



壳寡糖对虎龙斑的生长、免疫及肠道菌群的影响

施 斐¹, 黄 垚¹, 卢志杰¹, 邹翠云¹, 谭小红¹,
苏友禄¹, 汤开浩², 秦真东^{1*}, 林 鑫^{1*}

(1. 仲恺农业工程学院动物科技学院, 广东省水环境与水产品安全工程技术研究中心,

广州市水产病害与水禽养殖重点实验室, 广东广州 510225;

2. 中国科学院南海海洋研究所, 中国科学院热带海洋生物资源与生态重点实验室, 广东广州 510301)

摘要: 为研究壳寡糖(OCS)作为绿色饲料添加剂在石斑鱼免疫调控机制中的作用, 实验通过在基础饲料中添加0(对照组)、200、400、800和1600 mg/kg的壳寡糖, 配制出5种实验饲料并投喂虎龙斑4周后, 分析饲料中添加壳寡糖对虎龙斑的生长、非特异性免疫、肠道菌群多样性以及抗病力的影响。结果显示, 壳寡糖能显著提高石斑鱼的增重率、降低饲料系数, 但对肥满度和存活率无显著影响。采用实时荧光定量PCR(qRT-PCR)技术对虎龙斑中肠的免疫基因表达进行检测, 结果显示壳寡糖可显著提高免疫相关基因的表达水平, 激活炎症因子TNF- α 、IL-1 β 、TGF- β 1、TOR和TLR3的表达, 提高GPx、CAT和MnSOD的表达来改善抗氧化能力, 并增加紧密连接蛋白ZO-1、ZO-2、ZO-3和Claudin-3 α 的表达。通过微生物组高通量测序来揭示壳寡糖投喂石斑鱼的肠道微生物群落结构, 发现实验组和对照组肠道细菌优势类群丰度和 α 多样性无显著差异; 但是800 mg/kg组的益生菌所占丰度增加, 细菌群落 β 多样性差异明显, 可改变其群落组成结构。哈维氏弧菌攻毒7 d后, 800 mg/kg组的累积死亡率显著低于对照组和其他实验组, 并显著改善肠道形态。研究表明, 饲料中添加适量的壳寡糖能促进虎龙斑的生长、提高免疫力、改善肠道菌群及增强抗病力。

关键词: 虎龙斑; 壳寡糖; 哈维氏弧菌; 生长性能; 免疫反应; 肠道菌群; 抗病机制

中图分类号: S 917.1

文献标志码: A

疾病是制约绿色水产养殖的重要因素。尤其在现代集约化养殖模式下, 细菌病的治疗主要是通过使用抗生素, 但其同时也导致细菌耐药性增加和食品安全方面的隐患。因此, 寻找抗生素的替代产品已迫在眉睫。近年来, 在饲料中添加新型绿色、环保免疫增强剂, 提高水产动物自身免疫力和增强抗病力成为水产养殖研究的热点。

几丁质广泛存在于节肢动物如虾、蟹的外壳,

在自然界中是除纤维素以外的第二大天然多糖。壳聚糖是几丁质经过脱乙酰化而得到的大分子物质。壳寡糖(OCS)是壳聚糖经过酶解法或化学法而获得的2~10个氨基葡萄糖以 β -1, 4-糖苷键连接而成的低聚糖。与壳聚糖相比, 壳寡糖具有分子量小、容易吸收及水溶性好等特点, 能有效地被肠道吸收, 是抗生素的理想替代品^[1]。壳寡糖具有许多重要的生物活性功能, 能够抑制真菌和细

收稿日期: 2020-12-27 修回日期: 2021-05-13

资助项目: 广东省海洋与渔业厅项目(GDME-2018C006, D21822202); 中国-东盟海上合作基金(CAMC-2018F); 国家自然科学基金(4210061024); 中国科学院热带海洋生物资源与生态重点实验室联合资助开放课题(LMB20211004)

第一作者: 施斐(照片), 从事鱼类肠道菌群研究, E-mail: fshi1203@126.com

通信作者: 秦真东, 从事水产动物病害研究, E-mail: qinzhendongsc@163.com;

林鑫, 从事水产动物病害研究, E-mail: linli@zhku.edu.cn



菌的生长,可作为抗肿瘤药物、免疫增强剂和食品添加剂^[2-3]。段静等^[4]研究了壳寡糖的免疫机制,并在世界上首次克隆了鱼类甘露糖受体^[5-8]。研究表明,壳寡糖通过甘露聚糖和甘露糖受体结合,激活呼吸爆发^[9-13]。

虎龙斑是以褐点石斑鱼 (*Epinephelus fuscoguttatus*) 为母本,龙趸石斑鱼 (*E. lanceolatu*) 为父本的杂交种,具有生长迅速、抗病力强、经济价值高等优点^[14],已在广东、海南等地广泛养殖,成为石斑鱼养殖的主导品种。随着养殖规模和密度的不断提高,虎龙斑也遭受多种疾病威胁,因此开展虎龙斑的免疫和抗病研究具有重要意义。研究表明,石斑鱼的肠道微生物群落组成结构主要受摄食类型^[15-16]和水体环境^[17]等因素的影响,但饲料中添加壳寡糖对虎龙斑肠道菌群的影响仍未被研究。哈维氏弧菌 (*Vibrio harveyi*) 是栖息在水生和海洋环境中的革兰氏阴性细菌,可以感染包括石斑鱼在内的多种海洋鱼类^[18-19],给海水养殖业带来严重的经济损失。用哈维氏弧菌进行胁迫实验,研究投喂壳寡糖的虎龙斑对哈维氏弧菌的抗病力,可为实际生产应用提供参考。

本实验运用常规养殖营养学和免疫学手段研究不同浓度壳寡糖对虎龙斑的生长和免疫的调节作用;利用微生物组学技术揭示壳寡糖对虎龙斑肠道菌群的结构组成、多样性以及核心类群调控机制;通过弧菌感染实验,解析饲喂壳寡糖对虎龙斑的抗病能力,以期壳寡糖在石斑鱼健康养殖中的应用提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料

虎龙斑 [(10.58 ± 0.12) g] 由广东省海洋渔业试验中心的养殖基地提供。壳寡糖购于广东惠州长龙生物技术有限公司。基础饲料购于广东越群海洋生物研究开发有限公司,原料由进口鱼粉、鱿鱼粉、酶解蛋白、卵磷脂、面粉、维生素、矿物质等组成。哈维氏弧菌为本实验室分离和保存。

1.2 实验设计与饲喂管理

虎龙斑饲喂实验共设 5 组,分别投喂添加不同的壳寡糖含量 (0、200、400、800 和 1600 mg/kg) 的实验饲料,每组设 3 个重复,每个重复 30 尾鱼。每天饱食投喂 2 次 (8:00 和 18:00),养殖 4 周。全部实验鱼饲养于循环过滤水泥池中的内设小网箱,

24 h 持续充气,水温为 24.0~27.0 °C,溶解氧含量为 5.8~6.4 mg/L,氨氮值低于 0.2 mg/L。养殖实验结束后,实验鱼禁食 24 h。随机捞取 6 条石斑鱼,用浓度为 100 mg/L 甲磺酸三卡因 (MS 222) 迅速将石斑鱼麻醉后解剖分离肠道,并用灭菌的 0.85% 生理盐水冲洗干净,分离前、中、后肠,置于无 RNA 酶的离心管和冻存管中,并放置在液氮中。取完样后保存在 -80 °C 冰箱,用于测定免疫基因及肠道菌群的后续实验。

1.3 生长性能测定

养殖实验结束后,停食 1 d,准确称量不同浓度壳寡糖分组的虎龙斑的体质量、体长、饲料重量和死亡率,计算各生长指标。

增重率 (weight gain rate, WGR, %) = $(W_t - W_0) / W_0 \times 100\%$;

