

入境船舶压载水潜在致病菌组成及影响因素研究

沈浩^{1,2}, 陆笑澜², 韩阳春¹, 张迪², 吕宝一²

(1. 江阴海关综合技术服务中心, 江苏 江阴 214400; 2. 上海海事大学 海洋科学与工程学院, 上海 201306)

摘要: 船舶压载水直接促进了地理性隔离海域之间的水体交换, 可作为潜在致病菌迁移扩散的媒介。本文以采集到的 25 艘入境船舶的压载水样品为研究对象, 采用高通量测序技术对潜在致病菌群落组成和影响因素进行了初步解析。结果表明: 变形菌 (Proteobacteria)、拟杆菌 (Bacteroidetes) 和放线菌 (Actinobacteria) 为压载水中的优势菌门。船舶压载水中共检出 36 个潜在致病菌属和 19 个潜在致病菌种。痤疮丙酸杆菌 (*Cutibacterium acnes*)、大肠埃希氏杆菌 (*Escherichia coli*) 和表皮葡萄球菌 (*Staphylococcus epidermidis*) 为压载水中最普遍的潜在致病菌, 检出率超过 50%。置换和未置换压载水中潜在致病菌的种类数量和丰度并无显著差异。此外, 压载水中的潜在致病菌与磷酸盐及大肠埃希氏杆菌呈显著正相关性, 表明其可能与近岸的人类活动有关。综上所述, 相关部门应当对船舶压载水加强管理, 以降低潜在致病菌的入侵扩散风险。

关键词: 船舶压载水; 潜在致病菌; 高通量测序; 群落结构; 压载水置换

中图分类号: X55

文献标识码: A

文章编号: 1007-6336(2022)02-0260-07

The composition and influencing factors of potential pathogenic bacteria in ballast water of entry ships

SHEN Hao^{1,2}, LU Xiao-lan², HAN Yang-chun¹, ZHANG Di², LV Bao-yi²

(1. Integrated Technical Service Center of Jiangyin Customs, Jiangyin 214400, China; 2. College of Ocean Science and Engineering, Shanghai Maritime University, Shanghai 201306, China)

Abstract: Ship ballast water directly promotes the water exchange between geographically isolated sea areas and has been regarded as a medium for the migration of potential pathogenic bacteria. In this study, 25 ballast water samples of entry ships were collected and high-throughput sequencing technology was used to analyze the composition and influencing factors of potential pathogenic bacteria. The results showed Proteobacteria, Bacteroidetes and Actinobacteria were the dominant bacteria in ship ballast waters. A total of 36 genera and 19 species of potential pathogenic bacteria were detected in the ballast waters. *Cutibacterium acnes*, *Escherichia coli* and *Staphylococcus epidermidis* were the most common pathogens with the detection rate exceed 50% in ship ballast waters. No significant difference was found for the species number and abundances of potential pathogenic bacteria between the exchanged and unexchanged ballast waters. The close positive relationship between pathogenic bacteria and phosphorus and *Escherichia coli* indicated that human activities should be an important factor for those pathogens in ballast waters. In all, it should strengthen the management of ballast water so as to reduce the invasion risk of potential pathogenic bacteria.

Key words: ship ballast water; potential pathogenic bacteria; high-throughput sequencing; community structure; ballast water exchange

收稿日期: 2020-10-21, 修订日期: 2021-01-27

基金项目: 南京海关科技项目 (2018KJ54); 国家重点研发计划项目 (2017YFC1404602); 上海市教育委员会项目 (15CG53)

作者简介: 沈浩 (1990—), 男, 山东临沂人, 硕士, 主要从事船舶压载水生物检测, E-mail: shenhao5015558@163.com

通讯作者: 吕宝一 (1986—), 男, 山东临沂人, 副教授, 主要从事海洋环境研究, E-mail: bylv@shmtu.edu.cn

船舶承担了外贸货物运输量 90% 以上份额。压载水是为了保持船体平衡而在船舶底舱及边舱中装满的水, 体积约为货物运输量的 40%, 总量十分庞大^[1]。当船舶加装压载水时, 水中的生物也一同被装入压载舱并随船航行, 最终排放至目的港附近水域^[2]。据估计, 全世界每年约有 80000 余艘船舶携带超过 100 亿吨的压载水在全球范围内转移, 传播的物种可达 7000 种/天。由船舶压载水导致的有害生物在地理性隔离水体之间的传播问题, 已引起国际社会的广泛关注^[3]。随着近岸水体污染的加重, 江河入海口、港口和海湾等区域均发现存在大量潜在致病菌^[4]。这些病原微生物可能随船舶压载水远距离迁移后入侵目的港附近水域, 进而给水生生物及人类健康带来潜在危害^[5]。

