

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΙΧΘΥΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΥΔΑΤΙΝΟΥ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**«Μεταποιημένες ζωικές πρωτεΐνες μη μηρυκαστικών στην εφαρμοσμένη
διατροφή της τσιπούρας (*Sparus aurata*)»**

ΠΙΕΡ ΨΩΦΑΚΗΣ

Βόλος 2022

**«Μεταποιημένες ζωικές πρωτεΐνες μη μηρυκαστικών στην εφαρμοσμένη διατροφή της
τσιπούρας (*Sparus aurata*)»**

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή

1) Ιωάννης Καραπαναγιωτίδης, Αναπληρωτής Καθηγητής - Διατροφή Υδρόβιων Ζωικών Οργανισμών, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, επιβλέπων,

2) Χρήστος Νεοφύτου, Ομότιμος Καθηγητής – Ιχθυολογία - Υδροβιολογία, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, μέλος,

2) Παναγιώτης Βερίλλης, Αναπληρωτής Καθηγητής - Μικροσκοπία και Ανάλυση Εικόνας στην Ιστολογία και στους Υδρόβιους Οργανισμούς, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, μέλος.

Στους γονείς μου και στην Άννα

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να εκφράσω τις ειλικρινείς μου ευχαριστίες στους ανθρώπους που συνέβαλαν στο να φέρω σε πέρας την παρούσα Διδακτορική Διατριβή. Η πραγματοποίησή της δεν θα ήταν δυνατή χωρίς την καθολική τους συμπαράσταση.

Επίσης, εκφράζω τις εγκάρδιες ευχαριστίες μου στον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Ιωάννη Καραπαναγιωτίδη, επιβλέπων της Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής, για την ανιδιοτελή βοήθεια του, την συμπαράσταση του, για τις χρήσιμες πληροφορίες του και τις ατέλειωτες ώρες που διέθεσε ακόμα και όταν δεν είχε τον διαθέσιμο χρόνο, σε συζητήσεις τόσο σε επιστημονικού ενδιαφέροντος όσο και σε προσωπικού, την απεριόριστη υπομονή και κατανόησή του καθώς και για την εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπο μου από την αρχή της συνεργασίας μας.

Ευχαριστώ τον Ομότιμο Καθηγητή κ. Χρήστο Νεοφύτου, μέλος της Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής για την καθοδήγηση και τις χρήσιμες συμβουλές του καθ' όλα τα στάδια διεκπεραίωσης της έρευνας. Επίσης, εκφράζω τις εγκάρδιες ευχαριστίες μου στον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Παναγιώτη Βερίλλη, για την ανιδιοτελή βοήθεια του, την συμπαράσταση του, για τις χρήσιμες συμβουλές του καθ' όλα τα στάδια διεκπεραίωσης της έρευνας.

Εκφράζω, επίσης, τις ευχαριστίες μου στην Ειδική Υπηρεσία Διαχείρισης Ε.Π. ΑΛΙΕΙΑΣ του Υπουργείου Αγροτικής Ανάπτυξης για την χρηματοδότηση της Πράξης (Κωδικός ΟΠΣΑΑ: 185372, Κωδικός ΣΑ: 086/8, 2014ΣΕ08680009) με τίτλο «ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΜΕΤΑΠΟΙΗΜΕΝΩΝ ΖΩΙΚΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΣΤΙΣ ΙΧΘΥΟΤΡΟΦΕΣ ΤΗΣ ΤΣΙΠΟΥΡΑΣ (*Sparus aurata*), μέσω της οποίας χρηματοδοτήθηκε η έρευνα της διδακτορικής μου διατριβής. Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να δώσω και στους συνεργάτες μου Ευανθία Δασκαλοπούλου, Ιωάννη Βογιατζή, Κωνσταντίνο Αλεξίου, Αλέξανδρο Θεοδώρου, Αικατερίνη Μάστορα για τις πολύτιμες τεχνικές βοήθειες τους καθόλη της διάρκεια της έρευνας μου. Ευχαριστώ τις/τους καθηγήτριες/ές κ.κ. Ελένη

Γκολομάζου, Ελένη Μεντέ, Κωνσταντίνο Κορμά, Αθανάσιο Εξαδάκτυλο, Εμμανουήλ Μαλανδράκη για την ερευνητική και συγγραφική συνεργασία στο πλαίσιο της διδακτορικής μου διατριβής. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω και τις εταιρείες BioMar AEBE, ΣΕΛΟΝΤΑ ΑΕ και Sonac για τις δωρεές σε πρώτες ύλες ιχθυοτροφών και ιχθύδια για την διεξαγωγή των πειραματισμών μου.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα ψάρια, και γενικότερα τα ιχθυηρά, ανέκαθεν αποτελούσαν ένα σημαντικό κομμάτι της ανθρώπινης διατροφής, ενώ και ο ρόλος τους στη συμβολή μιας υγιεινής διατροφής είναι καθολικά αναγνωρισμένος. Η κατά κεφαλή ετήσια κατανάλωση ιχθυηρών παγκοσμίως έχει διπλασιαστεί από τη δεκαετία του 1960 και αναμένεται να συνεχίσει να αυξάνεται λόγω της αυξανόμενης ζήτησής της, που ενθαρρύνεται από την αύξηση του πληθυσμού και την στροφή προς μια πιο υγιεινή διατροφή, μεταξύ άλλων. Δεδομένης της στασιμότητας των φυσικών αλιευτικών αποθεμάτων, οι υδατοκαλλιέργειες διαδραματίζουν ένα ολοένα και σημαντικότερο ρόλο στην προσφορά ιχθυηρών και στην αντιμετώπιση της αυξανόμενης ζήτησης αυτών. Η ραγδαία αύξηση της ιχθυοκαλλιεργητικής παραγωγής οφείλεται κυρίως στην αυξημένη παραγωγή εντατικά εκτρεφόμενων ειδών, η οποία με τη σειρά της οφείλεται στη ραγδαία ανάπτυξη του τομέα των βιομηχανικά παρασκευαζόμενων ιχθυοτροφών.

Η περαιτέρω ανάπτυξη του τομέα των ιχθυοκαλλιεργειών, ωστόσο, δυσχεραίνεται από μία πληθώρα εμποδίων και περιορισμών. Ένας από τους σημαντικότερους περιοριστικούς παράγοντες, ο οποίος μάλιστα απειλεί και την ίδια τη βιωσιμότητα του τομέα, είναι η εξάρτηση του από τα ιχθυάλευρα που αποτελούν την κύρια πρωτεϊνική πηγή των ιχθυοτροφών. Τα ιχθυάλευρα παρασκευάζονται κυρίως από τη μεταποίηση φυσικών αλιευμάτων με την παγκόσμια παραγωγή τους να παραμένει στάσιμη εδώ και δεκαετίες και την τιμή τους συνεχώς να αυξάνει, εκτινάσσοντας έτσι το κόστος παρασκευής ιχθυοτροφών και κατά συνέπεια το κόστος παραγωγής της ιχθυοκαλλιέργειας. Εδώ και δύο δεκαετίες έχουν πραγματοποιηθεί σημαντικές μειώσεις στα χορηγούμενα επίπεδα των ιχθυαλεύρων στις ιχθυοτροφές των κυριότερων εκτρεφόμενων ειδών χωρίς σημαντικές αρνητικές επιδράσεις στην ανάπτυξή τους και πλέον τα φυτικά άλευρα χρησιμοποιούνται ευρέως στις ιχθυοτροφές. Ωστόσο, η χρησιμοποίηση των φυτικών αλεύρων εμπεριέχει και αρκετά μειονεκτήματα, όπως είναι τα μειωμένα επίπεδα των απαραίτητων αμινοξέων τους, συγκριτικά με τα ιχθυάλευρα, η

περιεκτικότητά τους σε διάφορες αντι-διατροφικές ουσίες, η μειωμένη αποδεκτή γεύση τους από τα ψάρια, η μειωμένη βιοδιαθεσιμότητα των θρεπτικών συστατικών στο σώμα των εκτρεφόμενων ψαριών και η συνεπαγόμενη υποβάθμιση του υδάτινου περιβάλλοντος, μεταξύ άλλων. Επίσης, η παραγωγή πολλών φυτικών αλεύρων σχετίζεται και η ίδια με προβλήματα περιβαλλοντικής αειφορίας. Για το λόγο αυτό, τα φυτικά άλευρα δεν μπορούν να αντικαταστήσουν πλήρως τα ιχθυάλευρα.

Προκειμένου οι ιχθυοκαλλιέργειες να προσφέρουν αειφορικά παραγόμενο ψάρι στην παγκόσμια κοινότητα θα πρέπει ο τομέας να συνεχίσει την εξεύρεση αξιόπιστων εναλλακτικών των ιχθυαλεύρων συστατικών των ιχθυοτροφών, οι οποίες θα πρέπει να είναι κατάλληλες διατροφικά, βιώσιμες οικονομικά αλλά και φιλικές προς το περιβάλλον. Οι υποψήφιες εναλλακτικές πηγές πρωτεϊνών, θα πρέπει να έχουν συγκεκριμένα χαρακτηριστικά συμπεριλαμβανομένης της ευρείας διαθεσιμότητάς τους στην αγορά και ανταγωνιστική τιμή αγοράς. Πρωταρχικά, θα πρέπει να διαθέτουν συγκεκριμένα θρεπτικά χαρακτηριστικά, όπως υψηλή περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες, ευνοϊκό προφίλ αμινοξέων, υψηλή πεπτικότητα, κατάλληλη γευστικότητα, αλλά και χαμηλά επίπεδα άπεπτων ινωδών ουσιών, δύσπεπτων υδατανθράκων και αντι-διατροφικών ουσιών.

Οι μεταποιημένες πρωτεΐνες χερσαίων μη μηρυκαστικών ζώων (ΜΖΠ) παγκοσμίως αποτελούν σημαντικά συστατικά ζωοτροφών. Πρόκειται για ζωικά υποπροϊόντα που παρασκευάζονται μέσω της θέρμανσης των υπολειμμάτων ζωικών ιστών και είναι υψηλής θρεπτικής αξίας αφού πρώτα έχουν επεξεργαστεί κατάλληλα, πλούσια σε πρωτεΐνες, βιταμίνες και ανόργανα στοιχεία. Ειδικότερα, η περιεκτικότητά τους σε πρωτεΐνες είναι υψηλότερη αυτής των φυτικών αλεύρων, ενώ περιέχουν πολύ υψηλά ποσοστά φωσφόρου, το οποίο είναι ένα περιορισμένο ανόργανο στοιχείο στο υδάτινο περιβάλλον. Περαιτέρω, η τιμή πώλησής τους στη διεθνή αγορά είναι σαφώς χαμηλότερη από εκείνη των ιχθυαλεύρων αλλά και πολλών φυτικών αλεύρων. Δυστυχώς οι ΜΖΠ αποτελούν πολύ χρήσιμα και

αποτελεσματικά συστατικά για τις ζωοτροφές, αλλά και από την άλλη προσφέρουν μία αξιόλογη λύση στη χρησιμοποίηση των ζωικών υποπροϊόντων που μέχρι σήμερα καταστρεφόταν. Η χρήση των ΜΖΠ είχε απαγορευτεί καθολικά στις ζωοτροφές της Ευρωπαϊκής Ένωσης το 2001, αλλά η απαγόρευση αυτή άρθηκε για τις ιχθυοτροφές την 1η Ιουνίου 2013, μετά τη διαπίστωση πως η χρησιμοποίηση των ΜΖΠ στις ιχθυοτροφές παρουσιάζει αμελητέο κίνδυνο για την ανθρώπινη υγεία, ενώ πρόσφατα (Σεπτέμβριος 2021) άρθηκε και η απαγόρευσή τους για τις ζωοτροφές πουλερικών και χοίρων. Σήμερα, το ενδιαφέρον της βιομηχανίας ιχθυοτροφών επικεντρώνεται σε συγκεκριμένα προϊόντα ΜΖΠ όπως είναι το άλευρο υποπροϊόντων πουλερικών (πτηνάλευρο), το άλευρο από υδρολυμένο πετράλευρο το αιματάλευρο και δυνητικά το άλευρο υποπροϊόντων χοίρων (χοιράλευρο).

