

三种铁源对珍珠龙胆石斑鱼幼鱼生长性能、 肝脏抗氧化酶活性及肠道发育形态的影响*

郭鑫伟¹, 张洋¹, 迟淑艳^{1,3**}, 谭北平^{1,2,3}, 姚亚军⁴, 姚红梅⁴

(1. 广东海洋大学水产动物营养与饲料实验室, 广东 湛江 524088; 2. 广东省水产动物精准营养与高效饲料工程技术研究中心, 广东 湛江 524088;
3. 农业农村部南方水产与畜禽饲料重点实验室, 广东 湛江 524088; 4. 长沙兴嘉生物工程股份有限公司, 湖南 长沙 410128)

摘要: 为研究配合饲料中添加不同铁源对珍珠龙胆石斑鱼(*Epinephelus lanceolatus* ♂ × *Epinephelus fuscoguttatus* ♀) 幼鱼的影响。选取遗传背景一致的健康珍珠龙胆石斑鱼(初重 (9.00 ± 0.49) g) 270尾, 随机分成3个处理, 分别饲喂硫酸亚铁(FeSO_4)、甘氨酸亚铁(Fe-Gly(II))和羟基蛋氨酸铁(Fe-MHA) 3种铁源等氮等脂的试验饲料, 养殖8周, 测量各组珍珠龙胆石斑鱼的生长性能、抗氧化能力和肠道发育等形态结构指标。研究表明:(1)铁源对各组间成活率、增重率和特定生长率均无显著影响($P > 0.05$), 但 Fe-MHA 组肥满度、全鱼和脊椎骨中 Fe 含量显著高于其余2组($P < 0.05$)。(2) Fe-MHA 组肝脏 CAT 活性显著高于 Fe-Gly(II) 组和 FeSO_4 组($P < 0.05$), 且该组肝脏 MDA 含量显著低于 Fe-Gly(II) 组和 FeSO_4 组($P < 0.05$)。(3)摄食 Fe-MHA 组饲料的石斑鱼前、中、后肠的绒毛高度显著高于 FeSO_4 组和 Fe-Gly(II) 组($P < 0.05$), 而绒毛宽度显著低于 FeSO_4 组和 Fe-Gly(II) 组($P < 0.05$); 该组中肠段肌层厚度显著高于 Fe-Gly(II) 组和 FeSO_4 组($P < 0.05$)。研究结果表明, 与 Fe-Gly(II) 和 FeSO_4 相比, Fe-MHA 有利于机体对铁元素的沉积, 改善鱼体肠道发育, 显著提高珍珠龙胆石斑鱼幼鱼肝脏的抗氧化能力, 建议珍珠龙胆石斑鱼幼鱼饲料中添加的铁源形式为 Fe-MHA 。

关键词: 铁源; 珍珠龙胆石斑鱼; 生长性能; 抗氧化酶; 矿物元素沉积; 肠道发育形态

中图法分类号: S917.4

文献标志码: A

文章编号: 1672-5174(2020)11-053-09

DOI: 10.16441/j.cnki.hdxh.20180355

引用格式: 郭鑫伟, 张洋, 迟淑艳, 等. 三种铁源对珍珠龙胆石斑鱼幼鱼生长性能、肝脏抗氧化酶活性及肠道发育形态的影响[J]. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2020, 50(11): 53-61.

GUO Xin-Wei, ZHANG Yang, CHI Shu-Yan, et al. Effects of three kinds Fe sources on growth performance, hepatic antioxidative enzymes and intestinal morphology of juvenile pearl gentian grouper (*Epinephelus lanceolatus* ♂ × *Epinephelus fuscoguttatus* ♀) [J]. Periodical of Ocean University of China, 2020, 50(11): 53-61.

铁(Fe)作为鱼类健康生长所需微量元素之一, 参与肌红蛋白和血红蛋白的行成, 并且以 Fe^{2+} 或 Fe^{3+} 的形式激活糖代谢酶, 催化该过程中的多种生化反应^[1]。相比于无机态铁和简单有机酸铁两种形式, 饲料中添加有机螯合铁被认为更易吸收, 具有更高的生物活性^[2-3]。甘氨酸铁(Fe-Gly(II))和柠檬酸铁比无机态的 FeSO_4 能够更有效地提高凡纳滨对虾(*Penaeus vannamei* Boone)蛋白质效率和饲料效率^[4]。然而, 评价依据不同, 铁源的生物效价存在差异, 当分别以增重率和饲料效率为参考依据时, 军曹鱼(*Rachycentron canadum*)对蛋氨酸铁的生物利用率和 FeSO_4 是相似的, 但当以血清 CAT 活性为判据时, 前者的生物利用率是后者的 2.75 倍^[5]。目前关于铁源如 FeSO_4 、 Fe-Gly(II) 和羟基蛋氨酸铁(Fe-MHA) 的利用效果在猪^[6]、肉仔鸡^[7-8]和 小鼠^[9]等陆生动物上已经开展了比较研究, 关于水产动物尤其是海水鱼类的研究较少。

石斑鱼目前已经成为中国四大海水养殖鱼类之一, 珍珠龙胆石斑鱼(*Epinephelus lanceolatus* ♂ × *E. fuscoguttatus* ♀) 由于其生长速度快、肉质鲜嫩和抗病力强等优势已成为南海主养海水品种^[10]。本研究分别添加无机态 FeSO_4 、氨基酸螯合态 Fe-MHA 和 Fe-Gly(II) 3种铁源, 探讨珍珠龙胆石斑鱼饲料中适宜铁源的应用效果, 以期获得满足石斑鱼健康快速生长的微量元素 Fe 的适宜添加形式。

1 材料与方法

* 基金项目: 广东省科技计划项目公益研究与能力建设专项项目(2016A020206006); 现代农业产业技术体系专项资金项目(CARS-47)资助
Supported by the Public Welfare Research and Capacity Building of Guangdong Province (2016A020206006); China Agriculture Research System (CARS-47)

收稿日期: 2019-09-09; 修订日期: 2019-10-22

作者简介: 郭鑫伟(1991-), 男, 硕士生。E-mail: 15889833262@126.com

** 通讯作者: E-mail: chishuyan77@163.com

1.1 试验材料和养殖管理

参考有关鱼类商业饲料及文献[4,11-14]报道中Fe需要量,分别添加FeSO₄、Fe-Gly(II)和Fe-MHA(纯度均为99%,长沙兴嘉生物工程发展股份有限公司)3种铁源,配制3组等氮等脂的试验饲料。根据饲料配方(见表1)准确称取已粉碎过60目筛的饲料原料,在V型立式混合机(JS14S型)中与微量组分预混合10 min后,倒入搅拌机并逐次加入鱼油、磷脂和适量的水,混合15 min后经双螺杆挤条机(F-75型)挤压成直径为3 mm的条状饲料。在室内自然风干至饲料水分将至10%左右,将各组饲料进行破碎分装,-20℃冰箱保存供养殖试验用。

