第26卷 增刊
2002年12月

水 生 生 物 学 报
ACTA HYDROBIOLOGICA SINICA

Vol.26 Suppl.
Dec. 2002

综 述

鱼虾消化率研究中的指示剂

杨 勇 崔奕波 解绶启
(中国科学院水生生物研究所;淡水生态与生物技术国家重点实验室,武汉 430072)

MARKERS USED IN FISH DIGESTIBILITY STUDIES

YANG Yong, CUI Yi-bo, XIE Shou-qi
(*Institute of Hydrobiology, The Chinese Academy of Sciences; State Key Laboratory of Freshwater Ecology and Biotechnology, Wuhan* 430072)

关键词:消化率;指示剂
Key words: Digestibility; Markers

消化率的高低是评价饲料营养价值的重要指标。

研究鱼类消化率的方法有体内消化法和体外消化法两类,体内消化法又包括直接法和间接法,现在应用最为广泛的是根据饲料和粪便中的指示剂含量(%)来间接求消化率的指示剂法。

在有关消化率的实验中,采用合适的指示剂是这种方法成功的基础。通常说来,理想的指示剂应符合以下四条标准[1]:

(1)不可消化吸收,不影响鱼体消化代谢,也不改变消化道中微生物群落的组成;

(2)可以与饲料中的各种成分均匀混合,即使在微量使用时,也能较容易而灵敏地完成定量分析;

(3)可与饲料中营养物质同步通过消化道;

(4)对人和环境卫生、无毒、无污染。

迄今为止,被用在鱼类消化率研究中的指示剂已有十多种,根据其来源通常将它们分为两类:一类是外源性指示剂,即添加到饲料中的外来物质,大多是一些金属类氧化物,如 Cr_2O_3、Y_2O_3 等;另一类是内源性指示剂,它们本身就是饲料的成分,如粗纤维、酸不溶灰分等。这些物质的理化特性不同,使用效果存在很大的差异。现结合相关文献,分别加以介绍。为叙述方便,文中将用于消化率研究的鱼、虾等水生生物统称为鱼类。

1 外源指示剂

1.1 三氧化二铬(Chromium Oxide, Cr_2O_3)

三氧化二铬(Cr_2O_3)是一种六方晶系深绿色粉末,不溶于水,难溶于酸,对光、大气、高温及一些腐蚀性气体均极稳定,是目前公认最为理想、也是使用最广泛的指示剂。Cr_2O_3 指示剂法于1918年由瑞典学者 Edin[2] 首次提出,在历时近一个世纪的应用过程中,这一方法不断得到改进,并建立了多种含量检测方法,目前应用最为广泛的是酸消化比色法[3]和原子吸收光谱法[4]。

收稿日期:2002-10-30;**修订日期**:2003-01-10
基金项目:中国科学院知识创新项目(ZKCX2-211)资助
作者简介:杨勇(1972—),男,湖北荆州人,博士研究生,主要从事鱼类营养能量学研究.

然而，随着鱼类营养学研究的不断发展和深入，Cr_2O_3 潜在的不足逐渐暴露出来，主要反映在以下几个方面：

1.1.1 Cr_2O_3 与营养成份不能保持同步移动 从理论上讲，Cr_2O_3 应该与营养成份保持同步的移动，否则粪便中的 Cr_2O_3 回收含量就不是100%，从而会影响到所测消化率的准确性。迄今为止，已分别在莫桑比克罗非鱼 *Tilapia mossambica*[5]、大西洋鳕 *Gadus morhua*[6] 和虹鳟 *Salmo gairdneri* Richardson[7] 等鱼类的实验中发现，Cr_2O_3 与饲料组分通过消化道的速率不一致，导致消化系数发生了相应的变化。而在甲壳纲十足目动物中这种现象似乎更为普遍[8,9]。

至于出现这一现象的原因，在不同的养殖种类中可能是不一样的。在有胃鱼类，其胃中组成物质通常比消化道其它部位的大，小颗粒的 Cr_2O_3 通过胃部相对较快，结果使消化道后部营养物质的消化系数产生了一些不真实的升高；此外，饲料的特殊比重、指示剂本身的理化特征（如混合比例、颗粒大小、表面积及对水的亲合力等）都可能是影响这种变化的原因[10]。

这样，为了获得均一的检测结果饲料中就需要含有高浓度的 Cr_2O_3，但 Cr_2O_3 的正常使用比例一般不宜超过1%，否则很可能会干扰营养物的吸收和代谢。在虹鳟的研究中就发现，当饲料中 Cr_2O_3 的含量达到2%时，饲料消化系数显著升高[10]，这可能正是 Cr_2O_3 的高浓度使其通过消化道速度加快所致。