饲料系数 (feed conversion ratio, FCR) = $W_f / (W_t - W_0)$;

肥满度 (condition factor, CF, g/cm³) = W / L^3 ;

存活率 (survival rate, SR, %) = $N_t / N_0 \times 100\%$

式中, W_0 为虎龙斑的初始体质量 (g), W_t 为终末体质量 (g), W_f 为石斑鱼的摄入饲料量 (g), L 为石斑鱼体长 (cm), W 为体质量 (g), N_0 为石斑鱼的初始数量 (尾), N_t 为终末数量 (尾)。

1.4 免疫基因 mRNA 的表达分析

取虎龙斑的中肠样品进行免疫基因 mRNA 的荧光定量 PCR (qRT-PCR) 实验。总 RNA 的提取按照 RNAiso Plus 试剂说明书进行提取,提取各组织的总 RNA 浓度及纯度用超微量分光光度计 (NanoDrop2000, USA) 和琼脂糖凝胶电泳进行检测。然后使用带有 gDNA wiper 的 HiScript[®] Q Select RT SuperMix for qPCR 试剂盒 (Vazyme) 合成 cDNA,在 -20 °C 保存备用。

参考已有文献的虎龙斑免疫基因的 qRT-PCR 上、下引物,选择 β -actin 作为内参基因 (表 1)^[14,20-21]。本实验选择的免疫基因包括:炎症因子 [肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , *TNF- α*)、白细胞介素 1 β (interleukin-1 β , *IL-1 β*)、转化生长因子 β 1 (transforming growth factor- β , *TGF- β 1*)、雷帕霉素靶蛋白 (target of rapamycin, *TOR*)、Toll 样受体 3 (toll-like receptor 3, *TLR3*); 抗氧化相关功能基因 [谷胱甘肽过氧化物酶 (glutathione peroxidase, *GPx*)、过氧化氢酶 (catalase, *CAT*)、锰超氧化物歧化酶 (manganese superoxide dismutase, *MnSOD*)、

谷胱甘肽还原酶 (glutathione reductase, *GR*); 肠道紧密连接蛋白 [3 种 ZO 蛋白 (*zonula occludens*, *ZO-1*、*ZO-2*、*ZO-3*)、闭合蛋白 (*occludin*)、密封蛋白 3 α (*claudin-3\alpha*)]。利用 cDNA 为模板, 进行 qRT-PCR 扩增的反应体系和反应程序参照 AceQ[®] qPCR SYBR[®] Green Master Mix 试剂说明书 (Vazyme), 该反应于 Roche LightCycler 480 (Roche, 美国) 仪器进行, 其中免疫相关目的基因和 β -*actin*

内参基因分别做 3 次重复。利用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法来计算相关基因的相对表达量。

1.5 肠道菌群测序及生物信息学分析

对投喂不同浓度 (0、400 和 800 mg/kg) 壳寡糖的实验鱼前、中、后肠样品进行基因组 DNA 提取, 16S rRNA 高通量测序以及后续的生物信息学分析。采用 DNeasy PowerSoil (QIAGEN) 试剂盒

表 1 实验所用引物

Tab. 1 Primers used in the experiments

基因 genes	引物名称 primers	序列(5'-3') sequence from 5' to 3'	应用 application
<i>TNF-α</i>	<i>TNF-α-F</i>	GAGGACGGTGGTGTGGTGG	qRT-PCR
	<i>TNF-α-R</i>	TTCTCTTGGCCTGATTGCG	
<i>IL-1β</i>	<i>IL-1β-F</i>	TACGATGCCTATGTGGTC	qRT-PCR
	<i>IL-1β-R</i>	CTCTGCTTATGCTGTCC	
<i>TGF-β1</i>	<i>TGF-β1-F</i>	AACATCCCCTACCTCGCTT	qRT-PCR
	<i>TGF-β1-R</i>	TCCGCTCATCTCATTCCT	
<i>TOR</i>	<i>TOR-F</i>	AACATCCCCTACCTCGCTT	qRT-PCR
	<i>TOR-R</i>	TCCGCTCATCTCATTCCT	
<i>TLR3</i>	<i>TLR3-F</i>	TCTCCATCCGTCACCTTCC	qRT-PCR
	<i>TLR3-R</i>	TCATCCAGCCCCTTACTATCC	
<i>GPx</i>	<i>GPx-F</i>	TACCCTACCAAGTCCTCAACC	qRT-PCR
	<i>GPx-R</i>	AACAAACACCCGACACCCA	
<i>CAT</i>	<i>CAT-F</i>	GCGTTTGGTTACTTTGAGGTGA	qRT-PCR
	<i>CAT-R</i>	GAGAAGCGGACAGCAATAGGT	
<i>MnSOD</i>	<i>MnSOD-F</i>	TACGAGAAGGAGAGCGGAAGA	qRT-PCR
	<i>MnSOD-R</i>	ATACCGAGGAGGGGATGA	
<i>GR</i>	<i>GR-F</i>	CTTTCACCTCCGATGTATCACGC	qRT-PCR
	<i>GR-R</i>	GCTTTGGTAGACCCATTTTG	
<i>ZO-1</i>	<i>ZO-1-F</i>	ACCTGCCAGTCAGTCCCTCT	qRT-PCR
	<i>ZO-1-R</i>	CGCTCCTCTCGGATTATG	
<i>ZO-2</i>	<i>ZO-2-F</i>	CAAGATTCTCTCCGACCA	qRT-PCR
	<i>ZO-2-R</i>	AACATCATTACCTCCTGCCA	
<i>ZO-3</i>	<i>ZO-3-F</i>	GAGCCAATCTACTCCCTTCC	qRT-PCR
	<i>ZO-3-R</i>	CTGGTCTCCCTCTTTCATCC	
<i>occludin</i>	<i>occludin-F</i>	TCAGAACATCCAGGGCAATC	qRT-PCR
	<i>occludin-R</i>	CCACCATCAGACCCAAAACCT	
<i>claudin-3α</i>	<i>claudin-3α-F</i>	ACTCTATGCTCGCCCTCTCT	qRT-PCR
	<i>claudin-3α-R</i>	TGGATGCCTCGTCGTC	
β - <i>actin</i>	β - <i>actin-F</i>	TACGAGCTGCCTGACGGACA	qRT-PCR
	β - <i>actin-R</i>	GGCTGTGATCTCCTTCTGC	
16S rRNA V3~V4	343F	TACGGRAGGCAGCAG	Illumina测序
	798R	AGGGTATCTAATCCT	

对样本的基因组 DNA 进行提取, 再利用 Nano-Drop2000 和琼脂糖凝胶电泳检测基因组 DNA 的浓度及纯度。通过带有条形码 (barcode) 的 16S rRNA 基因的 V3~V4 可变区域的通用引物 (表 1), 使用 Tks Gflex DNA Polymerase (TaKaRa) 试剂盒进行 PCR, 确保扩增效率和准确性。根据其浓度构建测序文库后, 利用 Miseq PE300 (Illumina) 平台进行测序。以上文库的构建、测序及数据分析均由上海欧易生物医学科技有限公司完成。

使用 Trimmomatic 软件对原始双端序列进行去杂并剔除低质量序列。利用 UCHIME (version 2.4.2) 软件去除嵌合体。对获得的干净序列进行聚类, 用 VSEARCH 软件根据相似性将序列归为不同的操作分类单元 (OTU), 相似度 $\geq 97\%$ 被归为 1 个 OTU。此外, 单个序列 (singleton, 只有 1 条序列指代 1 个 OTU) 因可信度低而剔除。通过 QIIME 软件包挑选每个 OTU 的代表序列, 基于 Silva (version 123) 数据库, 使用 RDP classifier 软件进行比对注释, 同时剔除 OTU 定位为叶绿体和线粒体的序列, 并保留置信阈值为 70% 的注释结果。