在广东海洋大学海洋生物研究基地(东海岛,湛江)实施石斑鱼的养殖试验。将购回的试验用珍珠龙胆幼鱼(东海岛石斑鱼苗场,湛江,广东)置于室外水泥池中暂养10 d,期间投喂石斑鱼商业配合饲料(粗蛋白≥49%,粗脂肪≥8%)。待石斑鱼稳定并适应养殖环境后,挑选健康且规格均一的试验鱼(初重 9.00 ± 0.49 g)随机分配到室内海水养殖玻璃钢桶中。根据试验设计,共设3个处理组,每个处理组3个重复,每个重复放养30尾鱼,静水养殖8周,定时换水2/3。每天在8:00和17:00进行投喂,投喂量约为其体重的3%,定时观察石斑鱼摄食情况及时调整投喂量,同时记录死亡数^[15]。

养殖期间用水为经过沉淀和沙滤的天然海水,水体中铁元素含量≤0.000 67 mg/L,24 h供应氧气,溶解氧≥5 mg/L,盐度27~29,水温 (29.14 ± 0.75) ℃,氨氮≤0.03 mg/L。

1.2 样本采集与处理

8周末,养殖试验结束,禁饲24 h后称重,记录每个重复存活尾数,分别用于计算各处理组的增重率(WGR)、特定生长率(SGR)和成活率(SR)。分别在每个玻璃钢桶中随机取3尾鱼,测量体长和体质量后置于-20℃冰箱,备测全鱼常规养分和Fe、铜(Cu)、锰(Mn)和锌(Zn)含量;另取4尾鱼分离肝脏并称重后迅速放于液氮中,后移至-80℃保存备测抗氧化酶活性,同时剥离脊椎骨保存于-20℃,备测Fe、Cu、Mn和Zn含量;每重复取2尾鱼分离肠道,并标记前、中和后肠固定于10%甲醛溶液中,用于肠道石蜡切片的制作。

1.3 检测方法

1.3.1 肝脏抗氧化酶活性 测定肝脏中丙二醛(MDA)、总超氧化物歧化酶(T-SOD)、过氧化氢酶(CAT)和碱性磷酸酶(AKP)的活性(南京建成生物工程研究所),样本前处理和操作过程参考说明书。

1.3.2 矿物元素含量 准确称量养殖水体、实验饲料、全鱼和脊椎骨样品(0.10~0.15 g)于消解罐中,滴加8 mL 默克硝酸和2 mL 双氧水后放入微波消解仪(CEM

表1 饲料配方及营养水平(干物质基础)^[15]

Table1 Composition and nutrient composition of diets (DM basis)

原料 Ingredients	铁源 Resources		
	FeSO ₄	Fe-Gly(II)	Fe-MHA
低温蒸汽红鱼粉 Low-temperature steam dried brown fish meal/%	42	42	42
去皮豆粕 Dehulled soybean meal/%	20.13	20.13	20.13
小麦谷朊粉 Wheat gluten flour/%	9	9	9
面粉 Wheat flour/%	18	18	18
鱼油 Fish oil/%	4.49	4.49	4.49
磷脂 Lecithin/%	3	3	3
磷酸二氢钙 Ca(H ₂ PO ₄) ₂ /%	1.5	1.5	1.5
维生素C Vitamin C/%	0.03	0.03	0.03
氯化胆碱 Choline chloride/%	0.5	0.5	0.5
多维 Vitamin mix ^① /%	0.5	0.5	0.5
无铁多矿 Fe-free mineral mix ^② /%	0.5	0.5	0.5
乙氧基喹啉 Ethoxyquin/%	0.05	0.05	0.05
蛋氨酸 Methionine/%	0.3	0.3	0.3
营养成分 Nutrients proximate			
粗蛋白 Crude protein/%	54.97	54.91	55.04
粗脂肪 Ether extract/%	10.98	12.48	12.52
铁 Iron/mg·kg ⁻¹	152.58	156.25	159.00

注:①多维:青岛玛斯特生物技术有限公司惠赠。②无铁多矿(以kg饲料计):一水合硫酸锰46.61 mg;五水合硫酸铜11.91 mg;七水合硫酸锌145.85 mg;亚硒酸钠0.73 mg;碘酸钾6.78 mg;六水合氯化钴42.00 mg。

Note:①Vitaminmix: Qingdao Master Biotech Co., Ltd offered. ②Fe-free mineral mix(kg dietbasis): MnSO₄·H₂O, 46.61 mg; CuSO₄·5H₂O, 11.91 mg; ZnSO₄·7H₂O, 145.85 mg; Na₂SeO₄, 0.73 mg; KI, 6.78 mg; CoCl₂·6H₂O, 42.00 mg.

MARS)消解。赶酸后转入比色管中用超纯水定容。等离子体质谱仪(ICP 6000)测定样品中 Cu、Fe、Mn 和 Zn 四种元素的含量^[15]。

1.3.3 肠道石蜡切片 将固定好的珍珠龙胆石斑鱼前、中、后肠样本分别进行常规石蜡包埋,切片厚度为 6 μm,苏木精-伊红(HE)染色,在全自动生物显微镜(DM600)下观察、拍照并测量肠道样本的皱襞高度(PH)、皱襞宽度(PW)和肌层厚度(MT),每张切片分别测定 10 个相应数据^[15]。

1.4 计算方法^[15]

成活率(Survival rate, SR, %) = $100 \times N_t / N_0$;

饲料系数(Feed coefficient rate, FCR) = $W_f / (W_t - W_0)$;

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

特定生长率(Special growth rate, SGR, %/d) = $100 \times (\ln W_t - \ln W_0) / t$;

脏体比(Viscerosomatic index, VSI, %) = $100 \times W_v / W_t$;

肝体比(Hepatosomatic index, HSI, %) = $100 \times W_L / W_t$;

肥满度(Condition factor, CF, %) = $100 \times W_t / L_t^3$ 。
式中: N_t 为终末尾数; N_0 为初始尾数; W_t 为终末体质量(g); W_0 为初始体质量(g); t 为试验天数(d); W_f 为摄入饲料干重(g); W_L 为肝脏质量(g); W_v 为内脏团质量(g); L_t 为终末体长(cm)。