1.1.2 影响一些营养成份的消化吸收 在脊椎动物中，铬是碳水化合物代谢的必需营养元素，可能是作用于胰岛素或胰岛素受体的辅助因子，因此，饲料中添加铬后可能会影响受胰岛素调控的酶的活性[7,11]。在罗非鱼 *Oreochromis niloticus*×*O. aureus* 的实验中同样发现，铬的使用显著提高了罗非鱼对葡萄糖的利用，对鱼的生长、饲料利用及鱼体组成等指标都有一定的影响[12-14]。

但在沟鲶 *Ictalurus punctatus* Rafinesque 的试验中却发现 Cr_2O_3 的使用并无不良副作用[13]；在金头鲷 *Sparus aurata* 的研究中也发现 Cr_2O_3 的含量并不影响血糖浓度以及和几种碳水化合物代谢相关的肝脏酶的活性。不过，在研究金头鲷对有机物质的消化率时 Cr_2O_3 是有效的指示剂，而在统计其对钙、磷的吸收时，其结果却会随饲料中 Cr_2O_3 的浓度不同而发生相应改变[16]。

在北极红点鲑 *Salvelins alpinus* L. 中的研究还发现饲料中添加1%Cr_2O_3 改变了鱼体肠道微生物群落结构和着生部位，甚至直接影响了肠道上皮结构[17,18]。此外 Cr_2O_3 虽不影响其胃容物中脂肪的组成，但显著提高了粪便中总脂肪含量，并改变了其脂肪组成[19]，可能是 Cr_2O_3 影响了鱼的消化吸收过程所致。

1.1.3 Cr_2O_3 的颜色可能影响鱼对饲料的选择 高纯度一级品的 Cr_2O_3 呈深绿色，着色力通常高于95%，遮盖力（g/m^3）接近15，是一种强性着色剂，饲料中添加1%的 Cr_2O_3 后会呈绿色。至于这种绿色对鱼的摄食生长影响会有多大目前还缺乏专门的研究，但不同的颜色对那些依靠视觉摄食的鱼类的确是有影响的，比如：

饲料和孵育缸的颜色对大西洋鲑 *Salmo salar* L. 鱼苗的摄食选择会有明显影响，从而影响到其成活率和生长发育[20]；而用灰色、黄色或两种色彩的混合色饲料喂养大西洋鲑幼鱼时，发现摄食混合色饲料的鱼平均增重显著高于其他两组[21]。

从已有的研究报道中还可发现：背景色会影响尼罗罗非鱼 *Oreochromis niloticus* 的行为[22]；缸壁的颜色会影响 *Perca fluviatilis* L. 鱼苗（平均初重0.57mg）的生长和成活率[23]；背景色对鲤鱼 *Cyprinus carpio* L.（初重16g）的生长和生理反应也有显著影响[24]。

1.1.4 Cr_2O_3 的毒副作用 铬（Cr）这种重金属本身是有毒的，而 Cr_2O_3 也是有毒制剂，它可能是人的过敏原[25]，Cr_2O_3 中还可能含有致癌成份[26]，即使在低浓度时也可能是有毒的。因此在加工、使用和分析饲料、粪样时一定要格外小心！

对鱼而言，Cr_2O_3 会氧化不饱和脂肪酸[27]，其氧化产物很可能对鱼有毒副作用[28]。在莫桑比克罗非鱼中的研究发现，它会有选择性地呕出附生植物碎屑聚集体中的 Cr_2O_3，这也许正是某种生理防御机能的反应[5]。

此外,在虹鳟[29]、罗非鱼[13,14]、沟鲶[15]、金头鲷[16]的研究中都发现饲料中添加铬后,鱼体组织中会富集不同浓度的铬,并且在罗非鱼的研究中还发现铬的富集量随饲料中 Cr_2O_3 的浓度增加而显著上升[13,14]。

1.1.5　量的限制　在测试虹鳟对虾红素的消化利用率时,由于虾红素在饲料中含量甚微,只占干物质的 0.003—0.004%,使用常规的 1% Cr_2O_3 是不合适的[30]。

正是因为 Cr_2O_3 暴露出了上述诸多不足,其应用价值已受到越来越多的质疑,积极探寻或开发新型的优良指示剂已成为鱼类营养学研究的一项新课题。

1.2　钇(Yttrlum)和镧系(Lanthanides)元素三价氧化物

镧系元素又叫稀土元素(Rare earth elements),早期的研究已发现钇和一些稀土金属的三价氧化物具有下列诸多优点[25]:

