

Vibrionen in anthropogen beeinflussten Küstenökosystemen

monographische Dissertation

zur

Erlangung des akademischen Grades

Doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität Rostock

vorgelegt von

Lars Möller, geb. am 10.06.1990 in Berlin

Rostock, den 14. August 2020

Gutachter:

Prof. Dr. Matthias Labrenz

Leibniz-Institut für Ostseeforschung Warnemünde (IOW)

Sektion Biologische Meereskunde

Dr. Gunnar Gerds

Alfred Wegener Institute (AWI), Helmholtz-Zentrum für Polar-und

Meeresforschung

Sektion Ökologie der Schelfmeere

Jahr der Einreichung: 2020

Jahr der Verteidigung: 2020

Zusammenfassung

Der Anstieg anthropogener Einflüsse in den letzten Jahrzehnten und die daraus resultierenden Folgen in Form von extremen Wetterphänomenen, steigenden Meerestemperaturen, dem Abschmelzen der Polkappen und der Ausbreitung invasiver Arten beeinflusst nicht nur Menschen Tiere und Pflanzen, sondern auch mikrobielle Gemeinschaften. Dabei können besonders potentiell pathogene Bakterien profitieren und in Zukunft verstärkt auftreten.

Einer dieser möglichen Profiteure, dessen Bedeutung für Mensch und Natur in Zukunft aufgrund anthropogener Einflüsse steigen könnte, ist die bakterielle Gattung *Vibrio*.

Vibrio ist ubiquitär in aquatischen Systemen verbreitet und mehr als 130 Arten sind beschrieben, dessen Lebensweisen von symbiontisch bis pathogen reichen. Doch obwohl *Vibrio* zu den am stärksten untersuchten bakteriellen Gruppen zählt, ist die Wechselwirkung zwischen *Vibrio* und anthropogenen Einflüssen meist unzureichend verstanden.

In dieser Promotion beschäftigte ich mich daher mit dem Einfluss anthropogener Faktoren auf die Abundanz und die Zusammensetzung von *Vibrio*-Küstengemeinschaften. Die Ostsee und die chinesische Insel Hainan, die sich durch individuelle Charakteristika unterscheiden, dienten dabei als Modellregionen für verschiedene anthropogene Einflüsse.

Die Ostsee wird auf Grund ihres geologisch jungen Alters sowie der intensiven anthropogenen Nutzung besonders stark durch invasive Arten geprägt, deren Anzahl sich in den letzten 60 Jahren mehr als verdreifacht hat. Dabei werden eingeschleppte Arten als möglicher Vektor für pathogene *Vibrio*-Spezies diskutiert. Ein Phänomen, welches in dieser Form noch nicht in der Ostsee nachgewiesen wurde.

Gleichzeitig ist die Ostsee auf Grund ihres flachen Charakters 6-mal stärker vom anthropogen bedingten Anstieg der Meerestemperaturen betroffen, als der globale Durchschnitt. Dadurch wird die für *Vibrio* kritische Wassertemperatur von 20 °C, ab der diese sich stark vermehren können, immer häufiger für längere Zeit überschritten. Während *Vibrio* in den Sommermonaten in der Ostsee in zum Teil hoher Zellzahl detektiert wird, erfolgt der Nachweis von *Vibrio* während der kalten Monate selten, und Winterreservoirs dieser Gruppe sind weitestgehend unbekannt. Die Kenntnis über mögliche Winterreservoirs stellt jedoch eine Grundlage dar, um die zukünftige Entwicklung und Dynamik von *Vibrio*-Küstengemeinschaften bei steigenden Meerestemperaturen in der Ostsee abschätzen zu können.

In meiner Promotion nutze ich eine Kombination aus kultivierungsunabhängiger gattungsspezifischer digitaler Droplet PCR, Illumina-16S rRNS Gen-Sequenzierung sowie

kultivierungsabhängiger Quantifizierung und Stammisolierung, um zum einen den Einfluss invasiver Arten auf *Vibrio*-Gemeinschaften in Küstengebieten abschätzen zu können und zum anderen mögliche Winterreservoir von *Vibrio* zu identifizieren. Wasser-, Sediment-, Seston- und Gewebeprobe von den einheimischen Fischen *Clupea harengus membras* (Hering) und *Gadus morhua* (Dorsch) sowie der invasiven Art *Neogobius melanostomus* (Schwarzgrundel) wurden in zwei Sommer- und Wintersituationen entlang des natürlich vorkommenden Salzgradienten an der deutschen Ostseeküste untersucht. Ich konnte zeigen, dass *N. melanostomus* als Winterreservoir für *N. melanostomus*-spezifische *Vibrio*-Gemeinschaften dienen konnte, inklusive der potentiell humanpathogenen Art *V. vulnificus*. Als Winterreservoir für einzigartige *Vibrio*-Gemeinschaften bieten Gebiete mit hoher Dichte an *N. melanostomus* damit einen möglichen Startpunkt, von denen sich *Vibrio*-Blüten im Sommer ausbreiten können.

Während die Ostsee besonders durch steigende Wassertemperaturen und invasive Arten geprägt ist, hat die in den Subtropen / Tropen liegende Insel Hainan in den letzten 50 Jahren besonders starke anthropogene Veränderungen durch den Ausbau von Aquakulturen erlebt.

Da verschiedene Studien zeigten, dass *Vibrio*, speziell auch deren pathogene Arten, in Aquakulturen angereichert werden können, ist durch die Freisetzung von ungefilterten Aquakulturabwässern ein möglicher Einfluss der *Vibrio*-Küstengemeinschaften in diesem Gebiet zu erwarten. Um diese Hypothese zu bestätigen, nutzte ich Illumina-16S rRNS Gen-Sequenzierung für Wasser, Sediment, Seegrass und Gewebeprobe von kultivierten Tieren aus verschiedenen Küstenabschnitten, Aquakulturen und einem Ästuar. Dabei zeigte sich, dass *Vibrio*-Gemeinschaften in Abundanz und Zusammensetzung innerhalb von Aquakulturen in Abhängigkeit von ihrer Betriebsweise beeinflusst werden konnten. Im Vergleich zur Küste reduzierten klassische Teichaquakulturen die relative *Vibrio*-16S rRNS Gen-Abundanz und *Vibrio*-Diversität signifikant. Im Gegensatz dazu waren kontinuierliche Aquakulturen in der relativen *Vibrio*-16S rRNS Gen-Abundanz angereichert, wiesen jedoch eine mit der Küste vergleichbare *Vibrio*-Diversität auf. Obwohl die Freisetzung von ungefilterten Aquakultur-Abwässern die theoretische Möglichkeit besaß, *Vibrio*-Küstengemeinschaften zu beeinflussen, konnte ein solcher Effekt in umliegenden Gebieten zum gegebenen Zeitpunkt nicht detektiert werden.

Die Ergebnisse meiner Studie konnten zeigen, dass anthropogene Einflüsse das Potential besitzen, *Vibrio*-Küstengemeinschaften zu verändern. Dies stellt einen wichtigen Schritt zum Verständnis der wechselseitigen Beziehung zwischen potentiell pathogenen Bakterien und dem menschlichen Einfluss dar.

Summary

Increasing anthropogenic influences and their consequences, including of extreme weather phenomena, rising sea temperature, melting of polar caps and spread of invasive species, do not only impact humans, animals and plants, but microbial communities as well. Pathogenic bacteria can particularly profit from these changes and their abundance is thought to increase in the future. *Vibrio* represents one of the bacterial genera which might profit from anthropogenic changes and therefore will rise in its importance to humans and in nature. *Vibrio* is ubiquitously distributed in aquatic systems and comprises more than 130 species, including symbionts and pathogens. While *Vibrio* is one of the most studied bacterial groups, its interaction with anthropogenic factors is barely understood.

Therefore, in this dissertation, I studied the impact of anthropogenic factors on the abundance and composition of coastal *Vibrio* communities. The Baltic Sea and the Chinese island Hainan were used as model regions for different anthropogenic factors, being characterised by individual environmental parameters.

Due to its geologically young age and its intensive anthropogenic use, the Baltic Sea is strongly impacted by invasive species; the numbers of invasive species have tripled in the last 60 years. In the literature, invasive species are discussed as a potential vector for pathogenic *Vibrio* species, a phenomena which was not documented for the Baltic Sea so far. Additionally, the Baltic Sea is 6 times more strongly affected by rising water temperatures than the global average, due to its shallow character. This factor will prolong the time span in which, critically, water temperatures are above 20 °C, during which *Vibrio* starts to proliferate. While *Vibrio* can be detected in high cell numbers during the summer months in the Baltic Sea, detection during the colder months is rare and winter reservoirs of this genus are largely unknown. The knowledge of potential winter reservoirs represents a key fact to understand the future development and dynamics of coastal *Vibrio* communities in the Baltic Sea at increasing water temperatures.

In my work, I used a combination of culture-independent genus-specific digital droplet PCR, Illumina 16S rRNA gene sequencing and culture-dependent quantification and strain isolation to evaluate the potential impact of invasive species on coastal *Vibrio* communities and to identify potential winter reservoirs. Water, sediment, seston and tissue samples from native fish species *Clupea harengus membras* (herring) und *Gadus morhua* (cod) as well as from the invasive *Neogobius melanostomus* (round goby) were analysed during two summer and winter

situations alongside the natural occurring salinity gradient of the German Baltic Sea coast. I was able to demonstrate, that *N. melanostomus* could act as a winter reservoir for *N. melanostomus*-specific *Vibrio* communities, including the potential human pathogen *V. vulnificus*. Given this finding, areas of high abundance of *N. melanostomus* represent a potential starting point for spreading *Vibrio* blooms during summer.

While the Baltic Sea is characterized by increasing water temperatures and invasive species, the subtropical / tropical island of Hainan has undergone strong anthropogenic impact from the increasing aquaculture industry over the last 50 years. Since several studies indicated that *Vibrio*, especially pathogenic species, can be enriched by aquaculture, the release of unfiltered aquaculture wastewater might influence coastal *Vibrio* communities in the area of Hainan. To test this hypothesis, water, sediment, sea grass and tissue samples of cultivated animals from several coastal transects, aquacultures and one estuary were analysed by Illumina 16S rRNA sequencing.

The results showed that *Vibrio* communities were influenced inside aquacultures depending on the operational system. While classical pond aquaculture system significantly reduced both the relative *Vibrio* 16S rRNA gene abundance and *Vibrio* diversity compared to the coast, the continuous aquaculture systems was characterised by an elevated relative *Vibrio* 16S rRNA gene abundance with similar *Vibrio* diversity to the coast. While the release of aquaculture-respective wastewater could theoretically change coastal *Vibrio* communities, such an effect was not detected during my studies.

The results of my thesis showed that anthropogenic factors have the potential to impact coastal *Vibrio* communities. This represents an important step in the understanding of the relationship between potential pathogenic bacteria and human influence.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	I-II
Abstract	III-IV
Inhaltsverzeichnis	V-IX
1 Einleitung.....	1-18
1.1 Eigenschaften und Verbreitung der Gattung <i>Vibrio</i>	1-2
1.2 <i>Vibrio</i> spp. in höheren Lebewesen	2-3
1.3 Pathogene <i>Vibrio</i> spp. in Aquakulturen.....	3-4
1.4 Humanpathogene <i>Vibrio</i> spp.	4-6
1.5 Virulenz und Pathogenität von <i>Vibrio vulnificus</i>	6-8
1.6 Geographische Verteilung von Vibriosen	9-10
1.7 <i>Vibrio</i> spp. als Profiteur anthropogener Veränderungen	10-11
1.8 Erderwärmung und extreme Wetterphänomene erhöhen Vibriosen	11-12
1.9 Gesteigerte Vibriosen durch Ausbau von Aquakulturen und invasiven Arten	12-13
1.10 Temperatur- und Salinitätsunterschiede charakterisieren das <i>Vibrio</i> -Habitat Ostsee	13-15
1.11 Invasive Arten wie <i>Neogobius melanostomus</i> als Rückzugsgebiet für <i>Vibrio</i> spp. in der Ostsee	15-16
1.12 <i>Vibrio</i> spp. in Aquakulturen auf der Insel Hainan	16-17
1.13 Fragestellungen der Promotion	17-18

2	Material und Methoden	19-32
2.1	Probenahme südliche Ostsee	19
2.2	Probenahme Hainan	20-21
2.3	Spezifizierung der Aquakulturen und geführte Interviews mit den Besitzern	21
2.4	Probenvorbereitung	22
2.5	Kultivierungsbasierte Quantifizierung von <i>Vibrio</i> spp.	23
2.6	<i>Vibrio</i> spp.-Anreicherung bei niedrigen <i>in situ</i> -Zellzahlen	23
2.7	Artbestimmung der <i>Vibrio</i> -Isolate durch MALDI-ToF-MS	24
2.8	DNS-Extraktion aus Umwelt- und Gewebeproben	25
2.9	Quantifizierung von <i>Vibrio</i> spp. mittels digitaler Droplet PCR	25-26
2.10	Illumina-16S rRNS Gen-Sequenzierung, OTU-Bestimmung und –Quantifizierung	26-27
2.11	Erstellung eines Korrekturfaktors für die Quantifizierung von <i>Vibrio</i> spp. basierend auf Illumina-Sequenzierung	27-28
2.12	Gemeinschaftsanalysen auf Basis der Illumina-Daten und statistische Analyse.....	28-29
2.13	Phylogenetische Analysen der <i>Vibrio</i> -OTUs	30
2.14	Co-Occurence Netzwerk-Analysen	30
2.15	Nachweis von Virulenz-Genen in <i>Vibrio vulnificus</i>	30-31
2.16	Trockenmasse-Bestimmung	31
2.17	Theoretische Verteilung von <i>Vibrio</i> spp. in verschiedenen Ostseehabitaten eines Küstenabschnitts im Winter	31-32

3	Ergebnisse	33-68
3.1	Invasive Fischart <i>Neogobius melanostomus</i> als <i>Vibrio</i> -Träger in der südlichen Ostsee	33-46
3.1.1	Umweltbedingungen südliche Ostsee	33-34
3.1.2	<i>Vibrio</i> spp.-Abundanzen	34-40
3.1.2.1	Absolute <i>Vibrio</i> spp.-Quantifizierung	34-38
3.1.2.2	Relative <i>Vibrio</i> spp.-Quantifizierung	38-39
3.1.2.3	Korrekturfaktoren für <i>in silico</i> verbesserte <i>Vibrio</i> -spezifische ddPCR	39-40
3.1.3	Gesamte bakterielle Gemeinschaft und <i>Vibrio</i> -Gemeinschaften in Fischen und anderen Umweltmaterialien	40-42
3.1.4	<i>Vibrio</i> -Artenzusammensetzung auf Basis der Kultivierung	42-44
3.1.5	Auftretende opportunistische Virulenz-Gene in <i>Vibrio vulnificus</i> ..	44-45
3.1.6	<i>Vibrio</i> -Last in <i>N. melanostomus</i> im Vergleich zu anderen untersuchten Materialien in einem Küstensegment im Winter.....	45-46
3.2	Aquakulturen als Einflussfaktor für <i>Vibrio</i> -Gemeinschaften in Hainan	47-68
3.2.1	Umweltbedingungen Hainan.....	47-48
3.2.2	Bakterielle Gemeinschaften in verschiedenen Habitaten in Hainan ..	48-51
3.2.3	Verteilung potentiell humanpathogener bakterieller Gruppen.....	51-56
3.2.4	<i>Vibrio</i> -Gemeinschaften in verschiedenen Habitaten in Hainan	56-59
3.2.5	Einfluss physikalischer Parameter auf <i>Vibrio</i> -Gemeinschaften im Wasser.....	59-62
3.2.6	Diversität von <i>Vibrio</i> -Gemeinschaften in verschiedenen Habitaten..	62-65
3.2.7	Wechselbeziehungen zwischen Vibrionen und assoziierten Bakterien in Aquakulturen und Küstengebieten.....	66-68

4	Diskussion	69-92
4.1	Anthropogene Faktoren beeinflussen <i>Vibrio</i> -Küstengemeinschaften	69-70
4.2	Invasive Arten als neues Reservoir pathogener Vibrionen.....	70-71
4.3	Aquakulturen als Anreicherungsmöglichkeit und Einflussfaktor von <i>Vibrio</i> -Küstengemeinschaften	71-73
4.4	Anreicherung von <i>Vibrio</i> spp. in tierischem Gewebe.....	73-75
4.5	Tiere beeinflussen <i>Vibrio</i> -Gemeinschaft	75-76
4.6	Die Lebensweise von Fischen beeinflusst assoziierte <i>Vibrio</i> -Gemeinschaften.....	76-78
4.7	Einfluss physikochemischer Eigenschaften auf Vibrionen	78-83
4.7.1	Wassertemperatur als Einfluss auf <i>Vibrio</i> -Populationen und mögliche Winterreservoir in gemäßigten Breiten	78-80
4.7.2	Salinität als bestimmender Faktor der <i>Vibrio</i> -Zusammensetzung	81-82
4.7.3	Phosphat als bestimmender Faktor für <i>Vibrio</i> -Gemeinschaften in Aquakulturen.....	82-83
4.8	Aufreinigung von Aquakulturabwässern zur Verringerung der <i>Vibrio</i> -Abundanz	83
4.9	Seegrass als natürlicher <i>Vibrio</i> -Filter.....	84-85
4.10	Anreicherung weiterer potentieller humanpathogener Bakterien in Aquakulturen	85-86
4.11	<i>Vibrio</i> als Teil eines bakteriellen Netzwerkes in Aquakulturen	86-88
4.12	Verteilung opportunistischer Virulenz-Faktoren in <i>V. vulnificus</i>	88-89
4.13	Zusammenfassung und Ausblick.....	90-92

5	Anhang	A1-A62
5.1	Referenzen	A1-A22
5.2	Zusatzdaten	A23-A52
5.3	Abkürzungsverzeichnis	A53-A54
5.4	Abbildungsverzeichnis	A55-A56
5.5	Tabellenverzeichnis	A57
5.6	Danksagung	A58
5.7	Selbständigkeitserklärung.....	A59
5.8	Curriculum Vitae des Autors	A60-62

1 Einleitung

1.1 Eigenschaften und Verbreitung der Gattung *Vibrio*

Die Gattung *Vibrio* wurde mit der Art *Vibrio cholerae* durch den italienischen Anatom Filippo Pacini im Jahr 1854 beschrieben, während er einen Ausbruch der Durchfallerkrankung Cholera in Florenz untersuchte (Pacini 1854). *Vibrio* stellt damit eine der ältesten beschriebenen bakteriellen Gattungen dar und umfasst inzwischen mehr als 130 beschriebene Arten (Gomez-Gil *et al.* 2013). Vibrionen, also Spezies der Gattung *Vibrio*, gehören zur Gruppe der *Gammaproteobacteria*, sind gramnegative, üblicherweise bewegliche, leicht gekrümmte Stäbchen und zeichnen sich durch einen fakultativ anaeroben Stoffwechsel aus (Abb. 1.1). Sie sind mesophil und bis auf wenige Ausnahmen, zu denen *V. cholerae* (Vital *et al.* 2007) und *V. mimicus* (Davis *et al.* 1981) zählen, halophil. Ihr Genom ist durch eine hohe genetische Flexibilität charakterisiert (Dryselius *et al.* 2007, Hazen *et al.* 2010) und besteht meist aus zwei verschieden großen, zirkulären Chromosomen (Okada *et al.* 2005).

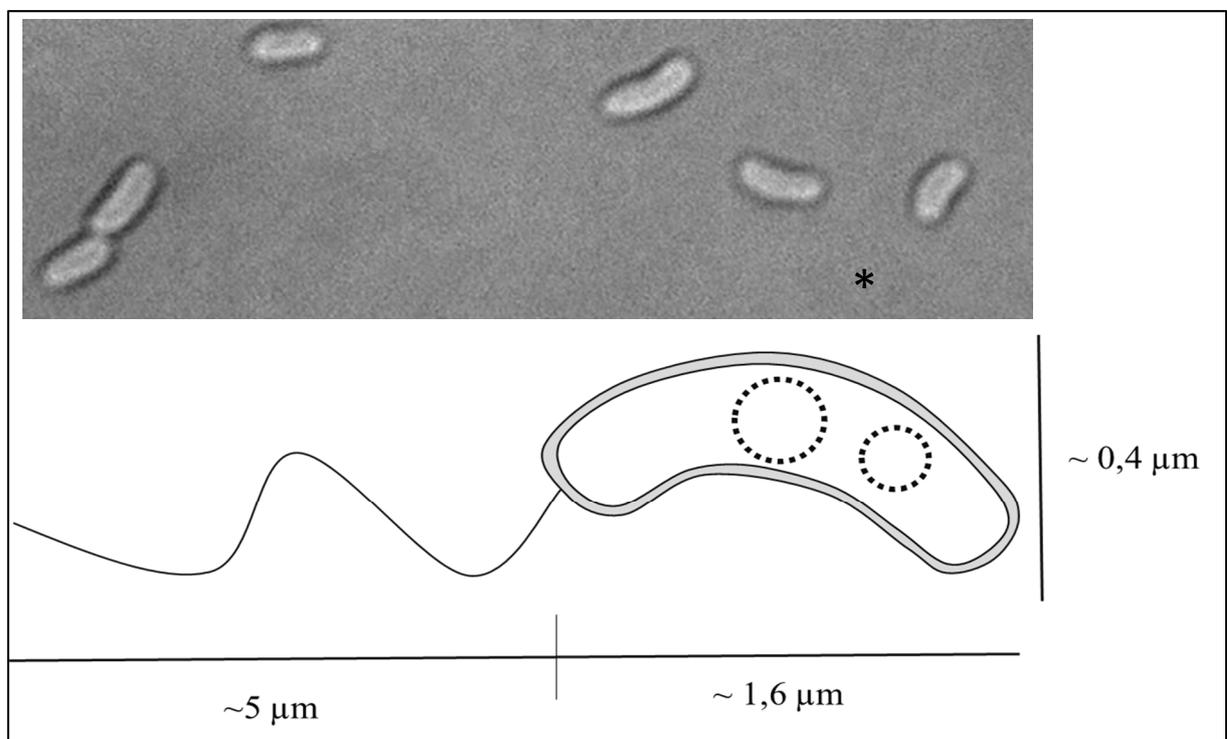


Abbildung 1.1: Mikroskopisches Bild und schematische Darstellung einer *Vibrio cholerae*-Zelle. Diese Art besitzt zwei verschieden große, zirkuläre Chromosomen. Das größere Chromosom besteht aus ca. 3 Megabasenpaaren (Mbp), das kleinere Chromosom aus ca. 1,1 Mbp (Tagomori *et al.* 2002).
* Bild modifiziert aus (Bruhn *et al.* 2018).

Diese Flexibilität spiegelt sich in der hohen ökologischen Bandbreite an Funktionen wieder, sowie der Fähigkeit, auf sich verändernde Umweltbedingungen zu reagieren (Thompson *et al.* 2010). Vibrionen sind unter anderem in der Lage, verschiedene gelöste, organische Verbindungen zu nutzen und dem Stoffkreislauf erneut zuzuführen (Zhang *et al.* 2018). So können einige Arten Polymere wie Chitin, einer der häufigsten Biopolymere und das größte Reservoir für Aminoglykoside im Meer (Jeuniaux und Voss-Foucart 1991), in seine Bestandteile zerlegen (Hunt *et al.* 2008). Ebenso synthetisieren einige Stämme für aquatische Organismen essentielle ungesättigte Fettsäuren (Hamamoto *et al.* 1994, Kanazawa *et al.* 1979), oder sind befähigt, Luftstickstoff zu fixieren (Criminger *et al.* 2007, Urdaci *et al.* 1988). Dies macht Vibrionen zu potentiellen Schlüsselorganismen in aquatischen Nährstoffkreisläufen. Die Gattung *Vibrio* ist ubiquitär in allen aquatischen Systemen verbreitet, und Vertreter leben frei vorkommend im Wasser (Thompson *et al.* 2004), im Sediment (Givens *et al.* 2014) oder auf der Oberfläche von Partikeln (Oberbeckmann *et al.* 2011b). Ebenso sind Vibrionen auf der Oberfläche und in Organen von höheren Lebewesen präsent, worunter Korallen, Muscheln, Schwämme, Krebse und Fische fallen (Bibi *et al.* 2020, Givens *et al.* 2014, Noguchi *et al.* 1987, Thompson *et al.* 2005, Vandenberghe *et al.* 1999).

1.2 *Vibrio* spp. in höheren Lebewesen

Vibrionen sind in der Lage, mit vielen verschiedenen höheren Organismen in Wechselwirkung zu treten. Dabei reichen die Beziehungen von symbiotisch bis hin zu pathogen. Ersteres zeigt sich in Schwämmen der Art *Suberea mollis*. In diesen produzieren symbiotische *Vibrio* spp.-Stämme antibiotische Substanzen, die den Wirt vor einer Reihe von pathogenen Bakterien und Pilzen schützen (Bibi *et al.* 2020) .

Ebenso stellen Vibrionen einen natürlichen Bestandteil auf der Oberfläche von Tieren dar. So ist *V. cholerae* auf der Chitin-Oberfläche von Copepoden zu finden (Kirschner *et al.* 2011), und in gesunden Korallen stellen Vibrionen einen Teil der natürlichen vorkommenden bakteriellen Oberflächengemeinschaft dar (Tout *et al.* 2015). In Fischen können sie einen bedeutenden Bestandteil der Magen-Darm-Flora ausmachen (Egerton *et al.* 2018, Tapia-Paniagua *et al.* 2019).

Neben solchen symbiotischen oder kommensalischen Wechselwirkungen zwischen Wirt und Vibrionen, ist eine Vielzahl an verschiedenen potentiellen pathogenen *Vibrio*-Arten bekannt. Diese können verschiedene Organismen infizieren. So wurden unter anderem aus abgestorbenen Korallen die Art *V. coralliilyticus* isoliert und als Verursacher von

Korallenbleichen ausgemacht (Ben-Haim *et al.* 2003). *V. vulnificus* verursacht in Süßwasseraalen akute hämorrhagische Sepsis (Valiente *et al.* 2008). *V. harveyi* kann die *Tail-Rot-Disease* und das *Bright-Red-Syndrom* in kultivierten Goldbrassen bzw. in Shrimps hervorrufen (Haldar *et al.* 2010, Soto-Rodriguez *et al.* 2012). Ebenso verursacht *V. alginolyticus* Infektionen in Shrimps und kultivierten Fischen (Lee *et al.* 1996, Liu *et al.* 2004). Durch diese Fülle an Infektionen, die diese Gattung in kultivierten Tieren verursachen kann, nehmen Vibrionen eine wichtige Stellung als Pathogene in Aquakulturen ein.

1.3 Pathogene *Vibrio* spp. in Aquakulturen

Aquakulturen stellen einen der am stärksten wachsenden Industriezweige weltweit dar und ihre Bedeutung wird in Zukunft weiter zunehmen, um die steigende Nachfrage nach Fisch und Meeresfrüchten zu decken. Allein in China wuchs dieser Industriezweig im Zeitraum von 2000 – 2017 um 150%, was einen Weltmarktanteil von 58% der Produktion ausmacht (FAO 2019). Dies entspricht 46,8 Millionen Tonnen an kultivierten Organismen pro Jahr. Obwohl der Einsatz von Aquakulturen in der Theorie positive Auswirkungen, wie den Schutz bestehender Fischbestände vor Überfischung, hat, können sie in der Praxis zu schweren Umweltproblemen führen. Dazu zählen unter anderen die Freisetzung von Nährstoffen und damit einhergehende Eutrophierung (Herbeck *et al.* 2013), chemische Verschmutzung (Boyd und Massaut 1999) und die Anreicherung und Freisetzung von potentiell pathogenen Bakterien, inklusive *Vibrio* spp. (Agnes *et al.* 1998, Corea 2019). Vibrionen scheinen von den in der Aquakultur vorherrschenden Bedingungen besonders profitieren zu können, was sich in deren hohen Abundanz in Aquakulturteichen widerspiegelt, speziell bei auftretenden Infektionen (Karunasagar *et al.* 1994, Sung *et al.* 2001). Vibrionen sind für eine Reihe von in Aquakulturen vorkommenden Krankheiten (Vibriosen) verantwortlich (Jayasree *et al.* 2006). Der Befall tritt oft früh in den Larvenstadien der gezüchteten Organismen auf und kann in kurzer Zeit zum Absterben eines Großteils der Tiere führen (Diggles *et al.* 2000, Handler *et al.* 2005, Karunasagar *et al.* 1994). Die kultivierbare Vibrionen-Gemeinschaft innerhalb dieser befallenen Aquakulturen ist dabei durch eine geringe Diversität charakterisiert, in der nur einzelne Arten dominieren. Diese beinhaltet unter anderem potentiell pathogene Arten wie *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* oder *V. harveyi* (Al-Harbi und Uddin 2005, Sung *et al.* 1999, Sung *et al.* 2001). Ein damit einhergehendes Resultat ist der gesteigerte Einsatz von Antibiotika innerhalb von Aquakulturen. So wurden in Norwegen große Mengen an Antibiotika eingesetzt, um das Auftreten von Kaltwasservibriosen (*V. salmonicida*, heute

Aliivibrio salmonicida) und akute hämorrhagische Sepsis (*V. anguillarum*, heute *Listonella anguillarum*) in der marinen Lachszucht zu verhindern (Grave *et al.* 1996, Grave *et al.* 1999, Lillehaug *et al.* 2003). Bis zum Jahr 1992 stieg dabei der jährliche Antibiotika-Einsatz in Aquakulturen in Norwegen auf bis zu 27.485 kg (Grave *et al.* 1996, Grave *et al.* 1999). Dies änderte sich erst durch den Einsatz von besseren Hygienemaßnahmen, der stärkeren Regulierung von Antibiotika und vorrangig durch den Einsatz von Impfungen für kultivierte Fische. Dies führte in zwei Jahren zu einem verringerten Einsatz von Antibiotika um ca. 95% (1.396 kg), bei einer gleichzeitigen Produktionssteigerung von 100% (Grave *et al.* 1996, Grave *et al.* 1999). Jedoch stellen Vibrionen immer noch einen weltweiten prominenten Faktor in der Aquakulturindustrie dar, da Impfungen nur für wenige kultivierte Fische zur Verfügung stehen (Angelidis *et al.* 2006, Crosbie und Nowak 2004, Esteve-Gassent *et al.* 2004). Allein in der Shrimps-Zucht verursachen Vibrionen geschätzte jährliche Schäden in Milliardenhöhe (Shinn *et al.* 2018). Zusätzlich bergen ungefiltert in die Umwelt abgegebene Abwässer aus Aquakulturen Risiken. Neben der Freisetzung von Nährstoffen und der daraus folgenden Eutrophierung (Herbeck *et al.* 2013), kann durch die Freisetzung von mit *Vibrio* spp. angereicherten Abwässern auch eine Gefahr für Tiere und auch den Menschen entstehen, da innerhalb dieser Gattung auch humanpathogene Arten vorkommen.

1.4 Humanpathogene *Vibrio* spp.

Neben Pathogenen, welche Tiere infizieren, umfasst die Gattung *Vibrio* mehr als ein Dutzend Arten (Tab. 1.1), die mit menschlichen Infektionen in Verbindung gebracht werden (CDC 2020c, Farmer III und Hickman-Brenner 2006). Die dabei wichtigsten pathogenen Arten stellen *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus* und *Vibrio vulnificus* dar. Dabei ist die prominenteste Art, die gleichzeitig auch den größten Anteil an durch Vibrionen verursachten Infektionen weltweit verursacht, *Vibrio cholerae*, der Erreger der Cholera. In einer Studie von Ali *et al.* (2015) wurde berechnet, dass weltweit ca. 2,86 Millionen Menschen jährlich an Cholera erkranken, wovon ca. 95.000 Personen sterben. Allerdings muss innerhalb dieser Art differenziert werden. So sind nur zwei der mehr als 100 existierenden Serotypen in der Lage, pandemische Cholera zu verursachen (Shimada *et al.* 1994, Qadri *et al.* 1995, WHO 1993). Dabei handelt es sich um die Serotypen O1 und O139. Aus diesem Grund erfolgt in der Literatur oft eine Einteilung von humanpathogenen *V. cholerae* -Serotypen in Cholera- und nicht Cholera-verursachende pathogene *V. cholerae*-Serotypen (Baker-Austin *et al.* 2017, Huehn *et al.* 2014).

Tabelle 1.1: Übersicht über humanpathogene *Vibrio*-Arten sowie ihren Nachweis in klinischen Proben. Die Symbole spiegeln die relative Häufigkeit wieder, mit der die entsprechende Art in klinischen Proben nachgewiesen wurde. Das Symbol (/) bedeutet, dass nicht genügend Informationen für eine Abschätzung des üblichen Vorkommens vorliegen. Modifiziert nach (CDC 2020c, Farmer Iii und Hickman-Brenner 2006)

Vibrio-Art	Auftreten in klinischen Proben	
	Intestinal	Extraintestinal
<i>V. alginolyticus</i>	+	++
<i>V. carchariae</i>	-	+
<i>V. campbellii</i>	(/)	(/)
<i>V. cholerae</i>		
Serogruppe O1, O139	++++	+
Serogruppe nicht O1, O139	++	++
<i>V. cincinnatiensis</i>	-	+
<i>V. fluvialis</i>	++	-
<i>V. furnissii</i>	++	-
<i>V. harvey</i>	(/)	(/)
<i>V. metoecus</i>	(/)	(/)
<i>V. metschnikovii</i>	-	+
<i>V. mimicus</i>	++	+
<i>V. navarrensis</i>	(/)	(/)
<i>V. parahaemolyticus</i>	++++	+
<i>V. vulnificus</i>	+	+++

Nach *V. cholerae* ist die Art *V. parahaemolyticus* für den Großteil an Vibriosen im Menschen verantwortlich. Dabei verursacht diese Art typischerweise Lebensmittelvergiftungen, die in den meisten Fällen mild ablaufen und nach wenigen Tagen bei nicht immunsupprimierten Personen selbständig ausheilen (Daniels *et al.* 2000, Qadri *et al.* 2003). Allein in den USA erkrankten jährlich schätzungsweise 45.000 Menschen an *V. parahaemolyticus* (CDC 2020c). In Südostasien spielt *V. parahaemolyticus* als Lebensmittelpathogen ebenfalls eine wichtige Rolle und ist für ca. 20% der Lebensmittelvergiftungen in diesen Regionen verantwortlich, meist hervorgerufen durch den Konsum von rohem oder unzureichend gegartem Fisch und Meeresfrüchten (Diseases 2011, Jahangir Alam *et al.* 2002, WHO und FAO 2011b). Im

Vergleich zu den Zahlen, der durch *V. parahaemolyticus* hervorgerufenen Erkrankungen, tritt eine Infektion durch *V. vulnificus* deutlich seltener auf. So sind in Japan bei einer Umfrage von 1.693 Krankenhäusern für den Zeitraum von 1999 bis 2003 nur 94 Fälle mit dieser Art registriert worden (Inoue *et al.* 2008). In den USA belaufen sich die Zahlen auf ca. 100 Fälle pro Jahr (CDC 2020c) und in Deutschland werden üblicherweise weniger als 10 Fälle jährlich registriert (LAGuS M-V 2020). Obwohl Infektionen durch *V. vulnificus* selten sind, laufen diese im Vergleich zu Infektionen anderen Vibrionen meist schwerwiegend ab, und die Letalität kann auch bei Behandlung bei über 50% liegen (Hlady und Klontz 1996, Inoue *et al.* 2008). Dadurch ist diese Art trotz ihrer geringen Fallzahl für die meisten Tode durch Vibriosen in den USA verantwortlich (CDC 2020c). Übertragungswege sind primär der Konsum von nicht oder nur unzulänglich gegarten Meeresfrüchten wie Austern, sowie Kontakt von Wunden mit Meereswasser (Hlady und Klontz 1996). Die sich dabei typischerweise ausbildenden klinischen Syndrome sind Gastroenteritis, Wundinfektionen und primäre Sepsis. Die bei Infektionen durch *V. vulnificus* auftretende hohe Letalität und das weltweite Vorkommen dieser Art stehen im Kontrast zu der geringen Anzahl an registrierten Infektionen. Eine Diskrepanz, die sich nur teilweise durch die Rolle von *V. vulnificus* als opportunistischer Pathogen erklären lässt.

1.5 Virulenz und Pathogenität von *Vibrio vulnificus*

In Tierversuchen hat sich gezeigt, dass sämtliche *V. vulnificus*-Stämme in der Lage sind, tödliche Infektionen zu verursachen (Starks *et al.* 2000). Sollte dies zutreffen, müsste aufgrund der weitläufigen Verbreitung dieser Art, die Anzahl an registrierten Infektionen weltweit jedoch deutlich größer sein, als sie ist. In den USA werden jedoch nur ca. 100 Fälle pro Jahr registriert. Ein Teil dieser Diskrepanz lässt sich durch die opportunistische Natur von *V. vulnificus* erklären. Infektionen treten selten in gesunden, immunkompetenten Personen auf. In mehr als 66% der Fälle (Dechet *et al.* 2008, Inoue *et al.* 2008, LAGuS M-V 2020) liegen chronische Erkrankungen, wie beispielsweise Leberzirrhose, Diabetes oder Immunschwächungen vor, was das Infektionsrisiko um das 80-fache steigert (CDC 1993). In einer Studie von Oliver (2005) wird berichtet, dass allein in den USA 12 – 30 Millionen Einwohner Teil dieser Risikogruppen waren. Gleichzeitig essen schätzungsweise 10 - 20% aller Amerikaner mindestens einmal pro Jahr rohe Schalentiere und 80 Millionen Portionen rohe Auster werden pro Jahr von 20 Millionen Amerikaner konsumiert (Oliver 2005, WHO und FAO 2011a). Dabei lagen die Fallzahlen bei nur ca. 20 tödlichen Infektionen im Jahr. Aus dieser Betrachtung ergab sich die

Theorie, dass möglicherweise weitere, bisher unbekannte Risikofaktoren für eine im Menschen auftretende Infektion nötig sind.

Ebenso ist es wahrscheinlich, dass kritische und essentielle Virulenz-Faktoren in Stämmen auftreten müssen, damit eine Infektion im Menschen überhaupt erst möglich ist.

Auf der Suche nach einem Weg, virulente Stämme von „nicht-virulenten“ Formen zu unterscheiden, zeigte sich, dass signifikante genomische Unterschiede in *V. vulnificus* Stämmen existieren (Aznar *et al.* 1994, Chatzidaki-Livanis *et al.* 2006a, Nilsson *et al.* 2003, Rosche *et al.* 2005).

So weist das *Virulence-correlated gene* (vcg), welches konstitutiv in *V. vulnificus* vorkommt, und vermutlich nicht selbst an dessen Virulenz beteiligt ist, zwei distinkte Formen auf (Rosche *et al.* 2005). Diese korrelieren stark mit dem Vorkommen der Stämme aus Umwelt- und klinischen Proben. Der klinische Typ (vcgC) tritt dabei häufiger (66-100%) in klinischen Isolaten auf, während der Umwelt-Typ (vcgE) häufiger in Umweltisolaten (59-93%) gefunden wird (Han *et al.* 2009, Rosche *et al.* 2005). Dies kann als starker Indikator für eine mögliche Virulenz gesehen werden. Im Mausexperiment zeigt sich jedoch erneut, dass beide Formen in der Lage sind, tödliche Infektionen zu verursachen (Starks *et al.* 2000), wobei lediglich Unterschiede in der für die Infektion erforderlichen Dosis auftreten. Auch sind Stämme des Umwelt-Typs bekannt, die im Menschen Infektionen verursachen (Han *et al.* 2009). Dies deutet darauf hin, dass, obwohl der Dimorphismus einen möglichen Indikator darstellt, die Präsenz von Virulenz-Faktoren entscheidend ist.

Zur Unterscheidung von pathogenen und apathogenen Bakterien wird üblicherweise das Prinzip der Virulenz-Gene verwendet. Echte Virulenz-Gene definieren sich dabei als Gene, dessen Produkte in der Interaktion mit dem Wirt in Verbindung stehen und für pathologischen Schaden verantwortlich sind. Abwesend sind sie dagegen in apathogenen Stämmen (Wassenaar und Gastra 2001). Ein typisches Beispiel für einen solchen Virulenz-Faktor stellt das Cholera-Toxin von *V. cholerae* Serotyp O1/O139 dar, dass für die Krankheit Cholera essentiell ist (Hall *et al.* 1994, Holmgren 1981). Da jedoch *V. vulnificus*-Stämme prinzipiell pathogen sind, wird das Prinzip der echten Virulenz-Faktoren für die weitere Betrachtung angepasst und folgend von opportunistischen Virulenz-Faktoren gesprochen. Diese haben eine Virulenz-fördernde Wirkung, wohingegen die Abwesenheit zu einer Reduzierung der Virulenz führt (Wassenaar und Gastra 2001). Ebenso treten sie typischerweise in klinischen Isolaten häufiger auf und sind selten in Umweltstämmen vertreten. Daher werden allgemeine strukturelle Komponenten von Zellen, wie Lipopolysaccharide (LPS) nicht beachtet, obwohl dieses Endotoxin in *V. vulnificus* höchst wahrscheinlich einen Virulenz-Faktor darstellt. LPS ist in *V. vulnificus* für die

Ausbildung eines endotoxischen Schocks und den damit verbundenen Tod des Wirtes verantwortlich (McPherson *et al.* 1991, Merkel *et al.* 2001).

Die Suche nach opportunistischen Virulenz-Faktoren erweist sich bei *V. vulnificus* als schwierig. Bis heute sind die Pathogenität und die für diese erforderlichen Virulenz-Faktoren von *V. vulnificus* noch nicht vollständig geklärt. Einige wenige werden jedoch als absolut notwendig angesehen, um eine Infektion im Menschen hervorzurufen und um diesen als stark pathogenen Stamm zu charakterisieren.

Die Ausbildung von Kapseln stellt einen solchen Faktor dar. Kapseln dienen dem Ausweichen der Immunantwort und erlauben das Überleben des Bakteriums im Wirt (Simpson *et al.* 1987, Tamplin *et al.* 1985). Dabei zeigen klinische Stämme von *V. vulnificus* spezifische Unterschiede in der Operon-Sequenz der kapsulären Polysaccharide (CPS) gegenüber Umweltstämmen, die in Form des hypothetischen Proteins 1 (HP1-Allel) in 87% alle klinischen Isolate vertreten sind (Chatzidaki-Livanis *et al.* 2006b).

Einen weiteren wichtigen opportunistischen Virulenz-Faktor stellen Siderophore dar, wovon *V. vulnificus* zwei Formen besitzt, Hydroxymate und Catechole. Dabei stellen letztere in Form des Vulnibactins, codiert durch das Gen *viuB*, den wichtigeren Faktor für die Eisenaufnahme dieses Organismus und damit der Virulenz dar (Kim *et al.* 2006, Simpson und Oliver 1983). Eisen liegt im Körper üblicherweise in gebundener Form vor und steht damit eindringenden Bakterien nicht für den Stoffwechsel zur Verfügung (Cassat und Skaar 2013, Johnson und Wessling-Resnick 2012). Diese Form des angeborenen Immunsystems kann jedoch durch *V. vulnificus* in Form von Vulnibactin umgangen werden, da dieses Eisen von körpereigenen Bindeproteinen wie Transferrin entfernen kann (Simpson und Oliver 1987).

Toxine sind für die Ausprägung einer Infektion ebenfalls essentiell und gehören damit zu den opportunistischen Virulenz-Faktoren. Für *V. vulnificus* ist dies das proteinogene RTX-Toxin, exprimiert aus entsprechenden RTX-Genen, welche ebenso in anderen Vibrionen wie *V. cholerae* und *V. parahemolyticus* vertreten sein können (Lin *et al.* 1999, Makino *et al.* 2003, Pérez-Reytor *et al.* 2018). RTX ist das Haupttoxin von *V. vulnificus*, welches für Zellschäden im Wirt verantwortlich gemacht wird und eine wesentliche Rolle bei der Ausbildung systemischer Infektionen spielt (Chung *et al.* 2010, Kim *et al.* 2008, Lee *et al.* 2007).

Neben diesen drei Kriterien werden weitere potentielle Schlüssel-Virulenz-Faktoren in der Literatur diskutiert, zu denen unter anderem Gene für Pili, Flagellen und Hämolyse gehören (Paranjpye und Strom 2005, Kim und Rhee 2003, Wright und Morris 1991). Aus diesem Grund kann nicht ausgeschlossen werden, das HP1, RTX und Vulnibactin, die einzigen Virulenz-

Faktoren in höherpathogenen *V. vulnificus*-Stämmen darstellen, doch repräsentieren sie einen möglichen notwendigen Grundstock.

1.6 Geographische Verteilung von Vibriosen

Trotz der ubiquitären Verbreitung von Vibrionen ist die Rolle als wichtiger Humanpathogen auf der Welt nicht gleichmäßig verteilt und einer geographischen Aufteilung unterworfen. Vibrionen zählen typischerweise als Pathogene der Subtropen und Tropen. So spielt *V. cholerae* als Auslöser der Cholera vor allem in der Nähe des Äquators eine Rolle (Abb. 1.2) (WHO 2020a). Fälle von Cholera in Ländern der gemäßigten Breitengrade stehen oft mit Reisen in tropische Risikogebiete in Verbindung (ECDC 2020, Hlady und Klontz 1996).

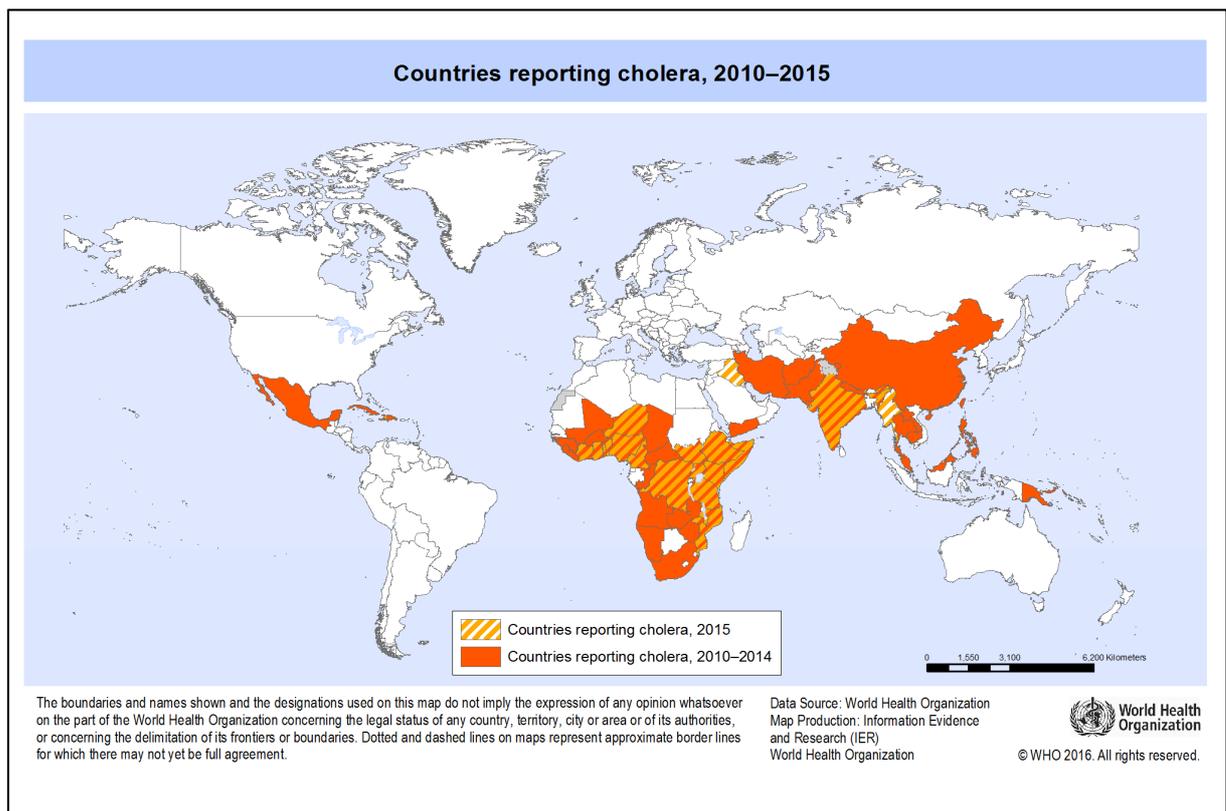


Abbildung 1.2: WHO-Karte auftretender Cholera-Fälle im Zeitraum 2010-2015. (Mit Erlaubnis der WHO verwendet.)

Doch auch bei nicht Cholera verursachenden humanpathogenen Vibrionen ist zu erkennen, dass diese häufiger in subtropischen oder tropischen Breiten wie der Golfküste der USA auftreten (Hlady und Klontz 1996, Huang *et al.* 2016). In gemäßigten und sub-arktischen Bereichen wie Nordeuropa, Nordwest-Südamerika oder den Nordosten der USA sind *Vibrio*-Infektionen

selten, so dass die Infektionszahlen gering und ihr Auftreten als ungewöhnlich angesehen wird (Baker-Austin *et al.* 2013, Baker-Austin *et al.* 2016, Córdova *et al.* 2002, González-Escalona *et al.* 2005). Ein Grund dafür liegt in der positiven Korrelation von wichtigen humanpathogenen Vertretern (*V. vulnificus*, *V. parahaemolyticus*, *V. cholerae* und *V. alginolyticus*) mit einer steigenden Wassertemperatur. Dabei gilt als Schwellenwert eine Temperatur von 15-20 °C, ab der diese sich besonders stark vermehren (Böer *et al.* 2012, Böer *et al.* 2013, Kaspar und Tamplin 1993). Ebenso scheint die Pathogenität von Vibrionen direkt von der Temperatur beeinflusst zu werden und mit steigender Temperatur zuzunehmen (Kimes *et al.* 2012, Montánchez *et al.* 2019).

1.7 *Vibrio* spp. als Profiteur anthropogener Veränderungen

Die Nutzung fossiler Brennstoffe, der immer stärkere Ausbau mariner Habitats durch den Menschen, verstärkte Globalisierung und Transport haben deutliche Spuren in der Natur hinterlassen (Dukes und Mooney 1999, Ren *et al.* 2019, Yao *et al.* 2017). Dies beeinflusst nicht nur die Tier und Pflanzenwelt, sondern kann auch Auswirkungen auf bakterielle Gemeinschaften haben (Manzari *et al.* 2015, Ramírez *et al.* 2017, Vezzulli *et al.* 2012).

Verschiedene Studien haben gezeigt, dass durch anhaltende anthropogen bedingte Veränderungen von marinen Ökosystemen, die Bedeutung von Vibrionen für den Menschen steigen könnte. Die Erwärmung der Weltmeere, extreme Wetterphänomene, Verbreitung von invasiven Arten, sowie der Ausbau von Küstenstrukturen können Einfluss auf *Vibrio*-Populationen und damit auch negative Auswirkungen auf Mensch und Umwelt haben (Baker-Austin *et al.* 2013, Martínez-Urtaza *et al.* 2010, Vezzulli *et al.* 2012). Dabei werden Vibrionen neben einer gesteigerten Rolle als wichtiger Einflussfaktor für Wirtschaft und Umwelt, auch eine gesteigerte Bedeutung als wichtiger Humanpathogen zuteil. Deutlich wird dies unter anderem an den steigenden Infektionszahlen durch nicht Cholera verursachenden Vibrionen in den USA. Im Vergleich zu anderen Lebensmittelpathogenen, wie *Salmonella* oder *Shigella*, die im Zeitraum von 1996 – 2014 konstant bzw. rückläufig waren (CDC 2020a, CDC 2020b), wiesen Vibrionen einen exponentiellen Anstieg in den Infektionszahlen auf (Abb. 1.3) (CDC 2020c).

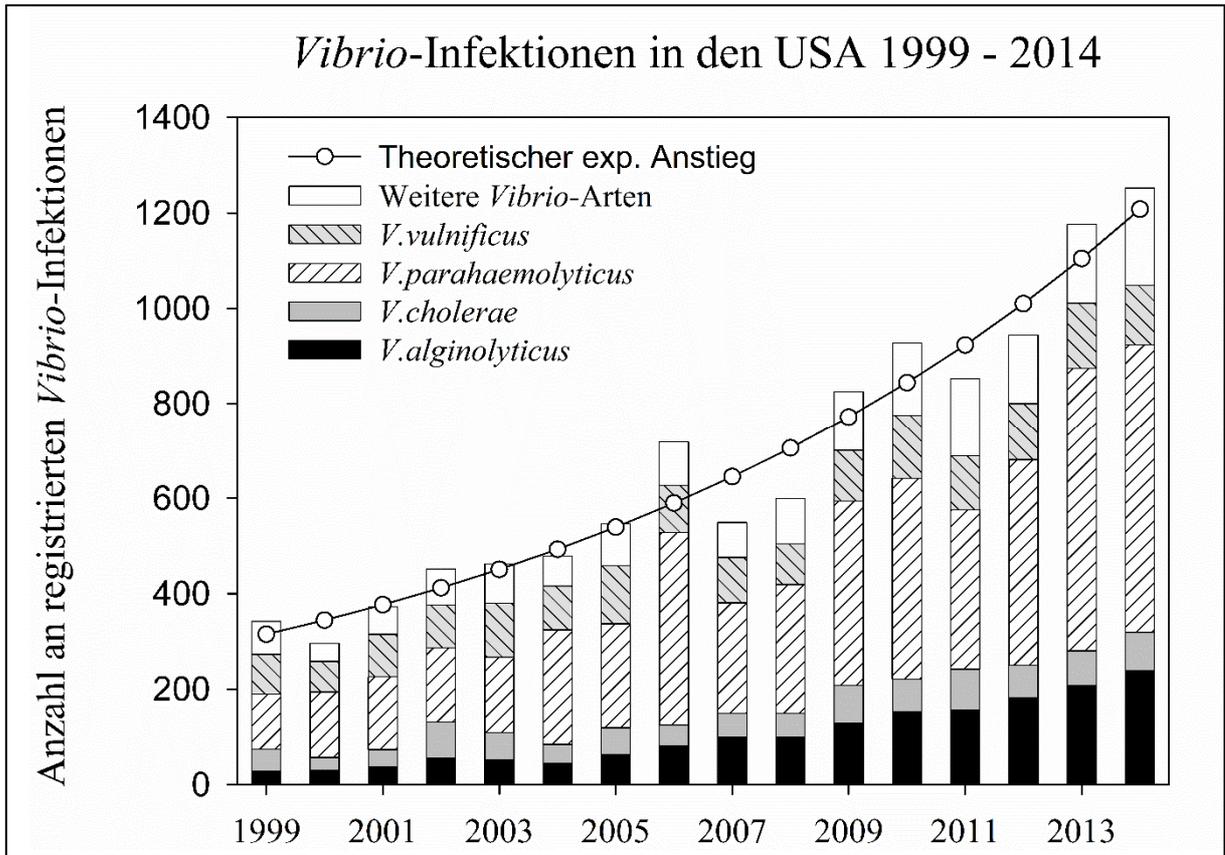


Abbildung 1.3: Anzahl der registrierten Infektionen, durch nicht Cholera verursachende Vibriolen in den USA im Zeitraum von 1999 – 2014. Die Trendlinie repräsentiert einen theoretisch angenommenen exponentiellen Anstieg. Ermittelt aus den Daten von *COVIS annual summaries on human Vibrio cases reported to CDC* (Centers for Disease Control and Prevention).

