李小义,张效平,赵 凤,等. 鲟鱼肠道微生物多样性的研究[J]. 江苏农业科学,2018,46(24):164-167. doi:10.15889/i, issn. 1002-1302.2018.24.044

鲟鱼肠道微生物多样性的研究

李小义,张效平,赵凤,孔杰,赵飞,周洲,王艳艳(贵州省农业科学院水产研究所,贵州贵阳 550025)

摘要:从贵州省水产研究所惠水试验基地采集杂交鲟鱼、养殖水体及饲料等样品,对鲟鱼前肠、中肠及后肠肠道微生物、养殖水体及饲料等样品微生物 DNA 进行提取扩增,结合宏基因组学测序技术和生物信息学分析等手段,对鲟鱼肠道微生物多样性进行分析。结果表明,在门水平上,变形菌门(Proteobacteria)在前肠、中肠、后肠及水样等样品为主要优势菌群,丰度分别为 75.0%、57.4%、66.0%、50.8%。饲料样品中蓝细菌(Cyanobacteria)丰度最高,为 59.5%。属水平分析,前肠样品组 G6 中,假单胞菌属(Pseudomonas)丰度最高,为 23.18%,其次为气单胞菌属(Aeromonas,7.23%)、不动杆菌属(Acinetobacter,3.73%)、黄杆菌属(Flavobacterium,2.47%)、unidentified Marinilabiaceae(2.43%)、Sedimenticola(2.20%)。中肠样品组 G7 中,以 unidentified Marinilabiaceae(4.22%)、Sedimenticola(3.13%)、地杆菌属(Geobacter,2.60%)、假单胞菌属(Pseudomonas,2.37%)、不动杆菌属(Acinetobacter,1.74%)、气单胞菌属(Aeromonas,1.40%)为主。后肠样品组 G8 中,主要包括气单胞菌属(Aeromonas,0.52%)、假单胞菌属(Pseudomonas,0.47%)、不动杆菌属(Acinetobacter,0.13%)、Sedimenticola(0.07%)、unidentified Marinilabiaceae(0.06%)、unidentified Chloroplast(0.03%)。前肠、中肠肠道微生物类型及丰度差异不大,后肠细菌和前、中肠内细菌差异明显。

关键词:肠道微生物;鲟鱼;高通量;多样性

中图分类号: S917.1 文献标志码: A 文章编号:1002-1302(2018)24-0164-04

肠道微生物是人体及动物肠道的正常组成部分,对宿主的营养和健康有重要影响。研究表明,肠道微生物可参与宿主的营养物质消化吸收、能量代谢、过敏、自身免疫疾病等多方面调节过程[1-3],对宿主的年龄亦有指示作用[4]。近年来,

收稿日期:2017-07-28

- 基金项目:贵州省科学技术基金(编号:黔科合 J字 LKN[2013]11 号);贵州省农业科学院项目(编号:黔农科院院专项[2014]012 号);国家自然科学基金(编号:31660746);贵州省特色水产产业技术体系项目(编号:GZCYTX2013)。
- 作者简介:李小义(1988—),女,贵州贵阳人,硕士,助理研究员,从事水产养殖研究。E-mail;lxw2012@yeah.net。
- 通信作者:王艳艳,硕士,助理研究员,从事水产养殖研究。E mail: wangyy19870117@163.com。
- [8]杜应琼,王富华,李乃坚,等. 新鲜蔬菜硝酸盐含量测定的改进试 粉法[J]. 园艺学报,2005,32(1):49-53.
- [9]位 杰,吴翠云,蒋 媛,等. 蒽酮法测定红枣可溶性糖含量条件的优化[J]. 食品科学,2014,35(24):136-140.
- [10]张 帆,王 倩,马智宏,等. 西瓜可溶性糖和纤维素含量的近 红外光谱测定[J]. 食品科学,2007,28(1);258-261.
- [11] Wang S Z, Pan L, Hu K, et al. Development and characterization of polymorphic microsatellite markers in *Momordica charantia* (Cucurbitaceae) [J]. American Journal of Botany, 2010, 97 (8): E75 - E78.
- [12] 左力辉,张文林,邱 彤,等. 新疆野苹果叶形性状变异及其与 SSR 标记关联分析[J]. 园艺学报,2015,42(4):759-768.
- [13] Excoffier L, Laval G, Schneider S. Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis[J]. Evolutionary Bioinformatics Online, 2005, 1:47-50.