(1)它们在弱酸碱中不溶,中性环境中溶解度很低;

(2)稀土金属不是鱼的必需营养元素,故不会影响鱼的代谢;

(3)它们的使用量通常只需 Cr_2O_3 用量的 1/100(100mg/kg);

(4)它们呈白色或浅灰色,低浓度使用时不会影响饲料颜色。

在人和反刍动物的营养研究中,这类指示剂已率先得到了成功的应用,到了 20 世纪 90 年代末,开始被用于鱼类的消化率研究中,并在鲑鳟类的相关研究中迅速得到推广[30,31],其中以 La_2O_3、Y_2O_3、Yb_2O_3 的使用效果最好[25]。

由于这类新型指示剂还未在我国广泛使用,现将其测试方法简介如下[32]:

(1)取 150—200mg 含指示剂的样品在发光玻璃管中 550℃燃烧过夜;

(2)冷却后,加入 5mL HCl : HNO_3 为 2 : 1(V/V)的混合液,将样品在高温灼烧到无色时停止加热;

(3)冷却后加入几滴水,使样品溶在 1.25mL 浓 HNO_3 中,用蒸馏水稀释至 25mL;

(4)用电感耦合等离子体发射光谱法(ICP)测试金属元素浓度即可。

从现有资料来看,这类新型指示剂使用效果不错,很大程度上弥补上述 Cr_2O_3 的诸多不足,大有取代 Cr_2O_3 的趋势。但由于其测试成本较昂贵,目前还很难普及,加之尚处于试用期,是否完全无毒副作用,尤其在我国的一些经济鱼类是否同样适用,都还有待进一步的实验论证,因而应用范围还很有限。

1.3　其它外源指示剂

1.3.1　钛(Titanium Ⅳ)的氧化物　在测试大西洋鳕对饲料蛋白质消化率时用 Cr_2O_3 和 TiO_2 作指示剂的效果是等价的[6]。

1.3.2　聚乙烯(Polyethylene)　聚乙烯用在几种家养牲畜的消化率研究中是理想的指示剂[33,34],但在虹鳟的试验中却发现在混合比例为 1%时,聚乙烯与 Cr_2O_3 效果相似,而在混合比例低于 1%(0.5%)和高于 1%(2%)时用聚乙烯所测消化系数均比用 Cr_2O_3 时显著偏低,且表现了很大的变异性[10],这可能是因为聚乙烯通过胃肠速度慢于饲料营养成分的缘故。

1.3.3　硅藻土(Celire)和酸洗沙(Acid-washed sand)　硅藻土又名钙铁石;是一种酸洗过的硅藻硅石粉末[35-37],不被鱼体吸收,硅藻土本是饲料中酸不溶灰分(acid-insoluble ash,AIA)的组分之一,所以当用 AIA 作指示剂,但其含量不足时,可通过添加硅藻土获得理想效果。

在虹鳟试验中发现添加硅藻土有效提高了 AIA 在饲料中的含量,用其作指示剂所测的干物质、粗蛋白、粗能量的消化系数与用 Cr_2O_3 时无显著差异[35],且分析方法更简单[38],添加类似的外源 AIA 可以提高饲料中 AIA 的测试精确度[39]。但单独使用硅藻土作指示剂测得的表观消化率有时会偏高[37]。

酸洗沙和硅藻土的功能相似,也是用作 AIA 的补充,但用其作指示剂所测虹鳟消化率偏低,且变异大,可能是其在胃肠道中移动速度慢的缘故[10]。

1.3.4　微示踪物 F—Ni　F—Ni 是一种铁镍磁化合金粉,无毒,可用简单设备提供快速的定量分析,在

虹鳟中的研究发现用其作指示剂所获得的表观消化率很一致，也最接近使用 Cr_2O_3 所测的值[40]。

2 内源指示剂

2.1 粗纤维(Crude fibre)