Η επανεισαγωγή των ΜΖΠ στις ιχθυοκαλλιέργειες θα ενισχύσει την προσπάθεια της Κοινής Αλιευτικής Πολιτικής για αειφορική ανάπτυξή τους με ταυτόχρονη αειφορική διαχείριση των φυσικών αλιευτικών αποθεμάτων. Εκτιμάται ότι η μελλοντική αύξηση της ιχθυοκαλλιεργητικής παραγωγής κυρίως θα επηρεαστεί από τη ποσοτική διαθεσιμότητα ποιοτικών ιχθυοτροφών, η οποία με τη σειρά της θα εξαρτηθεί σε μεγάλο βαθμό από τη χρησιμοποίηση των ΜΖΠ στις ιχθυοτροφές.

Μέχρι σήμερα, η επιστημονική γνώση για την καταλληλότητα των ΜΖΠ στις ιχθυοτροφές των ευρωπαϊκών εκτρεφόμενων ειδών ψαριών, συμπεριλαμβανομένης της τσιπούρας, είναι περιορισμένη. Με γνώμονα την έλλειψη αυτή πραγματοποιήθηκε η παρούσα Διδακτορική Διατριβή που σκοπό είχε να μελετήσει την καταλληλότητά τους και να καθορίσει τα μέγιστα επιθυμητά ποσοστά χορήγησης των ΜΖΠ, υποκαθιστώντας περαιτέρω τα ιχθυάλευρα στις ιχθυοτροφές της εκτρεφόμενης τσιπούρας (*Sparus aurata*). Ο ειδικότερος σκοπός ήταν να εξετάσει την επίδραση των τροφών που περιέχουν ΜΖΠ σε σύγκριση με τροφές που δεν περιέχουν ΜΖΠ, σε μια σειρά παραμέτρων που σχετίζονται με την ανάπτυξη και τη φυσιολογία των ψαριών γενικότερα, την θρεπτική αξία των ψαριών, αλλά και το

κόστος παραγωγής των ιχθυοτροφών. Συνεπώς, απώτερος στόχος της διατριβής ήταν να διαφωτίσει τον τομέα των ιχθυοκαλλιέργειών ως προς την καταλληλότητα των ΜΖΠ και την ενδεχόμενη μείωση των ποσοστών χορήγησης των ιχθυαλεύρων στις ιχθυοτροφές της τσιπούρας, ώστε να ενισχύσουν τη βιωσιμότητα και την αποδοτικότητα της παραγωγής της.

Στην παρούσα Διδακτορική Διατριβή, λοιπόν, διερευνήθηκε η δυνατότητα υποκατάστασης του ιχθυαλεύρου από άλευρα μεταποιημένων ζωικών πρωτεϊνών μη μηρυκαστικών ζώων στο σιτηρέσιο της τσιπούρας. Συγκεκριμένα, διερευνήθηκαν οι επιδράσεις της υποκατάστασης του ιχθυαλεύρου από άλευρο υποπροϊόντων πουλερικών (πτηνάλευρο), από υδρολυμένο πετράλευρο και από άλευρο χοίρων (χοιράλευρο) στην ανάπτυξη, τη θρεπτική σύσταση και στην ιστομορφολογία του είδους που μελετήθηκε. Για το σκοπό αυτόν διεξήχθησαν συνολικά πέντε διατροφικά πειράματα. Στο 1ο διατροφικό πείραμα διερευνήθηκε η υποκατάσταση του ιχθυαλεύρου από άλευρο υποπροϊόντων πουλερικών (πτηνάλευρο) σε υψηλά επίπεδα, και συγκεκριμένα 50% και 100% (πλήρης αντικατάσταση), και στη συνέχεια στο 2ο διατροφικό πείραμα δοκιμάστηκαν χαμηλότερα επίπεδα υποκατάστασης, και συγκεκριμένα 25% και 50% με ή χωρίς προσθήκη απαραίτητων αμινοξέων στο σιτηρέσιο. Στο 3ο διατροφικό πείραμα διερευνήθηκε η υποκατάσταση του ιχθυαλεύρου από υδρολυμένο πετράλευρο σε υψηλά επίπεδα, και συγκεκριμένα 50% και 100% (πλήρης αντικατάσταση) και στη συνέχεια στο 4ο διατροφικό πείραμα δοκιμάστηκαν χαμηλότερα επίπεδα υποκατάστασης, και συγκεκριμένα 25% και 50% με ή χωρίς προσθήκη απαραίτητων αμινοξέων στο σιτηρέσιο. Τέλος, στο 5ο διατροφικό πείραμα διερευνήθηκε η υποκατάσταση του ιχθυαλεύρου από άλευρο χοίρων κατά 25%, 35% και 45% με ή χωρίς προσθήκη απαραίτητων αμινοξέων στο σιτηρέσιο.

Στο 1ο διατροφικό πείραμα, διάρκεια 100 ημερών, χρησιμοποιήθηκαν συνολικά 300 ιχθύδια τσιπούρας μέσου σωματικού βάρους $2,52 \pm 0,25$ g, μέσου ολικού μήκους $6,1 \pm 0,1$ cm και τοποθετήθηκαν σε 12 γυάλινα ενυδρεία. Συνολικά, καταρτίστηκαν τρία ισοπρωτεϊνικά

(50% ολικές πρωτεΐνες) και ισοενεργειακά (21 KJ/g) σιτηρέσια, όπου η πρωτεΐνη του ιχθυαλεύρου της τροφής-μάρτυρα (FM) αντικαταστάθηκε κατά 50% από άλευρο υποπροϊόντων πουλερικών (poultry by-product meal) (PBM50) και 100% (PBM100). Η ενσωμάτωση του πτηναλεύρου (PBM) στο σιτηρέσιο, σε όλα τα εξεταζόμενα επίπεδα υποκατάστασης του ιχθυαλεύρου, δεν οδήγησε σε αύξηση των θνησιμοτήτων. Ωστόσο, η ολική αντικατάσταση του ιχθυαλεύρου από πτηνάλευρο οδήγησε σε σημαντικά ($P < 0,05$) μειωμένη πρόσληψη τροφής από την τσιπούρα. Επίσης, η υποκατάσταση κατά 50%, καθώς και η ολική αντικατάσταση (100%) της πρωτεΐνης του ιχθυαλεύρου από πρωτεΐνη πτηναλεύρου οδήγησε σε μειωμένο ρυθμό ανάπτυξης (SGR), αποδοτικότητα τροφής και κατακράτηση θρεπτικών ουσιών, η οποία οφείλεται εν μέρει στη μειωμένη πρόσληψη τροφής και παράλληλα στα χαμηλότερα επίπεδα μεθειονίνης του πτηναλεύρου. Επιπρόσθετα, η υποκατάσταση κατά 50% ή 100% του ιχθυαλεύρου από πτηνάλευρο δεν επέφερε σημαντικές διαφοροποιήσεις στη θρεπτική σύσταση ολόκληρου του σώματος και του μυϊκού ιστού των ιχθυδίων, πέραν της μειωμένης λιποπεριεκτικότητας και ενέργειας που παρατηρήθηκε στα ιχθύδια όπου διατράφηκαν με πλήρη αντικατάσταση του ιχθυαλεύρου. Περαιτέρω, η ενσωμάτωση του πτηναλεύρου στο σιτηρέσιο, σε όλα τα εξεταζόμενα επίπεδα υποκατάστασης του ιχθυαλεύρου, δεν προκάλεσε ιστολογικές αλλοιώσεις ή κάποιου είδους φλεγμονή στο έντερό τους, υποδηλώνοντας φυσιολογική πέψη και απορρόφηση του. Παρόλο που δεν υπήρξαν ενδείξεις στεάτωσης, η μερική (50%) και πολύ περισσότερο η ολική (100%) αντικατάσταση του ιχθυαλεύρου από πτηνάλευρο προκάλεσαν ήπιες έως μέτριες ηπατικές αλλοιώσεις στην ιστομορφολογία του ήπατός τους.

Στο 2ο διατροφικό πείραμα χρησιμοποιήθηκαν συνολικά 300 ιχθύδια τσιπούρας μέσου σωματικού βάρους $2,97 \pm 0,31$ g, μέσου ολικού μήκους $6,35 \pm 0,03$ cm και τοποθετήθηκαν σε 12 γυάλινα ενυδρεία (125 L) για 110 ημέρες εκτροφής. Συνολικά, καταρτίστηκαν τέσσερα ισοπρωτεϊνικά (50% ολικές πρωτεΐνες) και ισοενεργειακά (21 KJ/g)

σιτηρέσια, χρησιμοποιώντας την τροφή μάρτυρα (FM) του 1ου διατροφικού πειράματος, αλλά η πρωτεΐνη του ιχθυαλεύρου υποκαταστάθηκε σε χαμηλότερα επίπεδα με ή χωρίς συμπλήρωση απαραίτητων αμινοξέων: κατά 25% (PBM25), κατά 25% με ταυτόχρονη συμπλήρωση λυσίνης και μεθειονίνης (PBM25+) και κατά 50% με συμπλήρωση των συγκεκριμένων αμινοξέων (PBM50+). Η λυσίνη και η μεθειονίνη αποτέλεσαν τα δύο πιο ελλειμματικά απαραίτητα αμινοξέα στο πτηνάλευρο, συγκριτικά με το ιχθυάλευρο. Η επιβίωση των ψαριών ήταν υψηλή (>92%) και παρόμοια μεταξύ των ομάδων. Η πρόσληψη της τροφής, το τελικό σωματικό βάρος, η αύξηση βάρους, ο ειδικός ρυθμός ανάπτυξης (SGR), ο συντελεστής μετατρεψιμότητας της τροφής (FCR) και ο συντελεστής αποδοτικότητας της πρωτεΐνης (PER) ήταν παρόμοιοι ($P>0,05$) μεταξύ των τεσσάρων διατροφικών ομάδων. Αν και ο δείκτης κατακράτησης λίπους ήταν, επίσης, παρόμοιος μεταξύ των ομάδων, ο δείκτης κατακράτησης πρωτεΐνης ήταν μειωμένος καθώς το επίπεδο χορήγησης του πτηναλεύρου αυξήθηκε στο σιτηρέσιο, με αποτέλεσμα η ομάδα PBM50+ να έχει σημαντικά χαμηλότερο δείκτη από την ομάδα FM. Παρόμοια εικόνα παρατηρήθηκε και με τον ενδοσπλαχνικό δείκτη (VSI), ο οποίος μειώθηκε σημαντικά με την αύξηση του επιπέδου χορήγησης του πτηναλεύρου στην τροφή, ενώ ο ηπατοσωματικό δείκτης (HSI) και ο δείκτης ευρωστίας (K) ήταν παρόμοιοι σε όλες τις διατροφικές ομάδες. Η συμπληρωματική προσθήκη αμινοξέων, και ιδιαίτερα μεθειονίνης, δείχθηκε ότι είναι απαραίτητη όταν το ιχθυάλευρο υποκαθίσταται από πτηνάλευρο σε ποσοστό 50%. Επιπρόσθετα, η υποκατάσταση του ιχθυαλεύρου από πτηνάλευρο κατά 25% και 50%, με ή χωρίς προσθήκη αμινοξέων, δεν επέφερε σημαντικές διαφοροποιήσεις στη θρεπτική σύσταση ολόκληρου του σώματος και του μυϊκού ιστού της τσιπούρας, ούτε προκάλεσε ιστολογικές αλλοιώσεις στο έντερο της τσιπούρας. Η ιστομορφολογία του ήπατος της τσιπούρας δεν επηρεάστηκε όταν το πτηνάλευρο υποκατέστησε το ιχθυάλευρο κατά 25%. Ωστόσο, σε υψηλότερα επίπεδα αντικατάστασης παρατηρήθηκαν περισσότερα λιποσταγονίδια μεγάλου μεγέθους και μια

αυξημένη ηπατική λιπο-εναπόθεση. Η συμπληρωματική χορήγηση λυσίνης και μεθειονίνης στο σιτηρέσιο φάνηκε να βοηθά τη φυσιολογία πέψης, καθώς τα ψάρια που διατράφηκαν με αυτά τα σιτηρέσια έδειξαν λιγότερες ηπατικές αλλοιώσεις και δυσμορφίες σε σύγκριση με εκείνα που διατράφηκαν με σιτηρέσια παρόμοιου επιπέδου αντικατάστασης αλλά χωρίς συμπλήρωση αμινοξέων.

Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής, για τη χρήση του πτηναλεύρου, δείχνουν ότι η πιθανή υποκατάσταση της πρωτεΐνης του ιχθυαλεύρου της τροφής από πτηνάλευρο έως και 50% να είναι επιτυχής για τα νεαρά άτομα της τσιπούρας, εφόσον το σιτηρέσιο συμπληρωθεί με μεθειονίνη και λυσίνη, χωρίς να μειώνεται σημαντικά η πρόσληψη και η αποτελεσματικότητα της τροφής, η απόδοση της ανάπτυξης, η θρεπτική σύσταση και η ιστομορφολογία του εντέρου και του ήπατος των ιχθυδίων. Τα αποτελέσματα της παρούσας έρευνας έδειξαν ότι για τις τροφές ιχθυδίων τσιπούρας, μέσου βάρους 3-50 g, μπορεί να χρησιμοποιηθεί πτηνάλευρο στο επίπεδο του 27% επί της τροφής με συνχορήγηση λυσίνης, χωρίς να επιφέρει μειωμένη παραγωγική απόδοση, δεδομένου ότι το επίπεδο χορήγησης του ιχθυαλεύρου στην τροφή του μάρτυρα ήταν 58% και η πρωτεϊνική περιεκτικότητα του ήταν 64%.

Στο 3ο διατροφικό πείραμα, διάρκεια 100 ημερών, χρησιμοποιήθηκαν συνολικά 300 ιχθύδια τσιπούρας μέσου σωματικού βάρους $2,52 \pm 0,25$ g, μέσου ολικού μήκος $6,1 \pm 0,1$ cm και τοποθετήθηκαν σε 12 γυάλινα ενυδρεία. Για το 3ο πείραμα καταρτίστηκαν συνολικά τρία ισοαζωτούχα (ολικές πρωτεΐνες 50% της τροφής) και ισοενεργειακά (21 MJ/Kg της τροφής) σιτηρέσια όπου η πρωτεΐνη του ιχθυαλεύρου της τροφής-μάρτυρα (FM) αντικαταστάθηκε κατά 50% από άλευρο υδρολυμένου πτεραλεύρου (hydrolyzed feather meal) (HFM50) και κατά 100% (HFM100). Με το πέρας του πειράματος παρατηρήθηκαν σημαντικά ($P < 0,05$) υψηλότερες θνησιμότητες ($16,0 \pm 3,2\%$) στην HFM100 διατροφική ομάδα. Ταυτόχρονα, η πρόσληψη τροφής, το τελικό βάρος σώματος, η αύξηση βάρους, ο ειδικός ρυθμός ανάπτυξης

(SGR), ο συντελεστής μετατρεψιμότητας της τροφής (FCR) και ο συντελεστής αποδοτικότητας της πρωτεΐνης (PER), ήταν σταδιακά και σημαντικά ($P<0,05$) μειούμενοι με την αύξηση του επιπέδου χορήγησης του περαλεύρου στο σιτηρέσιο. Η τροφή HFM100 παρουσίασε μια εξαιρετικά χαμηλή ($P<0,05$) πρόσληψη και ένα μη αποδεκτά υψηλό συντελεστή μετατρεψιμότητας της τροφής ($8,72\pm 0,66$). Η κατακράτηση πρωτεΐνης ακολούθησε την ίδια τάση μεταξύ των τριών ομάδων ιχθύων, όπου μειώνονταν με την αύξηση της χορήγησης πτηναλεύρου στο σιτηρέσιο. Ωστόσο, παρατηρήθηκε μια σημαντικά υψηλότερη κατακράτηση λίπους ($81,9\pm 1,72\%$) στην ομάδα HFM50 συγκριτικά με εκείνη της ομάδας FM ($67,9\pm 2,08\%$), ενώ η ομάδα HFM100 είχε μια υπερβολικά χαμηλή τιμή ($3,60\pm 0,17\%$). Επίσης ο ηπατοσωματικός δείκτης (HSI) και ο δείκτης ευρωστίας (K), είχαν παρόμοια εικόνα στις ομάδες FM και HFM50 αλλά σημαντικά ($P<0,05$) μειωμένοι στην ομάδα HFM100. Ο ενδοσπλαχνικός δείκτης (VSI) ήταν σημαντικά μειωμένος στις ομάδες HFM50 και HFM100. Αναφορικά με τη θρεπτική σύσταση ολόκληρου του σώματος και του μυϊκού ιστού των ιχθυδίων τσιπούρας, η υποκατάσταση του ιχθυαλεύρου από πετράλευρο κατά 50% δεν επέφερε σημαντικές διαφοροποιήσεις. Ωστόσο, η ολική αντικατάσταση (HFM100) οδήγησε σε μειωμένα επίπεδα λιπιδίων και ενέργειας και αυξημένα επίπεδα υγρασίας και πρωτεϊνών στο σώμα και τον μυϊκό ιστό των ατόμων που μελετήθηκαν. Περαιτέρω, η ενσωμάτωση του υδρολυμένου περαλεύρου στο σιτηρέσιο δεν προκάλεσε ιστολογικές αλλοιώσεις ή κάποιου είδους φλεγμονή στο έντερο. Παρόλο που δεν υπήρξαν ενδείξεις στεάτωσης, η μερική (50%) και πολύ περισσότερο η ολική (100%) αντικατάσταση του ιχθυαλεύρου από υδρολυμένο πετράλευρο προκάλεσαν μέτριες έως πολύ πιο σοβαρές ηπατικές αλλοιώσεις στην ιστομορφολογία των ιχθυδίων.

Στο 4ο διατροφικό πείραμα μελετήθηκε η αντικατάσταση της πρωτεΐνης του ιχθυαλεύρου από πρωτεΐνη υδρολυμένου περαλεύρου σε χαμηλότερα επίπεδα. Ιχθύδια τσιπούρας τοποθετήθηκαν σε 12 γυάλινα ενυδρεία (125 L) και χωρίστηκαν σε 4 διατροφικές

ομάδες (25 άτομα/ενυδρείο, 3 επαναλήψεις/διατροφική ομάδα), στις οποίες χορηγήθηκαν 4 διαφορετικά σιτηρέσια και η σίτισή τους γινόταν 2 φορές καθημερινά μέχρι κορεσμού για 110 ημέρες. Στο πρώτο σιτηρέσιο, την πηγή ζωικής πρωτεΐνης αποτέλεσε αποκλειστικά το ιχθυάλευρο (FM). Στα υπόλοιπα τρία σιτηρέσια πραγματοποιήθηκε αντικατάσταση της πρωτεΐνης του ιχθυαλεύρου με πρωτεΐνη υδρολυμένου περαλεύρου σε ποσοστό 25% χωρίς προσθήκη αμινοξέων (HFM25), σε ποσοστό 25% με παράλληλη προσθήκη μεθειονίνης και λυσίνης (HFM25+) και σε ποσοστό 50% με παράλληλη προσθήκη μεθειονίνης και λυσίνης (HFM50+). Η μερική αντικατάσταση του ιχθυαλεύρου με υδρολυμένο περάλευρο σε όλα τα επίπεδα αντικατάστασης δεν επηρέασε στατιστικά σημαντικά την επιβίωση των ψαριών που σιτίστηκαν με αυτή. Η αύξηση του βάρους των ψαριών, ο ειδικός ρυθμός ανάπτυξης (SGR), ο συντελεστής μετατρεψιμότητας της τροφής (FCR), καθώς και ο συντελεστής αποδοτικότητας της πρωτεΐνης (PER) δεν διέφεραν σημαντικά ($P>0,05$) μεταξύ των ομάδων FM, HFM25 και HFM25+, αλλά επηρεάστηκαν αρνητικά ($P<0,05$) στην ομάδα HFM50+. Αναφορικά με τη θρεπτική σύσταση ολόκληρου του σώματος και του μυϊκού ιστού των ιχθυδίων τσιπούρας, η υποκατάσταση του ιχθυαλεύρου από περάλευρο έως και 50%, με ή χωρίς προσθήκη αμινοξέων, δεν παρουσιάσθηκαν σημαντικές διαφοροποιήσεις. Περαιτέρω, η ενσωμάτωση του υδρολυμένου περαλεύρου στο σιτηρέσιο κατά 25% ή 50% δεν προκάλεσε ιστολογικές αλλοιώσεις ή κάποιου είδους φλεγμονή στο έντερο. Η ιστομορφολογία του ήπατος των ιχθύων τσιπούρας δεν επηρεάστηκε όταν το περάλευρο υποκατέστησε το ιχθυάλευρο κατά 25%. Ωστόσο, σε υψηλότερα επίπεδα αντικατάστασης (50%) παρατηρήθηκαν περισσότερα λιποσταγονίδια μεγάλου μεγέθους και μια αυξημένη ηπατική λιπο-εναπόθεση.

Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής για τη χρήση του υδρολυμένου περαλεύρου δείχνουν ότι η υποκατάσταση της πρωτεΐνης του ιχθυαλεύρου της τροφής από περάλευρο έως και 25%, με ή χωρίς προσθήκη λυσίνης και μεθειονίνης, είναι

επιτυχής για τα νεαρά άτομα της τσιπούρας, χωρίς να μειώνεται σημαντικά η αποτελεσματικότητα της τροφής, η απόδοση της ανάπτυξης, η θρεπτική σύσταση και η ιστομορφολογία του εντέρου και του ήπατος των ιχθύων. Σε υψηλότερα επίπεδα υποκατάστασης, το συγκριτικά φτωχότερο προφίλ αμινοξέων του περαλεύρου και η χαμηλότερη μεταβολική αποτελεσματικότητά του είναι οι κυριότεροι παράγοντες που μειώνουν την απόδοση των ψαριών. Συνεπώς, τα ερευνητικά αποτελέσματα οδηγούν στην πιθανή πρόταση ότι, για τις τροφές ιχθυδίων τσιπούρας μέσου βάρους 3-50 g, μπορεί να χρησιμοποιηθεί περάλευρο σε ένα επίπεδο ένταξης στο σιτηρέσιο της τάξης του 10,8%, χωρίς να επιφέρει μειωμένη παραγωγική απόδοση, δεδομένου ότι το επίπεδο χορήγησης του ιχθυαλεύρου στην τροφή του μάρτυρα ήταν 58% και η πρωτεϊνική περιεκτικότητα του ήταν 64%.

