

我国热带典型海草床潜在致病菌群落结构及其毒力 基因丰度的空间特征

邓益琴¹, 刘松林², 冯娟¹, 江志坚²

(1. 中国水产科学研究院南海水产研究所/广东省渔业生态环境重点实验室/农业农村部南海渔业资源开发利用重点实验室, 广东广州 510300; 2. 中国科学院南海海洋研究所热带海洋生物资源与生态重点实验室, 广东广州 510301)

摘要: 该研究利用 16S rRNA 扩增子测序技术分析了中国热带(新村、黎安、潭门)典型海草床水体潜在致病菌的群落结构, 通过选择性培养基分析可培养弧菌和肠球菌的丰度, 进一步利用定量 PCR 分析弧菌 (*Vibrio*) 和肠球菌 (*Enterococcus*) 典型毒力基因含量。结果发现, 新村、黎安海草床水体潜在致病菌与潭门有显著差异; 可培养弧菌和肠球菌及其典型毒力基因 *vhh*、*toxR*、*aspA*、*esp* 和 *gelE* 均呈现新村>黎安>潭门的趋势, 而弧菌典型毒力基因 *ctxA*、*tlh*、*trh* 和 *vvp* 呈现黎安>新村>潭门的趋势。新村和黎安较高的人类活动强度如营养负荷, 可能是导致其海草床致病菌和毒力基因丰度较高的重要原因, 而新村和黎安的差异可能与不同的人类活动方式有关。

关键词: 海草床; 潜在致病菌; 弧菌; 肠球菌; 典型毒力基因

中图分类号: Q 89

文献标志码: A

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



Spatial characteristics of potential pathogenic bacteria community structure and their virulence gene abundance in typical tropical seagrass meadows of China

DENG Yiqin¹, LIU Songlin², FENG Juan¹, JIANG Zhijian²

(1. South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences/Guangdong Provincial Key Laboratory of Fishery Ecology and Environment/Key Laboratory of South China Sea Fishery Resources Exploitation & Utilization, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Guangzhou 510300, China; 2. South China Sea Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences/Key Laboratory of Tropical Marine Bio-resources and Ecology, Guangzhou 510301, China)

Abstract: In this study, 16S rRNA gene sequencing was used to analyze the community structure of potential pathogenic bacteria in the typical tropical (Xincun, Li'an, Tanmen) seagrass meadows of the South China Sea. The abundances of *Vibrio* and *Enterococcus* were counted by selective medium analysis, and their typical virulence genes abundances were quantified by quantitative PCR. The results show that the putative bacterial pathogens in Xincun and Li'an clustered and then separated from those of Tanmen. Abundances of cultured *Vibrio* and *Enterococcus*, and the typical virulence genes contents of *vhh*, *toxR*, *aspA*, *esp*, and *gelE* followed a descending order of Xincun>Li'an>Tanmen, while the contents of *Vibrio* typical virulence genes of *ctxA*, *tlh*, *trh*, and *vvp* followed a

收稿日期: 2020-04-07; 修回日期: 2020-05-08

资助项目: 国家自然科学基金项目(31902415, 41806147); 广东省自然科学基金项目(2019A1515011833); 中国水产科学研究院南海水产研究所中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金资助(2019TS04); 中国水产科学研究院基本科研业务费专项资金(2019ZD0707); 广东省渔业生态环境重点实验室开放基金(FEEL-2017-5)

作者简介: 邓益琴(1990—), 女, 博士, 助理研究员, 从事鱼类细菌病及防治技术研究。E-mail: yiqindd@126.com

通信作者: 冯娟(1973—), 女, 博士, 研究员, 从事鱼类细菌病及防治技术研究。E-mail: jannyfeng@163.com

descending order of Tanmen>Xincun>Li'an. Higher intensity human activities, such as nutrient load, probably are responsible for the higher abundance of pathogens and virulence genes of seagrass meadows in Xincun and Li'an, while the differences between Xincun and Li'an may be attributed to different types of human activities.

Key words: Seagrass meadow; Potential pathogens; *Vibrio*; *Enterococcus*; Typical virulence gene

海草床生态系统是近岸海域生产力极高的生态系统,虽然仅占全球海洋面积的0.2%,但却贡献了全球海洋1%的净初级生产力^[1]。海草床是许多经济鱼类和无脊椎动物的重要育幼场所,比沿岸其他生境具有更高的水生动物幼体生物量和密度^[2]。此外,全球50%的人口都居住在距离海洋100 km范围内^[3]。近年来,海草床能够清除水体潜在致病菌,从而降低水生动物及人类患病风险的能力被逐渐认识^[4-5]。研究表明,沿岸海草床生态系统能够使水体潜在致病菌的生物量下降50%,并使人类和水生动物患病风险下降超过一半^[4]。因此,海草床作为沿岸海域潜在致病菌的重要屏障,与水生动物和人类健康密切相关。

潜在致病菌的生物量及其毒力决定了人类和水生动物的患病风险^[6-7],并常作为生态健康的重要指标。潜在的海洋致病菌广泛存在于沿岸生境水体,常见的主要有肠球菌(*Enterococcus*)、弧菌(*Vibrio*)、气单胞菌(*Aeromonas*)、希瓦氏菌(*Shewanella*)、爱德华氏菌(*Edwardsiella*)、沙门氏菌(*Salmonella*)、弯曲杆菌(*Campylobacter*)和耶尔森氏菌(*Yersinia*)等^[8-10]。沉积物和近岸沙滩是水体潜在致病菌的主要来源^[11-12]。同时,人类活动如生活污水排放、农业和畜牧业污水排放和网箱养殖等都会向沿岸海域释放大量的潜在致病菌^[9]。

20世纪以来,受人类活动和气候变化的影响,全球约有30%的海草床生境消失且近几十年消失速度急剧上升,从每年0.9%升至7%,严重削弱了海草床去除水体致病菌的能力^[13]。本研究利用高通量测序技术分析了我我国热带典型海草床生态系统水体的微生物群落结构,并确定其潜在致病菌的结构特征,同时通过选择性培养基分析可培养弧菌和肠球菌的丰度,进一步利用定量PCR分析弧菌和肠球菌典型毒力基因的含量,从而探讨我国热带典型海草床潜在致病菌群落结构及其毒力基因丰度的空间特征,为评估海草床降低人类和水生动物患病风险能力对环境变化的响应提供科技基础,并为海草床的保护提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 研究区域与样品采集