1.5 数据分析^[15]

实验数据以平均值±标准差(Mean±SD)表示,通过 SPSS 20.0 软件进行单因素分析,当处理间有显著差异($P < 0.05$)时,用 Duncan 氏法进行多重比较检验。

2 结果分析

2.1 铁源对珍珠龙胆石斑鱼幼鱼生长性能和形态学指标的影响

3 种铁源对珍珠龙胆石斑鱼 SR、WGR 和 SGR 均无显著影响($P > 0.05$);Fe-MHA 组的 FCR 显著高于 FeSO₄ 组($P < 0.05$)。FeSO₄ 组 HIS 和 VSI 显著高于 2 个添加氨基酸螯合态 Fe 源组($P < 0.05$),其中 Fe-Gly(II)组的 HSI 和 VSI 显著高于 Fe-MHA 组($P < 0.05$)。Fe-Gly(II)组和 Fe-MHA 组的 CF 显著高于 FeSO₄ 组($P < 0.05$),Fe-MHA 组 CF 显著高于 Fe-Gly(II)组($P < 0.05$)(见表 2)。

表 2 铁源对珍珠龙胆石斑鱼幼鱼生长性能及体形态学指标的影响

Table 2 Effects of Fe sources on growth performance and morphological characteristics of juvenile grouper

生长指标 Growth index	FeSO ₄	Fe-Gly(II)	Fe-MHA
初重 IBW/g	9.00±0.59	9.00±0.41	9.00±0.51
成活率 SR/%	90.00±3.33	88.89±1.92	91.11±8.39
增重率 WGR/%	655.97±27.88	646.70±18.28	656.19±85.78
特定生长率 SGR/%·d ⁻¹	3.61±0.07	3.59±0.04	3.60±0.20
饲料系数 FCR/%	0.92±0.03 ^a	0.97±0.01 ^{ab}	0.99±0.02 ^b
肝体比 HSI/%	3.57±0.06 ^c	2.84±0.07 ^b	2.45±0.06 ^a
脏体比 VSI/%	11.40±0.01 ^c	10.65±0.01 ^b	8.60±0.13 ^a
肥满度 CF/%	2.55±0.04 ^a	3.04±0.03 ^b	3.17±0.02 ^c

注:同行数据上标字母不同表示组间差异显著($P < 0.05$)。下同。

Note: Data in each line with different superscripts are significantly different ($P < 0.05$). The same as below.

2.2 铁源对珍珠龙胆石斑鱼幼鱼鱼体和脊椎骨矿物元素含量的影响

Fe-MHA 组全鱼 Fe 和 Zn 含量显著高于 FeSO₄ 和 Fe-Gly(II)组($P < 0.05$);FeSO₄ 组全鱼 Cu 含量显著高于有机铁源组($P < 0.05$),且这两个有机铁源组间无显著差异($P > 0.05$);铁源对珍珠龙胆石斑鱼全鱼 Mn 含量没有显著性影响($P > 0.05$)(见表 3)。

FeSO₄ 组幼鱼脊椎骨 Cu 含量显著高于其余 2 个

Fe 的氨基酸螯合物组($P < 0.05$);Fe-MHA 组石斑鱼脊椎骨中 Fe 含量显著高于其他 2 组($P < 0.05$);Fe-Gly(II)组 Mn 含量显著低于 FeSO₄ 组和 Fe-MHA 组($P < 0.05$),且 FeSO₄ 组和 Fe-MHA 组这 2 组间无显著差异($P > 0.05$);Fe-MHA 组 Zn 含量显著高于 Fe-Gly(II)组和 FeSO₄ 组($P < 0.05$),而后 2 组间无显著差异($P > 0.05$)(见表 4)。

表3 铁源对珍珠龙胆石斑鱼幼鱼全鱼 Fe、Zn、Cu 和 Mn 含量的影响

Table 3 Effects of Fe sources on iron, zinc, copper and manganese contents in whole fish

矿物元素含量 Mineral contents	FeSO ₄	Fe-Gly(II)	Fe-MHA
Fe/mg · kg ⁻¹	51.46±0.65 ^a	62.87±1.10 ^b	174.04±3.58 ^c
Zn/mg · kg ⁻¹	82.53±2.37 ^b	67.48±1.05 ^a	113.20±1.77 ^c
Cu/mg · kg ⁻¹	19.55±0.20 ^b	12.06±0.19 ^a	11.07±2.26 ^a
Mn/mg · kg ⁻¹	17.94±0.39	18.20±0.40	18.58±0.32

表4 铁源对珍珠龙胆石斑鱼幼鱼脊椎骨 Fe、Zn、Cu 和 Mn 含量的影响

Table 4 Effects of Fe sources on iron, zinc, copper and manganese contents in the grouper vertebrae

矿物元素含量 Mineral contents	FeSO ₄	Fe-Gly(II)	Fe-MHA
Fe/mg · kg ⁻¹	102.05±0.98 ^a	118.34±1.00 ^b	174.95±1.34 ^c
Zn/mg · kg ⁻¹	116.85±0.54 ^a	117.36±0.29 ^a	126.31±1.21 ^b
Cu/mg · kg ⁻¹	13.09±0.06 ^c	7.88±0.55 ^a	10.47±0.00 ^b
Z/mg · kg ⁻¹	47.40±0.27 ^b	45.79±0.43 ^a	47.08±0.42 ^b

2.3 铁源对珍珠龙胆石斑鱼幼鱼肝脏抗氧化能力的影响

如表5所示, Fe-Gly(II)组和FeSO₄组肝脏CAT活性无显著差异,但是,显著低于Fe-MHA组($P<0.05$)。Fe-MHA组肝脏AKP活性显著低于Fe-Gly(II)组($P<0.05$)。Fe-MHA组肝脏MDA含量显著低于其余2组($P<0.05$)。Fe-Gly(II)和Fe-MHA组对肝脏T-SOD活性无显著影响($P>0.05$),但是这2组的T-SOD活性显著高于FeSO₄组($P<0.05$)。

2.4 铁源对珍珠龙胆石斑鱼幼鱼肠道结构的影响

如表6所示, Fe-MHA组石斑鱼3个肠段PH显著高于FeSO₄组和Fe-Gly(II)组($P<0.05$)。Fe-Gly(II)组和FeSO₄组前、中、后肠PW均显著高于Fe-MHA组($P<0.05$)。Fe-Gly(II)组前肠和后肠MT显著高于Fe-MHA组和FeSO₄组($P<0.05$)；Fe-MHA组中肠MT显著高于Fe-Gly(II)组和FeSO₄组($P<0.05$)。肠道切片显示(见图1~3),有机铁源组石斑鱼中肠的杯状细胞数量显著多于无机FeSO₄组。