Στο 5ο διατροφικό πείραμα, διάρκειας 90 ημερών, χρησιμοποιήθηκαν συνολικά 630 ιχθύδια τσιπούρας μέσου σωματικού βάρους $2,27 \pm 0,20$ g, μέσου ολικού μήκος $6,0 \pm 0,2$ cm και τοποθετήθηκαν σε 21 γυάλινα ενυδρεία. Συνολικά, καταρτίστηκαν επτά ισοαζωτούχα (52% της τροφής) και ισοενεργειακά (21 MJ/Kg της τροφής) σιτηρέσια. Η τροφή μάρτυρας (FM) περιείχε και στο πείραμα αυτό αποκλειστικά ιχθυάλευρο ως πηγή ζωικής πρωτεΐνης. Για την υποκατάσταση του ιχθυαλεύρου στις λοιπές πειραματικές τροφές χρησιμοποιήθηκε άλευρο χοίρων (POM, ολικών πρωτεϊνών 62%). Στις υπό εξέταση τροφές, η πρωτεΐνη του ιχθυαλεύρου υποκαταστάθηκε από πρωτεΐνη χοιραλεύρου κατά 25% (POM25), 35% (POM35) και 45% (POM45). Επίσης, σε άλλες τρεις πειραματικές τροφές η πρωτεΐνη του ιχθυαλεύρου υποκαταστάθηκε από πρωτεΐνη χοιραλεύρου κατά 25%, 35% και 45% με παράλληλη προσθήκη λυσίνης (POM25+, POM35+, POM45+, αντίστοιχα) σε ποσοστά ένταξης στο σιτηρέσιο τέτοια που εκτιμήθηκαν ότι εξισορροπούν τη μείωση της λυσίνης που επέρχεται λόγω της υποκατάστασης του ιχθυαλεύρου. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η επιβίωση των ιχθυδίων ήταν υψηλή (>83%) και παρόμοια μεταξύ των ομάδων ($P > 0,05$). Η

αύξηση του επιπέδου χορήγησης του χοιραλεύρου στο σιτηρέσιο οδήγησε σε μια αυξανόμενη εθελούσια πρόσληψη τροφής, αν και η τάση αυτή ήταν μη σημαντική ($P>0,05$). Το αποτέλεσμα αυτό έδειξε ότι το χοιράλευρο δεν επιφέρει κάποια αρνητική επίδραση στην αποδεκτικότητα της τροφής στο σύνολό του, και φανερώνει την υψηλή γευστικότητα του. Περαιτέρω, η υποκατάσταση της πρωτεΐνης του ιχθυαλεύρου από πρωτεΐνη χοιραλεύρου έως και 45%, που ήταν το μέγιστο εξεταζόμενο επίπεδο, δεν μείωσε σημαντικά το σωματικό βάρος και τον ειδικό ρυθμό ανάπτυξης (SGR) των ιχθυδίων τσιπούρας. Ωστόσο, τα υψηλά αυτά επίπεδα υποκατάστασης (45%) οδήγησαν σε σημαντικά μειωμένη αξιοποίηση της τροφής (υψηλό FCR) και αποδοτικότητας των πρωτεϊνών (PER). Ήταν φανερή μια τάση αύξησης του FCR και μείωσης του PER, καθώς το επίπεδο υποκατάστασης του ιχθυαλεύρου από χοιράλευρο αυξήθηκε στο σιτηρέσιο. Αντίθετα, η υποκατάσταση της πρωτεΐνης του ιχθυαλεύρου από πρωτεΐνη χοιραλεύρου έως και 35%, με ή χωρίς προσθήκη λυσίνης, δεν επέφερε καμία αρνητική επίδραση σε όλους τους δείκτες ανάπτυξης των ιχθυδίων και αξιοποίησης της τροφής. Επιπρόσθετα, η θρεπτική σύσταση του σώματος και του μυϊκού ιστού των ιχθυδίων, γενικά, δεν επηρεάστηκε από τις υποκαταστάσεις του ιχθυαλεύρου με χοιράλευρο.

Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα τη παρούσας Διδακτορικής Διατριβής έδειξαν ότι οι Μεταποιημένες Ζωικές Πρωτεΐνες μη-μηρυκαστικών, και συγκεκριμένα το άλευρο υποπροϊόντων πουλερικών, το άλευρο υδρολυμένου περαλεύρου και το άλευρο υποπροϊόντων χοίρων, είναι σε μεγάλο βαθμό κατάλληλες και αξιοποιήσιμες από ιχθύδια τσιπούρας και πιθανών δύνανται να υποκαταστήσουν μερικώς το ιχθυάλευρο στο σιτηρέσιό τους χωρίς να επιφέρουν αρνητικές επιδράσεις στην απόδοση των ιχθύων και την αποτελεσματικότητα της τροφής. Το επίπεδο της επιτυχούς υποκατάστασης ιχθυαλεύρου διαφέρει μεταξύ των χερσαίων αυτών ζωικών πρωτεϊνών με το πτηνάλευρο να έχει την καλύτερη αποδοτικότητα (50% επιτυχής υποκατάσταση), ακολουθούμενο από το χοιράλευρο

(35% επιτυχής υποκατάσταση) και το πετράλευρο (25% επιτυχής υποκατάσταση). Τα επίπεδα αυτά υποκατάστασης είναι πολύ σημαντικά στο να οδηγήσουν τον κλάδο των υδατοκαλλιεργειών στην περαιτέρω μείωση των ιχθυαλεύρων, ιδιαίτερα αν αναλογιστεί κανείς ότι εφαρμόστηκαν στο νεαρό στάδιο ανάπτυξης με αρχικό βάρος 2,27 g έως το τελικό βάρος των 26 g ιχθυδίων τσιπούρας. Η εφαρμογή αυτών των αποτελεσμάτων στην πράξη με τη μείωση αυτή των ιχθυαλεύρων από ΜΖΠ-μη μηρυκαστικών στο σιτηρέσιο των νεαρών ατόμων του μελετηθέντος είδους μπορούν να ενισχύσουν την περιβαλλοντική βιωσιμότητα και την αποδοτικότητα της παραγωγής της, μειώνοντας ταυτόχρονα το κόστος παραγωγής της ιχθυοκαλλιεργητικής προσπάθειας.

Η παρούσα Διδακτορική Διατριβή αποτέλεσε μέρος της Πράξης (Κωδικός ΟΠΣΑΑ: 185372, Κωδικός ΣΑ: 086/8, 2014ΣΕ08680009) με τίτλο «ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΜΕΤΑΠΟΙΗΜΕΝΩΝ ΖΩΙΚΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΣΤΙΣ ΙΧΘΥΟΤΡΟΦΕΣ ΤΗΣ ΤΣΙΠΟΥΡΑΣ (*Sparus aurata*)» που χρηματοδοτήθηκε από την Ειδική Υπηρεσία Διαχείρισης Ε.Π. ΑΛΙΕΙΑΣ (Ε.Π.ΑΛ. 2007-2013) του Υπουργείου Αγροτικής Ανάπτυξης.

Λέξεις – Κλειδιά: τσιπούρα, *Sparus aurata*, ιχθυάλευρο, Μεταποιημένες Ζωικές Προτεΐνες μη μηρυκαστικών, πτηνάλευρο, υδρολυμένο πετράλευρο, χοιράλευρο, ιχθυοκαλλιέργειες, διατροφή, αειφόρες ιχθυοτροφές

ABSTRACT

The aim of the present study was to evaluate the effect of fishmeal protein replacement by poultry by-product meal (PBM), hydrolyzed feather meal (HFM) and porcine meat meal (POM), on growth, feed utilization and proximate composition of gilthead seabream (*Sparus aurata*) juveniles. In total, five feeding trials were conducted in the aquaculture facilities of University of Thessaly. In the first feeding trial, the fishmeal replacement by PBM was investigated at high levels, namely 50% and 100% (total replacement), and then in the second feeding trial lower fishmeal substitution levels were examined, namely 25% and 50% with or without the addition of essential amino acids to the diet. In the third feeding trial, the fishmeal replacement by HFM was investigated at high levels, namely 50% and 100% (total replacement), and then in the second feeding trial lower fishmeal substitution levels were examined, namely 25% and 50% with or without the addition of essential amino acids to the diet. Finally, in the fifth feeding trial, fishmeal replacement by POM was investigated at 25%, 35% and 45% with or without the addition of essential amino acids to the diet.

In the first feeding trial, a total number of 300 juveniles of 2.52 ± 0.25 g mean weight were allocated at 12 glass tanks and fed at satiety for 100 days three isoenergetic (21 MJ/Kg) and isonitrogenous (50% CP) diets at which fishmeal protein of the control diet (FM) was replaced by poultry by-product meal (PBM) at 50%, 100%. At the end of the feeding trial, the results indicated that the replacement of dietary FM protein by PBM at all tested levels significantly ($P < 0.05$) reduced the mean weight, specific growth rate (SGR), protein efficiency ratio (PER), protein and lipid retentions and significantly increased the food conversion ratio (FCR) of fish. Furthermore, the 50% or 100% fishmeal replacement by PBM did not significantly alter the muscle and whole-body proximate composition of fish, other

than the reduced body fat and energy contents observed in fish fed with PBM100 diet. In addition, the incorporation of PBM into the diet, at all tested levels, did not cause histological lesions or any kind of inflammation in intestine of fish, indicating its normal digestion and absorption. Although there was no evidence of steatosis, partial (50%) and much more total (100%) fishmeal replacement by PBM caused mild to moderate hepatic impairment in the histomorphology of sea bream liver.

In the second feeding trial, a total number of 300 juveniles of 2.52 ± 0.25 g mean weight were fed at satiety for 110 days four isoenergetic (21 MJ/Kg) and isonitrogenous (50% CP) diets at which fishmeal protein of the control diet (FM) was replaced by poultry by-product meal (PBM) at 25% (PBM25), at 25% with lysine and methionine supplementation (PBM25+) and at 50% with lysine and methionine supplementation (PBM50+). The results indicated that the replacement of dietary FM protein by PBM at all tested levels did not significantly ($P > 0.05$) affect the mean weight, FCR, SGR, PER, whole body and muscle composition of seabream juveniles (*S. aurata*). The incorporation of PBM into the diet, at all tested levels, did not cause histological lesions or any kind of inflammation in intestine of fish, indicating its normal digestion and absorption. In addition, the liver histomorphology of fish was not affected by fishmeal replacement at 25%, but at 50% there was an increase in lipid vacuolization.

In the third feeding trial, a total number of 300 juveniles of 2.52 ± 0.25 g mean weight were fed at satiety for 100 days, three isoenergetic (21 MJ/Kg) and isonitrogenous (50% CP) diets at which fishmeal protein of the control diet (FM) was replaced by hydrolyzed feather meal (HFM) at 50% and 100%. The results indicated that the replacement of dietary FM protein by HFM at all tested levels significantly reduced survival, feed intake, mean weight, SGR, PER and significantly increased FCR of fish. In addition, 100% fishmeal replacement reduced body fat, proteins and energy contents in fish. Although the intestinal

histomorphology of fish was unaffected there were severe alteration in the liver histomorphology of HFM50 and HFM100 fish.