2018年4月,对位于海南岛东海岸线的新村湾(109°59'42"E, 18°24'03"N)、黎安港(110°3'18"E, 18°24'46"N)和潭门港(110°38'22"E, 19°15'04"N)3处热带典型海草床进行实地调查。这3处海草床均以海菖蒲(*Enhalus acoroides*)和泰来草(*Thalassia hemprichii*)混合生长为主。根据前期对这3处海草床的调查,营养盐负荷趋势为新村>黎安>潭门,这主要是因为这些海草床网箱养殖和其他人类活动的强度不同^[14-15]。在每片海草床设置4个海水采样点,相邻2个采样点之间的距离约为1~1.5 km。退潮时在每个取样点采集3 L海水(水深约60 cm),平均分成3份,分别进行下述分析。

1.2 DNA提取,PCR扩增与16S rRNA测序

取1 L海水用无菌过滤泵经0.22 μm聚醚砜膜(Supor-200, Pall)过滤。用CTAB法从滤膜中提取总基因组DNA。用1%琼脂糖凝胶检测DNA浓度和纯度。根据浓度,用无菌水稀释DNA至1 ng·μL⁻¹。扩增16S rRNA基因V3—V4区,用GeneJET™凝胶提取试剂盒(Thermo Scientific, 美国)纯化混合PCR产物。测序文库根据Ion Plus片段文库试剂盒(Thermo Scientific, 美国)的操作说明构建。文库质量通过Qubit@2.0荧光计(Thermo Scientific, 美国)进行评估。最后,扩增子文库在北京诺禾致源生物信息科技有限公司的Ion S5™ XL平台上进行测序,得到400~600 bp的单端reads结果。

1.3 潜在致病菌群落结构分析

将标签和引物序列从单端reads中切断。根据Cutadapt质量控制过程^[16]对原始序列进行质量过滤。然后利用UCHIME算法检测并去除嵌合序列^[17]。使用Uparse软件^[18]将clean序列分为操作分类单元(Operational taxonomic unit, OTU)。根据序列最少的样本,将OTUs丰度均一化。利用Silva数据库,基于Mothur算法对每个OTU的代表序列进行筛选及分类学注释^[19]。在查阅文献的基础上,整理获得属水平人和动物的潜在致病菌。

1.4 可培养弧菌和肠球菌分析

分别用 TCBS 琼脂 (BD, 美国)^[20] 和 Slanetz-Bartley 选择性琼脂 (广东环凯微生物科技有限公司)^[21] 确定海草床水体中可培养弧菌和肠球菌的丰度。将 100 μL 海水直接吸入以上 2 种平板后, 用无菌涂布棒涂布均匀; 同时将 10 和 100 倍稀释后的 100 mL 海水用无菌过滤泵经 0.22 μm 聚醚砜膜 (Supor-200, Pall) 过滤, 并将滤膜放置于以上 2 种平板。TCBS 琼脂平板在 $(28.0 \pm 1.0)^\circ\text{C}$ 下孵育 18~24 h, Slanetz-Bartley 选择性琼脂平板在 $(37.0 \pm 1.0)^\circ\text{C}$ 下孵育 18~24 h, 然后计数。根据不同稀释浓度平板生长情况, 选取合适的稀释倍数, 即每个平板生长克隆数为 30~500 个, 根据稀释倍数计算海草床水体 ($\text{CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$) 中弧菌和肠球菌的丰度。

1.5 弧菌和肠球菌典型毒力基因的定量 PCR 分析

水体 DNA 样品准备同 1.2。根据浓度, 用无

菌水稀释 DNA 至 $10 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 。选取弧菌和肠球菌典型毒力基因 (表 1): *ctxA*、*tlh*、*trh*、*vvp*、*vhh*、*toxR*、*aspA*、*esp* 和 *gelE*。根据基因序列, 利用 primer 5 设计特异性引物。利用 Roche Light-Cycler480 II 实时荧光定量 PCR 仪 (Roche, 德国), 使用 SYBR[®] Premix Ex Taq[™] II (Tli RNaseH Plus) (TaKaRa, 日本) 对水体 DNA 中的各典型毒力基因进行荧光定量分析。以 16S rRNA 基因为内参, 用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算各基因的相对含量。

1.6 统计分析

利用 PRIMER 6 & PERMANOVA+^[22] 软件, 基于各样品中潜在致病菌相对含量得到 Bray-Curtis 距离矩阵。基于 Bray-Curtis 距离矩阵进行初步的单向排列多元方差分析 (PERMANOVA)、主坐标分析 (pCoA) 和相似率分析 (SIMPER), 解析不同海草床水体致病菌群落结构的差异以及差异的

表1 本研究所用引物序列
Table 1 Primer sequences used in this study

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence	基因描述 Gene characterization
16S rRNA-F	TGTGTAGCGGTGAAATGCG	内参
16S rRNA-R	CATCGTTTACGGCGTGGAC	16S核糖体基因
<i>ctxA</i> -F	TTTGTTAGGCACGATGATGGAT	霍乱弧菌
<i>ctxA</i> -R	ACCAGACAATATAGTTTGACCCACTAAG	霍乱毒素A亚基基因
<i>tlh</i> -F	GAAAGCGCCTCAGTTTAAG	副溶血弧菌
<i>tlh</i> -R	ACTCGTTCATCTCAAGCACT	不耐热溶血毒素基因
<i>trh</i> -F	GACTAYTGGACAAACCGAAAC	副溶血弧菌耐热性溶血毒素
<i>trh</i> -R	ACYGTYATATAGGCGCTTAACC	相关的溶血毒素基因
<i>vvp</i> -F	TCTCGGTCTTATGCTTGTGCA	创伤弧菌
<i>vvp</i> -R	TCGGAGACGGACACCATTTC	金属蛋白酶基因
<i>vhh</i> -F	GGGCAGAAAATCCAGACGGC	哈维弧菌
<i>vhh</i> -R	GTAGGAGAAACGGTTATCGGCTGC	溶血毒素基因
<i>toxR</i> -F	CGCCAGCAGTGGAGTTAGAA	溶藻弧菌
<i>toxR</i> -R	TAATGACACGCGTAGCCAG	转录调控因子基因
<i>aspA</i> -F	GAAGGCGGTCAGCTACAGC	弧菌
<i>aspA</i> -R	GTTGTAAACGTAGTTTTTCGCAAACCTTC	碱性丝氨酸蛋白酶基因
<i>esp</i> -F	GCGGGAACAGGTCACAAAGC	肠球菌
<i>esp</i> -R	TTCATCTTTCGCGATTAATTTACTTGAATC	表面蛋白基因
<i>gelE</i> -F	ACACCAACAGGAAAAACGTATGC	肠球菌
<i>gelE</i> -R	TTCATTCAAGGCACCTGATTGTC	明胶酶基因