由于检测技术和成本等原因, 国际海事组织制定的《国际船舶压载水和沉积物控制和管理公约》(以下简称《压载水公约》) 仅对埃希氏大肠杆菌 (*Escherichia coli*)、霍乱弧菌 (*Vibrio cholerae*) 等指示微生物做了规定^[6]。然而, 潜在致病菌种类多、群落组成复杂, 采用大肠杆菌等指示微生物并不能完全反映环境中的志贺氏痢疾杆菌 (*Shigella castellani*)、霍乱弧菌、沙门氏菌 (*Salmonella*) 等特定病原微生物^[7]。高通量测序是近年来快速发展的一种研究微生物群落的方法, 可以精确地解析样品中的微生物组成情况, 甚至包括致病菌^[8]。尽管该技术的特异性和检测限不如定量 PCR, 但能够同时筛查和发现多种病原微生物, 可初步揭示环境样品中潜在致病菌的多样性及组成情况^[9]。

“21 世纪海上丝绸之路”的实施, 极大地促进了我国对外贸易的发展, 入境船舶及其携带的压载水量也进一步增加, 生物入侵的潜在威胁日益突出。与浮游动植物、藻类等相比, 细菌是压载水中数量最多的生物, 而压载水亦可能成为潜在致病菌入侵的载体^[10]。为此, 本研究采用高通量测序技术, 通过比对潜在致病菌参考数据库, 解析入境船舶压载水中潜在致病菌的群落组成情况, 并进一步探讨环境因子对潜在致病菌的影响, 以期对船舶压载水病原微生物的风险评价和管控提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 样品采集与处理

压载水样品取自江苏省江阴港入境船舶, 通过专用采水器从船体人孔盖处采集水样(水面下约 1.0 m 处), 共采集到 25 艘船舶的压载水样品。水样储存于预先高温灭菌的聚丙烯瓶内, 放置在冰盒中送回实验室。采用 0.22 μm 的无菌微孔滤膜对压载水中的微生物进行抽滤富集。

1.2 水质参数测定

pH 和盐度分别使用 pH 计和盐度计测定。氨氮($\text{NH}_4\text{-N}$)、亚硝态氮($\text{NO}_2\text{-N}$)、硝态氮($\text{NO}_3\text{-N}$)和磷酸盐($\text{PO}_4\text{-P}$)采用流动注射分析仪(DeChem-Tech 公司)测定, 所用方法分别为靛酚蓝法、Cd-Zn 还原+重氮偶氮法、重氮偶氮法和磷钼蓝法^[11]。有机碳(TOC)采用总有机碳分析仪(Shimadzu 公司)测定。

1.3 细菌群落组成分析

滤膜上的 DNA 采用 FastDNA[®] SPIN Kit for Soil 试剂盒(MP Biomedicals 公司)提取。DNA 的浓度和纯度使用 Nanodrop ND-1000 分光光度计(Nanodrop 公司)测定。

以细菌 16S rRNA 的 V3-V4 区为目的片段, 采用特异性引物 338F 和 806R 进行扩增(ABI GeneAmp[®] 9700, Applied Biosystems 公司)。反应条件为: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 4 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s, 循环 25 次, 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。每个 DNA 样品扩增 3 次, 将同一样品的 PCR 产物混合后进行凝胶电泳, AxyPrepDNA 试剂盒(AXYGEN 公司)回收扩增产物, 采用 QuantiFluor TM-ST 定量检测。最后将各样品的 PCR 产物等量混合, 使用 Illumina MiSeq 平台进行高通量测序(上海美吉生物医药科技有限公司)。

