

文章编号: 1000-0615(2016)09-1398-10

DOI: 10.11964/jfc.20150910061

## 配合饲料和冰鲜太平洋玉筋鱼对珍珠龙胆石斑鱼幼鱼生长、 抗氧化和脂质代谢的影响

丛林梅<sup>1,2</sup>, 王蔚芳<sup>2\*</sup>, 高淳仁<sup>2</sup>, 黄滨<sup>2</sup>, 雷霖<sup>2</sup>, 王桂芹<sup>1\*</sup>

(1. 吉林农业大学动物科技学院, 吉林 长春 130118;

2. 中国水产科学研究院黄海水产研究所,

青岛市海水鱼类种子工程与生物技术重点实验室, 山东 青岛 266071)

**摘要:** 为探讨2种不同饲料对珍珠龙胆石斑鱼幼鱼生长、抗氧化及脂质代谢的影响, 实验选取初始体质量为(191.47±3.70) g的珍珠龙胆石斑鱼幼鱼10 542尾, 随机分成2个处理组, 每个处理组3个重复, 每个重复1757尾, 分别投喂商品专用配合饲料和冰鲜太平洋玉筋鱼, 养殖75 d。结果显示, 冰鲜太平洋玉筋鱼组的增重率(WGR)、特定生长率(SGR)、肥满度(CF)、饲料系数(FCR)及全鱼脂肪含量显著高于商品专用配合饲料组, 肝体比(HSI)和脏体比(VSI)显著低于商品专用配合饲料组, 存活率(SR)和蛋白质效率(PER)与商品专用配合饲料组差异不显著。商品专用配合饲料组的甘油三酯(TG)、血清总胆固醇(CHO)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)含量显著低于冰鲜太平洋玉筋鱼组; 而谷丙转氨酶(GPT)和谷草转氨酶(GOT)的活性显著高于冰鲜太平洋玉筋鱼组。相对冰鲜太平洋玉筋鱼而言, 商品专用配合饲料组肝脏超氧化物歧化酶(SOD)、总抗氧化能力(T-AOC)、过氧化氢酶(CAT)和脂肪酸合成酶(FAS)的活性显著降低, 脂蛋白脂酶(LPL)活性显著升高, 但是苹果酸脱氢酶(MDH)和肉碱棕榈酰转移酶-II(CPT-II)在2组饲料间差异不显著。研究表明, 在本实验条件下, 冰鲜太平洋玉筋鱼更适合投喂珍珠龙胆石斑鱼幼鱼, 商品专用配合饲料对珍珠龙胆石斑鱼幼鱼肝脏产生了不利的影响, 因此, 建议参考冰鲜太平洋玉筋鱼优质的营养特性, 优化和调整珍珠龙胆石斑鱼幼鱼的营养配方。

**关键词:** 珍珠龙胆石斑鱼幼鱼; 冰鲜太平洋玉筋鱼; 商品专用配合饲料; 抗氧化; 脂质代谢

**中图分类号:** S 963.7

**文献标志码:** A

棕点石斑鱼(*Epinephelus fuscoguttatus*)和鞍带石斑鱼(*Epinephelus lanceolatus*)在分类学上属于鲈形目(Perciformes)、鲷科(Serranidae)、石斑鱼亚科(Epinephelinae), 石斑鱼属(*Epinephelus*)。棕点石斑鱼又称老虎斑、虎头斑, 其肉质鲜嫩、生长迅速、价格昂贵, 在东南沿海逐渐成为养殖的名优品种之一; 鞍带石斑鱼, 又称龙趸、龙胆石斑鱼, 是石斑鱼中体型最大的种类, 其肉质鲜嫩、抗病力强, 具有很高的食用和药用价值。近年来, 杂交育种作为一种培育经济效益

高的新品种的方式已经运用到石斑鱼养殖上<sup>[1]</sup>。我国台湾晟名水产公司在2008年用棕点石斑鱼作为母本(♀)、鞍带石斑鱼作为父本(♂)进行杂交, 培育出新品种珍珠龙胆石斑鱼。它继承了棕点石斑鱼的生长快速和鞍带石斑鱼抗病力强的特点, 肉质比较鲜嫩, 具有较高的经济价值。目前很多地区已经开始养殖, 逐渐成为石斑鱼养殖的新宠<sup>[2]</sup>。

石斑鱼是一种在全世界有着广泛的市场需求的肉食性鱼类<sup>[3]</sup>, 随着人工育苗和孵化的成

收稿日期: 2015-09-05 修回日期: 2016-04-18

资助项目: 山东省自然科学基金(BS2015SW018)

通信作者: 王桂芹, E-mail: wgqjla@aliyun.com; 王蔚芳, E-mail: wangwf2000@hotmail.com

功,石斑鱼的养殖已经成为新的产业。近年来,关于石斑鱼的营养需求的研究主要集中在蛋白质<sup>[4-6]</sup>、脂肪<sup>[7-8]</sup>、碳水化合物<sup>[9]</sup>等方面。朱仙龙等<sup>[10]</sup>研究了不同蛋白质与脂肪的日投喂水平对斜带石斑鱼(*Epinephelus coioides*)生长的影响。Shiau等<sup>[9]</sup>研究了点带石斑鱼(*Epinephelus malabaricus*)对碳水化合物的利用,发现其可以节约蛋白质。近几年,因工厂化循环水养殖环境可控、不受地域空间限制、养殖产量高等优点,使得石斑鱼由传统养殖向大规模工厂化循环水养殖扩展,采用什么样的饲料投喂也成为养殖者普遍关心的问题。目前,石斑鱼养殖饲料主要以冰鲜杂鱼为主,商品饲料的比例从2005年的不到1%上升到2014年的10%左右,未来还有很大的上升空间,而且冰鲜杂鱼资源有限,易腐败变质、易污染水质也影响了石斑鱼养殖业的可持续发展,因此,如何优化商品饲料的配方,改善饲料营养