In the fourth trial, a total number of 300 juveniles of 2.97 ± 0.31 g mean weight were fed at satiety for 110 days four isoenergetic (21 MJ/Kg) and isonitrogenous (50% CP) diets at which fishmeal protein of the control diet (FM) was replaced by hydrolyzed feather meal (HFM) at 25% (HFM25), at 25% with lysine and methionine supplementation (HFM25+) and at 50% with lysine and methionine supplementation (HFM50+). The results showed that HFM25 and HFM25+ successfully replaced dietary fishmeal, but HFM50+ diet significantly reduced fish growth and feed utilization. Body and muscle composition as well as intestinal histomorphology were unaffected by the diet. Fishmeal replacement by HFM at 25% did not affect liver histomorphology, but the HFM50+ diet caused mild alterations and increased lipid vacuolization.

In the fifth feeding trial, juveniles of 2.27 ± 0.20 g mean weight were fed at satiety for 90 days seven isoenergetic (21 MJ/Kg) and isonitrogenous (52% CP) diets at which fishmeal protein of the control diet (FM) was replaced by porcine meal (POM) at 25%, 35%, and 45%, with or without the supplementation of lysine. The results indicated that the replacement of dietary FM protein by POM was successful at 35%, with or without lysine supplementation, while at 45% there was a significant decreased in feed utilization. Muscle and body composition was in general unaffected by the diet.

In conclusion, the findings of the present Ph.D. thesis show that the non-ruminants Processed Animal Proteins, namely poultry by-product meal, hydrolyzed feather meal and porcine meat meal are suitable dietary feedstuffs for *S. aurata* and can successfully replace dietary fishmeal of juveniles without adversely affecting fish performance and feed efficiency. The level of successful fishmeal replacement differs between these terrestrial animal proteins with poultry meal having the best efficiency (50% successful replacement),

followed by porcine meal (35% successful replacement) and feather meal (25% successful replacement). These replacement levels are very important in leading the aquaculture industry to further reduce fishmeal, especially considering that they were applied at the young growth stage (2-50 g) of sea bream (*S. aurata*). The application of these results in industry, by reducing fishmeal with non-ruminant PAPs in the sea bream diet, can enhance the environmental sustainability and efficiency of its production, while reducing the production cost of the aquaculture operation.

Keywords: sea bream, *Sparus aurata*, fishmeal replacement, poultry meal, hydrolyzed feather meal, porcine meal, aquaculture, nutrition, sustainable aquafeeds.

Δημοσιεύσεις/ανακοινώσεις διδακτορικής διατριβής:

Σε επιστημονικά περιοδικά

- **Psofakis P.**, Meziti A., Berillis P., Mente E., Kormas K.A., Karapanagiotidis I.T. (2021). Effects of dietary fishmeal replacement by poultry by-product meal and hydrolyzed feather meal on liver and intestinal histomorphology and on intestinal microbiota of gilthead seabream (*Sparus aurata*). Appl. Sci. 11, 8806. <https://doi.org/10.3390/app11198806>
- **Psofakis P.**, Karapanagiotidis I.T., Malandrakis E.E., Golomazou E., Exadactylos A., Mente E. (2020). Effect of fishmeal replacement by hydrolyzed feather meal on growth performance, proximate composition, digestive enzyme activity, haematological parameters and growth-related gene expression of gilthead seabream (*Sparus aurata*), Aquaculture 521, 735006.
- Karapanagiotidis I.T., **Psofakis P.**, Mente E., Malandrakis E., Golomazou E. (2019). Effect of fishmeal replacement by poultry by-product meal on growth performance, proximate composition, digestive enzyme activity, haematological parameters and gene expression of gilthead seabream (*Sparus aurata*). Aquaculture Nutrition 25: 3-14

Ανακοινώσεις σε διεθνή/εθνικά συνέδρια

- **Psofakis P.**, Vogiatzis I., Kontotolis S., Kazopidi E., Kipreou H., Tsihchlis I., Tziantziou L., Karapanagiotidis I.T. (2018). The effect of fishmeal replacement by porcine meal on the proximate composition of gilthead seabream (*Sparus aurata*). Proceedings of the 3rd International Congress on Applied & Aquatic Environment (HydroMediT 2018), pp. 645-646.
- **Psofakis P.**, Berillis P., Karapanagiotidis I.T. (2016). The effect of poultry meal and hydrolyzed feathermeal on liver and intestinal morphology in the diet of gilthead seabream (*Sparus aurata*). HYDROMERIT 2016, 2nd International Congress of Applied Ichthyology and Aquatic Environment, 10-12 November, Messolonghi, Greece
- **Psofakis P.**, Daskalopoulou E., Vogiatzis I., Alexiou K., Mastora A., Kindinis K., Tziantziou L., Karapanagiotidis I.T. (2016). Replacement of fishmeal with hydrolysed feathermeal on the diet of gilthead seabream (*Sparus aurata*). HYDROMERIT 2016, 2nd International Congress of Applied Ichthyology and Aquatic Environment, 10-12 November, Messolonghi, Greece.

- **Psofakis P.**, Daskalopoulou E., Theodorou A., Mente E., Karapanagiotidis I.T. (2015). Effect of replacing fishmeal with poultry meal and hydrolysed feather meal on growth and feed efficiency of gilthead seabream (*Sparus aurata*). European Aquaculture Society, Rotterdam, The Netherlands, 20-23 October.
- **Ψωφάκης Π.**, Δασκαλοπούλου Ε., Θεοδώρου Α., Βογιατζής Ι., Αλεξίου Κ., Μαστορά Α., Κινδύνης Κ., Καραπαναγιωτίδης Ι. (2015). Αντικατάσταση του ιχθυαλεύρου με άλευρο πουλερικών και υδρολυμένο πτεράλευρο στο σιτηρέσιο της τσιπούρας (*Sparus aurata*). 30ο Ετήσιο Επιστημονικό Συνέδριο της Ελληνικής Ζωοτεχνικής Εταιρείας (Ε.Ζ.Ε.), Γιαννιτσά 14-16 Οκτωβρίου, σελ. 77-78.
- **Ψωφάκης Π.**, Δασκαλοπούλου Ε., Βογιατζής Ι., Αλεξίου Κ., Μάστορα Α., Κινδύνης Κ., Τζιάντζιου Α., Καραπαναγιωτίδης Ι. (2016). Αντικατάσταση του ιχθυαλεύρου με άλευρο πουλερικών στο σιτηρέσιο της τσιπούρας (*Sparus aurata*). 31ο Ετήσιο Επιστημονικό Συνέδριο της Ελληνικής Ζωοτεχνικής Εταιρείας (Ε.Ζ.Ε.), Σέρρες 7-7 Οκτωβρίου, σελ. 81-82.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

	ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. ΓΕΝΙΚΗ ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
1.1	Γενικά	1
1.2	Στοιχεία παγκόσμιας και ελληνικής υδατοκαλλιέργειας	3
1.3	Εκτροφή τσιπούρας (<i>Sparus aurata</i>)	5
1.4	Διατροφικές απαιτήσεις της τσιπούρας	7
1.5	Ιχθυάλευρα και εναλλακτικές των ιχθυαλεύρων πηγές πρωτεϊνών στις ιχθυοτροφές	10
1.6	Η χρήση Μεταποιημένων Ζωικών Πρωτεϊνών μη μηρυκαστικών στις ιχθυοτροφές	18
1.6.1	Άλευρο υποπροϊόντων πουλερικών	21
1.6.2	Υδρολυμένο πτεράλευρο	23
1.6.3	Άλευρο υποπροϊόντων χοίρων	24
1.7	Μεταβολικές επιδράσεις της αντικατάστασης του ιχθυαλεύρου από ΜΖΠ μη μηρυκαστικών στη θρεπτική σύσταση και στην ηπατική και εντερική ιστομορφολογία των ιχθύων	25
1.8	Σκοπός διδακτορικής διατριβής	29
	ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	31
2.1	Πειραματικά σιτηρέσια και παρασκευή ιχθυοτροφών	31
2.2	Συνθήκες εκτροφής των ιχθυδίων	33
2.3	Δειγματοληψίες	35
2.4	Αναλύσεις θρεπτικής σύστασης	37
2.4.1	Προσδιορισμός υγρασίας / ξηρής ουσίας	37
2.4.2	Προσδιορισμός ολικών λιπαρών ουσιών	37
2.4.3	Προσδιορισμός ολικών αζωτούχων ενώσεων	39
2.4.4	Προσδιορισμός ολικής ανόργανης ουσίας	41
2.4.5	Προσδιορισμός ολικής ενέργειας	42
2.4.6	Προσδιορισμός αμινοξέων	42
2.5	Παράμετροι ανάπτυξης των ιχθυδίων και αξιοποίησης της τροφής	44
2.5.1	Επιβίωση των ιχθυδίων	44
2.5.2	Αύξηση σωματικού βάρους των ιχθυδίων	44
2.5.3	Πρόσληψη τροφής	44
2.5.4	Ειδικός ρυθμός ανάπτυξης	45
2.5.5	Συντελεστής μετατρεψιμότητας της τροφής	45
2.5.6	Οικονομικότητα σιτηρεσίου	45
2.5.7	Συντελεστής αποδοτικότητας πρωτεϊνών	46
2.5.8	Συντελεστής κατακράτησης πρωτεΐνης	46
2.5.9	Συντελεστής κατακράτησης λίπους	47
2.5.10	Σωματομετρικοί δείκτες	47
2.6	Ιστολογική εξέταση	48
2.7	Στατιστική ανάλυση	52
	ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ	53
	Αντικατάσταση του ιχθυαλεύρου από πτηνάλευρο στο σιτηρέσιο των ιχθυδίων τσιπούρας (<i>Sparus aurata</i>)	
3.1	Εισαγωγή	53
3.2	1 ^ο διατροφικό πείραμα – μερική (50%) και ολική (100%) αντικατάσταση ιχθυαλεύρου από άλευρο υποπροϊόντων πουλερικών	54
3.2.1	Πειραματικά σιτηρέσια και συνθήκες εκτροφής	54

3.2.2	Αποτελέσματα	57
3.2.2.1	Παράμετροι ανάπτυξης ιχθυδίων και αξιοποίησης τροφής	57
3.2.2.2	Θρεπτική σύσταση των ιχθυδίων	61
3.2.2.3	Ιστολογική εξέταση των ιχθυδίων	63
3.3	2 ^ο διατροφικό πείραμα – μερική (25% και 50%) αντικατάσταση ιχθυαλεύρου από άλευρο υποπροϊόντων πουλερικών με ταυτόχρονη εξισορρόπηση σε αμινοξέα	68
3.3.1	Πειραματικά σιτηρέσια και συνθήκες εκτροφής	68
3.3.2	Αποτελέσματα	71
3.3.2.1	Παράμετροι ανάπτυξης των ιχθυδίων και αξιοποίησης τροφής	71
3.3.2.2	Θρεπτική σύσταση των ιχθυδίων	74
3.3.2.3	Ιστολογική εξέταση των ιχθυδίων	75
3.4	Συζήτηση	78
3.5	Συμπεράσματα	91

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ 93

Αντικατάσταση του ιχθυαλεύρου από υδρολυμένο πτεράλευρο στο σιτηρέσιο της τσιπούρας (*Sparus aurata*)