肠道微生物与水产动物的联系受到了越来越多的关注。Kan 等将金鱼暴露在 0~100 μg/L 的五氯苯酚中,对金鱼肠道微生物变化进行了分析,结果表明,拟杆菌属丰度与五氯苯酚浓度呈正相关,拟杆菌门、拟杆菌属及厚壁菌门/拟杆菌门之比对金鱼在五氯苯酚环境中的体质量和肝质量均有重要影响^[5]。Rolig 等对斑马鱼肠神经系统进行缺失突变处理,结果发现肠道发炎个体中促炎性细菌菌群较多,而在同样做缺失突变的肠道正常个体中具有抗炎作用的细菌菌群较多,研究表明肠道微生物对斑马鱼肠道健康具有重要作用^[6]。此外,动物体肠道始终处于动态变化,摄食方式和肠道微生物种类、数量及占例均有影响,动物体内肠道菌群结构合理有助于加快宿主的生长和改善肉质^[7]。唐杨等在凡纳滨对虾饲料中添加蜡样芽孢杆菌,试验组凡纳滨对虾生长速度比空白组平

[14] Hu J H, Pan L, Liu H G, et al. Comparative analysis of genetic diversity in sacred lotus (*Nelumbo nucifera* Gaertn.) using AFLP and SSR markers [J]. Molecular Biology Reports, 2012, 39 (4): 3637 – 3647.

- [15] Mackay I, Powell W. Methods for linkage disequilibrium mapping in crops [J]. Trends in Plant Science, 2007, 12(2):57-63.
- [16] Jorde L B. Linkage disequilibrium and the search for complex disease gene [J]. Genome Research, 2000, 10:1435-1444.
- [17]于志远,王伟威,魏 崃,等. 利用关联分析方法挖掘自然群体中大豆油分和蛋白质含量相关 SSR 标记[J]. 大豆科学,2015,34(6);977-981.
- [18] 冯英娜, 柳李旺, 刘卫东, 等. 茄子 SSR 遗传多样性及其农艺性状的关联分析[J]. 江苏农业学报, 2014, 30(4): 839-847.
- [19]严 玫,韩锁义,董文召,等. 中国主要花生品种品质性状关联 分析[J]. 植物遗传资源学报,2013,14(6):1064-1071.

均快15.2%,且试验组中菌群丰度变化明显,相对不添加蜡样芽孢杆菌的对照组,试验组中变形菌门丰度有所下降,而拟杆菌门丰度有所增加^[8]。

鲟鱼为高蛋白、多脂肪性鱼类,是世界上优良的淡水鱼品种,也是现存于世界上最珍奇古老的冷水性生物鱼群之一,有"活化石"之称,其肉厚骨软,同时鲟鱼卵可以加工成鲟鱼子酱,具有"黑色黄金"之称。鱼体含有人体必需的多种氨基酸,具有很高的经济价值和药用价值。本研究对 10 月龄鲟鱼苗肠道微生物多样性进行了初步分析,获得对鲟鱼健康有利的微生物菌群信息,对益生菌在鲟鱼类饲料添加剂中的应用及减少抗生素使用具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 材料

2016年5月,从贵州省水产研究所惠水试验基地采集10月龄鲟鱼苗数条、养殖水体3L(标记为S)及饲料20g(标记为SL)。迅速带回实验室,不投饵暂养3d。

1.2 试剂与仪器

DNA Marker、细菌 DNA 提取纯化等试剂,购自上海生工生物工程股份有限; Gel - Doc2000 凝胶成像分析仪,购自BIO-RAD公司;电泳仪,购自北京市六一仪器厂。

1.3 鲟鱼肠道采集

待鲟鱼肠粪便排空后,在超净台中对鲟鱼进行解剖取样。用75%乙醇对鲟鱼体表消毒后用解剖剪沿肛门朝前对鲟鱼进行解剖。清理出肠道,75%乙醇擦拭消化道外壁,无菌 PBS 缓冲液冲洗,5 mL 灭菌离心管分别收集前、中、后肠并作标记,Q4、Q5 为前肠样品,Z4、Z5 为中肠样品,H4、H5 为后肠样品。

1.4 肠道微生物 DNA 提取

对解剖取得的鲟鱼肠道样品,使用天根试剂盒提取 DNA,具体方法见试剂盒说明书。用 1.5% 琼脂糖凝胶对提取获得的 DNA 样品质量进行检测,并将合格样品干冰保存寄送北京诺禾致源生物信息科技有限公司进行测序分析。