粗纤维是被研究得最为广泛的内源性指示剂。

对于纤维素是否完全惰性或是否能为鱼体提供有限的能量曾一直存在争议，但在虹鳟中的研究结果表明它是没有直接营养价值的[41]。

虽然饲料中纤维素的含量升高会降低营养物质的消化率[42]，但不少研究者认为粗纤维是比 Cr_2O_3 更理想的指示剂：在鲤鱼的研究中发现，用粗纤维和 Cr_2O_3 作指示剂所测有机物质消化系数没有差异[43]；而在虾鳟的研究中发现，当饲料中含纤维或 Cr_2O_3 的比例为 0.5%和 1%时，所测干物质、有机质和粗蛋白消化系数相似，而且当混合比例上升到 2%时，用 Cr_2O_3 测得的值显著升高，而用粗纤维所测值则相对稳定一些[10]。这与在虹鳟和三种罗非鱼(*Tilapia aurea*, *T. mossambica*, *T. nilotica*)[44]、亚丽鱼 *Etroplus suratensis*[45]、奥利亚罗非鱼 *Oreochromis aureus*[42]以及鲫鱼 *Carassius auratus*[46]中的研究结论是一致的。

然而，Morales 等[37]在虹鳟的同一个养殖实验中却发现，用粗纤维作指示剂时所测全鱼粉饲料及含谷物面筋粉、棉籽粉、羽扁豆粉等植物蛋白饲料的消化率与用 Cr_2O_3 作指示剂时相似，而用粗纤维作指示剂时测试含大豆粉、葵花籽粉的饲料消化率却比用 Cr_2O_3 作指示剂所测值低。这可能是与粗纤维的复杂构成相关的，粗纤维可分为水不溶性的和水溶性的两类，水不溶性纤维在消化过程中不发生改变，而水溶性纤维在肠道运输过程中却会发生改变。大豆粉和葵花粉中含有可溶纤维，若在消化过程中发生改变，就可导致消化系数的偏低，其余几种含植物纤维成份的饲料之所以与 Cr_2O_3 所测值相似，可能正是因为它们含有不可溶纤维的缘故。

也有学者对此持不同意见，他们认为饲料中作指示剂的纤维是植物纤维，它们在饲料中普遍存在，在稀酸碱环境中都是不可溶的，且外面覆盖有一层几丁质的外壳，不能为消化液所降解，所以可用作有效的指示剂[10]。

然而，在虹鳟[47]和草鱼 *Ctenopharyngodon idellus* Curier et Valenciennes[48]的消化道中却发现会有少量纤维被吸收；在有些鱼的消化道或胃中还提取到了可水解纤维素的活性酶或几丁质酶[47,49,50]，其活性可能来源于消化道中的细菌群落。不过有些学者却认为这些菌群并没有水解纤维素几丁质外壳的能力[41]。

有一点比较肯定的是，在研究甲壳动物消化率时，纤维素不宜用作指示剂，因为甲壳动物的消化道中含有纤维素酶[51]。有关红螯螯虾 *Cherax quadricarinarus* 的研究结果表明，其消化道中含有活性较强的多糖水解酶，可以降解纤维素及相关基质，并且这些酶的活性不是来自消化道中的共生菌，而是来自动物自身[52]。

2.2 酸不溶灰分(Acid-insoluble ash, AIA)

作为内源性指示物的酸不溶灰分是指饲料中固有的灰分成分，其主要成分是硅石(SiO_2)。有关虹鳟[35]和罗非鱼[36,53]的研究均发现，用 AIA 作指示剂时所测饲料营养物质或能量的表观消化率与用 Cr_2O_3 所测值差异并不显著。De Silva 等[54]在用灰分作指示剂研究斯里兰卡 12 个人工湖中罗非鱼的消化率时也发现，虽然这种鱼的消化道会吸收少量的灰份，但由于鱼体消化的食物成分中灰分含量较高，对最终的研究结果影响不大。

但是，De Silva 和 Perera[45]在研究亚丽鱼对一种大型水生植物的消化率时却发现，用 AIA 作指示剂所测消化率要显著高于用 Cr_2O_3 所测的值，且粪便中回收率超过了 100%，而在虹鳟中的另一项研究结果正好与此相反[10]。AIA 的不稳定性可能是最主要原因，因为这会使 AIA 通过消化道的速度与饲料不一致，在柠檬鲨 *Negaprion brevir ostris* 的研究中也有类似发现[55]。而在美洲龙虾 *Homarus ameri-*

canus Milne Edwards[9]和虹鳟以及三种罗非鱼[44]研究中均发现用 AIA 所测消化系数偏低,主要是由于消化道吸收了部分灰分所致。

尽管 AIA 的应用效果目前还很不一致,但由于其测试简单,成本低廉,又无潜在毒性,目前仍然应用得较多。

2.3　烃类(Alkanes)

许多饲料成分中都含有烃类物质,有些含量极微,而植物性成分中则含有相当数量的烃类[56]。通过外加的途径,几乎任何长链烃都可用作鱼类饲料研究的指示剂,尤以 C_{28}、C_{32}、C_{36} 烃最佳[56]。