测序数据采用 I-sanger 生物信息云数据分析系统(<http://www.i-sanger.com>)进行处理。在 97% 的相似度水平上对序列进行可操作分类单元(operational taxonomic unit, OTU)聚类; 选取每个 OTU 中丰度最高的序列作为代表序列, 并采用 RDP classifier 进行分类学注释。

1.4 潜在致病菌检测

根据文献中总结的病原菌名录^[12-13], 首先, 从属水平上对压载水中的潜在致病菌进行鉴别。然后, 从 Greengenes 网站 (<http://greengenes.lbl.gov/>) 下载已知的 538 个代表性病原菌种的 16S DNA 序列, 并组装为病原菌数据库。通过本地 BLAST 程序, 将压载水 OTU 代表序列与上述病原菌序列进行比对^[14-15], 阈值为: 对齐长度 ≥ 440 bp; e-value $< 1 \times 10^{-20}$; 相似度 $\geq 99\%$ 。筛选出的潜在致病菌序列再次通过 NCBI 网站 (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) 进行比对以确认鉴定结果。潜在致病菌丰度定义为样品中的病原菌序列与全部序列的百分比。

1.5 统计分析

采用 SPSS 20.0 进行数据统计分析, $P < 0.05$ 表明存在显著性差异。论文中的图表采用 Origin 2018b 绘制。

2 结果与讨论

2.1 压载水理化特征

如表 1 所示, 船舶压载水的 pH 和盐度范围分别为 7.69 ~ 9.06 和 16.1 ~ 37.5, 平均值分别为 8.22 和 30.3。有机物和营养盐分析结果显示: 压载水中的 TOC、 $\text{NH}_4\text{-N}$ 、 $\text{NO}_2\text{-N}$ 、 $\text{NO}_3\text{-N}$ 和 $\text{PO}_4\text{-P}$ 浓度范围分别为 2.49 ~ 33.90 mg/L、0.008 ~ 0.300 mg/L、0.001 ~ 0.085 mg/L、0.002 ~ 0.976 mg/L 和

表 1 压载水理化性质
Tab.1 Physico-chemical properties of ballast waters

编号	pH	盐度	TOC/mg·L ⁻¹	NH ₄ -N/mg·L ⁻¹	NO ₂ -N/mg·L ⁻¹	NO ₃ -N/mg·L ⁻¹	PO ₄ -P/mg·L ⁻¹	备注
Y1	7.80	37.5	5.17	0.155	0.006	0.012	0.049	置换
Y2	9.06	31.7	11.00	0.300	0.051	0.123	0.020	未置换
Y3	8.30	32.2	9.22	0.230	0.002	0.060	0.012	置换
Y4	8.14	32.3	5.27	0.165	0.010	0.131	0.007	置换
Y5	8.42	27.6	3.08	0.008	0.008	0.116	0.037	未置换
Y6	8.08	35.1	3.57	0.008	0.007	0.043	0.009	置换
Y7	8.53	36.3	8.40	0.016	0.002	0.035	0.025	置换
Y8	8.98	35.7	8.18	0.029	0.001	0.003	0.015	置换
Y9	7.95	32.0	5.32	0.055	0.004	0.091	0.018	置换
Y10	8.35	31.8	5.62	0.019	0.001	0.002	0.006	置换
Y11	8.21	16.1	15.20	0.020	0.001	0.126	0.016	未置换
Y12	7.99	34.3	3.30	0.021	0.001	0.018	0.007	置换
Y13	8.00	30.2	8.16	0.042	0.013	0.028	0.001	置换
Y14	8.56	32.0	2.78	0.037	0.005	0.036	0.002	未置换
Y15	7.75	30.3	3.69	0.038	0.085	0.176	0.023	未置换
Y16	8.52	31.8	3.20	0.057	0.005	0.038	0.004	未置换
Y17	8.03	30.3	3.16	0.028	0.001	0.040	0.014	未置换
Y18	8.01	28.2	4.34	0.015	0.001	0.156	0.023	未置换
Y19	8.00	29.7	5.24	0.046	0.070	0.156	0.025	未置换
Y20	7.69	30.2	3.92	0.096	0.012	0.059	0.011	未置换
Y21	8.31	22.3	19.30	0.183	0.034	0.976	0.093	未置换
Y22	7.92	25.4	33.90	0.009	0.001	0.027	0.012	未置换
Y23	8.06	21.9	4.10	0.023	0.004	0.019	0.004	未置换
Y24	8.07	32.3	2.49	0.017	0.002	0.015	0.034	置换
Y25	8.10	29.8	20.75	0.039	0.002	0.003	0.007	未置换