1.8 Erderwärmung und extreme Wetterphänomene erhöhen Vibriosen

Da die Abundanzen wichtiger humanpathogener *Vibrio* spp. positiv mit der Wassertemperatur korrelieren (Böer *et al.* 2012, Böer *et al.* 2013, Kaspar und Tamplin 1993), führen die globale Erwärmung und der damit einhergehende Anstieg der Meerestemperatur vermutlich zur zukünftigen Zunahme von Vibriosen (Baker-Austin *et al.* 2013, Vezzulli *et al.* 2012). Deutlich wird dies in Ländern der gemäßigten und sub-arktischen Bereiche, die gesteigerte Infektionszahlen verzeichnen. Beispielsweise wurden in verschiedenen Anrainerländern der Ostsee ein Anstieg an Vibriosen registriert, speziell in Jahren, die durch ungewöhnlich heiße Sommer charakterisiert waren (Baker-Austin *et al.* 2016, Hauk und Duty 2015). Neben ihrer Bedeutung als wichtige humanpathogene Bakterien, könnte die Bedeutung von *Vibrio* spp. als Krankheitserreger für Tiere und Korallen ebenfalls zunehmen. So wird durch die ansteigenden Wassertemperaturen die Pathogenität und Abundanz von *Vibrio coralliilyticus* auf Korallen

erhöht (Tout *et al.* 2015). Korallen besitzen neben wichtigen ökologischen und ökonomischen auch soziale Funktionen wie Freizeit, Erholung und Ästhetik. Ihr Wert wird dabei auf mehrere Milliarden Dollar geschätzt (Brander *et al.* 2007, Cesar *et al.* 2003). Verluste von Korallen durch Vibrionen könnten damit weitreichende Folgen haben.

Auch stehen extreme Wetterereignisse und Klimaanomalien, wie der in Südamerika vorkommende El-Niño-Effekt mit erhöhten Infektionszahlen durch *V. parahaemolyticus* und *V. vulnificus* in Verbindung (Martinez-Urtaza *et al.* 2010). Durch das gesteigerte Auftreten solcher extremen Wetteranomalien, wird die Anzahl an Infektionen in diesen Gebieten zukünftig vermutlich weiter steigen.

1.9 Gesteigerte Vibriosen durch Ausbau von Aquakulturen und invasiven Arten

Der Aspekt von Vibrionen als Tierpathogen beeinflusst auch die Rolle von Vibrionen in Aquakulturen. Durch den immer stärkeren Ausbau und die wirtschaftliche Nutzung von Aquakulturen kann der Einfluss auf den Menschen in Gebieten, die von Aquakulturen abhängig sind, zunehmen. So verursachen Vibrionen bereits jährlich Verluste in Milliardenhöhe in Form von Ernteaussfällen (Shinn *et al.* 2018). Gleichzeitig können mit Pathogenen angereicherte Abwässer aus Aquakulturen einen Effekt der „Selbstverschmutzung“ bewirken, der zum Ausbruch weiterer Infektionen in umliegenden Aquakulturen führt. (Agnes *et al.* 1998, Corea 2019).

Invasive Arten stellen ebenfalls einen direkten Ausdruck des anthropogen bedingten Klimawandels dar. Natürliche Barrieren, wie Kontinente, Gebirge und Flüsse, die Ökosysteme sowie Arten trennen, weichen immer stärker auf. Künstliche Flüsse und Kanäle schaffen neue Übergänge (Gollasch 2006, Leuven *et al.* 2009). In wenigen Wochen erreichen Schiffe fast jeden Winkel der Erde und transportieren in dem mitgeführten Ballastwasser einen Teil des ursprünglichen Ökosystems (Cariton und Geller 1993, Ghabooli *et al.* 2016). Schätzungen zufolge werden täglich bis zu 10.000 Arten an Tieren und Pflanzen im Ballastwasser von Schiffen transportiert (Carlton 1999). Durch den Lufttransport können in wenigen Stunden Tiere aus Aquakulturen neue Kontinente erreichen und mit ihnen assoziierte bakterielle Gemeinschaften (Minchin 2007). Da Vibrionen in Wechselwirkung mit vielen verschiedenen Organismen stehen, als natürlicher Bestandteil der Darmflora oder als Biofilm auf Oberflächen (Egerton *et al.* 2018, Kirschner *et al.* 2011), kann die Einschleppung von nicht indigenen Arten, einheimische Vibrionengemeinschaften potentiell beeinflussen. Studien im Mittelmeer sowie an der Ostküste der USA haben gezeigt, dass pathogene Vibrionen mit invasiven Algen in

Zusammenhang stehen und die Konzentration dieser Bakterien in küstennahen Gebieten steigern. Dies erhöht auch die potentielle Gefahr menschlicher Infektionen (Gonzalez *et al.* 2014, Rizzo *et al.* 2016). Ebenso zeigt sich dies in Studien von Martinez-Urtaza *et al.* (2008, 2010). In diesen wurde ein direkter Zusammenhang mit dem Transport von asiatischen Kopepoden an den Küsten vor Chile mit der Vermehrung von pathogenen *V. parahaemolyticus* und damit einhergehender Infektionen festgestellt. Der pathogene *V. parahaemolyticus* Serotyp O3:K6, der für die aufgetretenen Fälle verantwortlich war, ist üblicherweise im asiatischen Raum weit verbreitet (Chiou *et al.* 2000, Wong *et al.* 2000) und wurde vermutlich durch die invasive Kopepoden eingeschleppt. Damit stellen invasive Arten nicht nur ein Problem für die lokale Flora und Fauna dar (Molnar *et al.* 2008), sondern können auch als Vektor für pathogene *Vibrio*-Populationen dienen.

Obwohl anthropogene Einflüsse auf die Ökosysteme und damit auch auf Vibrionen prinzipiell globaler Natur sind, ist der potentielle Einfluss in bestimmten Regionen stärker ausgeprägt. Zu diesen stärker gefährdeten Gebieten zählen unter anderem die Ostsee sowie die chinesische Insel Hainan. Die Ostsee ist aufgrund ihrer geographischen Beschaffenheit besonders starken klimatischen Veränderungen unterworfen, während Hainan als Modellregion für Veränderungen durch den Ausbau von Aquakulturen angesehen werden kann.

1.10 Temperatur- und Salinitätsunterschiede charakterisieren das *Vibrio*-Habitat Ostsee

Die Ostsee stellt für *Vibrio* spp. einen einzigartigen Lebensraum dar. Geologisch und geographisch ist es ein junges Meer und mit seinen 412.000 km³ das zweitgrößte Brackwassersystem Eurasiens, direkt hinter dem Schwarzen Meer (Leppäkoski und Olenin 1999). Sein natürlich vorkommender Salzgradient von < 4‰ bis 30 ‰ (Herlemann *et al.* 2011) liegt im Optimum einiger, zum Teil auch humanpathogener Vibrionen. Zu diesen zählt *V. vulnificus* (Kaspar und Tamplin 1993, Takemura *et al.* 2014), der für den Großteil der im südlichen Ostseeraum registrierten Vibriosen verantwortlich ist (LAGuS M-V 2020). Gleichzeitig erwärmt sich die Ostsee im Zuge der globalen Erwärmung durch ihren flachen Charakter ungefähr 6-mal schneller als der weltweite Durchschnitt (EEA 2019). Dies hat zur Folge, dass die Anzahl an Infektionen in den letzten Jahren stark angestiegen ist (Baker-Austin *et al.* 2016).

Für die üblicherweise in den warmen Sommermonaten auftretenden Infektionen an der Küste Deutschlands zeigt sich dabei der Trend einer geographischen Verteilung (Abb. 1.4)

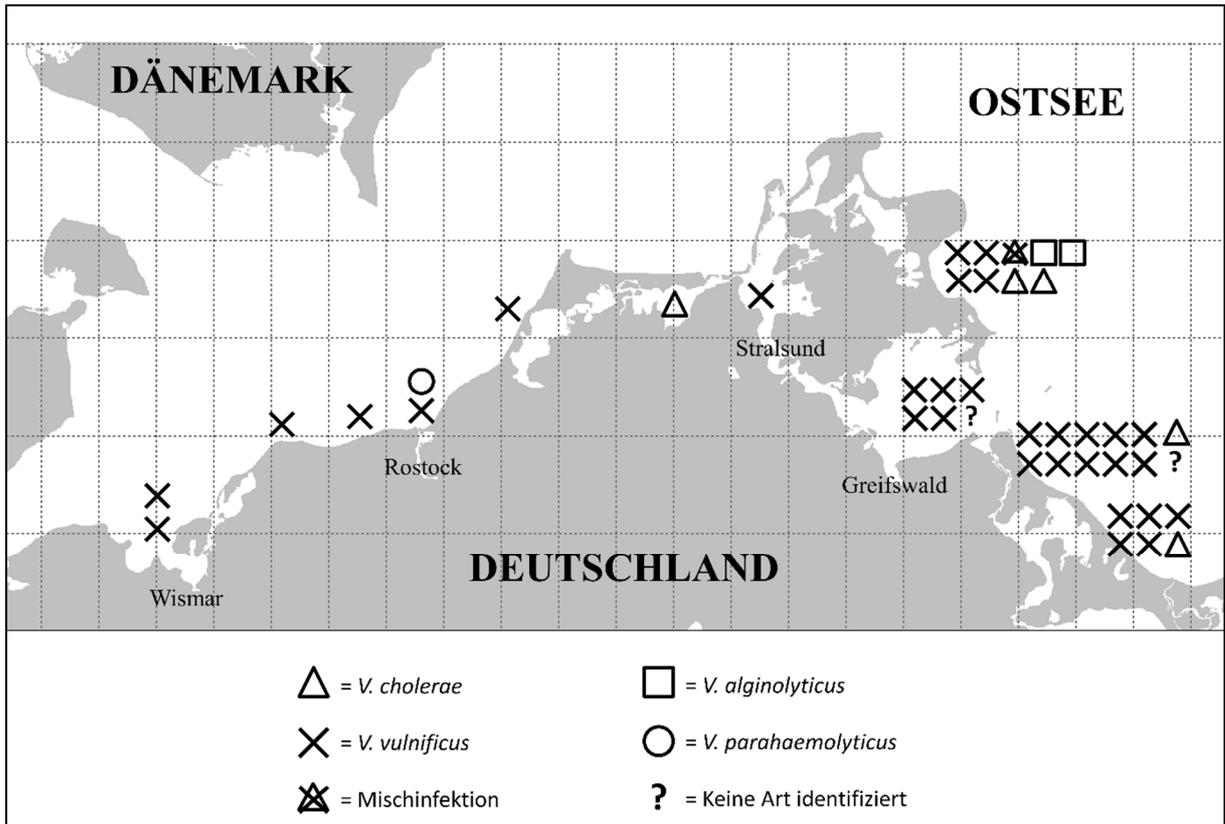


Abbildung 1.4: Auftretende *Vibrio*-Infektionen im Raum der südlichen Ostsee für den Zeitraum von 2003 – 2018. Die Karte wurde aus den zur Verfügung gestellten Daten des LAGuS M-V generiert (LAGuS M-V 2020).

Aus dieser Beobachtung heraus lässt sich vermuten, dass es mögliche Hot-Spots für potentiell humanpathogene Vibrionen in der südlichen Ostsee gibt. Für die Einschätzung von möglichen Risikogebieten ist ein Verständnis über das Vorkommen und die Abundanz von *Vibrio*-Populationen von entscheidender Bedeutung.

In den warmen Sommermonaten ist der Nachweis von Vibrionen in Küstengebieten der Ostsee mittels Kultivierung einfach, und Vibrionen können zum Teil in großer Anzahl nachgewiesen werden (Böer *et al.* 2012, Böer *et al.* 2013). Jedoch ist in den kalten Monaten, speziell im Winter, der kultivierungsbasierte Nachweis schwer oder nicht möglich (Böer *et al.* 2013, Oberbeckmann *et al.* 2011b). Dies erklärt sich durch das Phänomen des sogenannten VBNC-Status (*viable but non-culturable*). *Vibrio*-Zellen gehen in diesen Überdauerungszustand über, wenn die Wassertemperatur unter 10 °C fällt. Zellen im VBNC-Status sind lebendig, jedoch mit kultivierungsbasierten Methoden nicht mehr nachweisbar (Baffone *et al.* 2003, Weichart *et al.* 1992, Wolf und Oliver 1992). Gleichzeitig stellt die Kultivierung weiterhin eine wichtige Detektionsmöglichkeit für Vibrionen dar (Gyraite *et al.* 2019). Die Abwesenheit von detektierbaren *Vibrio*-Zellen während der Kaltwasserperioden hat die Frage nach möglichen

Rückzugsgebieten und Winter-Reservoiren aufgeworfen. Das Wissen über die möglichen Winter-Reservoirs, in denen die *Vibrio*-Zellen ungünstige Umweltbedingungen überstehen können und aus denen sie bei steigender Wassertemperatur erneut hervorgehen, stellt jedoch eine grundlegende Voraussetzung für das Verständnis über die Dynamik von *Vibrio*-Populationen in der Ostsee dar. Dies wäre ein erster Schritt, um mögliche Risikobereiche an Küsten bei ansteigenden Wassertemperaturen zu ermitteln und die bisherige Verteilung von Infektionen besser zu erklären. Ein Teil meiner Promotion beschäftigt sich daher mit der zentralen Aufgabe, die möglichen Rückzugsgebiete und Winter-Reservoirs von Vibrionen in der südlichen Ostsee zu ermitteln.

Die Reservoirs von Vibrionen, speziell der potentiell humanpathogenen Arten, werden in der Literatur noch immer diskutiert, und verschiedene Materialien werden in Betracht gezogen. Neben Sediment (Böer *et al.* 2013, Chase *et al.* 2015), welches oft als mögliches Reservoir diskutiert wird, ergeben sich durch die hohe Flexibilität in der Lebensweise von Vibrionen auch andere Habitate. *Vibrio* spp. ist in der Lage, sich an Seston, wie beispielsweise Chitin-Partikel zu binden, und in Anbetracht der Stabilität von Biofilmen gegenüber Umweltveränderungen, stellt Seston dadurch ebenfalls ein potentielles Reservoir dar (Kirschner *et al.* 2011, Matz *et al.* 2005, Shime-Hattori *et al.* 2006). Ebenso können durch die Wechselwirkungen von Vibrionen mit höheren Lebewesen auch Tiere als ein solches in Frage kommen. In einer Studie von De Paola *et al.* (1994) an der US-Golf-Küste wurden Fische als Hot-Spot für *Vibrio* spp. identifiziert. Ein biologisches Winter-Reservoir für Vibrionen wäre dabei von besonderer Bedeutung, da die biologische Diversität in der Ostsee von invasiven Arten geprägt wird.

1.11 Invasive Arten wie *Neogobius melanostomus* als Rückzugsgebiet für *Vibrio* spp. in der Ostsee

Ein Großteil der in der Ostsee vorkommenden Diversität hat Ihren Ursprung aus anderen Meeren und Ökosystemen, so dass die strukturelle und funktionelle Diversität maßgeblich von invasiven Arten beeinflusst wird (Leppäkoski und Olenin 2000). Dieses Phänomen wird als Xenodiversität definiert. Generell charakterisiert sich die Ostsee durch eine geringere Artenvielfalt, als andere marine Habitate (Costello und Chaudhary 2017, Ojaveer *et al.* 2010). Solche artenarmen Gemeinschaften können theoretisch besonders anfällig gegenüber invasiven Arten sein (Stachowicz *et al.* 1999). Die Beschaffenheit der Ostsee, mit ihren natürlich vorkommenden Salzgradienten bietet gleichzeitig gute Bedingungen für nicht-indigene Arten verschiedensten ökologischen Ursprungs, sowohl marinen-, brakischen- oder süßwasser-

Ursprungs. Bis heute sind in der Ostsee mindestens 140 nicht heimische Arten beschrieben, wobei Fische und Krebse mit 33 und 34 Arten den größten Anteil ausmachen (HELCOM 2018a, HELCOM 2009). In den letzten 60 Jahren hat die Anzahl der in der Ostsee durch den Menschen eingeführten Arten einen sprunghaften Anstieg erlebt und der Trend könnte sich fortsetzen (HELCOM 2018a, Leppäkoski und Olenin 2000). Mit jeder eingeführten Art bietet sich dabei die Möglichkeit, dass mit ihr Veränderungen in der bakteriellen Gemeinschaft und potentiell auch in der natürlich vorkommenden *Vibrio*-Gemeinschaft einhergehen (Gonzalez *et al.* 2014, Hahn 2003, Rizzo *et al.* 2016).

Eine der erst kürzlich in der Ostsee eingeführten Arten stellt dabei die aus dem Schwarzen Meer stammende Schwarzmundgrundel (*Neogobius melanostomus*) dar. Seit ihrer Einführung in den 1990er (Skóra und Stolarski 1993) hat sich *N. melanostomus* über weite Küstenbereiche der südlichen Ostsee verbreitet (Puntilla *et al.* 2018). Dies macht die Grundel als Rückzugsgebiet und Reservoir für *Vibrio*-Gemeinschaften in der Ostsee besonders interessant. Denn Fische können als potentielles Rückzugsgebiet und Reservoir für *Vibrio*-Gemeinschaften angesehen werden (Givens *et al.* 2014). Gleichzeitig sind invasive Arten potentielle Träger von aus ihrem Ursprungsgebiet stammenden *Vibrio*-Gemeinschaften, wozu auch pathogene Stämme zählen können (Martinez-Urtaza *et al.* 2008). *N. melanostomus* kann in Küstennähe hohe Besatzdichten erreichen und damit in Wechselwirkung mit dem Menschen treten. So sind Werte von 30 bis mehr als 100 Tiere pro Quadratmeter für die Ostsee bzw. Frischwasserhabitate beschrieben (Chotkowski und Marsden 1999, Sapota 2004). Diese Eigenschaften machen die invasive Schwarzmundgrundel zu einem interessanten Ansatzpunkt hinsichtlich einer Untersuchung als Reservoir und Rückzugsgebiet für Vibrionen in der Ostsee.

1.12 *Vibrio* spp. in Aquakulturen auf der Insel Hainan

Die im Südchinesischen Meer liegende Insel Hainan kann als Modellregion für anthropogenen Einfluss des immer stärker werdenden Ausbaus von Aquakulturen angesehen werden. Die Wassertemperatur an der südlichen Küste der hauptsächlich in den Tropen liegende Insel mit seinen 34.000 km² und knapp 8,6 Millionen Einwohnern verbleibt im gesamten Jahreszyklus über 20 °C (Herbeck *et al.* 2014, Krumme *et al.* 2012, Zhang *et al.* 2013) und stellt damit ganzjährig ideale Voraussetzungen für das Wachstum von Vibrionen bereit. Gleichzeitig hat sich Hainan in den letzten Jahrzehnten zu einer der produktivsten Regionen für Aquakulturen weltweit entwickelt (FAO 2019). Im Zeitraum von 1966 bis 2009 stieg die genutzte Küstenfläche von Aquakulturen im Osten der Insel von 550 ha auf knapp 4000 ha (Herbeck *et*

al. 2020). Der vorangetriebene Ausbau von Aquakulturen geht dabei Hand in Hand mit dem Verlust von Mangrovenwäldern. Im Osten der Insel sind in den letzten 50 Jahren 72% der Mangroven verlorengegangen, wobei in einigen Gebieten sogar ein kompletter Verlust zu verzeichnen ist. Mehr als die Hälfte der vormals von Mangroven bedeckten Fläche wurde dabei direkt für den Bau von Aquakulturen verwendet (Herbeck *et al.* 2020).

Viele dieser Aquakulturen bestehen aus einzelnen oder wenigen Teichen, die von Familienbetrieben bearbeitet werden (Hishamunda und Subasinghe 2003). Die in den Aquakulturen entstehenden, meist sehr nährstoffreichen Abwässer werden oft direkt in die naheliegende Küste abgegeben, was zu einer starken Eutrophierung (Herbeck *et al.* 2013) und zum Verlust der dortigen Seegrasswiesen führte (Herbeck *et al.* 2014).

Verstärkt wird dieser Effekt durch den Verlust der Mangroven, die als potentieller Filter und Puffer für aus Aquakultur stammende Nährstoffe dienen können (Gautier *et al.* 2001). Der Einfluss von Nährstoffen aus Aquakulturen innerhalb des Gebietes von Hainan ist in verschiedenen Studien beschrieben worden (Herbeck *et al.* 2013, Thomsen *et al.* 2020). Hingegen ist der potentielle Einfluss, den die Aquakulturen auf *Vibrio*-Gemeinschaften in diesen und umliegenden Küstengebieten besitzen, weitgehend unbekannt. In einem Gebiet wie Hainan, in dem große Bereiche der Küste für Aquakulturen genutzt werden, sind Auswirkungen von den daraus resultierenden Abwässern auf küstennahe *Vibrio*-Gemeinschaften, zu vermuten.

1.13 Fragestellungen der Promotion

Diese Promotion untersuchte die Frage, inwieweit anthropogene Faktoren einen Einfluss auf Abundanz und Zusammensetzung von Küsten-*Vibrio*-Gemeinschaften besitzen. Dabei wurden zwei sich unterscheidende Gebiete als Modellregion genutzt. Zum einen die südliche Ostsee als lokales Ökosystem der gemäßigten Zone, welche durch invasive Arten geprägt ist und zum anderen die durch Aquakulturen gezeichnete Insel Hainan der subtropischen / tropischen Zone. Dadurch war es möglich, eine Vielzahl von relevanten Parametern gleichzeitig in die Untersuchungen einfließen zu lassen.

Für die Ostsee stand die invasive Fischart *N. melanostomus*, als neues Rückzugsgebiet und Reservoir für Vibrionen in Küstengebieten im Fokus. Ebenso wird der Einfluss, des in der Ostsee auftretenden jahreszeitlichen Temperaturunterschieds sowie der natürlich auftretende Salzgradient berücksichtigt, um ein besseres Verständnis der *Vibrio*-Dynamik speziell für potentiell humanpathogene Arten, zu erhalten.

Zu diesem Zweck ist die Abundanz von *Vibrio* spp. und deren Zusammensetzung in der invasiven Art *N. melanostomus* sowie zwei weiteren in der Ostsee vorkommenden Fischarten, Dorsch (*Gadus morhua*) und Hering (*Clupea harengus membras*), bestimmt worden. Ebenso erfolgte dies für Wasser, Sediment und Seston in zwei Sommer und Wintersituationen an vier Probestationen entlang des Salinitätsgradienten der südlichen Ostsee. Um den Einfluss von falsch-positiven Ergebnissen durch Vertreter der Gattung *Photobacterium* auszuschließen, wurde eine Kombination aus kultivierungsbasiertem und kultivierungsunabhängigem Ansatz gewählt. Dieser vereinigte eine Illumina-16S rRNS Gen-Sequenzierung mit einer hauseigenen *in silico* verbesserten Version eines *Vibrio* spp. spezifischen Primer-Systems mit quantitativer digitaler Droplet PCR und einer klassischen Stammisolierung.

Für die durch Aquakulturen stark geprägte subtropische / tropische Insel Hainan stand die Frage im Fokus, inwieweit Aquakulturen die Zusammensetzung und Abundanz von *Vibrio*-Gemeinschaften in diesen, sowie in umliegenden Küstengebieten beeinflusst.

Vibrionen wurden dabei als Modell- und Indikatororganismus für Aquakultureinfluss herangezogen. Mittels Illumina-16S rRNS Gen-Sequenzierung wurde dieser potentielle Einfluss genauer untersucht.

2 Material und Methoden

2.1 Probenahme südliche Ostsee

Entlang der Ostseeküste Mecklenburg-Vorpommerns wurden vier offiziell als Badebereich eingestufte Strandabschnitte (Landesamt für Gesundheit und Soziales Mecklenburg-Vorpommern/LAGuS M-V) für die Probenahme ausgewählt: Warnemünde (W), LAGuS M-V Nummer 236; Lubmin (L), LAGuS M-V Nummer 750; Karlshagen (K), LAGuS M-V Nummer 703; Niendorf (N), LAGuS M-V Nummer 278. Diese wurden im Sommer 2015 (17. August – 21. Oktober 2015), Winter 2015/16 (15. Februar – 7. März 2016) und Winter 2016/17 (13. Februar – 15. Februar 2017) beprobt. Zusätzlich erfolgte während einer Hitzeperiode 2018 eine weitere Probenahme in Warnemünde (7. August 2018). Eine Übersicht über die genommenen Proben, sowie die durchgeführten Versuche ist in S1 dargestellt.

Die Temperatur und der Salzgehalt wurden mittels eines *Hach® HQD40D Portable Meter* und einer INTELLICAL Standard Leitfähigkeitssonde bestimmt.

Wasserproben wurden 20 cm unter der Wasseroberfläche im Strandbereich bei einer Wassertiefe von insgesamt einem Meter mittels säuregewaschenen und autoklavierten Glasflaschen entnommen. Die Proben wurden bis zur weiteren Bearbeitung auf Eis gelagert.

Die Sedimentproben wurden im Strandbereich bei einer Wassertiefe von insgesamt einem Meter mittels Sedimentstechrohr genommen. Aus sechs Sedimentkernen wurden die obersten 2 cm entnommen, in 50 mL-Zentrifugenröhren überführt und auf Eis gelagert.

Für die Sestonproben wurde ein 10 μ M Planktonnetz eingesetzt und bei einer Wassertiefe von insgesamt einem Meter für ca. 5 Minuten durch das Wasser gezogen. Die Netzproben wurden in 50 mL-Zentrifugenröhrchen gesammelt und bis zur weiteren Bearbeitung auf Eis gelagert.

Dorsche (*Gadus morhua*) und Heringe (*Clupea harengus membras*) wurden von ansässigen Fischern gefangen. Schwarzmundgrundeln (*Neogobius melanostomus*) wurden im Sommer von Fischern und im Winter mittels aufgestellter Fischfallen im Bereich von Warnemünde gefangen. Der Probenumfang betrug im Sommer 2015 bei *N. melanostomus* 17 Tiere (17 – 25 cm), bei *C. harengus membras* 5 Tiere (10 – 20 cm) und bei *G. morhua* 1 Tier (60 cm). Im Winter 2015/16 waren dies bei *N. melanostomus* 2 Tiere (17 und 25 cm), bei *C. harengus membras* 11 Tiere (28 - 30 cm) und bei *G. morhua* 3 Tiere (45 – 60 cm). Im Sommer 2018 betrug dies bei *N. melanostomus* 6 Tiere (8,5 – 16,5 cm), bei *C. harengus membras* 12 Tiere (17 – 24 cm) und bei *G. morhua* 1 Tier (32 cm).

2.2. Probenahme Hainan

Während der Probenahme im Zeitraum vom 15. – 27. April 2016 wurden fünf Küstentransekte, ein Flusstransekt sowie eine durch die Firma „*Hainan Guangtai Marine Breeding Company*“ professionell betriebene Aquakultur für Shrimps beprobt. Kleine familien- bzw. privatbetriebene Aquakulturen aus den Bereichen der entsprechenden Küstentransekte wurden ergänzend beprobt. Damit ergab sich ein Umfang von 46 Probestandorten, die sich wie folgt aufteilten: 24 Küstenstationen, 10 Stationen in kleinen küstennahen Aquakulturen, 4 Flusstationen sowie 8 Stationen in der firmenbetriebenen Aquakultur, die sich wiederum aufteilten in 4 Zuchtbecken für Shrimps und 4 Aufreinigungsbecken für Abwässer.

An den Küstenstandorten wurden Wasser und Sediment beprobt, sowie Seegras, falls vorhanden. In den Aquakulturen wurden Wasserproben entnommen sowie Sediment bei Vorhandensein. Mit Genehmigung der Besitzer der Aquakultur wurden in 8 Fällen Proben der kultivierten Tiere genommen. Von den sechs in der firmengeführten Aquakultur vorhandenen Aufreinigungsbecken wurden vier beprobt. Damit belief sich der Probenumfang auf 98 Proben: 46 Wasserproben, 35 Sedimentproben, 9 Tierproben und 8 Seegrasproben (S2).

Die physikalischen Parameter der Wasserproben wurden direkt während der Entnahme bestimmt. Salinität, Temperatur und pH-Wert wurden mit einer WTW® Multi 3430 Multisonde bestimmt. Die Salinität wurde in allen Proben, Temperatur und pH-Wert in 42 Proben und der Sauerstoffgehalt in 33 Proben bestimmt. Nährstoffkonzentrationen wurden in 29 Proben photometrisch nach Grasshof *et al.* (2009) durch das Leibniz-Zentrum für tropische Meeresforschung (ZMT) in Bremen bestimmt (Thomsen *et al.* 2020). Dies umfasste die Konzentration an gelöstem anorganischen Stickstoff (DIN), NH_4 , NO_x , NO_2^- , NO_3^- , PO_4^{3-} und Si. Chlorophyll a (Chla), Pheophytin und gesamt suspendiertes Material (TSM) wurden in 12 Proben bestimmt. Sämtliche Proben wurden nach ihrer Entnahme bis zur weiteren Bearbeitung auf Eis gelagert.

Wasser wurde 20 cm unterhalb der Wasseroberfläche, in mit Ethanol gesäuberten und dreifach mit Probewasser gespülten 1L-Glasflaschen gesammelt. Sedimentkerne wurden mittels 50 mL-Zentrifugenröhren entnommen und die oberen 2 cm des Sediments aufbewahrt. Je Standort wurden 6 Sedimentproben gesammelt.

Seegras wurde in 50 mL-Zentrifugenröhren gesammelt. Schnecken und Shrimps wurden in 50 mL-Zentrifugenröhren aufbewahrt. Fische wurden in mit Ethanol gereinigten Plastiktüten gesammelt. Der Probenumfang betrug für Fische 1 Tier je Aquakultur, für Schnecken 5 Tiere

je Aquakultur, für Shrimps 2-3 Tiere je Aquakultur bei einer Größe von über 1 cm, oder > 50 Tiere, wenn diese kleiner als 0,5 cm waren.

2.3 Spezifizierung der Aquakulturen und geführte Interviews mit den Besitzern

Die 10 beprobten küstennahen kleinen Aquakulturen sowie die firmenbetriebene Aquakultur wiesen prinzipielle Unterschiede in der Art der Betreibung auf. Die küstennahen Aquakulturen wurden in klassische Teich-Aquakulturen und kontinuierlich gespülte Aquakulturen differenziert. Die klassischen Aquakulturen beinhalteten einen kleinen Teich, der mit einer Folie abgedichtet sein konnte. Dieser Teich war abgetrennt von seiner ursprünglichen Wasserquelle. Der Teich wurde zu Beginn der Produktion gefüllt und entweder teilweise während der Aufzucht mit neuem Wasser aufgefüllt oder ersetzt bzw. nur zum Ende der Produktion geleert. Im Vergleich dazu wurden die kontinuierlichen Aquakulturen ständig mit neuem frischem Seewasser gespült und überschüssiges Abwasser ungefiltert in die Umwelt abgelassen.

Bei der firmenbetriebenen Aquakultur handelte es sich um ein semi-geschlossenes System, in dem das Abwasser der Aufzuchtbecken gesammelt und aufgereinigt wurde. Diese Aufreinigung beinhaltete sechs verschiedene Becken zum Sammeln der Abwässer, zur Sedimentation, Nitrifizierung, Biodegradation, flokkulente Sandfiltrierung sowie Belüftung. Bis zu 80% des aufgereinigten Wassers wurde den Aufzuchtbecken zurückgeführt, der Rest wurde nach einem weiteren Protein-Skimmer-Schritt, sowie einer zusätzlichen Ozon- und UV-Desinfektion ins Abwasser geleitet.

Innerhalb der firmenbetriebenen Aquakultur wurden 4 Shrimps-Aufzuchtbecken und 4 Aufreinigungsbecken beprobt. Im weiteren Verlauf der Arbeit werden diese Aufzuchtbecken als semi-geschlossene Aquakulturen bezeichnet, um sie von den kleineren, küstennahen Aquakulturen zu unterscheiden. Ein Überblick über die beprobten Aufreinigungsbecken und Aquakulturen, sowie Informationen über die Anzahl der beprobten Tiere wird in S3 dargestellt. Alle Besitzer der Aquakulturen hatten ihr Einverständnis zur Probenahme gegeben und wurden für zusätzliche Informationen über ihre Handhabung der Aquakulturen interviewt. Dies beinhaltete Fragen zur Größe und Tiefe der Teiche, zur Art der kultivierten Tiere und deren Größe und Alter, zur Anzahl der im Teich vorkommenden Tiere, zur Frequenz, mit der das Wasser erneuert wurde, zum momentanen Alter des Wassers, zum Einsatz von Antibiotika und Chemikalien zur Säuberung, zu kürzlich aufgetretenen Infektionen und zum Einsatz der Sauerstoffpumpen (S4).

2.4 Probenvorbereitung

Sämtliche Proben wurden nach ihrer Prozessierung in flüssigem Stickstoff gefroren und bis zur DNS-Extraktion bei – 80 °C gelagert. Die Proben aus Hainan wurden nach dem Schockfrieren zunächst auf -20 °C gelagert, bis sie nach Ihrem Transport nach Deutschland bei -80 °C gelagert wurden.

Für die DNS-Extraktion wurden zwischen 50 – 1000 mL Seewasser auf einen 0,22 µm GV Filter, 47 mm Ø (Merck Millipore GVWP04700) bei einem maximalen Unterdruck von 200 mbar abfiltriert. Für die Ostseeproben wurde der Rest des Seewassers für die Kultivierung verwendet.

Das Sediment von allen Sedimentkernen eines Standorts wurde zusammengeführt und gemischt. Für die Ostsee wurden 6-mal je 10 g in 50 mL-Zentrifugenröhren, für Hainan 6-mal ca. 2 g in Eppendorf-Röhrchen überführt. Für die Ostseeproben wurde der Rest des Sediments für die Kultivierung verwendet.

Die Sestonproben der Ostsee wurden bei 3000 g und 4 °C zentrifugiert und das überstehende Wasser durch Pipettieren entfernt. 3 Replikate wurden für die Kultivierung verwendet, der Rest wurde schockgefroren. .

Für die Gewebeproben wurden die Fische mit steril filtriertem Seewasser gespült. Anschließend erfolgte die aseptische Entnahme von Kiemen, Hautschleim und dem Magen-Darm-Trakt. Mit Ausnahme der Ostsee-Probenahme in 2018 wurden alle Gewebe einer Spezies von den gefangenen Individuen einer Art oder derselben Aquakultur zusammengeführt und gemeinsam homogenisiert. Die Ostseeproben wurden in 50 mL-Zentrifugenröhren aufgeteilt, wovon ein Teil für die Kultivierung verwendet wurde. Die Hainanproben wurden in 2 mL-Eppendorf-Röhrchen überführt. Für die Ostsee-Sommerproben 2018 wurden die gefangenen Tiere individuell betrachtet. Bei der Hälfte der gefangenen Tiere von *N. melanostomus*, *C. harengus membras* sowie dem einen *G. morhua* wurden die 3 Gewebssorten einzeln betrachtet. Für die andere Hälfte der Fische sind die 3 Gewebssorten eines einzelnen Individuums zusammengeführt und homogenisiert worden. Die Shrimps und Schneckenproben aus Hainan wurden analog zu den Fischen bearbeitet, wobei die kompletten Tiere homogenisiert wurden. Seegrassproben wurden mit steril filtriertem Seewasser gespült und in 2 mL-Eppendorf-Röhrchen überführt.

2.5 Kultivierungsbasierte Quantifizierung von *Vibrio* spp.

Ostseeproben aus dem Sommer 2015 und Winter 2015/17 wurden für die Quantifizierung von *Vibrio* spp. durch die Bestimmung der koloniebildenden Einheiten (KBE) genutzt. Alle Materialien wurden in 3 und für das Wasser in 5 Parallelen direkt ausplattiert. Für das direkte Ausplattieren von Wasserproben wurden 0,1 mL Seewasser direkt auf Thiosulfate-Citrate-Bile-Sucrose-Agar (TCBS-Agar, Merck, 110263) und CHROMagar™ (CA) *Vibrio* (CHROMagar, VB910) ausgestrichen. Die Platten wurden für 24 h bei 37 °C inkubiert. Für die Sedimentproben wurden 10 g Sediment mit 90 mL 1x Alkalischem-Pepton-Wasser (APW), pH 8.5 (1% [w/v] Pepton [Polypeptone™ Peptone, BD, 211910], 1% [w/v] NaCl [CELLPURE® ≥99,8%, Carl ROTH®, HN00.1]) vermischt und energisch gemischt. 0,1 mL der Suspension wurden anschließend direkt auf CA und TCBS ausplattiert und wie die Wasserproben inkubiert. Für das Seston wurden die Netzproben (0,1 – 0,25 g Frischgewicht) mit 100 mL 1 x APW gemischt und wie die Sedimentproben für die direkte Ausplattierung verwendet. Das Fischgewebe wurde analog zu den Sedimentproben vorbereitet. Kolonien wurden nach 24 h Inkubation ausgezählt und vorläufige KBE bestimmt. Um den Effekt falsch positiver Ergebnisse in der Berechnung der KBE zu reduzieren, wurden Isolate aus der direkten Ausplattierung auf ihre Spezieszugehörigkeit mittels MALDI-ToF-MS (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization – Time of Flight Mass Spectrometry) untersucht.

2.6 *Vibrio* spp.-Anreicherung bei niedrigen *in situ*-Zellzahlen

Zusätzlich zur direkten Kultivierung und Isolierung wurden *Vibrio*-Isolate durch vorherige Anreicherung in APW gewonnen. Dies wurde für die Ostseeproben im Sommer 2015 und Winter 2015/16 durchgeführt. Alle Anreicherungen erfolgten in 3 Parallelen. Mit Säure gesäuberte, autoklavierte 500 mL-Glasflaschen wurden mit 90 mL Probewasser befüllt und mit 10 mL 10 x APW (10% [w/v] Pepton, 10% [w/v] NaCl, pH 8.5) gemischt. Nach einer Inkubation von 24 h bei 37 °C wurden von den Proben 10-fach Verdünnungen mit 1 x APW bis zu einer Konzentration von 10⁻⁵ angefertigt. Von jeder Verdünnungsstufe wurden 0,1 mL auf CA und TCBS ausplattiert. Sediment, Seston und Fischgewebe wurde wie bereits beschrieben für die KBE-Ermittlung vorbereitet. Die APW- Suspensionen wurde anschließend wie die Wasserproben inkubiert und ausplattiert.

2.7 Artbestimmung der *Vibrio*-Isolate durch MALDI-ToF-MS

Sowohl aus der direkten Ausplattierung, als auch den Proben der Anreicherung, wurden für jedes einzelne Probenmaterial und jeden einzelnen Probestandort 100 Kolonien ausgewählt. Diese wurden auf Marine-Bouillon-Agar (MB-Agar) ausgestrichen und bei 37 °C inkubiert, bis reine Stämme gewonnen wurden. Für die Artbestimmung der Isolate wurde MALDI-ToF-MS auf Grundlage des Prinzips von Erler *et al.* (2015) eingesetzt. Ein Teil einer einzelnen, reinen Kolonie wurde zweimal in ein 2 mL-Eppendorf-Röhrchen mit 0,9 mL MB-Lösung überführt. Das angeimpfte Medium wurde über Nacht bei 37 °C inkubiert. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation bei Raumtemperatur für 5 min und 3000 g. Das Medium wurde durch Pipettieren entfernt und das Zellpellet in 300 µL HPLC-Wasser (Water HiPerSolv CHROMANORM®, VWR, 83645.290) durch Vortexen resuspendiert. Anschließend wurden 900 µL reinen Ethanols (Ethanol, molecular grade, AppliChem, A3678) zugegeben und erneut durch Vortexen gemischt. Die Proben wurden bei -20 °C bis zur Vermessung gelagert. Für die MALDI-ToF-MS-Identifizierung erfolgte die Proteinextraktion mit der Schnellextraktionsmethode nach Mellmann *et al.* (2008). Für sämtliche Schritte wurde dabei Material von Eppendorf verwendet, um mögliche Probleme durch Weichmacher zu vermeiden. Jeweils 1 µL des gewonnenen Extraktes wurde in zwei Parallelen auf einer gesäuberten Stahlplatte (MSP 96 target polished steel micro scout Target, 224989, Bruker) aufgetragen. Nach Trocknen an der Luft wurde dieser mit 1 µL einer gesättigten Matrixlösung überdeckt (50% Acetonitril, 47,5% MALDI-Wasser, 2,5% Trifluoressigsäure, gesättigt mit α -Cyano-4-Hydroxymethylsäure) [Sigma-Aldrich, T6508-M; Bruker, 255344). Als Standard wurde parallel zweimal *Bacterial Test Standard* (BTS, Bruker, 8290190) auf zwei Spots vorbereitet. Nach der Lufttrocknung wurden Massenspektren mit dem Microflex LT/SH-System (Bruker Daltonics Inc., Bremen) und der Bruker Flex Control Software aufgenommen. Die anschließende Analyse der Spektren erfolgte mit der MALDI-Biotyper RTC 3.1 Software. Die Spektren wurden mit Einträgen der Bruker-Daltonics-Datenbank (BDAL) und der *Vibrio*-Base Datenbank (Alfred-Wegener-Institut Helgoland/AWI-Helgoland) verglichen. Die Ergebnisse lieferten Identifikationswerte zwischen 1 - 3. Dabei repräsentierten Werte über 2 eine Identifizierung bis auf die Artebene. Werte zwischen 2 - 1,7 erlaubten eine Identifizierung bis zur Gattung. Ein Wert von unter 1,7 repräsentierte keinen passenden Referenzeintrag in der Datenbank. Für die Berechnung der korrigierten KBE-Werte flossen nur als *Vibrio* spp. identifizierte Isolate mit in die KBE-Berechnung ein.

2.8 DNS-Extraktion aus Umwelt- und Gewebeproben

Für die Extraktion der DNS aus Umweltproben wurde das QIAgen DNeasy Power Soil Kit für Wasser, Sediment und Seston verwendet. Für Fischgewebe kam eine Kombination aus dem QIAgen Blood and Tissue Kit und dem QIAgen DNeasy Power Soil Kit zum Einsatz. Alle finalen Elutionsschritte wurden zweimal mit 50 – 100 µL Diethylpyrocarbonat (DEPC) behandeltem Wasser durchgeführt. Zusammenfassend wurde Wasser, Sediment und Seston nach der Anleitung des Herstellers aufgearbeitet. Dabei wurden 250 mg Ausgangsmaterial verwendet für Seston und Sediment verwendet. Für die Wasserproben wurde je ein Filter in kleine (2 x 2 mm) Stücke geschnitten, die als Ausgangsmaterial dienten. Für die tierischen und pflanzlichen Gewebeproben wurden die Zellen von 25 mg Material nach dem Protokoll des Blood and Tissue Kit mit Proteinase K über Nacht aufgebrochen. Anschließend wurden 200 µL Puffer aus den “*bead beating tube*” des Power Soil Kit’s entfernt und mit der Proteinase K behandelten Zellsuspension ersetzt. Die weitere Bearbeitung erfolgte dann nach der Anleitung des Herstellers. Die Erhaltene DNS-Lösung wurde bei -20 °C gelagert.

2.9 Quantifizierung von *Vibrio* spp. mittels digitaler Droplet PCR

Die in dieser Promotion verwendeten Primer werden in S5 beschrieben.

Die quantitative PCR, basierend auf dem Prinzip der digitalen Droplet PCR (ddPCR), wurde mittels des Bio Rad EvaGreen Systems durchgeführt. Dabei enthielt jede PCR 11 µL der 2 x EvaGreen-Lösung, 100 nmol L⁻¹ jeden Primers, 1 µL DNS-Lösung (0,1 – 10 ng µL⁻¹) und wurde auf ein Volumen von 22 µL mit DEPC behandeltem Wasser eingestellt. Die Tröpfchen wurden mit dem *QX100 droplet generator* nach den Werkeinstellungen hergestellt. Die erhaltenen Proben wurden darauffolgend in eine 96-Well Platte überführt und mit einer durchbohrbaren Hitzefolie (BioRad, 181-4040) versiegelt. Für die PCR-Reaktion wurde ein *C1000 TouchTM Thermal Cycler*, Bio Rad verwendet. Nach erfolgter Amplifikation wurde die 96-Well Platte in den *QX100 droplet reader* überführt und vermessen. Die Analyse erfolgte dabei mit der Qantasoft 1.74.09.17 Software. In jedem Lauf wurde mindestens eine Positiv- und Negativkontrolle verwendet, die aus 0,1 ng DNS von *V. vulnificus* (DSM 10143), beziehungsweise DEPC behandeltem Wasser anstelle der DNS-Probe bestand.

Zwei Primer-Systeme wurden für die ddPCR verwendet, die entweder auf die Quantifizierung des bakteriellen 16S rRNS Gens (Com-f – Com-r (Schwieger und Tebbe 1998)) oder des *Vibrio*-16S rRNS Gens (567f - 680r (Thompson *et al.* 2004)) abzielten. Die optimale

Annealingtemperatur für jedes Primer-System wurde dabei mit einer Gradienten-PCR bestimmt. Diese deckte einen Bereich von ± 3 °C der für die Primer-Systeme beschriebenen Annealingtemperatur ab. Zusätzlich wurden die Verwendung von 30 oder 40 Zyklen, sowie die Verwendung einer 2-Schritt- oder 3-Schritt-PCR getestet. Dabei diente DNS von *V. vulnificus* (DSM 10143) als Template. DEPC behandeltes Wasser wurde als Negativkontrolle genutzt. Die schlussendlichen Bedingungen für die PCR lauteten wie folgt: Für das Com-Primer-System erfolgte ein erster Denaturierungsschritt für 5 min bei 95 °C. Anschließend wurden 40 Zyklen durchgeführt mit einer Abfolge von 95 °C für 1 Minute, 1 Minute bei 50 °C und 1,5 Minute bei 72 °C. Am Ende erfolgten ein 5-Minuten-Schritt bei 4 °C und anschließend ein 5-Minuten-Schritt bei 90 °C für eine Stabilisierung des Farbstoffes. Für das *Vibrio*-System waren die Bedingungen wie folgt: 95 °C für 5 Minuten, gefolgt von 40 Zyklen mit 95 °C für 1 Minute, 61,6 °C für 1 Minute, 72 °C für 1 Minute. Der finale Schritt enthielt ein 5-Minuten-Schritt bei 4 °C und ein 5-Minuten-Schritt bei 90 °C. Die Ergebnisse der ddPCR wurden in Kopienanzahl des bakteriellen 16S rRNS Gens oder der vorläufigen Kopienanzahl des *Vibrio*-16S rRNS Gens pro mL oder g Probematerial angegeben. Durch die bekannte Kreuzreaktion der *Vibrio*-Primer mit *Photobacterium* spp. (Thompson *et al.* 2004) und eine daraus resultierende Überschätzung der *Vibrio*-Zellzahlen, war die Verwendung eines Korrekturfaktors erforderlich. Dieser wurde mit dem Einsatz von einer Illumina-MiSeq-Sequenzierung ermittelt.

2.10 Illumina-16S rRNS Gen-Sequenzierung, OTU-Bestimmung und -Quantifizierung

Die Illumina-Sequenzierung erfolgte für alle Probematerialien aus Warnemünde im Sommer 2015 sowie allen Proben aus der Region Hainan. Die Illumina-16S rRNS Gen-Sequenzierung erfolgte nach dem Protokoll von Bennke *et al.* (2018), unter Verwendung des bakteriellen 16S Com-Primers (Herlemann *et al.* 2011). Eine Clusterdichte von 934 ± 80 K mm^{-2} und ein Q-score ≥ 30 von 67% wurde für alle Sequenz- und Indexläufe erreicht. Die Läufe generierten 22 Millionen Einzelsequenzen. Die erhaltenen FASTQ-Daten wurden anschließend in *bcl-Daten überführt und weiter prozessiert. Die Aufarbeitung der Datensätze und Ermittlung von relativen Abundanzen der OTUs erfolgte mit MOTHUR Version 1.39.5 (Schloss *et al.* 2009) und der SILVA Datenbank Version 132. Die Sequenzen wurden nach der MOTHUR-Pipeline und den MiSeq SOP Richtlinien aufgearbeitet (Kozich *et al.* 2013, MiSeqSOP). Die qualitätsgefilterten Sequenzen wurden mit der Referenzdatenbank SILVA SSURef Version 132 (Parks *et al.* 2018, Quast *et al.* 2013, Yilmaz *et al.* 2013) und nach der Methode von Wang *et al.* (2007) identifiziert. Der Bootstrap wurde auf $\geq 85\%$ eingestellt. Die Einteilung nach operativen

taxonomischen Einheiten (OTUs) erfolgte auf Basis von 97% Sequenzähnlichkeiten. Sequenzen, die weniger als dreimal im kompletten Datensatz vorkamen, wurden entfernt. Zusätzlich wurden Sequenzen, die als Eukaryoten, Mitochondrien, Chloroplasten oder nicht identifiziert werden konnten, aus dem Datensatz ausgeschlossen. Die relative Quantifizierung der OTUs erfolgte aus den restlichen Sequenzen. Als weiterer Qualitätsschritt wurden OTUs aus den Negativkontrollen und Leerextraktionen aus den Proben entfernt, sobald diese im Durchschnitt mit 1.25 Sequenzen je Probe vorkamen.

Für die Proben aus Hainan wurde neben der relativen Abundanz der *Vibrio*-OTUs noch die relative Abundanz von *Enterobacteriaceae* und *Legionellaceae* untersucht. Diese beiden Gruppen stellen typische Bioindikatoren zur Bewertung der Wasserqualität, bzw. möglichen anthropogenen Einflusses dar.

2.11 Erstellung eines Korrekturfaktors für die Quantifizierung von *Vibrio* spp. basierend auf Illumina-Sequenzierung

Für die Ermittlung des Korrekturfaktors der ddPCR erfolgte die Identifizierung und Quantifizierung von *Vibrio*-OTUs und *Photobacterium*-OTUs nach den im vorherigen Abschnitt beschriebenen Einstellungen. Dabei wurden die Einstellungen in MOTHUR so gewählt, dass jede vorkommende Sequenz als eigenständiges OTU betrachtet wurde. Auf diese Weise wurde verhindert, dass mehrere verschiedene Sequenzen in Form einer einzelnen Konsensussequenz bei der Bildung von OTUs zusammengefasst und möglicherweise verändert wurden. Für alle Sequenzen, die *Photobacterium* spp. zugeordnet wurden, erfolgte ein Test auf ihr Potential, mit den *Vibrio*-16S-Primern zu hybridisieren. Dafür erfolgte ein Abgleich der Primersequenz mit den erhaltenen *Photobacterium* spp.-Sequenzen. Bei identischer Sequenz, bis hin zu einem Fehler am 3'- oder 5'-Ende der Primer, wurden die Sequenz als hybridisierbar eingestuft. Aus der erhaltenen Anzahl an *Photobacterium* spp.-16S rRNS Gen-Sequenzen, die hybridisieren konnten, Gesamtanzahl an *Photobacterium* spp.-16S rRNS Gen-Sequenzen und Anzahl an *Vibrio*-16S rRNS Gen-Sequenzen wurde ein Korrekturfaktor für jedes einzelne Probematerial erstellt:

$$\text{Korrekturfaktor} = \frac{\text{Anzahl } Vibrio - \text{Sequenzen}}{\text{Anzahl } Vibrio - \text{Sequenzen} + \text{Anzahl amp. } Photobacterium - \text{Sequenzen} *}$$

* amp. *Photobacterium*-Sequenzen = *Photobacterium* -Sequenzen mit maximal einem Basenpaar-Unterschied am 3' oder 5' Ende,

Die Kopienanzahl aus der ddPCR wurde mit diesem multipliziert, um einen korrigierten Wert zu erhalten. Um die Zellzahl von *Vibrio* spp. zu bestimmen, wurde anschließend die korrigierte 16S rRNS Gen-Kopienanzahl durch 10,1 dividiert. Dies entspricht der durchschnittlichen Anzahl an 16S Genen im Genom von *Vibrio* spp. [rrnDB Datenbank, letzte Nutzung 1.08.2018, (Stoddard *et al.* 2014)].

2.12 Gemeinschaftsanalysen auf Basis der Illumina-Daten und statistische Analyse

Die relative Abundanz der OTUs, basierend auf der 16S rRNA Gen-Sequenzierung, wurde für alle folgenden statistischen Auswertungen verwendet. Für die bakterielle Gemeinschaftsanalyse wurden sämtliche bakterielle OTUs verwendet. Für die Analyse der *Vibrio*-Gemeinschaften wurden nur solche OTUs verwendet, die der Gattung *Vibrio* zugeordnet werden konnten. Die weitere Prozessierung und Analyse wurde dabei in R Version 3.4.2 (R-Core-Team 2018) durchgeführt unter zusätzlicher Verwendungen der Pakete *vegan* (Oksanen *et al.* 2019), *ggplot2* (Wickham 2016) und *devtools* (Wickham *et al.* 2020).

Die relativen *Vibrio*-Abundanzen der verschiedenen Proben aus Hainan wurden in einer Heatmap visualisiert (ComplexHeatmap (Gu *et al.* 2016)). Um die Abundanzen einzelner bakterieller Gruppen im Küstengebiet Hainan's geographisch darzustellen, wurde das Programm ‚Ocean Data View‘ Version 5.1.5 (Schlitzer 2019) verwendet.

Für die Proben aus Hainan wurde getestet, ob sich die Gesamt-*Vibrio*-Abundanz und Anzahl an gefundenen *Vibrio*-OTUs zwischen den Probematerialien bzw. zwischen Aquakultur-Proben und Küsten-Proben signifikant unterscheidet. Es wurde der Kruskal-Wallis-Test benutzt. Bei signifikanten Unterschieden zwischen den Probengruppen und Materialien erfolgte ein anschließender paarweiser Vergleich mittels Conover-Iman-Test mit dem Paket *conover.test* v.1.1.5 (Dinno 2017). Eine Benjamini-Hochberg-Korrektur wurde für p-Werte angewendet.

Um die grundlegende Struktur der Gemeinschaftsdaten zu analysieren, wurde eine Ordination mittels nicht-metrischer multidimensionaler Skalierung (nMDS, 100 Versuche) verwendet. Diese basierte auf der Bray-Curtis-Dissimilarity zwischen den Quadratwurzel-transformierten relativen Abundanzen der gesamten bakteriellen OTUs, bzw. den Hellinger-transformierten Abundanzen der *Vibrio*-OTUs.

Um zu testen, ob sich die im bakteriellen nMDS-Plot der Ostsee-Proben visuell sichtbare Gruppe der Gewebeproben der Fische von denen der Wasser-, Sediment- und Sestonproben unterschied, wurde eine ‚permutational multivariate analysis of variance‘ (PERMANOVA (Anderson 2001)) berechnet. Zusätzliche wurde mittels der PERMDISP-Routine (‚analysis of

multivariate homogeneity of group dispersions‘ (Anderson 2006)) getestet, ob diese Signifikanz auch durch einen Dispersionseffekt zustande kommen könnte. Hierfür wurde zusätzlich das R-Paket `funfuns` (Trachsel 2020) verwendet. Die Gruppen wurden durch ein 95% Vertrauensintervall in den nMDS-Ordinationen dargestellt.

Für die *Vibrio*-Gemeinschaften der Ostseeproben wurde getestet, ob sich die einzelnen Materialien untereinander signifikant unterscheiden. Hierfür wurde das Programm Primer7 mit dem Add-on PERMANOVA+ verwendet. Dabei erfolgte eine PERMANOVA mittels Monte Carlo-basierten-Permutations-Test, sowie einer anschließenden PERMDISP-Analyse.

Für die Proben aus Hainan wurde getestet, ob sich *Vibrio*- oder bakterielle Gemeinschaften zwischen den Probematerialien Wasser, Sediment, Gewebe und Seegras unterscheiden. Dafür wurde in R eine PERMANOVA und PERMDISP berechnet.

Bakterielle Gemeinschaften innerhalb der Wasser- und Sedimentproben der für Hainan visuell bestimmten Gruppen wurden als küstenähnlich oder aquakulturähnlich benannt, nach dem Ursprung des Großteils ihrer zugehörigen Proben. Anschließend erfolgte eine PERMANOVA- und PERMDISP-Analyse dieser Gruppen, um deren Signifikanz zu bestimmen.