主要来源。采用 SPSS 19.0 软件对不同海草床水体可培养弧菌和肠球菌数量及其典型毒力基因含量进行单因素方差分析 (One-way ANOVA), $P < 0.05$ 被认为差异显著。

2 结果

2.1 海草床水体潜在致病菌群落结构的特征

16S rRNA 扩增子鉴定得到 19 个对人、鱼、无脊椎动物和哺乳动物等致病的潜在致病菌属, 总潜在致病菌依次占新村、黎安和潭门总细菌群落的 (0.54±0.22)%、(0.44±0.08)% 和 (0.48±0.04)%, 且不同区域之间总潜在致病菌相对丰度无显著差异 (One-way ANOVA, $P > 0.05$, 表 2)。其中丰度前 6 的属为弓形杆菌属 (*Arcobacter*)、拟杆菌属 (*Bacteroides*)、弧菌属、黄杆菌属 (*Tenacibaculum*)、假交替单胞菌属 (*Pseudoalteromonas*) 和肠球菌属,

占总潜在致病菌组成的 81.33%~87.28% (表 2)。PERMANOVA 分析显示, 不同海草床之间潜在致病菌群落结构组成差异显著 [Pseudo- $F=1.9322$, $P(\text{perm})=0.037$]。主成分分析表明, 新村和黎安的潜在致病菌相对聚合, 并通过 PCO1 轴与潭门的潜在致病菌分开 (图 1)。进一步 SIMPER 分析显示, 丰度前 6 的属对不同海草床之间的潜在致病菌群落结构的差异贡献总量超过 50%, 依次为 56.54% (新村 vs 黎安)、66.17% (新村 vs 潭门) 和 67.45% (黎安 vs 潭门) (图 2)。假交替单胞菌属潭门含量显著高于新村和黎安 (One-way ANOVA, $F=8.364$, $P=0.009$)。其他的潜在致病菌属, 尽管不同海草床间相对丰度无显著差异 (One-way ANOVA, 所有 $P > 0.05$), 但弓形杆菌属和黄杆菌属在新村和黎安的平均丰度远大于潭门; 而拟杆菌属在新村和黎安的平均丰度远小于潭门; 3 个海草床水体中弧菌属

表2 属水平海草床水体各潜在致病菌的相对丰度

Table 2 Relative abundance of each potential pathogens of seagrass meadows at genus level

分类系统 Taxonomy	新村 Xincun	黎安 Li'an	潭门 Tanmen	感染有机体 Infection organism	参考文献 References
弓形杆菌属 <i>Arcobacter</i>	22.96±19.39 ^A	11.50±4.78 ^A	2.29±0.36 ^A	人、鱼	[23]
拟杆菌属 <i>Bacteroides</i>	7.26±1.01 ^A	9.02±1.02 ^A	14.37±7.90 ^A	人	[24]
肠球菌属 <i>Enterococcus</i>	2.39±0.37 ^A	2.43±0.40 ^A	2.63±0.44 ^A	人、鱼	[24]
嗜血杆菌属 <i>Haemophilus</i>	1.77±0.51 ^A	1.86±0.21 ^A	2.48±0.21 ^A	人	[24]
弧菌属 <i>Vibrio</i>	7.73±2.59 ^A	5.58±1.21 ^A	6.92±2.06 ^A	人、鱼、无脊椎动物	[25]
黄杆菌属 <i>Tenacibaculum</i>	6.44±3.50 ^A	8.97±3.24 ^A	0.29±0.23 ^A	人、鱼	[26]
假交替单胞菌属 <i>Pseudoalteromonas</i>	0.72±0.46 ^A	0.81±0.20 ^A	12.17±3.91 ^B	无脊椎动物	[27]
链球菌属 <i>Streptococcus</i>	0.67±0.25 ^A	0.95±0.19 ^A	0.76±0.30 ^A	人、鱼	[28]
发光杆菌属 <i>Photobacterium</i>	1.91±1.72 ^A	0.57±0.28 ^A	2.63±1.60 ^A	人、鱼	[29]
芽孢杆菌属 <i>Bacillus</i>	0.14±0.14 ^A	0.00±0.00 ^A	2.00±2.00 ^A	人、鱼、无脊椎动物	[26, 30]
铜绿色假单胞菌属 <i>Pseudomonas</i>	0.10±0.10 ^A	0.91±0.84 ^A	0.00±0.00 ^A	人、鱼、无脊椎动物	[30]
分枝杆菌属 <i>Mycobacterium</i>	0.14±0.14 ^A	0.67±0.61 ^A	0.53±0.26 ^A	人、鱼、哺乳动物	[31]
噬细胞菌属 <i>Cytophaga</i>	1.29±1.29 ^A	0.00±0.00 ^A	0.00±0.00 ^A	无脊椎动物	[32]
盐单胞菌属 <i>Halomonas</i>	0.43±0.25 ^A	0.14±0.14 ^A	0.29±0.12 ^A	人、鱼	[33]
黄杆菌属 <i>Flavobacterium</i>	0.00±0.00 ^A	0.53±0.32 ^A	0.10±0.10 ^A	鱼	[34]
军团菌属 <i>Legionella</i>	0.29±0.17 ^A	0.00±0.00 ^A	0.00±0.00 ^A	人	[35]
弗朗西斯氏菌属 <i>Francisella</i>	0.05±0.05 ^A	0.00±0.00 ^A	0.10±0.10 ^A	人、鱼	[36]
微球菌属 <i>Micrococcus</i>	0.14±0.14 ^A	0.00±0.00 ^A	0.00±0.00 ^A	无脊椎动物	[37]
嗜冷杆菌属 <i>Psychrobacter</i>	0.00±0.00 ^A	0.10±0.10 ^A	0.00±0.00 ^A	人	[38]

注: 单因素方差分析结果, 其中不同的字母 (A, B) 代表差异性显著, 相同的字母代表差异性不显著

Note: The results of One-way ANOVA. Different letters (A, B) indicate significant difference, and the same letters indicate no significant difference.