1.5 16S rDNA 文库构建及多样性分析

利用 16S V4 区引物(515F:5'-GTGCCAGCMGCCGCGG TAA - 3'和 806R:5' - GGACTACHVGGGTWTCTAAT - 3') 对 肠道微生物 DNA 进行扩增。采用 Illumina Hiseq 平台对扩增 获得的测序结果进行分析。截去 Barcode 和引物序列后使用 FLASH 对每个样品的 reads 进行拼接,后去除嵌合体序列,得 到最终有效数据。利用 Uparse 软件(Uparse v7.0.1001) 对所 有样品全部有效数据进行聚类,默认以97%的一致性将序列 聚类成为 OTU。对 OTUs 代表序列进行物种注释,用 Mothur 方法与 SILVA 的 SSUrRNA 数据库进行物种注释分析(设定 阈值为0.8~1.0),获得分类学信息并分别在各分类水平: kingdom(界)、phylum(门)、class(纲)、order(目)、family (科)、genus(属)、species(种)统计各样本的群落组成。使用 PyNAST 软件(Version 1.2)与 GreenGene 数据库中的"Core Set"数据信息进行快速多序列比对,得到所有 OTUs 代表序列 的系统关系。最后以样品数据量最少的为标准对各样品数据 进行均一化处理。使用 Qiime 软件(Version 1.7.0) 计算 Observed - species、Shannon 指数、Goods - coverage、Unifrac 距离 及构建 UPGMA 样品聚类树,使用 R 软件(Version 2.15.3) 绘

2 结果

2.1 细菌 16S rRNA 基因测序结果分析

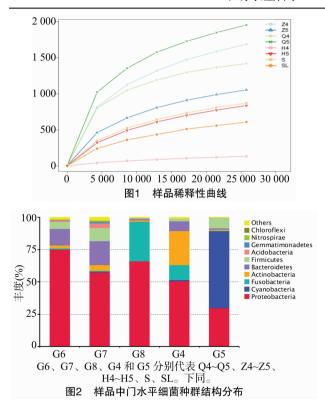
以序列相似性 97% 一致性(identity)的原则将序列聚类 成为1个OTU(operational taxonomic unit)。鲟鱼肠道微生物 样品共获得 8 239 个 OUT. 其中 O4、O5 样品分别含有 1 432、 1771 个 OUTs, Z4、Z5 样品分别含有 1702、1064 个 OUTs, H4、H5 样品分别包含 165、847 个 OUTs(表 1)。从养殖水体 S 样品和饲料 SL 样品中分别获得 861、602 个 OUTs。覆盖率 (good's coverage)是测序获得的序列占整个基因组的比例,用 以评估抽样完整性。本研究中所有样品的覆盖率为97.7%~ 99.7%,表明本次检测结果具有较好的覆盖性。通过单样本 的多样性分析(Alpha 多样性)可以反映样品内的微生物群落 的丰富度和多样性,Shannon 是用来估算样品中微生物多样 性指数之一,其值越大表明群落多样性越高,本研究中鲟鱼肠 道前肠样品 Shannon 指数最高,表明鲟鱼前肠细菌多样性丰 富,后肠样品 Shannon 指数最低,为0.365。结果表明,养殖水 体中细菌多样性较饲料高,而鲟鱼肠道细菌微生物多样性表 现为:前肠>中肠>后肠(表1)。稀释曲线是从样品中随机 抽取一定测序量的数据,统计它们所代表物种数目(即 OTUs 数目),以抽取的测序数据量与对应的物种数来构建曲线。 稀释曲线可直接反映测序数据量的合理性,并间接反映样品 中物种的丰富程度,本研究各样品稀释曲线较为平缓(图1), 说明测序数据量逐渐趋于合理。

表 1 基于 16S rRNA 基因序列的细菌多样性指数

| • | 样品名称 | 可操作分类单元 | Shannon 指数 | 覆盖率(%) |
|---|------------|---------|------------|--------|
| • | Q4 | 1 432 | 8.321 | 0.990 |
| | Q5 | 1 771 | 8.942 | 0.977 |
| | Z 4 | 1 702 | 7.87 | 0.980 |
| | Z5 | 1 064 | 5.745 | 0.986 |
| | H4 | 165 | 0.365 | 0.997 |
| | H5 | 847 | 2.777 | 0.987 |
| | S | 861 | 4.913 | 0.987 |
| | SL | 602 | 2.948 | 0.990 |
| | | | | |