0.001 ~ 0.093 mg/L, 平均值分别为 7.93 mg/L、0.066 mg/L、0.013 mg/L、0.100 mg/L 和 0.019 mg/L。此外, 个别压载水样品的 TOC 含量较高(超过 20 mg/L), 说明其可能加装于污染比较严重的海域。

2.2 压载水细菌群落多样性和组成特征

25 个压载水样品共获得 1257378 条高质量序列, 在 97% 相似度水平上聚类为 2649 个 OTU。所有样品的测序覆盖率均超过 0.99, 表明测序量可以反映压载水中的绝大多数细菌群落。 α 多样性分析显示: 压载水样品的 OTU 数量为 83 ~ 911, 平均值和中位值分别为 478 和 457; Shannon 指数范围为 0.86 ~ 5.46, 平均值和中位值分别为 3.58 和 3.66。其中, 样品 Y2 的多样性最低, 这可能与其加装时间最长有关, 压载水舱内的无光环境以及营养物质的不断消耗可能会导致部分微生物死亡。

物种注释结果显示: 船舶压载水中共发现 36 个菌门(图 1)。变形菌(Proteobacteria)、拟杆菌(Bacteroidetes)和放线菌(Actinobacteria)含量较高, 共占序列总数的 83% ~ 96%。其中, 变形菌为主导优势菌门, 丰度为 45% ~ 96%。 γ -变形菌(Gammaproteobacteria)和 α -变形菌(Alpha-proteobacteria)为变形菌门的优势菌纲, 这与以往

的研究报道吻合^[16]。此外, 黄杆菌(Flavobacteria)和鞘脂杆菌(Sphingobacteria)为拟杆菌的优势菌纲, 放线菌主要由同名放线菌纲(Actinobacteria)组成。

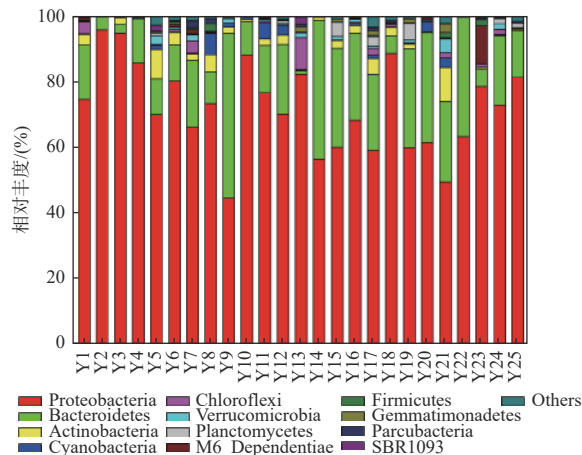


图 1 船舶压载水中细菌种类组成(门水平)

Fig. 1 Bacterial composition in the ship ballast water (phylum level)

在属水平上, 共检测到 721 个细菌菌属。如图 2 所示, 船舶压载水中的优势菌属主要包括 *unclassified_Rhodobacteraceae*、假交替单胞菌(*Pseudoalteromonas*)、亚硫酸杆菌(*Sulfitobacter*)、*NS3a_marine_group*、科尔韦氏菌(*Colwellia*)、盐单胞菌(*Halomonas*)、黄杆菌(*Flavobacterium*)、