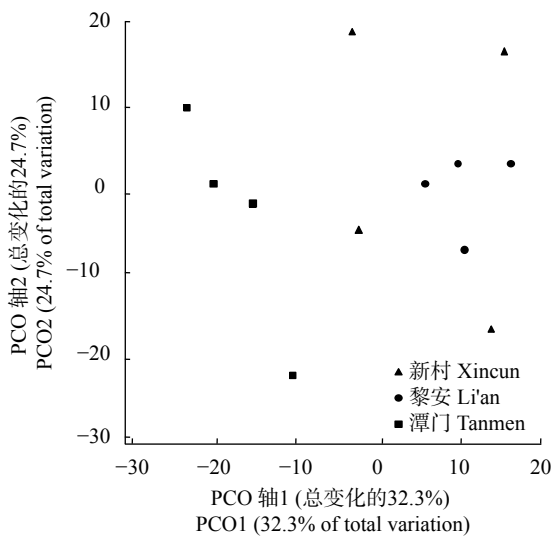


图1 基于Bray-Curtis距离矩阵的潜在致病菌群落的主成分分析

Figure 1 Principal co-ordinates analysis (pCoA) ordination of potential pathogenic microbial community data based on Bray-Curtis distance

和肠球菌属的平均相对丰度差异不明显(表 2)。

2.2 海草床水体可培养弧菌和肠球菌的空间特征

弧菌和肠球菌选择性培养基筛选结果发现:

1) 弧菌在新村、黎安和潭门海草床水体依次为 $(1\ 045 \pm 654)$ CFU·mL⁻¹、 (305 ± 35) CFU·mL⁻¹、 (75 ± 490) CFU·mL⁻¹, 不同海草床间无显著差异 ($P > 0.05$), 但平均值所呈趋势为新村 > 黎安 > 潭门(图 3-a); 2) 肠球菌在新村、黎安和潭门海草床水

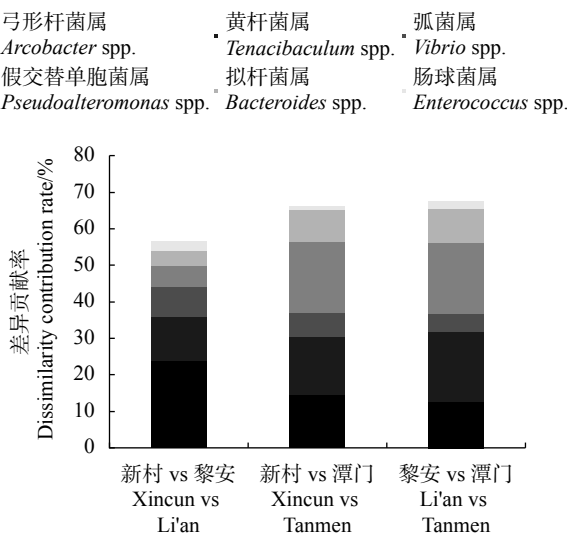


图2 丰度前6的潜在致病菌属对不同海草床水体潜在致病菌群落结构的差异贡献率

Figure 2 Dissimilarity contribution rate of top six potential pathogenic genera to community structure of potential pathogenic bacteria in different seagrass meadows

体含量依次为 (525 ± 492) CFU·mL⁻¹、 (10 ± 6) CFU·mL⁻¹、 (3 ± 3) CFU·mL⁻¹, 不同海草床间无显著差异 ($P > 0.05$), 但平均值呈现趋势为新村 > 黎安 > 潭门(图 3-b)。

2.3 海草床水体典型毒力基因含量的空间特征

定量分析结果表明, 尽管不同海草床间各典型毒力基因含量无显著差异 ($P > 0.05$), 但平均值显示 *ctxA*、*tlh*、*trh* 和 *vvp* 呈现趋势为黎安 > 新村 > 潭门(图 4); *vhh*、*toxR*、*aspA*、*esp* 和 *gelE* 呈现趋势为新村 > 黎安 > 潭门(图 5, 图 6)。

3 讨论

我国热带典型海草床水体中发现并鉴定出 19 个属的潜在致病菌, 少于 Lamb 等^[4]在印度尼西亚斯密蒙德群岛海草水体中鉴定出的 42 个属的潜在致病菌, 但是潜在致病菌总含量 (<1%) 则与 Lamb 等^[4]的结果类似。此外, 不到 1% 的海草床水体潜在致病菌含量远低于相应区域约 24% 的海草床沉积物潜在致病菌含量^[39]。研究表明, 沉积物中的病原菌丰度可高达水体的 100 倍^[40-41], 这表明海草床可能通过捕获水体悬浮颗粒物, 进而将水体中的病原菌沉降到沉积物中^[42]。

尽管潜在致病菌总的相对丰度在不同海草床水体之间无显著差异, 但是其群落结构组成在不同的海草床水体之间差异显著, 并且主坐标分析中 PCO1 轴将新村和黎安与潭门分开。此外, 丰度前 6 的属占总潜在致病菌组成的 80% 以上, 并且对不同海草床之间的潜在致病菌群落结构的差异贡献总量超过 50%。其中弓形杆菌属和黄杆菌属在新村和黎安的平均丰度远大于潭门; 拟杆菌属和假交替单胞菌属在新村和黎安的平均丰度远小于潭门; 而弧菌属和肠球菌属的平均相对丰度在 3 个海草床水体中差异不明显。潜在致病菌生物量在沿岸水体中呈现显著的季节变化^[43], 而影响沿岸海域潜在致病菌季节变化的主要因素为温度、盐度、pH、溶解氧、浑浊度和太阳辐射^[8, 43-44], 例如, 弧菌生物量与温度呈显著正相关^[44]。此外, C、N、P 等营养负荷导致海草床浮游植物、底栖藻类、附生藻类和大型藻类的爆发^[45], 影响潜在致病菌生长或为其中间宿主提供重要食物来源, 从而改变潜在致病菌的生物量。例如, Allison 等^[46]在加拿大东南部沿岸区域研究发现, 在高营养负荷区域的浮游植物、