Für die *Vibrio*-Gemeinschaft in Hainan wurde Wasser und Sediment ebenfalls in eigenen nMDS-Ordinationen dargestellt. Für das Wasser und Sediment wurde mittels PERMANOVA- und PERMDISP-Analyse getestet, ob sich die bereits in der bakteriellen nMDS-Analyse bestimmten küstenähnlichen von der aquakulturähnlichen Gruppen ebenfalls signifikant in der *Vibrio*-Zusammensetzung unterscheiden. Um zu testen, welche Umweltparameter einen signifikanten Einfluss auf die *Vibrio*-Gemeinschaften des Seewassers von Hainan haben könnten, wurden diese mittels der Funktion `envfit` (Oksanen et al., 2019) korreliert. Die Signifikanz der Korrelation wurde mittels Permutationstest (999 Permutationen) ermittelt und nur signifikante Parameter in die Ordination integriert. Hierfür wurde die Funktion `ordisurf` aus `vegan` (Oksanen et al., 2019) genutzt. Anhand der signifikanten Umweltparameter wurden die Proben in Gruppen eingeteilt und anschließend mittels PERMANOVA- und PERMDISP auf ihre Signifikanz überprüft. Für Salinität wurden die Gruppen nach dem Grenzwert 30 ‰ eingeteilt, da ≥ 30 ‰ der typischerweise beobachteten Salinität der Küstenbereiche Hainans in diesem Gebiet entspricht (Herbeck *et al.* 2013). Für Phosphat wurde der Wert 1 μM als Einteilungsgrenze gewählt, da Studien gezeigt haben, dass die beprobte Küste Hainans in diesem Bereich üblicherweise durch eine annähernd ähnliche Konzentration charakterisiert ist, die unter 1 μM liegen kann (Herbeck *et al.* 2013). Für die Wassertemperatur wurde der in den Proben gemessene Mittelwert von 28,6 °C als Grenze für die Gruppeneinteilung festgelegt.

2.13 Phylogenetische Analysen der *Vibrio*-OTUs

Die Sequenzen der 58 ermittelten *Vibrio*-OTUs aus den Hainan-Proben wurden im Web-Programm SINA (www.arb-silva.de) ausgerichtet und anschließend in das ARB-Programm Version 6.0.2 (Ludwig *et al.* 2004) übertragen. Referenzsequenzen von Typus-Stämmen der Gattung *Vibrio* in der SILVA_132_SSURef_NR99_bacteria database (Quast *et al.* 2013, Yilmaz *et al.* 2013) wurden für die Erstellung des Stammbaums verwendet. Die Gruppe *Desulfurella* (28 Sequenzen) dienten als Außengruppe im Stammbaum. Der Bootstrap-Core-Baum (Anzahl an Bäumen: 1000) wurde mit 283 Sequenzen, der *neighbor-joining*-Methode, allgemeinen bakteriellen Filter durch das ARB-Programm und der Jukes-Cantor-Korrektur berechnet. Die 58 *Vibrio*-Sequenzen aus den Proben Hainan's der Studie wurden in diesen Baum eingefügt, ohne die Struktur des Core-Baums zu verändern.

2.14 Co-Occurrence Netzwerk-Analysen

Um mögliche Interaktionen von *Vibrio* mit anderen bakteriellen OTUs aufzuzeigen, wurden die Sediment- und Wasserproben aus Hainan mittels einer Co-Occurrence Netzwerkanalyse untersucht. Die Netzwerkanalysen wurden dabei für vier verschiedene Gruppen erstellt, die anhand der Aufteilung in den nMDS-Plots der bakteriellen Gemeinschaften definiert wurden. Diese teilten sich für Wasser und Sediment jeweils in küstenähnliche Proben und aquakulturähnliche Proben auf. In den aufgeteilten Probegruppen wurden sämtliche OTUs, die mindestens in einer Probe mit einer relativen Abundanz von 0,15% vorkamen, sowie sämtliche 58 *Vibrio* OTUs für die Netzwerkerstellung genutzt. Die Analyse erfolgte dabei in R (R-Core-Team 2018) mit dem Paket Spiec-Easi (Sparse Inverse Covariance Estimation for Ecological Association Inference) (Kurtz *et al.* 2015). Die graphische Darstellung signifikanter positiver und negativer Korrelationen zwischen den relativen Abundanzen der OTUs erfolgte im Anschluss mittels des Programms Cytoscape (Shannon *et al.* 2003). Die *Vibrio*-OTUs 1-3, die in mehr als 85% aller Proben vertreten waren, wurden dabei als Mittelpunkt festgesetzt.

2.15 Nachweis von Virulenz-Genen in *Vibrio vulnificus*

Für die Identifizierung von potentiellen, hoch humanpathogenen *Vibrio vulnificus*-Stämmen wurden als durch MALDI-ToF-MS identifizierte *Vibrio vulnificus*-Isolate auf das Vorhandensein von Virulenz-Genen überprüft. Dafür wurden 10 mL MB-Medium mit einer

einzelnen Kolonie des Stammes angeimpft. Nach einer Inkubation bei 37 °C für 24 bis 36 h wurden 2 mL der Zellkultur für die Extraktion von DNS verwendet. Die Extraktion erfolgte mit dem QIAamp® DNA Mini and Blood Mini Kit nach der enthaltenen Anleitung für gramnegative Bakterien. Die MALDI-ToF-MS Identifizierung wurde durch den Einsatz einer *Vibrio vulnificus* spezifischen PCR bestätigt, die das artspezifische Gen *vvh* amplifizierte. Dafür wurden die Primer aus Warner und Oliver (2008) sowie Panicker *et al.* (2004a) verwendet. Zusätzlich wurden drei Primer-Systeme genutzt, um die Virulenz-Gene *rtxA1* (Chung *et al.* 2010), *HPI* (Han *et al.* 2009), *viuB* (Jones *et al.* 2008, Panicker *et al.* 2004a) nachzuweisen. Neben den *V. vulnificus*-Stämmen wurden fünf weitere *Vibrio* spp.-Stämme als Kontrollen verwendet. Eine repräsentative Auswahl an erhaltenen PCR-Produkten wurde nach den Anforderungen von LGC Genomics für die Sanger-Sequenzierung vorbereitet und sequenziert. Die Sequenzergebnisse wurden mit der NCBI-Datenbank verglichen, um die korrekte Amplifizierung des Zielgens zu bestätigen.

2.16 Trockenmasse-Bestimmung

Die Trockenmasse des Sediments, Sestons und des Fischgewebes in den Ostseeproben wurde durch Hitzetrocknung bestimmt. Die Gewichtsbestimmung erfolgte mit einer Mettler AM100-Feinwaage (Mettler Toledo). Für den Vorgang wurde in 2mL-Eppendorf-Röhrchen ein Loch mit einer glühenden Nadel (Ø 0.9 mm) in den Deckel geschmolzen. 20 – 2000 mg des Probenmaterials wurden in das Röhrchen überführt und bei 90 °C getrocknet. Die Proben wurden nach 72 h und weiteren 96 h gewogen, um die vollständige Trocknung zu gewährleisten. Leere Röhrchen dienten als Negativkontrolle. Die Trockenmasse wurde aus dem Gewichtsverlust der Proben berechnet.

2.17 Theoretische Verteilung von *Vibrio* spp. in verschiedenen Ostseehabitaten eines Küstenabschnitts im Winter

Auf Grundlage der *Vibrio* spp.-Zellzahlen der ddPCR für den ersten Winter wurde eine theoretische Aufteilung der *Vibrio* spp.-Abundanzen für den räumlichen Anteil eines jeden Habitats berechnet. Für die Berechnungen wurden folgende Annahmen getroffen: I. Das Durchschnittsgewicht einer Schwarzmundgrundel beträgt 40 g bei einer Länge von 140 mm (Hempel und Thiel 2013, Piria *et al.* 2011, Skabeikis und Lesutienė 2015) mit einer Gewebsdichte von 1,026 g cm⁻³ (Davidovits 2018); II: Die oberen 2 cm des Sediments werden

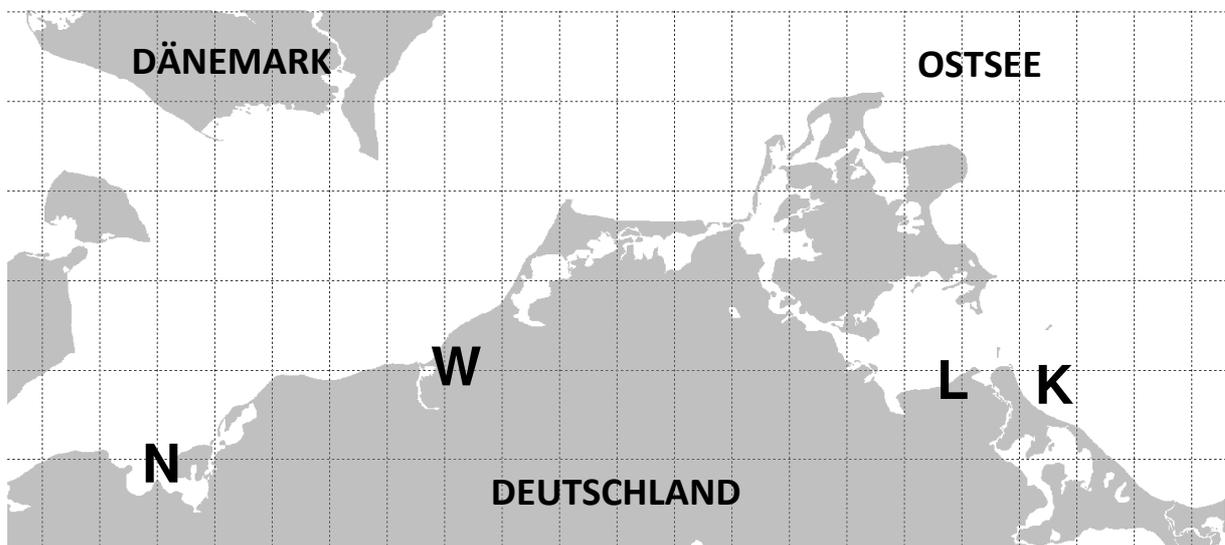
betrachtet bei einer durchschnittlichen Dichte von $2,65\text{g cm}^{-3}$ (Zobkov und Esiukova 2017); III: Die im Wasser enthaltene Seston-Menge beträgt 10 mg/L (Nausch *et al.* 2002) mit einer Dichte von $2,65\text{g cm}^{-3}$; IV: Der Wasserkörper ist 4 m tief, was der Wassertiefe in dem Bereich entspricht, in der die Grundeln mit Fischfallen gefangen wurden; V: Für die Abundanz an Grundeln werden theoretische Werte von $2, 30$ und 100 Tieren pro m^{-2} angenommen. Dies entspricht berichteten Abundanzen dieser Art in aquatischen Habitaten (Azour *et al.* 2015, Chotkowski und Marsden 1999, Sapota 2004)

3 Ergebnisse

3.1 Invasive Fischart *Neogobius melanostomus* als *Vibrio*-Träger in der südlichen Ostsee

3.1.1 Umweltbedingungen südliche Ostsee

Die Salinität an den vier Probestationen zeigte einen abfallenden Gradienten von West nach Ost. Dabei lagen die Werte für die Stationen Warnemünde und Niendorf im Bereich zwischen 11,6 – 15,3‰, und bei Lubmin und Karlshagen zwischen 6,0 – 8,3‰ (Abb. 3.1).



	Niendorf (N)	Warnemünde (W)	Lubmin (L)	Karlshagen (K)
Sommer 2015	Datum: 21.10.2015 Temp.: 10,6 °C Salinität: 14,6‰	Datum: 17.8.2015 Temp.: 16,8 °C Salinität: 11,6‰	Datum: 22.09.2015 Temp.: 15,8 °C Salinität: 8,3‰	Datum: 22.09.2015 Temp.: 15,0 °C Salinität: 8,0‰
Winter 2015/16	Datum: 7.03.2016 Temp.: 4,6°C Salinität: 12,0‰	Datum: 15.02.2016 Temp.: 3,7 °C Salinität: 13,1‰	Datum: 22.02.2016 Temp.: 5,9 °C Salinität: 6,4‰	Datum: 29.02.2016 Temp.: 3,7 °C Salinität: 6,0‰
Winter 2016/17	Datum: 13.02.2017 Temp.: 1,0 °C Salinität: 13,1‰	Datum: 13.02.2017 Temp.: 3,2 °C Salinität: 15,3‰	Datum: 15.02.2017 Temp.: 1,5 °C Salinität: 6,0‰	Datum: 15.02.2017 Temp.: 1,0 °C Salinität: 6,5‰
Sommer 2018	-	Datum: 07.08.2018 Temp.: 21,7 °C Salinität: 7,4‰	-	-

Abbildung 3.1: Karte der östlichen deutschen Ostseeküste. Die Buchstaben repräsentieren die Probenahmestationen. Die Probenahmezeitpunkte, die gemessene Salinität und die Temperatur sind gelistet.

Ausnahme bildete die Probe vom Sommer 2018 in Warnemünde mit einer Salinität von 7,4‰. Die Wassertemperaturen lagen in den Winterproben mindestens 10 °C unter den im Sommer genommenen Proben. Diese erreichten Werte zwischen 1 – 5,9 °C, bzw. 10,6 – 16,8 °C. Die Sommerprobenahme 2018 stellte erneut eine Ausnahme dar, mit der einzig gemessenen Wassertemperatur von über 20 °C.

3.1.2 *Vibrio* spp.-Abundanzen

3.1.2.1 Absolute *Vibrio* spp.-Quantifizierung

Die absolute *Vibrio* spp.-Zellzahl war in Proben von *N. melanostomus* in fast allen Fällen mindestens 10-mal höher als im umgebenden Wasser, Sediment und Seston.

Dies traf auf alle angewendeten methodischen Ansätze zu, und war sowohl im Sommer als auch im Winter sichtbar (Abb. 3.2, Abb. 3.4).

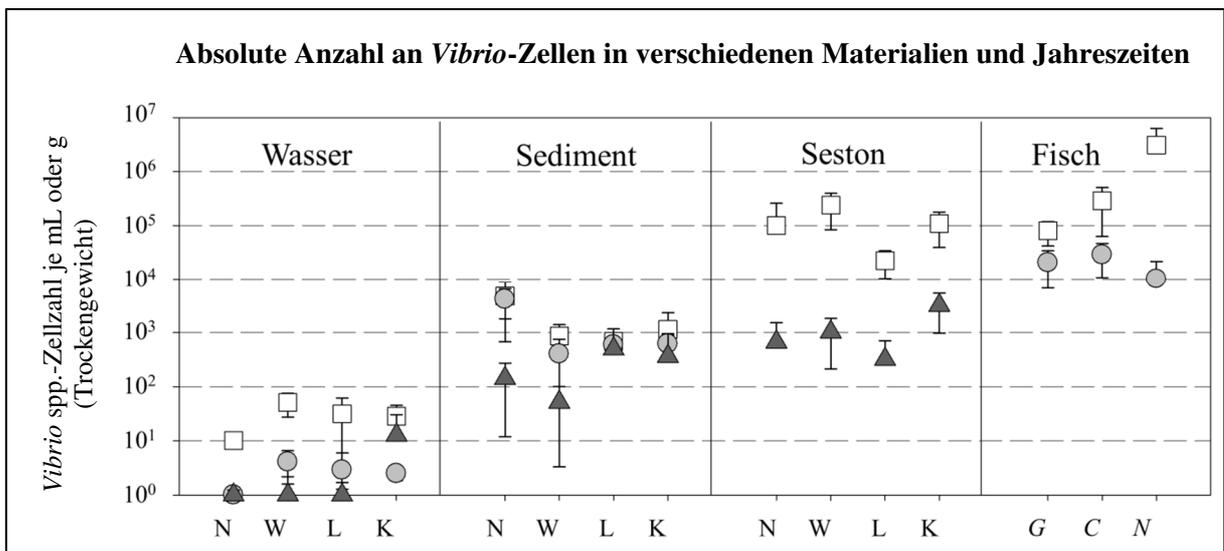


Abbildung 3.2: *Vibrio* spp.-Zellzahl ermittelt durch *in silico* verbesserte ddPCR-16S rRNS Gen-Quantifizierung.

Die Ergebnisse sind in absoluter *Vibrio* spp.-Zellzahl angegeben (mL⁻¹ oder g⁻¹ Trockengewicht),

N: Niendorf, W: Warnemünde, L: Lubmin, G: *G. morhua*, C: *C. harengus membras*, N: *N. melanostomus*

□ Sommer 2015, ● Winter 2015/16, ▲ Winter 2016/17

Insgesamt zeigte sich ein Anstieg in der *Vibrio*-Zellzahl, der vom Wasser, über das Sediment und das Seston bis zu den Fischen reichte. Hierfür ergaben sich *Vibrio*-Zellzahlen für den Sommer 2015 im Bereich von 1×10^1 Zellen mL⁻¹ für Wasser in Niendorf, bis hin zu Zellzahlen von $3,11 \times 10^6$ Zellen g⁻¹ in dem Gewebe von *N. melanostomus*. Die aufgeschlüsselte

Untersuchung von Hautschleim, Kiemen und Magen-Darm-Trakt in den drei Fischarten zeigte, dass letzteres den Hauptträger von *Vibrio* spp. in den untersuchten Fischgeweben darstellte (Tabelle 3.1).

Tabelle 3.1: Vergleich der *Vibrio* spp.-Zellzahl in individuell untersuchten Fischen und Kompartimenten aus dem Sommer 2018. Gezeigt werden alle Individuen, in denen die Bestandteile separat untersucht wurden. Grau markiert ist jenes Material, in dem die höchste Anzahl an *Vibrio* spp.-Zellen in einem Individuum gefunden wurde. NB: Nicht bestimmt

Fisch	Individuum	Material	Konzentration an Zellen von <i>Vibrio</i> spp. [g ⁻¹ Trockengewicht]
<i>N. melanostomus</i>	1	Hautschleim	0
		Kiemen	2,75 x 10 ²
		Magendarmtrakt	5,47 x 10 ³
<i>N. melanostomus</i>	2	Hautschleim	0
		Kiemen	4,74 x 10 ²
		Magendarmtrakt	1,30 x 10 ³
<i>N. melanostomus</i>	3	Hautschleim	2,80 x 10 ⁵
		Kiemen	1,02 x 10 ³
		Magendarmtrakt	3,43 x 10 ⁶
<i>C. harengus membras</i>	1	Hautschleim	2,37 x 10 ³
		Kiemen	0
		Magendarmtrakt	7,72 x 10 ²
<i>C. harengus membras</i>	2	Hautschleim	1,49 x 10 ²
		Kiemen	1,35 x 10 ¹
		Magendarmtrakt	1,71 x 10 ³
<i>C. harengus membras</i>	3	Hautschleim	8,28 x 10 ²
		Kiemen	7,14 x 10 ¹
		Magendarmtrakt	1,42 x 10 ⁴
<i>C. harengus membras</i>	4	Hautschleim	NB
		Kiemen	1,21 x 10 ²
		Magendarmtrakt	NB
<i>C. harengus membras</i>	5	Hautschleim	0
		Kiemen	0
		Magendarmtrakt	6,23 x 10 ³
<i>C. harengus membras</i>	6	Hautschleim	2,79 x 10 ²
		Kiemen	1,10 x 10 ³
		Magendarmtrakt	1,67 x 10 ³
<i>G. morhua</i>	1	Hautschleim	4,21 x 10 ⁴
		Kiemen	5,77 x 10 ¹
		Magendarmtrakt	8,31 x 10 ¹

In allen untersuchten Individuen von *N. melanostomus*, sowie in 4 der 5 Individuen von *C. harengus membras*, überstieg die Zellzahl an Vibrionen im Magen-Darm-Trakt die der anderen beiden Gewebe um fast das Zehnfache. Die Werte liegen dabei zwischen 1,3 x 10³ und 3,43 x 10⁶ *Vibrio* spp.-Zellen g⁻¹ Trockengewicht. Die Ausnahme bildete der individuell

untersuchte Dorsch (*G. morhua*). Bei diesem betrug die im Hautschleim gemessene *Vibrio*-Zellzahl $4,21 \times 10^4 \text{ g}^{-1}$ Trockengewicht, was die in den Kiemen und dem Magen-Darm-Trakt gemessenen Werte um drei Größenordnungen überstieg.

Der allgemein sichtbare Gradient, der sich in den durch ddPCR ermittelten *Vibrio*-Zellzahlen vom Wasser, zum Sediment, Seston und den Fischen in den Sommerproben zeigte, war auch in den beiden Winterprobenahmen sichtbar. In dieser Jahreszeit bestand jedoch eine Reduzierung in der Zellzahl der Vibrionen in allen Proben (Abb. 3.2). Die dabei auftretende Differenz zwischen den Werten der Sommerprobenahme und den Winterprobenahmen war materialabhängig. Die Differenz in den Sedimentproben war mit einer Magnitude am geringsten. Die Proben von Grundeln und Seston, welche die größte Konzentration im Sommer aufwiesen, waren durch die größte Differenz zwischen Sommer und Winter charakterisiert. Diese lag ungefähr bei 2 Magnituden. Im Umkehrschluss ergab sich ein Anstieg der *Vibrio*-Zellzahl mit einem Anstieg der Wassertemperatur. Beim Vergleich der *Vibrio*-Zellzahlen in Abhängigkeit zur Temperatur für die Proben aus Warnemünde zeigte sich in den beiden Sommersituationen ein starker Anstieg der *Vibrio*-Zellzahl im Wasser und im Sediment um das 20- bzw. 580-fache (Abb. 3.3, S6). Im Gegensatz dazu blieb dieser Anstieg der *Vibrio*-Zellzahl in den Geweben der 3 Fischarten aus.

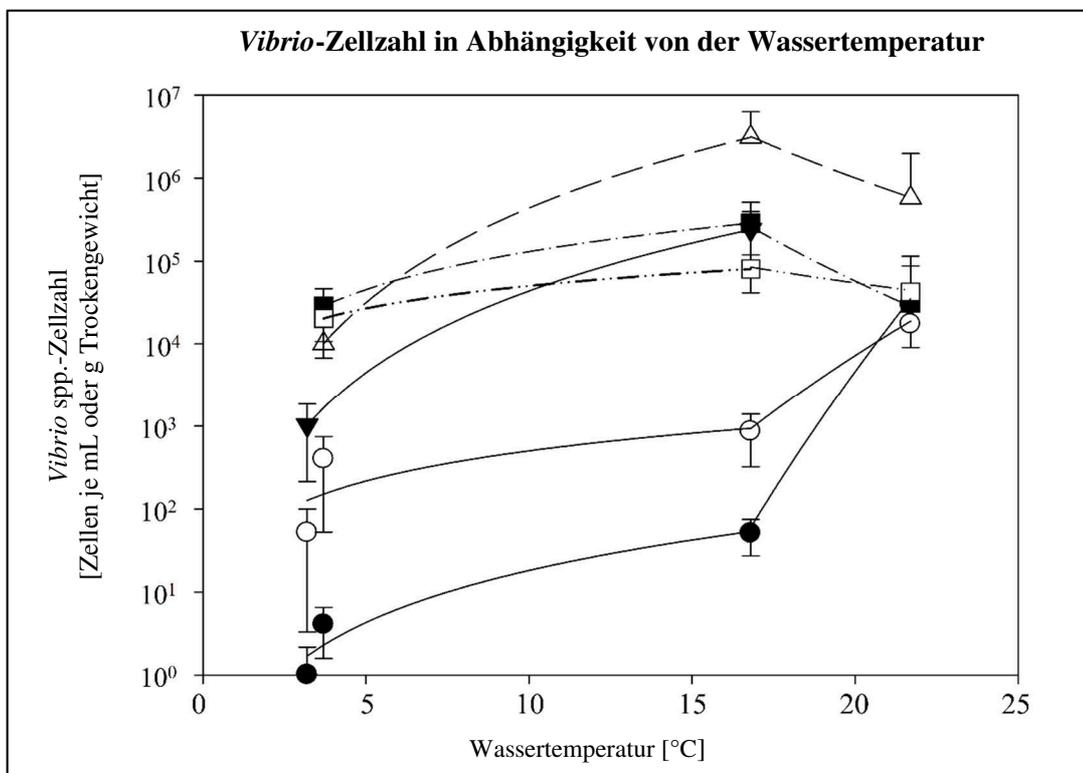


Abbildung 3.3: *Vibrio* spp.-Zellzahlen in Abhängigkeit von der Wassertemperatur im ● Wasser, ○ Sediment, ▼ Seston, ■ *C. harengus membras*, △ *N. melanostomus*, □ *G. morhua*. *Vibrio*-Zellzahlen wurden aus den Ergebnissen der ddPCR-Quantifizierung für Warnemünde berechnet.

Die kultivierungsbasierte absolute *Vibrio* spp.-Quantifizierung konnte im Vergleich zur ddPCR nur für die Proben aus Warnemünde im Sommer 2015 angewendet werden, da bei den Proben der anderen Standorte keine, oder nur eine einzelne Kolonie bei der direkten Ausplattierung auftraten. Die KBE-Werte für die Proben von Warnemünde bildeten ebenfalls einen Gradienten und lagen zwischen dem Detektionslimit im Wasser, bis hin zu $2,00 \times 10^6$ und $2,65 \times 10^6$ *Vibrio*-KBE pro g Trockengewicht in dem Gewebe von *N. melanostomus* bzw. im Seston (Abb. 3.4., S7).

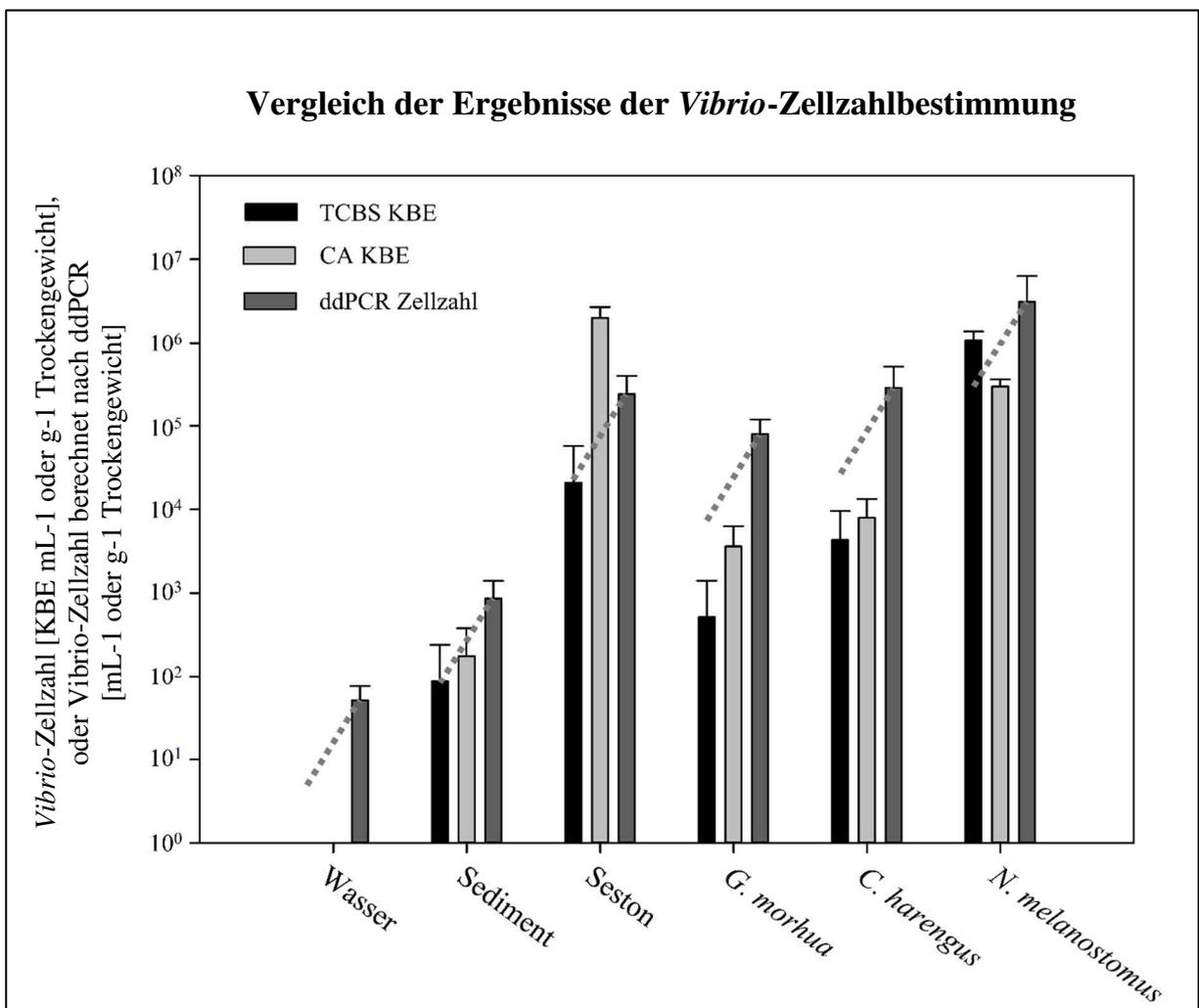


Abbildung 3.4: Quantifizierung der absoluten *Vibrio* spp.- Zellzahl in den Sommerproben 2015 aus Warnemünde mittels Kultivierung und ddPCR. Die Anzahl an KBE von *Vibrio* spp. basieren auf den korrigierten Werten nach der Entfernung von falsch positiven Ereignissen auf TCBS und CA. - - - - : Markierung einer Differenz von einer Magnitude beginnend bei den Ergebnissen der ddPCR.

Die Werte waren in fast allen Fällen kleiner, als die für die entsprechenden Materialien zugehörigen durch ddPCR ermittelten *Vibrio*-Zellzahlen. Die Differenz zwischen den Werten

der ddPCR und den niedrigsten kultivierungsbasierten Werten war dabei ungefähr eine Zehnerpotenz für Sediment, Seston und *N. melanostomus* und ungefähr zwei Zehnerpotenzen für *C. harengus membras* und *G. morhua*.

3.1.2.2 Relative *Vibrio* spp.-Quantifizierung

In Bezug auf die relative Abundanz von *Vibrio* zeigte sich, dass die Werte in den Gewebeproben von *N. melanostomus* mindestens um ein Zehntel größer waren als in den restlichen Proben (Abb. 3.5, Abb. 3.6, S5). Es ergab sich erneut ein Gradient der von Wasser, über Sediment bis hin zum Seston und den Fischen reichte. Das Gewebe von *G. morhua* stellte hiervon eine Ausnahme dar, mit einer relativen Abundanz ähnlich der des Wassers. Für den Sommer reichten die Werte von 0,0126% im Wasser von Niendorf, bis hin zu 3,3% im Gewebe von *N. melanostomus*. Im Winter lag die Spannweite von 0,001% im Wasser von Lubmin bis 0,83% und 0,81% im Seston von Warnemünde und Gewebe von *N. melanostomus*.

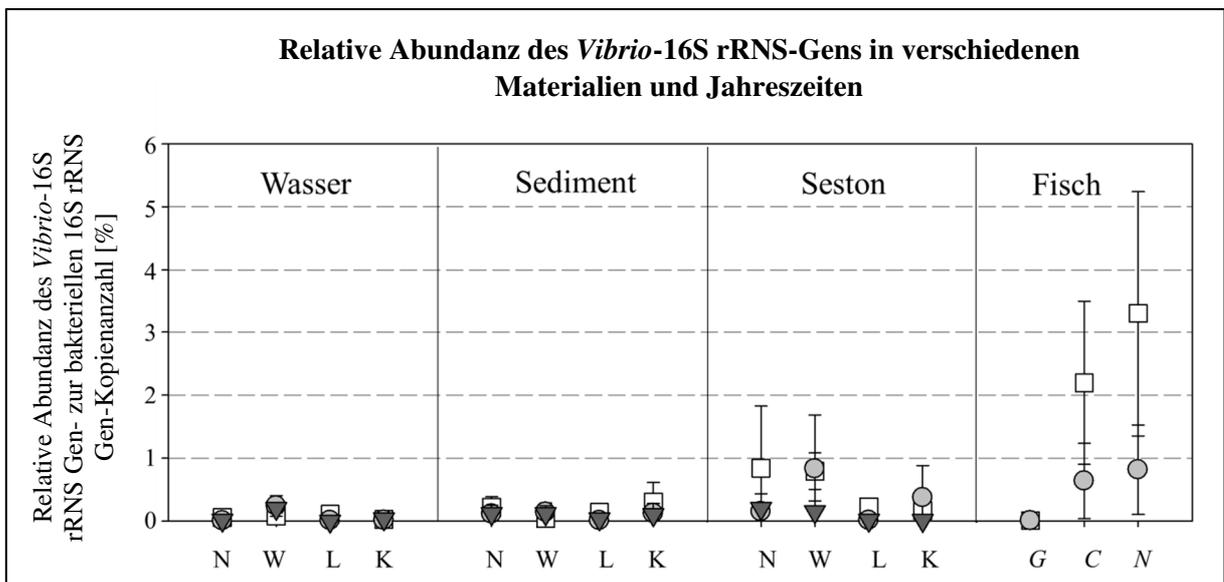


Abbildung 3.5: Relative Abundanz des *Vibrio* spp.-16S rRNA Gens, ermittelt durch *in silico* verbesserte ddPCR-16S rRNA Gen-Quantifizierung. Angabe als relative Abundanz des *Vibrio* spp.-16S rRNA Gens im Verhältnis zum bakteriellen 16S rRNA Gens.

N: Niendorf, W: Warnemünde, L: Lubmin, G: *G. morhua*, C: *C. harengus membras*, N: *N. melanostomus*, □ Sommer 2015, ● Winter 2015/16, ▲ Winter 2016/17

Im Vergleich der Messergebnisse aus der ddPCR und der Illumina-MiSeq-Sequenzierung lagen mit Ausnahme von *C. harengus membras* die Werte derselben Probenmaterialien im selben Größenbereich (Abb. 3.6, S7).

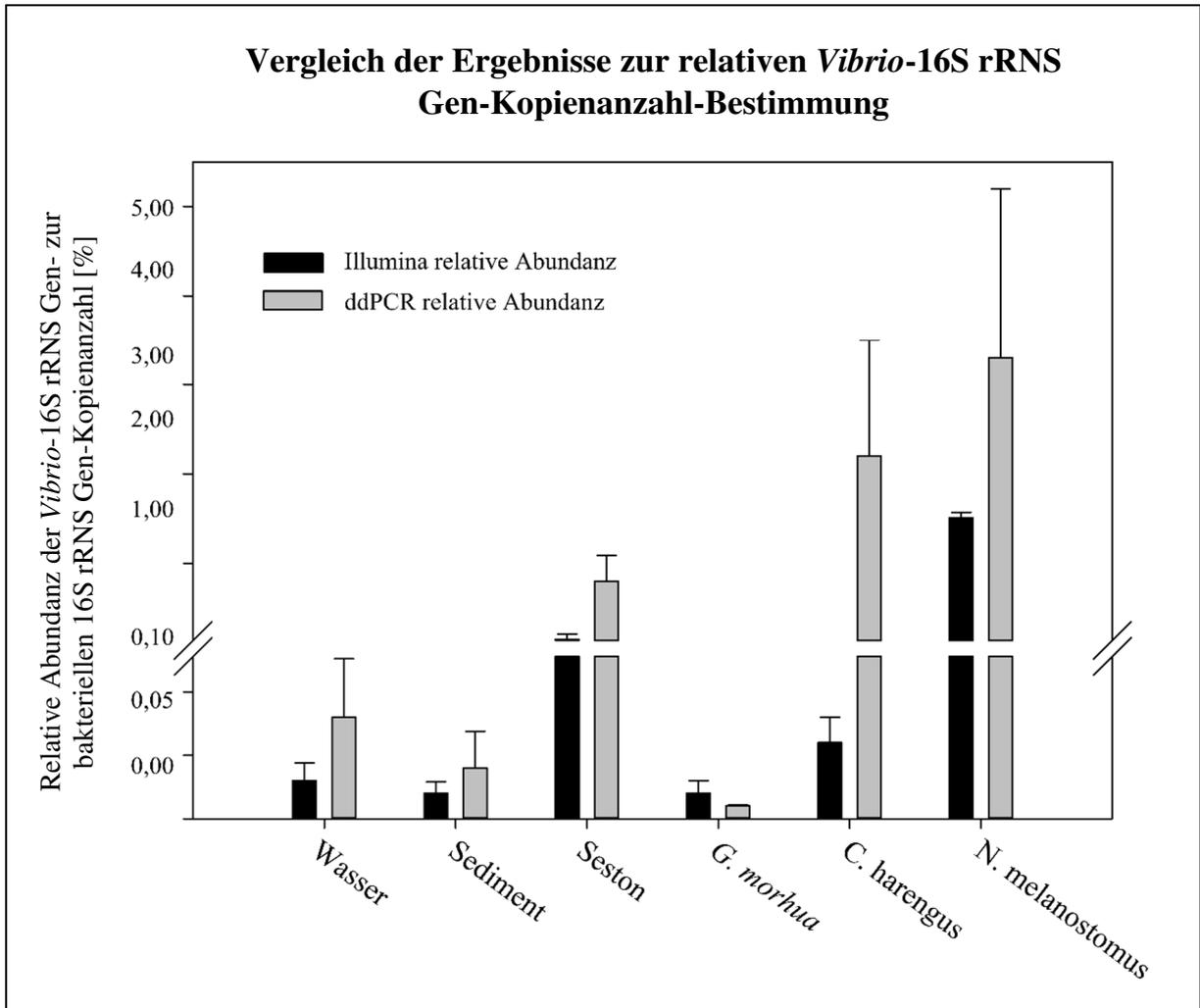


Abbildung 3.6: Relative Abundanz der Kopienanzahl des *Vibrio*-16S rRNS Gens im Verhältnis zur bakteriellen 16S rRNS Gen-Kopienanzahl für die Sommerproben Warnemünde 2015. Ermittelte Werte aus den Messungen der ddPCR und Illumina-Sequenzierung. Der Sprung in der y-Achse liegt zwischen 0,129 und 0,14.

3.1.2.3 Korrekturfaktoren für *in silico* verbesserte *Vibrio*-spezifische ddPCR

Während kultivierungs-basierte Methoden zur *Vibrio* spp.-Quantifizierung nur Ergebnisse in den Sommerproben aus Warnemünde 2015 lieferten, konnte die *Vibrio*-spezifischer ddPCR in allen Proben das *Vibrio*-16S rRNS Gen detektieren und quantifizieren. Dabei fanden die ermittelten Korrekturfaktoren bereits Berücksichtigung. Die Ermittlung dieser Korrekturfaktoren erfolgte durch Illumina-16S rRNS Gen-Sequenzierung für die Proben aus Warnemünde im Sommer 2015. Für *N. melanostomus* und *G. morhua* wurden dabei ca. 84% ($\pm 2,1\%$) der sequenzierten 16S rRNS Genen der Gattung *Photobacterium* zugeordnet. Für *C. harengus membras* lag dieser Wert bei 4,8% ($\pm 2,1\%$) und für Sediment-, Seston- und

Wasserproben bei ca. 0,03% ($\pm 0,02\%$). Der *in silico*-Vergleich dieser Sequenzen mit den Primern für die Quantifizierung von *Vibrio* zeigte in 90% der Fälle nur eine einzelne Abweichung an der endständigen Base oder eine komplette Übereinstimmung mit der entsprechenden Bindungsstelle (S8). Für diese Sequenzen wurde angenommen, dass sie mit den *Vibrio*-spezifischen Primern ein Amplifikat bilden. Auf dieser Grundlage erfolgte die Berechnung der Material-spezifischen Korrekturfaktoren, die in die Ergebnisse der ddPCR mit einfließen (S8). Die Faktoren lagen im Bereich von $4,47 \times 10^{-1}$ bis $2,07 \times 10^{-4}$.

3.1.3 Gesamte bakterielle Gemeinschaft und *Vibrio*-Gemeinschaften in Fischen und anderen Umweltmaterialien

Die multivariate Analyse der Illumina-16S rRNS Gen-Sequenzierung zeigte eine materialabhängige Differenzierung der gesamten bakteriellen Zusammensetzung, sowie der *Vibrio*-Gemeinschaften. In der bakteriellen Zusammensetzung zeichneten sich zwei signifikant unterschiedliche Gruppen ab ($p < 0.05$) (S9). Die erste Gruppe bestand aus den Proben von Wasser, Sediment und Seston, während sich die zweite Gruppe aus den drei Fischen zusammensetzte (Abb. 3.7).

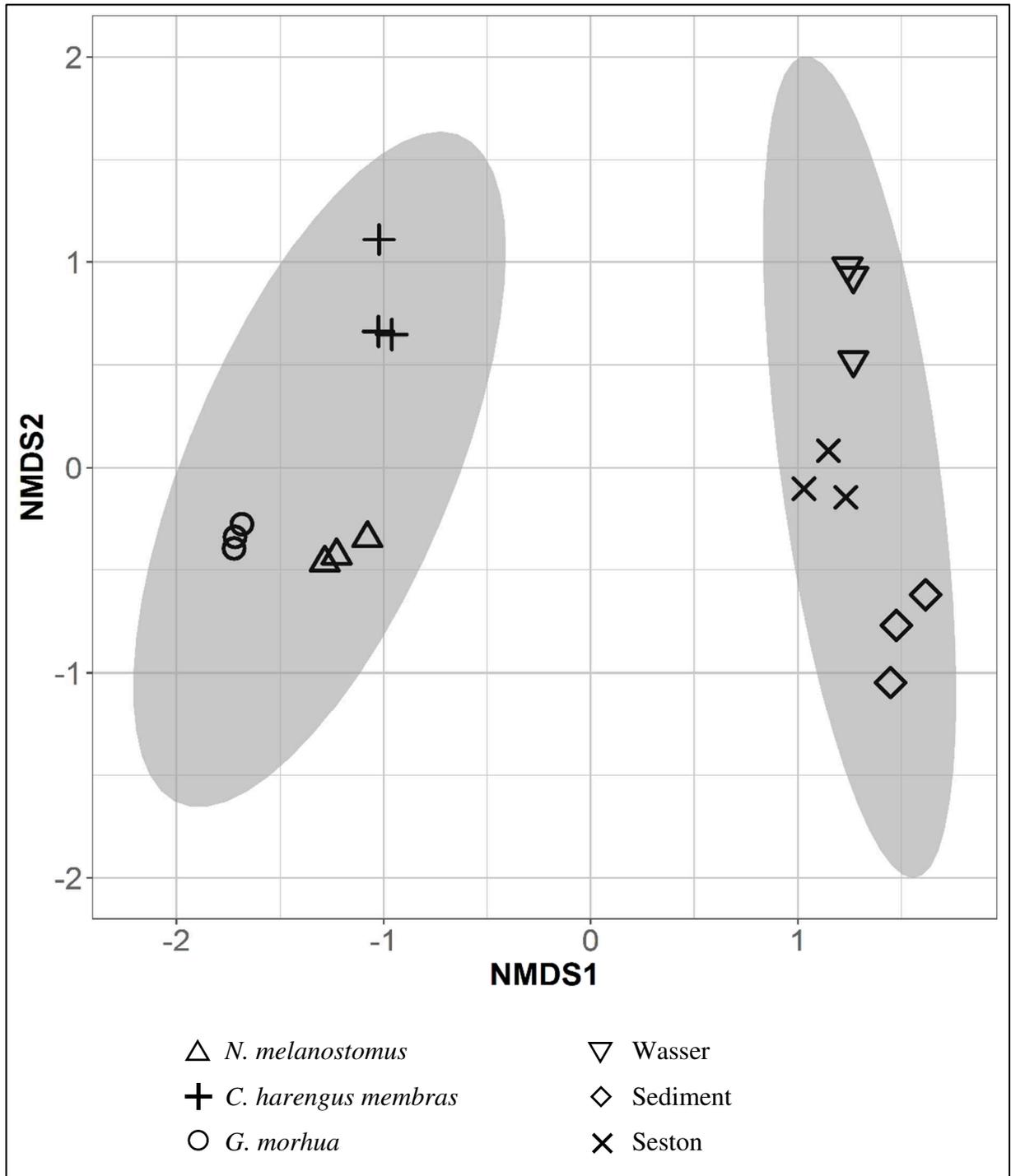


Abbildung 3.7: nMDS-Plot der bakteriellen Gemeinschaft in den Sommerproben aus Warnemünde 2015. Berechnet aus den relativen Abundanzen der bakteriellen OTUs. Die zwei Ellipsen markieren die Gruppen der Fischproben und die Sediment-Seston-Wasserproben mit einem 95% Vertrauensintervall. Stress = 0,048

Bei der Betrachtung der 15 *Vibrio*-OTUs zeigte sich im direkten Vergleich aller Materialien, dass sich *G. morhua* signifikant von allen Materialien unterschied (S10). Dies war ebenfalls für *N. melanostomus* mit Ausnahme zum Hering der Fall. Wasser, Sediment, Seston und Hering waren untereinander ähnlich. (Abb. 3.8).

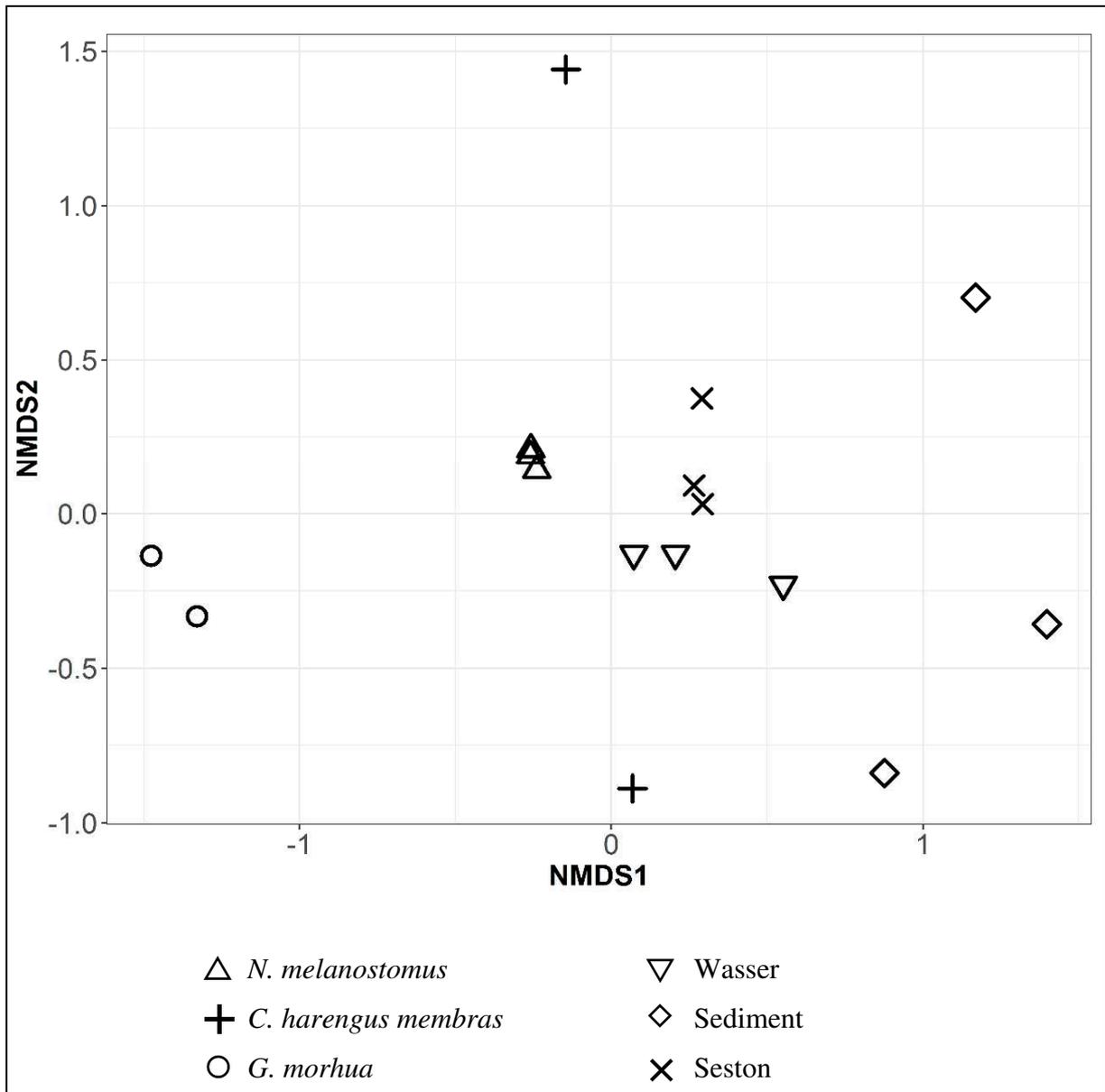


Abbildung 3.8: nMDS-Plot der Vibrionen-Gemeinschaft in den Sommerproben aus Warnemünde 2015. Berechnet aus den Hellinger-transformierten relativen Abundanzen der 15 *Vibrio*-OTUs. Stress = 0,08

3.1.4 *Vibrio*-Artenzusammensetzung auf Basis der Kultivierung

Die artspezifische Untersuchung der *Vibrio*-Gemeinschaft durch die Identifizierung der Isolate mittels MALDI-ToF-MS zeigte eine materialabhängige, als auch räumliche Verteilung der

Vibrio-Arten. Insgesamt konnten 1188 und 1324 potentielle *Vibrio*-Isolate im Sommer 2015 bzw. Winter 2015/16 kultiviert werden. Basierend auf der MALDI-ToF-MS-Identifizierung wurden 772 Sommerisolate (entspricht 64% aller Isolate des Sommers), sowie 115 der Winterisolate (entspricht 11,5% aller im Winter gewonnenen Isolate) *Vibrio* zugeordnet. Im Sommer wurden in allen untersuchten Materialien *Vibrio*-Stämme gewonnen. 11 Arten wurden detektiert. (Abb. 3.9).

	NW	NS	NP	WW	WS	WP	WG	WC	WN	LW	LS	LP	KW	KS	KP
<i>V. aestuarianus</i>															
<i>V. diazotrophicus</i>															
<i>V. anguillarum</i>															
<i>V. navarrensis</i>															
<i>V. furnissii</i>															
<i>V. parahaemolyticus</i>															
<i>V. vulnificus</i>															
<i>V. fluvialis</i>															
<i>V. cholerae</i>															
<i>V. alginolyticus</i>															
<i>V. mimicus</i>															

Abbildung 3.9: Durch MALDI-ToF-MS ermittelte Artzusammensetzung der Vibrionen in den verschiedenen Materialien und Probestandorten für den Sommer 2015. Weiß impliziert den Nachweis der Art, Grau impliziert keine Detektion dieser Art. Oberste Reihe: Der erste Buchstabe steht für die Probestation N: Niendorf, W: Warnemünde, L: Lubmin, K: Karlshagen. Der zweite Buchstabe steht für das Probenmaterial W: Wasser, S: Sediment, P: Seston, G: *G. morhua*, C: *C. harengus membras*, N: *N. melanostomus*

Die Sestonproben wiesen zusammen die höchste Diversität auf, mit dem Vorkommen aller 11 Arten. Hingegen wiesen die drei Fischarten zusammen, mit insgesamt fünf isolierten Arten, die geringste Diversität auf. *V. cholerae* trat in allen Probenmaterialien der beiden östlichen Probenahmestandorte auf, und *V. mimicus* wurde nur in Lubmin detektiert. Hingegen war *V. parahaemolyticus* in allen Proben aus Warnemünde vertreten, im Sediment aus Niendorf und Lubmin, sowie Seston aus Lubmin. Die potentiell humanpathogene Art *V. vulnificus* kam in 3

der 15 untersuchten Proben aus dem Sommer 2015 vor. Dies waren neben *N. melanostomus* aus Warnemünde, Wasser aus Lubmin und Seston in Karlshagen.

Im Winter wurden in 4 der 15 Proben Vibrionen detektiert: Wasser aus Warnemünde, Sediment aus Karlshagen, Wasser und Sediment aus Niendorf (S11). Dabei wurden vier Arten nachgewiesen: *V. parahaemolyticus*, *V. diazotorrophicus*, *V. anguillarum* und *V. aesturianus*.

3.1.5 Auftretende opportunistische Virulenz-Gene in *Vibrio vulnificus*

Auf Grundlage der PCR-Ergebnisse handelte es sich bei den Isolaten von *V. vulnificus* um vermutlich geringer pathogene Stämme. Alle getesteten opportunistischen Virulenz-Gene waren in verschiedenen Stämmen nachweisbar, jedoch maximal zwei im selben Stamm (Tabelle 3.2).

Tabelle 3.2: Detektion der Virulenz-Faktoren HP1, *viuB* und *rtxA1* in *Vibrio vulnificus*-Isolaten aus der Ostsee.

Zwei verschiedene *vvh*-Systeme verifizieren die Ergebnisse der Spezies-Identifizierung durch MALDI-ToF-MS. Als Negativ-Kontrolle dienten fünf *Vibrio*-Stämme, die der Art *V. parahaemolyticus* und *V. cholerae* zugeordnet wurden. + Nachweis des Gens, - Abwesenheit des Gens.

Stamm-ID	Spezies (MALDI-ToF)	vvhA	vvh785/990	HP1	viuB	rtxA1
X29	<i>V. vulnificus</i>	+	+	-	-	-
X33	<i>V. vulnificus</i>	+	+	+	-	-
X35	<i>V. vulnificus</i>	+	+	-	+	+
X36	<i>V. vulnificus</i>	+	+	-	-	-
X39	<i>V. vulnificus</i>	+	+	+	-	-
X41	<i>V. vulnificus</i>	+	+	-	-	-
X42	<i>V. vulnificus</i>	+	+	-	-	-
X44	<i>V. vulnificus</i>	+	+	+	-	-
X45	<i>V. vulnificus</i>	+	+	+	-	-
C11	<i>V. vulnificus</i>	+	+	-	-	-
C22	<i>V. vulnificus</i>	+	+	-	-	-
C26	<i>V. vulnificus</i>	+	+	+	-	-

Fortsetzung Tabelle 3.2:

Stamm-ID	Spezies (MALDI-ToF)	vvhA	vvh785/990	HP1	viuB	rtxA1
C30	<i>V.vulnificus</i>	+	+	-	-	-
C31	<i>V.vulnificus</i>	+	+	-	-	-
C32	<i>V.vulnificus</i>	+	+	-	-	-
C35	<i>V.vulnificus</i>	+	+	+	-	-
G96	<i>V.vulnificus</i>	+	+	-	+	+
C20	<i>V.cholerae</i>	-	-	-	-	+
C25	<i>V.cholerae</i>	-	-	-	-	+
C33	<i>V.cholerae</i>	-	-	-	-	+
Y5	<i>V.parahaemolyticus</i>	-	-	-	-	+
Y15	<i>V.parahaemolyticus</i>	-	-	-	-	+

Die PCR mit den Primern für das Gen *rtxA1* zeigten positive Ergebnisse in den Kontrollstämmen. Sämtliche *V. vulnificus*-Stämme waren positiv für das Spezies-spezifische Gen *vvh*.

3.1.6 Vibrio-Last in *N. melanostomus* im Vergleich zu anderen untersuchten Materialien in einem Küstensegment im Winter

Die geschätzte Winterlast an Zellen von *Vibrio* spp. für verschiedene Habitate zeigte die Rolle von *N. melanostomus* als potentiellen Hauptträger der Vibrionen-Last. Sowohl Wasser als auch Sediment wiesen einen ungefähr gleich großen Anteil an *Vibrio* spp.-Zellen mit jeweils ca. 30% des Gesamtanteils auf (Abbildung 3.10). Dabei machten sie den größten räumlichen Anteil eines Küstensegmentes aus. Seston nahm nur ungefähr ein Hunderttausendstel des Volumens von Wasser ein und trug eine vernachlässigbare Anzahl an *Vibrio* spp.-Zellen. Obgleich *N. melanostomus* ebenfalls nur ein Tausendstel des Volumens von Wasser darstellten, besaßen sie das Potential, einen relevanten bis hin zu gleich großem Anteil an *Vibrio* spp.-Zellen aufzunehmen wie Wasser und Sediment.