生物信息学分析按文献^[22]的方法进行, 并稍作修改。利用 α 多样性指数 (包括辛普森指数和香农指数) 对肠道微生物 α 多样性进行分析。群落 β 多样性分析采用 Binary-jaccard 算法, 用 QIIME 软件进行主坐标分析 (PCoA) 以及聚类热图的绘制。

1.6 哈维氏弧菌感染实验

养殖实验结束后, 实验鱼禁食 24 h, 通过哈维氏弧菌进行鱼体背部皮下注射攻毒。通过弧菌感染预实验, 发现哈维氏弧菌感染虎龙斑的半致死浓度为 1.01×10^6 CFU/g。用浓度为 100 mg/L 的 MS 222 迅速将石斑鱼麻醉后, 用 75% 的酒精消毒注射部位, 背部皮下注射制备好的哈维氏弧菌悬液 (浓度为 1×10^7 CFU/mL), 每条鱼的注射剂量为

0.2 mL, 持续观察 7 d, 记录存活率。

1.7 肠道组织学观察

哈维氏弧菌感染实验完成后, 每个组别随机选取 4 尾鱼, 取长度约为 1 cm 左右的前、中、后肠, 于灭菌的 0.85% 生理盐水中洗净, 再通过 4% 多聚甲醛固定 24 h。固定后的组织通过梯度酒精脱水和石蜡包埋处理, 切片厚度为 4 μm 。将蜡片依次用苏木素-伊红 (H.E) 染色, 中性树胶封片, 用荧光显微镜 (EVOS M5000, Thermo Fisher) 观察头肾组织变化并拍照。

1.8 数据分析

实验结果用平均值 \pm 标准差 (mean \pm SD) 表示, 统计学检验利用 SPSS 18.0 软件进行单因素方差分析 (One-Way ANOVA)。 $P < 0.05$ 表示差异显著, $P < 0.01$ 表示差异极显著。最终结果用 Graphpad prism 7 软件作图。

2 结果

2.1 壳寡糖对虎龙斑生长性能的影响

经过 30 d 的池塘网箱养殖, 得到各组虎龙斑的生长性能数据 (表 2)。随着饲料中壳寡糖浓度的增加, 石斑鱼的 WGR 呈先增加后降低的趋势, 在 800 mg/kg 组达到最大, 其次是 400 mg/kg 组, 与对照组差异显著 ($P < 0.05$)。与对照组相比, 800 mg/kg 组的 FCR 最低 ($P < 0.05$), 其他组均差异不显著。添加壳寡糖组别的 CF 与对照组相比无显著差异 ($P > 0.05$)。此外, 各组石斑鱼在实验期间有少量死亡, 成活率均 $> 94.00\%$, 组间差异不显著 ($P > 0.05$)。

2.2 壳寡糖对虎龙斑免疫因子的影响

饲喂不同壳寡糖添加量的虎龙斑, 饲料中添

表 2 饲料壳寡糖水平对虎龙斑生长性能的影响

Tab. 2 Effects of dietary oligochitosan levels on growth performance of hybrid groupers

指标 indexes	饲料壳寡糖水平 dietary oligochitosan levels				
	0 mg/kg	200 mg/kg	400 mg/kg	800 mg/kg	1 600 mg/kg
增重率/% WGR	262.26 \pm 31.26	298.50 \pm 10.56	345.72 \pm 19.11*	366.51 \pm 30.81*	332.67 \pm 40.97
饲料系数 FCR	31.17 \pm 0.86	30.02 \pm 1.54	31.73 \pm 1.34	27.51 \pm 0.94*	27.88 \pm 2.53
肥满度/(g/cm ³ \times 10) CF	0.16 \pm 0.00	0.17 \pm 0.00	0.16 \pm 0.00	0.18 \pm 0.00	0.17 \pm 0.00
存活率/% SR	94.44 \pm 1.92	96.66 \pm 3.33	95.55 \pm 1.92	97.77 \pm 1.92	96.66 \pm 3.33

注: *表示与 0 mg/kg 组之间差异显著 ($P < 0.05$)

Notes: values with asterisk symbol mean significant differences ($P < 0.05$)

加 400 和 800 mg/kg 壳寡糖可显著提高 *TNF- α* 和 *IL-1 β* 水平 ($P<0.05$), 随着壳寡糖添加量的升高而降低 (图 1-a)。与对照组相比, *TGF- β 1* 和 *TLR3* 表达水平也呈相似趋势, 在 800 mg/kg 组间差异显著 ($P<0.05$)。 *TOR* 的表达在 400、800 和 1600 mg/kg 组间均差异极显著 ($P<0.01$)。

与对照组相比, 抗氧化相关基因 *GPx*、*CAT* 和 *MnSOD* 的表达呈先提高后降低的趋势, 在添加 800 mg/kg 的壳寡糖饲料组中均显著增加 ($P<0.05$)。

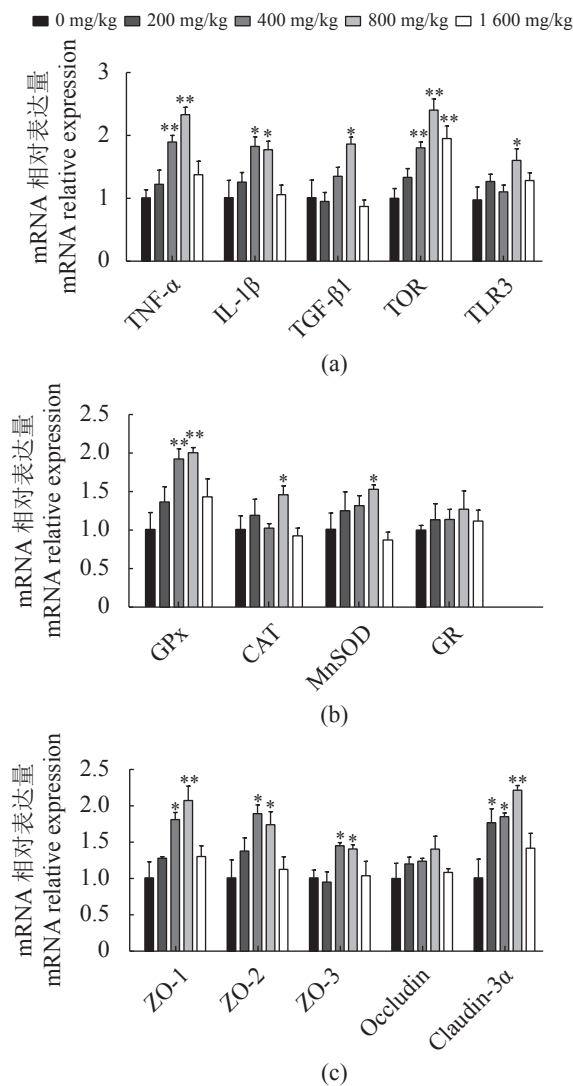


图 1 不同的壳寡糖添加量对虎龙斑中肠各相关指标 mRNA 表达水平的影响

(a) 免疫炎症因子, (b) 抗氧化基因, (c) 紧密连接蛋白

Fig. 1 mRNA expression levels of related indexes in the midgut of hybrid groupers fed with different concentrations of oligochitosan

(a) inflammation-associated cytokines, (b) antioxidant genes, (c) tight junction proteins. * $P<0.05$; ** $P<0.01$

其中, *GPx* 在 400 mg/kg 组中的表达显著提高 ($P<0.01$)。 *GR* 的表达各组间无显著差异 ($P>0.05$)。

紧密连接蛋白相关基因 *ZO-1*、*ZO-2* 和 *ZO-3* 的表达趋势一致, 400 和 800 mg/kg 组表达量最高, 且与对照组相比差异显著 ($P<0.05$)。 *claudin-3 α* 在 200、400 和 800 mg/kg 组间均差异显著 ($P<0.05$)。 *Occludin* 的表达各组间无显著差异 ($P>0.05$)。