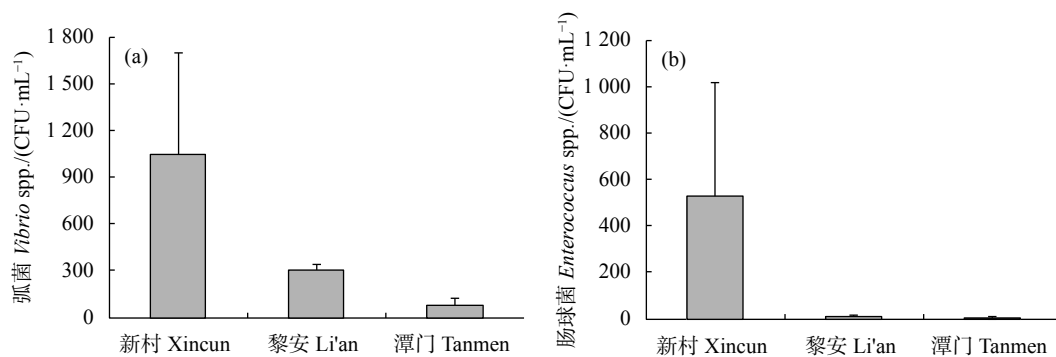


图3 不同海草床水体可培养弧菌(a)和肠球菌(b)丰度

Figure 3 Abundance of *Vibrio* (a) and *Enterococcus* (b) in different seagrass meadows

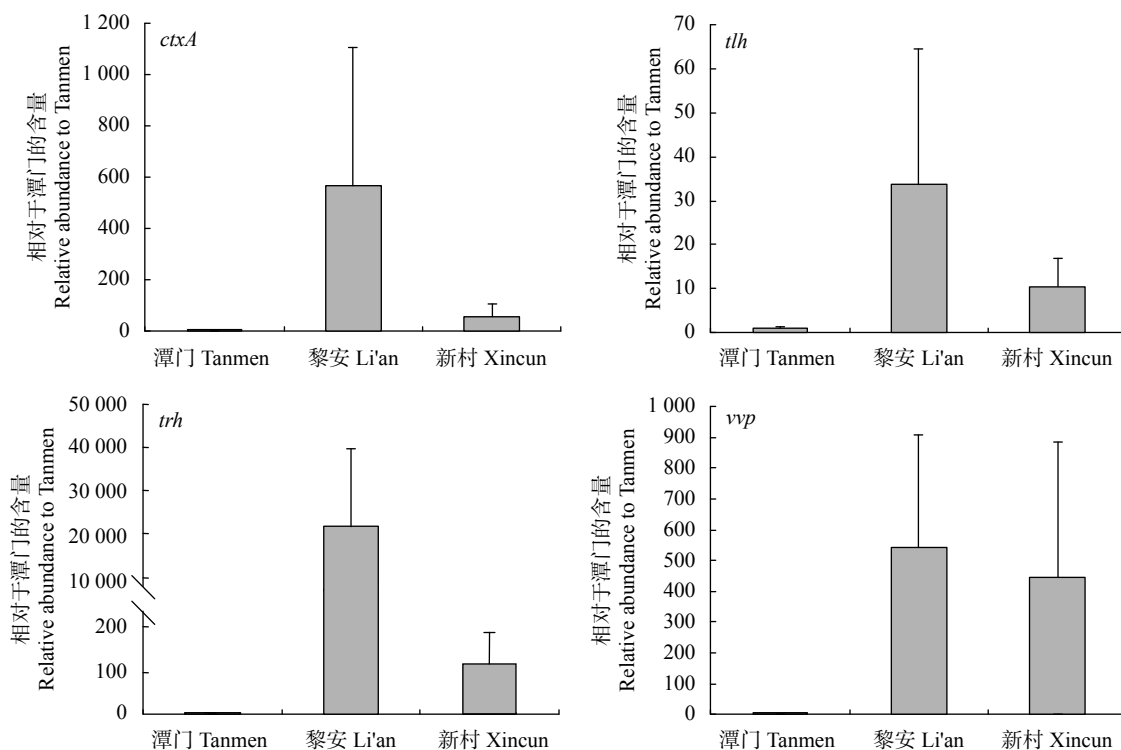


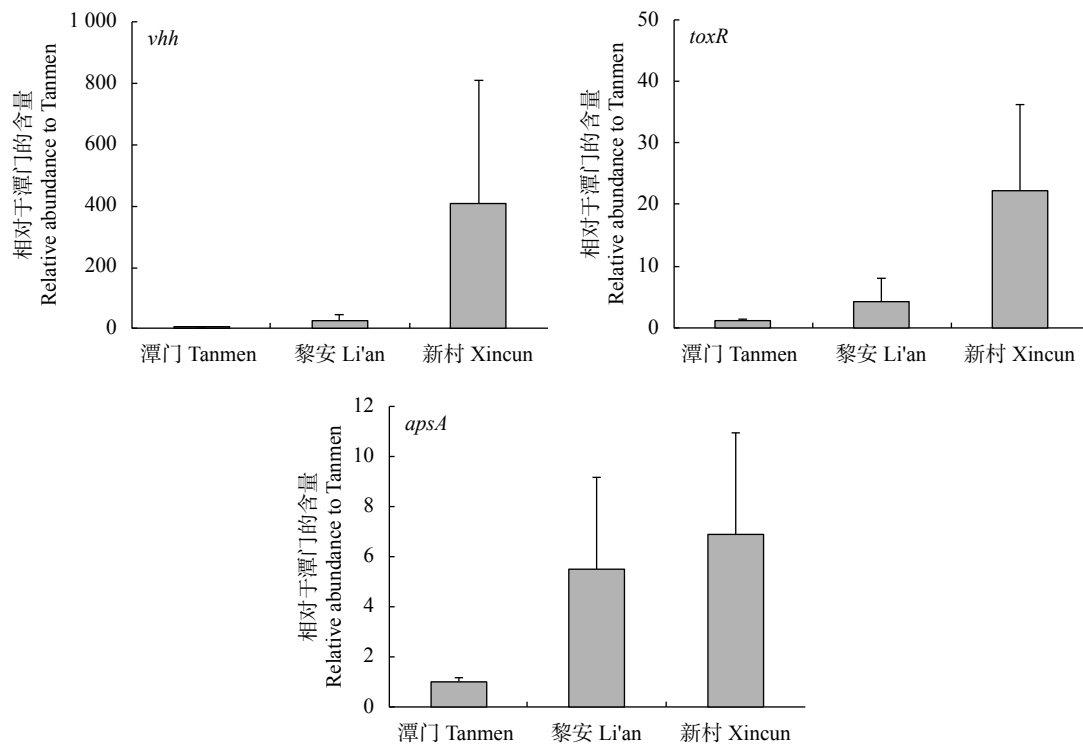
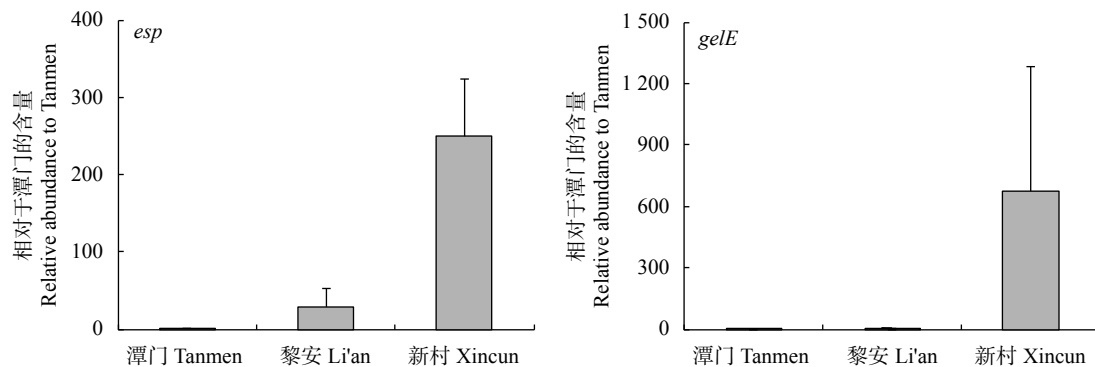
图4 弧菌典型毒力基因 $ctxA$ 、 tlh 、 trh 和 vvp 在不同海草床水体中的相对含量