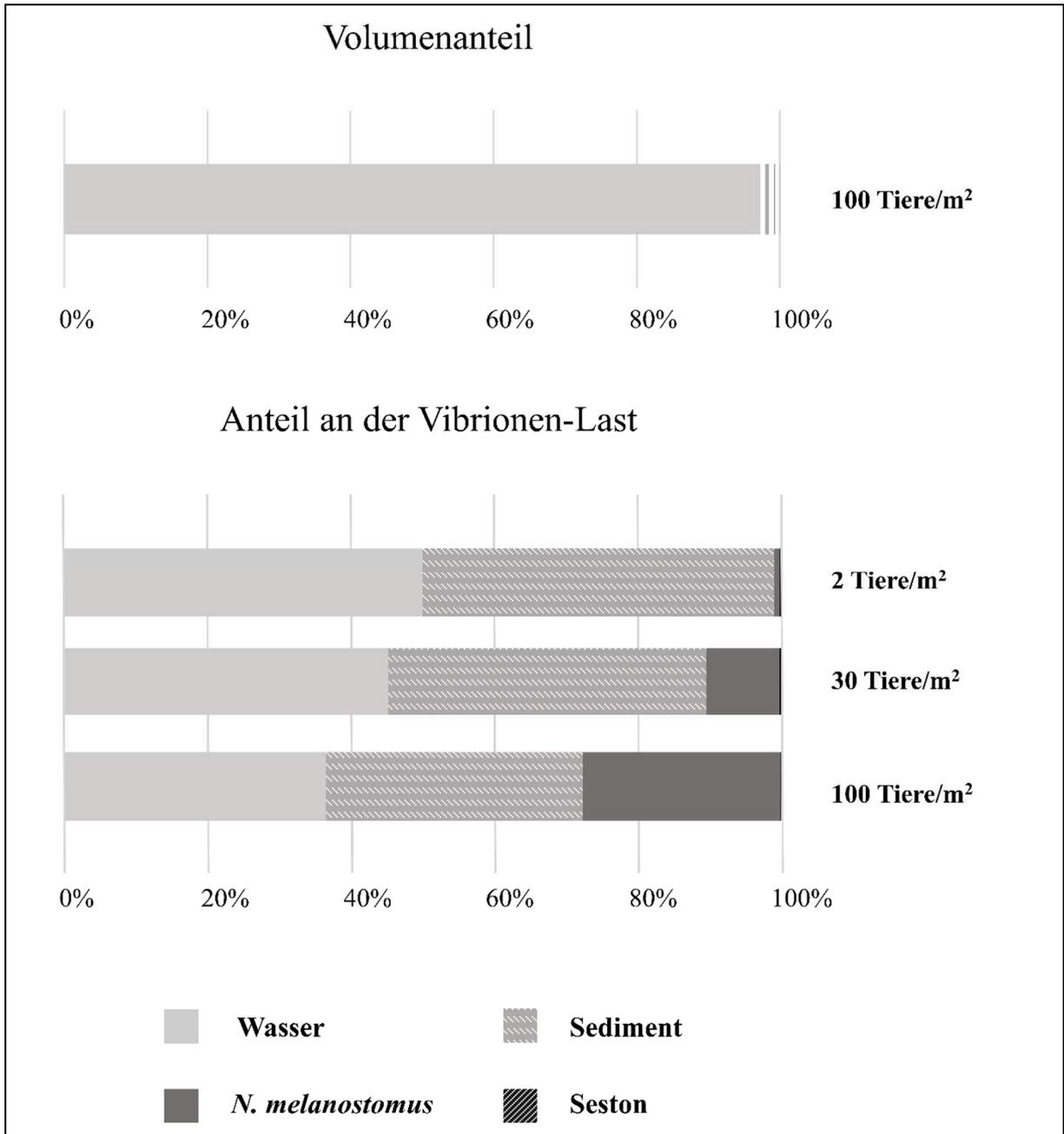


Abbildung 3.10: Theoretischer Anteil von *N. melanostomus* als Habitat für *Vibrio* spp. im Winter 2015/16 in Warnemünde. Die räumliche Berechnung erfolgte für eine Fläche von einem Quadratmeter bei einer Wassertiefe von vier Metern. A: Volumenanteil des Wassers, der obersten zwei Zentimeter des Sediments, Sestons und *N. melanostomus* bei einer Dichte von 100 Tieren je Quadratmeter. Andere Besatzdichten werden nicht dargestellt. B: Der relative Anteil der Last an *Vibrio* spp.-Zellen in Abhängigkeit von unterschiedlichen Besatzdichten von *N. melanostomus*.

3.2 Aquakulturen als Einflussfaktor für *Vibrio*-Gemeinschaften in Hainan

3.2.1 Umweltbedingungen Hainan

Die Standorte der Probenahme in Hainan sind in Abbildung 3.11 dargestellt.

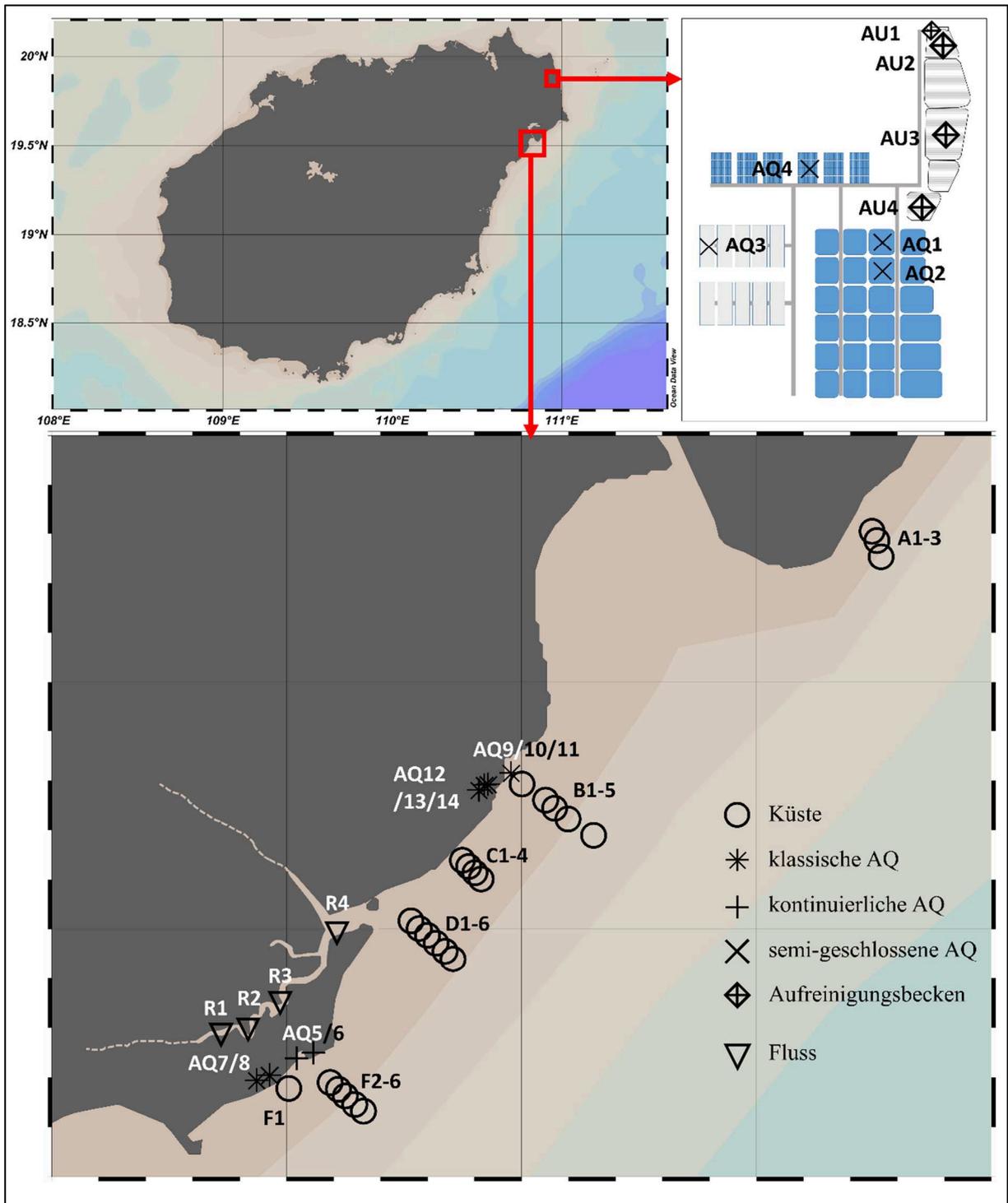


Abbildung 3.11: Standortübersicht der genommenen Proben im Raum Hainan, sowie innerhalb der firmenbetriebenen Aquakultur. AQ = Aquakultur (Modifiziert nach Möller *et al.* 2020)

Der Salzgehalt an den Standorten zeigte bei den Küstenproben einen ungefähr konstanten Wert von 31,5‰ ($\pm 1,5$) wohingegen bei den Aquakulturen eine Spannweite von 15,6 bis 31,8 ‰ auftrat. Beim Fluss war ein Gradient von Flussursprung bis Flussmündung sichtbar, der im Bereich von 9,59 bis 30,25 ‰ lag. Bei der Temperatur lagen alle Proben bei einem Mittelwert von 28,6 °C ($\pm 2,3$). Die Ergebnisse für die weiteren physikalischen und chemischen Parameter sind in S12 dargestellt. Die Informationen über die beprobten Aquakulturen sowie die Ergebnisse aus den Interviews mit den Aquakulturbesitzern sind in S3 und S4 zusammengefasst.

3.2.2 Bakterielle Gemeinschaften in verschiedenen Habitaten in Hainan

Die Untersuchung der bakteriellen Gemeinschaft auf Grundlage der bakteriellen 16S rRNS-Gen-Sequenzierung zeigte neben materiellen Einflüssen auch ein Einfluss durch Aquakulturen (Abb. 3.12). Alle Probenmaterialien wiesen signifikante Unterschiede in ihrer bakteriellen Zusammensetzung auf ($p < 0.05$) (S13). Die Dispersion zwischen den Materialien zeigte dabei, mit Ausnahme zwischen Wasser und Tierproben, ebenso signifikante Unterschiede. Im nMDS-Plot bildeten sich distinkte Cluster für Seegras-, Sediment- und Wasserproben. Die Gewebeproben gruppierten sich, bis auf die beiden Gewebeproben der Schnecken, in einem gemeinsamen Bereich.

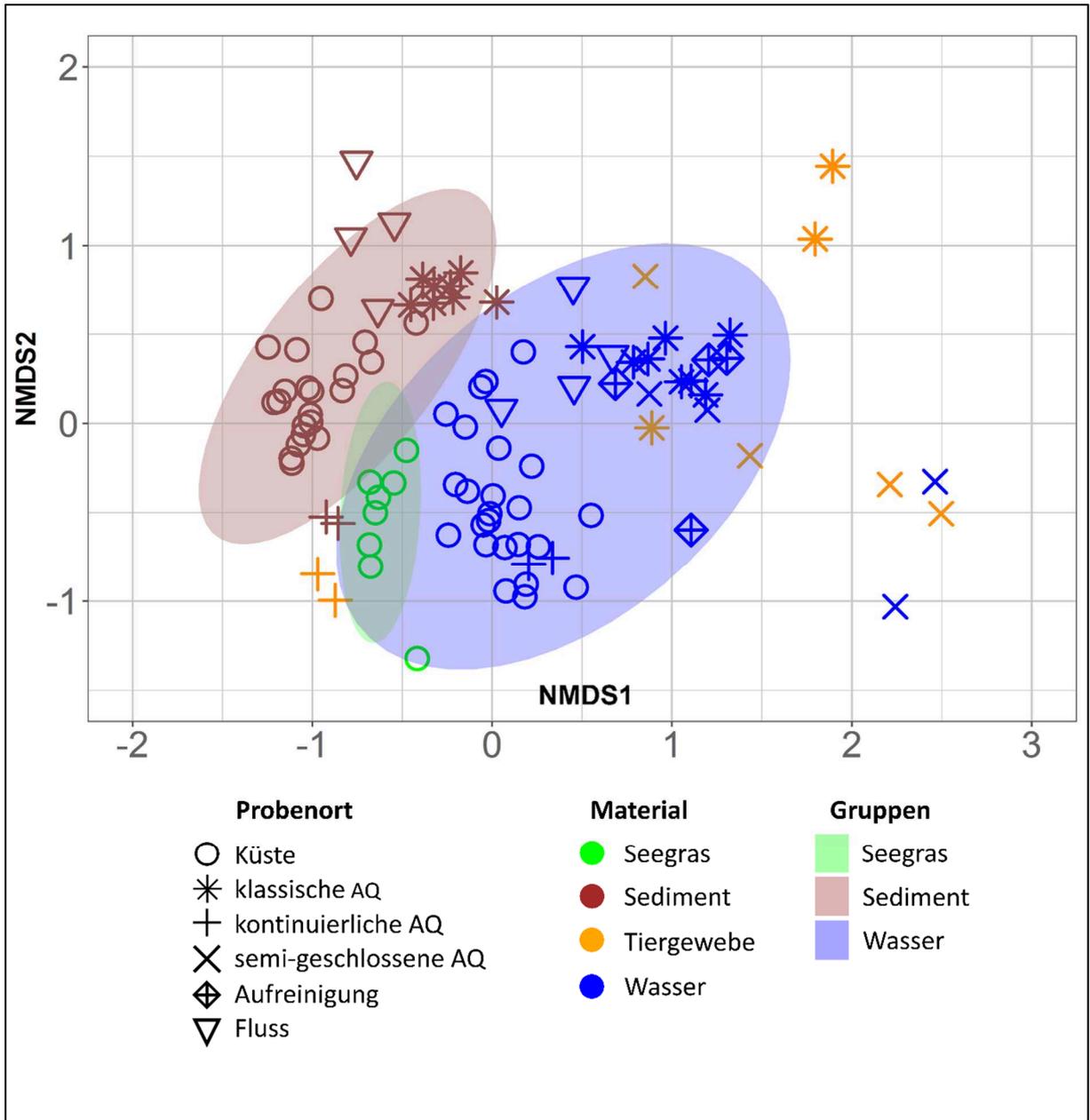


Abbildung 3.12: nMDS-Plot der bakteriellen Gemeinschaft für die Proben aus der Region Hainan. Berechnet aus der Wurzel der relativen Abundanzen der bakteriellen OTUs. Die Ellipsen markieren die Gruppen der Pflanzen-, Sediment- und Wasserproben mit einem 95% Vertrauensintervall. Stress = 0,145

Zusätzlich war innerhalb der Gruppen des Wassers und Sediments eine weitere tendenzielle Aufteilung innerhalb der Abbildung sichtbar (Abb. 3.12). So bildeten sich in diesen visuell eine „aquakulturähnliche“ und eine „küstenähnliche“ Gruppe. Diese wurden bei genauerer Betrachtung der einzelnen Probematerialien deutlicher sichtbar.

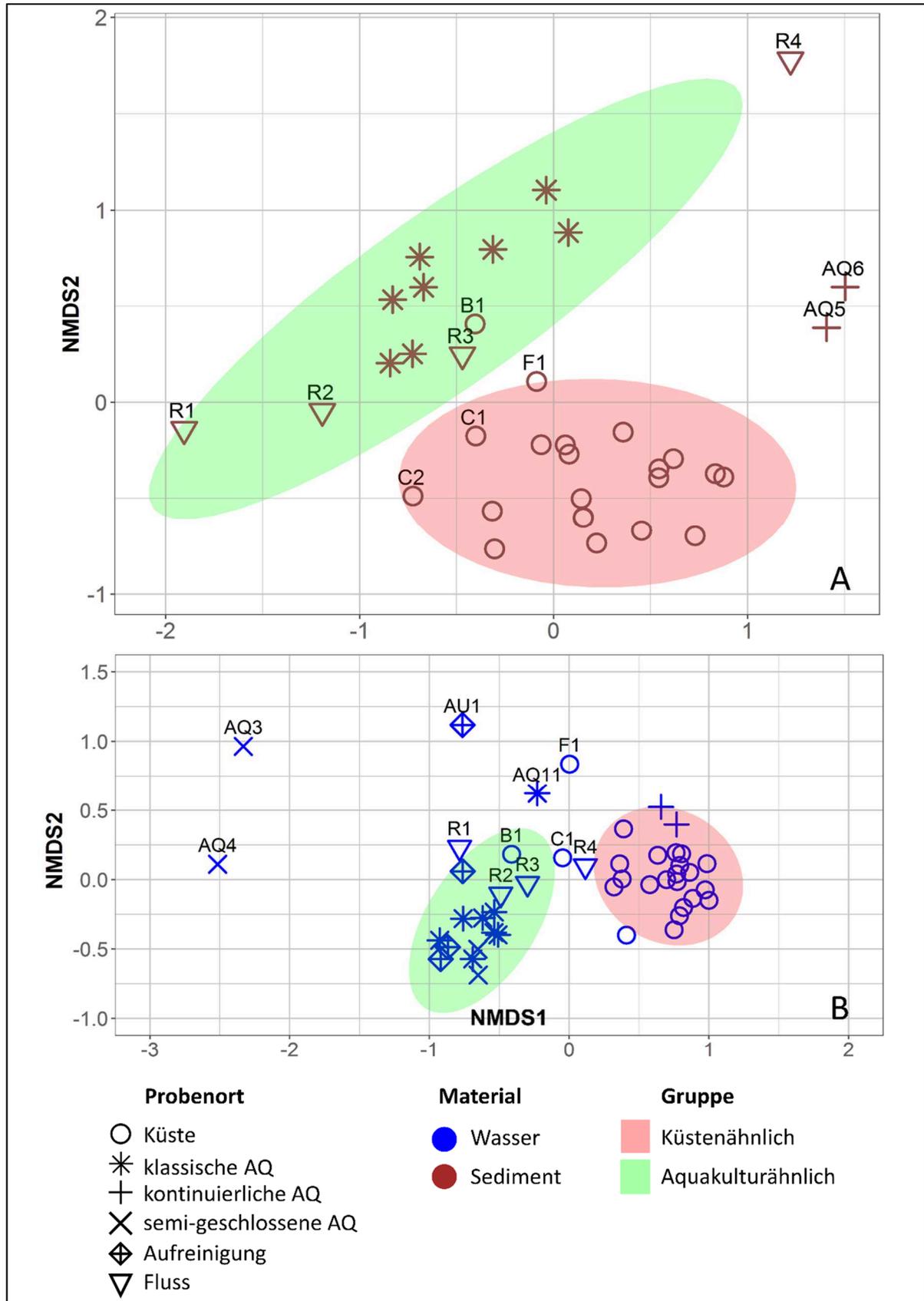


Abbildung 3.13: nMDS-Plot der bakteriellen Gemeinschaft für **A:**Sediment- und **B:**Wasserproben aus der Region Hainan. Berechnet aus der Wurzel der relativen Abundanzen der bakteriellen OTUs. Die Ellipsen markieren die Gruppe aquakulturähnlicher Proben und der küstenähnlichen Proben. A: Stress = 0,115, B: Stress = 0,101

Bei den Sedimentproben bestand die visuell sichtbare „aquakulturähnliche“ Gruppe aus allen Flussproben, der küstennahen Probe B1 und allen Aquakulturen (Abb. 3.13A). Diese unterschied sich signifikant ($p < 0.05$) (S14) von der „küstenähnlichen“ Gruppe, die aus allen Küstenproben mit Ausnahme von B1 bestand. Die beiden kontinuierlichen Aquakulturen (AQ5/6) bildeten ein eigenes außenstehendes Cluster. Die beiden Gruppen wiesen dabei signifikante Unterschiede in ihrer Dispersion auf. Bei den Wasserproben zeichnete sich eine ähnliche Aufteilung ab (Abb. 3.13B), wobei die „aquakulturähnliche“ Gruppe aus allen klassischen und semi-geschlossenen Aquakulturen mit Ausnahme von AQ3 und AQ4, zwei küstennahen Proben (B1, C1), den drei Flussproben des Flussursprungs (R1-R3), sowie den Aufreinigungsbecken AU2-AU4 bestand ($p < 0.05$) (S15). Die „küstenähnliche“ Gruppe bestand aus allen Küstenproben außer B1 und C1, der Probe aus der Flussmündung R4, sowie den beiden kontinuierlichen Aquakulturen. Beide Gruppen wiesen eine ähnliche Dispersion auf. Die im Sediment und Wasser visuell sichtbaren „aquakulturähnlichen“ und „küstenähnlichen“ Gruppen dienten als Ausgangspunkt für die Netzwerkanalysen (Abschnitt 3.26).

3.2.3 Verteilung potentiell humanpathogener bakteriellen Gruppen

Die relative Abundanz von *Vibrio* wurde als möglicher Indikator zur Bestimmung des potentiellen Aquakultureinflusses untersucht. Zusätzlich wurden die relativen Abundanzen der Gruppen *Legionellaceae* und *Enterobacteriaceae*, die als Bioindikatoren für Wasserqualität und möglichen anthropogenen Einfluss angesehen werden, ermittelt. Für *Vibrio*, *Legionellaceae* und *Enterobacteriaceae* zeigten sich dabei spezifische Verteilungsmuster (Abbildung 3.14).

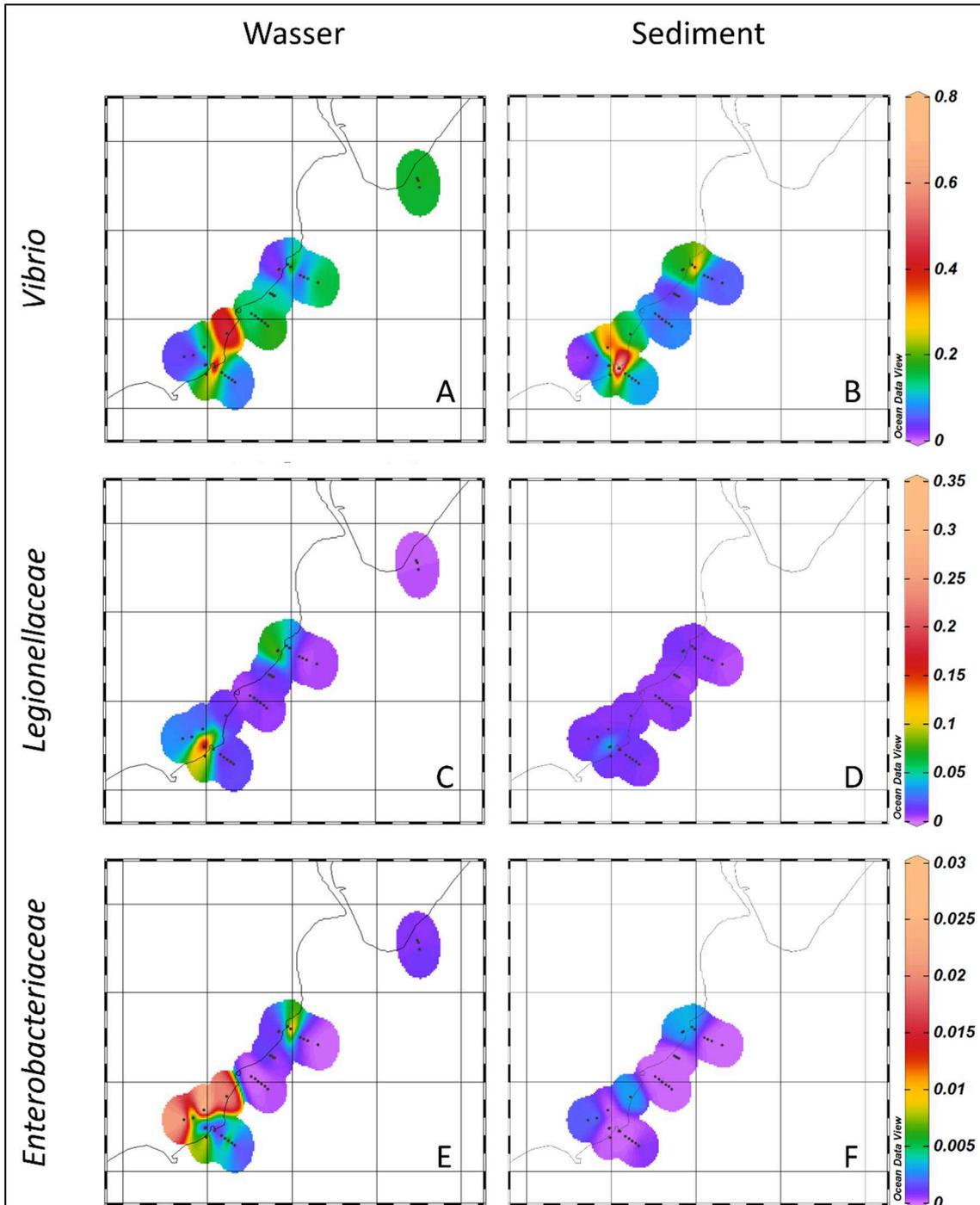


Abbildung 3.14: Relative Abundanz der potentiell humanpathogenen Gruppen *Vibrio*, *Enterobacteriaceae* und *Legionellaceae* im Wasser und Sediment. (modifiziert nach Möller *et al.* 2020)

Für *Vibrio* lag die durchschnittliche relative Abundanz der Kopienanzahl des *Vibrio*-16S rRNS-Gens der Küsten- und Flussproben im Wasser bei 0,16% ($\pm 0,1\%$) und im Sediment bei 0,095% ($\pm 0,12\%$) (Tabelle 3.3). Damit wies Wasser signifikant höhere relative Abundanzen des *Vibrio*-16S rRNS-Gens ($p < 0,05$) auf als das Sediment (S16). In beiden Materialien wurde die höchste relative Abundanz bei der Station B1 gemessen, die direkt an der Küste lag (Abb. 3.11). Seegras

erreichte Werte zwischen 0,08% bis 7,48% (MW 1,27 % \pm 2,56) und lag damit signifikant über den Abundanzen der Küstensedimente ($p < 0.05$) (S17, S18).

Tabelle 3.3: Relative Abundanz (%) der *Vibrio*-16S rRNS Gen-Kopienanzahl in der Illumina-16S rRNS Gen-Sequenzierung in den verschiedenen Probenmaterialien. Werte sind auf die zweite Kommastelle gerundet. – = Keine Probe vorhanden; AQ = Aquakultur; A-F = Küstentranspekt, R = Flusstranspekt, AU = Aufreinigungsbecken (modifiziert nach Möller *et al.* 2020)

Proben ID	Wasser	Sediment	Seegras	Gewebe
AQ01	0,01	-	-	0,33
AQ02	0,01	-	-	1,34
AQ03	0,00	-	-	0,01
AQ04	0,02	-	-	0,44
AQ05	0,74	2,28	-	5,64
AQ06	0,73	0,44	-	0,01
AQ07	0,005	0,01	-	-
AQ08	0,03	0,01	-	0
AQ09	0,01	0,01	-	-
AQ10	0,01	0,02	-	-
AQ11	0,05	0,02	-	-
AQ12	0,02	0,05	-	-
AQ13	0,01	0,19	-	0,04
AQ14	0,02	0,28	-	0,31
AU1	1,63	-	-	-
AU2	0,04	-	-	-
AU3	0,004	-	-	-
AU4	0,002	-	-	-
A1	0,15	-	-	-
A2	0,24	-	-	-
A3	0,17	-	-	-
B1	0,37	0,56	-	-
B2	0,02	0,02	-	-
B3	0,05	0,10	-	-
B4	0,18	0,03	7,48	-
B5	0,17	0,06	1,61	-
C1	0,06	0,01	-	-
C2	0,23	0,01	-	-
C3	0,16	0,13	0,09	-
C4	0,11	0,02	-	-
D1	0,14	0,10	-	-
D2	0,19	0,05	-	-
D3	0,10	0,07	0,08	-
D4	0,20	0,03	-	-
D5	0,19	0,10	-	-
D6	0,21	0,08	0,15	-
F1	0,27	0,03	-	-
F2	0,09	0,06	-	-
F3	0,18	0,11	-	-
F4	0,08	0,05	0,21	-
F5	0,07	0,11	0,13	-

Fortsetzung Tabelle 3.3:

Proben ID	Wasser	Sediment	Seegras	Gewebe
F6	0,07	0,08	0,40	-
R1	0,05	0,01	-	-
R2	0,02	0,02	-	-
R3	0,18	0,38	-	-
R4	0,46	0,15	-	-

Dabei wurden die beiden höchsten relativen Abundanzen im Seegras von 7,48% und 1,61% im Transekt B gemessen, in der auch Station B1 lag. Im Fluss war ein Gradient mit steigender relativen Abundanz der *Vibrio* spp.-16S rRNS-Kopienanzahl sichtbar, der im Wasser vom Flussursprung bis zur Flussmündung mit einer finalen relativen Abundanz von 0,46% reichte. Im Sediment war die höchste relative Abundanz mit 0,38% in der Mitte des Flusses lokalisiert. Die relative Abundanz der *Vibrio*-16S rRNS Gen-Kopienzahl im Wasser der klassischen und semi-geschlossenen Aquakulturen ($0,02\% \pm 0,01\%$) lagen signifikant unter den der im Wasser der Küste registrierten Abundanzen ($p < 0,05$) (S19).

Dieser Trend zeichnete sich tendenziell ebenfalls im Sediment ab (S20). In den beiden kontinuierlichen Aquakulturen für die Aufzucht von Schnecken lag die relative Abundanz der *Vibrio* spp.-Sequenzen bei 0,74% und 0,73% im Wasser und bei 2,28% und 0,44 % im Sediment. Damit waren dies die höchsten gemessenen relativen Abundanzen an *Vibrio* spp.-16S rRNS-Genen im Wasser und Sediment in sämtlichen Proben. Die Gewebeproben der Schnecken aus den kontinuierlichen Aquakulturen enthielten ebenfalls die höchste Abundanz von *Vibrio* spp.-16S rRNS-Genen aller Gewebeproben mit 5,64%, die in den anderen Geweben durchschnittlich bei 1% lag. In den Aufreinigungsbecken der Aquakulturen zeigt sich ein abnehmender Gradient der *Vibrio* 16S rRNS Gen Abundanz im Laufe der Reinigung von 0,04% - 0,002%.

Legionellaceae wiesen einzelne Hotspots in der relativen Abundanz der 16S rRNS-Gen-Kopienanzahl in wenigen Aquakultur- und Küstenproben auf (Abb. 3.14, Tabelle 3.4). Allgemein waren die relativen Abundanzen der *Legionellaceae* 16S rRNS-Gen-Kopienanzahl in den Seegrasproben, den Sediment- und Wasserproben der Küste gleichmäßig verteilt, wobei die Mittelwerte bei 0,019% ($\pm 0,021$), 0,013% ($\pm 0,016$) bzw. 0,007% ($\pm 0,004$) lagen. Ausnahme bildete die Probe F1 in Küstennähe, die im Wasser eine Konzentration von 0,079% aufwies. Auch ein Großteil der Sediment- und Wasserproben von Aquakulturen bewegt sich in diesem Mittelwerts-Bereich der Küstenproben. Ausnahmen stellten die Proben AQ8 und AQ12 dar, die überdurchschnittlich hohe relative Abundanzen aufwiesen. Für AQ8 lagen die Werte bei

0,323% sowie 0,058% für Wasser bzw. Sediment. In Probe AQ12 lag der Wert im Wasser bei 0,145%. In der Aquakultur AQ8 war ebenfalls die höchste relative Abundanz an *Legionellaceae*-16S rRNS Gen-Kopienanzahl in Gewebeproben mit 1% zu finden, die sich bei den restlichen Proben im Mittelwert bei 0,24% ($\pm 0,3$) befanden.

Tabelle 3.4: Relative Abundanz (%) der *Legionellaceae*-16S rRNS Gen-Kopienanzahl in der Illumina-16S rRNS Gen-Sequenzierung in den verschiedenen Probematerialien. Werte sind auf die zweite Kommastelle gerundet. – = Keine Probe vorhanden; AQ = Aquakultur; A-F = Küstentranspekt, R = Flusstranspekt, AU = Aufreinigungsbecken

Sampling ID	Water	Sediment	Seagrass	Tissue
AQ01	0,033	-	-	0,372
AQ02	0,020	-	-	0,214
AQ03	0,000	-	-	0,027
AQ04	0,000	-	-	0,000
AQ05	0,016	0,009	-	0,175
AQ06	0,031	0,006	-	0,141
AQ07	0,047	0,028	-	-
AQ08	0,323	0,058	-	1,005
AQ09	0,093	0,018	-	-
AQ10	0,048	0,008	-	-
AQ11	0,000	0,001	-	-
AQ12	0,145	0,013	-	-
AQ13	0,073	0,005	-	0,189
AQ14	0,014	0,014	-	0,068
AU1	0,011	-	-	-
AU2	0,023	-	-	-
AU3	0,028	-	-	-
AU4	0,033	-	-	-
A1	0,003	-	-	-
A2	0,001	-	-	-
A3	0,003	-	-	-
B1	0,017	0,007	-	-
B2	0,007	0,005	-	-
B3	0,003	0,008	-	-
B4	0,001	0,008	0,012	-
B5	0,005	0,003	0,000	-
C1	0,020	0,007	-	-
C2	0,014	0,012	-	-
C3	0,013	0,005	0,012	-
C4	0,004	0,001	-	-
D1	0,002	0,006	-	-
D2	0,005	0,008	-	-
D3	0,016	0,007	0,019	-
D4	0,007	0,006	-	-
D5	0,006	0,004	-	-
D6	0,007	0,010	0,015	-
F1	0,079	0,003	-	-
F2	0,004	0,011	-	-

Fortsetzung Tabelle 3.4:

Sampling ID	Water	Sediment	Seagrass	Tissue
F3	0,008	0,009	-	-
F4	0,017	0,013	0,020	-
F5	0,013	0,019	0,068	-
F6	0,020	0,003	0,002	-
R1	0,032	0,010	-	-
R2	0,015	0,009	-	-
R3	0,014	0,006	-	-
R4	0,012	0,009	-	-

Enterobacteriaceae waren in weniger als 1/3 der Wasser-, Sediment- und Gewebeproben mit relativen Abundanzen der 16S rRNS-Kopienanzahl nahe der Nachweisgrenze detektierbar und traten nicht in Seegrassproben auf (Abb. 3.14, S21). Die Werte lagen nahe 0%. Die höchsten relativen Abundanzen mit 0,054%, 0,028% und 0,024% waren im Wasser des ersten Aufreinigungsbeckens, sowie in den zwei Flussproben der Flussmündung zu finden.

3.2.4 Vibrio-Gemeinschaften in verschiedenen Habitaten in Hainan

Bei der Betrachtung der Vibrionen-Gemeinschaft auf Grundlage der 58 detektierten *Vibrio*-OTUs zeigte sich die Bildung materialabhängiger Gruppen (Abb. 3.15).

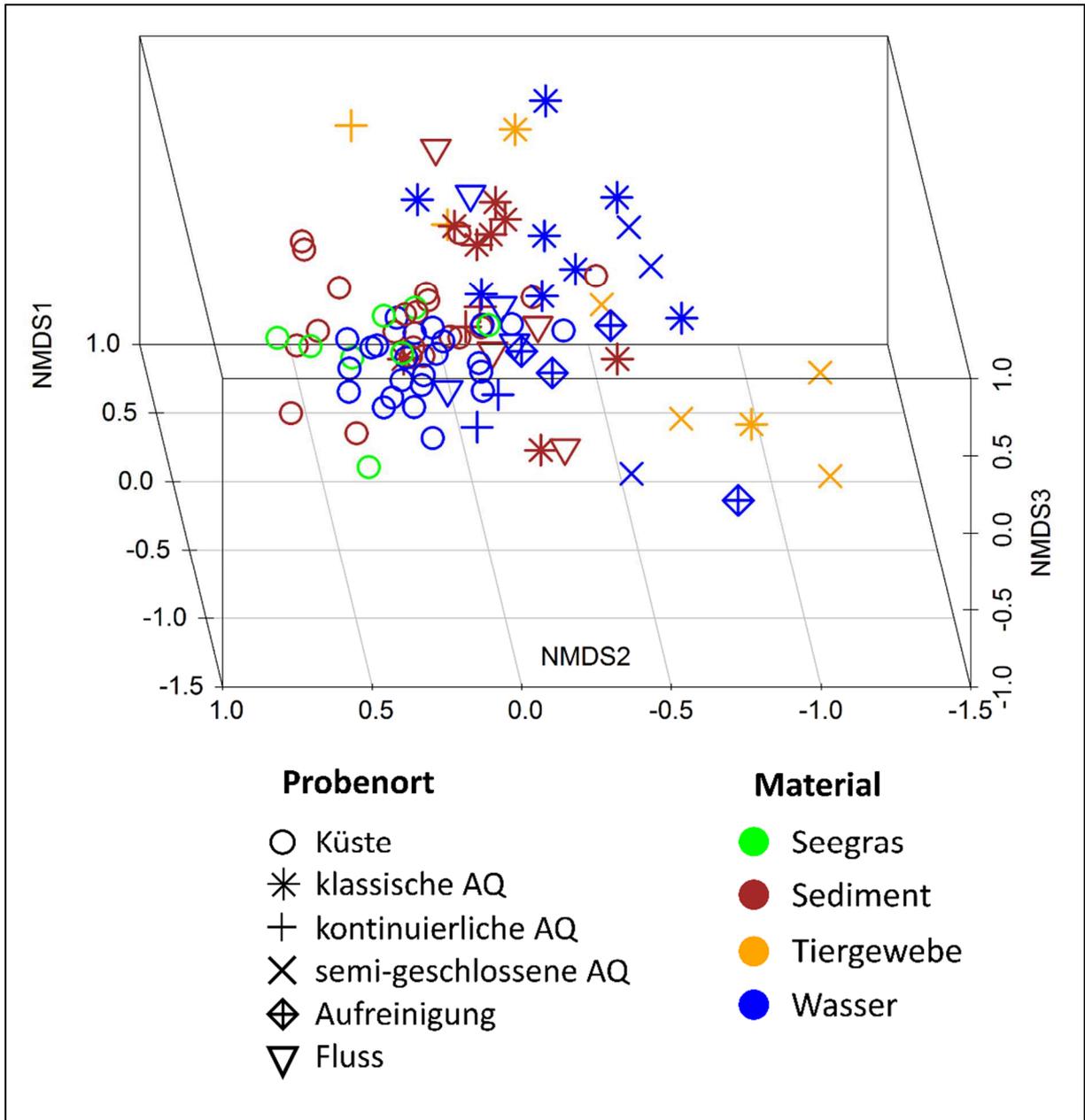


Abbildung 3.15: 3D-nMDS-Plot der *Vibrio*-Gemeinschaft auf Basis der Hellinger-transformierten relativen Abundanzen der 58 *Vibrio*-OTUs in den verschiedenen untersuchten Materialien. Stress = 0,14.

Wasser, Sediment, Seegras und Tiergewebe formten signifikant unterschiedliche Gruppen (S22). Gleichzeitig wurde erneut eine mögliche Aufteilung im Sediment und Wasser nach küsten- und aquakulturähnlichen Proben sichtbar, die sich in der genaueren Betrachtung der beiden Materialien unterschieden.

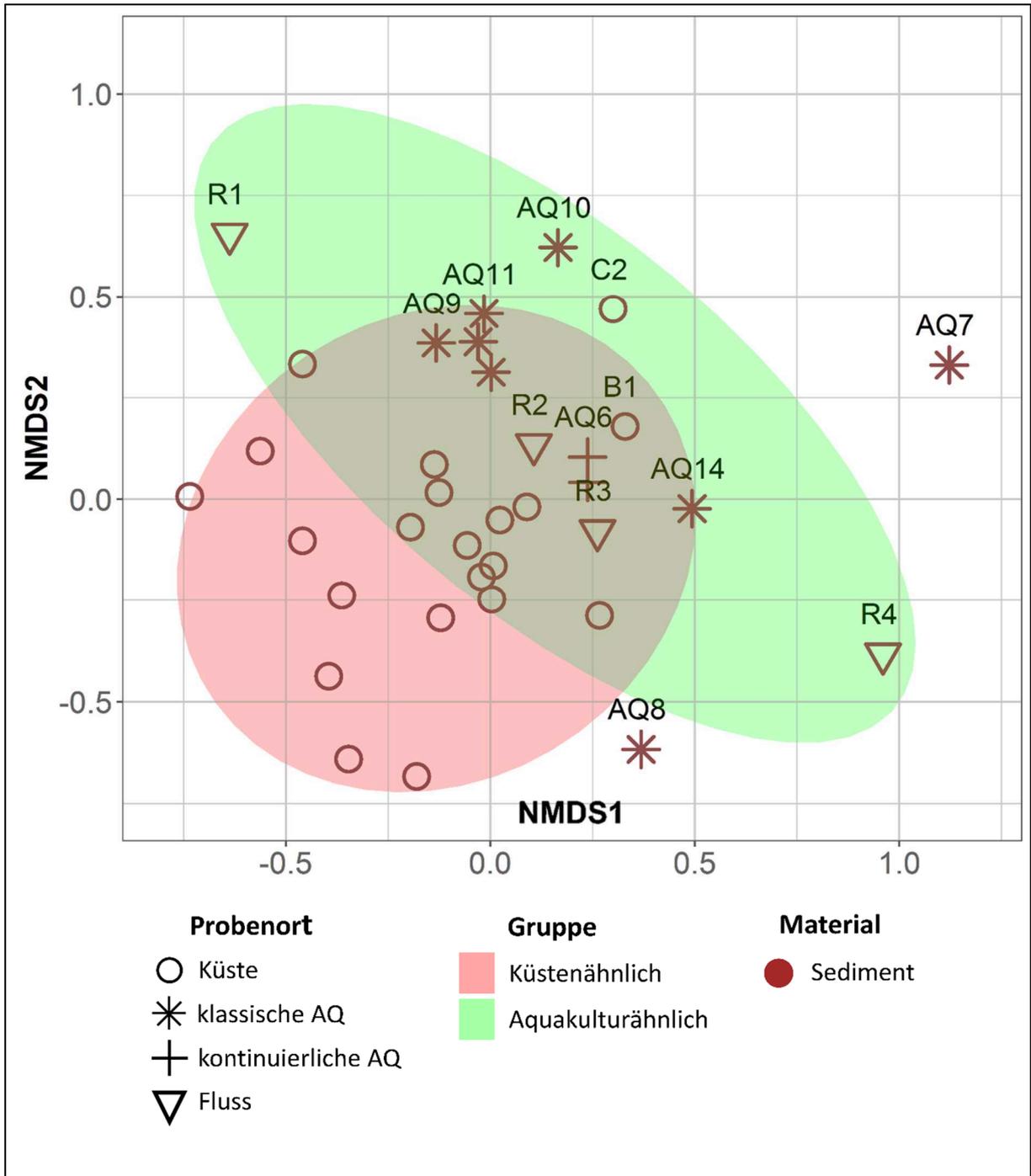


Abbildung 3.16: nMDS-Plot der *Vibrio*-Gemeinschaft auf Basis der Hellinger-transformierten relativen Abundanzen der 58 *Vibrio*-OTUs im Sediment. Die Ellipsen markieren die Gruppe aquakultur- und küstenähnlicher Proben mit einem Vertrauensintervall von 95%. Stress = 0,19.

Die Einteilung der Proben nach aquakulturähnlichen und küstenähnlichen Proben wie bereits für die bakteriellen Gemeinschaft durchgeführt (Abb. 3.13), ergab auch für die *Vibrio*-Gemeinschaft 2 signifikant unterschiedliche Gruppen (Abb. 3.16). Die küstenähnliche Gruppe

bestand aus den Proben der Küstentransekte, während sich die zweite Gruppe aus den Proben der Aquakulturen und des Flusses zusammensetzte (S23).

3.2.5 Einfluss physikalischer Parameter auf *Vibrio*-Gemeinschaften im Wasser

Durch die erneute Einteilung der Proben in aquakulturähnliche und küstenähnliche Proben, nach den bereits definierten Gruppen aus der bakteriellen Gemeinschaftsanalyse für Wasser (Abb. 3.13b), ergab sich auch für die *Vibrio*-Gemeinschaft die Bildung definierter Gruppen (Abb. 3.17A). Diese waren signifikant verschieden, bei gleichzeitig signifikanter Dispersion (S24). Unter Berücksichtigung der gemessenen physikalischen Parameter, zeigte sich dass Salinität, Phosphatkonzentration sowie Temperatur einen signifikanten Einfluss auf die Zusammensetzung der Proben hatten (Abb. 3.17, S25). Diese unterteilten die *Vibrio*-Gemeinschaften in jeweils 2 signifikant unterschiedliche Gruppen. Für die Salinität war die erste Gruppe durch eine Salinität unter 30‰ charakterisiert und bestand aus allen Aquakulturen mit Ausnahme der kontinuierlichen Aquakulturen, den Aufreinigungsbecken, den drei Flussproben des Flussursprung, sowie den küstennahen Proben F1 und B1 (Abb. 3.17B). Die zweite Gruppe bestand aus allen Küstenproben mit Ausnahme von B1 und F1, den beiden kontinuierlichen Aquakulturen, sowie der Probe aus der Flussmündung. Diese Proben waren durch eine Salinität über 30‰ charakterisiert (S26). Dabei wiesen beide Gruppen eine signifikante Dispersion auf.

Für Phosphat bestand die erste Gruppe aus den Aquakulturen AQ7, AQ8, AQ11-14, der Probe C1, sowie den Flussproben R1-R3 die Phosphatgehalte von 1–83 µM aufwiesen (Abb. 3.17C). Die restlichen gemessenen Phosphatgehalte befanden sich im Bereich von 0,6 – 0,14 µM und wurden an den Küstenstandorten, der Flussprobe R2, sowie den beiden kontinuierlichen Aquakulturen gefunden (S27). Dabei wiesen die Gruppen ebenfalls eine signifikante Dispersion auf. Bei der Einteilung nach Proben mit einer Wassertemperatur von unter 28,6 °C und über 28,6 °C waren in beiden Gruppen sowohl Küstenproben, als auch Aquakulturen vertreten (Abb. 3.17D). Die erhaltenen Gruppen wiesen im nMDS-Plot eine weniger klare Trennung auf, waren jedoch signifikant verschieden und wiesen eine ähnliche Dispersion auf (S28).

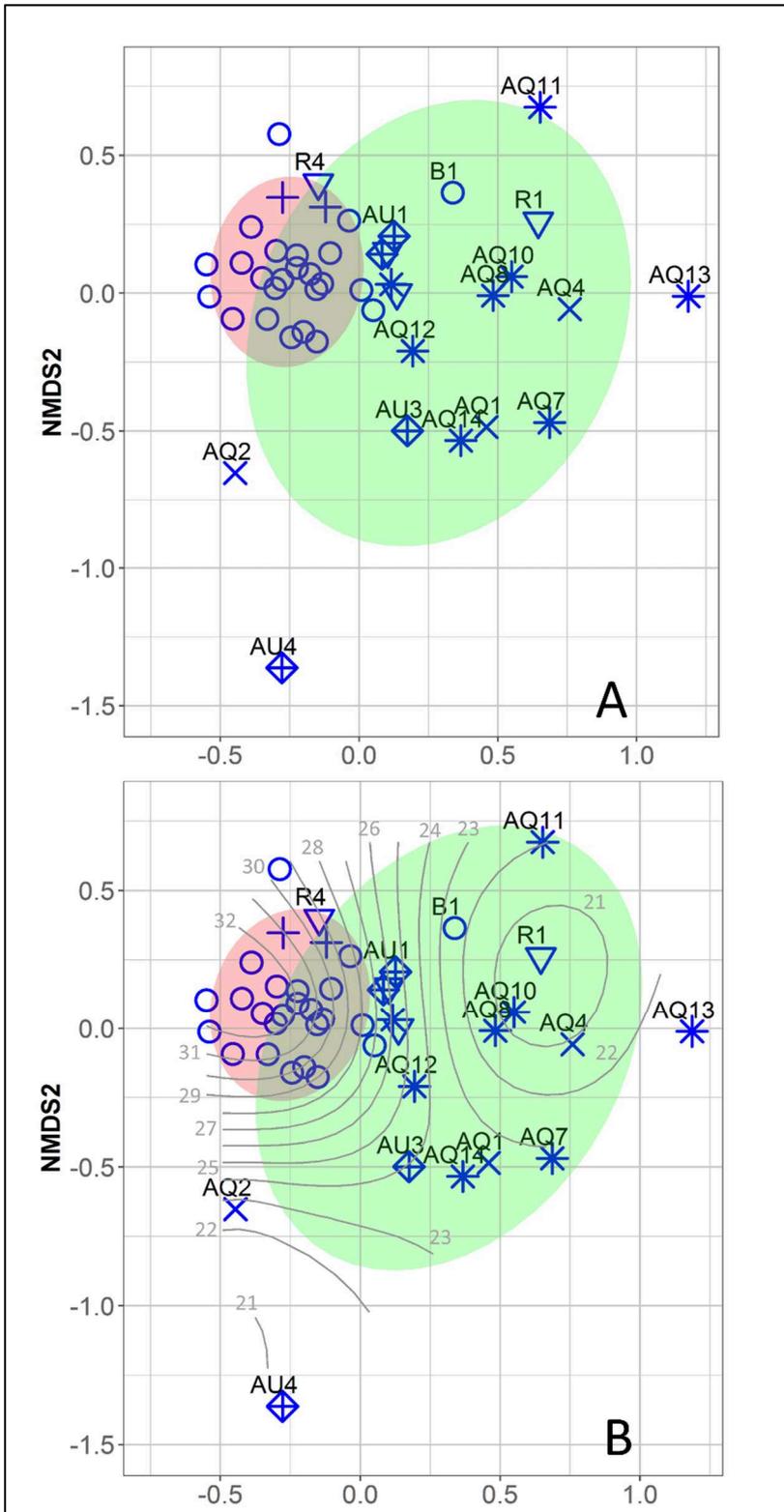


Abbildung 3.17 Abschnitt 1:
Abschnitt 2 auf der nächsten Seite.

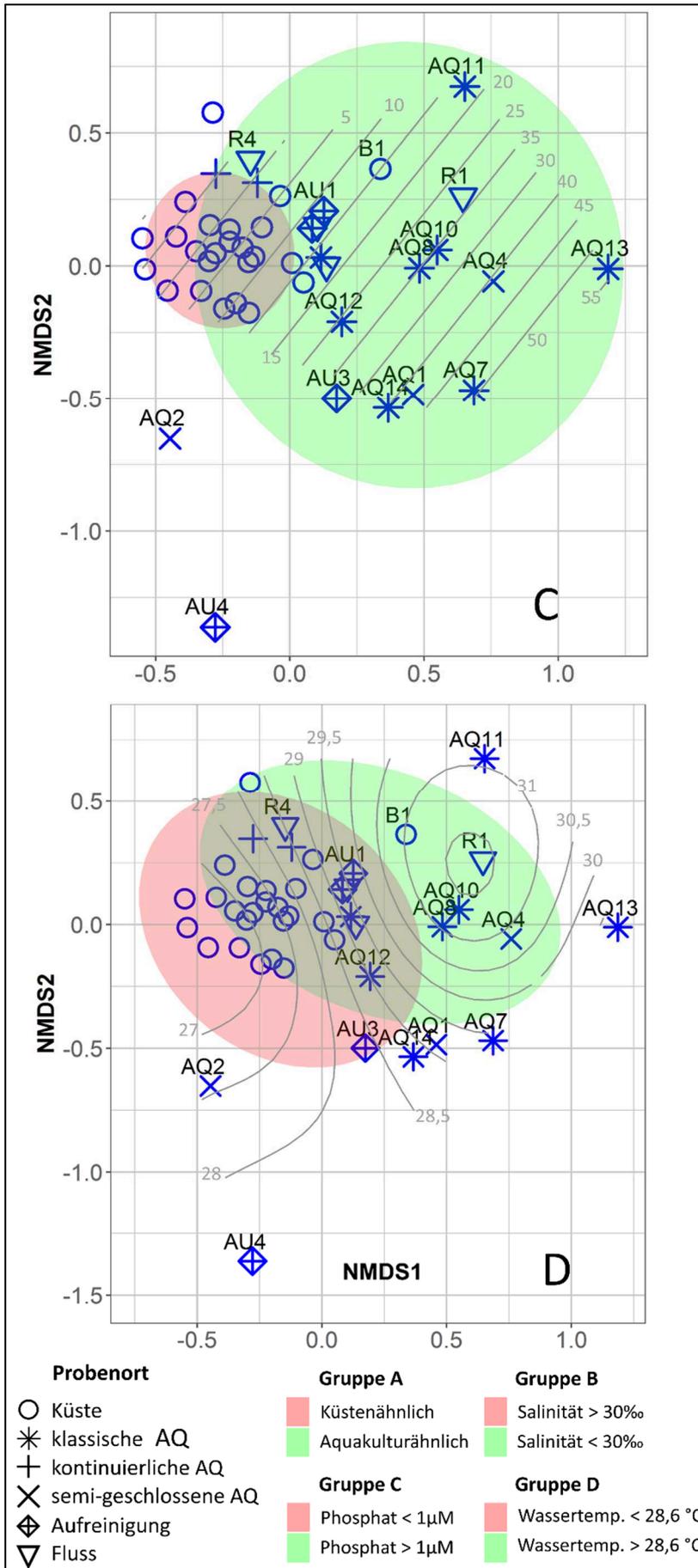


Abbildung 3.17 Abschnitt 2:
Beschriftung auf der nächsten Seite.

Abbildung 3.17: nMDS-Plot der *Vibrio*-Gemeinschaft auf Basis der Hellinger-transformierten relativen Abundanzen der 58 *Vibrio*-OTUs im Wasser. Die Ellipsen markieren die Gruppen anhand der Einteilung nach **A:** Salinität, **B:** Phosphat-Konzentration und **C:** Wassertemperatur mit einem Vertrauensintervall von 95%. Die grauen Linien repräsentieren die Konzentrationen der Parameter. Wassertemp. = Wassertemperatur, Stress = 0,17.

Informationen über potentielle Einflüsse in den verschiedenen Aquakulturen, die durch Antibiotikaeinsatz, den Gebrauch von Sauerstoffpumpen, Anzahl und Alter der kultivierten Organismen, Frequenz des Wasseraustauschs und das Auftreten von Krankheiten sind in S2 zusammengefasst. Durch die wenigen diesbezüglich verfügbaren Daten und der damit verbundenen geringen statistische Aussagekraft, war keine Aussage über einen Einfluss dieser Faktoren auf die Abundanz und Gemeinschaft von Vibrionen möglich.

3.2.6 Diversität von *Vibrio*-Gemeinschaften in verschiedenen Habitaten

In den Küstenproben und dem Flusstransekt waren durchschnittlich 14 ($\pm 5,5$) und 18 ($\pm 5,4$) *Vibrio*-OTUs im Sediment, bzw. Wasser vorhanden (Tabelle 3.5). In den klassischen und semi-geschlossenen Aquakulturen waren diese Werte signifikant geringer mit 6 ($\pm 1,8$) bzw. 5 ($\pm 2,6$) (S29, S30). Bei den beiden kontinuierlichen Aquakulturen AQ5 und AQ6 wurden 25 bzw. 24 verschiedene *Vibrio*-OTUs im Wasser detektiert, und im Sediment lagen diese Werte bei 18 und 17. Damit waren die beiden Aquakulturen AQ5 und AQ6 vergleichbar mit den Küstenproben. In den Seegrass-Proben waren im Durchschnitt 13 ($\pm 2,4$) *Vibrio*-OTUs vorhanden. Gewebeproben besaßen die niedrigste Diversität mit 4 ($\pm 2,3$) *Vibrio*-OTUs.