使用烃类物质在研究牧草动物的摄食量和消化率中已很流行,但在鱼类中的应用还非常有限。5α-胆甾烷(一种 C_{30} 类固醇)曾被作为指示剂测试过大西洋鲑对饲料脂肪的消化率[57,58]。之后,在罗非鱼和罗氏沼虾 *Macrobrachium rosenbergii* 的实验中,分别使用 Cr_2O_3 和 5α-胆甾烷作为指示剂测试饲料胆固醇和脂肪酸的消化率时发现,两种指示剂方法所得结果非常接近,而使用 α—胆甾烷作为指示剂的优点在于它可对胆固醇(或脂肪酸)和 5α-胆甾烷进行平行分析,且只需极少量的粪便样品即可[59]。

烃类物质虽然易与饲料直接混合,或者也可先溶在脂肪中后包被到饲料颗粒上,但若因为某些原因使得脂肪成分在被消化前就从饲料中分离出来,或者在收集粪便前从粪便中滤出,使用这种指示剂就会带来方法性的错误。因此,要对烃类物质进行合理应用还需深入的研究。

2.4　其他

不水解有机物(Hydrolysis-resistant organic matter,HROM)主要包括纤维素和矿物质,Buddington 发现用 HROM 作指示剂不会被虹鳟和三种罗非鱼吸收,测得的消化系数与用 Cr_2O_3 所得结果一致[44]。在亚丽鱼中也有相似的结论[45]。

此外,Lied[6]指出在测试大西洋鳕对饲料的蛋白质消化率时,胃肠道中的钙和锌也可用作指示剂。

3　问题与讨论

外源指示剂的最大优点是可以精确定量地添加到饲料中,保证了测试含量的需要。在实验室研究鱼类消化率的试验中,由于饲料可精确配制,故宜选用合适的外源指示剂,但有些外源指示剂与饲料或粪便结合的紧密度往往不够,容易散失,难以完全回收[60]。

应用内源性指示剂消除了外源指示剂可能引入新营养成分的风险,但这些内源物质在饲料中的含量往往需达到一定的水平才可检测到,比如,应用 AIA 作指示剂时,饲料中 AIA 的含量应超过 0.75%[60],这在客观上限制了其应用。不过在测试大规模生产的商业饲料的消化率,或者在野外条件下要研究鱼类对一些天然饲料(如藻类、动物性饲料等)的消化率时,内源指示剂却是无可替代的。可影响消化率的因子是很多的,除了正确选用指示剂外,在实验设计中还应特别考虑到以下两点:

一是粪便收集方法对消化率的影响。迄今为止,鱼类营养学家们已探索出了上十种不同的集粪方法,包括解剖法、挤压法、肛门吸粪法、代谢室法、网捞法、直接虹吸法、Guelph-System 积粪器法、沉淀柱法和滤网法等[61]。

应用这些方法所得消化率数据目前还很不一致。在野外或水族缸中没有特殊集粪装置时,可选用挤压法。挤压法和解剖法得到的消化系数值比较接近,但挤压法、解剖法和肛门吸粪法对鱼产生应激较大,而且挤压法有可能挤出尚未消化的物质及肠道上皮,使表观消化率偏低,若在后肠挤压可获得比解剖法更高的表观消化率[31]。其它方法不会对鱼造成太大的直接压力,但过滤法有可能使养分比指示剂滤去更多,从而使消化率偏高。

因此,建立可靠而有效的粪便收集方法是极为重要的。标准化程序对于有效比较营养物利用的不同研究结论至关重要,但目前还没有哪种粪便收集方法可以完全避免这些不足,最好的设计应该是能将这种影响最小化。

二是由于鱼的个体间差异的影响。为了减小因这种差异产生的消化系数的变异，应保证每组鱼的数量适当多一些为宜，至少要满足统计学上的有效性[6]；重复组数的设置也宜适当多些，这样可以减小重复组间的变异[31]。

只有综合考虑了这些因子并结合正确地选用指示剂，才能保证所测饲料消化率的准确有效。

参考文献：

[1] De Silva S S. Digestibility evaluations of natural and artificial diets. In: De Silva S S. Ed., Fish Nutrition Research in Asia[C]. Proceedings of the Third Asian Fish Nutrition Network Meeting. Asian Fisheries Society Special Publication 4, Asian Fisheries Society, Manila, Philippines, 1989, 36—45

[2] Edin H. Orientarande forsok over anvanbarheten av en pa "ledkroppsprincipan" grundad metod at bestamma en foderblandings smalbarhed[J]. *Medd. Centralanst. Foersoeksvaes. Jordbruksomraadet.*, 1918, **165**: 28.