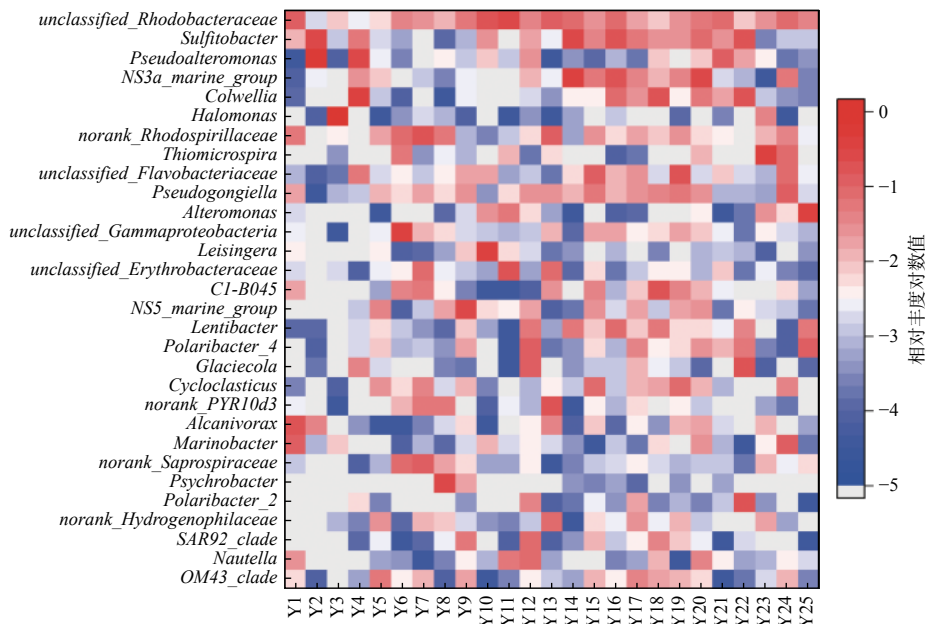


图 2 船舶压载水中细菌种类组成(属水平)

Fig. 2 Bacterial composition in the ballast water (genus level)

norank_Rhodospirillaceae、硫微螺菌(*Thiomicrospira*)等。其中,隶属于变形菌的 *unclassified_Rhodobacteraceae*、假交替单胞菌、*NS3a_marine_group* 和亚硫酸杆菌为主导优势菌属,占序列总数的 1%~90%,这些微生物亦是海水中的常见菌属^[17-18]。

2.3 压载水潜在致病菌组成

如图 3 所示,船舶压载水中共检出 36 个潜在致病菌属,占序列总数的 0.1%~33.2%。假单胞菌(*Pseudomonas*)、红球菌(*Rhodococcus*)、柯克斯氏体(*Coxiella*)、弓形杆菌(*Arcobacter*)、葡

萄球菌(*Staphylococcus*)、分支杆菌(*Mycobacterium*)、鞘脂单胞菌(*Sphingomonas*)和弧菌(*Vibrio*)在超过 60% 的压载水样品中检出,丰度亦相对较高。金黄杆菌(*Chryseobacterium*)、气球菌(*Aerococcus*)、罗氏菌(*Rothia*)、棒状杆菌(*Corynebacterium*)和颗粒链菌(*Granulicatella*)仅在不到 10% 的压载水样品中检出,且丰度较低。此外,不同压载水样品中的潜在致病菌属差异较大。例如,在样品 Y8 中检出 27 个潜在致病菌属,而在 Y22 中仅存在 5 个潜在致病菌属。