Tabelle 3.5: Anzahl gefundener *Vibrio*-OTUs in den verschiedenen Materialien. – = Keine Probe vorhanden; AQ = Aquakultur; A-F = Küstentranssekt, R = Flusstranssekt, AU = Aufreinigungsbecken (modifiziert nach Möller *et al.* 2020)

Proben ID	Wasser	Sediment	Seegrass	Gewebe
AQ01	5	-	-	2
AQ02	4	-	-	6
AQ03	0	-	-	3
AQ04	3	-	-	7
AQ05	25	18	-	7
AQ06	24	17	-	4
AQ07	3	4	-	-
AQ08	8	6	-	-
AQ09	8	7	-	0
AQ10	5	4	-	-
AQ11	5	7	-	-

Fortsetzung Tabelle 3.5:

Proben ID	Wasser	Sediment	Seegras	Gewebe
AQ12	8	5	-	-
AQ13	1	8	-	3
AQ14	6	9	-	4
AU1	24	-	-	-
AU2	14	-	-	-
AU3	5	-	-	-
AU4	3	-	-	-
A1	14	-	-	-
A2	29	-	-	-
A3	22	-	-	-
B1	18	22	-	-
B2	15	8	-	-
B3	18	23	-	-
B4	21	10	14	-
B5	27	8	12	-
C1	18	5	-	-
C2	19	5	-	-
C3	19	18	12	-
C4	11	9	-	-
D1	23	21	-	-
D2	20	19	-	-
D3	14	13	11	-
D4	28	13	-	-
D5	17	16	-	-
D6	27	17	17	-
F1	14	13	-	-
F2	20	20	-	-
F3	15	22	-	-
F4	17	15	21	-
F5	17	18	8	-
F6	12	14	15	-
R1	13	7	-	-
R2	8	10	-	-
R3	14	20	-	-
R4	26	14	-	-

Die drei abundantesten *Vibrio*-OTUs (V_OTU1, V_OTU2 V_OTU3) traten in fast allen Probenmaterialien auf, inklusive der Aquakulturen, der Küste und des Flusses (85 - 92%) (Abb.3.18). Laut phylogenetischer Analyse besaßen diese 3 OTUs die größte Sequenzähnlichkeit mit *V. vulnificus*, *V. xuii*, und *V. mytili* (S31). Bedingt durch die geringe Auflösungskraft der 16S rRNS wären jedoch weitere Tests für eine eindeutige Bestimmung nötig gewesen. Die Seegras-Proben zeichneten sich durch distinkte *Vibrio*-OTUs aus (Abb. 3.18). Diese beinhalteten V_OTU4, welches mit Abundanzen von bis zu 6.7% im Seegras auftrat, sowie V_OTU15-18 mit geringer Abundanz. V_OTU4 und V_OTU16 gruppierten sich in der phylogenetischen Analyse mit den nächsten Verwandten *V. nigripulchritudo* und *V.*

caribbeanicus (S31). Die nächsten Verwandten von V_OTU15 und V_OTU18 waren *V. mytili* bzw. *V. stylophorae/marisflavi*.

Die beiden OTU's 55 und 36 kamen nur in spezifischen Proben vor. So war V_OTU55, das sich phylogenetisch mit *V. cholerae*, *V. mimicus* und *V. metoecus* einordnete, nur in der Flusstation R1 vorhanden. Hingegen war V_OTU36 mit nahem Verwandtschaftsgrad zu *V. pacinii* nur in kontinuierlichen Aquakulturen (AQ5, AQ6), sowie dem ersten Aufreinigungsbecken zu finden.

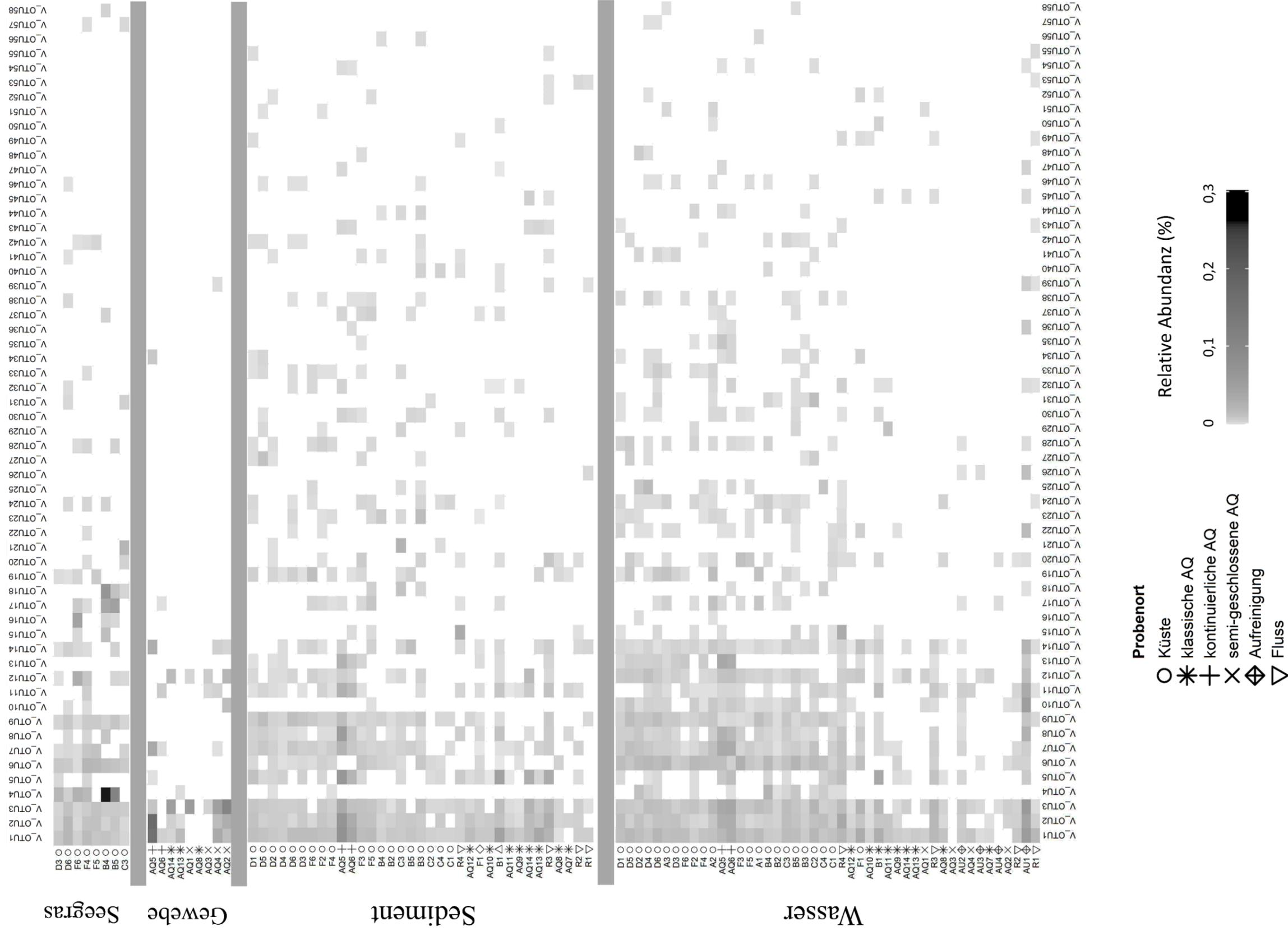


Abbildung 3.18: Heat-Map der relativen Abundanz der *Vibrio*-OTU-Kopienanzahl in den Probenahmestationen, sortiert nach Salinität und Habitat. Es wird die Wurzel der relativen Abundanz angegeben. Die Probenmaterialien sind voneinander getrennt. Die Proben sind innerhalb der Materialien von niedriger (unten) nach hoher (oben) Salinität aufgeteilt. (modifiziert nach Möller *et al.* 2020)

3.2.7 Wechselbeziehungen zwischen Vibrionen und assoziierten Bakterien in Aquakulturen und Küstengebieten

In den Co-Occurrence-Netzwerken mit den *Vibrio*-OTUs 1-3 zeigten sich für Wasserproben die Ausbildung von Gruppen anhand der positiven und negativen Korrelationen (Abb. 3.19). *Vibrio* bildete einen Teil eines miteinander positiv korrelierenden Clusters. OTUs, die negativ mit *Vibrio* korrelierten, waren untereinander positiv korreliert, während sie negativ mit den OTUs aus dem positiven Cluster korrelierten. Dadurch entstanden getrennte, in sich positiv miteinander verbundene Gruppen.

Die Vibrionen in der Aquakultur wiesen mit durchschnittlich 15 Verbindungen je *Vibrio*-OTU mehr als doppelt so viele Verbindungen auf, wie in den Proben der Küste mit 7 Verbindungen je *Vibrio*-OTU. Für die Proben des Sediments zeichnete sich ein ähnliches Bild ab (Abb. 3.20). Es waren erneut 2 definierte Cluster zu erkennen. Bei der Anzahl der Verbindungen je *Vibrio*-OTU wiesen diese jedoch allgemein mehr Verbindungen auf, wobei für Küstengebiete durchschnittlich 20 und für Aquakulturen durchschnittlich 34 Verbindungen je *Vibrio*-OTU registriert wurden.

Die häufigsten positiv mit den *Vibrio*-OTUs korrelierten OTUs gehörten der Gruppe der *Gammaproteobacteria*, *Alphaproteobacteria* und *Bacteroidia* an. *Gammaproteobacteria* bildeten dabei einen Anteil von 77% und 58% in den Küstennetzwerken im Wasser bzw. Sediment. In den Aquakulturen waren dies 27% bzw. 30%. Dabei stellten *Vibrio* und *Photobacterium* mit Ausnahme des Aquakultur-Sediments zwischen 38% - 50% dieser dar. *Alphaproteobacteria*, im spezifischem *Rhodobacterales*, bildeten 0% und 6% aller positiven Korrelationen im Sediment bzw. Wasser der Küstennetzwerke. In den Aquakulturen machten sie einen Anteil von 23% bzw. 10% aus. *Bacteroidia*, genauer *Flabobacterales* bildeten in den Netzwerken des Küsten-Wassers und -Sediments 7% bzw. 3% aller positiven Korrelationen. In den Aquakulturen waren dies jeweils 23%.

Für die negativen Korrelationen in der Küste ergaben sich nur 3 Verbindungen zu *Vibrio* im Wasser. Im Sediment der Küste bestanden die häufigsten negativen Korrelationen mit jeweils 24% aus *Deltaproteobacteria* und *Oxyphotobacteria*. Die häufigsten negativen Korrelationen der *Vibrio*-OTUs in den Aquakulturen stellten *Alphaproteobacteria* und *Planctomycea* dar.

Alphaproteobacteria nahmen im Wasser und Sediment jeweils einen Anteil von 27% der negativen Korrelationen innerhalb der Aquakultur-Netzwerke ein. Dabei stellten im Wasser *Rhodobacterales* 50% dieser dar und im Sediment 89% *Rhizobiales*.

Planctomycea stellten ca. 20% aller negativen Korrelationen in den Aquakulturnetzwerken dar, wobei 85-100% der Ordnung *Pirellulales* zugeordnet wurden.

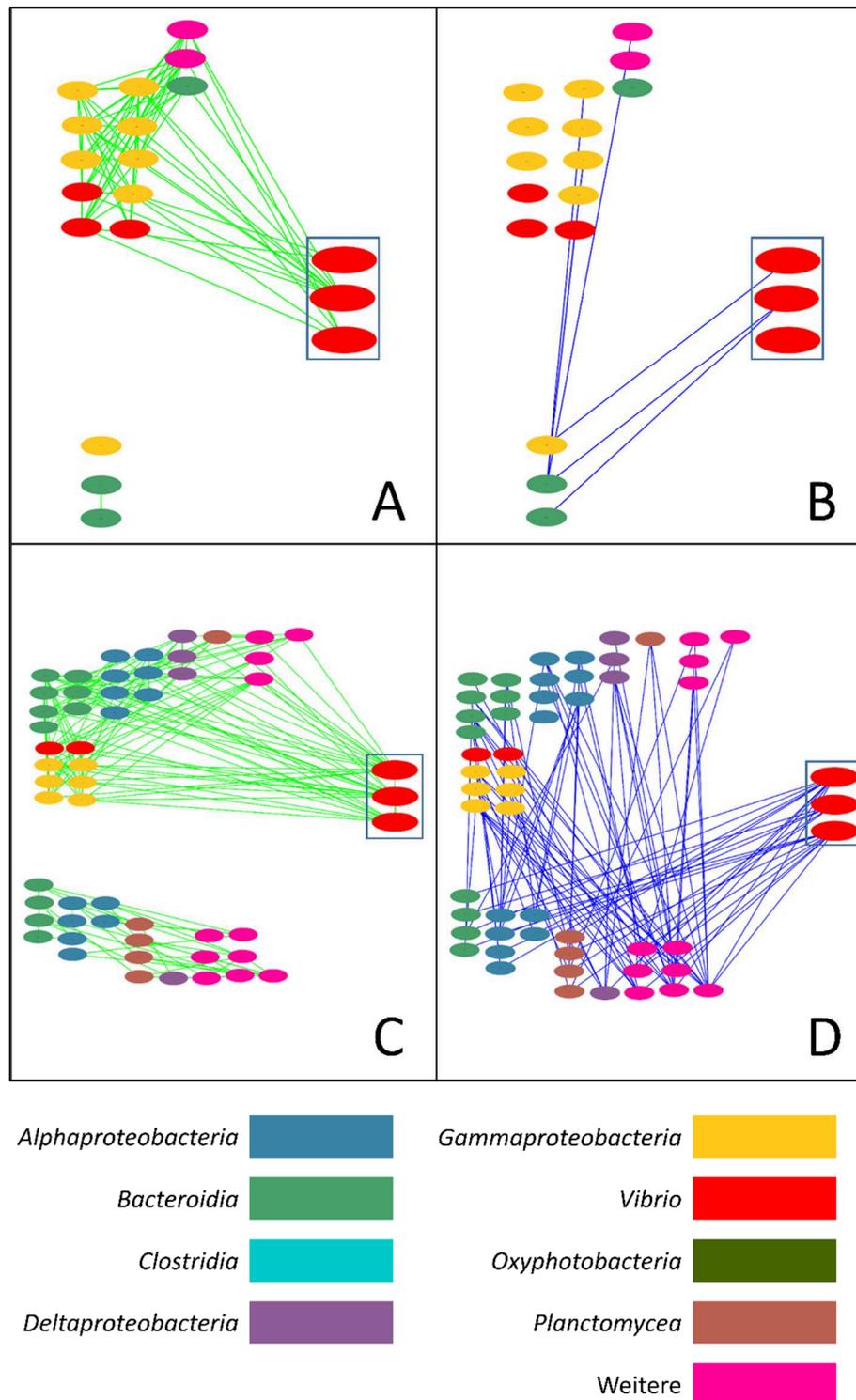


Abbildung 3.19: Co-Occurrence-Netzwerkdiagramme für die drei *Vibrio*-OTUs 1-3 auf OTU-Level in Wasserproben aus den beprobten Küstengebieten (A und B) und Aquakulturen (C und D). Positive Korrelationen werden in A und C dargestellt. Negative Korrelationen werden in B und D dargestellt. Ellipsen zeigen einzelne OTUs. Linien repräsentieren die Beziehungen zueinander. Grüne Linien zeigen positive Korrelationen. Blaue Linien zeigen negative Korrelationen.

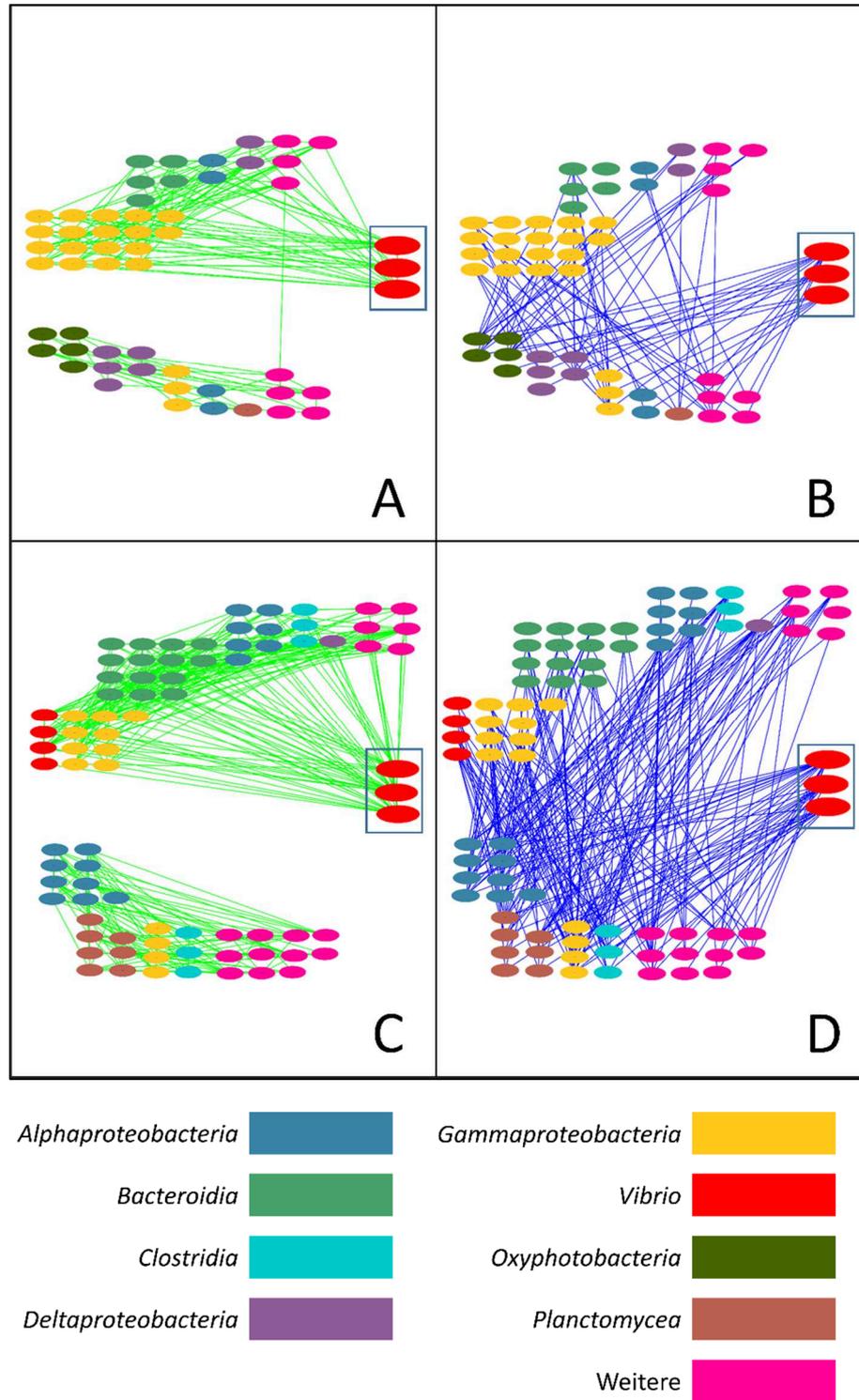


Abbildung 3.20: Co-Occurrence-Netzwerkkarte für die drei *Vibrio*-OTUs 1-3 auf OTU-Level in Sedimentproben aus den beprobten Küstengebieten (A und B) und Aquakulturen (C und D). Positive Korrelationen werden in A und C dargestellt. Negative Korrelationen werden in B und D dargestellt. Ellipsen zeigen einzelne OTUs. Linien repräsentieren die Beziehungen zueinander. Grüne Linien zeigen positive Korrelationen. Blaue Linien zeigen negative Korrelationen.

4 Diskussion

4.1 Anthropogene Faktoren beeinflussen *Vibrio*-Küstengemeinschaften

Die Beeinflussung der Natur durch den Menschen wird in Zukunft weiter zunehmen. Steigende Meerestemperaturen (Yao *et al.* 2017), die Verbreitung invasiver Arten (Dukes und Mooney 1999) und die stärkere Nutzung von Küstengebieten (Ren *et al.* 2019), zeigen nicht nur Auswirkungen auf die Tier und Pflanzenwelt (Cooper und Brush 1993, Longepierre *et al.* 2005, Ramírez *et al.* 2017), sondern haben auch Einfluss auf die mikrobiellen Gemeinschaften (Manzari *et al.* 2015, Martinez-Urtaza *et al.* 2008, Marzinelli *et al.* 2018, Vezzulli *et al.* 2012). Vibrionen stellen dabei eine bakterielle Gattung dar, die von diesen Bedingungen besonders beeinflusst werden und profitieren könnten (Baker-Austin *et al.* 2013, Martinez-Urtaza *et al.* 2008, Tout *et al.* 2015).

Ziel meiner Promotion war die Untersuchung der Frage, inwieweit anthropogene Faktoren einen Einfluss auf die Abundanz und Zusammensetzung von *Vibrio*-Küstengemeinschaften besitzen. Dabei lagen zwei Aspekte im Fokus. Zum einen wurden vom Menschen eingeschleppte Arten als Rückzugsgebiet und Reservoir für *Vibrio*-Populationen, speziell auch humanpathogener Vertreter untersucht. Dafür wurde das Gebiet der südlichen Ostsee mit der invasiven Fischart *N. melanostomus* ausgewählt. Die Ostsee weist als im gemäßigten Klima liegendes Habitat jahreszeitliche Schwankungen in der Wassertemperatur und einem natürlich vorkommenden Salzgradienten auf (HELCOM 2018b, Herlemann *et al.* 2011), der ebenfalls als Einflussfaktor berücksichtigt wurde.

Zum anderen beschäftigte sich der zweite Aspekt der Promotion mit Aquakulturen als Anreicherungsmöglichkeit für Vibrionen und ihren Einfluss auf die *Vibrio*-Gemeinschaften in umliegenden Küstengebieten. Dafür wurde die Küste Hainan's, als typisches, von Aquakulturen geprägtes Gebiet, ausgesucht.

Die südöstlichen Küstengewässer der Insel Hainan werden als ein in den Tropen liegendes Gebiet, anders als die Ostsee, durch nahezu konstante wärmere Wassertemperaturen von ca. 23-30 °C und Salinitäten zwischen 30-34‰ über den Jahresverlauf hinweg charakterisiert (Herbeck *et al.* 2014, Krumme *et al.* 2012, Meixia *et al.* 2008, Zhang *et al.* 2013).

Die Untersuchungen zeigten, dass beide anthropogenen Faktoren einen potentiellen Einfluss auf die *Vibrio*-Gemeinschaften haben könnten. *N. melanostomus* besaß durch ihre hohen *Vibrio* spp.-Zellzahlen sowie ihrer distinkten Zusammensetzung und dem Nachweis der potentiell

humanpathogenen Art *V. vulnificus* die Möglichkeit, *Vibrio*-Küstengemeinschaften zu prägen und zu beeinflussen. Ebenso konnten in Aquakulturen *Vibrio*-Gemeinschaften, sowohl in ihrer Zusammensetzung wie auch in ihrer Abundanz, verändert werden. Dabei spielte die Art der Aquakultur eine wichtige Rolle. Während kontinuierliche Aquakulturen eine erhöhte relative Abundanz des *Vibrio* spp.-16S rRNS Gens sowie eine ähnliche *Vibrio*-Gemeinschaft zur Küste aufwiesen, waren klassische Teichaquakulturen und semi-geschlossene Aquakulturen durch eine signifikant geringere *Vibrio*-Abundanz und Diversität gekennzeichnet. Durch die Freisetzung von ungefilterten Abwässern boten Aquakulturen damit zwar das Potential *Vibrio*-Gemeinschaften in umliegenden Küstengebieten zu beeinflussen, Hinweise für das Auftreten eines solchen Effektes konnten in meiner Promotion nicht nachgewiesen werden.

4.2 Invasive Arten als neues Reservoir pathogener Vibrionen

Eine Folge anthropogenen Einflusses repräsentieren invasive Arten (Leppäkoski und Olenin 2000), wobei die Ostsee besonders stark von diesem Phänomen beeinflusst wird. Dies geht auf ihr geologisch junges Alter, und ihre, im Vergleich zu marinen Küsten-Habitaten, geringe Biodiversität zurück (Costello und Chaudhary 2017, Leppäkoski und Olenin 1999, Ojaveer *et al.* 2010).

Gleichzeitig bietet ihr natürlich vorkommender Salzgradient verschiedenen Tieren und Pflanzen aus Süß-, Salz- und Brackwasser ein mögliches Habitat (HELCOM 2009, Leppäkoski und Olenin 2000, Paavola *et al.* 2005). Seit 1950 ist die Anzahl an bewusst oder unbewusst eingeschleppten Arten in der Ostsee von 40 auf mehr als 140 Arten angestiegen (HELCOM 2018a, Leppäkoski und Olenin 1999). Dabei kann jede neue Art ihr Mikrobiom, auch die mit ihr assoziierten Vibrionen, mitführen und in die neue Umgebung einbringen. So zeigte eine Studie von Tamplin und Capers (1992), dass einzelne Austern bis zu 10^6 *Vibrio*-Zellen pro Stunde in umgebendes Wasser abgaben. Somit können invasive Arten potentiell auch als Ausgangspunkt für die Verbreitung von humanpathogenen Vibrionen dienen. Eine Studie von Martinez-Urtaza (2008) verdeutlichte dies. So verursachte der von asiatischen Kopepoden an die Küsten Chiles eingetragene und verbreitete Serotyp *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 im Jahr 1989 mehrere hundert Infektionen (Chiou *et al.* 2000, Martinez-Urtaza *et al.* 2008, Martinez-Urtaza *et al.* 2010, Wong *et al.* 2000). Durch die immer stärkere Ausbreitung von nicht einheimischen Arten weltweit bietet sich damit die Möglichkeit, dass ursprünglich lokal begrenzte Formen von pathogenen Vibrionen sich immer stärker ausbreiten und weitere Küstengebiete beeinflussen.

Übertragen auf *N. melanostomus* ergab sich durch die in meiner Studie beobachteten hohen *Vibrio* spp.-Zellzahlen und dem Vorkommen der potentiell humanpathogenen Art *V. vulnificus*, dass *N. melanostomus* in der Ostsee als Ausgangspunkt für die Verbreitung dieser pathogenen *Vibrio*-Art dienen kann. Seit ihrem Auftreten in den 1990ern im Golf von Gdańsk hat sich *N. melanostomus* in großen Teilen der Ostsee mit zum Teil hohen Abundanzen ausgebreitet (Skóra und Stolarski 1993, Puntila *et al.* 2018, Kotta *et al.* 2016). Dabei wurden Dichten von 30 -100 Individuen m⁻² für die Ostsee-Küste und andere aquatische Habitats dokumentiert, also Bereiche, in denen eine starke Wechselwirkung mit dem Menschen zu vermuten ist (Chotkowski und Marsden 1999, Sapota 2004). Gebiete mit hoher Dichte an *N. melanostomus* könnten daher der potentielle Ausgangspunkt für Vibrionen-Blüten und *Vibrio*-Infektionen in der Ostsee sein.

4.3 Aquakulturen als Anreicherungsmöglichkeit und Einflussfaktor von *Vibrio* – Küstengemeinschaften

Neben invasiven Arten ist auch die zunehmende Inbesitznahme von Küstengebieten durch den Menschen ein direkter Faktor des globalen Wandels, wobei Aquakulturen einen wichtigen Teilaspekt darstellen (Bulleri und Chapman 2010, Hamilton 2013). Obwohl in dieser Promotion kein direkter Einfluss von Aquakulturen auf *Vibrio*-Populationen der umliegenden Gebiete nachgewiesen werden konnte, zeigte sich jedoch eine starke Veränderung der *Vibrio*-Zusammensetzung und Abundanz innerhalb der Aquakulturen.

“Dies deckt sich mit einer Studie von Sousa *et al.* (2006) in Brasilien. Bei dieser wiesen Shrimps-Aquakulturen sowie der Abwassergraben eine zehnfach höhere kultivierbare *Vibrio*-Zellzahl im Vergleich zu angrenzenden Küstengebieten auf und waren des Weiteren durch eine einzigartige *Vibrio*-Gemeinschaft charakterisiert. Jedoch konnte auch bei Sousa *et al.* (2006) kein Einfluss der Abwässer auf die Anzahl und Zusammensetzung von *Vibrio*-Gemeinschaften in umliegenden Küstengebieten nachgewiesen werden.

Auch in den Ergebnissen meiner Promotion zeigte sich, dass Aquakulturen Einfluss auf *Vibrio*-Gemeinschaften und deren Abundanz besitzen konnten, wobei der Aquakulturtyp starken Einfluss hatte. Die untersuchten klassischen Aquakulturen sowie die semi-geschlossenen Aquakulturen besaßen eine vergleichbare relative *Vibrio*-16S rRNS Gen-Abundanz mit der Küste, wobei die *Vibrio*-Diversität in diesen stark reduziert war. Im Gegensatz dazu waren die kontinuierlichen Aquakulturen durch eine mit der Küste vergleichbaren *Vibrio*-Diversität gekennzeichnet, jedoch durch eine hohe relative Abundanz an *Vibrio*-16S rRNS Genen.

Eine Verringerung der Diversität in klassischen Aquakulturen kann vermutlich als typischer Effekt angesehen werden. So zeigte sich in verschiedenen Studien, dass die *Vibrio*-Diversität in klassischen Teichaquakulturen über den Zeitraum der Kultivierung hinweg abnahm (Sung *et al.* 1999, Sung *et al.* 2001). Zusätzlich zeigten weitere Untersuchungen, dass eine Reduzierung der Diversität und die Dominanz weniger *Vibrio*-Arten, oft abrupt nach einigen Tagen bis Wochen auftrat (Lavilla-Pitogo *et al.* 1998, Sung *et al.* 2001). In meiner Studie waren sämtliche Aquakulturen bereits für mindestens einen Monat in Betrieb, so dass eine natürliche Reduktion bereits eingesetzt haben konnte.

Es ist anzunehmen, dass zu Beginn der Aufzucht, wenn die Aquakultur-Teiche erstmalig befüllt wurden, die *Vibrio*-Gemeinschaft mit denen der Küste vergleichbar war. So zeigte Sousa *et al.* (2006), dass die *Vibrio*-Zusammensetzung des Wassers des Aquakultur-Einlasskanals mit dem Wasser aus der Küste vergleichbar war. Auch wies das Aquakulturwasser einer Studie von Lavilla-Pitogo *et al.* (1998) zu Beginn der Befüllung eine bakterielle Zellzahl und Zellzahl einzelner *Vibrio*-Gruppen auf, die mit dem Ursprungswasser vergleichbar waren.

Dies lässt sich auf die in meiner Promotion beobachteten Ähnlichkeit in der *Vibrio*-Zusammensetzung im Wasser zwischen Küstengebieten und den kontinuierlichen Aquakulturen übertragen. Dessen konstante Zuführung von Küstenwasser ging vermutlich einher mit der konstanten Zufuhr von *Vibrio*-Küstengemeinschaften und konnte so einer potentiellen Verringerung einzelner *Vibrio*-OTUs möglicherweise entgegenwirken. In den klassischen Teichaquakulturen war dies nicht gegeben. Trotz der Reduktion in der *Vibrio*-Diversität in klassischen Aquakulturen waren sämtliche in diesen gefundene *Vibrio*-OTUs in Umweltproben präsent. Eine Ausnahme eines für Aquakulturen einzigartigen *Vibrio*-OTU's bildete V_OTU36. V_OTU36 trat in den beiden kontinuierlichen Aquakulturen sowie dem ersten Aufreinigungsbecken auf, jedoch in einer so geringen Abundanz, dass ein möglicher Einfluss auf die Umwelt unwahrscheinlich erschien. Obwohl sich in meiner Studie, ähnlich den Versuchen der Autoren Sousa *et al.* (2006), kein Effekt auf die Umwelt zeigte, ist es möglich, dass dieser aufgrund der in Hainan typisch vorhandenen Aquakultur-Typen nicht erfasst wurde. Der Südosten Hainans ist durch klassische Teichaquakulturen geprägt (Hishamunda und Subasinghe 2003, FAO 2019). Die Wechselwirkungen mit der Umwelt begrenzen sich auf wenige Zeitpunkte, wenn das Wasser teilweise ausgetauscht oder am Ende der Aufzuchtphase komplett erneuert wird. Der enge Zeitraum der Probenahme könnte eine temporäre Anreicherung von *Vibrio* spp. in der Umwelt, durch die Freisetzungen von Abwässern, übersehen haben. Durch das geringe Wasservolumen war es auch möglich, dass sich die natürlichen *Vibrio*-Zusammensetzungen schnell wieder einstellten, unterstützt dadurch, dass

die in meiner Studie gefundenen *Vibrio*-OTUs der Aquakulturen ebenso in der Umwelt vorkamen.

Auch treten laterale Strömungen an der Küste Hainans auf (Chen *et al.* 2012), die eine schnelle Vermischung von Wassermassen verursacht haben könnten. Ein erwarteter *Vibrio*-Gradient über die genommenen Entfernungen zur Küste könnte sich so unter Umständen schnell aufgelöst haben. Auch kann die natürliche Pufferkapazität des Küstensystems noch ausgereicht haben, um die Effekte der Aquakulturen zu kompensieren. Beobachtungen zeigten, das Küstengebiete und Mangroven die Fähigkeit besitzen, den Effekt eingehender Abwässer aus Aquakulturen abzuschwächen (Gautier *et al.* 2001, Trott und Alongi 2000, Valiela und Cole 2002)“ (vgl. Möller *et al.* 2020).

Obwohl die *Vibrio*-Gemeinschaften an der Küste Hainans von den Aquakulturabwässern in den Untersuchungen unbeeinflusst schienen, könnte sich dies in Zukunft ändern. Der immer stärkere Ausbau von Aquakulturen hat in den letzten Jahrzehnten zu einem Verlust von mehr als 90% der Mangroven an den Küsten Hainans geführt (Herbeck *et al.* 2020), wodurch deren natürliche Filterfunktion eingeschränkt wird. Dies kann möglicherweise dazu führen, dass Vibrionen in diesen Gebieten in Zukunft an Bedeutung gewinnen. Welche Auswirkungen dies haben kann, wird durch Studien in Sri-Lanka sichtbar (Corea 2019, Agnes *et al.* 1998). So hat die Freisetzung ungefilterter Aquakultur-Abwässer die Verbreitung von Shrimps-Pathogenen gefördert, was zur Ausbreitung von Infektionen in umliegenden Gebiete und Aquakulturen führte.

4.4 Anreicherung von *Vibrio* spp. in tierischem Gewebe

Sowohl in den untersuchten Fischarten der Ostsee als auch in den kultivierten Tieren aus Hainan waren Vibrionen zahlreich vertreten. Die drei untersuchten Fischspezies der Ostsee, speziell *N. melanostomus*, waren sowohl im Sommer als auch im Winter durch hohe *Vibrio* spp.-Zellzahlen, im Vergleich zum umgebenden Wasser und Sediment, charakterisiert. “Für die Gewebeprobe der Tiere aus Aquakulturen war dies ebenfalls in einigen Proben der Fall, wobei kein klarer Trend einer Anreicherung zwischen Shrimps, Fisch und Schnecken zu erkennen war. Die höchsten relativen Abundanzen an *Vibrio*-16S rRNS-Genen in Gewebeproben traten in Aquakulturen in einer Babylonia-Schnecke (5,6%), und in einer Shrimp-Probe (1,3%) auf. In der Gewebeprobe aus der zweiten Schneckenkultur war diese Konzentration jedoch um mehr als das 100-fache geringer und auch bei den Shrimps-Proben war diese Bandbreite vertreten“ (vgl. Möller *et al.* 2020). Dies deutete darauf hin, dass eine *Vibrio* spp.-Anreicherung nicht nur

von der Art abhängt, sondern individuelle Faktoren ebenfalls eine Rolle spielen könnten. Generell sind Alter und Physiologie einzelner Individuen bereits als wichtige Faktoren beschrieben, die Auswirkungen auf assoziierte Mikrobiota von Fischen und Shrimps haben können (Fan *et al.* 2019, Zhao *et al.* 2020).

Dies deckte sich mit meinen Ergebnissen der Promotion aus den individuell untersuchten Fischen der Ostsee, bei denen Unterschiede von mehreren Größenordnungen in der *Vibrio*-Zellzahl zwischen den Individuen beobachtet werden konnten. Die Untersuchung von den verschiedenen Kompartimenten zeigte desweiteren, dass der Magen-Darm-Trakt vermutlich Hauptträger der *Vibrio*-Zellen in den Fischen war. Eine Beobachtung, die mit einer Studie von Majumdar *et al.* (2014) vergleichbar ist, in der *Vibrio* spp.-Zellzahlen auf der Haut, den Kiemen und dem Magendarmtrakt von verschiedenen Fischarten auf Märkten in Bangladesch untersucht wurden. Der Magendarmtrakt sowie die Kiemen wurden als Hauptträger von Vibrionen für Fische identifiziert, wohingegen der Hautschleim eine 10-fach geringere Zellzahl aufwies. Auch in meiner Studie zeigte sich, dass die einzelnen Fischgewebe durch unterschiedliche *Vibrio*-Zellzahlen charakterisiert waren, mit dem Magen-Darm-Trakt als Hauptträger der Vibrionen-Last. Dabei wiesen die *Vibrio*-Zellzahlen erneut Unterschiede um mehrere Größenordnungen zwischen Individuen einer Art auf.

Die wissenschaftliche Gruppe um Star *et al.* (2013) beobachtete für Dorsche, die am selben Standort gefangen wurden, ein ähnliches Phänomen. So machte die Gruppe *Vibrionales* zwischen 40 - 95% der im Magen-Darm-Trakt einzelner individueller Dorsche identifizierten 16S rRNS-Gene aus. Ähnlich den Fischen zeigte sich in den Ergebnissen von MdZoqratt *et al.* (2018), dass im Magen-Darm-Trakt von Shrimps Unterschiede in der Anzahl der *Vibrio*-16S rRNS Gene um bis zu einer Zehnerpotenz in einzelnen Individuen auftreten konnten. Obwohl die Betrachtung der individuellen Darmflora einzelner *Babylonia*-Schnecken noch nicht untersucht wurde, ist davon auszugehen, dass solche vergleichbaren Unterschiede ebenfalls vorliegen. Diese Beobachtungen könnten die in meinen Ergebnissen aufgetretenen Abundanzunterschiede von *Vibrio*-16S rRNS Gene in Geweben von Shrimps und Schnecken in den Aquakulturen erklären.

“Für die untersuchten Schnecken-Kulturen in meiner Studie könnte der beobachtete Unterschied jedoch auch auf den Beginn eines potentiellen Krankheitsbefalls durch Vibrionen hinweisen. Die beiden Schnecken-Kulturen stammten von demselben Farmer und die Tiere wiesen das gleiche Alter auf und sind vermutlich auch entsprechend behandelt und gefüttert worden. Trotzdem zeigte sich in der relativen Abundanz ein Unterschied von mehreren Magnituden“ (vgl. Möller *et al.* 2020). Ein vergleichbares Verhalten wurde bereits in mehreren

Studien, unter anderem von Pinoargote *et al.* (2018) und Rajkumar *et al.* (2007) beschrieben. So konnte Pinoargote *et al.* (2018) nach einer Infektion mit *V. parahaemolyticus* im Magen-Darm-Trakt von Shrimps einen Anstieg der relativen Abundanz von *Vibrionaceae* um das 20-fache beobachten. Und auch Rajkumar *et al.* (2007) konnten zeigen, dass in mit *Vibrio* infizierten Sardellen dies mit einem Anstieg der kultivierbaren *Vibrio*-Zellzahl um 2 Größenordnungen einherging. Tatsächlich berichtete der Farmer der Schnecken-Kulturen, dass in der Vergangenheit Krankheiten aufgetreten sind, die den kompletten Verlust des Besatzes verursachten.

4.5 Tiere beeinflussen *Vibrio*-Gemeinschaft

Neben der möglichen Anreicherung von Vibrionen im Tiergewebe, zeigte sich in meiner Studie ebenfalls ein möglicher Einfluss auf die *Vibrio*-Zusammensetzung.

Das Mikrobiom aquatischer Organismen unterscheidet sich im Allgemeinen von dem des umgebenden Sediments und Wassers (Md Zoqratt *et al.* 2018, Wu *et al.* 2012). Dabei zeigten Studien über die Mikrobiota in der Darmflora von Fischen und Shrimps, dass Faktoren wie Ernährung, Alter, Entwicklungsstadium und Bedingungen des umgebenden Wassers einen Einfluss hatten (Fan *et al.* 2019, Li *et al.* 2017, Zeng *et al.* 2017, Zhao *et al.* 2020).

Auch in meiner Studie zeigte sich, dass innerhalb derselben Tierart die bakterielle Zusammensetzung verschieden sein konnte. Die untersuchten Shrimps-Proben wiesen Unterschiede auf, die sich möglicherweise mit den unterschiedlichen Alters-Stadien der beprobten Shrimps erklären lassen können, vergleichbar mit den Beobachtungen von Zeng *et al.* (2017). Doch auch wenn individuelle Unterschiede einzelner Shrimps deren bakterielle Gemeinschaft beeinflussen können, weisen Studien darauf hin, dass die bakterielle Gesamtzusammensetzung innerhalb einer Art ähnlich bleibt. Zoqratt *et al.* (2018) konnte zeigen, dass Shrimps aus Aquakulturen in Malaysia und Vietnam sich in ihrer bakteriellen Zusammensetzung des Magen-Darm-Traktes ähneln, obwohl das umgebende Wasser aus den Gebieten sich stark unterschied. Auch bei Fischen kann ein ähnliches Phänomen beobachtet werden. Die Transplantation des Darm-Mikrobioms aus Mäusen in den Magen-Darm-Trakt von keimfreien Zebrafischen führte zur Ausbildung einer mikrobiellen Gemeinschaft, die denen der normalen Gemeinschaft des Darms aus Zebrafischen wieder ähnelte (Rawls *et al.* 2006). Dies deutet darauf hin, dass die mikrobielle Gemeinschaft in Fischen aufgrund der Eigenschaften des Wirtes ausgewählt und geformt wird und nur angepasste bakterielle Gemeinschaften überstehen.

Dabei zeigten Vergleiche der mikrobiellen Diversität aus Aquakultur stammenden Karpfen (Li *et al.* 2015) und Shrimps (Pinoargote *et al.* 2018), dass diese geringere Diversitäten aufwiesen, als das umgebende Wasser. Diese allgemeine Reduktion der bakteriellen Diversität innerhalb des Magen-Darm-Trakts in Shrimps und Fischen könnte sich ebenso auf die *Vibrio*-Gemeinschaft übertragen, und damit die in den Ergebnissen meiner Arbeit vorliegende geringe *Vibrio*-Diversität in den untersuchten Gewebeproben sowohl innerhalb der Aquakulturen als auch der Ostsee erklären.

Zusätzlich konnten verschiedene Studien zeigen, dass der Hauptanteil der bakteriellen Zusammensetzung des Magen-Darm-Mikrobioms von Shrimps und Fischen ebenso im Sediment und Wasser vorkamen (Li *et al.* 2015, Sun *et al.* 2019, Wu *et al.* 2012). Dabei waren jedoch einzelne OTUs spezifisch in den Tieren vertreten.

Auch in meiner Studie lässt sich dieses Phänomen möglicherweise auf die *Vibrio*-Gemeinschaften in den verschiedenen untersuchten Fischarten der Ostsee, als auch für die Fische, Shrimps und Schnecken der Aquakulturen übertragen. In den Aquakulturen sind die *Vibrio*-Gemeinschaften der Tiere aus *Vibrio*-OTUs zusammengesetzt, die ebenso im Küstenwasser vertreten waren. Ebenso in den Fisch-Proben der Ostsee traten vier der fünf *Vibrio*-Arten auf, die auch in den umgebenden Materialien vorzufinden waren. Jedoch wurde in Warnemünde die potentiell humanpathogene Art *V. vulnificus* nur in *N. melanostomus* gefunden. Möglicherweise stellt *V. vulnificus* damit eine für *N. melanostomus* indikative *Vibrio*-Art dar.

Eine mögliche Ursache dafür, dass in den beiden Fischarten *C. harengus membras* und *G. morhua* *V. vulnificus* nicht vertreten war, könnte an der unterschiedlichen Lebensweise und Ernährung der Fischarten liegen:

4.6 Die Lebensweise von Fischen beeinflusst assoziierte *Vibrio*-Gemeinschaften

Tiere, speziell der Magendarmtrakt von Fischen, wurden bereits als wichtiges Habitat für Vibrionen diskutiert, das zur Ausbreitung, speziell auch potentiell humanpathogener Vertreter, dienen kann (Givens *et al.* 2014). Kaneko und Colwell (1973) stellten die Hypothese auf, dass *V. parahaemolyticus* in der Chesapeake Bay, welche in der gemäßigten Zone der USA liegt, in Muscheln oder aassfressenden bodenbewohnenden Fischen, wie der Grundel, angereichert wird und in diesen überwintern kann. Diese Theorie beruhte auf dem konstanten Kontakt der Grundeln mit dem Sediment, welches ebenfalls als Rückzugsgebiet für Vibrionen angesehen wurde. Unterstützt wurde diese Theorie durch eine auf Kultivierung basierenden Studie in der

subtropischen Golf Küste der USA (DePaola *et al.* 1994). *Vibrio vulnificus* erreichte signifikant höhere Zellzahlen in bodenbewohnenden Fischen als im umgebende Meereswasser, Sediment, Austerngewebe, in filtrierend ernährenden Fischen oder Raubfischen. Dies stimmt mit den Ergebnissen meiner Studie überein. Im Sommer 2015 lagen die *Vibrio*-Zellzahlen in der bodenbewohnenden Grundel mindestens um eine Magnitude über denen des umgebenden Wassers, Sediments und räuberisch lebenden *G. morhua* oder fakultativ filtrierend lebendem *C. harengus membras*. Tatsächlich war diese Differenz möglicherweise sogar größer. Die Zellzahlen in *G. morhua* und *C. harengus membras* wurden vermutlich durch ddPCR überschätzt, da die Differenz in den beiden Fischen zwischen ddPCR und KBE doppelt so groß war, wie in den restlichen Probematerialien.

Aus den Beobachtungen meiner und anderer Studien (DePaola *et al.* 1994) lässt sich damit ableiten, dass bodenbewohnende Fische in der Ostsee ebenfalls, im Vergleich zu Fischen mit anderem Lebensstil, höhere *Vibrio* spp. Zellzahlen erreichen könnten. Damit ergibt sich die Möglichkeit, dass neben *N. melanostomus* andere bodenbewohnende Fischarten der Ostsee ein wichtiges Anreicherungsmaterial darstellen. Ein möglicher Kandidat wäre die einheimische Aalmutter (*Zoarces viviparus*), wobei diese in meiner Studie nicht untersucht wurde. Die invasive *N. melanostomus* verdrängt in der südlichen Ostsee einheimische Arten immer stärker und stellte in manchen Bereichen, beispielsweise im Golf von Gdańsk, mit Anteilen von über 75% bereits den größten Teil der vorhandenen Fischbiomasse dar (Sapota und Skóra 2005). Daher kann in solchen Gebieten die Bedeutung von anderen bodenbewohnenden Fischarten als Träger von *Vibrio*-Populationen im Vergleich zu *N. melanostomus* mittlerweile als eher gering eingestuft werden.

Neben der hohen *Vibrio* Zellzahl zeichnete sich *N. melanostomus* auch durch das Auftreten von *V. vulnificus* in dem untersuchten Gewebe auf. In der Studie von DePaola *et al.* (1994) wurde eine Anreicherung von *V. vulnificus* in bodenbewohnenden Fischen ebenfalls detektiert. Erklärt wurde dies durch die Nahrung der Fische, die aus Muscheln und Krebsen bestand, deren Gewebe ebenfalls mit Vibrionen angereichert sein konnten. Diese beiden Nahrungsquellen repräsentierten auch einen Hauptanteil an dem Speiseplan von *N. melanostomus* in der Ostsee (Skabeikis und Lesutienė 2015), was die erhöhten Zellzahlen an *Vibrio* spp. und den Nachweis von *V. vulnificus* in der vorliegenden Studie erklären könnte. Zusätzlich filtrieren Muscheln Seston aus dem umgebenden Meerwasser (Raymond *et al.* 2006) und könnten damit die im Wasser und Seston vorkommenden *Vibrio*-Gemeinschaften aufnehmen. Durch den Konsum der Muscheln durch *N. melanostomus* könnten diese Wasser/Seston-*Vibrio*-Gemeinschaften an *N. melanostomus* übertragen werden, was eine mögliche Erklärung der höheren Ähnlichkeit in der

Vibrio-Gemeinschaft zwischen *N. melanostomus* und dem Wasser und Seston im nMDS-Plot ist.

4.7. Einfluss physikochemischer Eigenschaften auf Vibrionen

Neben Tieren als biologischer Einflussfaktor, zeigt sich in den Ergebnissen meiner Promotion, dass physikochemische Eigenschaften *Vibrio*-Populationen in ihrer Zusammensetzung und Abundanz verändern können. Im konkreten waren dies Temperatur, Salinität und Phosphatkonzentration. Dabei waren die Einflüsse örtlich gewichtet zu betrachten. So waren Temperatur und Salinität wichtige Faktoren für die Abundanz und Zusammensetzung von *Vibrio*-Gemeinschaften in der Ostsee, während Salinität und Phosphat wichtige Einflussfaktoren in Hainan darstellten.

4.7.1 Wassertemperatur als Einfluss auf *Vibrio*-Populationen und mögliche Winter-Reservoirre in gemäßigten Breiten

Die Wassertemperatur wurde als einer der wichtigsten Einflussfaktoren der *Vibrio* spp.-Abundanz in gemäßigten Zonen beschrieben (Eiler *et al.* 2006, Oberbeckmann *et al.* 2012, Vezzulli *et al.* 2012). Auch in meiner Studie zeigte sich ein deutlicher Effekt der Temperatur auf die *Vibrio*-Abundanz in den Proben der südlichen Ostsee, wobei verschiedene Materialien unterschiedlich sensitiv gegenüber diesem Faktor waren. Obwohl alle Materialien einen Rückgang in der *Vibrio*-Zellzahl von der Sommer- zur Wintersituation aufwiesen, war die sich daraus ergebende Differenz in den Materialien verschieden ausgeprägt. *N. melanostomus* und Seston wiesen die größte Differenz auf. Trotzdem war die daraus resultierende Zellzahl in dem bodenbewohnenden Fisch immer noch um fast eine Zehnerpotenz höher als im umgebenden Wasser und Sediment. Diese Beobachtung deutet daraufhin, dass Vibrionen in Fischgewebe überwintern könnten, eine Theorie, die bereits DePaola *et al.* (1994) in dieser Form postulierten. Die Autoren konnten Vibrionen während Kaltwasserperioden in Fischen nachweisen, im umliegenden Wasser und Sediment jedoch nicht. Auch wenn deren Studie in der subtropischen Regionen erfolgte, in denen die Wassertemperaturen im Jahr über 10 °C verblieben, zeigte meine Studie, dass das Prinzip von Fischen als mögliches Winterreservoir auch auf gemäßigte Klimazonen übertragbar ist. Während sich die *Vibrio* spp.-Zellzahlen in Fischen im Winter und Sommer stark unterscheiden, zeigten diese bei Wassertemperaturen über 20 °C jedoch nur noch geringe Änderungen. Dies kann mit einer langsamen Angleichung der Körpertemperatur im

Fisch mit der Umgebungstemperatur oder der Vermeidung von ungünstigen Wassertemperaturen durch Abtauchen in kühlere Wasserschichten erklärt werden (Claireaux *et al.* 1995). Ein solcher Effekt muss jedoch in dieser Form noch im Detail untersucht werden. Neben den Fischen zeichnete sich auch Seston durch eine hohe Sensitivität gegenüber der Temperatur aus. Seston wurde ebenfalls als wichtiges Habitat von *Vibrio* spp. und möglicher Rückzugsort für Vibrionen während kühler Wassertemperatur-Phasen diskutiert (Eiler und Bertilsson 2006, Venkateswaran *et al.* 1990), da Bakterien allgemein auf Seston angereichert werden (Caron *et al.* 1982). Zusätzlich sind *Vibrio*-Arten, unter anderem *V. cholerae*, in der Lage, Biofilme auf Chitin-Partikeln zu bilden (Meibom *et al.* 2004). In meiner Studie waren bei hohen Wassertemperaturen im Sommer auf Seston ähnliche *Vibrio*-Zellzahlen wie in Fischen zu verzeichnen. Die *Vibrio*-Zellzahlen von 10^4 – 10^5 Zellen g^{-1} sind dabei mit den bereits dokumentierten Zahlen von Kaneko und Colwell (1973) aus der Chesapeake Bay vergleichbar. Während im Sommer die Abundanzen ein Level erreichten, welche mit denen in Fischen vergleichbar waren, fielen sie jedoch während der kühlen Wassertemperaturen im Winter auf Werte ähnlich dem Sediment und unter die *Vibrio*-Zellzahlen im Fisch. Dies deutete daraufhin, dass Seston ein bedeutsames Habitat im Sommer darstellte, aber ein ungünstiges Winterhabitat repräsentiert. Auf die starke Temperaturabhängigkeit der *Vibrio*-Zellzahl im Seston wiesen bereits frühere Studien in der Chesapeake Bay in den USA hin (Kaneko und Colwell 1973). So zeigten die *Vibrio*-Zellzahlen ab 14 °C einen exponentiellen Anstieg mit zunehmender Wassertemperatur und erreichten bei 30 °C Werte von bis zu 10^9 g^{-1} .

Eine ähnlich starke Temperaturabhängigkeit war im Sediment in den Ergebnissen meiner Promotion nicht zu beobachten, womit dieses sich als stabileres Habitat auszeichnete. Im Sediment waren die *Vibrio*-Zellzahlen sowohl im Sommer als auch im Winter vergleichbar hoch. Die geringere Sensitivität gegenüber der Wassertemperatur und damit gegenüber Jahreszeiten wurde bereits durch kultivierungsbasierte Methoden von Böer *et al.* (2013) in der Nordsee beschrieben. Bei deren Versuchen konnten potentiell pathogene *Vibrio* spp. im Winter noch aus dem Sediment isoliert werden, während im Wasser dieser Nachweis nicht mehr möglich war. Dieser Effekt wurde auf eine geringere Sensitivität von Vibrionen im Sediment gegenüber von der Umgebungstemperatur erklärt. Diese Beobachtung ist auch ein Grund, warum Sediment oft als Winterreservoir für Vibrionen angesehen wird (Böer *et al.* 2013, Kumazawa und Kato 1985).

In meiner Studie waren Vibrionen in fast konstanten Zellzahlen von ca. $8,8 \times 10^2$ ($\pm 1,3 \times 10^3$) *Vibrio*-Zellen je g Trockengewicht im Sediment während des Winters nachgewiesen worden, während in der Hälfte der Wasserproben die Werte gegen 0 fielen. Jedoch zeigte sich bei einem

Anstieg der Wassertemperatur von über 20°C, dass die *Vibrio*-Zellzahlen stark anstiegen. Ein solches Verhalten ist ebenfalls für Wasser sichtbar, bei der zwischen Winter und dem ersten Sommer ein vergleichsweise geringer Anstieg in der *Vibrio* Zellzahl bestand, beim Überschreiten von 20 °C diese sich jedoch um mehrere Magnituden vergrößerte. Die dabei aufgetretenen Zellzahlen sind mit anderen Studien vergleichbar, in denen ähnliche Umweltbedingungen herrschten (Gyrate *et al.* 2019, Hauk und Duty 2015). Allgemein gilt für Vibrionen 20 °C als Schwellenwert, ab dem diese sich stark vermehren und hohe Zellzahlen erreichen können (Böer *et al.* 2013, Kaspar und Tamplin 1993).

Obwohl die Wassertemperatur als wichtiger Faktor für Vibrionen gilt, spielt diese in tropischen Gebieten eher eine geringere Rolle, da die Wassertemperatur über das Jahr meist über 20°C verbleibt (Asplund *et al.* 2011). Andere Faktoren wie Phytoplankton-Zusammensetzung, organische und anorganische Nährstoffe, werden in diesen Bereichen für saisonale Unterschiede in der *Vibrio*-Zusammensetzung verantwortlich gemacht (Asplund *et al.* 2011). Hingegen wurde für Aquakulturen die Wassertemperatur als wichtiger formender Faktor der Bakteriengemeinschaften und *Vibrio*-Gemeinschaft beschrieben (Noriega-Orozco *et al.* 2007, Qin *et al.* 2016).