4.1	Εισαγωγή	93
4.2	3 ^ο διατροφικό πείραμα – μερική (50%) και ολική (100%) αντικατάσταση ιχθυαλεύρου από υδρολυμένο πτεράλευρο	94
4.2.1	Πειραματικά σιτηρέσια και συνθήκες εκτροφής	94
4.2.2	Αποτελέσματα	97
4.2.2.1	Παράμετροι ανάπτυξης των ιχθυδίων και αξιοποίησης τροφής	97
4.2.2.2	Θρεπτική σύσταση ιχθυδίων	101
4.2.2.3	Ιστολογική εξέταση ιχθυδίων	102
4.3	4 ^ο διατροφικό πείραμα – μερική (25% και 50%) αντικατάσταση ιχθυαλεύρου από υδρολυμένο πτεράλευρο με ταυτόχρονη εξισορρόπηση σε αμινοξέα	106
4.3.1	Πειραματικά σιτηρέσια και συνθήκες εκτροφής	106
4.3.2	Αποτελέσματα	109
4.3.2.1	Παράμετροι ανάπτυξης των ιχθυδίων και αξιοποίησης τροφής	109
4.3.2.2	Θρεπτική σύσταση των ιχθυδίων	112
4.3.2.3	Ιστολογική εξέταση των ιχθυδίων	113
4.4	Συζήτηση	115
4.5	Συμπεράσματα	126

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ 128

Αντικατάσταση του ιχθυαλεύρου από άλευρο χοίρων στο σιτηρέσιο της τσιπούρας (*Sparus aurata*)

5.1	Εισαγωγή	128
5.2	5 ^ο διατροφικό πείραμα – αντικατάσταση ιχθυαλεύρου από άλευρο χοίρων	128
5.2.1	Πειραματικά σιτηρέσια και συνθήκες εκτροφής	128
5.2.2	Αποτελέσματα	132
5.2.2.1	Παράμετροι ανάπτυξης των ιχθυδίων και αξιοποίησης τροφής	132
5.2.2.2	Θρεπτική σύσταση των ιχθυδίων	134
5.3	Συζήτηση	139
5.4	Συμπεράσματα	147

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6. Γενικά συμπεράσματα	148
Βιβλιογραφία	152
Παράρτημα	175

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

1.1	Χαρακτηριστικές ποσοτικές διατροφικές απαιτήσεις (% της τροφής) της τσιπούρας στα στάδια του ιχθυδίου (προπάχυνσης) και ενήλικου ατόμου (κύρια πάχυνσης).	8
1.2	Ποσοτικές διατροφικές απαιτήσεις σε απαραίτητα και ημι-απαραίτητα αμινοξέα, και λιπαρά οξέα στη διατροφή της τσιπούρας.	9
1.3	Ενδεικτικά προτεινόμενα επίπεδα βιταμινών και ανόργανων στοιχείων σε εναρκτήρια σιτηρέσια, σιτηρέσια κύριας εκτροφής και γεννητόρων τσιπούρας (ποσότητες/Kg τροφής με 10% υγρασία).	10
1.4	Χαρακτηριστικά επίπεδα συμμετοχής των ιχθυαλεύρων στις ιχθυοτροφές διαφόρων εκτρεφόμενων ειδών, όπως εφαρμόζονταν το 2000 (Tacon & Metian 2008).	12
1.5	Χαρακτηριστική θρεπτική σύσταση (% επί ξηρής ουσίας) και προφίλ αμινοξέων (% πρωτεϊνών) του ιχθυαλεύρου, του αλεύρου υποπροϊόντων πουλερικών (πτηνάλευρο), του υδρολυμένου πτεραλεύρου και του χοιραλεύρου.	22
2.1	Θρεπτική σύσταση (% ως έχει) και προφίλ αμινοξέων (% πρωτεΐνης) του ιχθυαλεύρου, του αλεύρου υποπροϊόντων πουλερικών (πτηνάλευρο), του υδρολυμένου πτεραλεύρου και του αλεύρου υποπροϊόντων χοίρων (χοιράλευρο), που χρησιμοποιήθηκαν στις πειραματικές ιχθυοτροφές.	32
2.2	Πρωτόκολλο αφυδάτωσης, διαύγασης και εγκλισμού σε παραφίνη.	49
3.1	Καταρτισμός σιτηρεσίων και θρεπτική σύσταση πειραματικών ιχθυοτροφών που χρησιμοποιήθηκαν για τη μερική (50%) και ολική (100%) αντικατάσταση του ιχθυαλεύρου από πτηνάλευρο (1ο διατροφικό πείραμα).	55
3.2	Σύσταση σε αμινοξέα (% πρωτεΐνης) των πειραματικών ιχθυοτροφών που χρησιμοποιήθηκαν για τη μερική (50%) και ολική (100%) αντικατάσταση του ιχθυαλεύρου από πτηνάλευρο (1° διατροφικό πείραμα).	56
3.3	Παράμετροι ανάπτυξης των ιχθυδίων τσιπούρας (<i>S. aurata</i>) διατρεφόμενα με ιχθυοτροφές που χρησιμοποιήθηκαν για τη μερική (50%) και ολική (100%) αντικατάσταση του ιχθυαλεύρου από πτηνάλευρο (1° διατροφικό πείραμα), έπειτα από 30 ημέρες εκτροφής.	58
3.4	Παράμετροι ανάπτυξης των ιχθυδίων τσιπούρας (<i>S. aurata</i>) διατρεφόμενα με ιχθυοτροφές που χρησιμοποιήθηκαν για τη μερική (50%) και ολική (100%) αντικατάσταση του ιχθυαλεύρου από πτηνάλευρο (1° διατροφικό πείραμα), έπειτα από 60 ημέρες εκτροφής.	58
3.5	Παράμετροι ανάπτυξης, αξιοποίησης τροφής, οικονομικότητας σιτηρεσίου και μορφομετρικά χαρακτηριστικά των ιχθυδίων τσιπούρας διατρεφόμενοι με ιχθυοτροφές που χρησιμοποιήθηκαν για τη μερική (50%) και ολική (100%) αντικατάσταση του ιχθυαλεύρου από πτηνάλευρο (1° διατροφικό πείραμα), έπειτα από 100 ημέρες εκτροφής.	59
3.6	Θρεπτική σύσταση (% επί της ξηρής ουσίας δείγματος) ολόκληρου σώματος, του μυϊκού ιστού και του ήπατος των ιχθυδίων που χρησιμοποιήθηκαν για τη μερική (50%) και ολική (100%) αντικατάσταση του ιχθυαλεύρου από πτηνάλευρο (1° διατροφικό πείραμα).	62
3.7	Βαθμολογία ιστολογικής αλλοίωσης του ήπατος και του εντέρου των ιχθυδίων	63

	του 1 ^{ου} διατροφικού πειράματος.	
3.8	Καταρτισμός σιτηρεσίων και θρεπτική σύσταση πειραματικών ιχθυοτροφών που χρησιμοποιήθηκαν για τη μερική (25% και 50%) αντικατάσταση του ιχθυαλεύρου από πτηνάλευρο με ταυτόχρονη εξισορρόπηση σε αμινοξέα (2 ^ο διατροφικό πείραμα).	69
3.9	Σύσταση σε αμινοξέα (% πρωτεΐνης) των πειραματικών ιχθυοτροφών που χρησιμοποιήθηκαν για τη μερική (25% και 50%) αντικατάσταση του ιχθυαλεύρου από πτηνάλευρο με ταυτόχρονη εξισορρόπηση σε αμινοξέα (2 ^ο διατροφικό πείραμα).	70
3.10	Παράμετροι ανάπτυξης των ιχθυδίων τσιπούρας διατρεφόμενοι με ιχθυοτροφές που χρησιμοποιήθηκαν για τη μερική (25% και 50%) αντικατάσταση του ιχθυαλεύρου από πτηνάλευρο με ταυτόχρονη εξισορρόπηση σε αμινοξέα (2 ^ο διατροφικό πείραμα), έπειτα από 30 ημέρες εκτροφής.	72
3.11	Παράμετροι ανάπτυξης των ιχθυδίων τσιπούρας διατρεφόμενοι με ιχθυοτροφές που χρησιμοποιήθηκαν για τη μερική (25% και 50%) αντικατάσταση του ιχθυαλεύρου από πτηνάλευρο με ταυτόχρονη εξισορρόπηση σε αμινοξέα (2 ^ο διατροφικό πείραμα), έπειτα από 60 ημέρες εκτροφής.	72
3.12	Παράμετροι ανάπτυξης, αξιοποίησης τροφής, οικονομικότητας σιτηρεσίου και μορφομετρικοί παράμετροι των ιχθυδίων τσιπούρας (<i>S. aurata</i>) διατρεφόμενοι με ιχθυοτροφές που χρησιμοποιήθηκαν για τη μερική (25% και 50%) αντικατάσταση του ιχθυαλεύρου από πτηνάλευρο με ταυτόχρονη εξισορρόπηση σε αμινοξέα (2 ^ο διατροφικό πείραμα), έπειτα από 110 ημέρες εκτροφής.	73
3.13	Θρεπτική σύσταση (% επί της ξηρής ουσίας δείγματος) ολόκληρου σώματος, του μυϊκού ιστού και του ήπατος των ιχθύων που χρησιμοποιήθηκαν για τη μερική (25% και 50%) αντικατάσταση του ιχθυαλεύρου από πτηνάλευρο με ταυτόχρονη εξισορρόπηση σε αμινοξέα (2 ^ο διατροφικό πείραμα).	74
3.14	Βαθμολογία ιστολογικής αλλοίωσης του ήπατος και του εντέρου των ιχθυδίων του 2 ^{ου} διατροφικού πειράματος	75
4.1	Καταρτισμός σιτηρεσίων και θρεπτική σύσταση πειραματικών ιχθυοτροφών που χρησιμοποιήθηκαν για τη μερική (50%) και ολική (100%) αντικατάσταση του ιχθυαλεύρου από υδρολυμένο πτεράλευρο (3ο διατροφικό πείραμα).	95
4.2	Σύσταση σε αμινοξέα (% πρωτεΐνης) των πειραματικών ιχθυοτροφών που χρησιμοποιήθηκαν για τη μερική (50%) και ολική (100%) αντικατάσταση του ιχθυαλεύρου από υδρολυμένο πτεράλευρο (3 ^ο διατροφικό πείραμα).	96
4.3	Παράμετροι ανάπτυξης ιχθυδίων τσιπούρας (<i>S. aurata</i>) διατρεφόμενοι με ιχθυοτροφές που χρησιμοποιήθηκαν για τη μερική (50%) και ολική (100%) αντικατάσταση του ιχθυαλεύρου από του υδρολυμένο πτεράλευρο (3 ^ο διατροφικό πείραμα), έπειτα από 30 ημέρες εκτροφής.	97
4.4	Παράμετροι ανάπτυξης ιχθυδίων τσιπούρας (<i>S. aurata</i>) διατρεφόμενοι με ιχθυοτροφές που χρησιμοποιήθηκαν για την υψηλή αντικατάσταση του ιχθυαλεύρου από υδρολυμένο πτεράλευρο (3ο διατροφικό πείραμα), έπειτα από 60 ημέρες εκτροφής.	98
4.5	Παράμετροι ανάπτυξης, αξιοποίησης τροφής, οικονομικότητας σιτηρεσίου και μορφομετρικοί παράμετροι ιχθυδίων τσιπούρας (<i>S. aurata</i>) διατρεφόμενοι με ιχθυοτροφές που χρησιμοποιήθηκαν για τη μερική (50%) και ολική (100%) αντικατάσταση του ιχθυαλεύρου από υδρολυμένο πτεράλευρο (3 ^ο διατροφικό πείραμα), έπειτα από 100 ημέρες εκτροφής.	99
4.6	Θρεπτική σύσταση (% επί της ξηρής ουσίας δείγματος) ολόκληρου σώματος, του μυϊκού ιστού και του ήπατος των ιχθυδίων που χρησιμοποιήθηκαν για τη μερική (50%) και ολική (100%) αντικατάσταση του ιχθυαλεύρου από πτεράλευρο (3 ^ο διατροφικό πείραμα).	101