Figure 4 Relative abundance of *Vibrio* typical virulence genes $ctxA$, tlh , trh and vvp in different seagrass meadows

大型藻类丝藻属 (*Ulothrix speciosa*) 和孔石莼 (*Ulva lactuca*) 生物量分别是低营养负荷区域的 1.8、40 和 670 倍, 而 Michael 等^[47] 研究发现, 底栖微藻表面的微生物是珊瑚礁致病菌的重要来源。因此, 温度、盐度、pH、溶解氧、浑浊度、太阳辐射以及营养负荷的差异可能造成了 3 处海草床区域潜在致病菌的群落结构差异。近封闭式的新村和黎安存在大量的网箱养殖及污水排放等频繁的人为活动, 导致新村和黎安相对高的营养负荷; 相反, 潭门是相对开放式的海湾, 网箱养殖和污水排放较少, 营养负荷相对低^[14-15]。因此, 营养负荷的差异

很可能是造成新村、黎安和潭门潜在致病菌群落结构差异的主要原因。

弧菌被发现广泛分布在海洋环境中, 其中许多种类既是引起海洋生物病害的重要病原菌, 也是造成人类食物中毒和肠道急性传染病等的重要致病菌, 已成为海洋环境中人兽感染的主要风险源^[48]。肠球菌是肠道的常驻菌, 具有极大的酸碱、温度、渗透压和氧气适应范围^[49-50], 是医院获得性继发感染的主要原因^[51]。本研究发现, 尽管弧菌和肠球菌(被培养+未被培养)总平均相对丰度在 3 处海草床水体中差异不明显, 但是被培养的弧菌和肠

图5 弧菌典型毒力基因*vhh*、*toxR*和*aspA*在不同海草床水体中的相对含量Figure 5 Relative abundance of *Vibrio* typical virulence genes *vhh*, *toxR* and *aspA* in different seagrass meadows图6 肠球菌典型毒力基因*esp*和*gelE*在不同海草床水体中的相对含量Figure 6 Relative abundance of *Enterococcus* typical virulence genes *esp* and *gelE* in different seagrass meadows

球菌在新村的含量显著高于黎安和潭门, 并呈现新村>黎安>潭门的趋势。弧菌和肠球菌均被报道在营养负荷增强时显著增加^[52-53]。这是因为营养负荷导致水体中藻类丰度增加, 提高了水体活性有机碳含量, 而作为 r-选择细菌的弧菌和肠球菌能够很好地利用活性有机碳生长繁殖^[45]。例如, 吴建平等^[53]研究发现, 大亚湾网箱养殖区域网箱内的可培养弧菌是网箱外的 4 倍, 是非网箱区域的 11 倍。因此, 弧菌和肠球菌可培养结果进一步表明, 营养负荷的差异是造成新村、黎安和潭门的潜在致病菌群落结构差异的重要原因。

进一步, 与弧菌和肠球菌可培养细菌数量趋势相似, 弧菌典型毒力基因 *vhh* (哈维弧菌)、*toxR* (溶藻弧菌) 和 *aspA* (弧菌) 以及肠球菌典型毒力基因 *esp* 和 *gelE* 的平均含量均呈现新村>黎安>潭门的趋势。值得注意的是, 弧菌典型毒力基因 *ctxA* (霍乱弧菌)、*tlh* (副溶血弧菌)、*trh* (副溶血弧菌) 和 *vvp* (创伤弧菌) 的平均含量呈现黎安>新村>潭门的趋势。溶藻弧菌和哈维弧菌主要感染鱼类等海洋动物, 对人的感染极少, 而霍乱弧菌、副溶血弧菌和创伤弧菌长期以来被认为是海洋环境中最严重的病原菌, 它们是人类的致病菌, 可引起海鲜性胃肠

炎、霍乱、伤口感染和败血症等^[54-55]。*ctxA*、*tlh*、*trh* 和 *vvp* 在黎安含量高于新村，推测霍乱弧菌、副溶血弧菌和创伤弧菌的数量黎安高于新村。尽管黎安的总营养负荷水平比新村低，但黎安周围人类污水和粪便等的直接排放更加剧烈，这很可能是该水域人类致病菌以及相应致病基因含量增加的主要原因。然而，具体影响机制有待深入研究。