Obwohl in meiner Studie die Wassertemperatur als wichtiger Faktor registriert wurde, deckt sich das Ergebnis nicht mit der sichtbaren Gruppenbildung von Aquakulturen und Küstenproben, wie es für die Salinität und Phosphat der Fall war. Ein Grund dafür könnte in den unterschiedlichen Aquakulturtypen und der Probenahme-Zeit liegen.

Es ist davon auszugehen, dass die Aquakulturen aufgrund des geringen Wasservolumens größeren Wassertemperatur-Schwankungen über den Tagesverlauf hinweg unterworfen waren, als im Vergleich zu angrenzenden Küstengebieten (Krumme *et al.* 2012). Für flache Aquakulturteiche der tropischen Regionen wurden bereits Schwankungen der täglichen Wassertemperaturen von 7 – 10 °C dokumentiert (Dunn 1967, Khan *et al.* 1970). Kutty (1987) berichtet sogar von täglichen Werten, die zwischen 20 – 40 °C schwanken konnten. Eine Wassertemperaturdifferenz, die vergleichbar mit den in meiner Arbeit gemessenen Differenzen zwischen den Werten für die Winter und Sommerproben der Ostsee waren. Da die Probenahme innerhalb meiner Promotion nur einmal am Tag erfolgte, könnten über den Tag aufgetretene Wassertemperaturschwankungen unbeachtet geblieben sein.

In zukünftigen Versuchen sollte dieses dahingehend berücksichtigt werden, als dass in tropischen Gebieten die Probestationen mehr durch ihre Schwankungsbreite der Wassertemperatur über den Tag hinweg definiert werden, als über die Wassertemperatur zum Probenahme-Zeitpunkt.

4.7.2 Salinität als bestimmender Faktor der *Vibrio*-Zusammensetzung

Während die Temperatur als ein Haupteinflussfaktor für die *Vibrio* spp.-Abundanz in gemäßigten Zonen angesehen wird (Eiler *et al.* 2006, Oberbeckmann *et al.* 2012, Vezzulli *et al.* 2012), wird der Salinität eine Schlüsselrolle in der Spezieskomposition zugesagt (Li *et al.* 2020, Matteucci *et al.* 2015, Siboni *et al.* 2016). Auch in dieser Studie zeigt sich ein Einfluss des Salzgehaltes auf die *Vibrio*-Zusammensetzung. In der Ostsee wird die Salinität durch den natürlich vorkommenden Salzgradienten bestimmt (Herlemann *et al.* 2011).

Aber auch in dem untersuchten Ästuar in Hainan trat ein natürlicher Salzgradient auf, der eine sukzessive Veränderung in der *Vibrio*-Zusammensetzung zeigte. Die Ästuar-Mündung wies Ähnlichkeiten in der *Vibrio*-Gemeinschaft mit den Küstenstandorten auf, die im ähnlichen Salinitätsbereich von über 30‰ lagen. Dahingegen ähnelte der Flussursprung in der Zusammensetzung den Aquakulturen, die ihrerseits, ähnlich dem Flussursprung, durch geringere Salinitäten von <25-30‰ charakterisiert waren.

Für die Aufzucht von Penaiden-Shrimps ist ein Salzgehalt von 15-25‰ optimal, so dass das ursprüngliche Küstenwasser in den Aquakulturen vermutlich mit Süßwasser aus Brunnen oder Regenwasser verdünnt werden musste (Baliao 2000). Die dadurch herbeigeführte Änderung im Salzgehalt könnte die beobachtete verringerte Diversität in der *Vibrio*-Gemeinschaft hervorgerufen haben, die dem natürlichen Salzgradienten des Flusses ähnelten.

Obwohl für viele *Vibrio*-Arten ein sehr großer Toleranzbereich für die Salinität im Labor beschrieben wurde (Kaspar und Tamplin 1993, Singleton *et al.* 1982, Twedt *et al.* 1969), zeigen die verschiedenen Arten in der Natur spezifische Salinitätspräferenzen, die Einfluss auf ihre Vorkommen haben (Randa *et al.* 2004, Takemura *et al.* 2014). Die unterschiedlichen Salinitäten an den Probestationen können daher die meiner Promotion beobachteten Zusammensetzungen in der *Vibrio*-Gemeinschaft sowohl an der Ostseeküste als auch den Proben Hainans teilweise erklären.

In der Ostsee zeigte sich dies insbesondere in der Verteilung der vier Arten *V. parahaemolyticus*, *V. cholerae/mimicus* und *V. vulnificus*. *V. parahaemolyticus*, besitzt eine Präferenz für Salinitäten von ≥ 17 –20‰ (Cook *et al.* 2002, DePaola *et al.* 2003, Rivera *et al.* 1989). Aus diesem Grund ist diese Art in Proben der drei westlichen Stationen der Ostsee vertreten, die höhere Salinitäten als der östliche Standort aufwies. Hingegen waren *V. cholera* und *V. mimicus*, die Bedingungen von < 5‰ bis Süßwasser bevorzugen (Chowdhury *et al.* 1989, Takemura *et al.* 2014), hauptsächlich in den östlichen Probestationen der Ostsee gefunden worden, die sich durch vergleichsweise geringere Salinitäten auszeichneten. Dieses

Phänomen zeigte sich ebenso in Hainan im Flussursprung, in dem eine Salinität von ca. 9,5 ‰ gemessen wurde. Dies war der einzige Ort in Hainan, an dem das mit *V. cholerae* / *V. mimicus* / *V. metoecus* verwandte V_OTU55 auftrat. Im Vergleich dazu ist *V. vulnificus* als eine Art beschrieben, die in der Umwelt brackische Bedingungen von 8-15‰ bevorzugt (Kelly 1982, Rivera *et al.* 1989), so dass sein breites Auftreten in den Bereichen von Warnemünde bis Karlshagen plausibel erscheint. Die deutsche Ostseeküste liegt genau in dem Optimum dieser Art und begründet damit, dass *V. vulnificus* auch für die größte Anzahl an bisher registrierten Vibriosen in Deutschland verantwortlich war (LAGuS M-V 2020). *V. vulnificus* kann jedoch auch in Gebieten auftreten, in denen dieser optimale Salzgehalt überschritten wird (Johnson *et al.* 2010, Maugeri *et al.* 2006).

Das Auftreten von V_OTU1 in allen Proben aus Hainan, das hohe Sequenzähnlichkeiten mit *V. vulnificus* zeigte, kann darauf hindeuten, dass diese Art hier ebenfalls verbreitet war. Allerdings bietet die geringe Auflösungskraft des 16S rRNS Gens nur die Möglichkeit zwischen *V. cholerae/mimicus/metoecus* und den restlichen *Vibrio*-Arten mit einiger Sicherheit zu unterscheiden (Kirchberger *et al.* 2014, Kita-Tsukamoto *et al.* 1993, Pascual *et al.* 2010, Yong *et al.* 2006). Daher ist die Identifizierung auf Basis des 16S rRNS Gens für die *Vibrio*-OTUs in Haina, mit Ausnahme von V_OTU55, als ungenau zu bewerten.

4.7.3 Phosphat als bestimmender Faktor für *Vibrio*-Gemeinschaften in Aquakulturen

“Neben dem Salzgehalt war die Phosphat-Konzentration ein vermutlich wichtiger Einflussfaktor für die Vibrionen-Zusammensetzung in Hainan. In einer Studie für das Nord-Chinesische Meer zeigte Liang *et al.* (2019) eine negative Korrelation zwischen der Diversität der *Vibrio*-Gemeinschaft und spezifischen *Vibrio*-Arten mit steigender Phosphatkonzentration. In meiner Studie waren in sämtlichen Aquakultur-Proben, mit Ausnahme in den Proben der beiden kontinuierlichen Aquakulturen, sowie den Proben des Flussursprungs, vergleichsweise hohe Phosphatkonzentrationen registriert worden. Diese Proben zeigten ebenfalls eine geringe *Vibrio*-Diversität auf, was im Einklang mit der von Liang aufgestellten Hypothese einer negativen Korrelation von Phosphat zur *Vibrio*-Diversität steht. Jedoch kann Phosphat auch ein Nebenprodukt hoher organischer Belastung darstellen, welches von Aquakulturabwässern oder Futter stammten. Qin *et al.* (2016) konnten zeigen, dass Nährstoffe signifikanten Einfluss auf die dort vorkommenden bakteriellen Gemeinschaften besaßen. Daher ist es möglich, dass die in meiner Studie beobachteten Veränderungen in der *Vibrio*-Gemeinschaft innerhalb der Aquakulturen ein indirekter Effekt durch Beeinflussung der gesamt bakteriellen Gemeinschaft

aufgrund hoher Nährstoffbelastung darstellt. Dies wurde in meiner Studie nicht weitergehend betrachtet. Die Rolle von Phosphaten und organischer Belastung als reduzierender Faktor auf die *Vibrio*-Diversität bedarf weiterer Untersuchungen.“ (vgl. Möller *et al.* 2020)

4.8 Aufreinigung von Aquakulturabwässern zur Verringerung der *Vibrio*-Abundanz

Die in meiner Studie durch die Firma „*Hainan Guangtai Marine Breeding Company*“ betriebene Aquakultur war die einzige, die einen Teil ihrer Abwässer aufbereitet hat, um dieses erneut wiederzuverwenden. In den einzelnen Aufreinigungsbecken kam es zu einer schrittweisen Verringerung der *Vibrio* spp.-16S rRNS Gen-Anzahl und *Vibrio*-Diversität.

Die Aufarbeitung von Aquakultur-Abwässern zur Wiederverwendung hat die Anforderung, dass das aufgearbeitete Wasser die Qualitätsmerkmale besitzt, die einen kontinuierlichen Betrieb der Aquakulturen erlauben. Oft geht dieser Recyclingprozess einher mit der mechanischen und/oder mikrobiologischen Entfernung von Futterresten und Nährstoffen, wie beispielsweise Ammoniak (Martins *et al.* 2013, van Rijn und Rivera 1990, Van Rijn *et al.* 2006). Bei biologischen Aufreinigungen sollen in den verschiedenen Becken Bedingungen geschaffen werden, die spezielle Gruppen von Bakterien fördern, welche in der Lage sind, die belastenden Substanzen zu entfernen (Schreier *et al.* 2010).

“Die beobachtete Verringerung der *Vibrio* spp.-16S rRNS-Genen in meiner Studie stellt vermutlich einen Nebeneffekt dar, der dadurch zustande kam, dass andere bakteriellen Gruppen besser an die Bedingungen der Aufreinigungsbecken angepasst waren. Diese indirekte Reduzierung deckt sich mit einer Beobachtung von Martins *et al.* (2013). In dieser Studie wurde die Zusammensetzung der bakteriellen Gemeinschaft in zirkulierenden Aquakultursystemen untersucht, die mit dem Aufbau der Firmen-betriebenen Aquakultur in meiner Promotion vergleichbar war. Dabei zeigte sich ebenfalls, dass *Vibrionales* im ausgehenden Wasseraufbewahrungstank einen Anteil von 20% ausmachten, dieser Wert jedoch in den anschließenden Aufbereitungsschritten auf unter 5% fiel“ (vgl. Möller *et al.* 2020). Eine Aufbereitung von Abwässern ist daher nicht nur aus eutrophierungstechnischer Sicht zu empfehlen, sondern könnte dabei helfen, einen möglichen Einfluss von Aquakulturen auf *Vibrio*-Küstengemeinschaften in der Zukunft weiterhin zu vermeiden.

4.9 Seegras als natürlicher *Vibrio*-Filter

Ursprünglich sollte ein Teil meiner Arbeit den möglichen Filtereffekt von Seegräsern auf Aquakulturabwässer und *Vibrio*-Gemeinschaften untersuchen. Jedoch konnte dies nicht realisiert werden, da mehr als 87% der zum Zeitpunkt der Projektantragsstellung vorhandenen Seegraswiesen zu Projektbeginn im geplanten Untersuchungsgebiet von Hainan bereits abgestorben waren (Thomsen *et al.* 2020). Seegräser traten nur noch sporadisch und nicht in großen zusammenhängenden Bereichen auf.

Die einzelnen untersuchten Seegrasproben zeigten jedoch die höchste relative Abundanz an *Vibrio* 16S rRNS-Genen von allen Proben auf. Ein solche Beobachtung deckt sich mit den Ergebnissen von Jiang *et al.* (2015), in denen *Vibrionales* als ein wichtiger Teil der bakteriellen Gemeinschaft auf Seegräsern beschrieben wurde. Diese Ordnung machte dabei auf Seegräsern an der Küste Hainans bis zu 25% der kultivierbaren Bakterien aus. Liu *et al.* (2018) berichten des Weiteren von erhöhten *Vibrio* spp.-Zellzahlen in Seegras-Wiesen in stark eutrophierten Gewässern. Die höchsten Abundanzen an *Vibrio*-16S rRNS-Genen in meiner Studie stammten vom Küstentransekt B. Jedoch waren im Transekt D die Abundanzen 10-fach geringer, obgleich die anorganische Nährstoffbelastung beider Standorte ähnlich hoch war. Es bleibt daher für diese Habitate unklar, welche Rolle Eutrophierung auf *Vibrio*-Abundanzen hatte. Zusätzlich zur hohen Abundanz an *Vibrio* spp. waren die Seegras-Proben durch spezifische *Vibrio*-OTUs charakterisiert, die aus V_OTU4 und V_OTU15-18 bestanden. Crump und Koch (2008) untersuchten die bakterielle Zusammensetzung auf der Oberfläche aquatischer Angiospermen und konnten Hinweise auf das Vorhandensein einzigartiger, potentiell mutualistischer bakterieller Gemeinschaften finden.

Auch wiesen verschiedene Studien darauf hin, dass Seegräser in einer sehr engen Wechselbeziehung mit Bakterien stehen, wobei beide sich durch positive als auch negative Wechselwirkungen beeinflussen (Brodersen *et al.* 2017, Puglisi *et al.* 2007). Die Pflanze kann dabei als Nährstoffquelle für Bakterien dienen (Puglisi *et al.* 2007, Wood und Hayasaka 1981), die ihrerseits Nährstoffe für das Seegras bereitstellen (Nielsen *et al.* 2001). *Bacillus licheniformis*, ein bakterieller Symbiont von Seegräsern (Nugraheni *et al.* 2010), ist dafür bekannt, antimikrobielle Substanzen gegen Konkurrenten zu bilden (Cladera-Olivera *et al.* 2004) und kann so möglicherweise auch Seegräser vor Pathogenen schützen. Die gezielte Rekrutierung der entsprechenden Bakterien aus dem Wasser oder Sediment könnte dabei durch Freisetzung von Exudaten erfolgen (Wood und Hayasaka 1981).

Die in meiner Studie gefundenen *Vibrio*-OTUs stellen möglicherweise einen Teil dieser einzigartigen bakteriellen Gemeinschaft in Seegräsern dar. Dies deckt sich auch mit einer Studie von Jose *et al.* (Jose 2014), in der *Vibrio*-Stämme einen Teil der in den Wurzeln vorkommenden kultivierbaren bakteriellen Gemeinschaft ausmachten, die zusätzlich für die Seegräser wachstumsfördernde Eigenschaften besaßen.

Infolge dieser Wechselwirkungen und Beeinflussungen der bakteriellen Gemeinschaften durch Seegräser ist es möglich, dass Seegräser dabei helfen, das Auftreten von Pathogenen zu reduzieren. Seegräser wurde bereits von Lamb *et al.* (2017) als wichtiger Filter für Korallensysteme beschrieben, der in der Lage ist, pathogene Bakterien, wie Vibrionen, zu reduzieren. Korallenriffe und Seegräserwiesen sind eng verbundene Ökosysteme, die in starker Wechselwirkung zueinander stehen (Camp *et al.* 2016). Der Filtereffekt der Seegräser könnte so das Auftreten von Krankheiten in den Korallen verhindern und damit die vorhandenen Küstenstrukturen schützen. Durch die in den letzten Jahrzehnten auftretenden Verluste an Seegräsern an der Küste Hainan's, der vermutlich durch die durch Aquakulturen hervorgerufenen Eutrophierung auftrat (Thomsen *et al.* 2020), ist dieser Filtereffekt jedoch bedroht.

4.10 Anreicherung weiterer potentieller humanpathogener Bakterien in Aquakulturen

Bei *Vibrio*, als typischer Aquakultur-Pathogen, handelt es sich um einen heterotroph lebenden Organismus, der auch einen natürlichen Bestandteil in Aquakulturen und den kultivierten Tieren darstellen kann (Alfiansah *et al.* 2020). Neben typischen heterotrophen Bakterien, die fester Bestandteil von Aquakulturen sein können, ist der Eintrag potentieller Humanpathogener durch Düngung oder Futter in Aquakulturen möglich. *Enterobacteriaceae* stellen typische Fäkalbakterien dar, deren Anzahl als Indikator für die Wasserqualität verwendet wird (Purdy *et al.* 2010).

Eine Studie von Lalitha und Serndran (2004) zeigte, dass in dem Magendarm-Trakt von Süßwasser-Shrimps aus Aquakulturen *Enterobacteriaceae* ca. 30% aller gramnegativen Bakterien der Darmflora ausmachten und im Vergleich zum umgebenden Wasser angereichert wurden. Gleichzeitig werden *Enterobacteriaceae* üblicherweise nicht als typischer Bestandteil der Darmflora in marinen Shrimps in Aquakulturen beschrieben (Md Zoqratt *et al.* 2018, Yao *et al.* 2018). Die beobachtete hohe Abundanz an *Enterobacteriaceae* in der Studie von Lalitha und Serndran wurde mit der Verwendung von Kuh-Gülle als Düngung der Aquakultur begründet, die in Indien zu diesem Zeitpunkt angewendet wurde.

In den Ergebnissen meiner Studie zeigte sich eine solche Anreicherung an *Enterobacteriaceae* nicht. Daher wurde diese Praktik der Düngung vermutlich nicht in den entsprechenden Aquakulturen eingesetzt. Auch hat keiner der interviewten Farmer eine solche Düngung für seine Teiche beschrieben.

Eine weitere potentiell pathogene Gruppe, die ebenfalls als Maß für die Wasserqualität herangezogen wird, stellen *Legionellaceae* dar (Pierre *et al.* 2019).

In den Ergebnissen meiner Studie zeigte sich, dass *Legionellaceae* mit bis zu 1% in Geweben von Fischen vertreten waren. Diese Anreicherung auf das 50-fache der üblicherweise in Küstenwasser detektierten Abundanz könnte an der möglichen Verwendung von Fischmehlhaltigen Futtern liegen. So zeigte eine Studie von Estruch *et al.* (2015), dass durch die Verwendung von Fischmehl *Legionellaceae* stärker im Magen-Darm-Trakt von Fischen auftreten können, als im Vergleich zu Tieren, die Futter mit pflanzlichen Proteinen erhielten. Diese Übereinstimmung zu den Ergebnissen meiner Studie kann jedoch anhand der Interview-Daten nicht genau belegt werden, da die Farmer keine Informationen über die verwendeten Futtermittel bereitstellten.

4.11 *Vibrio* als Teil eines bakteriellen Netzwerkes in Aquakulturen

Die Untersuchungen der *Co-Occurrence*-Netzwerkanalyse zeigten, dass *Vibrio* Teil eines bakteriellen Netzwerkes war, in dem die einzelnen Mitglieder positiv untereinander korrelierten. Diese stabile Gruppenbildung war unabhängig vom untersuchten System und Material, wobei Unterschiede in der Größe und Zusammensetzung der Gruppen zwischen Wasser und Sediment sowie küstenähnlichen Proben und Aquakultur auftraten.

Dabei waren diese Netzwerke sowohl im Sediment als auch im Wasser von Aquakulturen stärker ausgeprägt. Fan *et al.* (2017) erklärten die unterschiedlich starke Gruppenbildung in Sediment-Netzwerken mit der Dynamik von bakteriellen Gemeinschaften. So wiesen dynamische Gemeinschaften, in denen viele verschiedene Taxa ohne gemeinsames Vorkommen in den Probestandorten charakterisiert waren, eine geringere Verbundenheit der Netzwerke auf. Daher ist es möglich, dass die Aquakulturen, die in meiner Studie untersucht wurden, sich in Bezug auf das gemeinsame Vorkommen der drei *Vibrio*-OTUs und ihren assoziierten Bakterien ähnlich verhielten, dementsprechend eher statischer Natur waren.

Dabei standen in den Aquakulturen die *Vibrio*-OTUs vor allem mit anderen heterotrophen, bakteriellen Gruppen in positiver Korrelation. Dazu zählten, neben weiteren Vibrionen, Photobakterien und Flavobakterien. Flavobakterien sind typische heterotroph lebende

Bakterien, die, wie *Vibrio*, dafür bekannt sind, ein großes Spektrum an komplexen organischen Substanzen abzubauen (Williams *et al.* 2012). Oft stehen diese Arten auch in engem Kontakt mit Fischen, und einige Arten wurden sogar als Fischpathogen beschrieben (Nematollahi *et al.* 2003). Dies trifft auch auf die mit den Vibrionen nahe verwandten Photobakterien zu (Fouz *et al.* 2000, Süß *et al.* 2008). *Photobacteriaceae* kann dabei einen Hauptteil der bakteriellen Gemeinschaft im Fischdarm ausmachen (Le Doujet *et al.* 2019). Allgemein zeigte sich in Studien, dass heterotrophe Bakterien den größten Anteil der in Aquakulturen vorkommenden Bakterien darstellen (Alfiansah *et al.* 2018, Lin *et al.* 2017). Alphaproteobakterien werden als typische Besiedler im marinen Seston angesehen, ähnlich wie es auch für Vibrionen und Flavobakterien der Fall ist (Bižić-Ionescu *et al.* 2015, Milici *et al.* 2017, Oberbeckmann *et al.* 2011a). Daher ist es möglich, dass diese Gruppen gemeinsam auf Seson vorkommen können. Die Korrelation zwischen den drei *Vibrio*-OTUs mit anderen heterotrophen Gruppen in den Ergebnissen meiner Promotion könnte ein Hinweis darauf sein, dass in den Aquakulturen hohe Konzentrationen an organischen Substanzen vorkamen, die durch das *Vibrio*-Netzwerk genutzt wurden. Für die Region Hainan wurde bereits gezeigt, dass die dortigen Aquakulturen durch hohe organische Belastung charakterisiert sein können (Herbeck *et al.* 2013).

Die wichtigsten negativen Korrelationen der drei *Vibrio*-OTU's in meinen Analysen stellten Planctomyceten und Mitglieder der *Alphaproteobacteria* dar. Planctomyceten stellen wie Alphaproteobakterien ebenfalls typische Besiedler im marinen Seston dar, ebenfalls ähnlich den Vibrionen und Flavobakterien (Bižić-Ionescu *et al.* 2015, Milici *et al.* 2017); (Oberbeckmann *et al.* 2011a). Es ist daher möglich, dass sowohl *Planctomycetes* und einige *Alphaproteobacteria* mit *Vibrio* in direkter Konkurrenz um Besiedlungsräume und Nährstoffe standen. Studien von Gossart *et al.* (2004) haben gezeigt, dass Seston, als nährstoffreiche Quelle, ein Ort starker antagonistischer Beziehungen ist. Dabei produzierten die im Seston vorkommenden Bakterien Substanzen, die inhibitorische Effekte auf andere Gruppen besaßen. Long und Azam (2001) konnten überdies zeigen, dass besonders aus Seston stammende *Vibrionales*-Isolate viele antagonistische Substanzen produzierten. Daher ist die in meiner Studie beobachtete negative Korrelation zwischen *Vibrio* / *Photobacterium* / *Flavobacterium* / *Alphaproteobacteria* gegenüber *Alphaproteobacteria* / *Planctomycetes* möglicherweise auf eine solche antagonistische Wechselbeziehung zurückzuführen.

Neben solchen Beziehungen ist es denkbar, dass die Netzwerke der Aquakulturen Ausdruck einer Sukzession waren, in der sich Veränderungen der bakteriellen Gemeinschaften über die Zeit widerspiegelten. Sombatjinda *et al.* (2011) konnten bereits zeigen, dass bakterielle Gemeinschaften in Aquakulturen sich im Laufe des Kultivierungsprozesses verändern. Die

Bestätigung einer solchen Aussage ist mit den Daten meiner Promotion als Momentaufnahme, wie sie das *Co-Occurrence*-Netzwerk darstellte, nicht möglich. Jedoch kann dies als Hinweis gesehen werden, der in zukünftigen Versuchen genauer untersucht werden sollte.

4.12 Verteilung opportunistischer Virulenz-Faktoren in *V. vulnificus*

Ein Teilaspekt meiner Promotion beschäftigte sich ebenfalls mit der Frage, inwieweit potentiell Humanpathogene durch anthropogene Faktoren angereichert werden können. Der Fokus lag dabei auf *V. vulnificus* als Hauptverursacher für Humaninfektionen im Ostseeraum (LAGuS M-V 2020). Obgleich *V. vulnificus* in den Sommerproben 2015 nachgewiesen wurde, indizierte das Fehlen der wichtigsten opportunistischen-Virulenz-Faktoren, dass es sich bei den Stämmen um vermeintlich geringer pathogene Formen handelte. In verschiedenen Studien wurde bereits aufgezeigt, dass aus der Umwelt gewonnene Stämme zwar Virulenz-Faktoren tragen können, diese jedoch seltener auftraten, als in klinischen Isolaten (Natividad-Bonifacio *et al.* 2013, Reynaud *et al.* 2013). Die Abwesenheit von Virulenz-Faktoren schließt dabei jedoch nicht aus, dass die isolierten Stämme Infektionen im Menschen hervorrufen könnten. So fehlten klinischen *V. vulnificus*-Stämmen in der Studie von (Reynaud *et al.* 2013) ebenfalls Virulenz-Faktoren.

Allgemein wird vermutet, dass alle *V. vulnificus*-Stämme, unabhängig ihren Ursprungs, pathogen sein können. Studien an Mäusen mit Stämmen aus klinischen sowie Umweltstämmen zeigten eine solche allgemeine Pathogenität (Starks *et al.* 2000). Das Vorhandensein spezifischer Virulenz-Faktoren verringert vermutlich nur die für eine tödliche Infektion erforderliche Dosis (Kim *et al.* 2008, Wright *et al.* 2001). Auch weisen Vibrionen, wie *V. vulnificus*, eine hohe genomische Plastizität auf, so dass Virulenz-Faktoren zwischen einzelnen Stämmen ausgetauscht werden können (Quirke *et al.* 2006). Dadurch könnten neue hoch virulente Stämme entstehen.

Neben dem Vorhandensein virulenter Eigenschaften spielt der Zustand des Wirtes vermutlich auch eine große Rolle. In 66% der registrierten Fälle an *V. vulnificus*-Infektionen in Deutschland sowie den USA wurden bei den betroffenen Personen spezifische Vorerkrankungen diagnostiziert, zu denen Immunschwächen, Diabetes, Leberschäden und/oder Gefäß- und Herzerkrankungen zählten (Dechet *et al.* 2008, LAGuS M-V 2020). Gesunde Menschen wurden hingegen selten infiziert. Auch waren in 2/3 der Fälle Männer betroffen. Der Grund dafür liegt in der protektiven Wirkung des weiblichen Geschlechtshormons Östrogen. In Rattenversuchen reduzierte Östrogen die Wirkung des konstitutiv in allen Stämmen gebildeten

Endotoxins von *V. vulnificus* (Merkel *et al.* 2001). Auf Grund dieser Beobachtung scheint es für eine Risikoabschätzung nicht zielführend zu sein, ausschließlich nach Virulenz-Faktoren in Umweltproben zu suchen. So haben jüngste Studien in der Nordsee aufgezeigt, dass in Wasserproben mit *V. vulnificus* in mehr als 90% der Proben alle untersuchten Viruelenz-Gene auftraten (Hackbusch *et al.* 2020). Daher scheint eine rechtzeitige Warnung von Risikogruppen beim Auftreten von hohen *Vibrio* spp.-Zellzahlen sinnvoller.

4.13 Zusammenfassung und Ausblick

Die Ergebnisse meiner Promotion zeigten, dass anthropogene Faktoren, spezifisch Aquakulturen und die Begünstigung invasiver Arten, das Potential besaßen, *Vibrio*-Küstengemeinschaften in Abundanz und Zusammensetzung zu beeinflussen. *N. melanostomus*, als Beispiel einer invasiven Art, erwies sich, neben der Präsenz einer mindestens 10-fach höheren *Vibrio*-Zellzahl im Vergleich zu umgebenden Wasser, Sediment, Seston und heimischen Fischen, auch als Träger der potentiell humanpathogenen Art *V. vulnificus*. Damit stellen invasive Arten nicht nur selbst einen starken Einflussfaktor für lokale Flora und Fauna dar, sondern können als Träger distinkter *Vibrio*-Gemeinschaften auch einen Einfluss auf *Vibrio*-Küstengemeinschaften ausüben. Speziell Bereiche mit hoher Abundanz an invasiven Arten könnten damit als Ausgangspunkt für die Verbreitung von *Vibrio*-Populationen bei steigenden Temperaturen in der Ostsee fungieren.

Der Einfluss von Aquakulturen auf *Vibrio*-Populationen konnte nur innerhalb der Aquakulturen selbst nachgewiesen werden. Dabei hatte die Art der Aquakultur maßgeblichen Einfluss. So verringerten semi-geschlossene und klassische Teichaquakulturen, die nicht im regelmäßigen Austausch mit der Küste standen, die *Vibrio*-Diversität und Abundanz. Hingegen zeigten kontinuierliche Aquakulturen eine Anreicherung des *Vibrio*-16S rRNS-Gens im Vergleich zur Küste auf.

Es ist zusammenfassend festzustellen, dass die durch den Menschen hervorgerufenen Umweltveränderungen konkrete Auswirkungen auf Vibrionen-Gemeinschaften in anthropogen beeinflussten Küstengemeinschaften haben und auch in Zukunft wohl haben werden.

In nachfolgenden Versuchen sollten die in dieser Promotion gewonnenen Erkenntnisse ausgebaut werden. Um die invasive Fischart *N. melanostomus* als potentiellen Träger und Ausgangsmaterial für humanpathogene *V. vulnificus* in der Ostsee zu bestätigen, könnte eine mögliche Korrelation zwischen dem Auftreten von *V. vulnificus*-Infektionen mit der Verteilung und zeitlichen Ausbreitung von *N. melanostomus* überprüft werden. Auch könnten *V. vulnificus*-Isolate, die von Infektions-Fällen der Ostsee stammen, mit aus der Grundel stammenden *V. vulnificus*-Isolate verglichen werden, um eine mögliche Verbindung aufzuzeigen. Da *N. melanostomus* seinen Ursprung im Schwarzen Meer hat, wäre es sinnvoll *V. vulnificus*-Stämme aus Tieren beider Regionen zu vergleichen. Dies könnte eine vergleichbare Verbindung zwischen invasiven Arten und pathogenen Vibrionen herstellen, wie

es für Südamerika und invasive Kopepoden bereits erfolgte (Martinez-Urtaza *et al.* 2008, Martinez-Urtaza *et al.* 2010).

Für weitere zukünftige Analysen in Hainan würde sich eine dauerhafte Beobachtung der *Vibrio*-Abundanzen in Küstengebieten anbieten. Obwohl in meiner Promotion kein Effekt von Aquakulturen auf umliegende Gebiete nachweisbar war, könnte sich dies in Zukunft ändern. Durch den Verlust der natürlichen Strukturen, wie vorgelagerte Mangroven-Wälder, den extremen Verlust an Seegras-Wiesen und den starken Ausbau der Aquakultur, könnte dies zu erhöhten *Vibrio*-Zellzahlen in diesem Gebiet führen (Herbeck *et al.* 2020, Thomsen *et al.* 2020). Gleichzeitig ist die Förderung potentieller Pathogene möglich, was, ähnlich wie es für Sri-Lanka bereits beobachtet wurde, den Einbruch der dortigen Aquakultur zur Folge haben könnte (Agnes *et al.* 1998, Corea 2019). Ein zukünftiges Monitoring von Pathogenen, sowohl von *Vibrio*-Arten, als auch weiteren Aquakultur-Pathogenen, könnte dabei helfen, einer solchen Entwicklung entgegenzuwirken.

Nach aktuellen Prognosen und Modellen, wird der anthropogene Einfluss auf die Erde weiter zunehmen. Unter Berücksichtigung der Ergebnisse meiner Promotion und der daraus gewonnenen Erkenntnis, dass Vibrionen durch anthropogene Faktoren beeinflusst werden, ergibt sich die Hypothese, dass *Vibrio* als bakterielle Gruppe und als wichtiger Pathogen in Küstengebieten an Bedeutung gewinnen wird. Dies wird Auswirkungen auf den Menschen haben, in Form von einem Anstieg an Infektionen, auch in Gebieten, die bisher weniger von diesen Pathogenen betroffen waren. Ebenso wird es zu finanziellen Beeinträchtigungen, unter anderem durch die Belastung des Gesundheitssystems und Verluste in der Aquakulturindustrie und Fischerei kommen. Doch auch für die Tierwelt wird der Anstieg an Vibrionen, speziell pathogener Arten, Konsequenzen haben. Die steigenden Meerestemperaturen, die speziell pathogenen *Vibrio*-Arten in ihrer Abundanz und Virulenz fördern, und auch die mögliche Verbreitung pathogener Vibrionen in die Umwelt durch die Freisetzung von Aquakulturabwässern, birgt ein verstärkendes Infektionsrisiko für Mensch und Tier. Dabei werden auch Korallen betroffen sein, da *Vibrio* ein wichtiger Korallenpathogen ist. Dies wird Korallenriffe zusätzlich zu den steigenden Meerestemperaturen belasten und könnte Korallenabsterben weiter beschleunigen.

Obwohl Vibrionen vermutlich in Zukunft an Bedeutung für Mensch und Umwelt gewinnen werden, stehen Vibrionen nur modellhaft für eine Vielzahl an potentiellen Pathogenen, die im Zuge des anthropogenen Wandels beeinflusst und gefördert werden können. Verschiedene Studien haben sich damit beschäftigt, wie sich menschliche Aktivitäten auf das Risiko und die Verbreitung von Krankheiten auswirken könnten (Lebarbenchon *et al.* 2008, Lindahl und Grace

2015). Dabei zeigte sich, dass die zukünftige Gefahr von Krankheiten sowohl für den Menschen, als auch für Tiere steigen könnte. Dabei wird vermutlich nicht nur das Auftreten von Krankheiten und deren schnelle Verbreitung zu Problemen führen, sondern auch immer häufiger auftretende Antibiotika-Resistenzen (WHO 2020b). In einer Studie von Peng *et al.* (2020) konnte gezeigt werden, dass im Houxi-Fluss (Xiamen, China), der sowohl durch rurale und urbane Bereiche charakterisiert war, ein direkter Zusammenhang zwischen Bevölkerungsdichte und dem Auftreten von Antibiotika-Resistenzen bestand. Gleichzeitig sind Resistenz-Gene persistent und verbleiben für lange Zeit in der Umwelt, auch wenn der Druck durch die Abwesenheit des Antibiotikums entfällt (Manson *et al.* 2004).

Es zeigt sich, dass ein Verständnis von Wechselwirkungen zwischen anthropogenen Veränderungen und potentiellen pathogenen Bakterien fundamental ist, um die zukünftige Entwicklung von anthropogen beeinflussten und genutzten Küstengebieten abschätzen zu können. Meine Promotion bildet damit einen Teil der Forschung, die sich mit dieser Herausforderung bisher beschäftigt hat.

5 Anhang

5.1 Referenzen

- Agnes C, Johnstone R, Jayasinghe J, Santhiago E, Kamburapola J (1998). Self-pollution: A major threat to the prawn farming industry in Sri Lanka. *Ambio* 27: 662-668.
- Al-Harbi AH, Uddin N (2005). Bacterial diversity of tilapia (*Oreochromis niloticus*) cultured in brackish water in Saudi Arabia. *Aquaculture* 250: 566-572.
- Alfiansah YR, Hassenrück C, Kunzmann A, Taslihan A, Harder J, Gärdes A (2018). Bacterial abundance and community composition in pond water from shrimp aquaculture systems with different stocking densities. *Front Microbiol* 9: 1-15.
- Alfiansah YR, Peters S, Harder J, Hassenrück C, Gärdes A (2020). Structure and co-occurrence patterns of bacterial communities associated with white faeces disease outbreaks in Pacific white-leg shrimp *Penaeus vannamei* aquaculture. *Sci Rep* 10: 1-13.
- Ali M, Nelson AR, Lopez AL, Sack DAJ Pntd (2015). Updated global burden of cholera in endemic countries. *PLoS Negl Trop Dis* 9: 1-13.
- Anderson MJ (2001). A new method for non-parametric multivariate analysis of variance. *Austral Ecol* 26: 32-46.
- Anderson MJ (2006). Distance-based tests for homogeneity of multivariate dispersions. *Biometrics* 62: 245-253.
- Angelidis P, Karagiannis D, Crump EMJ Doao (2006). Efficacy of a *Listonella anguillarum* (syn. *Vibrio anguillarum*) vaccine for juvenile sea bass *Dicentrarchus labrax*. *Dis Aquat Org* 71: 19-24.
- Asplund ME, Rehnstam-Holm A-S, Atnur V, Raghunath P, Saravanan V, Härnström K *et al.* (2011). Water column dynamics of *Vibrio* in relation to phytoplankton community composition and environmental conditions in a tropical coastal area. *Environ Microbiol* 13: 2738-2751.
- Aznar R, Ludwig W, Amann RI, Schleifer KH (1994). Sequence determination of rRNA Genes of pathogenic *Vibrio* species and whole-cell Identification of *Vibrio vulnificus* with rRNA-targeted oligonucleotide probes. *Int J Syst Evol Microbiol* 44: 330-337.
- Azour F, Deurs M, Behrens J, Carl H, Hüsey K, Greisen K *et al.* (2015). Invasion rate and population characteristics of the round goby *Neogobius melanostomus*: Effects of density and invasion history. *Aquat Biol* 24: 41-52.
- Baffone W, Citterio B, Vittoria E, Casaroli A, Campana R, Falzano L *et al.* (2003). Retention of virulence in viable but non-culturable halophilic *Vibrio* spp. *Int J Food Microbiol* 89: 31-39.
- Baker-Austin C, Trinanes JA, Taylor NG, Hartnell R, Siitonen A, Martinez-Urtaza J (2013). Emerging *Vibrio* risk at high latitudes in response to ocean warming. *Nat Clim Change* 3: 73.
- Baker-Austin C, Trinanes JA, Salmenlinna S, Löfdahl M, Siitonen A, Taylor NG *et al.* (2016). Heat wave-associated vibriosis, Sweden and Finland, 2014. *Emerging Infect Dis* 22: 1216-1220.

- Baker-Austin C, Trinanes J, Gonzalez-Escalona N, Martinez-Urtaza J (2017). Non-cholera vibrios: the microbial barometer of climate change. *Trends Microbiol* 25: 76-84.
- Baliao DD (2000). 'Water managment' in Baliao DD *Environment-friendly schemes in intensive shrimp farming* (Baliao DD). SEAFDEC (South East Asia Fisheries Development Centre) and ASEAN (Association of South East Asian Nations), Aquaculture Department: 12-13.
- Ben-Haim Y, Thompson F, Thompson C, Cnockaert M, Hoste B, Swings J *et al.* (2003). *Vibrio coralliilyticus* sp. nov., a temperature-dependent pathogen of the coral *Pocillopora damicornis*. *Int J Syst Evol Microbiol* 53: 309-315.
- Benneke CM, Pollehne F, Müller A, Hansen R, Kreikemeyer B, Labrenz M (2018). The distribution of phytoplankton in the Baltic Sea assessed by a prokaryotic 16S rRNA gene primer system. *J Plankton Res* 40: 244-254.
- Bibi F, Yasir M, Al-Sofyani A, Naseer MI, Azhar EI (2020). Antimicrobial activity of bacteria from marine sponge *Suberea mollis* and bioactive metabolites of *Vibrio* sp. EA348. *Saudi J Biol Sci* 27: 1139-1147.
- Bižić-Ionescu M, Zeder M, Ionescu D, Orlić S, Fuchs BM, Grossart H-P *et al.* (2015). Comparison of bacterial communities on limnic versus coastal marine particles reveals profound differences in colonization. *Environ Microbiol* 17: 3500-3514.
- Böer S, Hauk G, Duty O, Luden K, Heinemeyer E-A, Brennholt N (2012). Pathogenic *Vibrio* species in German coastal waters of the North Sea and the Baltic Sea—a comparison. *Pathogenic Vibrio spp in Northern European Waters, International Symposium, 31 May—1 June 2012 in Koblenz Koblenz: Bundesministerium für Verkehr, Bau und Stadtentwicklung, 2012: 1-36.*
- Böer SI, Heinemeyer E-A, Luden K, Erler R, Gerds G, Janssen F *et al.* (2013). Temporal and spatial distribution patterns of potentially pathogenic *Vibrio* spp. at recreational beaches of the German North Sea. *Microb Ecol* 65: 1052-1067.
- Boyd CE, Massaut LAE (1999). Risks associated with the use of chemicals in pond aquaculture. *Aquacult Eng* 20: 113-132.
- Brander LM, Van Beukering P, Cesar HSJ (2007). The recreational value of coral reefs: A meta-analysis. *Ecol Econ* 63: 209-218.
- Brasher CW, DePaola A, Jones DD, Bej AK (1998). Detection of microbial pathogens in shellfish with multiplex PCR. *Curr Microbiol* 37: 101-107.
- Brodersen KE, Koren K, Moßhammer M, Ralph PJ, Kühl M, Santner J (2017). Seagrass-mediated phosphorus and iron solubilization in tropical cediments. *Environ Sci Technol* 51: 14155-14163.
- Bruhn M, Schindler D, Kemter FS, Wiley MR, Chase K, Koroleva GI *et al.* (2018). Functionality of two origins of replication in *Vibrio cholerae* strains with a single chromosome. *Front Microbiol* 9: 2932.
- Bulleri F, Chapman MG (2010). The introduction of coastal infrastructure as a driver of change in marine environments. *J Appl Ecol* 47: 26-35.

- Camp EF, Suggett DJ, Gendron G, Jompa J, Manfrino C, Smith DJ (2016). Mangrove and seagrass beds provide different biogeochemical services for corals threatened by climate change. *Front Mar Sci* 3: 1-16.
- Cariton JT, Geller JB (1993). Ecological roulette: The global transport of nonindigenous marine organisms. *Science* 261: 78-82.
- Carlton J (1999). 'The scale and ecological consequences of biological invasions in the world's oceans.' in *Invasive Species and Biodiversity Management*. (Eds OT Sandlund, PJ Schei and Å. Viken.) Kluwer Academic Publishers: Dordrecht. pp. 195–212.
- Caron DA, Davis PG, Madin LP, Sieburth JM (1982). Heterotrophic bacteria and bacterivorous protozoa in oceanic macroaggregates. *Science* 218: 795-797.
- Cassat JE, Skaar EP (2013). Iron in infection and immunity. *Cell Host Microbe* 13: 509-519.
- CDC (1993). Centers for Disease Control and Prevention (CDC), *Vibrio vulnificus* infections associated with raw oyster consumption—Florida, 1981-1992. *Arch Dermatol* 129: 957-958.
- CDC (2020a). Center for Disease Control and Prevention, National enteric disease surveillance: *Shigella* annual report, 2016. *Center for Disease Control and Prevention (CDC)* <https://www.cdc.gov/nationalsurveillance/pdfs/LEDS-Shig-2016-REPORT-508.pdf> [Last accessed: 03.08.2020]: 1-18.
- CDC (2020b). Center for Disease Control and Prevention, National enteric disease surveillance: *Salmonella* annual report, 2016. *Center for Disease Control and Prevention (CDC)* <https://www.cdc.gov/nationalsurveillance/pdfs/2016-Salmonella-report-508.pdf> [Last accessed: 03.08.2020]: 1-86.
- CDC (2020c). Centers for Disease Control and Prevention, COVIS annual summaries on human *Vibrio* cases reported to CDC *Center for Disease Control and Prevention (CDC)* 17 case reports from 1997 - 2014, <https://www.cdc.gov/vibrio/surveillance.html> [Last accessed: 03.08.2020].
- Cesar H, Burke L, Pet-Soede L (2003). The economics of worldwide coral reef degradation. *Arnhem, Netherlands, Cesar environmental economics consulting (CEEC)*: 1-24.
- Chase E, Young S, Harwood VJ (2015). Sediment and vegetation as reservoirs of *Vibrio vulnificus* in the Tampa Bay estuary and Gulf of Mexico. *Appl Environ Microbiol* 81: 2489-2494.
- Chatzidaki-Livanis M, Hubbard MA, Gordon K, Harwood VJ, Wright AC (2006a). Genetic distinctions among clinical and environmental strains of *Vibrio vulnificus*. *Appl Environ Microbiol* 72: 6136-6141.
- Chatzidaki-Livanis M, Jones MK, Wright AC (2006b). Genetic variation in the *Vibrio vulnificus* group 1 capsular polysaccharide operon. *J Bacteriol* 188: 1987-1998.
- Chen C, Lai Z, Beardsley RC, Xu Q, Lin H, Viet NT (2012). Current separation and upwelling over the southeast shelf of Vietnam in the South China Sea. *J Geophys Res Oceans* 117: 1-16.
- Chiou C-S, Hsu S-Y, Chiu S-I, Wang T-K, Chao C-S (2000). *Vibrio parahaemolyticus* serovar O3:K6 as cause of unusually high incidence of food-borne disease outbreaks in Taiwan from 1996 to 1999. *J Clin Microbiol* 38: 4621-4625.

- Chotkowski MA, Marsden JE (1999). Round goby and mottled sculpin predation on lake trout eggs and fry: field predictions from laboratory experiments. *J Great Lakes Res* 25: 26-35.
- Chowdhury MA, Yamanaka H, Miyoshi S, Aziz KM, Shinoda S (1989). Ecology of *Vibrio mimicus* in aquatic environments. *Appl Environ Microbiol* 55: 2073-2078.
- Chung K-J, Cho E-J, Kim MK, Kim YR, Kim S-H, Yang H-Y *et al.* (2010). RtxA1-induced expression of the small GTPase Rac2 plays a key role in the pathogenicity of *Vibrio vulnificus*. *J Infect Dis* 201: 97-105.
- Cladera-Olivera F, Caron GR, Brandelli A (2004). Bacteriocin-like substance production by *Bacillus licheniformis* strain P40. *Lett Appl Microbiol* 38: 251-256.
- Claireaux G, Webber D, Kerr S, Boutilier R (1995). Physiology and behaviour of free-swimming Atlantic cod (*Gadus morhua*) facing fluctuating temperature conditions. *J Exp Biol* 198: 49-60.
- Cook DW, Bowers JC, DePaola A (2002). Density of total and pathogenic (tdh+) *Vibrio parahaemolyticus* in Atlantic and Gulf coast molluscan shellfish at harvest. *J Food Prot* 65: 1873-1880.
- Cooper SR, Brush GS (1993). A 2,500-year history of anoxia and eutrophication in Chesapeake Bay. *Estuaries* 16: 617-626.
- Córdova JL, Astorga J, Silva W, Riquelme C (2002). Characterization by PCR of *Vibrio parahaemolyticus* isolates collected during the 1997-1998 Chilean outbreak. *Biol Res* 35: 433-440.
- Corea ASLE (2019). Reviewing effluent and estuarine water quality in view of introducing effluent standards for coastal aquaculture in Sri Lanka. *J Environ Prof Sri Lanka* 8: 1-26.
- Costello MJ, Chaudhary C (2017). Marine biodiversity, biogeography, deep-sea gradients, and conservation. *Curr Biol* 27: R511-R527.
- Criminger J, Hazen T, Sobecky P, Lovell C (2007). Nitrogen fixation by *Vibrio parahaemolyticus* and its implications for a new ecological niche. *Appl Environ Microbiol* 73: 5959-5961.
- Crosbie PB, Nowak BF (2004). Immune responses of barramundi, *Lates calcarifer* (Bloch), after administration of an experimental *Vibrio harveyi* bacterin by intraperitoneal injection, anal intubation and immersion. *J Fish Dis* 27: 623-632.
- Crump BC, Koch EW (2008). Attached bacterial populations shared by four species of aquatic angiosperms. *Appl Environ Microbiol* 74: 5948-5957.
- Daniels NA, MacKinnon L, Bishop R, Altekruise S, Ray B, Hammond RM *et al.* (2000). *Vibrio parahaemolyticus* infections in the United States, 1973–1998. *J Infect Dis* 181: 1661-1666.
- Davidovits P (2018). 'Buoyancy of Fish' in *Physics in biology and medicin, Third Edition* (Davidovits, Paul). Academic press.
- Davis B, Fanning G, Madden J, Steigerwalt A, Bradford H, Smith H *et al.* (1981). Characterization of biochemically atypical *Vibrio cholerae* strains and designation of a new pathogenic species, *Vibrio mimicus*. *J Clin Microbiol* 14: 631-639.
- Dechet AM, Yu PA, Koram N, Painter J (2008). Nonfoodborne *Vibrio* infections: An important cause of morbidity and mortality in the United States, 1997–2006. *Clin Infect Dis* 46: 970-976.

- DePaola A, Capers GM, Alexander D (1994). Densities of *Vibrio vulnificus* in the intestines of fish from the U.S. Gulf Coast. *Appl Environ Microbiol* 60: 984-988.
- DePaola A, Nordstrom JL, Bowers JC, Wells JG, Cook DW (2003). Seasonal abundance of total and pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in Alabama oysters. *Appl Environ Microbiol* 69: 1521-1526.
- Diggles BK, Carson J, Hine PM, Hickman RW, Tait MJ (2000). *Vibrio* species associated with mortalities in hatchery-reared turbot (*Colistium nudipinnis*) and brill (*C. guntheri*) in New Zealand. *Aquaculture* 183: 1-12.
- Dinno A (2017). conover.test: Conover-Iman Test of Multiple Comparisons Using Rank Sums. R package version 1.1.5., <https://CRAN.R-project.org/package=conover.test>.
- Diseases SCoEIF (2011). Food poisoning associated with *Vibrio parahaemolyticus* in Hong Kong—current situation and recommendations. *Centre for Health Protection, Hong Kong SAR*.
- Dryselius R, Kurokawa K, Iida T (2007). *Vibrionaceae*, a versatile bacterial family with evolutionarily conserved variability. *Res Microbiol* 158: 479-486.
- Dukes JS, Mooney HA (1999). Does global change increase the success of biological invaders? *Trends Ecol Evol* 14: 135-139.
- Dunn IG (1967). Diurnal fluctuations of physicochemical conditions in a shallow tropical pond. *Limnol Oceanogr* 12: 151-154.
- ECDC (2020). European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC), Cholera annual epidemiological report for 2018. *European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC)* <https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/cholera-annual-epidemiological-report-2018.pdf> [Last accessed: 03.08.2020]: 1-3.
- EEA (2019). European Environment Agency (EEA), Annual average sea surface temperature anomaly <https://www.eea.europa.eu/data-and-maps/daviz/annual-average-sea-surface-temperature-6#tab-based-on-external-data>, [Last accessed: 03.08.2020].
- Egerton S, Culloty S, Whooley J, Stanton C, Ross RP (2018). The gut microbiota of marine fish. *Front Microbiol* 9: 1-17.
- Eiler A, Bertilsson S (2006). Detection and quantification of *Vibrio* populations using denaturant gradient gel electrophoresis. *J Microbiol Methods* 67: 339-348.
- Eiler A, Johansson M, Bertilsson S (2006). Environmental influences on *Vibrio* populations in northern temperate and boreal coastal waters (Baltic and Skagerrak Seas). *Appl Environ Microbiol* 72: 6004-6011.
- Erler R, Wichels A, Heinemeyer E-A, Hauk G, Hippelein M, Reyes NT *et al.* (2015). VibrioBase: a MALDI-TOF MS database for fast identification of *Vibrio* spp. that are potentially pathogenic in humans. *Syst Appl Microbiol* 38: 16-25.
- Esteve-Gassent MD, Fouz B, Amaro C (2004). Efficacy of a bivalent vaccine against eel diseases caused by *Vibrio vulnificus* after its administration by four different routes. *Fish Shellfish Immunol* 16: 93-105.

- Estruch G, Collado MC, Peñaranda DS, Tomás Vidal A, Jover Cerdá M, Pérez Martínez G *et al.* (2015). Impact of dishmeal replacement in diets for gilthead sea bream (*Sparus aurata*) on the gastrointestinal microbiota determined by pyrosequencing the 16S rRNA gene. *PLoS one* 10: 1-22.
- Fan J, Chen L, Mai G, Zhang H, Yang J, Deng D *et al.* (2019). Dynamics of the gut microbiota in developmental stages of *Litopenaeus vannamei* reveal its association with body weight. *Sci Rep* 9: 1-10.
- Fan K, Cardona C, Li Y, Shi Y, Xiang X, Shen C *et al.* (2017). Rhizosphere-associated bacterial network structure and spatial distribution differ significantly from bulk soil in wheat crop fields. *Soil Biology & Biochemistry* 113: 275-284.
- Farmer Iii J, Hickman-Brenner F (2006). 'The genera *Vibrio* and *Photobacterium*' in *The Prokaryotes*, Third Edition, Vol. 6 (Eds Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer K-H & Stackebrandt E). Springer, New York. pp pp. 508-563.
- Fouz B, Toranzo A, Milan M, Amaro C (2000). Evidence that water transmits the disease caused by the fish pathogen *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*. *J Appl Microbiol* 88: 531-535.
- Gautier D, Amador J, Newmark F (2001). The use of mangrove wetland as a biofilter to treat shrimp pond effluents: preliminary results of an experiment on the Caribbean coast of Colombia. *Aquacult Res* 32: 787-799.
- Ghabooli S, Zhan A, Paolucci E, Hernandez MR, Briski E, Cristescu ME *et al.* (2016). Population attenuation in zooplankton communities during transoceanic transfer in ballast water. *Ecol Evol* 6: 6170-6177.
- Givens C, Bowers J, DePaola A, Hollibaugh J, Jones J (2014). Occurrence and distribution of *Vibrio vulnificus* and *Vibrio parahaemolyticus*—potential roles for fish, oyster, sediment and water. *Lett Appl Microbiol* 58: 503-510.
- Gollasch S (2006). Overview on introduced aquatic species in European navigational and adjacent waters. *Helgol Mar Res* 60: 84-89.
- Gomez-Gil B, C. Thompson C, Matsumura Y, Sawabe T, Iida T, Christen R *et al.* (2013). 'The Family Vibrionaceae - Taxonomy, Historical and Current' in *The Prokaryotes, Fourth edition* (Eds Rosenberg E, DeLong EF, Lory S, Stackebrandt E, Thompson F). Springer, New York.
- González-Escalona N, Cachicas V, Acevedo C, Rioseco ML, Vergara JA, Cabello F *et al.* (2005). *Vibrio parahaemolyticus* diarrhea, Chile, 1998 and 2004. *Emerg Infect Dis* 11: 129-131.
- Gonzalez DJ, Gonzalez RA, Froelich BA, Oliver JD, Noble RT, McGlathery KJ (2014). Non-native macroalga may increase concentrations of *Vibrio* bacteria on intertidal mudflats. *Mar Ecol Prog Ser* 505: 29-36.
- Grasshoff K, Kremling K, Ehrhardt M (2009). *Methods of seawater analysis*. John Wiley & Sons.
- Grave K, Markestad A, Bangen M (1996). Comparison in prescribing patterns of antibacterial drugs in salmonid farming in Norway during the periods 1980-1988 and 1989-1994. *J Vet Pharmacol Ther* 19: 184-191.