表5 三种铁源对珍珠龙胆石斑鱼幼鱼肝脏抗氧化酶活性的影响

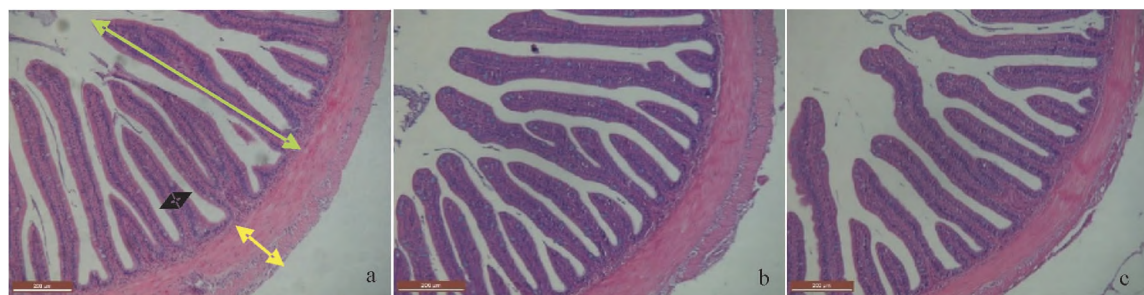
Table 5 Effects of three kinds Fe sources on antioxidative enzymes of juvenile pearl gentian grouper

抗氧化酶 Antioxidative enzymes	FeSO ₄	Fe-Gly(II)	Fe-MHA
过氧化氢酶 CAT /U · (mg prot) ⁻¹	5.46±0.12 ^a	6.15±0.81 ^a	16.43±0.57 ^b
碱性磷酸酶 AKP/金氏单位 · (g prot) ⁻¹	10.12±0.25 ^{ab}	15.10±1.43 ^b	6.35±0.22 ^a
总超氧化物歧化酶 T-SOD/U · (mg prot) ⁻¹	22.79±0.44 ^b	20.06±0.62 ^b	13.75±0.69 ^a
丙二醛 MDA/nmol · (mg prot) ⁻¹	321.99±0.24 ^a	568.48±37.86 ^b	497.96±6.45 ^b

表6 铁源对珍珠龙胆石斑鱼幼鱼肠道形态的影响

Table 6 Effects of Fe sources on intestinal morphology of grouper

铁源 Fe sources	不同肠段形态 Dissimilar intestinal morphology								
	前肠 Foregut			中肠 Midgut			后肠 Hindgut		
	PH	PW	MT	PH	PW	MT	PH	PW	MT
FeSO ₄	671.76±4.88 ^b	52.57±0.33 ^b	94.48±3.17 ^a	408.33±1.98 ^b	52.47±0.24 ^b	83.73±3.08 ^a	415.71±3.68 ^a	64.58±0.37 ^c	116.13±2.06 ^a
Fe-Gly(II)	529.39±4.84 ^a	52.89±0.05 ^b	134.38±3.04 ^c	354.36±2.71 ^a	53.58±0.39 ^c	103.09±3.44 ^b	454.69±3.06 ^b	60.44±0.32 ^b	123.69±2.54 ^b
Fe-MHA	763.31±5.90 ^c	47.62±0.21 ^a	115.24±2.92 ^b	466.49±1.91 ^c	47.64±0.24 ^a	115.49±1.26 ^c	483.90±2.42 ^c	51.22±0.16 ^a	114.88±3.21 ^a



(绿色双向箭头: 皱襞高度; 黑色双向箭头: 皱襞宽度; 黄色双向箭头: 肌层厚度。a: FeSO_4 组; b: Fe-Gly(II)组; c: Fe-MHA 组, 下同。Green two-way arrows: plica height; Black two-way arrow: plica width; Yellow two-way arrow: muscle thickness. a: FeSO_4 group; b: Fe-Gly (group II); c: MHA-Fe group. The same below.)

图 1 铁源对珍珠龙胆幼鱼前肠发育形态的影响(HE 染色, $10\times$)

Fig.1 Effect of dietary iron sources on histomorphology appearance of the foregut of *E. fuscoguttatus* ♀ × *E. lanceolatu* ♂ (HE stain, $10\times$), the same as follow



(白色箭头表示杯状细胞。White arrow represent goblet cells.)

图 2 铁源对珍珠龙胆幼鱼中肠发育的影响(HE 染色, $10\times$)

Fig.2 Effect of dietary iron sources on histomorphology appearance of the midgut of *E. fuscoguttatus* ♀ × *E. lanceolatu* ♂ (HE stain, $10\times$)

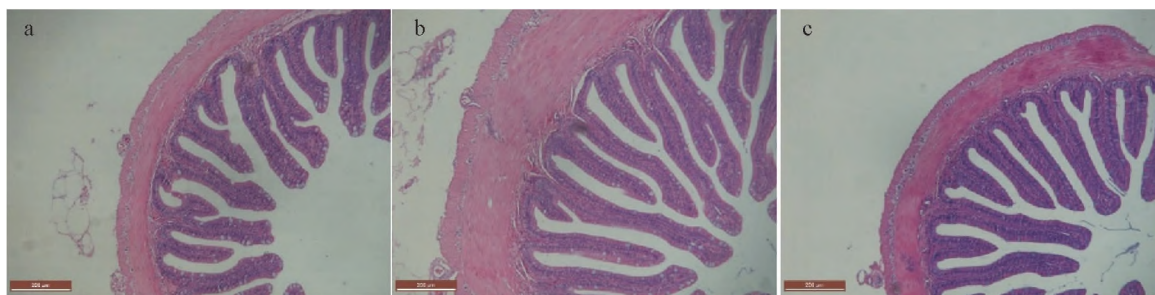


图 3 铁源对珍珠龙胆幼鱼后肠发育的影响(HE 染色, $10\times$)

Fig.3 Effect of dietary iron sources on histomorphology appearance of the hindgut of *E. fuscoguttatus* ♀ × *E. lanceolatu* ♂ (HE stain, $10\times$)

3 讨论

3.1 三种铁源对珍珠龙胆石斑鱼幼鱼生长性能和形态学指标的影响

金属离子只有在肠道内与蛋白质或氨基酸结合形成络合物,才能通过富含阴离子的细胞膜,被机体吸收利用。并且,该络合物的形成需要动物体内辅酶的参与,在吸收进入血液后与某些蛋白结合被运输到所需组织才能发挥其功效^[16]。金属离子在鱼的碱性中肠环境下溶解度较低,降低了消化吸收率,而矿物质的氨基