4.7	Βαθμολογία ιστολογικής αλλοίωσης του ήπατος και του εντέρου των ιχθυδίων του 3 ^{ου} διατροφικού πειράματος.	103
4.8	Καταρτισμός σιτηρεσίων και θρεπτική σύσταση πειραματικών ιχθυοτροφών που χρησιμοποιήθηκαν για την μερική (25% και 50%) αντικατάσταση του ιχθυαλεύρου από υδρολυμένο πετράλευρο με ταυτόχρονη εξισορρόπηση σε αμινοξέα (4 ^ο διατροφικό πείραμα).	107
4.9	Σύσταση σε αμινοξέα (% πρωτεΐνης) των πειραματικών ιχθυοτροφών που χρησιμοποιήθηκαν για τη μερική (25% και 50%) αντικατάσταση του ιχθυαλεύρου από υδρολυμένο πετράλευρο με ταυτόχρονη εξισορρόπηση σε αμινοξέα (4 ^ο διατροφικό πείραμα).	108
4.10	Παράμετροι ανάπτυξης ιχθυδίων τσιπούρας (<i>S. aurata</i>) διατρεφόμενοι με ιχθυοτροφές που χρησιμοποιήθηκαν για τη μερική (25% και 50%) αντικατάσταση του ιχθυαλεύρου από υδρολυμένο πετράλευρο με ταυτόχρονη εξισορρόπηση σε αμινοξέα (4 ^ο διατροφικό πείραμα), έπειτα από 30 ημέρες εκτροφής.	110
4.11	Παράμετροι ανάπτυξης ιχθυδίων τσιπούρας (<i>S. aurata</i>) διατρεφόμενοι με ιχθυοτροφές που χρησιμοποιήθηκαν για τη μερική (25% και 50%) αντικατάσταση του ιχθυαλεύρου από υδρολυμένο πετράλευρο με ταυτόχρονη εξισορρόπηση σε αμινοξέα (4 ^ο διατροφικό πείραμα), έπειτα από 60 ημέρες εκτροφής.	110
4.12	Παράμετροι ανάπτυξης, αξιοποίησης τροφής, οικονομικότητας σιτηρεσίου και μορφομετρικοί παράμετροι ιχθυδίων τσιπούρας (<i>S. aurata</i>) διατρεφόμενοι με ιχθυοτροφές που χρησιμοποιήθηκαν για τη μερική (25% και 50%) αντικατάσταση του ιχθυαλεύρου από υδρολυμένο πετράλευρο με ταυτόχρονη εξισορρόπηση σε αμινοξέα (4 ^ο διατροφικό πείραμα), έπειτα από 110 ημέρες εκτροφής.	111
4.13	Θρεπτική σύσταση (% επί της ξηρής ουσίας δείγματος) ολόκληρου σώματος, του μυϊκού ιστού και του ήπατος των ιχθυδίων που χρησιμοποιήθηκαν για τη μερική (25% και 50%) αντικατάσταση του ιχθυαλεύρου από υδρολυμένο πετράλευρο με ταυτόχρονη εξισορρόπηση σε αμινοξέα (4 ^ο διατροφικό πείραμα).	112
4.14	Βαθμολογία ιστολογικής αλλοίωσης του ήπατος και του εντέρου των ιχθυδίων του 4 ^{ου} διατροφικού πειράματος.	113
5.1	Συστατικά και θρεπτική σύσταση (% επί της νωπής ουσίας) των πειραματικών σιτηρεσίων που χρησιμοποιήθηκαν για την αντικατάσταση του ιχθυαλεύρου από χοιράλευρο (5 ^ο διατροφικό πείραμα).	130
5.2	Εκτιμήσεις του προφίλ αμινοξέων (% της τροφής) των πειραματικών σιτηρεσίων.	131
5.3	Παράμετροι ανάπτυξης ιχθυδίων τσιπούρας (<i>S. aurata</i>) διατρεφόμενοι με ιχθυοτροφές που χρησιμοποιήθηκαν για την αντικατάσταση του ιχθυαλεύρου από χοιράλευρο (5 ^ο διατροφικό πείραμα), έπειτα από 30 ημέρες εκτροφής.	135
5.4	Παράμετροι ανάπτυξης ιχθυδίων τσιπούρας (<i>S. aurata</i>) διατρεφόμενοι με ιχθυοτροφές που χρησιμοποιήθηκαν για την αντικατάσταση του ιχθυαλεύρου από χοιράλευρο (5 ^ο διατροφικό πείραμα), έπειτα από 60 ημέρες εκτροφής.	136
5.5	Παράμετροι ανάπτυξης ιχθυδίων τσιπούρας (<i>S. aurata</i>) διατρεφόμενοι με ιχθυοτροφές που χρησιμοποιήθηκαν για την αντικατάσταση του ιχθυαλεύρου από χοιράλευρο (5 ^ο διατροφικό πείραμα), έπειτα από 90 ημέρες εκτροφής.	137
5.6	Θρεπτική σύσταση (% επί της ξηρής ουσίας δείγματος) ολόκληρου σώματος και του μυϊκού ιστού ιχθυδίων τσιπούρας (<i>S. aurata</i>) διατρεφόμενοι με ιχθυοτροφές που χρησιμοποιήθηκαν για την αντικατάσταση του ιχθυαλεύρου	138

από χοιράλευρο (5^ο διατροφικό πείραμα).

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

1.1	Παγκόσμια παραγωγή ιχθυαλεύρων από αλιεία (ολόκληρα αλιευμένα ψάρια) και από υποπροϊόντα της μεταποίησης (υπολείμματα ψαριών) και μελλοντική εκτίμηση αυτής. Πηγή: FAO (2020)	14
2.1	Πελλετομηχανή τύπου California Pellet Mill CL-2	34
2.2	Κλειστό σύστημα εκτροφής	35
2.3	Συσκευή εκχύλισης λίπους	38
2.4	Συσκευή πέψης	40
2.5	Συσκευή απόσταξης	40
2.6	Συσκευή αποτέφρωσης	41
2.7	Αδιαβατικό θερμιδόμετρο	42
2.8	Εξοπλισμός ιστολογίας	51
2.9	Οπτικό μικροσκόπιο με κάμερα υψηλής ανάλυσης από την αίθουσα μικροσκοπίας του Τμήματος Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος του Π.Θ	52
3.1	Φυσιολογική ιστολογική εικόνα ήπατος της ομάδας του μάρτυρα (FM)	64
3.2	Ιστολογική τομή ήπατος ιχθυδίων τσιπούρας που διατράφηκε με την PBM50 τροφή. Ύπαρξη φλεγμονής με παρουσία υγρού και λευκοκυττάρων.	64
3.3	Ιστολογικές τομές ήπατος ιχθυδίων τσιπούρας που διατράφηκε με την PBM50 τροφή. Μεσαίου μεγέθους λιποσταγονίδια και μερική μετατόπιση του πυρήνα των ηπατοκυττάρων	65
3.4	Αρκετά λιποσταγονίδια μεσαίου μεγέθους στην ομάδα (PBM100)	66
3.5	Αρκετά λιποσταγονίδια μεσαίου μεγέθους και εκφύλιση ηπατοκυττάρων στην ομάδα (PBM100)	66
3.6	Ιστολογική τομή εντέρου τσιπούρας που διατράφηκε με την FM (αριστερά) και PBM100 (δεξιά) τροφή. Φυσιολογική ιστολογική εικόνα με ευδιάκριτα εντεροκύτταρα και βλεννοπαραγωγά κύτταρα	67
3.7	Φυσιολογική ιστολογική εικόνα ήπατος της ομάδας του μάρτυρα (FM)	76
3.8	Φυσιολογική ιστολογική εικόνα ήπατος της ομάδας PBM25+	77
3.9	Μεσαία λιποσταγονίδια με μετατοπισμένους τους πυρήνες, σε ήπαρ της ομάδας PBM50+	77
3.10	Φυσιολογική ιστολογική εικόνα εντέρου ιχθυδίων της ομάδας PBM50+	77
4.1	Φυσιολογική ιστολογική εικόνα ήπατος της ομάδας του μάρτυρα FM	103
4.2	Λιποσταγονίδια μεγάλου μεγέθους με ενδείξεις νέκρωσης των παγκρεατικών νησιδίων στα ηπατοκύτταρα της ομάδας HFM50 (αριστερά) και HFM100 (δεξιά)	104
4.3	Λιποσταγονίδια μεγάλου μεγέθους (αριστερά) και κύρωση ήπατος (δεξιά) στο ήπαρ της ομάδας HFM100	104
4.4	Αιμορραγίες στα ηπατοκύτταρα της ομάδας HFM50 (αριστερά) και HFM100 (δεξιά)	104
4.5	Ιστολογική τομή εντέρου ιχθυδίων τσιπούρας της ομάδας FM (αριστερά) και HFM50 (δεξιά). Φυσιολογική ιστολογική εικόνα με ευδιάκριτα εντεροκύτταρα και βλεννοπαραγωγά κύτταρα	105
4.6	Φυσιολογική ιστολογική εικόνα ήπατος της ομάδας του μάρτυρα FM	114
4.7	Φυσιολογική ιστολογική εικόνα ήπατος των ιχθυδίων HFM25 (αριστερά) και HFM25+ (δεξιά)	114

- 4.8 Λιποσταγονιδία μεγάλου μεγέθους στο ήπαρ των ιχθυδίων της ομάδας HFM50+ 114
- 4.9 Φυσιολογική ιστολογική εικόνα εντέρου των ιχθυδίων της ομάδας FM (αριστερά) και HFM50+ (δεξιά) 115

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

ECR - Economic Conversion Ratio (οικονομικός συντελεστής μετατρεψιμότητας τροφής)

FCR – Food Conversion Ratio (συντελεστής μετατρεψιμότητας τροφής)

FM – Fishmeal (ιχθυάλευρο)

HFM – Hydrolyzed Feather Meal (υδρολυμένο πτεράλευρο)

HSI - Hepatosomatix index (ηπατοσωματικός δείκτης)

PBM – Poultry By-product Meal (υποπροϊόντα πουλερικών – πτηνάλευρο)

PER - Protein Efficiency Ratio (συντελεστής αποδοτικότητας των πρωτεϊνών)

POM- Porcine meal (χοιράλευρο)

SGR - Specific Growth Rate (ημερήσιος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης)

VSI - Viscerosomatic index (ενδοσπλαχνικός δείκτης)

MZΠ – Μεταποιημένες Ζωικές Πρωτεΐνες μη μηρυκαστικών

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. ΓΕΝΙΚΗ ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Γενικά

Ο διαρκώς αυξανόμενος ανθρώπινος πληθυσμός επιζητεί όλο και περισσότερα τρόφιμα διαθέτοντας, ωστόσο, περιορισμένους φυσικούς πόρους. Τα ψάρια πάντοτε αποτελούσαν ένα σημαντικό μέρος μιας ισορροπημένης και υγιεινής ανθρώπινης διατροφής λόγω της υψηλής θρεπτικής τους αξίας (Karapanagiotidis 2017). Λαμβάνοντας υπόψη τη στασιμότητα της παραγωγής των φυσικών ιχθυοπροϊόντων, οι υδατοκαλλιέργειες διαδραματίζουν ολοένα και σημαντικότερο ρόλο στην προσφορά ψαριών για τον άνθρωπο (Huss 1995, FAO/WHO 2010, FAO 2020). Η ιχθυοκαλλιεργητική παραγωγή αυξήθηκε ραγδαία από τις αρχές της δεκαετίας του 80' και αποτελεί σήμερα τον ταχύτερα αναπτυσσόμενο κλάδο ζωικής παραγωγής (FAO 2020). Η συνεχής αύξηση της ιχθυοκαλλιεργητικής παραγωγής και η εντατικοποίηση του τομέα έχει ως αποτέλεσμα την αυξανόμενη ζήτηση για πλήρεις, βιομηχανικά παρασκευαζόμενες, ιχθυοτροφές.