- Grave K, Lingaas E, Bangen M, Rønning M (1999). Surveillance of the overall consumption of antibacterial drugs in humans, domestic animals and farmed fish in Norway in 1992 and 1996. *J Antimicrob Chemother* 43: 243-252.
- Grossart H-P, Schlingloff A, Bernhard M, Simon M, Brinkhoff T (2004). Antagonistic activity of bacteria isolated from organic aggregates of the German Wadden Sea. *FEMS Microbiol Ecol* 47: 387-396.
- Gu Z, Eils R, Schlesner M (2016). Complex heatmaps reveal patterns and correlations in multidimensional genomic data. *Bioinformatics* 32: 2847-2849.
- Gyraite G, Katarzyte M, Schernewski G (2019). First findings of potentially human pathogenic bacteria *Vibrio* in the south-eastern Baltic Sea coastal and transitional bathing waters. *Mar Pollut Bull* 149: 1-9.
- Hackbusch S, Wichels A, Gimenez L, Döpke H, Gerdts G (2020). Potentially human pathogenic *Vibrio* spp. in a coastal transect: Occurrence and multiple virulence factors. *Sci Total Environ* 707: 1-14.
- Hahn DR (2003). Alteration of microbial community composition and changes in decomposition associated with an invasive intertidal macrophyte. *Biol Invasions* 5: 45-51.
- Haldar S, Maharajan A, Chatterjee S, Hunter S, Chowdhury N, Hinenoya A *et al.* (2010). Identification of *Vibrio harveyi* as a causative bacterium for a tail rot disease of sea bream *Sparus aurata* from research hatchery in Malta. *Microbiol Res* 165: 639-648.
- Hall RH, Khambaty FM, Kothary MH, Keasler SP, Tall BD (1994). *Vibrio cholerae* non-O1 serogroup associated with cholera gravis genetically and physiologically resembles O1 E1 Tor cholera strains. *Infect Immun* 62: 3859-3863.
- Hamamoto T, Takata N, Kudo T, Horikoshi K (1994). Effect of temperature and growth phase on fatty acid composition of the psychrophilic *Vibrio* sp. strain no. 5710. *FEMS Microbiol Lett* 119: 77-81.
- Hamilton S (2013). Assessing the role of commercial aquaculture in displacing mangrove forest. *Bull Mar Sci* 89: 585-601.
- Han F, Pu S, Hou A, Ge B (2009). Characterization of clinical and environmental types of *Vibrio vulnificus* isolates from Louisiana oysters. *Foodborne Pathog Dis* 6: 1251-1258.
- Handler J, Carson J, Donachie L, Gabor L, Taylor D (2005). 'Bacterial infection in tasmanian farmed abalone: causes, pathology, farm factors and vontrol options' in *Diseases in Asian Aquaculture V* (Eds Walker, P., Lester, R., Bondad-Reantaso, M.G.) Asian Fisheries Society, Manila edn. Asian Fisheries Society, Manila.
- Hauk G, Duty O (2015). Vibrionen in der Ostsee - wann und für wen besteht eine Gesundheitsgefahr. Landesamt für Gesundheit und Soziales. BVÖGD-Kongress, Rostock, 23. April 2015. http://bvoegdkonrh-kundede/wp-content/uploads/sites/7/2015/05/Vibrio_BV%C3%96GD-Kongress-2015-Rostock-Gerhard-Haukpdf [Last accessed: 20.06.2016].
- Hazen TH, Pan L, Gu J-D, Sobecky PA (2010). The contribution of mobile genetic elements to the evolution and ecology of *Vibrios*. *FEMS Microbiol Ecol* 74: 485-499.

- HELCOM (2009). Helsinki Commission (HELCOM) List of non-indigenous and cryptogenic species in the Balti Sea http://archive.iwlearn.net/helcom.fi/stc/files/shipping/Table_1_%20Alienspecies_lists_%202009.pdf [Last accessed 24.07.2020].
- HELCOM (2018a). 'Non-indigenous species' in *State of the Baltic Sea report – Second HELCOM holistic assessment 2011–2016*: 81-83.
- HELCOM (2018b). 'Climate and hydrology' in *State of the Baltic Sea report – Second HELCOM holistic assessment 2011–2016*: 14-18
- Hempel M, Thiel R (2013). First records of the round goby *Neogobius melanostomus* (Pallas, 1814) in the Elbe River, Germany. *BiolInvasions Rec* 2: 291-295.
- Herbeck LS, Unger D, Wu Y, Jennerjahn TC (2013). Effluent, nutrient and organic matter export from shrimp and fish ponds causing eutrophication in coastal and back-reef waters of NE Hainan, tropical China. *Cont Shelf Res* 57: 92-104.
- Herbeck LS, Sollich M, Unger D, Holmer M, Jennerjahn TC (2014). Impact of pond aquaculture effluents on seagrass performance in NE Hainan, tropical China. *Mar Pollut Bull* 85: 190-203.
- Herbeck LS, Krumme U, Andersen TJ, Jennerjahn TC (2020). Decadal trends in mangrove and pond aquaculture cover on Hainan (China) since 1966: mangrove loss, fragmentation and associated biogeochemical changes. *Estuar Coast Shelf Sci* 233: 1-47.
- Herlemann DP, Labrenz M, Jürgens K, Bertilsson S, Waniek JJ, Andersson AF (2011). Transitions in bacterial communities along the 2000 km salinity gradient of the Baltic Sea. *ISME J* 5: 1571-1579.
- Hishamunda N, Subasinghe RP (2003). 'Structure and organization of the industry' in *Aquaculture development in China: the role of public sector policies (No. 427)*. <http://www.fao.org/3/y4762e/y4762e04.htm> [Last accessed: 04.08.2020]. Food & Agriculture Organization of the United Nations (FAO): Rome.
- Hlady WG, Klontz KC (1996). The epidemiology of *Vibrio* infections in Florida, 1981–1993. *J Infect Dis* 173: 1176-1183.
- Holmgren J (1981). Actions of cholera toxin and the prevention and treatment of cholera. *Nature* 292: 413-417.
- Huang K-C, Weng H-H, Yang T-Y, Chang T-S, Huang T-W, Lee MS (2016). Distribution of fatal *Vibrio vulnificus* necrotizing skin and soft-tissue infections: a systematic review and meta-analysis. *Medicine (Baltimore)* 95: 1-8.
- Huehn S, Eichhorn C, Urmersbach S, Breidenbach J, Bechlars S, Bier N *et al.* (2014). Pathogenic vibrios in environmental, seafood and clinical sources in Germany. *Int J Med Microbiol* 304: 843-850.
- Hunt DE, Gevers D, Vahora NM, Polz MF (2008). Conservation of the chitin utilization pathway in the *Vibrionaceae*. *Appl Environ Microbiol* 74: 44-51.
- Inoue Y, Ono T, Matsui T, Miyasaka J, Kinoshita Y, Ihn H (2008). Epidemiological survey of *Vibrio vulnificus* infection in Japan between 1999 and 2003. *J Dermatol* 35: 129-139.

- Jahangir Alam M, Tomochika K-I, Miyoshi S-I, Shinoda S (2002). Environmental investigation of potentially pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in the Seto-Inland Sea, Japan. *FEMS Microbiol Lett* 208: 83-87.
- Jayasree L, Janakiram P, Madhavi R (2006). Characterization of *Vibrio* spp. associated with diseased shrimp from culture ponds of Andhra Pradesh (India). *J World Aquacult Soc* 37: 523-532.
- Jeuniaux C, Voss-Foucart MF (1991). Chitin biomass and production in the marine environment. *Biochem Syst Ecol* 19: 347-356.
- Jiang Y-F, Ling J, Wang Y-S, Chen B, Zhang Y-Y, Dong J-D (2015). Cultivation-dependent analysis of the microbial diversity associated with the seagrass meadows in Xincun Bay, South China Sea. *Ecotoxicology* 24: 1540-1547.
- Johnson CN, Flowers AR, Noriega NF, Zimmerman AM, Bowers JC, DePaola A *et al.* (2010). Relationships between environmental factors and pathogenic *Vibrios* in the northern Gulf of Mexico. *Appl Environ Microbiol* 76: 7076.
- Johnson EE, Wessling-Resnick M (2012). Iron metabolism and the innate immune response to infection. *Microb Infect* 14: 207-216.
- Jones MK, Warner E, Oliver JD (2008). Survival of and in situ gene expression by *Vibrio vulnificus* at varying salinities in estuarine environments. *Appl Environ Microbiol* 74: 182-187.
- Jose PA, Sivakala KK, Jebakumar SRD (2014). Molecular phylogeny and plant growth promoting traits of endophytic bacteria isolated from roots of seagrass *Cymodocea serrulata*. *Indian J Geomarine Sci* 43: 571-579.
- Kanazawa A, Teshima S-I, Ono K (1979). Relationship between essential fatty acid requirements of aquatic animals and the capacity for bioconversion of linolenic acid to highly unsaturated fatty acids. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry* 63: 295-298.
- Kaneko T, Colwell RR (1973). Ecology of *Vibrio parahaemolyticus* in Chesapeake Bay. *J Bacteriol* 113: 24-32.
- Karunasagar I, Pai R, Malathi GR, Karunasagar I (1994). Mass mortality of *Penaeus monodon* larvae due to antibiotic-resistant *Vibrio harveyi* infection. *Aquaculture* 128: 203-209.
- Kaspar Ca, Tamplin M (1993). Effects of temperature and salinity on the survival of *Vibrio vulnificus* in seawater and shellfish. *Appl Environ Microbiol* 59: 2425-2429.
- Kelly MT (1982). Effect of temperature and salinity on *Vibrio (Benecke) vulnificus* occurrence in a Gulf Coast environment. *Appl Environ Microbiol* 44: 820-824.
- Khan AA, Siddiqui AQ, Nazir M (1970). Diurnal variations in a shallow tropical freshwater fish pond in Shahjahanpur, U.P. (India). *Hydrobiologia* 35: 297-304.
- Kim YR, Rhee JH (2003). Flagellar basal body flg operon as a virulence determinant of *Vibrio vulnificus*. *Biochem Biophys Res Commun* 304: 405-410.

- Kim CM, Park RY, Park JH, Sun HY, Bai YH, Ryu PY *et al.* (2006). *Vibrio vulnificus* vulnibactin, but not metalloprotease VvpE, is essentially required for iron-uptake from human holotransferrin. *Biol Pharm Bull* 29: 911-918.
- Kim YR, Lee SE, Kook H, Yeom JA, Na HS, Kim SY *et al.* (2008). *Vibrio vulnificus* RTX toxin kills host cells only after contact of the bacteria with host cells. *Cell Microbiol* 10: 848-862.
- Kimes NE, Grim CJ, Johnson WR, Hasan NA, Tall BD, Kothary MH *et al.* (2012). Temperature regulation of virulence factors in the pathogen *Vibrio coralliilyticus*. *ISME J* 6: 835-846.
- Kirchberger PC, Turnsek M, Hunt DE, Haley BJ, Colwell RR, Polz MF *et al.* (2014). *Vibrio metoecus* sp. nov., a close relative of *Vibrio cholerae* isolated from coastal brackish ponds and clinical specimens. *Int J Syst Evol Microbiol* 64: 3208-3214.
- Kirschner AKT, Schauer S, Steinberger B, Wilhartitz I, Grim CJ, Huq A *et al.* (2011). Interaction of *Vibrio cholerae* non-O1/non-O139 with copepods, cladocerans and competing bacteria in the large alkaline lake Neusiedler See, Austria. *Microb Ecol* 61: 496-506.
- Kita-Tsukamoto K, Oyaizu H, Nanba K, Simidu U (1993). Phylogenetic relationships of marine bacteria, mainly members of the family *Vibrionaceae*, determined on the basis of 16S rRNA sequences. *Int J Syst Evol Microbiol* 43: 8-19.
- Kotta J, Nurkse K, Puntila R, Ojaveer H (2016). Shipping and natural environmental conditions determine the distribution of the invasive non-indigenous round goby *Neogobius melanostomus* in a regional sea. *Estuar Coast Shelf Sci* 169: 15-24.
- Kozich JJ, Westcott SL, Baxter NT, Highlander SK, Schloss PD (2013). Development of a dual-index sequencing strategy and curation pipeline for analyzing amplicon sequence data on the MiSeq Illumina sequencing platform. *Appl Environ Microbiol* 79: 5112-5120.
- Krumme U, Herbeck LS, Wang T (2012). Tide-and rainfall-induced variations of physical and chemical parameters in a mangrove-depleted estuary of East Hainan (South China Sea). *Mar Environ Res* 82: 28-39.
- Kumazawa NH, Kato E (1985). Survival of Kanagawa-positive strains of *Vibrio parahaemolyticus* in a brackish-water area. *J Hyg, Camb* 95: 299-307.
- Kurtz ZD, Müller CL, Miraldi ER, Littman DR, Blaser MJ, Bonneau RA (2015). Sparse and compositionally robust inference of microbial ecological networks. *PLoS Comp Biol* 11: 1-25.
- Kutty M (1987). 'Temperature' in *Site selection for aquaculture: physical features of water*, Lectures presented at ARAC for the Senior Aquaculturists course, *Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO)* <http://www.fao.org/3/AC174E/AC174E02.htm> [Last accessed: 04.08.2020].
- LAGuS M-V L (2020). Falldaten über *Vibrio*-Infektionen im Ostsee-Raum ermittelt durch das Landesamt für Gesundheit und Soziales Mecklenburg-Vorpommern (LAGuS M-V), Daten nicht öffentlich.
- Lalitha KV, Surendran PK (2004). Bacterial microflora associated with farmed freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* (de Man) and the aquaculture environment. *Aquac Res* 35: 629-635.

- Lamb JB, van de Water JAJM, Bourne DG, Altier C, Hein MY, Fiorenza EA *et al.* (2017). Seagrass ecosystems reduce exposure to bacterial pathogens of humans, fishes, and invertebrates. *Science* 355: 731-733.
- Lavilla-Pitogo CR, Leaño EM, Paner MG (1998). Mortalities of pond-cultured juvenile shrimp, *Penaeus monodon*, associated with dominance of luminescent vibrios in the rearing environment. *Aquaculture* 164: 337-349.
- Le Doujet T, De Santi C, Klemetsen T, Hjerde E, Willassen N-P, Haugen P (2019). Closely-related *Photobacterium* strains comprise the majority of bacteria in the gut of migrating Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Microbiome* 7: 1-12.
- Lebarbenchon C, Brown SP, Poulin R, Gauthier-Clerc M, Thomas F (2008). Evolution of pathogens in a man-made world. *Mol Ecol* 17: 475-484.
- Lee JH, Kim MW, Kim BS, Kim SM, Lee BC, Kim TS *et al.* (2007). Identification and characterization of the *Vibrio vulnificus* rtxA essential for cytotoxicity in vitro and virulence in mice. *J Microbiol* 45: 146-152.
- Lee KK, Yu SR, Yang TI, Liu PC, Chen FR (1996). Isolation and characterization of *Vibrio alginolyticus* isolated from diseased kuruma prawn, *Penaeus japonicus*. *Lett Appl Microbiol* 22: 111-114.
- Leppäkoski E, Olenin S (1999). 'Xenodiversity of the European brackish water seas: The North American contribution' in Marine Bioinvasions, Proceedings of the First National Conference. 1999, January 24-27, 1999. Massachusetts Institute of Technology (Ed Pederson J) 107-119.
- Leppäkoski E, Olenin S (2000). Non-native species and rates of spread: lessons from the brackish Baltic Sea. *Biol Invasions* 2: 151-163.
- Leuven RS, van der Velde G, Baijens I, Snijders J, van der Zwart C, Lenders HR *et al.* (2009). The river Rhine: a global highway for dispersal of aquatic invasive species. *Biol Invasions* 11: 1989-2008.
- Li B, Liu J, Zhou S, Fu L, Yao P, Chen L *et al.* (2020). Vertical variation in *Vibrio* community composition in Sansha Yongle Blue Hole and its ability to degrade macromolecules. *Mar Life Sci Technol* 2: 60-72.
- Li T, Long M, Gatesoupe F-J, Zhang Q, Li A, Gong X (2015). Comparative analysis of the intestinal bacterial communities in different species of carp by pyrosequencing. *Microb Ecol* 69: 25-36.
- Li X, Zhou L, Yu Y, Ni J, Xu W, Yan Q (2017). Composition of gut microbiota in the gibel carp (*Carassius auratus gibelio*) varies with host development. *Microb Ecol* 74: 239-249.
- Liang J, Liu J, Wang X, Lin H, Liu J, Zhou S *et al.* (2019). Spatiotemporal dynamics of free-living and particle-associated *Vibrio* communities in the northern Chinese marginal seas. *Appl Environ Microbiol* 85: 1-16.
- Lillehaug A, Lunestad B, Grave K (2003). Epidemiology of bacterial diseases in Norwegian aquaculture a description based on antibiotic prescription data for the ten-year period 1991 to 2000. *Dis Aquat Organ* 53: 115-125.
- Lin G, Sun F, Wang C, Zhang L, Zhang X (2017). Assessment of the effect of *Enteromorpha prolifera* on bacterial community structures in aquaculture environment. *PloS one* 12: 1-15.

- Lin W, Fullner KJ, Clayton R, Sexton JA, Rogers MB, Calia KE *et al.* (1999). Identification of a *Vibrio cholerae* RTX toxin gene cluster that is tightly linked to the cholera toxin prophage. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 1071-1076.
- Lindahl JF, Grace D (2015). The consequences of human actions on risks for infectious diseases: a review. *Infect Ecol Epidemiol* 5: 30048-30048.
- Liu P-C, Lin J-Y, Hsiao P-T, Lee K-K (2004). Isolation and characterization of pathogenic *Vibrio alginolyticus* from diseased cobia *Rachycentron canadum*. *J Basic Microbiol* 44: 23-28.
- Liu S, Jiang Z, Deng Y, Wu Y, Zhang J, Zhao C *et al.* (2018). Effects of nutrient loading on sediment bacterial and pathogen communities within seagrass meadows. *e00600* 7: 1-11.
- Long RA, Azam F (2001). Antagonistic interactions among marine pelagic bacteria. *Appl Environ Microbiol* 67: 4975-4983.
- Longepierre S, Robert A, Levi F, Francour P (2005). How an invasive alga species (*Caulerpa taxifolia*) induces changes in foraging strategies of the benthivorous fish *Mullus surmuletus* in coastal Mediterranean ecosystems. *Biodivers Conserv* 14: 365-376.
- Ludwig W, Strunk O, Westram R, Richter L, Meier H, Yadhukumar *et al.* (2004). ARB: a software environment for sequence data. *Nucleic Acids Res* 32: 1363-1371.
- Majumdar PR, Sarker BS, Dey SC, Saha D, Adhikary RK, Mondal S (2014). Bacterial hazards especially pathogenic to human in consumable marine fishes of Noakhali Sadar, Bangladesh. *Am J Food Technol* 9: 257-265.
- Makino K, Oshima K, Kurokawa K, Yokoyama K, Uda T, Tagomori K *et al.* (2003). Genome sequence of *Vibrio parahaemolyticus*: a pathogenic mechanism distinct from that of *V cholerae*. *Lancet* 361: 743-749.
- Manson JM, Smith JM, Cook GMJA (2004). Persistence of vancomycin-resistant enterococci in New Zealand broilers after discontinuation of avoparcin use. *Appl Environ Microbiol* 70: 5764-5768.
- Manzari C, Fosso B, Marzano M, Annese A, Caprioli R, D'Erchia AM *et al.* (2015). The influence of invasive jellyfish blooms on the aquatic microbiome in a coastal lagoon (Varano, SE Italy) detected by an Illumina-based deep sequencing strategy. *Biol Invasions* 17: 923-940.
- Martinez-Urtaza J, Huapaya B, Gavilan RG, Blanco-Abad V, Ansedo-Bermejo J, Cadarso-Suarez C *et al.* (2008). Emergence of asiatic *Vibrio* diseases in South America in phase with El Niño. *Epidemiology* 19: 829-837.
- Martinez-Urtaza J, Bowers JC, Trinanes J, DePaola A (2010). Climate anomalies and the increasing risk of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* illnesses. *Food Res Int* 43: 1780-1790.
- Martins P, Cleary DFR, Pires ACC, Rodrigues AM, Quintino V, Calado R *et al.* (2013). Molecular analysis of bacterial communities and detection of potential pathogens in a recirculating aquaculture system for *Scophthalmus maximus* and *Solea senegalensis*. *PLoS one* 8: 1-17.
- Marzinelli EM, Qiu Z, Dafforn KA, Johnston EL, Steinberg PD, Mayer-Pinto M (2018). Coastal urbanisation affects microbial communities on a dominant marine holobiont. *NPJ Biofilms Microbiomes* 4: 1-7.

- Matteucci G, Schippa S, Di Lallo G, Migliore L, Thaller MC (2015). Species diversity, spatial distribution, and virulence associated genes of culturable vibrios in a brackish coastal Mediterranean environment. *Ann Microbiol* 65: 2311-2321.
- Matz C, McDougald D, Moreno AM, Yung PY, Yildiz FH, Kjelleberg S (2005). Biofilm formation and phenotypic variation enhance predation-driven persistence of *Vibrio cholerae*. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 16819-16824.
- Maugeri TL, Carbone M, Fera MT, Gugliandolo C (2006). Detection and differentiation of *Vibrio vulnificus* in seawater and plankton of a coastal zone of the Mediterranean Sea. *Res Microbiol* 157: 194-200.
- McPherson VL, Watts JA, Simpson LM, Oliver JD (1991). Physiological effects of the lipopolysaccharide of *Vibrio vulnificus* on mice and rats. *Microbios* 67: 141-149.
- Md Zoqratt MZH, Eng WWH, Thai BT, Austin CM, Gan HM (2018). Microbiome analysis of Pacific white shrimp gut and rearing water from Malaysia and Vietnam: implications for aquaculture research and management. *PeerJ* 6: 1-22.
- Meibom KL, Li XB, Nielsen AT, Wu C-Y, Roseman S, Schoolnik GK (2004). The *Vibrio cholerae* chitin utilization program. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 2524-2529.
- Meixia Z, Kefu Y, Qiaomin Z, Qi S (2008). Spatial pattern of coral diversity in Luhuitou fringing reef, Sanya, China. *Acta ecologica sinica / Sheng Tai Xue Bao* 28: 1419-1428.
- Mellmann A, Cloud J, Maier T, Keckevoet U, Ramminger I, Iwen P *et al.* (2008). Evaluation of matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight mass spectrometry in comparison to 16S rRNA gene sequencing for species identification of nonfermenting bacteria. *J Clin Microbiol* 46: 1946-1954.
- Merkel SM, Alexander S, Zufall E, Oliver JD, Huet-Hudson YM (2001). Essential role for estrogen in protection against *Vibrio vulnificus*-induced endotoxic shock. *Infect Immun* 69: 6119-6122.
- Milici M, Vital M, Tomasch J, Badewien TH, Giebel H-A, Plumeier I *et al.* (2017). Diversity and community composition of particle-associated and free-living bacteria in mesopelagic and bathypelagic Southern Ocean water masses: Evidence of dispersal limitation in the Bransfield Strait. *Limnol Oceanogr* 62: 1080-1095.
- Minchin D (2007). Aquaculture and transport in a changing environment: Overlap and links in the spread of alien biota. *Mar Pollut Bull* 55: 302-313.
- MiSeqSOP - mothur Available at: https://www.mothur.org/wiki/MiSeq_SOP [Last accessed: 07.07.2020].
- Möller L, Kreikemeyer B, Luo Z-H, Jost G, Labrenz M (2020). Impact of coastal aquaculture operation systems in Hainan island (China) on the relative abundance and community structure of *Vibrio* in adjacent coastal systems. *Estuar Coast Shelf Sci* 233: 1-33.
- Molnar JL, Gamboa RL, Revenga C, Spalding MD (2008). Assessing the global threat of invasive species to marine biodiversity. *Front Ecol Environ* 6: 485-492.
- Montánchez I, Ogayar E, Plágaro AH, Esteve-Codina A, Gómez-Garrido J, Orruño M *et al.* (2019). Analysis of *Vibrio harveyi* adaptation in sea water microcosms at elevated temperature

- provides insights into the putative mechanisms of its persistence and spread in the time of global warming. *Sci Rep* 9: 1-12.
- Natividad-Bonifacio I, Fernández F, Quiñones-Ramírez EI, Curiel-Quesada E, Vázquez-Salinas C (2013). Presence of virulence markers in environmental *Vibrio vulnificus* strains. *J Appl Microbiol* 114: 1539-1546.
- Nausch M, Setzkorn D, Glockzin I, Grützmüller A (2002). Bakterielle Aktivitäten als Parameter für die Modifikation des organischen Materials zwischen Swina-Mündung und Arkona-Becken (Pommernbucht, südliche Ostsee). *Rostocker Meeresbiol Beitr* 10: 113-133.
- Nematollahi A, Decostere A, Pasmans F, Haesebrouck F (2003). *Flavobacterium psychrophilum* infections in salmonid fish. *J Fish Dis* 26: 563-574.
- Nielsen L, Finster K, Welsh D, Donnelly A, Herbert R, De Wit R *et al.* (2001). Sulphate reduction and nitrogen fixation rates associated with roots, rhizomes and sediments from *Zostera noltii* and *Spartina maritima* meadows. *Environ Microbiol* 3: 63-71.
- Nilsson WB, Paranjypte RN, DePaola A, Strom MS (2003). Sequence polymorphism of the 16S rRNA gene of *Vibrio vulnificus* is a possible indicator of strain virulence. *J Clin Microbiol* 41: 442-446.
- Noguchi T, Hwang D, Arakawa O, Sugita H, Deguchi Y, Shida Y *et al.* (1987). *Vibrio alginolyticus*, a tetrodotoxin-producing bacterium, in the intestines of the fish *Fugu vermicularis vermicularis*. *Mar Biol* 94: 625-630.
- Noriega-Orozco L, Acedo-Félix E, Higuera-Ciapara I, Jiménez-Flores R, Cano R (2007). Pathogenic and non pathogenic *Vibrio* species in aquaculture shrimp ponds. *Rev Latinoam Microbiol (1958)* 49: 60-67.
- Nugraheni SA, Khoeri MM, Kusmita L, Widyastuti Y, Radjasa OK (2010). Characterization of carotenoid pigments from bacterial symbionts of seagrass *Thalassia hemprichii*. *J Coast Dev* 14: 51-60.
- Oberbeckmann S, Wichels A, Maier T, Kostrzewa M, Raffelberg S, Gerdts G (2011a). A polyphasic approach for the differentiation of environmental *Vibrio* isolates from temperate waters. *FEMS Microbiol Ecol* 75: 145-162.
- Oberbeckmann S, Wichels A, Wiltshire KH, Gerdts G (2011b). Occurrence of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio alginolyticus* in the German Bight over a seasonal cycle. *Antonie Van Leeuwenhoek* 100: 291-307.
- Oberbeckmann S, Fuchs BM, Meiners M, Wichels A, Wiltshire KH, Gerdts G (2012). Seasonal dynamics and modeling of a *Vibrio* community in coastal waters of the North Sea. *Microb Ecol* 63: 543-551.
- Ojaveer H, Jaanus A, MacKenzie BR, Martin G, Olenin S, Radziejewska T *et al.* (2010). Status of Biodiversity in the Baltic Sea. *PloS one* 5: 1-19.
- Okada K, Iida T, Kita-Tsukamoto K, Honda T (2005). *Vibrios* commonly possess two chromosomes. *J Bacteriol* 187: 752-757.
- Oksanen J, Blanchet FG, Friendly M, Kindt R, Legendre P, McGlinn D *et al.* (2019). vegan: community ecology package, R package version 2.5-4, <https://CRAN.R-project.org/package=vegan>.

- Oliver JD (2005). '*Vibrio vulnificus*' in *Oceans and Health: Pathogens in the Marine Environment*. (Eds Belkin S., Colwell R.R.). Springer, Boston, MA. pp 253-276.
- Paavola M, Olenin S, Leppäkoski E (2005). Are invasive species most successful in habitats of low native species richness across European brackish water seas? *Estuar Coast Shelf Sci* 64: 738-750.
- Pacini F (1854). *Osservazioni microscopiche e deduzioni patologiche sul cholera asiatico*. Federigo Bencini.
- Panicker G, Call DR, Krug MJ, Bej AK (2004a). Detection of pathogenic *Vibrio* spp. in shellfish by using multiplex PCR and DNA microarrays. *Appl Environ Microbiol* 70: 7436-7444.
- Panicker G, Myers ML, Bej AK (2004b). Rapid detection of *Vibrio vulnificus* in shellfish and Gulf of Mexico water by real-time PCR. *Appl Environ Microbiol* 70: 498-507.
- Paranjpye RN, Strom MS (2005). A *Vibrio vulnificus* type IV pilin contributes to biofilm formation, adherence to epithelial cells, and virulence. *Infect Immun* 73: 1411-1422.
- Parks DH, Chuvochina M, Waite DW, Rinke C, Skarszewski A, Chaumeil P-A *et al.* (2018). A standardized bacterial taxonomy based on genome phylogeny substantially revises the tree of life. *Nat Biotechnol* 36: 996.
- Pascual J, Macián MC, Arahal DR, Garay E, Pujalte MJ (2010). Multilocus sequence analysis of the central clade of the genus *Vibrio* by using the 16S rRNA, *recA*, *pyrH*, *rpoD*, *gyrB*, *rctB* and *toxR* genes. *Int J Syst Evol Microbiol* 60: 154-165.
- Peng F, Guo Y, Isabwe A, Chen H, Wang Y, Zhang Y *et al.* (2020). Urbanization drives riverine bacterial antibiotic resistome more than taxonomic community at watershed scale. *Environ Int* 137: 1-10.
- Pérez-Reytor D, Jaña V, Pavez L, Navarrete P, García K (2018). Accessory toxins of *Vibrio* pathogens and their role in epithelial disruption during infection. *Front Microbiol* 9: 1-11.
- Pierre D, Baron JL, Ma X, Sidari FP, 3rd, Wagener MM, Stout JE (2019). Water quality as a predictor of *Legionella* positivity of building water systems. *Pathogens (Basel, Switzerland)* 8: 1-11.
- Pinoargote G, Flores G, Cooper K, Ravishankar S (2018). Effects on survival and bacterial community composition of the aquaculture water and gastrointestinal tract of shrimp (*Litopenaeus vannamei*) exposed to probiotic treatments after an induced infection of acute hepatopancreatic necrosis disease. *Aquacult Res* 49: 3270-3288.
- Piria M, Sprem N, Jakovlić I, Tomljanović T, Matulić D, Treer T *et al.* (2011). First record of round goby, *Neogobius melanostomus* (Pallas, 1814) in the Sava River, Croatia. *Aquat Invasions* 6: 153-157.
- Puglisi MP, Engel S, Jensen PR, Fenical W (2007). Antimicrobial activities of extracts from Indo-Pacific marine plants against marine pathogens and saprophytes. *Mar Biol* 150: 531-540.
- Puntila R, Strake S, Florin A, Naddafi R, Lehtiniemi M, Behrens J *et al.* (2018). Abundance and distribution of round goby (*Neogobius melanostomus*). HELCOM Baltic Sea Environment Fact Sheets, <https://helcom.fi/wp-content/uploads/2020/06/BSEFS-Abundance-and-distribution-of-round-goby.pdf> [Last accessed: 04.08.2019]. pp 1-10.

- Purdy CW, Clark RN, Straus DC (2010). Determination of water quality variables, endotoxin concentration, and *Enterobacteriaceae* concentration and identification in southern High Plains dairy lagoons. *J Dairy Sci* 93: 1511-1522.
- Qadri F, Mohi G, Hossain J, Azim T, Khan AM, Salam MA *et al.* (1995). Comparison of the vibriocidal antibody response in cholera due to *Vibrio cholerae* O139 Bengal with the response in cholera due to *Vibrio cholerae* O1. *Clin Diagn Lab Immunol* 2: 685-688.
- Qadri F, Shamsul Alam M, Nishibuchi M, Rahman T, Alam NH, Chisti J *et al.* (2003). Adaptive and inflammatory immune responses in patients infected with strains of *Vibrio parahaemolyticus*. *J Infect Dis* 187: 1085-1096.
- Qin Y, Hou J, Deng M, Liu Q, Wu C, Ji Y *et al.* (2016). Bacterial abundance and diversity in pond water supplied with different feeds. *Sci Rep* 6: 1-13.
- Quast C, Pruesse E, Yilmaz P, Gerken J, Schweer T, Yarza P *et al.* (2013). The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res* 41: D590-D596.
- Quirke AM, Reen FJ, Claesson MJ, Boyd EF (2006). Genomic island identification in *Vibrio vulnificus* reveals significant genome plasticity in this human pathogen. *Bioinformatics* 22: 905-910.
- R-Core-Team (2018). R: A language and environment for statistical computing, Vienna, Austria, <https://www.R-project.org/>. *R Foundation for Statistical Computing*.
- Rajkumar M, Thavasi R, Perumal P, Trilles J-P (2007). Parasite induced Vibriosis in *Stolephorus commersonii*. *Res J Microbiol* 2: 972-977.
- Ramírez F, Afán I, Davis LS, Chiaradia A (2017). Climate impacts on global hot spots of marine biodiversity. *Sci Adv* 3: 1-18.
- Randa MA, Polz MF, Lim E (2004). Effects of temperature and salinity on *Vibrio vulnificus* population dynamics as assessed by quantitative PCR. *Appl Environ Microbiol* 70: 5469-5476.
- Rawls JF, Mahowald MA, Ley RE, Gordon JI (2006). Reciprocal gut microbiota transplants from zebrafish and mice to germ-free recipients reveal host habitat selection. *Cell* 127: 423-433.
- Raymond E G, Jennifer K G, Mark W L, Loren D C (2006). A new *in situ* method for measuring seston uptake by suspension-feeding bivalve molluscs. *J Shellfish Res* 25: 643-649.
- Ren C, Wang Z, Zhang Y, Zhang B, Chen L, Xi Y *et al.* (2019). Rapid expansion of coastal aquaculture ponds in China from Landsat observations during 1984–2016. *Int J Appl Earth Obs Geoinformation* 82: 1-12.
- Reynaud Y, Pitchford S, De Decker S, Wikfors GH, Brown CL (2013). Molecular typing of environmental and clinical strains of *Vibrio vulnificus* isolated in the northeastern USA. *PLoS one* 8: 1-11.
- Rivera S, Lugo T, Hazen TC (1989). Autecology of *Vibrio vulnificus* and *Vibrio parahaemolyticus* in tropical waters. *Water Res* 23: 923-931.
- Rizzo L, Frascchetti S, Alifano P, Tredici MS, Stabili L (2016). Association of *Vibrio* community with the Atlantic Mediterranean invasive alga *Caulerpa cylindracea*. *J Exp Mar Bio Ecol* 475: 129-136.

- Rosche TM, Yano Y, Oliver JD (2005). A rapid and simple PCR analysis indicates there are two subgroups of *Vibrio vulnificus* which correlate with clinical or environmental isolation. *Microbiol Immunol* 49: 381-389.
- Sapota M, Skóra K (2005). Spreading of alien (non-indigenous) fish species *Neogobius melanostomus* in the Gulf of Gdańsk (South Baltic). *Biol Invasions* 7: 157-164.
- Sapota MR (2004). The round goby (*Neogobius melanostomus*) in the Gulf of Gdańsk – a species introduction into the Baltic Sea. *Hydrobiologia* 514: 219-224.
- Schlitzer R (2019). Ocean Data View, <https://odv.awi.de>.
- Schloss PD, Westcott SL, Ryabin T, Hall JR, Hartmann M, Hollister EB *et al.* (2009). Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Appl Environ Microbiol* 75: 7537-7541.
- Schreier HJ, Mirzoyan N, Saito K (2010). Microbial diversity of biological filters in recirculating aquaculture systems. *Curr Opin Biotechnol* 21: 318-325.
- Schwieger F, Tebbe CC (1998). A new approach to utilize PCR–single-strand-conformation polymorphism for 16S rRNA gene-based microbial community analysis. *Appl Environ Microbiol* 64: 4870-4876.
- Shannon P, Markiel A, Ozier O, Baliga NS, Wang JT, Ramage D *et al.* (2003). Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res* 13: 2498-2504.
- Shimada T, Arakawa E, Itoh K, Okitsu T, Matsushima A, Asai Y *et al.* (1994). Extended serotyping scheme for *Vibrio cholerae*. *Curr Microbiol* 28: 175-178.
- Shime-Hattori A, Iida T, Arita M, Park K-S, Kodama T, Honda T (2006). Two type IV pili of *Vibrio parahaemolyticus* play different roles in biofilm formation. *FEMS Microbiol Lett* 264: 89-97.
- Shinn A, Pratoomyot J, Griffiths D, Trùng T, Thanh Vu N, Jiravanichpaisal P *et al.* (2018). Asian shrimp production and the economic costs of disease. *Asian Fish Sci* 31S: 29-58.
- Siboni N, Balaraju V, Carney R, Labbate M, Seymour JR (2016). Spatiotemporal dynamics of *Vibrio* spp. within the Sydney harbour estuary. *Front Microbiol* 7: 460-460.
- Simpson LM, Oliver JD (1983). Siderophore production by *Vibrio vulnificus*. *Infect Immun* 41: 644-649.
- Simpson LM, Oliver JD (1987). Ability of *Vibrio vulnificus* to obtain iron from transferrin and other iron-binding proteins. *Curr Microbiol* 15: 155-157.
- Simpson LM, White VK, Zane SF, Oliver JD (1987). Correlation between virulence and colony morphology in *Vibrio vulnificus*. *Infect Immun* 55: 269-272.
- Singleton FL, Attwell R, Jangi S, Colwell RR (1982). Effects of temperature and salinity on *Vibrio cholerae* growth. *Appl Environ Microbiol* 44: 1047-1058.
- Skabeikis A, Lesutienė J (2015). Feeding activity and diet composition of round goby (*Neogobius melanostomus*, Pallas 1814) in the coastal waters of SE Baltic Sea. *Oceanol Hydrobiol Stud* 44: 508-519.

- Skóra K, Stolarski J (1993). New fish species in the Gulf of Gdansk, *Neogobius* sp. (cf. *Neogobius melanostomus* (Pallas 1811)). *Bull Sea Fish Inst Gdynia* 1: 83-84.
- Sombatjinda S, Boonapatcharoen N, Ruengjitchatchawalya M, Wantawin C, Withyachumnarnkul B, Techkarnjanaruk S (2011). Dynamics of microbial communities in an earthen shrimp pond during the shrimp growing period. *Environ Nat Resour Res* 1: 171-180.
- Soto-Rodriguez SA, Gomez-Gil B, Lozano R, del Rio-Rodríguez R, Diéguez AL, Romalde JL (2012). Virulence of *Vibrio harveyi* responsible for the “Bright-red” Syndrome in the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *J Invertebr Pathol* 109: 307-317.
- Sousa OV, Macrae A, Menezes FGR, Gomes NCM, Vieira RHSF, Mendonça-Hagler LCS (2006). The impact of shrimp farming effluent on bacterial communities in mangrove waters, Ceará, Brazil. *Mar Pollut Bull* 52: 1725-1734.
- Stachowicz JJ, Whitlatch RB, Osman RW (1999). Species diversity and invasion resistance in a marine ecosystem. *Science* 286: 1577-1579.
- Star B, Haverkamp THA, Jentoft S, Jakobsen KS (2013). Next generation sequencing shows high variation of the intestinal microbial species composition in Atlantic cod caught at a single location. *BMC Microbiol* 13: 1-6.
- Starks AM, Schoeb TR, Tamplin ML, Parveen S, Doyle TJ, Bomeisl PE *et al.* (2000). Pathogenesis of infection by clinical and environmental strains of *Vibrio vulnificus* in iron-dextran-treated mice. *Infect Immun* 68: 5785-5793.
- Stoddard SF, Smith BJ, Hein R, Roller BRK, Schmidt TM (2014). *rrnDB*: improved tools for interpreting rRNA gene abundance in bacteria and archaea and a new foundation for future development. *Nucleic Acids Res* 43: D593-D598.
- Sun F, Wang Y, Wang C, Zhang L, Tu K, Zheng Z (2019). Insights into the intestinal microbiota of several aquatic organisms and association with the surrounding environment. *Aquaculture* 507: 196-202.
- Sung H-H, Li H-C, Tsai F-M, Ting Y-Y, Chao W-L (1999). Changes in the composition of *Vibrio* communities in pond water during tiger shrimp (*Penaeus monodon*) cultivation and in the hepatopancreas of healthy and diseased shrimp. *J Exp Mar Bio Ecol* 236: 261-271.
- Sung H-H, Hsu S-F, Chen C-K, Ting Y-Y, Chao W-L (2001). Relationships between disease outbreak in cultured tiger shrimp (*Penaeus monodon*) and the composition of *Vibrio* communities in pond water and shrimp hepatopancreas during cultivation. *Aquaculture* 192: 101-110.
- Süß J, Herrmann K, Seidel M, Cypionka H, Engelen B, Sass H (2008). Two distinct *Photobacterium* populations thrive in ancient Mediterranean sapropels. *Microb Ecol* 55: 371-383.
- Tagomori K, Iida T, Honda T (2002). Comparison of genome structures of vibrios, bacteria possessing two chromosomes. *J Bacteriol* 184: 4351-4358.
- Takemura AF, Chien DM, Polz MF (2014). Associations and dynamics of *Vibrionaceae* in the environment, from the genus to the population level. *Front Microbiol* 5: 1-26.
- Tamplin ML, Specter S, Rodrick GE, Friedman H (1985). *Vibrio vulnificus* resists phagocytosis in the absence of serum opsonins. *Infect Immun* 49: 715-718.

- Tamplin ML, Capers GM (1992). Persistence of *Vibrio vulnificus* in tissues of Gulf Coast oysters, *Crassostrea virginica*, exposed to seawater disinfected with UV light. *Appl Environ Microbiol* 58: 1506-1510.
- Tapia-Paniagua ST, Fumanal M, Anguís V, Fernández-Díaz C, Alarcón FJ, Moriñigo MA *et al.* (2019). Modulation of intestinal microbiota in *Solea senegalensis* fed low dietary level of *Ulva ohnoi*. *Front Microbiol* 10: 1-16.
- Thompson FL, Gevers D, Thompson CC, Dawyndt P, Naser S, Hoste B *et al.* (2005). Phylogeny and molecular identification of vibrios on the basis of multilocus sequence analysis. *Appl Environ Microbiol* 71: 5107-5115.
- Thompson FL, Thompson CC, Vicente ACP, Klose KE, Group A (2010). Vibrio2009: the third international conference on the biology of Vibrios. *Mol Microbiol* 77: 1065-1071.
- Thompson JR, Randa MA, Marcelino LA, Tomita-Mitchell A, Lim E, Polz MF (2004). Diversity and dynamics of a North Atlantic coastal *Vibrio* community. *Appl Environ Microbiol* 70: 4103-4110.
- Thomsen E, Herbeck LS, Jennerjahn TC (2020). The end of resilience: Surpassed nitrogen thresholds in coastal waters led to severe seagrass loss after decades of exposure to aquaculture effluents. *Mar Environ Res* 160: 1-13.
- Tout J, Siboni N, Messer LF, Garren M, Stocker R, Webster NS *et al.* (2015). Increased seawater temperature increases the abundance and alters the structure of natural *Vibrio* populations associated with the coral *Pocillopora damicornis*. *Front Microbiol* 6: 1-12.
- Trachsel J (2020). funfuns: Functions I Use , R package version 0.1.1 <https://rdr.io/github/Jtrachsel/funfuns/>.
- Trott LA, Alongi DM (2000). The impact of shrimp pond effluent on water quality and phytoplankton biomass in a tropical mangrove estuary. *Mar Pollut Bull* 40: 947-951.
- Twedt RM, Spaulding PL, Hall HE (1969). Morphological, cultural, biochemical, and serological comparison of Japanese strains of *Vibrio parahaemolyticus* with related cultures isolated in the United States. *J Bacteriol* 98: 511-518.
- Urdaci MC, Stal LJ, Marchand M (1988). Occurrence of nitrogen fixation among *Vibrio* spp. *Arch Microbiol* 150: 224-229.
- Valiela I, Cole ML (2002). Comparative evidence that salt marshes and mangroves may protect seagrass meadows from land-derived nitrogen loads. *Ecosystems* 5: 92-102.
- Valiente E, Padrós F, Lamas J, Llorens A, Amaro C (2008). Microbial and histopathological study of the vibriosis caused by *Vibrio vulnificus* serovar E in eels: The metalloprotease Vvp is not an essential lesional factor. *Microb Pathog* 45: 386-393.
- van Rijn J, Rivera G (1990). Aerobic and anaerobic biofiltration in an aquaculture unit—Nitrite accumulation as a result of nitrification and denitrification. *Aquac Eng* 9: 217-234.
- Van Rijn J, Tal Y, Schreier H (2006). Denitrification in recirculating systems: theory and applications. *Aquac Eng* 34: 364-376.

- Vandenberghé J, Verdonck L, Robles-Arozarena R, Rivera G, Bolland A, Balladares M *et al.* (1999). Vibrios associated with *Litopenaeus vannamei* larvae, postlarvae, broodstock, and hatchery probionts. *Appl Environ Microbiol* 65: 2592-2597.
- Venkateswaran K, Kiiyukia C, Nakanishi K, Nakano H, Matsuda O, Hashimoto H (1990). The role of sinking particles in the overwintering process of *Vibrio parahaemolyticus* in a marine environment. *FEMS Microbiol Ecol* 6: 159-166.
- Vezzulli L, Brettar I, Pezzati E, Reid PC, Colwell RR, Höfle MG *et al.* (2012). Long-term effects of ocean warming on the prokaryotic community: evidence from the vibrios. *ISME J* 6: 21-30.
- Vital M, Füsclin HP, Hammes F, Egli T (2007). Growth of *Vibrio cholerae* O1 Ogawa Eltor in freshwater. *Microbiology* 153: 1993-2001.
- Wang Q, Garrity GM, Tiedje JM, Cole JR (2007). Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Appl Environ Microbiol* 73: 5261-5267.
- Warner EB, Oliver JD (2008). Multiplex PCR assay for detection and simultaneous differentiation of genotypes of *Vibrio vulnificus* biotype 1. *Foodborne Pathog Dis* 5: 691-693.
- Wassenaar TM, Gaastra W (2001). Bacterial virulence: can we draw the line? *FEMS Microbiol Lett* 201: 1-7.
- Weichert D, Oliver JD, Kjelleberg S (1992). Low temperature induced non-culturability and killing of *Vibrio vulnificus*. *FEMS Microbiol Lett* 100: 205-210.
- WHO (1993). World Health Organization. Epidemic diarrhoea due to *Vibrio cholerae* non-O1 = Diarrhée épidémique due à *Vibrio cholerae* non O1. *Wkly Epidemiol Rec* 68: 141-142.
- WHO, FAO (2011a). 'Consumption of oysters' in *Risk assessment of Vibrio parahaemolyticus in seafood : interpretative summary and technical report, Microbiological risk assessment series ; no. 16*. World Health Organization (WHO), Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), : Geneva. p 38.
- WHO, FAO (2011b). 'Hazard identification' in *Risk assessment of Vibrio parahaemolyticus in seafood : interpretative summary and technical report, Microbiological risk assessment series ; no. 16*. World Health Organization (WHO), Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), : Geneva. pp 5-6.
- WHO (2020a). WHO (World Health Organization), Areas affected by cholera epidemics. https://www.who.int/gho/epidemic_diseases/cholera/epidemics/en/ [Last accessed: 05.08.2020].
- WHO (2020b). WHO (World Health Organization), Antibiotic resistance. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antibiotic-resistance> [Last accessed: 05.08.2020].
- Wickham H (2016). *ggplot2: elegant graphics for data analysis (2nd Edition)*, <https://ggplot2.tidyverse.org>. Springer-Verlag New York, 2016.
- Wickham H, Hester J, Chang W (2020). devtools: tools to make developing R packages easier, R package version 2.2.2, <https://CRAN.R-project.org/package=devtools>.

- Williams T, Wilkins D, Long E, Evans F, DeMaere M, Raftery M *et al.* (2012). The role of planktonic *Flavobacteria* in processing algal organic matter in coastal East Antarctica revealed using metagenomics and metaproteomics. *Environ Microbiol* 15: 1302-1317.
- Wolf PW, Oliver JD (1992). Temperature effects on the viable but non-culturable state of *Vibrio vulnificus*. *FEMS Microbiol Lett* 101: 33-39.
- Wong H-C, Liu S-H, Wang T-K, Lee C-L, Chiou C-S, Liu D-P *et al.* (2000). Characteristics of *Vibrio parahaemolyticus* O3: K6 from Asia. *Appl Environ Microbiol* 66: 3981-3986.
- Wood DC, Hayasaka SS (1981). Chemotaxis of rhizoplane bacteria to amino acids comprising eelgrass (*Zostera marina* L.) root exudate. *J Exp Mar Bio Ecol* 50: 153-161.
- Wright AC, Morris J (1991). The extracellular cytolysin of *Vibrio vulnificus*: inactivation and relationship to virulence in mice. *Infect Immun* 59: 192-197.
- Wright AC, Powell JL, Kaper JB, Morris JG (2001). Identification of a group 1-like capsular polysaccharide operon for *Vibrio vulnificus*. *Infect Immun* 69: 6893-6901.
- Wu S, Wang G, Angert ER, Wang W, Li W, Zou H (2012). Composition, diversity, and origin of the bacterial community in grass carp intestine. *PLoS one* 7: 1-11.
- www.arb-silva.de, webaligner available at: <https://www.arb-silva.de/> [Last accessed: 02.05.2019].
- Yao S-L, Luo J-J, Huang G, Wang P (2017). Distinct global warming rates tied to multiple ocean surface temperature changes. *Nat Clim Change* 7: 486-491.
- Yao Z, Yang K, Huang L, Huang X, Qiuqian L, Wang K *et al.* (2018). Disease outbreak accompanies the dispersive structure of shrimp gut bacterial community with a simple core microbiota. *AMB Express* 8: 1-10.
- Yilmaz P, Parfrey LW, Yarza P, Gerken J, Pruesse E, Quast C *et al.* (2013). The SILVA and “All-species Living Tree Project (LTP)” taxonomic frameworks. *Nucleic Acids Res* 42: D643-D648.
- Yong L, Guanpin Y, Hualei W, Jixiang C, Xianming S, Guiwei Z *et al.* (2006). Design of *Vibrio* 16S rRNA gene specific primers and their application in the analysis of seawater *Vibrio* community. *J Ocean Univ China* 5: 157-164.
- Zeng S, Huang Z, Hou D, Liu J, Weng S, He J (2017). Composition, diversity and function of intestinal microbiota in pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) at different culture stages. *PeerJ* 5: 1-20.
- Zhang C, Huang H, Ye C, Huang L, Li X, Lian J *et al.* (2013). Diurnal and seasonal variations of carbonate system parameters on Luhuitou fringing reef, Sanya Bay, Hainan Island, South China Sea. *Deep Sea Res Part 2 Top Stud Oceanogr* 96: 65-74.
- Zhang X, Lin H, Wang X, Austin B (2018). Significance of *Vibrio* species in the marine organic carbon cycle—A review. *Sci China Earth Sci* 61: 1357-1368.
- Zhao R, Symonds JE, Walker SP, Steiner K, Carter CG, Bowman JP *et al.* (2020). Salinity and fish age affect the gut microbiota of farmed Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Aquaculture* 528: 1-16.

Zobkov M, Esiukova E (2017). Microplastics in Baltic bottom sediments: Quantification procedures and first results. *Mar Pollut Bull* 114: 724-732.

5.2 Zusatzdaten

S1: Übersicht über die in der südlichen Ostsee genommenen Proben und durchgeführten Untersuchungen. W = Wasser, S = Sediment, P = Seston, G = *G. morhua*, C = *C. harengus membras*, N = *N. melanostomus*, KBE-Best.= Bestimmung der *Vibrio*-Koloniebildenden Einheiten, ddPCR-Quant. = ddPCR-Quantifizierung der relativen Abundanz des *Vibrio*- 16S rRNS Gens und absolute *Vibrio*-Zellzahl-Bestimmung

	Niendorf	Warnemünde	Lubmin	Karlshagen
Koordinaten	N: 53.930299 E: 11.270197	N:54.181291 E:12.078845	N: 54.137104 E: 13.611340	N: 54.122105 E:13.842652
Probematerialien				
Sommer 2015	W, S, P	W, S, P G, C, N	W, S, P	W, S, P
Winter 2015/16	W, S, P	W, S, P G, C, N	W, S, P	W, S, P
Winter 2016/17	W, S, P	W, S, P G, C, N	W, S, P	W, S, P
Sommer 2018	-	W, S G, C, N		
Untersuchungen				
Sommer 2015	KBE-Best., Isolierung + Spezies- Identifizierung, ddPCR-Quant.	KBE-Best., Isolierung + Spezies- Identifizierung, ddPCR-Quant. Illumina-16S rRNS Gen- Sequenzierung	KBE-Best., Isolierung + Spezies- Identifizierung, ddPCR-Quant.	KBE-Best., Isolierung + Spezies- Identifizierung, ddPCR-Quant.
Winter 2015/16	KBE-Best., Isolierung + Spezies- Identifizierung, ddPCR-Quant.	KBE-Best., Isolierung + Spezies- Identifizierung, ddPCR-Quant.	KBE-Best., Isolierung + Spezies- Identifizierung, ddPCR-Quant.	KBE-Best., Isolierung + Spezies- Identifizierung, ddPCR
Winter 2016/17	ddPCR-Quant.	ddPCR-Quant.	ddPCR-Quant.	ddPCR-Quant.
Sommer 2018		ddPCR-Quant.		