2.3 壳寡糖对虎龙斑肠道菌群的影响

通过高通量测序对所得序列进行过滤分析, 共获得 1 786 070 条合格序列, 每个样本获得的有效序列均超过 50 000 条, 根据 97% 相似性, 所有样本共划分 4 679 个 OTU。韦恩图 (图 2-a) 呈现了每个样本的 OTU 数量, 其中所有样本共有 33 个 OTU。稀薄曲线 (图 2-b) 趋于平缓, 说明测序深度足够覆盖样品细菌群落的多样性。基于 Kruskal-wallis 算法, α 群落多样性指数 Shannon 和 Simpson 在各组间差异不显著 ($P>0.05$, 图 2-c, d)。

各组样品在门水平的细菌群落相对丰度没有出现显著差异 (图 3-a)。不同组别的绝对优势菌群主要为变形菌门 (Proteobacteria)、拟杆菌门 (Bacteroidetes)、厚壁菌门 (Firmicutes) 和放线菌门 (Actinobacteria)。通过分类阶元为种水平的 OTU 注释, 绝大多数优势物种为益生菌, 如格氏乳杆菌 (*Lactobacillus gasseri*)、罗伊氏乳杆菌 (*L. reuteri*) 和长双歧杆菌 (*Bifidobacterium longum* subsp. *longum*)。格氏乳杆菌在 800 mg/kg 组别的后肠样品中丰度最高, 其次为 800 mg/kg 组别的中肠样品, 其余样品中的丰度均较低。同时, 实验也发现了一些条件致病菌, 如杀香鱼假单胞菌 (*Pseudomonas plecoglossicida*)、椭圆形拟杆菌 (*Bacteroides ovatus* V975) 和美人鱼发光杆菌 (*Photobacterium damsela* subsp. *damsela*)。杀香鱼假单胞菌在对照组的中肠样品中丰度最高 (图 3-b)。

对饲喂不同剂量 (0、400 和 800 mg/kg) 壳寡糖的实验鱼前、中、后肠的细菌群落进行主坐标分析 (图 3-c)。结果显示, 0 和 800 mg/kg 组的细菌群落可以明显分开, 而 0 和 400 mg/kg 之间以及 400 和 800 mg/kg 之间都有部分区域重叠, 说明 800 mg/kg 处理组与 0 mg/kg 对照组有明显的微生物群落多样性差异。

2.4 哈维氏弧菌感染实验结果

肠道组织学观察 感染哈维氏弧菌后, 对照组实验鱼前肠皱襞上出现黏膜脱落、断裂现象,

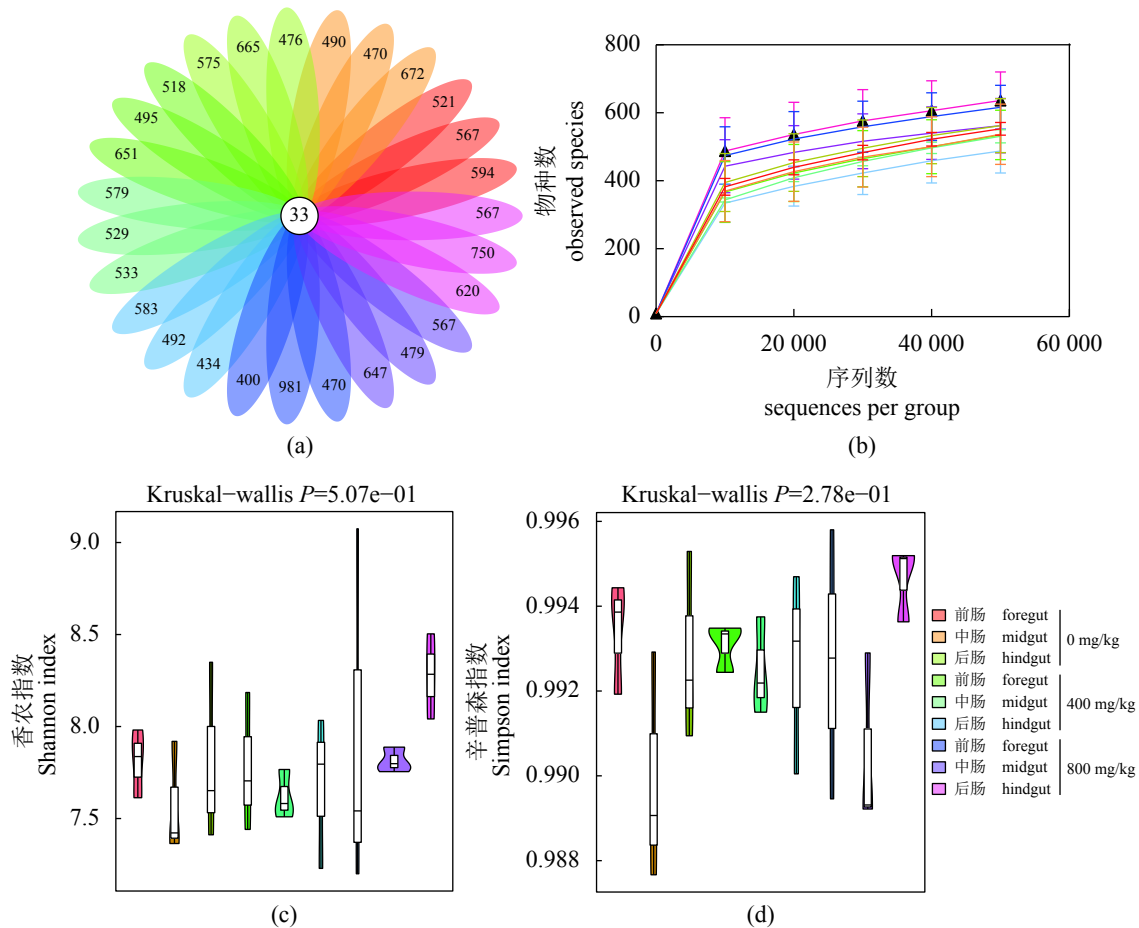


图 2 饲喂壳寡糖的虎龙斑肠道菌群 α 多样性

(a) 每个样品共同和独有 OTU 数量的韦恩图, (b) 基于 OTU 聚类阈值为 97% 相似性的不同分组的稀薄曲线, (c) 香农指数, (d) 辛普森指数。多样性指数都是基于 Kruskal-wallis 算法, $P<0.05$ 为差异显著

Fig. 2 Alpha diversity of bacterial community composition of hybrid groupers with different oligochitosan diets and gut compartments

(a) Venn diagram of shared and unique OTU numbers per sample, (b) rarefaction curves of OTUs clustered at 97% sequence similarity across different groups. Bars show the mean \pm SD ($n=3$), (c) Shannon-Wiener (Shannon) index, (d) Simpson index. Diversity index originated from all the treatments using Kruskal-wallis method. $P<0.05$ indicates the difference among all these groups

细胞界限不清晰。中肠皱襞形状萎缩呈畸形。后肠皱襞内部空洞化, 高度减小, 肠壁变薄。与对照组相比, 800 mg/kg 组不同部位的肠道结构最完整, 无黏膜断裂, 其中杯状细胞紧密排列在皱襞外缘下, 且杯状细胞和嗜酸性粒细胞数量有明显的增加 (图版)。

存活率统计 哈维氏弧菌感染后, 800 mg/kg 组的存活率显著高于对照组 ($P<0.05$), 其次为 400 和 1600 mg/kg 组, 200 mg/kg 最低, 但这 3 组与对照组相比均无显著差异 ($P>0.05$) (图 4)。