酸螯合物可直接被吸收^[10,16]。当微量元素与氨基酸以螯合物的形式进入机体后,则以胞饮的方式被吸收,这样不但减弱了矿物元素之间的竞争,提高了吸收效率,还改善了其他营养物质的吸收。

黄颡鱼 (*Pelteobagrus fulvidraco*) 摄食氨基酸螯合态铁后增重率、蛋白质效率以及饲料系数均优于七水合硫酸亚铁组^[17],这与军曹鱼^[18]和奥尼罗非鱼 (*Oreochromis aureus* × *O. niloticus*)^[19] 的研究结果类似。添加 Fe、Cu、Mn 和 Zn 复合的氨基酸螯合物与其无机盐相比,可以改善青鱼 (*Mylopharyngodon*

piceus)^[20]和尼罗罗非鱼(*Oreochromis spp*)^[21]的生长,提高非特异性免疫力,表明相比无机微量元素,鱼类能够更有效地利用矿物元素的氨基酸螯合物提高机体的生长性能。并且,氨基酸的分子量亦会影响微量元素的吸收。氨基酸螯合矿物盐 Fe-MHA 和 Fe-Gly 在动物体内的生物利用度较 FeSO₄ 高的原因可能是由于氨基酸的分子量和氨基酸的需要程度。甘氨酸的分子量在所有氨基酸中最小,而依据饲料原料的使用,蛋氨酸成为鱼类的第一限制性氨基酸。氨基酸分子量的大小有利于维持其与矿物元素螯合结构的稳定性,并且可以减少消化道内其他相关抑制因子的干扰,从而有利于微量元素的吸收^[22]。

循环养殖的水体矿物质浓度会对鱼体组织的矿物质沉积产生一定影响^[23],本实验会定期换水,并且通过定期采样抽查发现养殖用水体中的 Fe 元素含量较低,并且各重复玻璃钢桶中水体 Fe 含量无显著差异,对本实验中矿物元素有效利用不会造成显著影响。尽管 3 种铁源对石斑鱼的生长性能在统计学未产生显著影响,但是石斑鱼摄食含有 Fe-MHA 的饲料,对鱼体的形态学相关数据有显著改善,HS 和 VSI 显著低于无机组,CF 显著高于无机组,表明 Fe-MHA 比 FeSO₄ 更能改善珍珠龙胆石斑鱼的生长。有研究表明,相比 FeSO₄,蛋氨酸螯合铁更有效地参与大鼠肝脏脂肪酸和类固醇的合成,上调电子呼吸链途径中电子传递复合体 I、细胞色素 C 氧化酶及 ATP 合成相关基因表达,下调氨基酸分解和尿素循环途径中的关键酶基因表达,表明蛋氨酸螯合铁有利于降低机体氨基酸分解产氨,促使能量更有效地参与动物的生长和合成代谢^[24],更有效地促进机体的生长发育。

矿物元素的添加形式不同,会导致不同的吸收效率,因此也会影响矿物元素发挥其生理作用和在机体内的沉积效率。蛋氨酸螯合盐可有效提高加州鲈(*Micropterus salmoides*)机体各组织微量元素的含量^[25]。本实验中,Fe-MHA 组和 Fe-Gly(II)组全鱼和脊椎骨中 Fe 和 Zn 含量显著高于 FeSO₄ 组,其中以 Fe-MHA 组最高,表明氨基酸螯合铁 Fe-MHA 和 Fe-Gly(II)比 FeSO₄ 更有利于珍珠龙胆石斑鱼对 Fe 和 Zn 的沉积。Cu 作为造血反应的激活剂可催化 Fe 合成血红蛋白和生成红细胞、参与将 Fe²⁺ 转化为 Fe³⁺ 合成转铁蛋白和参与生成铜蓝蛋白^[26]。本实验中 FeSO₄ 组全鱼和脊椎骨 Cu 含量显著高于 Fe-Gly(II)组和 Fe-MHA 组,可能是由于 Fe-MHA 和 Fe-Gly(II)更有利于 Fe 的吸收转运,加速了 Cu 的动员而降低了组织 Cu 的沉积。尽管各处理组全鱼 Mn 含量没有受到 3 种铁源的显著影响,但是从数据上可以看出,各组脊椎骨 Mn 的含量均为其全鱼 Mn 含量的 2.5 倍,提示脊椎骨可能是 Mn 元

素沉积的主要场所。

3.2 三种铁源对珍珠龙胆石斑鱼幼鱼肝脏抗氧化酶活性的影响

Fe 在动物机体内参与血红蛋白与肌红蛋白的合成、激活碳水化合物代谢过程的关键酶、直接参与 CAT 等的合成,是细胞抗氧化防御体系的重要组成部分^[27]。Fe²⁺ 非常活跃,容易被氧化为 Fe³⁺,而氨基酸螯合铁由于其结构稳定,能更好地避免这种氧化反应^[28]。相比无机铁,Fe-Gly(II)和 Fe-MHA 具有较低的氧化性,增强了机体的抗氧化能力。

与 FeSO₄ 相比,军曹鱼^[4]、猪^[6]和肉仔鸡^[8]摄食含有蛋氨酸铁和甘氨酸螯合铁的饲料可提高血清 CAT 活性,本实验中相比于 FeSO₄ 和 Fe-Gly,添加 Fe-MHA 显著提高了肝脏 CAT 活性。氨基酸螯合铁具有较高的生物活性也体现在其较强地清除自由基的能力方面^[11]。除 CAT 外,体内自由基的动态变化及组织损伤情况亦可通过 SOD 的活性得到体现^[21]。珍珠龙胆石斑鱼肝脏 SOD 的活性在其摄食氨基酸螯合铁 Fe-Gly(II)或者 Fe-MHA 后得到显著改善。机体对氨基酸螯合铁吸收效率高,提高了血红蛋白、肌红蛋白以及细胞色素等物质的生物活性,有利于调节呼吸、氧化应激以及电子转移,进而提高了铁的利用率,同时,SOD 的活性有赖于 Cu、Mn 和 Zn 的参与,本实验的结果亦表明氨基酸螯合 Fe 有利于机体对这几种元素的吸收利用,从而使石斑鱼肝脏 SOD 活性的增强。AKP 活性表示吞噬细胞清除异物的能力,是巨噬细胞溶酶体的标志酶,同时与一些营养物质的消化吸收能力有关^[29]。Fe-Gly(II)组珍珠龙胆石斑鱼肝脏 AKP 活性较高,表明氨基酸螯合铁有利于提高鱼体吞噬细胞清除外源有害物质的能力。本实验中石斑鱼摄食 Fe-MHA 后肝脏 MDA 含量显著低于其余两组,更加印证了氨基酸 Fe 螯合物具有可以增强机体抗氧化酶活性和清除自由基的能力的生物活性。