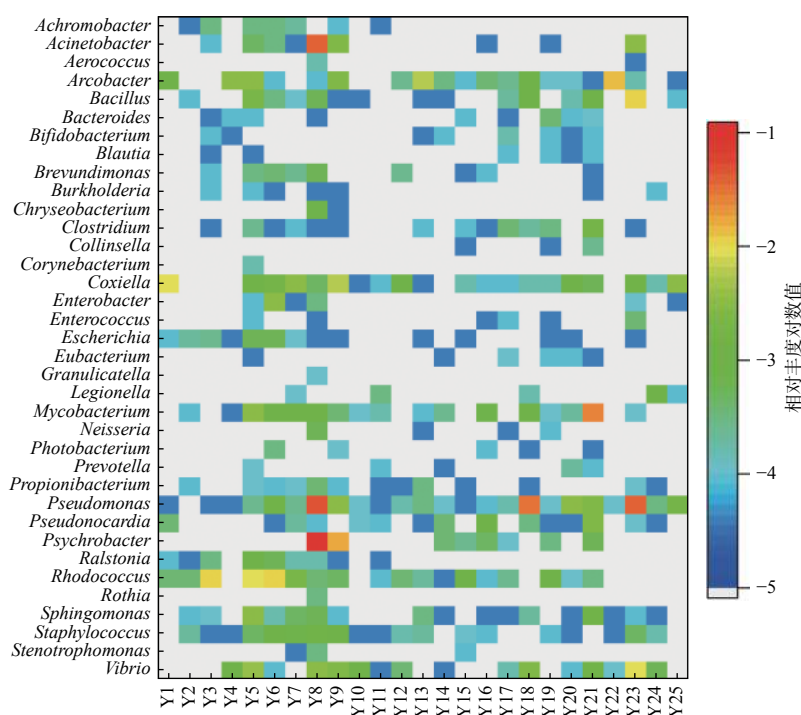


图 3 船舶压载水中潜在病原菌组成情况(属水平)

Fig. 3 The composition of potential pathogenic bacteria in ship ballast water(genus level)

基于种水平的序列分析显示:船舶压载水中共存在 19 个潜在致病菌种(图 4),占全部序列的 0.004%~0.86%,平均丰度为 0.13%。其中,表皮葡萄球菌(*Staphylococcus epidermidis*)、痤疮丙酸杆菌(*Cutibacterium acnes*)和大肠埃希氏杆菌是压载水中最为普遍的潜在致病菌,检出率超过 50%。颗粒丙酸杆菌(*Propionibacterium granulosum*)、马脉气球菌(*Aerococcus urinaeequi*)、产气柯林斯菌(*Collinsella aerofaciens*)、粪便拟杆菌(*Bacteroides stercoris*)和深黄奈瑟菌(*Neisseria*

perflava)仅在不到 20% 的压载水样品中检出,且丰度较低。不同压载水样品中的潜在致病菌种差异较大。Y5 和 Y8 中分别含有 14 种和 13 种潜在致病菌,而仅有 1 个潜在致病菌种在 Y14、Y22 和 Y25 中检出。统计分析显示:压载水中病原菌种的数量与丰度之间存在显著正相关性($r^2=0.690$, $P<0.01$)。

在《压载水公约》规定的 3 种指示性病原微生物中,除霍乱弧菌外,肠球菌(*Enterococcus*)和大肠埃希氏杆菌均有检出。此外,隶属于弧菌属

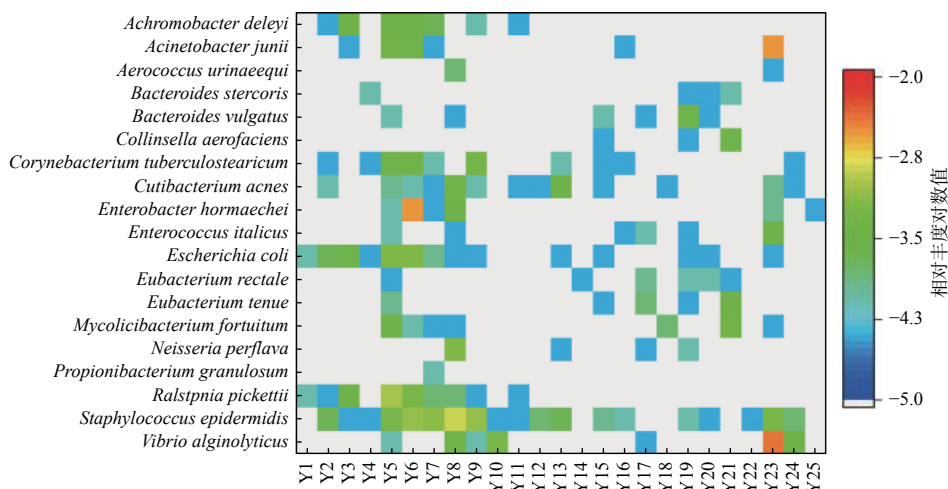


图4 船舶压载水中潜在病原菌的组成情况(种水平)

Fig. 4 The composition of potential pathogenic bacteria in ship ballast water(species level)

(*Vibrio*)的溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*)在部分压载水样品中有检出,这表明高通量测序技术能初步揭示船舶压载水中致病微生物的组成情况。针对压载水中检出率较高的潜在致病菌,后续可通过定量PCR测定其致病功能基因。