配比,替代冰鲜杂鱼成为研究者普遍关注的研究热点<sup>[11]</sup>。关于2种饲料研究的报道主要集中在对石斑鱼生长、免疫力<sup>[12]</sup>和营养成分等<sup>[13]</sup>,然而在工厂化循环水养殖条件下商品饲料和冰鲜杂鱼对珍珠龙胆石斑鱼幼鱼脂质代谢和抗氧化等方面的系统研究还未见报道。本实验旨在通过研究配合饲料和冰鲜杂鱼对珍珠龙胆石斑鱼幼鱼生长、血清生化指标、抗氧化能力和脂质代谢的影响,为调整珍珠龙胆石斑鱼商品配合饲料中营养物质的合理配比提供参考依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验饲料

实验所用冰鲜杂鱼为太平洋玉筋鱼(*Ammodytes personatus*), -20 °C冰库中保存,商品饲料为石斑鱼专用配合饲料,2种实验饲料的主要营养组成见表1,氨基酸和脂肪酸的组成见表2和表3。

表1 商品专用配合饲料和冰鲜太平洋玉筋鱼的主要营养组成(干重)

Tab. 1 The main nutritional components of commercial compound diet and fresh frozen *A. personatus* (dry matter) %

营养成分 nutritional component	商品专用配合饲料 commercial compound diet	冰鲜太平洋玉筋鱼 fresh frozen <i>A. personatus</i>
水分 moisture	10.10	71.55
粗蛋白质 crude protein	55.30	56.43
粗脂肪 crude lipid	10.85	33.44
粗灰分 crude ash	8.22	9.23
淀粉含量 starch content	12.00	-

### 1.2 实验动物及饲养管理

实验所用珍珠龙胆石斑鱼幼鱼购自山东东方海洋科技股份有限公司,为当年人工培育的同一批苗种。养殖地点在山东莱州,使用循环水养殖系统进行养殖。实验前,驯养一部分幼鱼从摄食商品专用配合饲料到摄食冰鲜太平洋玉筋鱼,驯养期间每日7:00和16:00投喂冰鲜太平洋玉筋鱼,驯养时间为2w,驯养结束后停食24h,挑选体质量为(191.47±3.70)g的健康幼鱼10542尾随机平均分配到6个30 m<sup>3</sup>的养殖池中,每个养殖池放养1757尾实验鱼,每个处理组设3个重复。实验过程中,每天表观饱食投喂商品专用配合饲料和冰鲜太平洋玉筋鱼2次(7:00, 16:00),投喂结束30 min后排污,养殖实验周期为75 d。实验期间记录死亡幼鱼数量并称重。整个养殖期间

水温(24.6±1) °C,盐度 27~28,溶解氧>7 mg/L。

### 1.3 鱼体成分和形体指标

养殖实验结束后,停饲24 h。每个池子随机取26尾鱼,其中6尾放于-20 °C冰箱保存,用于全鱼体的常规营养成分分析;另外20尾鱼编号分别测量体质量(g)、体长(cm),之后冰上解剖,取出肝胰脏和内脏,并记录质量(g)。商品专用配合饲料、冰鲜太平洋玉筋鱼和珍珠龙胆石斑鱼全鱼的常规营养测定均采用国标法。105 °C(72 h)烘干恒重法测定水分;凯氏定氮法测定粗蛋白质,使用2300型蛋白质自动分析仪(FOSS公司,瑞典)分析;索氏抽提法测定粗脂肪,使用36680型脂肪抽提仪(BUCHI公司,瑞士)分析;箱式电阻炉550 °C灼烧法(16 h)测定粗灰分。饲料氨基酸的测定采用日立835-50全自动氨基酸分析

表 2 商品专用配合饲料和冰鲜太平洋玉筋鱼的  
氨基酸组成(干重)

Tab. 2 Amino acid components of commercial compound  
diet and fresh frozen *A. personatus* (dry matter) %

氨基酸 amino acids	商品专用配合饲料 commercial compound diet	冰鲜太平洋玉筋鱼 fresh frozen <i>A. personatus</i>
苏氨酸 Thr	1.77	2.26
缬氨酸 Val	2.35	2.92
蛋氨酸 Met	0.06	0.08
异亮氨酸 Ile	2.13	2.60
亮氨酸 Leu	3.69	4.27
苯丙氨酸 Phe	2.04	2.29
组氨酸 His	1.61	2.40
赖氨酸 Lys	3.45	4.44
精氨酸 Arg	2.66	3.06
天冬氨酸 Asp	4.19	4.83
丝氨酸 Ser	1.61	2.03
谷氨酸 Glu	7.04	7.88
甘氨酸 Gly	2.85	3.14
丙氨酸 Ala	3.00	3.39
半胱氨酸 Cys	0.34	0.65
脯氨酸 Pro	2.25	2.25

仪进行测定, 饲料脂肪酸的测定采用GC-2010气相色谱仪(日本岛津公司)进行测定。

#### 1.4 血清生化指标

每个池子随机取6尾鱼, 用2.5 mL注射器在鱼体尾静脉采血, 放入2 mL离心管中于4 °C冰箱静置5 h, 3500 r/min低温离心10 min, 收集血清, 液氮速冻, -80 °C冰箱中保存, 采用试剂盒(南京建成生物工程研究所)测定总胆固醇(CHO)、谷草转氨酶(GOT)、谷丙转氨酶(GPT)、甘油三酯(TG)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)的含量。

#### 1.5 肝脏抗氧化和脂质代谢指标

幼鱼取血后, 冰上解剖, 取出肝脏, 液氮速冻, -80 °C超低温冰箱中保存待测。采用试剂盒(南京建成生物工程研究所)测定超氧化物歧化酶(SOD)、总抗氧化能力(T-AOC), 过氧化氢酶(CAT)。采用酶联免疫吸附测定法(ELISA)测定脂蛋白脂酶(LPL)、脂肪酸合成酶(FAS)、苹果酸

表 3 商品专用配合饲料和冰鲜太平洋玉筋鱼的  
脂肪酸组成(干重)

Tab. 3 Fatty acid components of commercial compound  
diet and fresh frozen *A. personatus* (dry matter) %