[3] Furukawa A, Tsukahara H. On the acid digestion method for the determination of chromic oxide as an index substance in the study of digestibility of fish feed [J]. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.*, 1966, **32**: 502—506

[4] Scott K. Cause and control of losses of chromium during nitric-perchloric acid oxidation of aquatic sediments [J]. *Analyst*, 1978, **103**: 754—758

[5] Bowan S H. Chromic oxide in assimilation studies—a caution [J]. *Am. Fish. Soc.*, 1978, **107**: 755—756

[6] Lied E, Julshamn K, Braekkan O R. Determination of protein digestibility in Atlantic cod Gadus morhua with internal and external indicators [J]. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 1982, **39**: 854—861

[7] Davis C M, Vincent J B. Chromium in carbohydrate and lipid metabolism [J]. *J. BioL Inord. Chem.*, 1997, **2**: 675—679

[8] Jones P L, De Silva S S. Influence of differential movement of the marker chromic oxide and nutrients on digestibility estimation in the Australian fieshwater crayfish *Cherax destructor* [J]. *Aquaculture*, 1997, **154**: 323—336

[9] Leavitt D F. An evaluation of gravimetric and inert marker techniques to measure digestibility in the American lobster [J]. *Aquaculture*, 1985, **47**: 131—142.

[10] Tacon A G J, Rodrigues A M P. Comparison of chromic oxide, crude fibre, polyethylene and acid—insoluble ash as dietary markers for the estimation of apparent digestibility coefficients in rainbow trout [J]. *Aquaculture*, 1984, **43**: 391—399

[11] Anderson R A. Nutritional factors influencing the glucose/insulin system: Chromium [J]. *J. Am. Coll. Nutr.*, 1997, **16**: 404—410

[12] Shiau S Y, Chen M J. Carbohydrate utilization by tiapia *Oreochromis niloticus*×*O. aureus* as influenced by different chromium sources [J]. *J. Nutr.*, 1993, **123**: 1747—1753

[13] Shiau S Y, Liang H S. Carbohydrate utilization and digestibility by tilapia, Oreochromis niloticus×O. aureus, are affected by chromic oxide inclusion in the diet [J]. *J. Nutr*, 1995, **125**: 976—982

[14] Shiau S Y, Shy S M. Dietary chromic oxide in clusion level required to maximize glucose utilization in hybrid tilapia *Oreochromis niloticus*×*O. aureus* [J]. *Aquaculture*, 1998, **161**: 357—364

[15] Ng W K, Wilson R P. Chromic oxide inclusion in the diet does not affect glucose utilization or chromium retention by channel catfish, *Ictalurus punctatus*[J]. *J. Nutr*, 1997, **127**: 2357—2362

[16] Fernandez F, Miquel A G, Martinez R. Dietary chromic oxide does not affect the utilization of organic components but can alter the utilization of mineral salts in gilthead sea bream *Sparus aurata*[J]. *J. Nutr.*, 1999, **129**: 1053—1059

[17] Ring ϕ E. Does chromic oxide Cr_2O_3 affect faecal lipid and intestinal bacteria flora in Arctic charr, *Salvelinus alpinus* L [J]. *Aquault. Fish. Manag.*, 1993, **24**: 767—776

[18] Ringϕ E. The effect of chromic oxide Cr_2O_3 on aerobic bacterial populations associated with the intestinal epithelial mucosa of Arctic chart, *Salvelinus alpinus* L[J]. *Can J. Microbiol.*, 1993, **39**: 1169—1173

[19] Ringϕ E. The effect of chromic oxide Cr_2O_3 on faecal lipid and intestinal microflora of seawater—reared Arctic charr, *Salvelinus alpinus* L [J]. *Aquacult. Fish. Manag*, 1993, **24**: 341—344

[20] Browman H I, Marcotte B M. Effects of prey color and background color on feeding by Atlantic salmon alevins [J]. *Prog. Fish-Cult.*, 1987, **49**: 140—143

[21] Jskobsen P J, Johnsen G H, Holm J C. Increased growth rate in Atlantic salmon parr Salmo saint by using a two-coloured diet[J]. *Cuan. J. Fish. Aquat. Sci.*, 1987, **44**: 1079—1082

[22] Fanta E. influence of background color on the behavior of the fish *Oreochromis niloticus*(Cichlidae) [J]. *Auq. Biol. Techaol.*, 1995, **38**:1237—1251