综上所述，网箱养殖和污水排放等人类活动的影响导致沿岸营养负荷不断加剧^[45,56]，从而直接增加海草床水体潜在致病菌的生物量^[7]，并增强潜在致病菌的毒力^[57]，提高疾病暴发的潜力。此外，研究表明富营养化会导致海草地上和地下生物量下降^[58]。海草地上生物量的下降会减弱其捕获水体颗粒物的能力^[59]，地下生物量的下降不利于沉积物的稳定^[60]，很可能导致水体潜在致病菌生物量的上升。同时，海草生物量的下降会减少海草组织向水体释放抑制潜在致病菌活性的物质，可能会削弱其抑制潜在致病菌活性的能力，从而导致潜在致病菌毒力上升。然而，目前关于驱动海草床致病菌和其毒力基因变化的因子仍不明确，亟待更深入的研究。

参考文献:

- [1] DUARTE C M, MIDDELBURG J J, CARACO N. Major role of marine vegetation on the oceanic carbon cycle[J]. *Biogeosciences*, 2005, 2(1): 1-8.
- [2] HECK K L, HAYS G, ORTH R J. Critical evaluation of the nursery role hypothesis for seagrass meadows[J]. *Mar Ecol Prog*, 2003, 253: 123-136.
- [3] STEWART J R, GAST R J, FUJIOKA R S, et al. The coastal environment and human health: microbial indicators, pathogens, sentinels and reservoirs[J]. *Environ Health-Glob*, 2008, 7(Sup 2): S3.
- [4] LAMB J B, van de WATER, JEROEN A J M, et al. Seagrass ecosystems reduce exposure to bacterial pathogens of humans, fishes, and invertebrates[J]. *Science*, 2017, 355(6326): 731-733.
- [5] ARUMUGAM R, ANANTHARAMAN P. Antibacterial potential of three seagrasses against human pathogens[J]. *Asian Pac J Trop Med*, 2010(11): 890-893.
- [6] DUARTE C M. Reviews and syntheses: hidden forests, the role of vegetated coastal habitats in the ocean carbon budget[J]. *Biogeosciences*, 2017, 14(2): 301-310.
- [7] COUPLAND G T, WALKER D D I. High metabolic rates in beach cast communities[J]. *Ecosystems*, 2007, 10(8): 1341-1350.
- [8] PATIL R, EYASEKARAN G J, SHANMUGAM S A. Control of bacterial pathogens, associated with fish diseases, by antagonistic marine actinomycetes isolated from marine sediments[J]. *Ind J Geo-Mar Sci*, 2011, 30(4): 324-267.
- [9] ZHU H Y, LI X W, ZHENG X Y. Sediment composition influences spatial variation in the abundance of human pathogen indicator bacteria within an estuarine environment[J]. *Biomed Res Int*, 2017: 2796054.
- [10] SHENG H, ZHOU P, ZHANG Y, et al. Loss of labile organic carbon from subsoil due to land-use changes in subtropical China[J]. *Soil Biol Biochem*, 2015, 88: 148-157.
- [11] ROLL B M, FUJIOKA R S. Sources of faecal indicator bacteria in a brackish, tropical stream and their impact on recreational water quality[J]. *Water Sci Technol*, 1997, 35(11/12): 179-186.
- [12] FUJIOKA R, SIAN-DENTON C, BORJA M, et al. Soil: the environmental source of *Escherichia coli* and *Enterococci* in Guam's streams[J]. *J Appl Microbiol*, 2010, 85(S1): 83-89.
- [13] WAYCOTT M, DUARTE C M, CARRUTHERS T J B, et al. Accelerating loss of seagrasses across the globe threatens coastal ecosystems[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106(30): 12377-12381.
- [14] 周立柱, 杨顶田, 尹小青. 海南新村港和黎安港非点源污染负荷估算 [J]. *生态科学*, 2018, 37(3): 11-20.
- [15] ZHANG X, ZHAO C, YU S, et al. Rhizosphere microbial community structure are selected by habitats but not plant species in two tropical seagrass beds[J]. *Fronit Mirobiol*, 2020, 11. doi: 10.3389/fmicb.2020.00161.
- [16] MARTIN M. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads[J]. *Embnet J*, 2011, 17(1): 10-12.
- [17] KNIGHT R. UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection[J]. *Bioinformatics*, 2011, 27(16): 2194-2200.
- [18] EDGAR R C. UPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads[J]. *Nat Methods*, 2013, 10(10): 996-998.
- [19] CHRISTIAN Q, ELMAR P, PELIN Y, et al. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools[J]. *Nucleic Acids Res*, 2013, 41(D1): D590-D596.
- [20] UCHIYAMA H. Distribution of *Vibrio* species isolated from aquatic environments with TCBS agar[J]. *Environ Health Prev*, 2000, 4(4): 199-204.
- [21] EMBERGER O, PAVLOVÁ M. Suitability of Slanetz-Bartley esculine sodium azide media for determination of *Enterococci*[J]. *Epidemiol Mikrobi Im*, 1971, 20(5): 262-269.
- [22] ANDERSON M J, GORLEY R N, CLARKE K R. PERMANOVA for PRIMER: guide to software and statistical methods[M]. Plymouth, UK: PRIMER-E Ltd., 2008: 105-121.
- [23] COLLADO L, INZA I, GUARRO J, et al. Presence of *Arcobacter* spp. in environmental waters correlates with high levels of fecal pollution[J]. *Environ Microbiol*, 2008, 10(6): 1635-1640.
- [24] HAAGSMA J. Pathogenic anaerobic bacteria and the environment[J]. *Rev Sci Tech*, 1991, 10(3): 749-764.
- [25] JANDA J M. Current perspectives on the epidemiology and pathogenesis of clinically significant *Vibrio* spp.[J]. *Clin Microbiol Rev*, 1988, 1(3): 245-267.
- [26] DAVID P P, AURELIE L, GHISLAINE M, et al. The complete genome sequence of the fish pathogen *Tenacibaculum maritimum* provides insights into virulence mechanisms[J]. *Front Microbiol*, 2017, 8: 1542. doi: 10.3389/fmicb.2017.01542.
- [27] CHISTOSERDOV A Y, GUBBALA S L, SMOLOWITZ R, et al. A microbiological assessment of epizootic shell disease in the