此外,氨基酸螯合铁改善细胞防御机制,促进机体对炎症的自然反应,提高机体免疫反应^[30]的结果也可能是通过对肠道粘膜发育及物理屏障的改善产生的影响。

3.3 三种铁源对珍珠龙胆石斑鱼幼鱼肠道形态的影响

肠道分为粘膜层、粘膜下层、肌肉层和浆膜层,是鱼体消化吸收营养物质的重要场所^[31]。增加鱼类肠道粘膜厚度、PH 和微绒毛长度能够提高肠道吸收养分的表面积,促进营养物质的吸收^[32]。小肠绒毛高度与隐窝深度的比值(Villus height/Crypt depth, V/C)上升时表明消化吸收能力增强,下降时则表明该能力减弱^[33]。有机 Fe 相比于无机 Fe 可以改善仔猪肠道发育形态,优化空肠 V/C 值^[34]。氨基酸螯合 Fe 可能在肠

道存在特定或非特定的转运系统,使其在 Caco-2 细胞中的转运率明显高于 $\text{FeSO}_4^{[35]}$ 。

珍珠龙胆石斑鱼幼鱼摄食 Fe-MHA 后显著提高了前、中、后肠的 PH,肠道褶皱数量增多,皱襞相对完整,排列整齐,提示饲料中添加 Fe-MHA 有利于提高石斑鱼肠道吸收营养物质的表面积。由平滑肌组成肠道的肌肉层,其节律性舒缩是肠道运动的主要动力,环肌通过波状收缩实现肠蠕动,推动食糜向后移动^[36],MT 的增加能够提高肠道运动的能力。珍珠龙胆石斑鱼摄食 Fe-Gly(II)或 Fe-MHA 可一定程度地改善肠道 MT,促进肠道蠕动,有利于营养物质的吸收。杯状细胞主要分泌黏液和消化酶,发挥着润滑、免疫和帮助消化的作用,因此,杯状细胞的数量可间接反映鱼类的消化能力^[37]。通过 HE 染色的切片中可看出,石斑鱼摄食 Fe-MHA 或 Fe-Gly(II)后,中肠皱襞杯状细胞的数量明显多于 FeSO_4 组,表明有机螯合 Fe 可通过增加杯状细胞的数量来减少肠道黏膜损伤维护肠道屏障功能,具有改善免疫和提高消化能力的作用。

4 结语

相比于无机态的 FeSO_4 ,珍珠龙胆石斑鱼幼鱼饲料中添加 Fe-Gly(II)或 Fe-MHA,对鱼体形态学和微量元素的沉积产生有益的影响,增加了前肠和中肠的肌层厚度,提高了后肠的皱襞高度,有利于维护养殖期鱼类肠道健康。并且,Fe-MHA 提高了肝脏的过氧化氢酶和总超氧化物歧化酶活性,降低了丙二醛含量,使幼鱼的抗氧化能力得到提升,有利于石斑鱼健康生长。推荐珍珠龙胆石斑鱼幼鱼饲料中添加的铁源形式为 Fe-MHA。

参考文献:

- [1] 李清晓,李忠平.铁元素的营养作用及在动物生产上的应用[J].饲料博览,2004(4):4-6.
Li Q X, Li Z P. Nutritional role of iron and its application in animal production[J]. Feed Review, 2004(4): 4-6.
- [2] 庞少伟,孙之南,董景岗.微量元素饲料添加剂研究与应用进展[J].饲料工业,2004,25(11):17-19.
Pang S W, Sun Z N, Dong J G. Progress in research and application of trace element feed additives[J]. Feed Industry, 2004, 25(11): 17-19.
- [3] Paripatananont T, Lovell R T. Comparative net absorption of chelated and inorganic trace minerals in Channel catfish *Ictalurus punctatus* diets[J]. Journal of the World Aquaculture Society, 2010, 28(1): 62-67.
- [4] 彭志东,张波.不同形式铁对南美白对虾生长和体沉积的影响[J].饲料与畜牧,2008(1):7-10.
Peng Z D, Zhang B. Effects of different forms of Iron on the growth and deposition of *Penaeus vannamei*[J]. Feed and Animal Husbandry, 2008(1): 7-10.
- [5] 乔永刚.军曹鱼微量元素锌、铁、铜营养生理的研究[D].青岛:中国海洋大学,2007:42.
Qiao Y G. Study on Nutrition Physiology of Zinc, Iron and Copper in Cobia (*Rachycentron canadum*)[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2007: 42.
- [6] 张志美,付石军,郭时金,等.氨基酸螯合铁在猪营养中的应用研究进展[J].饲料研究,2012(8):35-36.
Zhang Z M, Fu S J, Guo S J, et al. Advances in the application of amino acid chelated iron in pig nutrition[J]. Feed Research, 2012(8): 35-36.
- [7] Ma W Q, Sun H, Zhou Y, et al. Effects of Iron glycine chelate on growth, tissue mineral concentrations, fecal mineral excretion, and liver antioxidant enzyme activities in Broilers[J]. Biological Trace Element Research, 2012, 149(2): 204-211.
- [8] 贾彦芳.肉仔鸡对几种铁源吸收的研究[D].哈尔滨:东北农业大学,2015:33-36.
Jia Y F. Studies on Absorption of Iron Sources in the Broiler[D]. Haerbin: Northeast Agricultural University, 2015: 33-36.
- [9] Zhuo Z, Fang S L, Hu Q L, et al. Digital gene expression profiling analysis of duodenum transcriptomes in SD rats administered ferrous sulfate or ferrous glycine chelate by gavage[J]. Scientific Reports, 2016, 6: 37923.
- [10] 刘云.珍珠龙胆石斑鱼幼鱼对钴和锰营养需求的研究[D].上海:上海海洋大学,2016:1.
Liu Y. Studies on the Cobalt and Manganese Requirements in Juvenile Pearl Gentian Grouper (*Epinephelus lanceolatus* ♂ × *E. fuscoguttatus* ♀)[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2016: 1.
- [11] 周立斌,王安利,马细兰,等.饲料中铁对美国红鱼(*Sciaenops ocellatus*)生长和免疫的影响[J].海洋与湖沼,2009,40(5):663-668.
Zhou L B, Wang A L, Ma X L, et al. Effect of dietary iron on growth and immune response of Red drum *Sciaenops ocellatus* [J]. Oceanologia Et Limnologia Sinica, 2009, 40(5): 663-668.
- [12] 张佳明.鲈鱼和大黄鱼微量元素 锌、铁的营养生理研究[D].青岛:中国海洋大学,2007:50-62.
Zhang J M. Studies on Nutritional Physiology of Zinc and Iron for Japanese Seabass, *Lateolabrax japonicus*, and Large Yellow Croaker, *Pseudosciaena crocea* R[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2007: 50-62.
- [13] Shiau S Y, Su L W. Ferric citrate is half as effective as ferrous sulfate in meeting the iron requirement of juvenile tilapia, *Oreochromis niloticus* × *O. aureus* [J]. Journal of Nutrition, 2003, 133(2): 483-488.
- [14] Ye C X, Liu Y J, Mai K S, et al. Effect of dietary iron supplement on growth, haematology and microelements of juvenile grouper, *Epinephelus coioides* [J]. Aquaculture Nutrition, 2007, 13(6): 471-477.
- [15] 郭鑫伟.饲料蛋白质、糖脂比及铁铜源对珍珠龙胆石斑鱼幼鱼营养生理功能的影响[D].湛江:广东海洋大学,2019.
Guo X W. Effect of Dietary Protein, Carbohydrate to Lipid Ratios, Fe Sources and Cu Sources on Nutrition Physiological Function of Juvenile Pearl Gentian Grouper (*Epinephelus lanceolatus* ♂ × *E. fuscoguttatus* ♀)[D]. Zhanjiang: Guangdong Ocean University, 2019.