[23] Tamazouzt L, Chatain B, Fontaine P. Tank wall colour and light level affect growth and survival of Eurasian perch larvae (*Percafiuviatilis* L.) [J]. *Aquaculture*, 2000, **182**: 85—90

[24] Papoutsoglou S E, Mylonakis G, Mdiou H. Effects of background color on growth performances and physiological reponses of scaled carp (*Cyprinus carpio* L.) reared in a closed circulated system[J]. *Aquacult. Eng.*, 2000,**22**:309—318

[25] Austreng E, Storebakken T, Tbomassen M S. Evaluation of selected trivalent metal oxides as inert markers used to estimate apparent digestibility in salmonids [J]. *Aquaculture*, 2000, **188**: 65—78

[26] Peddle J, Dewar W A, Gilbert A B. The use of titanium dioxide to determining apparent digestibility in mature domestic fowls(*Gallus domesticus*) [J]. *J Agric Sci*, 1982, **99**: 233—236

[27] Steele W, Clapperton J L. The use of chromic oxide as a food marker-a warning [J]. *J. Sci. Food. Agric.*, 1982, **33**: 325—328

[28] Watanabe T, Hashimoto Y. Toxic components of oxidized saury oil inducing muscular dystrophy in carp [J]. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.*,1968, **34**:1131—1140

[29] Tacon A G J, Beveridge M M. Effects of dietary trivalent chromium on rainbow trout [J]. *Nutr. Rep. Int*, 1982, **25**: 49—56

[30] Bjerkeng B, Foiling M, Lagocki S. Bioavailability of all-E—astaxantbin and Z—astaxanthin isomers in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*[J]. *Aquaculture*, 1997,**157**: 63—82

[31] Storebalkken T, Kvien I S, Shearer K D. Estimation of gastro-intestinal evacuation rate in Atlantic salmon Salmosalar using inert markers and collection of faeces by sieving: evauation of diets with fish meal, soybean meal or bacterial meal [J]. *Aquaculture.*, 1999, **172**: 291—299

[32] Refstie S, Helland S J, Storebakken T. Adaptation to soybean meal in diets for rainbow trout,*Oncorhynchus mykiss*[J]. *Aquaculture*, 1997,**153**: 263—272

[33] Chandler P T, Keler E M, Jones G M. Excretion of polyethylene by diary cows[J]. *J. Anim. Sci.*, 1966,**251**: 64—68

[34] Knapka J J, Barth K M, Brown D G. Evaluation of polyethylene, chromic oxide, and cerium^{-144} as digestibility indicators in burrors[J]. J. Nutr., 1967, **92**: 79—85

[35] Atkinson J L, Hilton J W, Slinger S J. Evaluation of acid—insoluble ash as an indicator of feed digestibility in rainbow trout Salmo gairdneri [J]. *Can. Fish. Aquat. Sci.*, 1984, **41**: 1384—1386

[36] Goddard J S, McLean E. Acid-insoluble ash as an reference material for digestibility studies in tilapia, *Oreoehromis aureu*[J]. *Aquaculture*, 2001, **194**: 93—98

[37] Morales A E, Cardenete G, de la Higuera M. Re-evatuation of crude fibre and acid-insoluble ash as inert markers, alternative to chromic oxide, in digestibfiity studies with rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. *Aquaculture*, 1999, **179**: 71—79

[38] Van Keulen J, Young B A. Evaluation of acid-insoluable ash as a natural marker in ruminant digestibility studies [J]. *J. Anima. Sci.*, 1977, **44**: 282—287

[39] Thonney M L. Acid insoluble ash as a digestion marker[C]. In: Proceedings of the 1981 Cornell Nutrition Conference for Feed Manufacturers, Cornell University, Ithaca, NY,1981, 118—122

[40] Kabir N M J, Wee K L, Maguire G. Estimation of apparent digestibility coefficients in rainbow trout. *Ottcorhynchus mykiss* using different markers: 1. Validation of microtracer F—Ni as marker[J]. *Aquaculture*,1998, **167**:259—272

[41] Bromley P J, Adkins T C. The influence of cellulose filler on feeding, growth and utilization of protein and energy in rainbow trout, *Salmo gairdnerii* Richardson [J]. *J. Fish Biol.*, 1984, **24**: 235—244

[42] De Silva S S, Shim K F, Khim Ong A. An evaluation of the method used in digestibility estimations of a dietary ingredient and comparisons on external and internal markers, and time of faeces collection in digestibility studies in the fish *Oreochromis aureus*(Steindachner) [J]. *Reprod Nutr Dev.*, 1990, **30**:215—226