3 讨论

本实验中, 饲喂不同浓度壳寡糖的虎龙斑生

长结果表明, 添加 800 mg/kg 壳寡糖能提高虎龙斑的增重率和饲料利用率。吉富罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*, GIFT)^[23-24]、幼建鲤 (*Cyprinus carpio* var. *jian*)^[25]、卵形鲳鲀 (*Trachinotus ovatus*)^[26] 和虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*)^[27-28] 的相关研究表明, 饲料中添加适宜的壳寡糖能显著提高鱼体生长性能。饲料中添加壳寡糖可显著提高凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*) 的生长率和成活率^[29]。然而本实验结果表明, 添加过量壳寡糖会导致虎龙斑增重率下降, 可能是机体摄入过量的水溶性壳寡糖从而导致虎龙斑肠道中食糜的黏度增加, 进而影响其吸收效率。

炎症相关因子在迅速响应病原体感染和激活免疫细胞以应对细菌攻击方面起着关键作用^[30]。

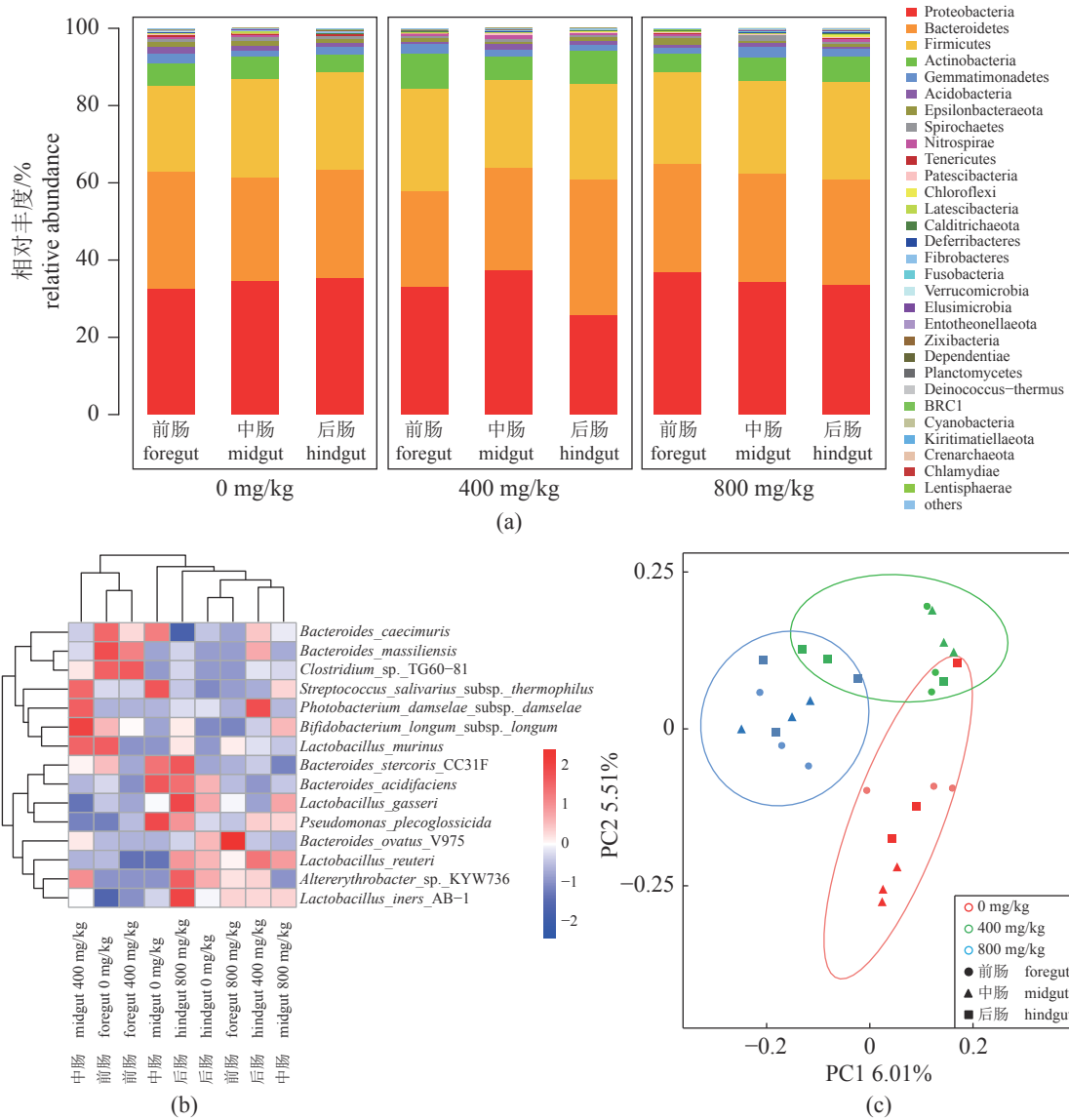


图 3 饲喂壳寡糖的虎龙斑肠道细菌群落的相对丰度和 β 多样性

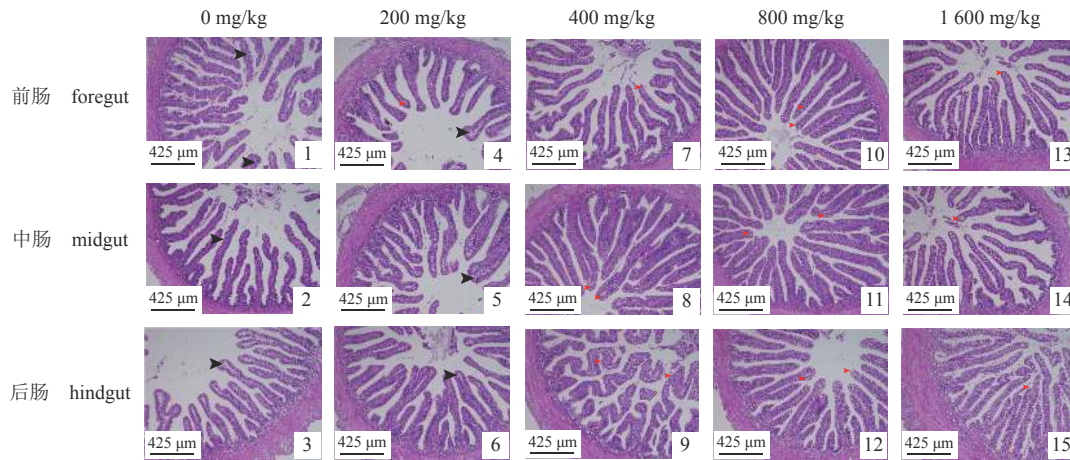
(a) 不同剂量 (0、400、800 mg/kg) 的壳寡糖饲喂虎龙斑的肠道 (前、中、后肠) 细菌群落的相对丰度柱状图, (b) 基于种一级分类阶元, 不同分组的细菌类群为相对丰度前 15 的聚类热图, (c) 基于 Binary-jaccard 算法, 不同分组肠道菌群的主坐标分析

Fig. 3 Relative abundance of the bacterial communities and β diversity in hybrid groupers fed with oligochitosan

(a) relative abundance of the bacterial communities at the genus level found in different diets (0, 400 and 800 mg/kg oligochitosan) and gut compartments (foregut, midgut and hindgut) of hybrid groupers, (b) Heatmap of relative abundances of the 15 most dominant targets summarized at the species level in gut microbial communities collected from oligochitosan-treated hybrid groupers, (c) PCoA of the samples in three gut compartments (foregut, midgut and hindgut) based on different diets (0, 400 and 800 mg/kg oligochitosan) using Binary-jaccard method

本实验中, 虎龙斑中肠免疫因子 $TNF-\alpha$ 、 $IL-1\beta$ 、 $TGF-\beta_1$ 、 TOR 和 $TLR3$ 的 mRNA 表达水平升高, 说明投喂壳寡糖可显著提高炎症反应, 尤其以 800 mg/kg 添加量最明显。这与早期研究投喂壳寡糖会激活尼罗罗非鱼 (*O. niloticus*) 的炎症因子的相关结果一致^[31]。壳寡糖能够通过改善内源性抗氧化剂活性, 抑制并清除体内多余自由基的积累, 从而提高抗氧化性能及降低氧化应激损伤^[32]。Lin