脂肪酸 fatty acid	商品专用配合饲料 commercial compound diet	冰鲜太平洋玉筋鱼 fresh frozen <i>A. personatus</i>
C14:0	8.15	4.86
C16:0	27.64	23.60
C16:1n-7	7.23	6.70
C18:0	5.41	3.88
C18:1n-9	14.27	12.49
C18:2n-6	3.38	1.72
C18:3n-3	1.17	1.53
C18:2n-6	5.56	8.59
C20:0	1.04	1.23
C20:1n-9	1.03	1.36
C20:3n-3	0.98	2.01
C20:4n-6	0.25	0.68
C22:0	0.94	0.92
C22:1n-9	0.62	0.52
C20:5n-3(EPA)	9.28	9.55
C22:6n-3(DHA)	13.87	17.23
ΣSFA	43.18	34.49
ΣMUFA	23.15	21.07
n-3 PUFA	25.30	30.32
n-6 PUFA	5.81	9.27
n-3/n-6	4.35	3.27

脱氢酶(MDH)、肉碱棕榈酰转移酶-II (CPT-II)的活性。

#### 1.6 计算公式

$$\text{存活率(SR, \%)} = N_t \times 100 / N_0;$$

$$\text{增重率(WGR, \%)} = (W_t - W_0) / W_0 \times 100$$

$$\text{饵料系数(FCR)} = F / (W_t - W_0);$$

$$\text{特定生长率(SGR, \% / t)} = (\ln W_t - \ln W_0) / t \times 100;$$

$$\text{肝体比(HSI, \%)} = W_h / W_t \times 100;$$

$$\text{脏体比(VSI, \%)} = W_v / W_t \times 100;$$

$$\text{蛋白质效率(PER, \%)} = (W_t - W_0) / (C \times F) \times 100;$$

$$\text{肥满度(CF, g/cm}^3\text{)} = W_t / L^3 \times 100;$$

式中,  $N_t$ 、 $N_0$ 分别表示终末尾数和初始尾数,

$F$ 为投喂量,  $W_0$ 为初始实验鱼体质量(g),  $W_t$ 为实验末实验鱼体质量(g),  $W_v$ 为内脏湿重(g),  $W_h$ 为肝脏湿重(g),  $C$ 为饲料蛋白质的含量(%),  $L$ 为体长(cm),  $t$ 为实验天数。

### 1.7 数据处理

采用SPSS18.0软件进行独立样本T检验分析, 实验数据以平均值±标准差(mean±SD)表示,  $P<0.05$ 表示差异显著。

## 2 结果

### 2.1 商品专用配合饲料和冰鲜太平洋玉筋鱼对珍珠龙胆石斑鱼幼鱼生长的影响

商品专用配合饲料组的WGR、SGR、FCR和CF均显著低于冰鲜太平洋玉筋鱼组( $P<0.05$ ), HSI、VSI均显著高于冰鲜太平洋玉筋鱼组( $P<0.05$ ), 2种饲料的PER和SR无显著性差异( $P>0.05$ ), 全鱼粗脂肪含量差异显著( $P<0.05$ ) (表4)。

### 2.2 商品专用配合饲料和冰鲜太平洋玉筋鱼对珍珠龙胆石斑鱼幼鱼血清生化指标的影响

商品专用配合饲料组血清中的TG、CHO、LDL-C的含量均显著低于冰鲜太平洋玉筋鱼组( $P<0.05$ ), GPT和GOT显著高于冰鲜太平洋玉筋鱼组( $P<0.05$ ) (表5)。

### 2.3 商品专用配合饲料和冰鲜太平洋玉筋鱼对珍珠龙胆石斑鱼幼鱼肝脏抗氧化能力的影响

商品专用配合饲料组肝脏中SOD、T-AOC和CAT的活性均显著低于冰鲜太平洋玉筋鱼组( $P<0.05$ ) (表6)。

### 2.4 商品专用配合饲料和冰鲜太平洋玉筋鱼对珍珠龙胆石斑鱼幼鱼脂质代谢的影响

商品专用配合饲料组LPL活性显著低于冰鲜太平洋玉筋鱼组( $P<0.05$ ), 而FAS的活性显著高于冰鲜太平洋玉筋鱼组( $P<0.05$ ), 商品专用配合饲料组的MDH和CPT- II 的活性与冰鲜太平洋玉筋鱼组差异不显著( $P>0.05$ ) (表7)。

## 3 讨论

### 3.1 商品专用配合饲料和冰鲜太平洋玉筋鱼对珍珠龙胆石斑鱼幼鱼生长和全鱼体组成的影响

饲料是养殖鱼类营养物质和能量的重要来

表4 商品专用配合饲料和冰鲜太平洋玉筋鱼对珍珠龙胆石斑鱼幼鱼生长性能和全鱼体组成的影响

Tab. 4 Effects of commercial compound diet and fresh frozen *A. personatus* on the growth performance and whole body composition of hybrid grouper (*E. fuscoguttatus*♀×*E. lanceolatus*♂) juveniles

生长性能 growth performance	商品专用配合饲料 commercial compound diet	冰鲜太平洋玉筋鱼 fresh frozen <i>A. personatus</i>
初均重/g IAW	190.23±1.01	192.71±2.18
末均重/g FAW	311.24±5.81 <sup>a</sup>	350.29±2.19 <sup>b</sup>
增重率/% WGR	63.64±3.92 <sup>a</sup>	81.78±0.92 <sup>b</sup>
饵料系数 FCR	1.95±0.55 <sup>a</sup>	6.22±0.25 <sup>b</sup>
存活率/% SR	99.57±0.08	99.60±0.23
特定增长率/(%/d)SGR	0.66±0.35 <sup>a</sup>	0.80±0.55 <sup>b</sup>
蛋白质效率/% PER	103.05±2.86	100.16±0.41
肝体比/% HSI	2.82±0.40 <sup>a</sup>	1.83±0.25 <sup>b</sup>
脏体比/% VSI	8.57±0.11 <sup>a</sup>	7.44±0.14 <sup>b</sup>
肥满度/(g/cm <sup>3</sup> ) CF	4.39±0.08 <sup>a</sup>	4.60±0.04 <sup>b</sup>
全鱼体组成/(%干重) whole body components(dry matter)		
水分 moisture	71.58±1.34	71.75±5.09
粗蛋白质 crude protein	59.90±3.01	55.44±1.15
粗脂肪 crude lipid	21.39±2.01 <sup>a</sup>	29.44±1.11 <sup>b</sup>
粗灰分 crude ash	15.47±0.37	14.64±0.27

注: 同一列中上标字母不同表示差异显著( $P<0.05$ ), 无字母表示差异不显著( $P>0.05$ ), 下同  
Notes: Values in the same column with different superscripted small letters mean significant difference ( $P<0.05$ ), no letter superscripted mean no significant difference ( $P>0.05$ ). The same below