[43] Scbwarz F J, Kirchgessner M. Zur bestimmung der nahrstoffverdaulichkeit helm karpfen (*Cyprinus carpio* L.): 1. Mittedung Aquarienaufbau und versuchsmethodik [J]. *Bayer Landwirtsch. Jahrb*, 1982, **59**: 79—84

[44] Buddington R K. Hydrolysis-resistant organic matter as a relerence for measurement of fish digestive efficiency [J]. *Trans. Am. Ftsh. Soc.*, 1980, **109**:653—656

[45] De Silva S S, Perera M K. Digestibility of an aquatic macrophyte by the cichlid, *Etroplus suratensis*,with ob-

servations the relative merits of three indigenous components as markers and daily changes in protein digestibility [J]. *J. Fish Biol.*, 1983, **23**: 675—684

[46] De Silva S S, Deng D F, Rajendram V. Digestibility in goldfish fed diets with and without chromic oxide and exposed to sublethal concentrations of cadmium [J]. *Aquacult. Nutr.*, 1997, **3**: 109—114

[47] Niederholzer R, Hofer R. The adoptation of digestive enzymes to temperature, season and diet in roach *Rutilus* L. and rudd *Sardinus eerythrophthalamus* L. celhtlase [J]. *J. Fish Biol.*, 1979, **15**:411—416

[48] Van Dyke J M, Sutton D L. Digestion of duckweek(*Lemna* spp.) by grass carp(*Ctenopharyngodon idella*) [J]. *J. Fish Biol.* 1977, **11**: 273—278

[49] Danulat E, Kausch H. Chitinase activity in the digestive tract of the cod, *Gadus morhua*(L.) [J]. *J. Fish Biol.*, 1984, **24**: 125—133

[50] Stickney R R, Shumway S E. Occurrence of cellulase activity in the stomach of fishes[J]. *J. Fish Biol.*, 1974, **6**:779—790

[51] Yokoe Y, Yasumas I. The distribution ofcellulase in invertebrates[J]. *Comp. Biochem. Physiol*, 1964,**13**:323—338

[52] Xue X M, Anderson A J, Richrdson N A. Characterisation of celluase activity in the digestive system of the redclaw crayfish (*Cherax quadricarinatus*)[J]. *Aquaculture*, 1999,**180**: 373—386

[53] Bowen S H. Digestion and assimilation of periphytic detrita aggregate by *Tilapia mossambica*[J]. *Trans. Am. Fish. Soc.*, 1981, **110**: 239—245

[54] De Silva S S, Perera M K, Maitipe M. Food, nutritional status and digestibility of *Sarotherodon mossambicus* populations of twelve mini-made lakes in Sri Lanka [J]. *Environ. Biol Fish.*, 1984,**11**: 205—219

[55] Wetherbee B M, Gruber S H. Use of acid—insoluble ash as a marker in absorption efficiency studies with the lemon shark [J]. *Prog Fish-Cult*, 1993, **55**: 270—274

[56] Gudmundsson B O, Halldorsdottir K. The use of n-atkanes as markers for determination of intake and digestability of fish feed [J]. *J. Appl. Ichthyol.*, 1995, **11**: 354—358

[57] Sigurgisladottir S, Lall S P, Parrish C C. Digestibility of dietary lipids in Atlantic salmon, using cholestane as a digestibility marker [J]. *Bull. Aquacult. Assoc. Can*, 1990, **90**(4): 41—44

[58] Sigurgisladottir S, Lall S P, Parrish C C. Cholestane as a digestibility marker in the absorption of polyunsatureated fatty acid ethyl esters in *Atlantic salmon*[J]. *Lipids*, 1992, **27**: 418—424

[59] Ishikawa M, Teshima S I, Koshio O. Measurements of digestibilities of cholesterol and fatty acids using 5α-cholestane as an inert market in the tilapia, *Oreochromis niloticus*, and the freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* [J]. *J. Appl. Icthyol*, 1997, **13**: 31—35

[60] Thonney M L, Palhof B A, Decarlo M R. Source of variatJon of dry matter digestibility measured by the acid insoluble ash marker [J]. *J. Dairy Sci*, 1984, **69**: 661—668

[61] Spyridakis P, Metailler R, Gabaudan J. Studies on nutrient digestibility in European sea bass *Dicentrachus labrax*: 1. Methodological aspects concerning faecal collection[J]. *Aquaculture*, 1989,**77**:61—70