等^[33] 研究发现, 壳寡糖可提高大口黑鲈 (*Microp-terus salmoides*) 的 SOD 活性。本实验进一步验证壳寡糖可以提高抗氧化性能, 从而增强鱼体免疫。紧密连接 (tight junction) 广泛存在于肠道上皮细胞间连接的顶端, 由 ZO 蛋白、Occludin、Claudin 和连接黏附分子 (JAM) 等蛋白组成; 肠道上皮细胞通过紧密连接形成整体, 维持自身的极性^[34-35]。Tan 等^[14] 研究了银杏叶提取物作为饲料添加剂对高



图版 饲喂不同添加量壳寡糖的虎龙斑在哈维氏弧菌感染后的肠道 H.E 染色切片

1~15 分别表示不同剂量 (0、200、400、800、1 600 mg/kg) 壳寡糖饲喂的杂交石斑鱼不同肠道部位 (前、中、后肠) 组织形态变化。黑色箭头指向损坏组织, 红色箭头指向杯状细胞

Plate Photomicrographs of the intestine of hybrid groupers treated with different dosages of oligochitosan after being challenged with *V. harvey* by H.E staining

Histological examination of 1-15 shows the tissue of foregut, midgut and hindgut of hybrid groupers treated with different dosages (0, 200, 400, 800 and 1 600 mg/kg) of oligochitosan after being challenged with *V. harvey*, stained by H.E, respectively. Black arrows represented damaged tissue, while red arrows showed goblet cell

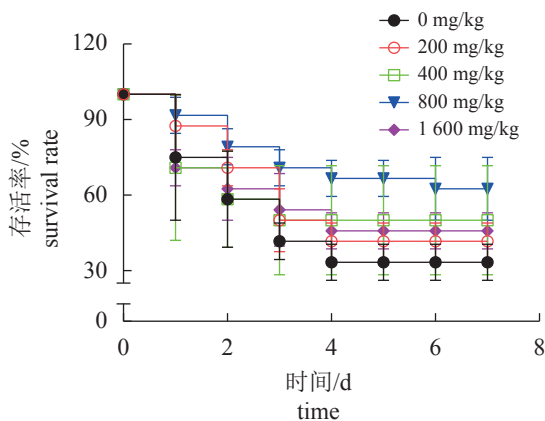


图 4 饲喂不同浓度壳寡糖的虎龙斑在哈维氏弧菌感染后的存活率

Fig. 4 Survival rate (%) of hybrid groupers challenged by *V. harvey* for 7 days at different levels of dietary oligochitosan after 4-week trials

脂喂养的虎龙斑肠道紧密连接蛋白 (ZO 蛋白、Occludin 和 Claudin) 的影响, 发现添加银杏叶提取物可显著激活紧密连接蛋白的表达。该研究与本实验结果相似, 说明壳寡糖可以提高肠道上皮细胞的通透性, 使营养物质更好地被肠道吸收, 排出对机体不利的有害物质, 进而提高免疫能力。

肠道不仅是吸收、消化和营养物质交换的重要器官, 同时其消化系统可为微生物提供庇护, 肠道微生物在营养、免疫以及抵御外界不利因素

上扮演着重要的角色^[36-37]。鱼类的肠道免疫系统是由肠道上皮细胞和杯状细胞以及分泌的黏液和生物活性蛋白共同组成的一个复杂生态系统, 而且在肠道中共生着大量的微生物, 能够有效制止致病菌在肠道上皮入侵、黏附和定殖, 并产生免疫相关的细胞因子杀死有害菌, 发挥肠道免疫功能^[37-38]。不同的水产养殖动物的肠道优势种群不同, 可能与生长环境、宿主摄食、饲养密度等条件有关, 反映了宿主抗病性的异质性^[39]。研究表明, 壳寡糖可以改善幼建鲤^[25]的肠道健康, 优化鲢 (*Hypophthalmichthys molitrix*)^[40]肠道菌群结构, 有利于肠道有益菌增殖。黄鑫玮等^[25]认为壳寡糖可显著降低幼建鲤肠道大肠杆菌数量, 提高双歧杆菌和乳酸杆菌丰度。本研究发现, 虽然饲喂不同剂量壳寡糖的虎龙斑肠道细菌的 α 多样性无显著差异, 但可以提高虎龙斑肠道中定殖的有益菌丰度, 如格氏乳杆菌和长双歧杆菌。Prasai 等^[41]认为, 肠道微生物区系的稳定与机体的健康密切相关, 健康状况可能是少数病原体的减少而非总体菌群丰度和多样性的变动导致。本实验也进一步说明, 壳寡糖虽然没有影响总体菌群的丰度, 但可以降低病原菌的比例, 如杀香鱼假单胞菌。因此, 壳寡糖能够通过调节肠道菌群结构, 比如益生菌的生长, 进而可能促进维生素和矿物质的生成和吸收, 从而间接影响鱼体的免疫性能。

利用细菌或病毒感染模型来揭示水产动物抗病免疫相应机制的研究越来越重要。Duy 等^[42]的研究结果说明, 在鲷爱德华氏菌 (*Edwardsiella ictaluri*) 的侵染下, 壳寡糖可降低条形鲈 (*Pangasianodon hypophthalmus*) 的死亡率。Guan 等^[24]发现, 用嗜水气单胞菌 (*Aeromonas hydrophila*) 感染吉富罗非鱼, 不同分子量的壳寡糖可提高其存活率。相似的结论在杂交罗非鱼 [*O. niloticus* (♀) × *O. aureus* (♂)]^[43] 和牙鲆 (*Paralichthys olivaceus*)^[44] 中也有报道。

综上所述, 饲料中添加壳寡糖能够改善虎龙斑的生长性能、提高非特异性免疫、增加肠道益生菌的丰度及降低弧菌感染的死亡率。本实验条件下, 壳寡糖添加量为 800 mg/kg 的效果较好。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

参考文献 (References):