- [16] 董晓慧, 杨原志, 郑石轩, 等. 不同形式钴对凡纳滨对虾生长和组织钴含量的影响[J]. 广东海洋大学学报, 2006, 26(6): 8-12.
Dong X H, Yang Y Z, Zheng S X, et al. Effect of cobalt sources and its supplemental level on growth of *Penaeus vannamei* and Co concentration in selected organs of the Shrimp[J]. Journal of Guangdong Ocean University, 2006, 26(6): 8-12.
- [17] 韩庆, 李丽立, 黄春红, 等. 不同剂型的微量元素及不同水平的氨基酸螯合物对黄颡鱼(*Pelteobagrus fulvidraco*)生长及体组成的影响[J]. 海洋与湖沼, 2008, 39(5): 482-487.
Han Q, Li L L, Huang C H, et al. Performance of Yellow Catfish *Pelteobagrus fulvidraco* fed with metal elements enriched diet[J]. Oceanologia Et Limnologia Sinica, 2008, 39(5): 482-487.
- [18] Qiao Y G, Tan B P, Mai K S, et al. Evaluation of iron methionine and iron sulphate as dietary iron sources for juvenile cobia (*Rachycentron canadum*) [J]. Aquaculture Nutrition, 2013, 19(5): 721-730.
- [19] 李爱杰, 李静, 王凤雷, 等. 不同剂型微量元素对杂食性鱼生长和消化率的影响[J]. 中国饲料, 1994(7): 15-18.
Li A J, Li J, Wang F L, et al. Effects of different dosage forms of trace elements on growth and digestibility of omnivorous fish[J]. China Feed, 1994(7): 15-18.
- [20] 周志刚. 全螯合矿对青鱼生长、饲料转化及非特异性免疫力的影响[J]. 饲料与畜牧, 2009(6): 58-61.
Zhou Z G. Effects of total chelation on growth, feed conversion and non-specific immunity of *Mylopharyngodon piceus* [J]. Feed and Animal Husbandry, 2009(6): 58-61.
- [21] 林仕梅, 潘瑜, 罗莉, 等. 不同来源微量元素铁、锌、锰、铜对罗非鱼生长、代谢和非特异性免疫力的影响[J]. 动物营养学报, 2011, 23(5): 763-770.
Lin S M, Pan Y, Luo L, et al. Effects of different sources of Iron, Zinc, Manganese and Copper on growth, metabolism and non-specific immunity of Tilapia (*Oreochromis niloticus*) [J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2011, 23(5): 763-770.
- [22] 张伶俐. 有机铁源的化学特性、对肉仔鸡的相对生物学利用率及其小肠铁吸收研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2016: 62.
Zhang L Y. Study on Chemical Characteristics, Relative Bioavailabilities and Small Intestinal Iron Absorptions of Organic Iron Sources in Broilers[D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2016: 62.
- [23] Antony Jesu Prabhu P, Schrama J W, Kaushik S J. Mineral requirements of fish: A systematic review[J]. Reviews in Aquaculture, 2015, 8(2): 172-219.
- [24] 王立宽, 乐国伟, 顾博, 等. 蛋氨酸螯合铁对大鼠肝脏物质代谢相关基因表达的影响[J]. 食品科学, 2006(12): 735-739.
Wang K L, Le G W, Gu B, et al. Effect of methionine chelate iron on the liver gene expression and metabolism of rat[J]. Food Science, 2006(12): 735-739.
- [25] 袁万安, 杨松全, 陈建, 等. 蛋氨酸微量元素螯合物在大口黑鲈饲料中的应用效果[J]. 中国水产科学, 2003, 10(5): 409-413.
Yuan W F, Yang S Q, Chen J, et al. Effects of amino acid chelating microelements on *Micropterus salmoides* [J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2003, 10(5): 409-413.
- [26] 冯德智, 张利民, 王际英, 等. 富马酸亚铁对虹鳟幼鱼生长性能、血液生化指标及微量元素含量的影响[J]. 动物营养学报, 2012, 24(4): 729-738.
Feng D Z, Zhang L M, Wang J Y, et al. Effects of Ferrous Fumarate on growth performance, blood biochemical parameters and trace element contents of Juvenile Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2012, 24(4): 729-738.
- [27] Andersen F, Lygren B, Maage A, et al. Interaction between two dietary levels of iron and two forms of ascorbic acid and the effect on growth, antioxidant status and some non-specific immune parameters in Atlantic salmon (*Salmo salar*) smolts[J]. Aquaculture, 1998, 161(1-4): 437-451.
- [28] Zhang L Y, Lu L, Luo X G. The chemical characteristics of organic iron sources and their relative bioavailabilities for broilers fed a conventional corn-soybean meal diet[J]. Journal of Animal Science, 2016, 94(6): 2378-2396.
- [29] 朱婷婷, 金敏, 孙蓬, 等. 饲料脂肪水平对大口黑鲈形体指标、组织脂肪酸组成、血清生化指标及肝脏抗氧化性能的影响[J]. 动物营养学报, 2018, 30(1): 126-137.
Zhu T T, Jin M, Sun P, et al. Effects of dietary lipid level on morphology indexes, tissue fatty acid composition, serum biochemical indexes and liver antioxidant indexes of largemouth bass (*Micropterus salmoides*) [J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2018, 30(1): 126-137.
- [30] Jarosz Ł, Kwiecień M, Marek A, et al. Effects of feed supplementation with glycine chelate and iron sulfate on selected parameters of cell-mediated immune response in broiler chickens[J]. Research in Veterinary Science, 2016, 107: 68-74.
- [31] 吴水清. 斜带石斑鱼(♀)×鞍带石斑鱼(♂)杂交子代早期发育及幼鱼消化道组织化学和免疫组织化学的研究[D]. 上海: 上海海洋大学, 2014: 6.
Wu S Q. Studies on Post-Embryonic Development of Qinglong Grouper (*Epinephelus coioides* ♀ × *E. lanceolatus* ♂) and Histochemistry and Immunohistochemistry of Digestive Tract in Juveniles[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2014: 6.
- [32] Sang H M, Fotadar R. Effects of mannan oligosaccharide dietary supplementation on performances of the tropical spiny lobsters juvenile (*Panulirus ornatus*, Fabricius 1798) [J]. Fish Shellfish Immunol, 2010, 28(3): 483-9.
- [33] 胡振华, 杨永平, 杨宇, 等. 枯草芽孢杆菌对樱桃谷肉鸭生长性能、免疫器官指数、肠道菌群及肠道形态的影响[J]. 动物营养学报, 2018, 30(4): 1504-1512.
Hu Z H, Yang Y P, Yang Y, et al. Effects of *Bacillus subtilis* on growth performance, immune organ indices, intestinal flora and intestinal morphology of Cherry Valley Meat Ducks [J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2018, 30(4): 1504-1512.
- [34] 李伟, 邓波, 刘婉盈, 等. 不同铁源对断奶仔猪形态结构的影响[C]. //中国畜牧兽医学会动物营养学分会第十一次全国动物营养学术研讨会论文集. 长沙: 中国畜牧兽医学会, 2012: 18.
Li W, Deng B, Liu W Y, et al. Effects of different Iron sources on intestinal morphology and structure of Weaned Piglets [C]. // Proceedings of the 11th National Animal Nutrition Symposium of the Animal Nutrition Society of China Animal Husbandry and Veterinary Society. Changsha: Chinese Association of Animal Science and Veterinary Medicine, 2012: 18.
- [35] 马文强. 甘氨酸亚铁螯合物的肠道吸收特点及其生物学效应研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2010: 74.