表5 商品专用配合饲料和冰鲜太平洋玉筋鱼对珍珠龙胆石斑鱼幼鱼血清生化指标的影响

Tab. 5 Effects of commercial compound diet and fresh frozen *A. personatus* on serum biochemical indices of hybrid grouper (*E. fuscoguttatus*♀×*E. lanceolatus*♂) juveniles

血清生化指标 serum biochemical indexes	商品专用配合饲料 commercial compound diet	冰鲜太平洋玉筋鱼 fresh frozen <i>A. personatus</i>
谷草转氨酶/(IU/L) GOT	1334.23±30.08 <sup>a</sup>	833.69±101.45 <sup>b</sup>
谷丙转氨酶/(IU/L) GPT	58.34±2.50 <sup>a</sup>	40.18±6.37 <sup>b</sup>
胆固醇/(mmol/L) CHO	3.01±0.63 <sup>a</sup>	6.31±0.39 <sup>b</sup>
甘油三酯/(mmol/L) TG	1.75±0.46 <sup>a</sup>	3.01±0.61 <sup>b</sup>
低密度脂蛋白胆固醇/ (mmol/L) LDL-C	1.11±0.15 <sup>a</sup>	3.35±0.28 <sup>b</sup>

源, 饲料中的营养物质不仅影响鱼类的生长发

表 6 商品专用配合饲料和冰鲜太平洋玉筋鱼对珍珠龙胆石斑鱼幼鱼肝脏抗氧化能力的影响

Tab. 6 Effects of commercial compound diet and fresh frozen *A. personatus* on liver antioxidant ability of hybrid grouper (*E. fuscoguttatus*♀×*E. lanceolatus*♂) juveniles

肝脏抗氧化能力 liver antioxidative ability	商品专用配合饲料 commercial compound diet	冰鲜太平洋玉筋鱼 fresh frozen <i>A. personatus</i>
超氧化物歧化酶 (U/mg prot) SOD	98.51±0.29 <sup>a</sup>	117.85±0.82 <sup>b</sup>
过氧化氢酶(U/mg prot) CAT	23.91±0.36 <sup>a</sup>	37.03±0.71 <sup>b</sup>
总抗氧化能力(U/mg prot) T-AOC	1.15±0.14 <sup>a</sup>	1.93±0.17 <sup>b</sup>

表 7 商品专用配合饲料和冰鲜太平洋玉筋鱼对珍珠龙胆石斑鱼幼鱼脂质代谢的影响

Tab. 7 Effects of commercial compound diet and fresh frozen *A. personatus* on lipid metabolism of hybrid grouper (*E. fuscoguttatus*♀×*E. lanceolatus*♂) juveniles

脂质代谢 lipid metabolism	商品专用配合饲料 commercial compound diet	冰鲜太平洋玉筋鱼 fresh frozen <i>A. personatus</i>
苹果酸脱氢酶(U/mg prot) MDH	1087.92±109.66	1141.97±66.86
脂蛋白酯酶(U/mg prot) LPL	630.69±8.98 <sup>a</sup>	732.74±36.02 <sup>b</sup>
脂肪酸合成酶(U/mg prot) FAS	1774±88.02 <sup>b</sup>	1454±29.55 <sup>a</sup>
肉碱棕榈酰转移酶- II/(ng/mg prot) CPT-II	114.86±24.12	129.72±17.13

育,还对鱼类健康养殖具有重要意义。本实验结果显示,2种饲料对珍珠龙胆石斑鱼幼鱼SR和PER无显著影响,而投喂冰鲜太平洋玉筋鱼组的珍珠龙胆石斑鱼幼鱼WGR和SGR比商品专用配合饲料组分别提高了29%左右和21%左右,表明投喂冰鲜太平洋玉筋鱼促进了珍珠龙胆石斑鱼幼鱼的生长,这与陈度煌等<sup>[12]</sup>对斜带石斑鱼和牛化欣等<sup>[14]</sup>对大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)的研究结果一致,可能是冰鲜太平洋玉筋鱼的适口性好,诱食作用较强,更利于珍珠龙胆石斑鱼幼鱼的消化和吸收。但是冰鲜太平洋玉筋鱼组的FCR为6.22,显著高于商品专用配合饲料的1.95,商品专用配合饲料成本约为18元/kg,当年冰鲜太平洋玉筋鱼成本约为4元/kg,分析可知,投喂冰鲜太平洋玉筋鱼产生的经济效益高于商品专用配合饲料,也就是说投喂冰鲜杂鱼可以节约成本。饲料的脂肪水平影响鱼类的脂肪沉积,从本实验结果中可以看出,投喂冰鲜太平洋玉筋鱼的珍珠龙胆石斑鱼幼鱼的全鱼脂肪水平显

著高于商品专用配合饲料, Helland等<sup>[15]</sup>曾报道过饲料脂肪水平的升高会导致脂肪在鱼体的沉积增多,本实验冰鲜太平洋玉筋鱼的脂肪含量高于商品专用配合饲料,从而使全鱼脂肪含量升高,相似的结果在点带石斑鱼<sup>[16]</sup>、白甲鱼(*Onychostoma sima*)<sup>[17]</sup>上都有报道,可见高脂肪水平饲料可以提高鱼体的脂肪含量。