2.2 细菌多样性分析

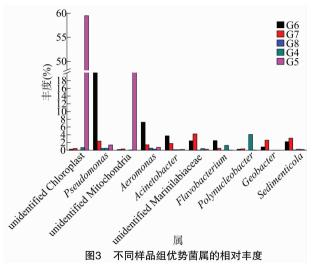
根据物种注释结果在门水平对物种相对丰度进行统计分析,由图 2 可知,其中相对丰度排前 10 的物种包括变形菌门(Proteobacteria)、蓝细菌门(Cyanobacteria)、梭杆菌门(Fusobacteria)、放线菌门(Actinobacteria)、拟杆菌门(Bacteroidetes)、厚壁菌门(Firmicutes)、绿弯菌门(Chloroflexi)、酸杆菌门(Acidobacteria)、芽单胞菌门(Gemmatimonadetes)及硝化螺旋菌门(Nitrospirae)。前肠样品组 G6 中变形菌门相对丰度最高,为 75.0%,其次为拟杆菌门(12.9%)、厚壁菌门(5.2%)、放线菌门(2.3%)、酸杆菌门(1.3%)。中肠样品组 G7 中亦包含较多的变形菌门(57.4%),其次为拟杆菌门(18.6%)、厚壁菌门(10.2%)、放线菌门(4.3%)、酸杆菌门(18.6%)、厚壁菌门(10.2%)、放线菌门(4.3%)、酸杆菌门(3.5%)。后肠样品组 G8 中,除了变形菌门(66.0%)丰度较高以外,梭杆菌门(30.7%)明显高于前肠组(0.71%)和中肠组(0.77%)。水体样品 G4(S)中,



丰度较高的物种包括变形菌门(50.8%)、放线菌门(26.2%)、梭杆菌门(11.7%)、拟杆菌门(7.7%)、厚壁菌门(1.8%)。饲料样品G5(SL)中丰度较高的物种包括蓝细菌门(59.5%)、变形菌门(29.8%)、厚壁菌门(8.1%)、拟杆菌门(1.1%)。前中后肠、水样及饲料样品中变形菌门均为主要优势物种。前中肠细菌在门水平物种类型及丰度差异不大,后肠细菌和前中肠内细菌差异明显。

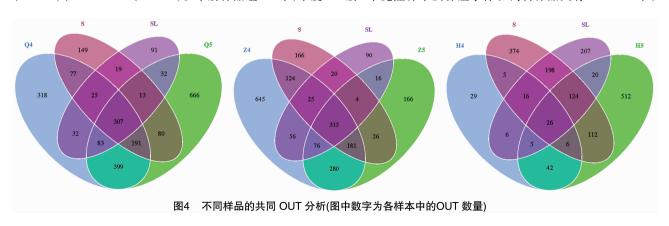
在菌属水平上对每个样品的菌群结构及分布进行统计分析,由图 3 可知,5 个样品组丰度前 10 的菌属包括:假单胞菌属(Pseudomonas)、气单胞菌属(Aeromonas)、不动杆菌属(Acinetobacter)、黄杆菌属(Flavobacterium)、unidentified Marinilabiaceae、Sedimenticola、地杆菌属(Geobacter)、Polynucleobacter、unidentified Chloroplast 及 unidentified Mitochondria。前肠样品组 G6 中,假单胞菌属丰度最高,为23.18%,其次为气单胞菌属(7.23%)、不动杆菌属(3.73%)、黄杆菌属(2.47%)、unidentified Marinilabiaceae (2.43%)、Sedimenticola(2.20%)。中肠样品组 G7 中,丰度

排名前6的菌属分别为 unidentified Marinilabiaceae (4,22%)、 Sedimenticola (3.13%)、 地杆菌属 (2.60%)、 假单胞菌属 (2.37%)、不动杆菌属(1.74%)、气单胞菌属(1.40%)。后 肠样品组 G8 中,主要包括气单胞菌属(0.52%)。假单胞菌属 (0,47%)、不动杆菌属(0,13%)、Sedimenticola(0,07%)、 unidentified Marinilabiaceae (0, 06%), unidentified Chloroplast (0.03%)。养殖水体样品组 G4 中, Polynucleobacter 丰度最高 为 4.06%, 其次为黄杆菌属(1.27%), unidentified Chloroplast (0.70%)、假单胞菌属(0.51%)、unidentified Marinilabiaceae (0.43%)、气单胞菌属(0.29%)。饲料样品组 G5 中. unidentified Chloroplast 丰度最高(59.50%). 其次为 unidentified Mitochondria(21.33%)、假单胞菌属(1.35%)、气 单胞菌属(0.77%), unidentified Marinilabiaceae(0.27%), 不 动杆菌属(0.21%)。不同来源样品组中细菌丰度各不相同, 后肠样品组 G8 细菌多样性与其他组相差较大,不含 unidentified Mitochondria Polynucleobacter 及 Geobacter 等 3 个 属的细菌。