- Ma W Q. Research on Intestinal Absorption Characteristics of Iron Glycine Chelate and Its Biological Effects[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2010: 74.
- [36] Owens D, Mcgee M, Boland T. Effect of grass regrowth interval on intake, rumen digestion and nutrient flow to the omasum in beef cattle[J]. *Animal Feed Science & Technology*, 2008, 146(1-2): 21-41.
- [37] 杨娅. 黄金鲈营养评价、消化酶活力及消化道组织学的研究[D]. 长春: 吉林农业大学, 2014: 19.
- Yang H. The Research of Nutritional Assessment, Digestive Enzyme Activity and Gastrointestinal Histology in *Perca Flavescens* [D]. Changchun: Jilin Agricultural University, 2014: 19.

Effects of Three Kinds Fe Sources on Growth Performance, Hepatic Antioxidative Enzymes and Intestinal Morphology of Juvenile Pearl Gentian Grouper (*Epinephelus lanceolatus* ♂ × *Epinephelus fuscoguttatus* ♀)

GUO Xin-Wei¹, ZHANG Yang¹, CHI Shu-Yan^{1,3}, TAN Bei-Ping^{1,2,3}, YAO Ya-Jun⁴, YAO Hong-Mei⁴
(1. Laboratory of Aquatic Animal Nutrition and Feed, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088, China; 2. Research Center for Accurate Nutrition and Highly Efficient Feed Engineering of Aquatic Animals of Guangdong Province, Zhanjiang 524088, China; 3. Key Laboratory of Aquatic, Livestock and Poultry Feed Science and Technology in South China of Ministry of Agriculture, Zhanjiang 524088, China; 4. Changsha Xingjia Biotechnology Share Co., Ltd, Cahnghsha 410128, China)

Abstract: The three kinds of iron sources iron sulfate (FeSO₄), glycine chelated iron(II) (Fe-Gly(II)), and iron hydroxymethionine(Fe-MHA) were added in the juvenile pearl gentian grouper (*Epinephelus lanceolatus* ♂ × *E. fuscoguttatus* ♀) isonitrogenous and isolipidic experimental diets respectively. The grouper(initial weight (9.00±0.49) g) were randomly divided into 3 groups with 3 replicates, and 30 individuals in each replicate. The experiment lasted 8 weeks. The effects of three different iron sources on the growth performance, hepatic antioxidative abilities, and intestinal morphology of were evaluated. The results showed that although three kinds of Fe sources did not influenced significantly the survival ratio, weight gain ratio, and specific growth rate ($P > 0.05$), the condition factor, Fe contents of whole body and vertebrae of fish fed Fe-MHA diet were significantly higher than those of fish fed FeSO₄ and Fe-Gly(II) diets ($P < 0.05$). Hepatic CAT activities in Fe-MHA group was significantly higher than that in other two groups ($P < 0.05$). MDA contents of liver in Fe-MHA group was significantly lower than that in other two groups ($P < 0.05$). The plica height of the three part of the fish intestinal in Fe-MHA group were significantly higher than those in FeSO₄ and Fe-Gly(II) groups ($P < 0.05$), the plica width of foregut, midgut and hindgut in Fe-MHA group were significantly lower than that in other two groups ($P < 0.05$). The muscle thickness of midgut in Fe-MHA group was significantly higher than that in FeSO₄ and Fe-Gly(II) groups ($P < 0.05$). Based on the above experimental results, compared with Fe-Gly(II) and FeSO₄, adding Fe-MHA in grouper diet improved the iron deposition and intestinal development, and then ameliorate antioxidant capacity of juvenile pearl gentian grouper. It was recommended that Fe-MHA should be better as the iron sources in the feed of juvenile pearl gentian grouper.

Key words: Fe source; pearl gentian grouper (*Epinephelus lanceolatus* ♂ × *E. fuscoguttatus* ♀); growth performance; antioxidative enzyme; mineral accumulation; intestinal development and morphology