### 3.2 商品专用配合饲料和冰鲜太平洋玉筋鱼对珍珠龙胆石斑鱼幼鱼形体指标和血清生化指标的影响

饲料营养水平影响鱼类血清的生化指标,营养物质一般通过血液运输到组织中<sup>[18]</sup>。Han等<sup>[19]</sup>研究日本黄姑鱼(*Nibea japonica*)、孙瑞健等<sup>[20]</sup>研究大黄鱼(*Larimichthys crocea*)和张春暖等<sup>[21]</sup>研究梭鱼(*Liza haematocheila*)都表明,在一定范围内,HSI和VSI随着饲料脂肪水平的升高而升高;正常情况下,GPT和GOT在血液中的值很低,只有组织出现损伤时,才会使血液中的GPT和GOT升高,所以血液中GPT和GOT可以反映肝脏的损伤程度<sup>[22]</sup>。牛化欣等<sup>[14]</sup>研究表明,与投喂低脂商品饲料相比,投喂冰鲜野杂鱼和高脂商品饲料使大菱鲆的HSI和VSI增大、血清转氨酶活性升高,本实验结果却是投喂脂肪含量低于冰鲜太平洋玉筋鱼的商品专用配合饲料的幼鱼的HSI和VSI、GPT和GOT的值呈现升高的趋势,分析原因可能是因为珍珠龙胆石斑鱼幼鱼对商品专用配合饲料的适应能力较差。大菱鲆因多年驯化投喂商品饲料,引种之前已适应欧洲的工厂化养殖,而珍珠龙胆石斑鱼是近年来杂交新品种,对商品饲料的生理适应还不成熟,实践中主要还以冰鲜杂鱼为主。血液中TG和CHO含量亦可以反映鱼类脂类代谢的情况。Lin等<sup>[23]</sup>研究发现患脂肪肝病的草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)脂肪含量与甘油三脂含量变化趋势相反,可能是因为肝脏受损后,TG和CHO不能及时转运出去,积累在肝脏,使血液中的TG和CHO降低,因为当肝细胞中的脂肪不能随血液及时转运出去时,就会造成脂肪在肝脏堆积,因此肝脏中脂肪含量升高的同时,血液中脂肪含量就会降低<sup>[24]</sup>,本实验商品专用配合饲料组的TG和CHO的含量显著低于冰鲜太平洋玉筋鱼组,可能是肝脏受到影响后影响了TG和CHO的转运,相似结果在奥尼罗非鱼(*Oreochromis aureus*♂×*O. niloticus*♀)<sup>[25]</sup>、

草鱼<sup>[26]</sup>和褐菖鲉(*Sebastes marmoratus*)<sup>[27]</sup>上都有报道。LDL-C是负责把肝脏中的CHO从肝运送到全身组织<sup>[28]</sup>。当鱼类肝脏出现损伤后, LDL-C活性变低, 数量也因此减少, 影响了CHO的代谢和酯化, 进而导致CHO在肝脏内贮留, 所以分解进入血液的LDL-C和CHO减少, 本实验商品专用配合饲料的LDL-C的含量显著低于冰鲜太平洋玉筋鱼组, 再结合其他指标分析, 投喂商品专用配合饲料对幼鱼肝脏造成了一定的影响, 分析原因有以下几个方面: ①养殖鱼类品种不同, 珍珠龙胆石斑鱼为养殖新品种, 属于肉食性鱼类, 对天然饵料的适应能力较人工配合饲料强。②商品专用配合饲料淀粉含量较高(淀粉含量为12%)可能会影响石斑鱼的脂质代谢。已有研究报道, 肉食性鱼类特别是海水鱼类对碳水化合物化合物的利用率很低, 虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)摄食高糖饲料后, 会使脂肪在肝脏沉积, HSI增大进而对肝脏造成损伤<sup>[29]</sup>; 谭肖英等<sup>[30]</sup>研究指出, 随着饲料碳水化合物水平的下降, 大口黑鲈(*Micropterus salmoides*)的VSI、HSI和肝脂含量都呈下降趋势。本实验冰鲜太平洋玉筋鱼脂肪含量很高, 但VSI、HSI和GOT、GPT的活性低于商品配合饲料, 说明石斑鱼能耐受高脂肪饲料, 脂肪含量高不是本实验石斑鱼脂肪肝倾向的主要原因。本实验所用商品饲料的糖含量要远高于野杂太平洋玉筋鱼, 导致饲喂商品配合饲料的石斑鱼幼鱼有脂肪肝的倾向, 说明珍珠龙胆石斑鱼幼鱼耐受高糖的能力较差, 生产中要注意糖类能量饲料的添加。③养殖方式的改变也可能是引起石斑鱼肝脏亚健康状态的原因。近些年, 在集约化高密度养殖过程中, 鱼类脂肪肝常有发生<sup>[31]</sup>, 作为养殖新品种的珍珠龙胆石斑鱼是否适应这种养殖方式, 还需要进一步验证。④商品专用配合饲料中缺乏抗脂肪肝的因子。冰鲜太平洋玉筋鱼氨基酸组成平衡, 脂肪酸以不饱和脂肪酸居多, 特别是高度不饱和脂肪酸含量高。B族维生素尤以维生素B<sub>12</sub>和维生素B<sub>2</sub>居多, 含有丰富的脂溶性维生素, 鱼粉是良好的矿物质来源, 尤其是微量元素的含量较多。冰鲜杂鱼含有高度不饱和脂肪酸、蛋氨酸和赖氨酸、微量元素等抗脂肪肝因子促进脂肪的代谢<sup>[24]</sup>。所以在珍珠龙胆石斑鱼幼鱼商品饲料中要注意鱼粉和相关抗脂肪肝因子的适当添加。

### 3.3 商品专用配合饲料和冰鲜太平洋玉筋鱼对珍珠龙胆石斑鱼幼鱼肝脏抗氧化能力和脂质代谢的影响

鱼体的主要抗氧化指标包括SOD、CAT等, 主要作用是清除包括超氧阴离子(O<sub>2</sub><sup>-</sup>)和过氧化氢(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)在内的超氧化物自由基<sup>[21]</sup>。T-AOC是机体抵抗外界氧化能力的综合体现, 代表两方面因子的总体抗氧化能力, 包括酶系统(SOD、CAT、GST等)和非酶系统(维生素、氨基酸和金属蛋白等), 它的大小可以表示机体对外来刺激的代偿能力及机体自由基代谢状态<sup>[32]</sup>。本实验中冰鲜太平洋玉筋鱼组SOD、CAT、T-AOC显著高于商品专用配合饲料组, 投喂商品专用配合饲料的珍珠龙胆石斑鱼肝脏抗氧化能力降低。与牛化欣等<sup>[14]</sup>冰鲜野杂鱼和高脂商品饲料使大菱鲆肝脏抗氧化能力降低的结果不一致, 可能是因为鱼的种类不同, 对商品专用配合饲料的适应程度不同所致。