2.3 核心微生物菌落分析

绘制成韦恩图对不同样品(组)之间共有、特有的 OUT 进行分析,由图 4 可知,其中前肠 2 个克隆共有 OUTs 980 个,前肠 2 个克隆样本及养殖水体和饲料样品共有 OUTs 307 个,优势菌属包括 Marinifilum(2.61%)、假单胞菌属(2.28%)、黄杆菌属(1.63%)。中肠 2 个克隆样本共有 OUTs 852 个,中肠2 个克隆样本及养殖水体和饲料样品共有OUTs 315个,



主要包括 Marinifilum (2.54%)、假单胞菌属(2.22%)、黄杆菌属(1.59%)、芽孢杆菌属(1.27%)、unidentified _ Marinilabiaceae(1.27%)及 Bacteroides(1.27%)等菌属。后肠2个克隆样本共有OUTs 79个,后肠样品及养殖水体和饲料共有OUTs 26个,在门水平上主要为变形菌门(73.08%)和厚壁菌门(15.38%)。

3 讨论

近年来,研究者对人体^[9-10]、斑马鱼^[11]、虹鳟鱼^[12]、果蝇^[13]及蝴蝶^[14]等脊椎和非脊椎动物肠道微生物多样性均进行了研究。Ni 等对 24 条草鱼肠道微生物多样性进行了研究,共发现 1 228 种细菌(116 种古细菌和 1 112 种细菌),其中大部分属于厚壁菌门、变形杆菌门及梭杆菌门,此外笔者还发现,以黑麦草为饲料喂养的草鱼肠道微生物在草鱼肠道碳代谢、氨基酸代谢及脂肪酸代谢过程中作用显著^[15]。Tzeng等研究发现,变形杆菌门是日本沼虾肠道微生物丰度最高的细菌门类,其次为厚壁菌门和放线菌门^[16]。李建柱等研究发现鱼菜共生模式下的草鱼、鲫、鲢及鳙 4 种鲤科鱼类肠道微生物优势菌均为鲸杆菌属、梭状芽孢杆菌属、拟杆菌属及芽孢杆菌属,表明鱼类肠道微生物组成不完全由食性决定^[17]。兰阿峰等研究发现大鲵肠道微生物以变形菌门为主,其次还包含梭菌门、芽孢杆菌门及衣原体门^[18]。

目前,对鲟鱼肠道微生物的研究较少。Ghorbani 等对闪光鲟胃肠道可培养细菌进行了分离鉴定,其中分离获得的细菌以肠杆菌科中的气单胞菌、假单胞菌及沙门氏菌为主^[19]。 Zahra 等人从西伯利亚鲟肠道中分离纯化获得 129 株单菌,并利用 5 种致病菌对这 129 株单菌的益生效果进行了研究,其中乳酸球菌属(7 株)、芽孢杆菌属(2 株)及柠檬酸杆菌属(1 株)对致病菌的抵抗作用效果明显^[20]。

采用高通量测序分析方法,本研究对鲟鱼肠道微生物多样性进行了分析。门水平分析,前中肠样品组主要包括变形菌门(Proteobacteria)、拟杆菌门(Bacteroidetes)、厚壁菌门(Firmicutes)及放线菌门(Actinobacteria),该结果与王纯等研究的草鱼肠道微生物组成相似^[21]。后肠样品组中,主要以变形菌门(Proteobacteria)和梭杆菌门(Fusobacteria)为主。有研究表明,宿主健康状况及发育阶段的不同均会对肠道微生物组成产生影响^[22-23]。本研究中,前中后肠微生物差异原因可能与食物在前中后肠中处于不同状态有关,具体原因有待进一步研究。

参考文献:

- [1] Flint H J, Scott K P, Louis P, et al. The role of the gut microbiota in nutrition and health [J]. Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology, 2012, 9(10):577 - 589.
- [2] Navarrete P, Espejo R T, Romero J. Molecular analysis of microbiota along the digestive tract of juvenile Atlantic salmon (Salmo salar L.)
 [J]. Microbial Ecology, 2009, 57(3):550-561.
- [3] Nagalingam N A, Lynch S V. Role of the microbiota in inflammatory bowel diseases [J]. Inflammatory Bowel Diseases, 2012, 18 (5): 968-980.
- [4] Xiong J B, Zhu J Y, Dai W F, et al. Integrating gut microbiota immaturity and disease – discriminatory taxa to diagnose the initiation and severity of shrimp disease [J]. Microbial Ecology, 2017, 19(4):

- 1490 1501
- [5] Kan H F, Zhao F Z, Zhang X X, et al. Correlations of gut microbial community shift with hepatic damage and growth inhibition of *Carassius auratus* induced by pentachlorophenol exposure [J]. Environmental Science & Technology, 2015, 49 (19):11894-11902.
- [6] Rolig A S, Mittge E K, Ganz J, et al. The enteric nervous system promotes intestinal health by constraining microbiota composition[J]. PLOS Biology, 2017, 15(2):e2000689.
- [7]钟 蕾,向建国,曾 丹,等. 饵料对鳡肠道微生物多样性的影响 [J]. 水生生物学报,2016,40(4):830-835.
- [8]唐 杨,刘文亮,宋晓玲,等. 饲料中补充蜡样芽孢杆菌对凡纳滨 对虾生长及其肠道微生物组成的影响[J]. 水产学报,2017,41 (5):765-774.
- [9] Ley R E, Hamady M, Lozupone C, et al. Evolution of mammals and their gut microbes [J]. Science, 2008, 320 (5883):1647-1651.
- [10] Methe B A, Nelson K E, Pop M, et al. A framework for human microbiome research [J]. Nature, 2012, 486 (742):215-221.
- [11] Roeselers G, Mittge E K, Stephens W Z, et al. Evidence for a core gut microbiota in the zebrafish [J]. The ISME Journal, 2011, 5 (10):1595-1608.
- [12] Kim D H, Brunt J, Austin B. Microbial diversity of intestinal contents and mucus in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. Journal of Applied Microbiology, 2007, 102(6):1654-1664.
- [13] Wong A C, Chaston J M, Douglas A E. The inconstant gut microbiota of *Drosophila* species revealed by 16S rRNA gene analysis [J]. The ISME Journal, 2013, 7(10):1922-1932.
- [14] Hammer T J, Mcmillan W O, Fierer N. Metamorphosis of a butterfly associated bacterial community [J]. PLoS One, 2014, 9(1):e86995 e87002.
- [15] Ni J, Yan Q, Yu Y, et al. Factors influencing the grass carp gut microbiome and its effect on metabolism [J]. FEMS Microbiology Ecology, 2014, 87(3):704-714.
- [16] Tzeng T D, Pao Y Y, Chen P C, et al. Effects of host phylogeny and habitats on gut microbiomes of oriental river prawn (*Macrobrachium nipponense*) [J]. PLoS One, 2015, 10(7); e0132860.
- [17]李建柱,侯 杰,张鹏飞,等. 鱼菜共生模式中不同鱼类肠道微生物群落结构的比较[J]. 南方水产科学,2016,12(6):42-50.
- [18] 兰阿峰, 杨 曼, 郭素芬, 等. 免培养法对大鲵肠道微生物多样性的研究[J]. 微生物学通报, 2014, 41(7): 1342 1349.
- [19] Ghorbani Choboghlo H, Khosravi A R, Sharifzadeh A, et al. Gastrointestinal microflora of captured stellate sturgeon (*Acipenser stellatus*, Pallas, 1771) from Southeast Caspian Sea, Iran [J]. Iranian Journal of Fisheries Sciences, 2014, 13(2):319 - 329.
- [20] Geraylou Z, Vanhove M P, Souffreau C A, et al. In vitro selection and characterization of putative probiotics isolated from the gut of Acipenser baerii (Brandt, 1869) [J]. Aquaculture Research, 2014, 45(2):341-352.
- [21]王 纯,倪加加,颜庆云,等. 草鱼与团头鲂肠道菌群结构比较分析[J]. 水生生物学报,2014,38(5);868-875.
- [22] Fujimura K E, Slusher N A, Cabana M D. Role of the gut microbiota in defining human health [J]. Expert Review of Anti Infective Therapy, 2010, 8(4):435-454.
- [23] Moran D, Turner S J, Clements K D. Ontogenetic development of the gastrointestinal microbiota in the marine herbivorous fish *Kyphosus* sydneyanus [J]. Microbial Ecology, 2005, 49(4):590-597.