- [1] Hamed I, Özogul F, Regenstein J M. Industrial applications of crustacean by-products (chitin, chitosan, and chitooligosaccharides): A review[J]. Trends in Food Science & Technology, 2016, 48: 40-50.
- [2] Abdel-Ghany H M, Salem M E S. Effects of dietary chitosan supplementation on farmed fish; a review[J]. Reviews in Aquaculture, 2020, 12(1): 438-452.
- [3] Samarakoon K W, Cha S H, Lee J H, et al. The growth, innate immunity and protection against H₂O₂-induced oxidative damage of a chitosan-coated diet in the olive flounder *Paralichthys olivaceus*[J]. Journal of Fisheries and Aquatic Science, 2013, 16(3): 149-158.
- [4] 段静, 刘广鑫, 董晏君, 等. 解淀粉芽孢杆菌HZ-1510壳聚糖酶基因的克隆、重组表达及其活性[J]. 水产学报, 2017, 41(10): 1552-1561.
- Duan J, Liu G X, Dong Y J, et al. Cloning, expression and activity analysis of chitosanase from *Bacillus amyloliquefaciens* HZ-1510[J]. Journal of Fisheries of China, 2017, 41(10): 1552-1561 (in Chinese).
- [5] Wang L, Liu L C, Zhou Y, et al. Molecular cloning and expression analysis of mannose receptor C type 1 in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*)[J]. Developmental & Comparative Immunology, 2014, 43(1): 54-58.
- [6] Liu X L, Tang X C, Wang L, et al. Molecular cloning and expression analysis of mannose receptor in blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*)[J]. Molecular Biology Reports, 2014, 41(7): 4601-4611.
- [7] 刘小玲, 王虹, 樊启学, 等. 黄颡鱼甘露糖受体基因的克隆和功能分析[J]. 水产学报, 2017, 41(7): 1036-1043.
- Liu X L, Wang H, Fan Q X, et al. Cloning and functional analysis of mannose receptor from Chinese yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*)[J]. Journal of Fisheries of China, 2017, 41(7): 1036-1043 (in Chinese).
- [8] 何昕, 秦真东, 张凯, 等. 苏丹鱼甘露糖受体的基因克隆表达和免疫特性[J]. 水产学报, 2020, 44(3): 378-390.
- He X, Qin Z D, Zhang K, et al. Cloning, expression and immune features of Sultan fish (*Leptobarbus hoevenii*) mannose receptor[J]. Journal of Fisheries of China, 2020, 44(3): 378-390 (in Chinese).
- [9] Liu L C, Zhou Y, Zhao X H, et al. Oligochitosan stimulated phagocytic activity of macrophages from blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*) associated with respiratory burst coupled with nitric oxide production[J]. Developmental & Comparative Immunology, 2014, 47(1): 17-24.
- [10] Wu C S, Zhao X H, Babu V S, et al. Distribution of mannose receptor in blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*) during the embryonic development and its immune response to the challenge of *Aeromonas hydrophila*[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2018, 78: 52-59.
- [11] Zhao X H, Liu L C, Hegazy A M, et al. Mannose receptor mediated phagocytosis of bacteria in macrophages of blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*) in a Ca²⁺-dependent manner[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2015, 43(2): 357-363.
- [12] Zheng F F, Asim M, Lan J F, et al. Molecular cloning and functional characterization of mannose receptor in zebra fish (*Danio rerio*) during Infection with *Aeromonas sobria*[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2015, 16(5): 10997-11012.
- [13] 郝明君, 刘立春, 张涓, 等. 3种壳聚糖对团头鲂体外头肾吞噬细胞呼吸爆发功能的影响[J]. 华中农业大学学报, 2014, 33(3): 72-77.
- Xi M J, Liu L C, Zhang J, et al. Effect of three chitosan on respiratory burst activity of head-kidney phagocytes in Wuchang bream (*Megalobrama amblycephala*)[J]. Journal of Huazhong Agricultural University, 2014, 33(3): 72-77 (in Chinese).
- [14] Tan X H, Sun Z Z, Ye C X. Dietary *Ginkgo biloba* leaf extracts supplementation improved immunity and intestinal morphology, antioxidant ability and tight junction

- proteins mRNA expression of hybrid groupers (*Epinephelus lanceolatus* ♂ × *Epinephelus fuscoguttatus* ♀) fed high lipid diets[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2020, 98: 611-618.
- [15] 丛林梅. 商品饲料和冰鲜杂鱼对珍珠龙胆石斑鱼生长、抗氧化、脂质代谢、肠道菌群和品质的影响 [D]. 长春: 吉林农业大学, 2016.
- Cong L M. Effect of commercial diet and fresh frozen trash fish on growth, antioxidant capacity, lipid metabolism, intestinal bacterial communities of quality of hybrid grouper (*Epinephelus fuscoguttatus* ♀ × *E. lanceolatus* ♂)[D]. Changchun: Jilin Agricultural University, 2016 (in Chinese).
- [16] 麦浩彬, 郭鑫伟, 王金港, 等. 摄食不同水平饲料蛋白质对珍珠龙胆石斑鱼幼鱼肠道组织形态和菌群组成的影响[J]. *大连海洋大学学报*, 2020, 35(1): 63-70.
- Mai H B, Guo X W, Wang J G, *et al.* Effects of dietary protein levels on intestinal tract histomorphology and microflora composition in juvenile pearl gentian grouper (*Epinephelus lanceolatus* ♂ × *E. fuscoguttatus* ♀)[J]. *Journal of Dalian Ocean University*, 2020, 35(1): 63-70 (in Chinese).
- [17] 孙敏秋, 林克冰, 葛辉, 等. 基于宏基因组比较分析石斑鱼育苗两种模式水体中的菌群多样性和分布特点[J]. *渔业研究*, 2016, 38(3): 181-191.
- Sun M Q, Lin K B, Ge H, *et al.* Comparative analysis of bacterial diversity and distribution characteristics in water collected from two *Epinephelus coioides* seedling models with Metagenomics[J]. *Journal of Fisheries Research*, 2016, 38(3): 181-191 (in Chinese).
- [18] Li J, Wu Z B, Zhang Z, *et al.* Effects of potential probiotic *Bacillus velezensis* K2 on growth, immunity and resistance to *Vibrio harveyi* infection of hybrid grouper (*Epinephelus lanceolatus* ♂ × *E. fuscoguttatus* ♀)[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2019, 93: 1047-1055.
- [19] 蒋魁, 徐力文, 苏友禄, 等. 两株珍珠龙胆病原性哈维弧菌(*Vibrio harveyi*)的分离与鉴定[J]. *生态科学*, 2017, 36(6): 16-24.
- Jiang K, Xu L W, Su Y L, *et al.* Isolation and identification of two pathogenetic *Vibrio harveyi* strains from pearl gentian[J]. *Ecological Science*, 2017, 36(6): 16-24 (in Chinese).
- [20] Zou C Y, Tan X H, Ye H Q, *et al.* The hepatoprotective effects of *Radix bupleuri* extracts against D-galactosamine/lipopolysaccharide induced liver injury in hybrid grouper (*Epinephelus lanceolatus* ♂ × *Epinephelus fuscoguttatus* ♀)[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2018, 83: 8-17.
- [21] Wu M J, Wu X Y, Lu S D, *et al.* Dietary arginine affects growth, gut morphology, oxidation resistance and immunity of hybrid grouper (*Epinephelus fuscoguttatus* ♀ × *E. lanceolatus* ♂) juveniles[J]. *British Journal of Nutrition*, 2018, 120(3): 269-282.
- [22] Shi F, Zi Y J, Lu Z J, *et al.* *Bacillus subtilis* H2 modulates immune response, fat metabolism and bacterial flora in the gut of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*)[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2020, 106: 8-20.
- [23] 田娟, 孙立威, 文华, 等. 壳寡糖对吉富罗非鱼幼鱼生长性能、前肠组织结构及肠道主要菌群的影响[J]. *中国水产科学*, 2013, 20(3): 561-568.
- Tian J, Sun L W, Wen H, *et al.* Effect of dietary chitooligosaccharides on growth performance, gut flora and intestinal structure of juvenile GIFT tilapia *Oreochromis niloticus*[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2013, 20(3): 561-568 (in Chinese).
- [24] Guan D Y, Sun H W, Meng X, *et al.* Effects of different molar mass chitooligosaccharides on growth, antioxidant capacity, non-specific immune response, and resistance to *Aeromonas hydrophila* in GIFT tilapia *Oreochromis niloticus*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2019, 93: 500-507.
- [25] 黄鑫玮, 杨莎莎, 刘毅, 等. 壳寡糖对幼建鲤生长性能、脂肪代谢、非特异性免疫功能和肠道健康的影响[J]. *动物营养学报*, 2015, 27(7): 2106-2114.
- Huang X W, Yang S S, Liu Y, *et al.* Effect of dietary chitosan on growth performance, lipid metabolism, non-specific immune function and intestinal health of juvenile Jian carp (*Cyprinus carpio* var. Jian)[J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2015, 27(7): 2106-2114 (in Chinese).
- [26] Lin S M, Mao S H, Guan Y, *et al.* Dietary administration of chitooligosaccharides to enhance growth, innate immune response and disease resistance of *Trachinotus ovatus*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2012, 32(5): 909-913.
- [27] 刘含亮, 孙敏敏, 王红卫, 等. 壳寡糖对虹鳟生长性能、血清生化指标及非特异性免疫功能的影响[J]. *动物营养学报*, 2012, 24(3): 479-486.
- Liu H L, Sun M M, Wang H W, *et al.* Effects of chito-