2.4 潜在致病菌的影响因素分析

压载水置换指船舶在距陆地200海里外将随船携带的近岸压载水排出并换成公海海水,以此削减外来生物入侵的风险。在本研究中,置换和未置换压载水中潜在致病菌的种类数量($P=0.539$)及丰度($P=0.161$)并无明显差异。尽管公海海水通常较近岸水体清洁,但置换时压载水并不能完全排出,且压载水舱沉积物中的潜在致病菌可在一定条件下进入压载水^[19],这些因素均减弱了置换的效果。因此,为了有效去除潜在致病菌,应采取必要措施对压载水进行处理。

潜在致病菌与环境因子的相关性分析显示:未置换压载水中的潜在致病菌与 $\text{PO}_4\text{-P}$ 浓度呈显著正相关性($r=0.588$, $P=0.027$)。此外,压载水中大肠埃希氏杆菌的丰度与潜在致病菌的种类数($r=0.562$, $P=0.003$)和丰度($r=0.525$, $P=0.007$)之间均呈显著相关性。未置换压载水主要来自港口、河口等近岸水体,说明沿岸人类活动可能是病原菌的重要来源^[15]。值得注意的是,产气柯林斯菌、粪便拟杆菌、纤细真杆菌(*Eubacterium tenue*)等与TOC、总无机氮和 $\text{PO}_4\text{-P}$ 之间呈显著正相关性($P<0.05$),这表明有机物和营养盐可促

进潜在致病菌的生长^[15]。因此,当压载水排放到营养水平较高的海域后,潜在病原菌的增殖可能会加大其生态风险。

3 结论

(1)变形菌、拟杆菌和放线菌为船舶压载水中的优势菌门。隶属于变形菌的 *unclassified_Rhodobacteraceae*、假交替单胞菌和亚硫酸杆菌等为压载水中的主导优势菌属。

(2)25个船舶压载水样品中共检测出36个潜在致病菌属。假单胞菌、红球菌、柯克斯氏体、弓形杆菌、葡萄球菌、分支杆菌、鞘脂单胞菌和弧菌为压载水中的优势病原菌属。此外,在种级别上共检出19个潜在致病菌种,占序列总数的0.004%~0.86%。痤疮丙酸杆菌、大肠埃希氏杆菌和表皮葡萄球菌是压载水中最普遍的潜在致病菌。

(3)置换并不能显著降低船舶压载水中潜在致病菌的种类和丰度。压载水中的潜在致病菌与 $\text{PO}_4\text{-P}$ 和大肠埃希氏杆菌之间呈显著正相关性,表明近岸人类活动和营养盐是影响压载水中潜在致病菌的重要因素。

参考文献:

- [1] 庞艳华,吕晓燕,丁永生,等.船舶压载水外来生物入侵传播的防治[J].大连海事大学学报,2007,33(1):10-12.
- [2] 陈立侨,李云凯,侯俊利,等.船舶压载水导致的生物入侵及其防治对策[J].华东师范大学学报:自然科学版,2005(5/6):