鱼类组织中的脂质合成和分解与摄入的外源性脂质有着紧密的关系。MDH在脂肪合成代谢过程中能生成烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NADPH), 以供脂肪酸从头合成脂肪的需要。LPL主要是在脂肪分解阶段发挥作用, 它分解来自于饲料中的甘油三酯, 生成甘油和游离的脂肪酸, 在此过程中作为限速酶发挥作用。FAS在鱼体内源性脂肪酸合成时发挥关键作用, 其活性的大小是衡量鱼体脂肪沉积的一个重要参数。CPT-II是肉碱转运酶系统中的重要组成部分, 在脂肪分解以及能量代谢过程中作为限速酶起重要作用<sup>[33]</sup>。本实验中冰鲜太平洋玉筋鱼组LPL的活性显著高于商品配合饲料组, 分析原因可能是具有高脂肪含量的冰鲜太平洋玉筋鱼提高了LPL的活性, 进而用于分解脂肪, 这与宋理平等<sup>[34]</sup>对许氏平鲈(*Sebastes schlegeli*)的研究和王爱民等<sup>[35]</sup>对吉富罗非鱼(GIFT *Oreochromis niloticus*)的研究结果相一致。商品专用配合饲料组FAS的活性显著高于冰鲜太平洋玉筋鱼组, 这与牛化欣等<sup>[14]</sup>对大菱鲆研究的结果相似, 可能是因为冰鲜太平洋玉筋鱼脂肪含量比较高, 不需要过多的FAS合成。MDH的活性与脂肪含量呈负相关, 但是差异不显著, 这与宋理平等<sup>[34]</sup>的研究结果一致。

本实验是在工厂化循环水养殖条件下开展的规模较大的生产性实验, 其结果对生产具有

一定的参考价值,综合看来,虽然冰鲜太平洋玉筋鱼脂肪含量较高,但是因为其是天然饵料,幼鱼比较适应,对生长比较有利,而投喂商品配合饲料对幼鱼肝脏造成了一定的影响,在工厂化养殖生产中,投喂冰鲜太平洋玉筋鱼可以加快珍珠龙胆石斑鱼幼鱼生长,建议商品配合饲料应该参考冰鲜太平洋玉筋鱼的营养优势,改善营养配比,提高生产工艺降低淀粉含量,添加一些抗脂肪肝因子,以便开展高效健康的珍珠龙胆石斑鱼工厂化养殖。

#### 参考文献:

- [1] 王大鹏,曹占旺,谢达祥,等.石斑鱼的研究进展[J].南方农业学报,2012,43(7):1058-1065.  
Wang D P, Cao Z W, Xie D X, *et al.* Research progress in *Epinephelus* industry[J]. Journal of Southern Agriculture, 2012, 43(7): 1058-1065(in Chinese).
- [2] Jiang Y D, Wang J T, Han T, *et al.* Effect of dietary lipid level on growth performance, feed utilization and body composition by juvenile red spotted grouper(*Epinephelus akaara*)[J]. Aquaculture International, 2015, 23(1): 99-110.
- [3] 胡家财,周立红,洪惠馨.青石斑鱼人工配合饵料中蛋白质适宜含量的研究[J].厦门水产学院学报,1995,17(2):13-16.  
Hu J C, Zhou L H, Hong H X. The most suitable content of protein in the artificial diets to culture *Epinephelus awoara*[J]. Journal of Xiamen Fisheries College, 1995, 17(2): 13-16(in Chinese).
- [4] Shiau S Y, Lan C W. Optimum dietary protein level and protein to energy ratio for growth of grouper (*Epinephelus malabaricus*)[J]. Aquaculture, 1996, 145(1-4): 259-266.
- [5] Luo Z, Liu Y J, Mai K S, *et al.* Optimal dietary protein requirement of grouper *Epinephelus coioides* juveniles fed isoenergetic diets in floating net cages[J]. Aquaculture Nutrition, 2004, 10(4): 247-252.
- [6] 阮成旭,袁重桂.点带石斑鱼人工配合饵料中蛋白质适宜含量的研究[J].福州大学学报(自然科学版),2007,35(2):308-311.  
Ran C X, Yuan C G. Suitable content of protein in artificial diet for *Epinephelus malabaricus*[J]. Journal of Fuzhou University (Natural Science), 2007, 35(2): 308-311(in Chinese).
- [7] Lin Y H, Shiau S Y. Dietary lipid requirement of grouper, *Epinephelus malabaricus*, and effects on immune responses[J]. Aquaculture, 2003, 225(1-4): 243-250.
- [8] 董晓慧,杨俊江,谭北平,等.幼鱼和养成阶段斜带石斑鱼对饲料中脂肪的需要量[J].动物营养学报,2015,27(1):133-146.  
Dong X H, Yang J J, Tan B P, *et al.* Dietary lipid requirements of orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*) in juvenile and grow out stage[J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2015, 27(1): 133-146(in Chinese).
- [9] Shiau S Y, Lin Y H. Carbohydrate utilization and its protein-sparing effect in diets for grouper (*Epinephelus malabaricus*)[J]. Animal Science, 2001, 73(2): 299-304.
- [10] 朱仙龙,吴小易,李伟峰,等.不同蛋白与脂肪日投喂水平对斜带石斑鱼生长的影响[J].热带生物学报,2015,6(1):1-10.  
Zhu X L, Wu X Y, Li W F, *et al.* Effects of dietary protein and lipid levels on the growth of orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*)[J]. Journal of Tropical Biology, 2015, 6(1): 1-10(in Chinese).
- [11] 赵志玉.业界聚焦石斑鱼产业发展[J].海洋与渔业,2015(1):33-35.  
Zhao Z Y. The industry focus on the development of grouper industry[J]. Ocean & Fishery, 2015(1):33-35.
- [12] 陈度煌,郑乐云,林建斌,等.不同饲料与小杂鱼对斜带石斑鱼生长和免疫力影响的研究[J].福建农业学报,2013,28(4):309-314.  
Chen D H, Zheng L Y, Lin J B, *et al.* Effects of different feed and coarse fish on growth and immunity of grouper (*Epinephelus coioides*)[J]. Fujian Journal of Agricultural Sciences, 2013, 28(4): 309-314(in Chinese).
- [13] 逯尚尉,刘兆普,余燕.不同饵料对点带石斑鱼幼鱼生长、营养成分及组织消化酶活性的影响[J].上海海洋大学学报,2010,19(5):648-653.  
Lu S W, Liu Z P, Yu Y. Effect of different diets on growth nutritive composition and digestive enzyme activities of juvenile *Epinephelus malabaricus*[J]. Journal of Shanghai Ocean University, 2010, 19(5): 648-653(in Chinese).
- [14] 牛化欣,雷霖霖,常杰,等.冰鲜野杂鱼和商品饲料对大菱鲆生长、脂质代谢及抗氧化功能的影响[J].动物营养学报,2013,25(11):2696-2704.