- oligosaccharides on growth performance, serum biochemical indices and non-specific immunity function of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)[J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2012, 24(3): 479-486 (in Chinese).
- [28] Luo L, Cai X F, He C A, *et al.* Immune response, stress resistance and bacterial challenge in juvenile rainbow trouts *Oncorhynchus mykiss* fed diets containing chitosan-oligosaccharides[J]. *Current Zoology*, 2009, 55(6): 416-422.
- [29] 李振达, 陈小娥, 廖智, 等. 壳寡糖对凡纳滨对虾生长和免疫力的影响[J]. *南方水产科学*, 2011, 7(4): 36-42.
- Li Z D, Chen X E, Liao Z, *et al.* Effects of chitooligosaccharides on growth and immunity of *Litopenaeus vannamei*[J]. *South China Fisheries Science*, 2011, 7(4): 36-42 (in Chinese).
- [30] Yin Z, Lam T J, Sin Y M. Cytokine-mediated antimicrobial immune response of catfish, *Clarias gariepinus*, as a defence against *Aeromonas hydrophila*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 1997, 7(2): 93-104.
- [31] Shi F, Qiu X L, Nie L J, *et al.* Effects of oligochitosan on the growth, immune responses and gut microbes of tilapia (*Oreochromis niloticus*)[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2020, 106: 563-573.
- [32] Liu H T, Li W M, Xu G, *et al.* Chitosan oligosaccharides attenuate hydrogen peroxide-induced stress injury in human umbilical vein endothelial cells[J]. *Pharmacological Research*, 2009, 59(3): 167-175.
- [33] Lin S M, Jiang Y, Chen Y J, *et al.* Effects of *Astragalus* polysaccharides (APS) and chitooligosaccharides (COS) on growth, immune response and disease resistance of juvenile largemouth bass, *Micropterus salmoides*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2017, 70: 40-47.
- [34] Soderholm A T, Pedicord V A. Intestinal epithelial cells: At the interface of the microbiota and mucosal immunity[J]. *Immunology*, 2019, 158(4): 267-280.
- [35] Slifer Z M, Blikslager A T. The integral role of tight junction proteins in the repair of injured intestinal epithelium[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21(3): 972.
- [36] Macpherson A J, Harris N L. Interactions between commensal intestinal bacteria and the immune system[J]. *Nature Reviews Immunology*, 2004, 4(6): 478-485.
- [37] Round J L, Mazmanian S K. The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease[J]. *Nature Reviews Immunology*, 2009, 9(5): 313-323.
- [38] Butt R L, Volkoff H. Gut microbiota and energy homeostasis in fish[J]. *Frontiers in Endocrinology*, 2019, 10: 9.
- [39] Kokou F, Sasson G, Friedman J, *et al.* Core gut microbial communities are maintained by beneficial interactions and strain variability in fish[J]. *Nature Microbiology*, 2019, 4(12): 2456-2465.
- [40] Jia S L, Liu X C, Huang Z, *et al.* Effects of chitosan oligosaccharides on microbiota composition of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) determined by culture-dependent and independent methods during chilled storage[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2018, 268: 81-91.
- [41] Prasai T P, Walsh K B, Bhattarai S P, *et al.* Biochar, bentonite and zeolite supplemented feeding of layer chickens alters intestinal microbiota and reduces *Campylobacter* load[J]. *PLoS One*, 2016, 11(4): e0154061.
- [42] Duy N N, Van Phu D, Quoc Le A, *et al.* Effect of oligochitosan and oligo- β -glucan supplementation on growth, innate immunity, and disease resistance of striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*)[J]. *Bio-technology and Applied Biochemistry*, 2017, 64(4): 564-571.
- [43] Qin C B, Zhang Y T, Liu W S, *et al.* Effects of chito-oligosaccharides supplementation on growth performance, intestinal cytokine expression, autochthonous gut bacteria and disease resistance in hybrid tilapia *Oreochromis niloticus* ♀ × *O. aureus* ♂[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2014, 40(1): 267-274.
- [44] Li R J, Yang X B, Li Q, *et al.* Enhanced immune response and resistance to edwardsiellosis following dietary chitooligosaccharide supplementation in the olive flounder (*Paralichthys olivaceus*)[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2015, 47(1): 74-78.

Effects of oligochitosan on the growth, immune responses and gut microbes of hybrid groupers [*Epinephelus fuscoguttatus* (♀)× *E. lanceolatu* (♂)]

SHI Fei¹, HUANG Yao¹, LU Zhijie¹, ZOU Cuiyun¹, TAN Xiaohong¹,
SU Youlu¹, TANG Kaihao², QIN Zhendong^{1*}, LIN Li^{1*}

(1. Guangdong Provincial Water Environment and Aquatic Products Security Engineering Technology Research Center, Guangzhou Key Laboratory of Aquatic Animal Diseases and Waterfowl Breeding, College of Animal Sciences and Technology, Zhongkai University of Agriculture and Engineering, Guangzhou 510225, China;

2. Key Laboratory of Tropical Marine Bio-resources and Ecology, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510301, China)

Abstract: Oligochitosan (OCS) has many important physiological functions, however, the underlying mechanisms on immune regulation of groupers are not well characterized. A feeding trial was conducted in triplicates with the control diet supplemented with OCS at different concentrations (0, 200, 400, 800 and 1 600 mg/kg). The effects of OCS on the grouper growth, immune responses and gut microbes were explored after juvenile hybrid groupers [*Epinephelus fuscoguttatus* (♀)× *E. lanceolatu* (♂)] were cultured for 4 weeks. The results showed that OCS significantly increased weight gain rate and decreased feed coefficient of hybrid groupers, but had no significant effect on condition factor and survival rate. To elucidate the immune responses stimulated by OCS using qRT-PCR, the mRNA expression levels of inflammation-associated cytokines (TNF- α , IL-1 β , TGF- β 1, TOR, and TLR3) from midgut were all significantly up-regulated in the 800 mg/kg group compared to the control. At the same time, OCS significantly improved the antioxidant capacity by increasing the expression of GPx, CAT and MnSOD while they also significantly increased the expression of tight junction proteins (ZO-1, ZO-2, ZO-3, and Claudin-3 α). To characterize the gut bacterial flora by high-throughput sequencing of 16S rRNA, microbe samples were collected from the foregut, midgut, and hindgut, respectively. We found that although there was no significant differences in the relative abundance and α diversity of intestinal bacterial dominant groups between the OCS and the control group, the abundance of probiotics were increased in the 800 mg/kg group. Additionally, the results of principal coordinate analysis showed that β diversity of bacterial community in 800 mg/kg group was significantly different from that in control group, which indicated that OCS could alter the bacterial assembly of hybrid groupers. To further test the antibacterial ability of hybrid groupers fed with OCS, when the hybrid groupers were challenged with *Vibrio harvey*, intestinal morphology was greatly improved and the mortality rate of groups fed with 800 m/kg OCS was significantly lower than that of the control. Taken together, appropriate dietary OCS could improve the growth, immune responses and change the bacterial assembly in the gut of hybrid groupers, so as to play a role in the bacterial resistance.

Key words: *Epinephelus fuscoguttatus* (♀)× *E. lanceolatu* (♂); oligochitosan; *Vibrio harvey*; growth performance; immune response; gut microbes; disease resistance

Corresponding authors: QIN Zhendong. E-mail: qinzhendongsc@163.com;

LIN Li. E-mail: linli@zhku.edu.cn

Funding projects: Foundation of Guangdong Provincial Marine and Fisheries Bureau (GDME-2018C006, D21822202); China-ASEAN Maritime Cooperation Fund (CAMC-2018F); National Natural Science Foundation of China (4210061024); Open Foundation of Key Laboratory of Tropical Marine Bio-resources and Ecology, Chinese Academy of Sciences (LMB20211004)