- American lobster indicates its strictly dermal etiology[M]. Boston: Boston University of Massachusetts, 2005: 12-20.
- [28] DIEDRICH L K, MANBY C L. *Haemophilus* species as a urinary tract pathogen[J]. Lab Med, 2017, 48(1): e1-e3.
- [29] RIVAS A J, VENCES A, HUSMANN M, et al. The *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* major virulence factors Dly, HlyApl and HlyAch are secreted via the type II secretion system[J]. Infect Immun, 2015, 83(4): 1246-1256.
- [30] WEBSTER N S. Sponge disease: a global threat?[J]. Environ Microbiol, 2007, 9(6): 1363-1375.
- [31] WATRAL V, KENT M L. Pathogenesis of *Mycobacterium* spp. in zebrafish (*Danio rerio*) from research facilities[J]. Comp Biochem Physiol C, 2007, 145(1): 55-60.
- [32] DALSGAARD I. Virulence mechanisms in *Cytophaga psychrophila* and other *Cytophaga*-like bacteria pathogenic for fish[J]. Ann Rev Fish Dis, 1993, 3: 127-144.
- [33] STEVENS D A, HAMILTON J R, JOHNSON N, et al. *Halomonas*, a newly recognized human pathogen causing infections and contamination in a dialysis center three new species[J]. Medicine, 2009, 88(4): 244-249.
- [34] FARKAS J. Filamentous *Flavobacterium* sp. isolated from fish with gill diseases in cold water[J]. Aquaculture, 1985, 44(1): 1-10.
- [35] JOHNSON D I. *Legionella* spp. [M]. New York: Springer International Publishing AG, 2018:279-287
- [36] MAUEL M J, SOTO E, MORALIS J A, et al. A Piscirickettsiosis-like syndrome in cultured Nile tilapia in Latin America with *Francisella* spp. as the pathogenic agent[J]. J Aquat Anim Health, 2007, 19(1): 27-34.
- [37] VALDIVIA-ARENAS M A. Bloodstream infections due to *Micrococcus* spp and intravenous epoprostenol[J]. Infect Cont Hosp Ep, 2009, 30(12): 1237-1237.
- [38] BOWMAN J P. The Genus, *Psychrobacter*[M]. New York: Springer, 2006: 920-930.
- [39] LIU S, JIANG Z, DENG Y, et al. Effects of nutrient loading on sediment bacterial and pathogen communities within seagrass meadows[J]. Microbiol Open, 2018, 7(5): e00600.
- [40] GHADERPOUR A, NASORI K N M, CHEW L L, et al. Detection of multiple potentially pathogenic bacteria in Matang mangrove estuaries, Malaysia[J]. Mar Pollut Bull, 2014, 83(1): 324-330.
- [41] PERKINS T L, KATIE C, BAAS J H, et al. Sediment composition influences spatial variation in the abundance of human pathogen indicator bacteria within an estuarine environment[J]. PLoS One, 2014, 9(11): e112951.
- [42] AGAWIN N S R, DUARTE C M. Evidence of direct particle trapping by a tropical seagrass meadow[J]. Estuar Coast, 2002, 25(6): 1205-1209.
- [43] MAUGERI T L, CARBONE M, FERA M T, et al. Distribution of potentially pathogenic bacteria as free living and plankton associated in a marine coastal zone[J]. J Appl Microbiol, 2004, 97(2): 354-361.
- [44] BAFFONE W, PIANETTI A, BRUSCOLINI F, et al. Occurrence and expression of virulence-related properties of *Vibrio* species isolated from widely consumed seafood products[J]. Int J Food Microbiol, 2000, 54(1/2): 9-18.
- [45] JOANN M B, DAVID A T, BRANT W T. Seagrasses and eutrophication[J]. J Exp Mar Biol Ecol, 2007, 50(1/2): 46-72.
- [46] ALLISON L S, JESSICA K C W, SUSANNE E C. Regional-scale effects of eutrophication on ecosystem structure and services of seagrass beds[J]. Limnol Oceanogr, 2012, 57(5): 1389-1402.
- [47] MICHAEL J S, JOHN C B, MAGGY M N, et al. Algae as reservoirs for coral pathogens[J]. PLoS One, 2013, 8(7): e69717.
- [48] EGIDIUS E. Vibriosis: pathogenicity and pathology. A review[J]. Aquaculture, 1987, 67(1/2): 15-28.
- [49] 杨青, 俞云松, 倪语星, 等. 2009年中国 CHINET 肠球菌属细菌耐药性监测 [J]. 中国感染与化疗杂志, 2010, 10(6): 421-425.
- [50] FISHER K, PHILLIPS C. The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*[J]. Microbiology, 2009, 155(6): 1749-1757.
- [51] YASUYOSHI I K E. Pathogenicity of *Enterococci*[J]. Nihon Saikingaku Zasshi, 2017, 72(2): 189-211.
- [52] HSIEH J L, FRIES J S, NOBLE R T. *Vibrio* and phytoplankton dynamics during the summer of 2004 in a eutrophying estuary[J]. Ecol Appl, 2007, 17(5): S102-S109.
- [53] 吴建平, 蔡创华, 周毅频, 等. 大亚湾网箱养殖水体弧菌种类组成及变化 [J]. 湛江海洋大学学报, 2006, 26(4): 46-52.
- [54] AUSTIN B. Vibrios as causal agents of zoonoses[J]. Vet Microbiol, 2010, 140(3/4): 310-317.
- [55] REILLY G D, REILLY C A, SMITH E G, et al. *Vibrio alginolyticus*-associated wound infection acquired in British waters, Guernsey, July 2011[J]. Euro Surveill, 2011, 16(42): 321-326.
- [56] LIU S, JIANG Z, ZHANG J, et al. Effect of nutrient enrichment on the source and composition of sediment organic carbon in tropical seagrass beds in the South China Sea[J]. Mar Pollut Bull, 2016, 110(1): 274-280.
- [57] JOHNSON P T J, CARPENTER S R. Influence of eutrophication on disease in aquatic ecosystems: patterns, processes, and predictions. Infectious disease ecology: the effects of ecosystems on disease and of disease on ecosystems[M]. Princeton: Princeton University Press, 2010: 71-99.
- [58] GLADSTONE-GALLAGHER R V, HUGHES R W, DOUGLAS E J, et al. Biomass-dependent seagrass resilience to sediment eutrophication[J]. J Exp Mar Biol Ecol, 2008, 501: 54-64.
- [59] GACIA E, DUARTE C M, MARBÀ N, et al. Sediment deposition and production in SE-Asia seagrass meadows[J]. Estuar Coast Shelf S, 2003, 56(5/6): 909-919.
- [60] MARBÀ N, ARIAS-ORTIZ A, MASQUÉ P, et al. Impact of seagrass loss and subsequent revegetation on carbon sequestration and stocks[J]. J Ecol, 2015, 103(2): 296-302.