- Niu H X, Lei J L, Chang J, *et al.* Effects of fresh frozen trash fish and commercial feeds on growth, lipid metabolism and antioxidant function of turbot (*Scophthalmus maximus* L.)[J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2013, 25(11): 2696-2704(in Chinese).
- [15] Helland S J, Grisdale-Helland B. The influence of replacing fish meal in the diet with fish oil on growth, feed utilization and body composition of Atlantic salmon (*Salmo salar*) during the smoltification period[J]. Aquaculture, 1998, 162(1-2): 1-10.
- [16] Tuan L A, Williams K C. Optimum dietary protein and lipid specifications for juvenile malabar grouper (*Epinephelus malabaricus*)[J]. Aquaculture, 2007, 267(1-4): 129-138.
- [17] 向泉, 周兴华, 陈建, 等. 饲料脂肪水平对白甲鱼幼鱼生长性能、体组成和血清生化指标的影响[J]. 动物营养学报, 2013, 25(8): 1805-1816.
- Xiang X, Zhou X H, Chen J, *et al.* Effects of dietary lipid level on growth performance, body composition and serum biochemical indices of juvenile *Onychostoma sima*[J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2013, 25(8): 1805-1816(in Chinese).
- [18] 林浩然. 鱼类生理学[M]. 广州: 中山大学出版社, 2011: 127-132.
- Lin H R. Fish Physiology[M]. Guangzhou: Sun yai-Sen University Press, 2011: 127-132(in Chinese).
- [19] Han T, Li X Y, Wang J T, *et al.* Effect of dietary lipid level on growth, feed utilization and body composition of juvenile giant croaker *Nibea japonica*[J]. Aquaculture, 2014, 434: 145-150.
- [20] 孙瑞健, 徐玮, 米海峰, 等. 饲料脂肪水平和投喂频率对大黄鱼生长、体组成及脂肪沉积的影响[J]. 水产学报, 2015, 39(3): 401-409
- Sun R J, Xu W, Mi H F, *et al.* Effects of dietary lipid level and feeding frequency on growth, body composition and lipid deposition in juvenile large yellow croaker (*Larimichthys crocea*)[J]. Journal of Fisheries of China, 2015, 39(3): 401-409(in Chinese).
- [21] 张春暖, 王爱民, 刘文斌, 等. 饲料脂肪水平对梭鱼脂肪沉积、脂肪代谢酶及抗氧化酶活性的影响[J]. 中国水产科学, 2013, 20(1): 108-115.
- Zhang C N, Wang A M, Liu W B, *et al.* Effects of dietary lipid levels on fat deposition, lipid metabolize enzyme and antioxidant activities of *Chelon haematocheilus*[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2013, 20(1): 108-115(in Chinese).
- [22] Rotllant J, Tort L. Cortisol and glucose responses after acute stress by net handling in the sparid red porgy previously subjected to crowding stress[J]. Journal of Fish Biology, 1997, 51(1): 21-28.
- [23] Lin D, Mao Y Q, Cai F S. Nutritional lipid liver disease of grass carp *Ctenopharyngodon idullus* (C. et V.)[J]. Chinese Journal of Oceanology and Limnology, 1990, 8(4): 363-373.
- [24] 王兴强, 段青源, 麦康森, 等. 养殖鱼类脂肪肝研究概况[J]. 海洋科学, 2002, 26(7): 36-39.
- Wang X Q, Duan Q Y, Mai K S, *et al.* Studies on fatty liver of cultured fishes: a review[J]. Marine Sciences, 2002, 26(7): 36-39(in Chinese).
- [25] 甘晖, 李坚明, 冯广朋, 等. 饲料脂肪水平对奥尼罗非鱼幼鱼生长和血浆生化指标的影响[J]. 上海海洋大学学报, 2009, 18(1): 35-41.
- Gan H, Li J M, Feng G P, *et al.* Effects of different lipid levels on growth and haematological biochemistry in juvenile tilapia (*Oreochromis niloticus*×*Oreochromis aureus*)[J]. Journal of Shanghai Ocean University, 2009, 18(1): 35-41(in Chinese).
- [26] 曹俊明, 林鼎, 薛华, 等. 四种抗脂肪肝物质降低草鱼肝脏脂肪积累的替代关系[J]. 水生生物学报, 1999, 23(2): 102-111.
- Cao J M, Li D, Xue H, *et al.* Substitutional effects of four lipotropic agents on lipid accumulation in grass carp liver[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 1999, 23(2): 102-111(in Chinese).
- [27] 施兆鸿, 岳彦峰, 彭士明, 等. 饲料脂肪水平对褐菖鲉血清生化指标、免疫及抗氧化酶活力的影响[J]. 中国水产科学, 2013, 20(1): 101-107.
- Shi Z H, Yue Y F, Peng S M, *et al.* Effects of dietary lipid levels on serum biochemistry indices, immunity and antioxidant activity in *Sebastiscus marmoratus*[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2013, 20(1): 101-107(in Chinese).
- [28] Deplano M, Connes R, Diaz J P, *et al.* Intestinal steatosis in the farm-reared sea bass *Dicentrarchus labrax*[J]. Diseases of Aquatic Organisms, 1989, 6(2): 121-130.
- [29] Capilla E, Médale F, Navarro I, *et al.* Muscle insulin binding and plasma levels in relation to liver glucokinase activity, glucose metabolism and dietary carbohydrates



