial counts during the infection proces	218
7.3.5 DGGE analysis during the infection process	219
7.3.6 Identification of the plaque-forming bacteria	220
7.4. Discussion	222
7.4.1 Discovery of the plaque-forming microbes towards <i>P.tricornutum</i>	223
7.4.2 The size and property of the plaque-forming microbes	223
7.4.3 Efforts to trace the molecular information of the microbe during the infection process	223
7.4.4 The special nutritional requirement and potential use of the plaque-forming microbe.....	224
7.5 Summary	224

Reference.....	225
Chapter 8 Lytic and chemotaxis features of a plaque-forming bacterium KD531 on <i>Phaeodactylum tricornutum</i>	230
8.1 Introduction	230
8.2 Materials and methods	231
8.2.1 Algal cultures and lytic bacteria.....	231
8.2.2 Stability of algicidal activity of KD531-lysate	231
8.2.3 Assay of the algicidal effect of lysate on other algal species.....	232
8.2.4 Microscopic observation	232
8.2.5 Effects of KD531-lysate on <i>P.tricornutum</i> biomass.....	233
8.2.6 Chemotaxis effect of KD531-lysate on <i>P.tricornutum</i> nutrition.....	234
8.3 Results	234
8.3.1 KD531-lysate sensitivity to temperature and effect of incubating temperature on algicidal activity of KD531-lysate on <i>P.tricornutum</i>	234
8.3.2 Effect of light and pH on the lytic capability of the KD531-lysate	236
8.3.3 Effect of KD531-lysate on the growth of other algal species	237
8.3.4 SEM and TEM observation on different parts of plaques	238
8.3.5 Influence of KD531-lysate on <i>P.tricornutum</i>	240
8.3.6 Chemotaxis capabilities of KD531	241
8.4 Discussion	242
8.5 Summary	244
Reference.....	244
Chapter 9 <i>Phaeodactylibacter xiamenensis</i> gen. nov., sp. nov., a member of the family <i>Saprospiraceae</i> isolated from the marine algae <i>Phaeodactylum tricornutum</i>	248
9.1 Introduction	248
9.2 Materials and methods	248
9.2.1 Strain and culture condition	248
9.2.2 Phenotype features	249
9.2.3 Biochemistry features	249
9.2.4 Phylogentic analysis.....	250
9.3 Results	250
9.3.1 Phenotype.....	250
9.3.2 Chemotaxonomy	255
9.3.3 Phylogentic tree	257
9.3.4 Description of <i>Phaeodactylibacter</i> gen. nov.....	258
9.3.5 Description of <i>Phaeodactylibacter xiamenensis</i> sp. nov	259
9.4 Summary	260
Reference.....	261

Chapter 10 Conclusion and prospect	263
10.1 Conclusion	263
10.2 Innovation point	264
10.3 Prospect	265
Appendix 1 Appendix Figure and Table	267
Appendix 2 Abbreviations list	274
Appendix 3 Research project, published or to be published papers, patents, academic conference and awards	277
1. Research project.....	277
2. Published or to be published papers.....	277
3. Patents	279
4. Academic conference	279
5. Awards.....	280
Acknowledgements	281

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士学位论文摘要库