- 40-48.
- [3] DARLING J A, MARTINSON J, GONG Y G, et al. Ballast water exchange and invasion risk posed by intracoastal vessel traffic: an evaluation using high throughput sequencing[J]. *Environmental Science and Technology*, 2018, 52(17): 9926-9936.
- [4] 张子龙, 李深伟, 张晓航, 等. 上海口岸入出境船舶压载水的致病微生物携带情况调查[J]. *上海海洋大学学报*, 2018, 27(3): 425-430.
- [5] ALTUG G, GURUN S, CARDAK M, et al. The occurrence of pathogenic bacteria in some ships' ballast water incoming from various marine regions to the Sea of Marmara, Turkey[J]. *Marine Environmental Research*, 2012, 81: 35-42.
- [6] IMO. International convention on the control and management of ships' ballast water and sediments[R]. London: International Maritime Organization, 2004.
- [7] 陈亚楠, 王亚伟, 魏源送, 等. 不同功能地表水体中病原微生物指示物的标准比较[J]. *环境科学学报*, 2015, 35(2): 337-351.
- [8] CUI Q J, HUANG Y, WANG H, et al. Diversity and abundance of bacterial pathogens in urban rivers impacted by domestic sewage[J]. *Environmental Pollution*, 2019, 249: 24-35.
- [9] DONG P Y, CUI Q J, FANG T T, et al. Occurrence of antibiotic resistance genes and bacterial pathogens in water and sediment in urban recreational water[J]. *Journal of Environmental Sciences*, 2019, 77: 65-74.
- [10] NG C, GOH S G, SAEIDI N, et al. Occurrence of *Vibrio* species, beta-lactam resistant *Vibrio* species, and indicator bacteria in ballast and port waters of a tropical harbor[J]. *Science of the Total Environment*, 2018, 610/611: 651-656.
- [11] GRASSHOFF K, KREMLING K, EHRHARDT M. Methods of seawater analysis[M]. 3rd ed. Weinheim: WILEY-VCH, 1999: 203-223.
- [12] TAYLOR L H, LATHAM S M, WOOLHOUSE M E J. Risk factors for human disease emergence[J]. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 2001, 356(1411): 983-989.
- [13] LI B, JU F, CAI L, et al. Profile and fate of bacterial pathogens in sewage treatment plants revealed by high-throughput metagenomic approach[J]. *Environmental Science and Technology*, 2015, 49(17): 10492-10502.
- [14] CAI L, ZHANG T. Detecting human bacterial pathogens in wastewater treatment plants by a high-throughput shotgun sequencing technique[J]. *Environmental Science and Technology*, 2013, 47(10): 5433-5441.
- [15] 侯丽媛, 胡安谊, 马英, 等. 九龙江流域潜在病原菌污染分析[J]. *环境科学*, 2014, 35(5): 1742-1749.
- [16] LYMPEROPOULOU D S, DOBBS F C. Bacterial diversity in ships' ballast water, ballast-water exchange, and implications for ship-mediated dispersal of microorganisms[J]. *Environmental Science and Technology*, 2017, 51(4): 1962-1972.
- [17] LU J, ZHANG Y X, WU J. Continental-scale spatio-temporal distribution of antibiotic resistance genes in coastal waters along coastline of China[J]. *Chemosphere*, 2020, 247: 125908.
- [18] BRINKMEYER R. Diversity of bacteria in ships ballast water as revealed by next generation DNA sequencing[J]. *Marine Pollution Bulletin*, 2016, 107(1): 277-285.
- [19] MOLINA V, DRAKE L A. Efficacy of open-ocean ballast water exchange: a review[J]. *Management of Biological Invasions*, 2016, 7(4): 375-388.

(上接第259页)

- [22] AGAWIN N S R, DUARTE C M. Evidence of direct particle trapping by a tropical seagrass meadow[J]. *Estuaries*, 2002, 25(6): 1205-1209.
- [23] LEE S Y, LEE I W, CHOI C I. Seasonal changes of community structure of phytoplankton in three Korean seagrass beds[J]. *Ocean and Polar Research*, 2006, 28(2): 95-105.
- [24] 张才学, 陈慧妍, 孙省利, 等. 流沙湾海草床海域浮游植物的时空分布及其影响因素[J]. *生态学报*, 2012, 32(5): 1527-1537.
- [25] 蔺银鼎, 韩学孟, 武小刚, 等. 城市绿地空间结构对绿地生态场的影响[J]. *生态学报*, 2006, 26(10): 3339-3346.
- [26] 柳杰, 张沛东, 郭栋, 等. 环境因子对海草生长及光合生理影响的研究进展[J]. *水产科学*, 2012, 31(2): 119-124.
- [27] VERWEIJ M C, NAGELKERKEN I, DE GRAAFF D, et al. Structure, food and shade attract juvenile coral reef fish to mangrove and seagrass habitats: a field experiment[J]. *Marine Ecology Progress Series*, 2006, 306: 257-268.
- [28] VERWEIJ M C, NAGELKERKEN I, WARTENBERGH S L J, et al. Caribbean mangroves and seagrass beds as daytime feeding habitats for juvenile French grunts, *Haemulon flavolineatum*[J]. *Marine Biology*, 2006, 149(6): 1291-1299.