- in rainbow trout[J]. *Regulatory Peptides*, 2003, 110(2): 123-132.
- [30] 谭肖英, 刘永坚, 田丽霞, 等. 饲料中碳水化合物水平对大口黑鲈 *Micropterus salmoides* 生长、鱼体营养成分组成的影响[J]. 中山大学学报(自然科学版), 2005, 44(增1): 258-263.  
Tan X Y, Liu Y J, Tian L X, *et al.* The effects of dietary carbohydrate levels on the growth, nutrient composition of juvenile largemouth bass *Micropterus salmoides*[J]. *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni*, 2005, 44(Suppl.1): 258-263(in Chinese).
- [31] 牛化欣, 祁飞, 贾磊. 集约化养殖鱼类脂肪肝疾病及其防治[J]. 河北渔业, 2007(7): 47-48.  
Niu H X, Qi F, Jia L. Fatty liver disease of fish under intensive culture and its control[J]. *Hebei Fisheries*, 2007(7): 47-48(in Chinese).
- [32] 潘瑜, 毛述宏, 关勇, 等. 饲料中不同脂肪源对鲤鱼生长性能、脂质代谢和抗氧化能力的影响[J]. 动物营养学报, 2012, 24(7): 1368-1375.  
Pan Y, Mao S H, Guan Y, *et al.* Effects of different lipid sources in diets on growth performance lipid metabolism and antioxidant ability of common carp (*Cyprinus carpio*)[J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2012, 24(7): 1368-1375(in Chinese).
- [33] 张媛媛, 刘波, 戈贤平, 等. 不同脂肪源对异育银鲫生长性能、机体成分、血清生化指标、体组织脂肪酸组成及脂质代谢的影响[J]. 水产学报, 2012, 36(7): 1111-1118  
Zhang Y Y, Liu B, Ge X P, *et al.* Effect of dietary oil sources on growth performance, body composition the serum biochemical indices, fatty acids composition and lipid metabolism of *Carassius auratus gibelio*[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2012, 36(7): 1111-1118(in Chinese).
- [34] 宋理平, 冒树泉, 马国红, 等. 饲料脂肪水平对许氏平鲈脂肪沉积、血液生化指标及脂肪代谢酶活性的影响[J]. 水产学报, 2014, 38(11): 1879-1888.  
Song L P, Mao S Q, Ma G H, *et al.* Effects of dietary lipid level on lipid deposition, blood biochemistry indices and lipid metabolic enzyme activities of *Sebastes schlegelii*[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2014, 38(11): 1879-1888(in Chinese).
- [35] 王爱民, 杨文平, 於叶兵, 等. 不同脂肪含量饲料对吉富罗非鱼鱼种生长性能、脂蛋白脂酶活性及其基因表达的影响[J]. 华中农业大学学报, 2014, 33(2): 97-102.  
Wang A M, Yang W P, Yu Y B, *et al.* Effects of dietary lipid levels on growth performance, activity and gene expression of lipoprotein lipase in GIFT tilapia (*Oreochromis niloticus*) juvenile[J]. *Journal of Huazhong Agricultural University*, 2014, 33(2): 97-102(in Chinese).

## Effects of compound diet and fresh frozen *Ammodytes personatus* on growth, antioxidant ability and lipid metabolism of hybrid grouper (*Epinephelus fuscoguttatus* ♀ × *Epinephelus lanceolatus* ♂) juveniles

CONG Linmei<sup>1,2</sup>, WANG Weifang<sup>2\*</sup>, GAO Chunren<sup>2</sup>, HUANG Bin<sup>2</sup>,  
LEI Jilin<sup>2</sup>, WANG Guiqin<sup>1\*</sup>

(1. College of Animal Science and Technology, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China;  
2. Qingdao Key Laboratory for Marine Fish Breeding and Biotechnology, Yellow Sea Fisheries Research Institute,  
Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China)

**Abstract:** This study was conducted to determine the effects of commercial compound diet and fresh frozen *Ammodytes personatus* on growth, antioxidant ability and lipid metabolism of hybrid grouper (*Epinephelus fuscoguttatus* ♀ × *E. lanceolatus* ♂) juveniles. Ten thousand five hundred and forty-two groupers [initial average weight (191.47 ± 3.70) g] were randomly divided into two groups with three replicates at a stock density of one thousand seven hundred and fifty-seven, and commercial compound diet and fresh frozen *A. personatus* were allocated to each of two groups of fish for a feeding period of 75 days. The results showed that the weight gain rate (WGR), specific growth rate (SGR), condition factor (CF), feed conversion ratio (FCR) and whole body fat content of hybrid grouper juveniles fed with fresh frozen trash fish group were significantly higher than those of fish fed with commercial compound diet ( $P < 0.05$ ), and the hepatosomatic index (HSI), viscerosomatic index (VSI) were significantly lower than those of commercial compound diet group ( $P < 0.05$ ). But the survival rate (SR) and protein efficiency ratio (PER) had no difference between fresh frozen trash fish group and commercial compound diet group ( $P > 0.05$ ). The contents of total cholesterol (CHO), triglyceride (TG), and low density lipoprotein cholesterol (LDL-C) in serum of commercial diet group were significantly decreased compared with fresh frozen *A. personatus* group ( $P < 0.05$ ). The activities of glutamic-pyruvic transaminase (GPT) and glutamic-oxaloacetic transaminase (GOT) in commercial compound diet were significantly higher than those of fresh frozen *A. personatus* group ( $P < 0.05$ ). There was an obvious decrease in levels of superoxide dismutase (SOD), total antioxidant capacity (T-AOC), catalase enzyme (CAT) and fatty acid synthase (FAS) ( $P < 0.05$ ), and a significant increase in activity of lipoprotein lipase (LPL) was observed in commercial diet group ( $P < 0.05$ ), while the levels of malic dehydrogenase (MDH) and carnitine palmitoyltransferase-II (CPT-II) were not impacted by two diets. Under given conditions, the fresh frozen *A. personatus* is better than commercial compound diet, and commercial compound diet may cause an adverse effect on liver of hybrid grouper juveniles. Therefore, it is necessary to optimize and adjust the nutrient formula of hybrid grouper juveniles by referring to the quality nutrition characteristics of fresh frozen *A. personatus*.

**Key words:** *Epinephelus fuscoguttatus* ♀ × *Epinephelus lanceolatus* ♂; fresh frozen *Ammodytes personatus*; commercial compound diet; antioxidant ability; lipid metabolism

**Corresponding author:** WANG Guiqin. E-mail: wgqjlau@aliyun.com; WANG Weifang. E-mail: Wangwf2000@hotmail.com

**Funding projects:** Natural Science Foundation of Shandong Province (BS2015SW018)