S2: Übersicht über die in Hainan genommenen Proben, sowie deren symbolische Darstellung in den Ergebnissen der Promotion. + = Probenmaterial vorhanden, - = Probenmaterial nicht vorhanden

Proben ID	Probenort	Symbol	Wasser	Sediment	Seegrass	Gewebe
AQ01	Aquakultur	⊗	+	-	-	+
AQ02	Aquakultur	⊗	+	-	-	+
AQ03	Aquakultur	⊗	+	-	-	+
AQ04	Aquakultur	⊗	+	-	-	+
AQ05	Aquakultur	⊕	+	+	-	+
AQ06	Aquakultur	⊕	+	+	-	+
AQ07	Aquakultur	✱	+	+	-	-
AQ08	Aquakultur	✱	+	+	-	-
AQ09	Aquakultur	✱	+	+	-	-
AQ10	Aquakultur	✱	+	+	-	-
AQ11	Aquakultur	✱	+	+	-	-
AQ12	Aquakultur	✱	+	+	-	-
AQ13	Aquakultur	✱	+	+	-	+
AQ14	Aquakultur	✱	+	+	-	+
AU1	Aufreinigungsbecken	⊕	+	-	-	-
AU2	Aufreinigungsbecken	⊕	+	-	-	-
AU3	Aufreinigungsbecken	⊕	+	-	-	-
AU4	Aufreinigungsbecken	⊕	+	-	-	-
A1	Küste	○	+	-	-	-
A2	Küste	○	+	-	-	-
A3	Küste	○	+	-	-	-
B1	Küste	○	+	+	-	-
B2	Küste	○	+	+	-	-
B3	Küste	○	+	+	-	-
B4	Küste	○	+	+	+	-
B5	Küste	○	+	+	+	-
C1	Küste	○	+	+	-	-
C2	Küste	○	+	+	-	-
C3	Küste	○	+	+	+	-
C4	Küste	○	+	+	-	-
D1	Küste	○	+	+	-	-
D2	Küste	○	+	+	-	-
D3	Küste	○	+	+	+	-
D4	Küste	○	+	+	-	-
D5	Küste	○	+	+	-	-
D6	Küste	○	+	+	+	-
F1	Küste	○	+	+	-	-
F2	Küste	○	+	+	-	-
F3	Küste	○	+	+	-	-
F4	Küste	○	+	+	+	-
F5	Küste	○	+	+	+	-
F6	Küste	○	+	+	+	-
R1	Fluss	▽	+	+	-	-
R2	Fluss	▽	+	+	-	-
R3	Fluss	▽	+	+	-	-
R4	Fluss	▽	+	+	-	-

S3: Liste der untersuchten Aquakulturen und Übersicht über das verwendete System, die kultivierten Tiere, Anzahl an beprobten Individuen und Größe der beprobten Individuen. (modifiziert nach Möller *et al.* 2020)

Proben ID	Aquakulturtyp	Organismus /Aufreinigungs-schritt	Anzahl an beprobten Organismen	Organismusgröße
AU1	Aufreinigungs-becken	Sammelbecken	Keine Probe	Keine Probe
AU2	Aufreinigungs-becken	Sedimentations-becken	Keine Probe	Keine Probe
AU3	Aufreinigungs-becken	Biodegratations-becken	Keine Probe	Keine Probe
AU4	Aufreinigungs-becken	Belüftetes biologisches Filterbecken	Keine Probe	Keine Probe
AQ1	semi-geschlossenes System	Shrimp (<i>Litopenaeus vannamei</i>)	2	11 cm
AQ2	semi-geschlossenes System	Shrimp (<i>Litopenaeus vannamei</i>)	3	12–14 cm
AQ3	semi-geschlossenes System	Shrimp (<i>Litopenaeus vannamei</i>)	>50	2–5 mm
AQ4	semi-geschlossenes System	Shrimp (<i>Litopenaeus vannamei</i>)	>50	≈ 0.5 cm
AQ5	Kontinuierliche Aquakultur	Schnecke (<i>Babylonia areolata</i>)	5	1.7–2.6 cm
AQ6	Kontinuierliche Aquakultur	Schnecke (<i>Babylonia areolata</i>)	5	2.5–3.5 cm
AQ7	Klassische Aquakultur	Fisch (<i>Epinephelus lanceolatus</i>)	Keine Probe	Keine Probe
AQ8	Klassische Aquakultur	Fisch (<i>Epinephelus lanceolatus</i>)	1	45 cm
AQ9	Klassische Aquakultur	Fisch (<i>Epinephelus lanceolatus</i>)	Keine Probe	Keine Probe
AQ10	Klassische Aquakultur	Fisch (<i>Epinephelus lanceolatus</i>)	Keine Probe	Keine Probe
AQ11	Klassische Aquakultur	Fisch (<i>Epinephelus lanceolatus</i>)	Keine Probe	Keine Probe

Fortsetzung S3:

Proben ID	Aquakulturtyp	Organismus /Aufreinigungs- schritt	Anzahl an beprobten Organismen	Organismusgröße
AQ12	Klassische Aquakultur	Fisch (<i>Epinephelus lanceolatus</i>)	Keine Probe	Keine Probe
AQ13	Klassische Aquakultur	Fisch (<i>Epinephelus lanceolatus</i>)	1	30 cm
AQ14	Klassische Aquakultur	Shrimp (<i>Litopenaeus vannamei</i>)	3	1.5–3 cm

S4: Zusammenfassung der Eigenschaften der beprobten Aquakulturen basierend auf den Interviews der Aquakulturbesitzer. Die Anzahl der kultivierten re ist von Tieden Besitzern geschätzt worden. (modifiziert nach Möller *et al.* 2020)

Proben ID	AQ1	AQ3	AQ2	AQ4	AQ5	AQ6	AQ7
Teichgröße [m]	30 × 30	unbekannt	30 × 30	9 × 2	6.8 × 2.5	6.8 × 2.5	30 × 30
Teichtiefe [m]	unbekannt	unbekannt	unbekannt	unbekannt	0.5	0.5	1.5
Organismus	Shrimp (<i>Litopenaeus vannamei</i>)	Schnecke (<i>Babylonia areolata</i>)	Schnecke (<i>Babylonia areolata</i>)	Fisch <i>Epinephelus lanceolatus</i>			
Alter Tiere	6 Monate	2 Tage	6 Monate	unbekannt	5 Monate	5 Monate	20 Monate
Anzahl der Tiere	unbekannt	unbekannt	unbekannt	unbekannt	20,000	20,000	Zu Beginn 6,000, zur Probenahme 1,500
Größe der Tiere	≈ 11 cm	2–5 mm	12–14 cm	≈ 0.5 cm	1.7–2.6 cm	2.5–3.5 cm	unbekannt (1.5–2 kg)
Alter des Wassers	unbekannt	kontinuierlicher Austausch	unbekannt	kontinuierlicher Austausch	kontinuierlicher Austausch	kontinuierlicher Austausch	20 Monate

Fortsetzung S4:

Proben ID	AQ1	AQ3	AQ2	AQ4	AQ5	AQ6	AQ7
Frequenz des Wasser-Austauschs	unbekannt	kontinuierlicher Austausch	unbekannt	kontinuierlicher Austausch	kontinuierlicher Austausch	kontinuierlicher Austausch	nur zum Ende der Aufzucht
Antibiotika-Nutzung	unbekannt	unbekannt	unbekannt	unbekannt	nein, aber Nutzung von "Medizin"	nein, aber Nutzung von "Medizin"	Nein, aber Nutzung von "Medizin"
Auftreten von Infektionen	unbekannt	unbekannt	unbekannt	unbekannt	selten, aber mit dem kompletten Verlust aller Tiere	selten, aber mit dem kompletten Verlust aller Tiere	ab und zu sterben ein paar Fische
Nutzungsdauer der Sauerstoff-Pumpe	unbekannt	kontinuierlich	unbekannt	kontinuierlich	kontinuierlich	kontinuierlich	täglich für 8h

Fortsetzung S4:

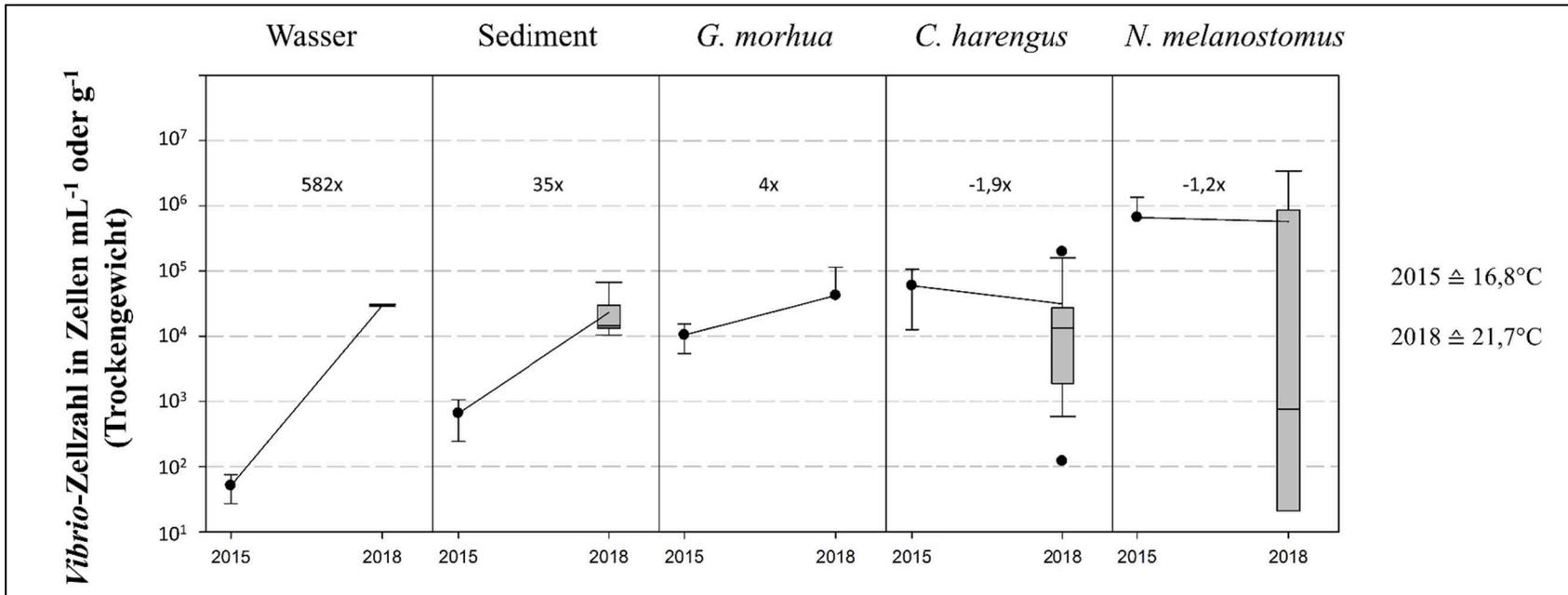
Proben ID	AQ8	AQ9	AQ10	AQ11	AQ12	AQ13	AQ14
Teichgröße [m]	30 × 30	35 × 35	35 × 35	60 × 60	40 × 40	20 × 45	35 × 45
Teichtiefe [m]	1.5	1.8	1.8	1.8	2	1.5	1.8
Organismus	Fisch <i>Epinephelus lanceolatus</i>	Fisch (<i>Epinephelus lanceolatus</i>)	Shrimp <i>Litopenaeus vannamei</i>				
Alter Tiere	8 Monate	2 Monate	2 Monate	12 Monate	12 Monate	12 Monate	1 month
Anzahl der Tiere	3,000	8,000	11,000	2,000-3,000	8,000	4,000	30,000,000
Größe der Tiere	45 cm	2-5 cm	2-5 cm	30-40 cm	unbekannt	30 cm	1.5–3 cm
Alter des Wassers	8 Monate	unbekannt, mindestens einen Tag	unbekannt, mindestens einen Tag	unbekannt, mindestens einen Tag	6 days	15 days	1 Monat

Fortsetzung S4:

Proben ID	AQ8	AQ9	AQ10	AQ11	AQ12	AQ13	AQ14
Frequenz des Wasser-Austauschs	nur zum Ende der Aufzucht	abhängig von den Bedingungen, "ein paar mal im Monat" wird $\frac{3}{4}$ des Wassers ausgetauscht	abhängig von den Bedingungen, "ein paar mal im Monat" wird $\frac{3}{4}$ des Wassers ausgetauscht)	abhängig von den Bedingungen, "ein paar mal im Monat" wird $\frac{3}{4}$ des Wassers ausgetauscht	2 times per month	every 16 days	abhängig von den Bedingungen, nicht regelmäßig
Antibiotika-Nutzung	unbekannt	unbekannt	unbekannt	unbekannt	nein, aber Nutzung von "Medizin"	nein, aber Nutzung von "Medizin"	Nein, aber Nutzung von "Medizin"
Auftreten von Infektionen	unbekannt	unbekannt	unbekannt	unbekannt	selten, aber mit dem kompletten Verlust aller Tiere	selten, aber mit dem kompletten Verlust aller Tiere	ab und zu sterben ein paar Fische
Nutzungsdauer der Sauerstoff-Pumpe	unbekannt	kontinuierlich	unbekannt	kontinuierlich	kontinuierlich	kontinuierlich	täglich für 8h

S5: Die in dieser Promotion verwendeten Primer. Dargestellt werden der Name, das Ziel-Gen und die vermutete Amplikon-Länge in Basenpaaren (bp). Für die Illumina-Primer 341f und 805r repräsentieren die fettgedruckten Buchstaben die Adapter des Illumina-Protokolls.

Primer	Nukleotidsequenz	Ziel	Amplikon-Länge [bp]	Referenz
341f	CCT ACG GGN GGC WGC AG	16S	465	(Herlemann <i>et al.</i> 2011)
805r	GAC TAC HVG GGT ATC TAA TCC			
Illumina 341 f	TCG TCG GCA GCG TCA GAT GTG TAT AAG AGA CAG CCT ACG GGN GGC WGC AG	16S	465	Illumina + (Herlemann <i>et al.</i> 2011)
Illumina 805 r	GTC TCG TGG GCT CGG AGA TGT GTA TAA GAG ACA G GAC TAC HVG GGT ATC TAA TCC			
Com-f	CAG CAG CCG CGG TAA TAC	16S	408	(Schwieger und Tebbe 1998)
Com-r	CCG TCA ATT CCT TTG AGT TT			
567F	GGC GTA AAG CGC ATG CAG GT	16S	114	(Thompson <i>et al.</i> 2004)
680R	GAA ATT CTA CCC CCC TCT ACA G			
vvhA f	AGC GGT GAT TTC AAC G	vvhA	412	(Warner und Oliver 2008)
vvhA r	GGC CGT CTT TGT TCA CT			
vvh 785	TTC CAA CTT CAA ACC GAA CTA TGA C	vvhA	205	(Brasher <i>et al.</i> 1998) (Panicker <i>et al.</i> 2004b)
vvh 990	ATT CCA GTC GAT GCG AAT ACG TTG			
HP1 f	TTT GGG ATT TGA AAG GCT TG	CPS I	342	(Han <i>et al.</i> 2009)
HP1 r	GTG CCT TTG CGA ATT TTG AT			
viuB f	GGT TGG GCA CTA AAG GCA GAT ATA	viuB	316	(Panicker <i>et al.</i> 2004a) (Jones <i>et al.</i> 2008)
viuB r	TCG CTT TCT CCG GGG CGG			
rtxA1 f	TCA ACC GTT ATC AAG GCT CG	rtxA1	151	(Chung <i>et al.</i> 2010)
rtxA1 r	ATA TCG CCC ACT TTG CCT TT			



S6: Direkter Vergleich der *Vibrio*-Zellzahlen bestimmt durch ddPCR für den Sommer 2015 und 2018 in Warnemünde. Die Zahlen beschreiben die Differenz in der *Vibrio*-Zellzahl zwischen den beiden Probezeitpunkten. Die Wassertemperatur 2015 und in 2018 betrug 16,8 °C bzw. 20,8 °C. Zellzahlen werden als *Vibrio*-Zellzahl mL⁻¹ oder g⁻¹ Trockengewicht angegeben.

S7: Vergleich der verschiedenen Quantifizierungs-Methoden für die Sommerproben 2015 Warnemünde angewendet wurden. Die relative Abundanz des *Vibrio*-16S rRNA-Gens wurde mittels Illumina-Sequenzierung und ddPCR bestimmt. Absolute *Vibrio*-Zellzahlen sind angegeben für KBE auf TCBS und Ca, sowie der absoluten *Vibrio*-Zellzahl durch ddPCR. KBE werden sowohl als nicht-korrigierten, sowie durch MALDI-ToF-MS korrigierte (k) Werte dargestellt. KBE werden in Zellen je ml oder je g Trockengewicht angegeben. rel. Abund = Relative Abundanz der Kopien-Anzahl des *Vibrio*-16S rRNS-Gens im Vergleich zur Kopien-Anzahl des bakteriellen 16S rRNS-Gens

Material	KBE TCBS [g ⁻¹ oder mL ⁻¹]	KBE TCBS k [g ⁻¹ oder mL ⁻¹]	KBE CA [g ⁻¹ oder mL ⁻¹]	KBE CA k [g ⁻¹ oder mL ⁻¹]	ddPCR Zellen [g ⁻¹ or mL ⁻¹]	ddPCR rel. Abund.	Illumina rel. Abund.
Water	0	0	1,40 x10 ¹ (±1,6 x10 ¹)	0	5,11 x10 ¹ (±2,4 x10 ¹)	0,08% (± 0,047%)	0,03 % (± 0,01%)
Sediment	8,81 x10 ¹ (±1,5 x10 ²)	8,81 x10 ¹ (±1,5 x10 ²)	3,52 x10 ² (±1,5 x10 ²)	1,76 x10 ² (±2,0 x10 ²)	8,63 x10 ² (±5,4 x10 ²)	0,04% (± 0,029%)	0,02 % (± 0,01%)
Seston	6,30 x10 ⁴ (±6,3 x10 ⁴)	2,1 x10 ⁴ (±3,6 x10 ⁴)	2,69 x10 ⁶ (±9,1 x10 ⁵)	2,00 x10 ⁶ (±7,1 x10 ⁵)	2,39 x10 ⁵ (±1,6 x10 ⁵)	0,8% (± 0,288%)	0,15 % (± 0,02%)
Cod	5,15 x10 ² (±8,9 x10 ²)	5,15 x10 ² (±8,9 x10 ²)	5,67 x10 ³ (±4,2 x10 ³)	3,61 x10 ³ (±2,7 x10 ³)	8,01 x10 ⁴ (±3,9 x10 ³)	0,01% (± 0,001%)	0,02 % (± 0,01%)
Herring	4,34 x10 ³ (±5,2 x10 ³)	4,34 x10 ³ (±5,2 x10 ³)	8,9 x10 ³ (±6,0 x10 ³)	7,99 x10 ³ (±5,3 x10 ³)	2,86 x10 ⁵ (±2,4 x10 ⁵)	2,2 % (± 1,3%)	0,06 % (± 0,02%)
Goby	2,15 x10 ⁶ (±6,1 x10 ⁵)	1,08 x10 ⁶ (±3,1 x10 ⁵)	2,05 x10 ⁶ (±1,2 x10 ⁵)	2,95 x10 ⁵ (±6,55 x10 ⁴)	3,11 x10 ⁶ (±3,2 x10 ⁶)	3,3% (± 1,9%)	1,51 % (± 0,6%)

S8: Ergebnisse der Illumina-Sequenzierung und der *in silico* bearbeitung die genutzt wurde um den Korrekturfaktor für die ddPCR-Ergebnisse mit dem *Vibrio*-16S Primer-Paar zu berechnen. Der Faktor errechnet sich aus der Kopienanzahl an *Photobacterium*-Sequenz, die *in silico* mit dem Primer-Paar hybridisieren können, sowie der Kopienanzahl an *Vibrio*-16S rRNS-Gen-Sequenzen.

Probematerial	Wasser			Sediment			Seston		
	A	B	C	A	B	C	A	B	C
Parallele									
Absolute Kopienanzahl an Sequenzen, identifiziert als <i>Photobacterium</i>	5	10	10	1	39	2	31	43	24
Absolute Kopienanzahl an Sequenzen, identifiziert als <i>Vibrio</i>	30	75	31	8	9	1	118	154	126
Anteil an <i>Photobacterium</i> Sequenzen, mit bis zu einem Basenpaar unterschied in der Primer Abdeckung [%]	100	90	100	100	97,4	100	90,3	90,7	83,3
Verhältnis <i>Photobacterium</i> Sequenz-Kopien die ein Amplifikat mit dem <i>Vibrio</i> Primer zu erzeugen/ Kopienanzahl an <i>Vibrio</i> 16S Sequenzen	0,167	0,12	0,32	0,125	4,22	2	0,24	0,25	0,16
Korrekturfaktor für die ddPCR	$8,571 \times 10^{-1}$	$8,929 \times 10^{-1}$	$7,576 \times 10^{-1}$	$8,889 \times 10^{-1}$	$1,914 \times 10^{-1}$	$3,333 \times 10^{-1}$	$8,065 \times 10^{-1}$	$8,000 \times 10^{-1}$	$8,621 \times 10^{-1}$
Durchschnittlicher Korrekturfaktor für die ddPCR	$8,35 \times 10^{-1}$			$4,71 \times 10^{-1}$			$8,23 \times 10^{-1}$		

Fortsetzung S8:

Probematerial	Hering			Schwarzmundgrundel			Dorsch		
	A	B	C	A	B	C	A	B	C
Absolute Anzahl an Sequenzen, identifiziert als <i>Photobakterium</i>	3730	2223	2370	55381	65694	82158	57567	66161	64196
Absolute Anzahl an Sequenzen, identifiziert als <i>Vibrio</i>	0	34	39	1127	703	1961	8	19	10
Anteil an <i>Photobakterium</i> Sequenzen, mit bis zu einem Basenpaar unterschied in der Primer Abdeckung [%]	92,8	93,1	92,6	93,6	93,7	92,4	93,4	93,3	94,4
Verhältnis <i>Photobakterium</i> Sequenzen die ein Amplifikat mit dem <i>Vibrio</i> Primer zu erzeugen/ Anzahl an <i>Vibrio</i> 16S Sequenzen	/	60,88	56,28	45,99	87,61	38,70	6727,75	3251,11	6062,10
Korrekturfaktor für die ddPCR	/	1,616 $\times 10^{-2}$	1,746 $\times 10^{-2}$	2,128 $\times 10^{-2}$	1,129 $\times 10^{-2}$	2,519 $\times 10^{-2}$	1,486 $\times 10^{-4}$	3,075 $\times 10^{-4}$	1,649 $\times 10^{-4}$
Durchschnittlicher Korrekturfaktor für die ddPCR	1,68 $\times 10^{-2}$			1,93 $\times 10^{-2}$			2,07 $\times 10^{-4}$		

S9: Pair-wise PERMANOVA und PERMDISP für die Gruppen Fische und Wasser-Sediment-Seston auf Basis der bakteriellen OTUs.

Faktoren	PERMANOVA	PERMDISP
	p	p
Fische-Wasser/Sediment/Seston	0,001	0,22

S10: Pair-wise PERMANOVA und PERMDISP auf Basis des Monte-Carlo-Tests für *G. morhua*, *N. melanostomus*, *C. harengus membras*, Wasser, Sediment und Seston als einzelne Gruppen auf Basis der *Vibrio*-OTUs.

Faktoren	PERMANOVA	PERMDISP
	p	p
<i>G. morhua</i> _ <i>N. melanostomus</i>	0,001	0,707
<i>G. morhua</i> _ <i>C. harengus membras</i>	0,046	0,092
<i>G. morhua</i> _ Seston	0,001	0,109
<i>G. morhua</i> _ Sediment	0,007	0,099
<i>G. morhua</i> _ Wasser	0,002	0,109
<i>N. melanostomus</i> _ <i>C. harengus membras</i>	0,249	0,091
<i>N. melanostomus</i> _ Seston	0,004	0,113
<i>N. melanostomus</i> _ Sediment	0,024	0,118
<i>N. melanostomus</i> _ Wasser	0,006	0,095
<i>C. harengus membras</i> _ Seston	0,218	0,086
<i>C. harengus membras</i> _ Sediment	0,342	0,09
<i>C. harengus membras</i> _ Wasser	0,199	0,117
Seston_ Sediment	0,089	0,111
Seston_ Wasser	0,083	0,53
Sediment_ Wasser	0,115	0,94

	NW	NS	NP	WW	WS	WP	WG	WC	WN	LW	LS	LP	KW	KS	KP
<i>V. aestuarianus</i>															
<i>V. diazotrophicus</i>															
<i>V. anguillarum</i>															
<i>V. navarrensis</i>															
<i>V. furnissii</i>															
<i>V. parahaemolyticus</i>															
<i>V. vulnificus</i>															
<i>V. fluvialis</i>															
<i>V. cholerae</i>															
<i>V. alginolyticus</i>															
<i>V. mimicus</i>															

S11: Durch MALDI-ToF-MS ermittelte Artzusammensetzung der Vibrionen in den verschiedenen Materialien und Probestandorten für den Sommer 2016. Weiß impliziert den Nachweis der Art, Grau impliziert keine Detektion dieser Art. Oberste Reihe: Der erste Buchstabe steht für die Probestation N: Niendorf, W: Warnemünde, L: Lubmin, K: Karlshagen. Der zweite Buchstabe steht für das Probematerial W: Wasser, S: Sediment, P: Seston, G: *G. morhua*, C: *C. harengus membras*, N: *N. melanostomus*

S12: Physikalische Parameter der Probestationen, gemessen durch das ZMT Bremen ((Thomsen *et al.* 2020) Chla = Chlorophyll a, Pheo = Pheophytin, TSM = Gesamtmenge suspendierter Partikel (modifiziert nach Möller *et al.* 2020)

Proben ID	Latitude	Longitude	Salinität [ms/cm]	Salinität [‰]	Temp. [°C]	pH	Sauerstoff [mg/L]
A1	19.52945	110.8739167	49,7	31,33	26,7	8,14	6,06
A2	19.5279	110.8746667	50,3	32,03	26,3	8,13	6,63
A3	19.5241	110.87555	50,8	32,96	25,5	8,08	6,3
B1	19.4796167	110.7992	51	26,93	35,6	8,08	5,4
B2	19.4750833	110.8047833	52,5	31,08	NA	NA	NA
B3	19.4739667	110.8068	51,9	30,68	NA	NA	NA
B4	19.4731667	110.8092167	52,6	31,15	NA	NA	NA
B5	19.4708833	110.81545	52,1	30,81	NA	NA	NA
C1	19.4648833	110.7870167	50,6	30,26	29,3	8,16	7,48
C2	19.46435	110.78805	50,8	30,39	29,3	8,18	7,95
C3	19.4636667	110.7889667	50,6	31,03	28,1	8,12	7,39
C4	19.4634	110.7898	50,7	30,32	29,3	8,1	8,24
D1	19.45315	110.7759	51,3	33,4	25,4	8,13	6,75
D2	19.45175	110.77805	51,3	33,03	25,9	8,12	6,88

Fortsetzung S12:

Proben ID	DIN [μM]	NH_4^+ [μM]	Nox [μM]	NO_2 [μM]	NO_3 [μM]	PO_4^{3-} [μM]	Si [μM]	Chla [$\mu\text{g/L}$]	Pheo [$\mu\text{g/L}$]	TSM [mg/L]
A1	4,36	2,57	1,8	0,1	1,7	0,19	4,49	0,19	-0,19	26,17
A2	2,95	1,86	1,09	0,1	0,99	0,18	4,76	NA	NA	NA
A3	2,34	1,34	1	0,09	0,91	0,18	3,5	0,39	-0,36	45,95
B1	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
B2	0,33	0,21	0,12	0,04	0,08	0,6	5,85	2,4	1,23	21,65
B3	0,33	0,33	0	0,02	-0,02	0,14	6,09	-0,32	0,63	26
B4	0,61	0,53	0,09	0,06	0,03	0,14	4,56	NA	NA	NA
B5	2,33	1,59	0,75	0,12	0,63	0,15	6,4	NA	NA	NA
C1	1,04	0,85	0,19	0,12	0,07	1,08	4,42	4,72	3,79	30,16
C2	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
C3	0,8	0,52	0,28	0,1	0,18	0,34	4,82	2,51	2,92	68,94
C4	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
D1	2,18	1,61	0,58	0,17	0,41	0,28	6,12	0,51	0,65	33,08
D2	1,88	1,04	0,84	0,15	0,69	0,38	5,76	NA	NA	NA

Fortsetzung S12:

Proben ID	Latitude	Longitude	Salinität [ms/cm]	Salinität [‰]	Temp. [°C]	pH	Sauerstoff [mg/L]
D3	19.4501333	110.78	51,3	32,89	26,1	8,14	7,13
D4	19.44875	110.7820667	51,3	32,96	26	8,51	6,8
D5	19.4477	110.7838667	51,5	33,32	25,7	8,16	6,62
D6	19.4461833	110.7856667	51,4	32,96	26,1	8,22	7,5
F1	19.419	110.74935	51,4	29,62	31,2	8,49	15,44
F2	19.4198333	110.7582667	52	32,13	27,9	8,08	NA
F3	19.4184333	110.76035	51,8	31,65	28,4	8,2	NA
F4	19.4171833	110.76235	51,8	32,06	27,8	8,23	NA
F5	19.4159167	110.7643167	51,4	31,44	28,3	8,16	NA
F6	19.41445	110.7661	51,5	32,47	26,9	8,18	NA
R1	19.42885	110.7362	18,73	9,59	32	8,11	NA
R2	19.4299667	110.7414833	29,3	16,25	30,1	8,05	NA
R3	19.4343333	110.7479	40,8	23,51	29,9	8,08	NA
R4	19.4417833	110.76125	50,5	30,25	29,2	8,42	NA

Fortsetzung S12:

Proben ID	DIN [μM]	NH_4^+ [μM]	Nox [μM]	NO_2 [μM]	NO_3 [μM]	PO_4^{3-} [μM]	Si [μM]	Chla [$\mu\text{g/L}$]	Pheo [$\mu\text{g/L}$]	TSM [mg/L]
D3	0,89	0,32	0,57	0,08	0,49	0,14	5,6	NA	NA	NA
D4	2,11	1,12	0,99	0,14	0,84	0,59	4,88	0,58	0,25	23,13
D5	1,67	0,82	0,84	0,11	0,73	0,23	3,64	NA	NA	NA
D6	1,93	1,33	0,6	0,13	0,47	0,21	3,64	NA	NA	NA
F1	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
F2	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
F3	0,14	0,1	0,03	0,04	-0,01	0,33	7,77	NA	NA	NA
F4	0,2	0,2	0	0,03	-0,03	0,16	3,61	NA	NA	NA
F5	2,4	1,75	0,65	0,06	0,59	0,15	4,51	0,58	-0,07	21,34
F6	NA	NA	NA	∇N	∇N	∇N	∇N	∇N	∇N	∇N
R1	NA	79,44	48,29	31,16	16,97	27,95	17,91	62,71	NA	NA
R2	NA	61,11	37,36	23,74	8,92	20,49	10,98	41,18	NA	NA
R3	NA	10,32	6,6	3,73	1,03	0,26	1,27	7,75	NA	NA
R4	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA

Fortsetzung S12:

Proben ID	Latitude	Longitude	Salinität [ms/cm]	Salinität [‰]	Temp. [°C]	pH	Sauerstoff [mg/L]
AQ1	19.85998	110.9575767	39,8	24,05	27,7	8,48	7,47
AQ2	19.85998	110.9575767	31,5	18,45	27,8	8,39	7,85
AQ3	19.85998	110.9575767	42,8	23,21	33,2	8,08	5,86
AQ4	19.85998	110.9575767	38,5	20,72	33	7,95	5,6
AQ5	19.4226833	110.75435	51,9	31,79	28,3	8,1	6,03
AQ6	19.4226833	110.75435	51,9	31,79	28,3	8,01	6,06
AQ7	19.4242333	110.7485167	37,4	20,34	32,3	8,72	15,26
AQ8	19.42445	110.7489333	40	23,33	29,2	7,79	7,36
AQ9	19.48085	110.79755	44,5	25,27	31,1	8,48	11,37
AQ10	19.48085	110.79755	47,5	27,23	31	8,25	12,07
AQ11	19.48085	110.79755	44,9	25,67	30,8	7,36	4,57
AQ12	19.4780667	110.79195	48,7	29,92	27,8	7,64	5,92
AQ13	19.4783833	110.7924	40,5	24,52	27,5	7,65	4,35
AQ14	19.4784333	110.79255	41,3	24,84	27,9	8,48	6,41

Fortsetzung S12:

Proben ID	DIN [µM]	NH ₄ ⁺ [µM]	Nox [µM]	NO ₂ [µM]	NO ₃ [µM]	PO ₄ ³⁻ [µM]	Si [µM]	Chla [µg/L]	Pheo [µg/L]	TSM [mg/L]
AQ1	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
AQ2	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
AQ3	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
AQ4	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
AQ5	13,7	9,51	4,19	0,94	0,72	0,45	15,85	NA	NA	NA
AQ6	14,99	10,97	4,02	1,09	0,55	0,56	15,89	NA	NA	NA
AQ7	8,93	4,39	4,54	2,17	1,08	83,51	137,22	NA	NA	NA
AQ8	100,2	27,68	72,51	9,28	69,21	38,57	59,23	NA	NA	NA
AQ9	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
AQ10	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
AQ11	637,89	582,77	55,12	39,95	51,68	22,66	16,18	NA	NA	54,31
AQ12	438,07	370,36	67,7	56,88	64,27	94,99	4,66	243,38	94,77	371,7
AQ13	408,62	379,32	29,3	24,76	25,82	46,03	6,54	108,74	219,88	165,59
AQ14	6,57	6,56	0,01	0,27	-3,52	2,27	7,72	15,97	17,39	169,57

Fortsetzung S12:

Proben ID	Latitude	Longitude	Salinität [ms/cm]	Salinität [‰]	Temp. [°C]	pH	Sauerstoff [mg/L]
AU1	19.85998	110.9575767	26,9	15,61	27,5	8,15	7,02
AU2	19.85998	110.9575767	37,1	22,25	27,5	7,85	6,49
AU3	19.85998	110.9575767	34,4	20,46	27,5	8,95	9,54
AU4	19.85998	110.9575767	33,4	19,81	27,5	8,82	8,22

Fortsetzung S12:

Proben ID	DIN [μM]	NH_4^+ [μM]	Nox [μM]	NO_2 [μM]	NO_3 [μM]	PO_4^{3-} [μM]	Si [μM]	Chla [$\mu\text{g/L}$]	Pheo [$\mu\text{g/L}$]	TSM [mg/L]
NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA

S13: Pair-wise PERMANOVA und PERMDISP für die vier Probenmaterialien Seegras, Sediment, Tiergewebe und Wasser auf Basis der bakteriellen OTUs.

Faktoren	PERMANOVA	PERMDISP
	p	p
Seegras_Sediment	0,001	0,001
Seegras_Tiergewebe	0,001	0,001
Seegras_Wasser	0,001	0,01
Sediment_Tiergewebe	0,001	0,002
Sediment_Wasser	0,001	0,05
Tiergewebe_Wasser	0,001	0,08

S14: Pair-wise PERMANOVA und PERMDISP innerhalb der Sedimentproben auf Basis der bakteriellen OTUs.

Faktoren	PERMANOVA	PERMDISP
	p	p
Küstenähnlich_Aquakulturähnlich	0,001	0,04

S15: Pair-wise PERMANOVA und PERMDISP innerhalb der Wasserproben auf Basis der bakteriellen OTUs.

Faktoren	PERMANOVA	PERMDISP
	p	p
Küstenähnlich_Aquakulturähnlich	0,001	0,95

S16: Kruskal-Wallis-Test für die *Vibrio*-Abundanzen zwischen Sediment und Wasser der Küsten-/Flussproben

Faktoren	chi-squared	p
Wasser_Sediment	9,9743	0.0016

S17: Kruskal-Wallis-Test für die *Vibrio*-Abundanzen zwischen Sediment, Wasser und Seegras der Küsten-/Flussproben

Faktoren	chi-squared	p
Wasser_Sediment_Seegras	16,576	0,0002515

S18: Paarweiser Vergleich mittels Conover-Iman-Test und Benjamini-Hochberg-Korrektur für die *Vibrio*-Abundanzen zwischen Sediment, Wasser und Seegras der Küsten-/Flussproben

Faktoren	p
Wasser_Sediment	0,0014
Wasser_Seegras	0,2094
Sediment_Seegras	0,0018

S19: Kruskal-Wallis-Test für die *Vibrio*-Abundanzen im Wasser zwischen Küstenproben und Aquakulturproben

Faktoren	chi-squared	p
Wasser-Aquakulturen_Wasser-Küste	22,172	2,493 x10 ⁻⁶

S20: Kruskal-Wallis-Test für die *Vibrio*-Abundanzen im Sediment zwischen Küstenproben und Aquakulturproben

Faktoren	chi-squared	p
Sediment-Aquakulturen_Sediment-Küste	1,7552	0,1852

S21: Relative Abundanz (%) der *Enterobacteriaceae* 16S rRNS Gen-Kopienanzahl in der Illumina 16S Sequenzierung in den verschiedenen Probenmaterialien Werte sind auf die zweite Kommastelle gerundet. – = Keine Probe vorhanden; AQ = Aquakultur; A-F = Küstentranssekt, R = Flusstranssekt, AU = Aufreinigungsbecken

Proben ID	Wasser	Sediment	Seegras	Gewebe
AQ01	0	-	-	0,001
AQ02	0	-	-	0
AQ03	0,001	-	-	0
AQ04	0	-	-	0
AQ05	0	0	-	0
AQ06	0	0	-	0
AQ07	0	0	-	-
AQ08	0	0	-	-
AQ09	0	0	-	-
AQ10	0	0,005	-	-
AQ11	0	0,001	-	-
AQ12	0	0,001	-	-
AQ13	0,001	0,004	-	0
AQ14	0,001	0,005	-	0,008
AU1	0,054	-	-	-
AU2	0,009	-	-	-
AU3	0	-	-	-
AU4	0	-	-	-
A1	0,001	-	-	-
A2	0	-	-	-
A3	0,001	-	-	-
B1	0,019	0,001	-	-
B2	0,001	0	-	-
B3	0	0	-	-
B4	0	0	0	-
B5	0	0	0	-
C1	0,003	0	-	-
C2	0,001	0	-	-
C3	0	0	0	-
C4	0	0	-	-
D1	0	0	-	-
D2	0	0	-	-
D3	0	0	0	-
D4	0	0	-	-
D5	0	0	-	-
D6	0	0	0	-
F1	0,012	0	-	-
F2	0	0	-	-
F3	0	0	-	-
F4	0,014	0	0	-
F5	0,001	0	0	-
F6	0	0,001	0	-
R1	0,024	0,002	-	-
R2	0,003	0,002	-	-
R3	0,028	0	-	-
R4	0,019	0,003	-	-

S22: Pair-wise-PERMANOVA und PERMDISP für die vier Probenmaterialien Seegras, Sediment, Tiergewebe und Wasser auf Basis der *Vibrio*-OTUs.

Faktoren	PERMANOVA	PERMDISP
	p	p
Seegras_Sediment	0,002	0,43
Seegras_Tiergewebe	0,002	0,84
Seegras_Wasser	0,002	0,487
Sediment_Tiergewebe	0,002	0,298
Sediment_Wasser	0,002	0,853
Tiergewebe_Wasser	0,002	0,328

S23: Pair-wise-PERMANOVA und PERMDISP für das Probenmaterial Sediment zwischen der aquakulturähnlichen Gruppe und der küstenähnlichen Gruppe auf Basis der *Vibrio*-OTUs.

Faktoren	PERMANOVA	PERMDISP
	p	p
Küstenähnlich_Aquakulturähnlich	0,001	0,15

S24: Pair-wise-PERMANOVA und PERMDISP für das Probenmaterial Wasser zwischen der zwischen der aquakulturähnlichen Gruppe und der küstenähnlichen Gruppe auf Basis der *Vibrio*-OTUs

Faktoren	PERMANOVA	PERMDISP
	p	p
Küstenähnlich_Aquakulturähnlich	0,001	0,01

S25: Ergebnisse der envfit-Funktion zur Abschätzung des Einflusses von Umweltparametern

Faktoren	r ²	p
Salinität	0.5347	0.002
Temperatur	0.4283	0.006
Phosphat	0.4895	0.004

S26: Pair-wise-PERMANOVA und PERMDISP für das Probenmaterial Wasser zwischen der Proben mit einer Salinität unter 30‰ und der Gruppe über 30‰

Faktoren	PERMANOVA	PERMDISP
	p	p
<30‰_>30‰	0,001	0,01

S27: Pair-wise-PERMANOVA und PERMDISP für das Probematerial Wasser zwischen der Proben mit Phosphatgehalt unter $1\mu\text{M}$ und der Gruppe über $1\mu\text{M}$

Faktoren	PERMANOVA p	PERMDISP p
< $1\mu\text{M}$ _> $1\mu\text{M}$	0,001	0,01

S28: Pair-wise-PERMANOVA und PERMDISP für das Probematerial Wasser zwischen der Proben mit einer Wassertemperatur über $28,6\text{ }^\circ\text{C}$ und der Gruppe unter $28,6\text{ }^\circ\text{C}$.

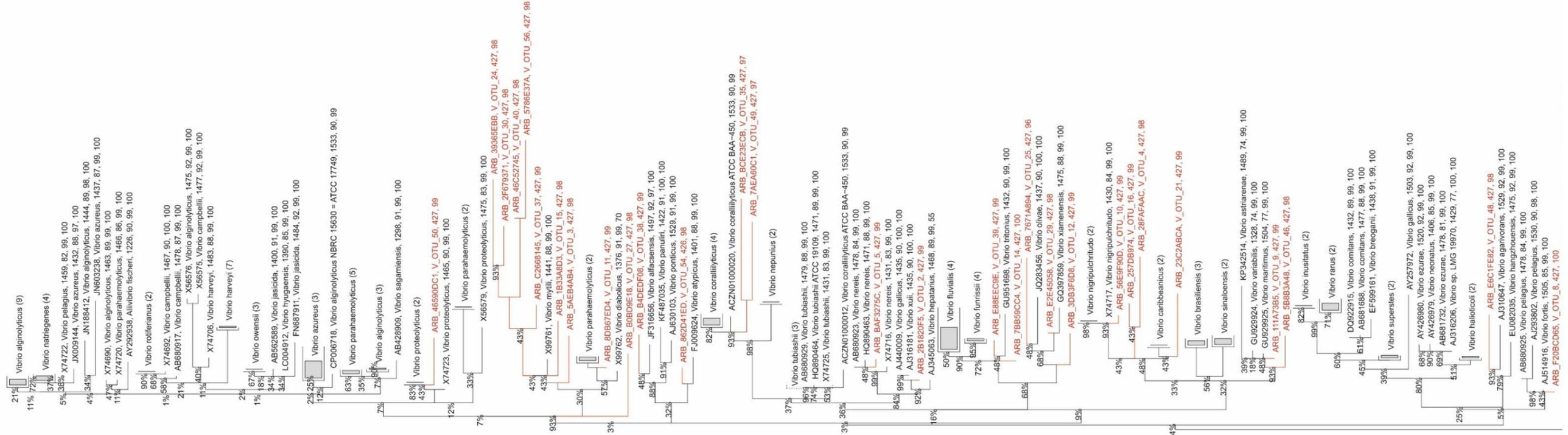
Faktoren	PERMANOVA p	PERMDISP p
< $28,6\text{ }^\circ\text{C}$ _> $28,6\text{ }^\circ\text{C}$	0,002	0,53

S29: Kruskal-Wallis-Test für die Anzahl an *Vibrio*-OTUs im Wasser zwischen Küstenproben und Aquakulturproben

Faktoren	chi-squared	p
Wasser-Aquakulturen_Wasser-Küste	23,427	$1,298 \times 10^{-6}$

S30: Kruskal-Wallis-Test für die Anzahl an *Vibrio*-OTUs im Sediment zwischen Küstenproben und Aquakulturproben

Faktoren	chi-squared	p
Wasser-Aquakulturen_Wasser-Küste	11,549	0,0007



S31: Phylogenetischer 16S rRNS Gen-Baum konstruiert mittels ARB-Software. *Vibrio*-Typus-Stämme aus der ARB-Datenbank sind in schwarz dargestellt. Die 58 *Vibrio*-OTUs aus Hainan werden in rot dargestellt. (modifiziert nach Möller *et al.* 2020)

5.3 Abkürzungsverzeichnis

APW	Alkalisches Pepton wasser
AQ	Aquakultur
BDAL	Bruker Daltonics Datenbank
CA	Chroma-Agar
COVIS	Cholera and Other <i>Vibrio</i> Illness Surveillance
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
Chla	Chlorophyll a
CPS	<i>Capsular Polysaccharides</i> (Kapsuläre Polysaccharide)
ddPCR	<i>Droplet Digital Polymerase Chain Reaction</i> (digitale Droplet Polymerase Kettenreaktion)
DEPC	Diethylpyrocarbonat
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
KBE	Koloniebildende Einheit
LAGuS M-V	Landesamt für Gesundheit und Soziales Mecklenburg-Vorpommern
MALDI-ToF-MS	<i>Matrix Assisted Laser Desorption Ionization – Time of Flight Mass Spectrometry</i> (Matrix–Unterstützte Laser–Desorption–Ionisierung mit Flugzeitanalyse zur Massenspektrometrie)
MB-Agar	<i>Marine Broth Agar</i> (Marine-Bouillon Agar)
Mbp	<i>Megabasenpaare</i>
nMDS	<i>Non-metric multidimensional scaling</i> (Nichtmetrische multidimensionale Skalierung)
OTU	<i>Operational Taxonomic Unit</i> Operative taxonomische Einheiten

TCBS	<i>Thiosulfate Citrate Bile Sucrose</i> (Thiosulfat Citrat Galle Saccharose)
TSM	<i>Total suspended matter</i> (gesamt suspendiertes Material)
Temp.	Temperatur
VBNC	<i>Viable but non-culturable</i> (lebendig aber nicht kultivierbar)

5.4 Abbildungsverzeichnis

Einleitung

Abbildung 1.1	Mikroskopisches Bild und schematische Darstellung einer <i>Vibrio cholerae</i> -Zelle.	1
Abbildung 1.2	WHO-Karte auftretender Cholera-Fälle im Zeitraum 2010-2015.....	9
Abbildung 1.3	Anzahl der registrierten Infektionen, durch nicht Cholera verursachende Vibrionen in den USA im Zeitraum von 1999 – 2014.....	11
Abbildung 1.4	Auftretende <i>Vibrio</i> -Infektionen im Raum der südlichen Ostsee für den Zeitraum von 2003 – 2018.	14

Ergebnisse

Abbildung 3.1	Karte der östlichen deutschen Ostseeküste.	33
Abbildung 3.2	<i>Vibrio</i> spp.-Zellzahl ermittelt durch <i>in silico</i> verbesserte ddPCR-16S rRNS Gen-Quantifizierung.	34
Abbildung 3.3	<i>Vibrio</i> spp.-Zellzahlen in Abhängigkeit von der Wassertemperatur..	36
Abbildung 3.4	Quantifizierung der absoluten <i>Vibrio</i> spp.-Zellzahl in den Sommerproben 2015 aus Warnemünde mittels Kultivierung und ddPCR.	37
Abbildung 3.5	Relative Abundanz des <i>Vibrio</i> spp.-16S rRNS Gens, ermittelt durch <i>in silico</i> verbesserte ddPCR-16S rRNS Gen-Quantifizierung.	38
Abbildung 3.6	Relative Abundanz der Kopienanzahl des <i>Vibrio</i> -16S rRNS Gens im Verhältnis zur bakteriellen 16S rRNS Gen-Kopienanzahl für die Sommerproben Warnemünde 2015.....	39
Abbildung 3.7	nMDS-Plot der bakteriellen Gemeinschaft in den Sommerproben aus Warnemünde 2015..	41
Abbildung 3.8	nMDS-Plot der Vibrionen-Gemeinschaft in den Sommerproben aus Warnemünde 2015... ..	42

Abbildung 3.9	Durch MALDI-ToF-MS ermittelte Artzusammensetzung der Vibrionen in den verschiedenen Materialien und Probestandorten für den Sommer 2015.....	43
Abbildung 3.10	Theoretischer Anteil von <i>N. melanostomus</i> als Habitat für <i>Vibrio</i> spp. im Winter 2015/16 in Warnemünde.....	46
Abbildung 3.11	Standortübersicht der genommenen Proben im Raum Hainan, sowie innerhalb der firmenbetriebenen Aquakultur.....	47
Abbildung 3.12	nMDS-Plot der bakteriellen Gemeinschaft für die Proben aus der Region Hainan.....	49
Abbildung 3.13	nMDS-Plot der bakteriellen Gemeinschaft für Sediment- und Wasserproben aus der Region Hainan..	50
Abbildung 3.14	Relative Abundanz der potentiell humanpathogenen Gruppen <i>Vibrio</i> , <i>Enterobacteriaceae</i> und <i>Legionellaceae</i> im Wasser und Sediment.....	52
Abbildung 3.15	3D-nMDS-Plot der <i>Vibrio</i> -Gemeinschaft auf Basis der 58 <i>Vibrio</i> -OTUs in den verschiedenen untersuchten Materialien.	57
Abbildung 3.16	nMDS-Plot der <i>Vibrio</i> -Gemeinschaft auf Basis der 58 <i>Vibrio</i> -OTUs im Sediment.	58
Abbildung 3.17	nMDS-Plot der <i>Vibrio</i> -Gemeinschaft auf Basis der 58 <i>Vibrio</i> -OTUs im Wasser.....	60-62
Abbildung 3.18	Heat-Map der relativen Abundanz der <i>Vibrio</i> -OTU-Kopienanzahl in den Probenahmestationen, sortiert nach Salinität und Habitat.....	65
Abbildung 3.19	Co-Occurrence-Netzwerkkarte für die drei <i>Vibrio</i> -OTUs 1-3 auf OTU-Level in Wasserproben aus den beprobten Küstengebieten und Aquakulturen.....	67
Abbildung 3.20	Co-Occurrence-Netzwerkkarte für die drei <i>Vibrio</i> -OTUs 1-3 auf OTU-Level in Sedimentproben aus den beprobten Küstengebieten und Aquakulturen.....	68

5.5 Tabellenverzeichnis

Einleitung

Tabelle 1.1	Übersicht über humanpathogene <i>Vibrio</i> -Arten sowie ihren Nachweis in klinischen Proben.	5
-------------	--	---

Ergebnisse

Tabelle 3.1	Vergleich der <i>Vibrio</i> spp.-Zellzahl in individuell untersuchten Fischen und Kompartimenten aus dem Sommer 2018..	35
Tabelle 3.2	Detektion der Virulenz-Faktoren HP1, <i>viuB</i> und <i>rtxA1</i> in <i>Vibrio vulnificus</i> -Isolaten aus der Ostsee.	44-45
Tabelle 3.3	Relative Abundanz (%) der <i>Vibrio</i> -16S rRNS Gen-Kopienanzahl in der Illumina-16S rRNS Gen-Sequenzierung in den verschiedenen Probematerialien.	53-54
Tabelle 3.4	Relative Abundanz (%) der <i>Legionellaceae</i> -16S rRNS Gen-Kopienanzahl in der Illumina-16S rRNS Gen-Sequenzierung in den verschiedenen Probematerialien.	55-56
Tabelle 3.5	Anzahl gefundener <i>Vibrio</i> -OTUs in den verschiedenen Materialien.	62-63

5.6 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich gerne bei all jenen bedanken, die mich während meiner Arbeit unterstützt, begleitet und diese Promotion damit erst ermöglicht haben.

An erster Stelle möchte ich daher Matthias Labrenz für die Chance danken, an diesem spannenden Thema zu arbeiten. Seine Erfahrung, sein Wissen und seine bei Fragen stets offene Tür halfen mir, auch in schwierigen Situationen voranzukommen.

Einen großen Dank an Heike Benterbusch für die langjährige Unterstützung im Labor und ihr immer offenes Ohr.

Danke auch an Andreas Müller, der mich auf meiner Reise nach Hainan begleitet hat, und auf dessen Erfahrung ich mich während der langen Nächte im Feld immer verlassen konnte.

Auch möchte ich den momentanen und ehemaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Umweltmikrobiologie meinen Dank aussprechen: Franziska Klaeger, Fabiola Henning, Sonja Oberbeckmann, Sophie Charvet, Janine Wäge, Juliana Ivar do Sul, Alexander Tagg, Robin Lenz, Kristina Enders, Brittan Scales, Inga Hennl, Stephanie Mothes und Günter Jost. Die Arbeit mit euch war großartig.

Ebenso herzlichen Dank an all die weiteren Personen vom Institut, die mir Geräte erklärt und Methoden beigebracht haben, oder einfach für wissenschaftliche Gespräche offen waren: Christian Meeske, Rainer Bahlo, Christian Stolle, Sascha Plewe, Christin Laudan, Mercé Berga, Christian Burmeister, Ronny Baaske, Jan Henkel und Philipp Braun,

Mein Dank geht an Katharina Kesy und René Janßen nicht nur als tolle Bürokollegen, sondern auch als Freunde.

Dem BMBF (Bundesministerium für Bildung und Forschung) und der Forschungstiftung Ostsee möchte ich für die Förderung der Projekte ECOLOC bzw. Vibrio-MV meinen Dank ausrichten, in deren Rahmen diese Arbeit entstanden ist.

Zu guter Letzt möchte ich meinen Freunden und meiner Familie danken. Allen voran meinen Eltern, die immer hinter mir standen und mich in all meinen Bestrebungen unterstützten.

Euch allen ein herzliches Dankeschön.

5.7 Selbstständigkeitserklärung

Ich versichere hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt und ohne fremde Hilfe verfasst habe, keine außer den von mir angegebenen Hilfsmitteln und Quellen dazu verwendet habe und die den benutzten Werken inhaltlich und wörtlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Rostock, den 14.08.2020

Lars Möller

5.8 Curriculum Vitae des Autors

Lars Möller *10.06.1990 / Berlin

Bildungsweg und wissenschaftlicher Werdegang

10/2015 – dato	Leibniz-Institut für Ostseeforschung Warnemünde (IOW) Promotion Thema: <i>Vibrio</i> spp. in anthropogen beeinflussten Küstenökosystemen mit Gastaufenthalt am Alfred-Wegener-Institut auf Helgoland (Helmholtz-Zentrum für Polar- und Meeresforschung)
11/2014 – 09/2015	Leibniz-Institut für Ostseeforschung Warnemünde (IOW) Anstellung als wissenschaftlicher Assistent
10/2012 – 10/2014	Universität Rostock Masterstudium Mikrobiologie und Biochemie Masterarbeit: Untersuchungen zu Phosphatanreicherungen in einem Schlüsselorganismus pelagischer Redoxklinen, <i>Sulfurimonas gotlandica</i> GD1 ^T Note der Masterarbeit: 1,0 Gesamtnote: 1,0 (mit Auszeichnung)
10/2009 – 09/2012	Universität Rostock Bachelorstudium Biowissenschaften Bachelorarbeit: Klonierung und Transformation des Gens Sod_d0970 aus <i>Serratia odorifera</i> 4Rx13 Note der Bachelorarbeit: 1,0 Gesamtnote: 1,4

Praktika vor und neben dem Studium

- 2013** **Proteom-Zentrum Rostock der Universitätsmedizin zu Rostock**
Profiling von Blutserum mittels hydrophober Affinitäts-Partikel und ESI-MS Analysen
- 2013** **Leibniz-Institut für Ostseeforschung Warnemünde (IOW)**
Untersuchungen von *Sulfurimonas gotlandica* GD1^T mittels EDX-Analysen
- 2005, 2007, 2008** **Museum für Naturkunde – Leibniz Institut für Evolutions- und Biodiversitätsforschung, Berlin (MfN)**
Sammlungspflege, -erschließung und -konservierung, embryologische Sammlung

Tagungen, Vorträge, Studienbegleitende Tätigkeiten

- 08/2018** **17th International Symposium on Microbial Ecology**
Poster: Baltic Sea goby and herring are potential reservoirs for *Vibrio* spp. in winter
- 06/2017** **The biennial Baltic Sea Science Congress (BSSC)**
Poster: Polyphosphates maintain chemotactic movement of *Sulfurimonas gotlandica* GD1^T at substrate-limited conditions in Baltic pelagic redoxclines
- 06/2015** **Rostock's Eleven, Rostock denkt 365 Grad**
Wettbewerb für Wissenschaft und Kommunikation
- 07/2008 – 01/2015** **Museum für Naturkunde – Leibniz Institut für Evolutions- und Biodiversitätsforschung, Berlin (MfN)**
Ehrenamtliche Tätigkeit in der Embryologischen Sammlung, in der Säugetier-Abteilung, im Histologischen Labor, im Isotopenlabor, in der Genetik und im Bereich Meeresbiologie

Stipendien und Auszeichnungen

- 10/2014** **Fakultätspreis, Mathematisch-Naturwissenschaftliche-Fakultät Rostock** Jahrgangsbester des Masterstudienganges Mikrobiologie und Biochemie 2013-2014
- 10/2012 – 09/2014** **Deutschlandstipendium der Universität Rostock**
Dauer des gesamten Masterstudiums

Publikationsliste

Non-indigenous species round goby (*Neogobius melanostomus*) as a new winter reservoir for *Vibrio* spp. in the German Baltic Sea coast

Möller L., Kreikemeyer B., Gerdts G., Jost G., Labrenz M.

(Eingereicht)

Impact of coastal aquaculture operation systems in Hainan island (China) on the relative abundance and community structure of *Vibrio* in adjacent coastal systems

Möller L., Kreikemeyer B., Luo Z. H., Jost G., Labrenz M.

Estuarine, Coastal and Shelf Science, 2020; **233**: 106542

DOI: 10.1016/j.ecss.2019.106542

Sulfurimonas subgroup GD17 cells accumulate polyphosphate under fluctuating redox conditions in the Baltic Sea: possible implications for their ecology

Möller L., Laas P, Rogge A., Goetz F., Bahlo R., Leipe T., Labrenz M.

ISME J. 2019; **13**(2): 482–493

DOI: 10.1038/s41396-018-0267-x

Modern and classic approaches towards revealing the orbital mosaic in the common shrew *Sorex araneus* Linnaeus, 1758 (Soricidae, Lipotyphla, Mammalia)

Giere P., **Möller L.**, Hilger A., Paulke A., Riesemeier H., Kuehbacher M.

Zoosyst. Evol. 2010; **86**(2), 343-350

DOI: 10.1002/zoos.201000016