Πέραν των πολλών προβλημάτων που έχει να επιλύσει σήμερα ο τομέας, ένα από τα σημαντικότερα ζητήματα που απειλεί την περαιτέρω ανάπτυξή του, αλλά και την ίδια τη βιωσιμότητά του, είναι η εξάρτησή του από τα ιχθυάλευρα που αποτελούν την κύρια πρωτεϊνική πηγή των βιομηχανικά παρασκευασμένων ιχθυοτροφών. Η παγκόσμια παραγωγή ιχθυαλεύρων ανέρχεται περίπου σε 6 εκατομμύρια τόνους ετησίως (FAO 2020), παραμένοντας στάσιμη εδώ και τρεις δεκαετίες, με την τιμή τους συνεχώς να αυξάνει (Jannathulla *et al.* 2019), αυξάνοντας παράλληλα το κόστος διατροφής των εκτρεφόμενων ιχθύων και κατά συνέπεια το κόστος της ιχθυοκαλλιεργητικής παραγωγής (Hernández *et al.* 2014, Καραπαναγιωτίδης 2018, FAO 2020).

Εδώ και δύο δεκαετίες ο τομέας χρησιμοποιεί επιτυχώς τις χερσαίες φυτικές πρωτεΐνες ως υποκατάστατα συστατικά των ιχθυαλεύρων στις ιχθυοτροφές των κυριότερων εκτρεφόμενων ιχθύων (ανασκόπηση από Bell & Waagbø 2008). Ωστόσο, προκειμένου οι

ιχθυοκαλλιέργειες να συνεχίσουν να αναπτύσσονται και να παράγουν αειφορικά, θα πρέπει ο τομέας να συνεχίσει την εξεύρεση νέων και αξιόπιστων εναλλακτικών του ιχθυαλεύρου συστατικών των ιχθυοτροφών. Οι «Μεταποιημένες Ζωικές Πρωτεΐνες μη μηρυκαστικών (ΜΖΠ)» αποτελούν υποψήφιες εναλλακτικές πηγές πρωτεϊνών, λαμβάνοντας υπόψη ότι διαθέτουν υψηλή θρεπτική αξία (Nengas *et al.* 1999, Hernández *et al.* 2010, Zhou *et al.* 2011, Yu *et al.* 2013, Karapanagiotidis 2014, González-Rodríguez *et al.* 2016, Zapata *et al.* 2016, Karapanagiotidis *et al.* 2019), είναι διαθέσιμες στην αγορά και σε τιμή χαμηλότερη των ιχθυαλεύρων, όπως και πολλών φυτικών αλεύρων και επιπροσθέτως η αξιοποίησή τους στις ιχθυοτροφές εμπεριέχει στοιχεία ανακύκλωσης στην τροφική αλυσίδα του ανθρώπου, αλλά και μείωσης του περιβαλλοντικού αποτυπώματος της ιχθυοκαλλιέργειας (den Hartog & Sijtsma, 2013, Maiolo *et al.* 2021).

Στο πρόσφατο παρελθόν, υπήρξε μία έντονη ανησυχία σε κοινωνικό και πολιτικό επίπεδο ως προς την ασφαλή χρησιμοποίηση συστατικών ζωικής προέλευσης στις ζωοτροφές γενικότερα, λόγω των κρουσμάτων σπογγώδους εγκεφαλοπάθειας των βοοειδών εντός της Ευρωπαϊκής Ένωσης (Ε.Ε.). Το 2001 η Ε.Ε. προέβη στην καθολική απαγόρευση χρησιμοποίησης μεταποιημένων ζωικών πρωτεϊνών από χερσαία θηλαστικά στις ζωοτροφές όλων των εκτρεφόμενων ζώων (ΕΕ/999/2001). Το 2011 ο Ευρωπαϊκός Οργανισμός για την Ασφάλεια Τροφίμων (EFSA) ανακοίνωσε πως η χρησιμοποίηση των ΜΖΠ στις τροφές μη μηρυκαστικών ζώων παρουσιάζει αμελητέο κίνδυνο για την ανθρώπινη υγεία (EFSA 2011). Από την 1η Ιουνίου 2013, σύμφωνα με τον Ευρωπαϊκό Κανονισμό 56/2013, έγινε άρση της απαγόρευσης διατροφής των ζώων υδατοκαλλιέργειας με ΜΖΠ μη μηρυκαστικών ζώων.

Η εκ νέου εισαγωγή των ΜΖΠ μη μηρυκαστικών ζώων στις ιχθυοκαλλιέργειες εκτιμάται ότι θα ενισχύσει τη βιωσιμότητα και την αειφορία του τομέα μέσω της περαιτέρω μείωσης της εξάρτησης του τομέα από τα ιχθυάλευρα και τη μείωση του κόστους παραγωγής (Karapanagiotidis 2014, Hu *et al.* 2013, Aragao *et al.* 2020, Hodar *et al.* 2020). Ταυτόχρονα,

η χρήση των προϊόντων αυτών θα συνεισφέρει στην αειφορική διαχείριση των φυσικών αλιευτικών αποθεμάτων μέσω της μείωσης της αλιευτικής πίεσης σε αυτά (Karapanagiotidis 2014, Aragao *et al.* 2020, Hodar *et al.* 2020) και θα ενισχύσει την οικολογική αποδοτικότητα των ιχθυοκαλλιεργειών μιας και το οικολογικό αποτύπωμα της παραγωγής τους θεωρείται μικρότερο από εκείνο των ιχθυαλεύρων (den Hartog & Sijtsma 2013, Maiolo *et al.* 2021).

Λαμβάνοντας υπόψη την παραπάνω ανάλυση, η παρούσα διδακτορική διατριβή αποσκοπεί να διαφωτίσει τον τομέα των ιχθυοκαλλιεργειών ως προς την καταλληλότητα των ΜΖΠ μη μηρυκαστικών ζώων στη διατροφή της εκτρεφόμενης τσιπούρας (*Sparus aurata*) και την ενδεχόμενη μείωση των ποσοστών χρησιμοποίησης των ιχθυαλεύρων στις ιχθυοτροφές της, προκειμένου να ενισχυθεί η βιωσιμότητα και η αποδοτικότητα της περαιτέρω παραγωγής της.

1.2 Στοιχεία παγκόσμιας και ελληνικής υδατοκαλλιέργειας

Σύμφωνα με τα τελευταία στατιστικά στοιχεία του Παγκόσμιου Οργανισμού Τροφίμων και Γεωργίας (FAO) η ετήσια παραγωγή προϊόντων αλιείας και υδατοκαλλιέργειας παγκοσμίως έχει ανέλθει σε περίπου 179 εκατομμύρια τόνους, εκ των οποίων το 46% έχουν προέλθει από την υδατοκαλλιέργεια και το υπόλοιπο 54% από τη συλλεκτική αλιεία (FAO 2020). Από την παραγωγή της αλιείας, περίπου 18 εκ. τόνοι χρησιμοποιήθηκαν για την παραγωγή ιχθυαλεύρων και ιχθυελαίων. Ο κλάδος των υδατοκαλλιεργειών συνεχίζει να αναπτύσσεται ραγδαία με έναν ετήσιο ρυθμό της τάξης του 5,3% για το διάστημα 2001-2018. Η συνολική υδατοκαλλιεργητική παραγωγή το 2018 ήταν περίπου 114 εκ. τόνοι, αν συνυπολογιστεί και η παραγωγή υδρόβιων φυτών και μικροφυκών, έχοντας χρηματική αξία 263 δις. δολαρίων. Οι υδατοκαλλιέργειες, πέραν της ταχύρρυθμης ανάπτυξής τους, διαρκώς εντατικοποιούνται κάνοντας χρήση όλο και περισσότερο βιομηχανικά παρασκευασμένων ιχθυοτροφών για τη σίτιση των εκτρεφόμενων ειδών. Σήμερα είναι χαρακτηριστικό πως το

ποσοστό της παραγωγής βιομάζας εκτρεφόμενων ειδών, που η διατροφή τους βασίζεται σε ιχθυοτροφές (fed aquaculture), αυξήθηκε στο 70% επί του συνόλου της ετήσιας υδατοκαλλιεργητικής παραγωγής, από το 56% που ήταν στις αρχές του 2000 (FAO 2020). Το γεγονός αυτό χαρακτηρίζει και την ολοένα υψηλότερη ζήτηση που υπάρχει για βιομηχανικά παρασκευασμένες ιχθυοτροφές. Η μεγάλη ποικιλία περιβαλλοντικών συνθηκών, όπου μπορούν να εφαρμοστούν υδατοκαλλιέργειες, έχει οδηγήσει σε ένα μεγάλο αριθμό ειδών, άνω των 600, που εκτρέφονται/καλλιεργούνται παγκοσμίως, συμπεριλαμβανομένων της τσιπούρας (*S. aurata*) και του λαβρακιού (*Dicentrarchus labrax*) που αποτελούν τα δύο κυριότερα εκτρεφόμενα είδη στην Ελλάδα (FAO 2022a).

Στη χώρα μας, η υδατοκαλλιέργεια και κυρίως η ιχθυοκαλλιέργεια, αποτελεί έναν από τους σημαντικότερους κλάδους της αγροτικής παραγωγής συμβάλλοντας στην οικονομική ανάπτυξη και κοινωνική συνοχή. Σύμφωνα με τα πιο πρόσφατα στοιχεία του Συνδέσμου Ελληνικών Θαλασσοκαλλιεργειών (ΣΕΘ), ο συνολικός όγκος παραγωγής ανήλθε το 2019 στους 150 χιλιάδες τόνους, αξίας 650 εκ. ευρώ (ΣΕΘ 2020). Πέραν της τσιπούρας και του λαβρακιού, σε μικρότερες ποσότητες εκτρέφονται κρانيός (*Argyrosomus regius*), φαγκρί (*Pagrus* sp.), πέστροφα (*Onchorynchus mykiss*), χέλι (*Anguilla anguilla*), συναγρίδα (*Dentex dentex*), μαγιάτικο (*Seriola dumerili*), μυτάκι (*Diplodus puntazzo*), λυθρίνι (*Pagellus erythrinus*) κ.α., ενώ σημαντική είναι και η συμβολή της μυδοκαλλιέργειας που αντιπροσωπεύει το 15% του συνολικού όγκου. Η θαλάσσια ιχθυοκαλλιέργεια, που αποτελεί μακράν την κυριότερη μορφή υδατοκαλλιέργειας στην Ελλάδα και εφαρμόζεται σε θαλάσσιους ιχθυοκλωβούς, αναπτύχθηκε ραγδαία από τη δεκαετία του '80 και σήμερα υπάρχουν πάνω από 300 παραγωγικές μονάδες ανά την επικράτεια. Οι ετήσιες παραγωγές τσιπούρας και λαβρακιού κυμαίνονται περί τους 65.000 και 55.000 τόνους, αντίστοιχα. Οι ελληνικές υδατοκαλλιέργειες συμβάλλουν στην κοινωνική συνοχή της χώρας μιας και κατανέμονται σε 11 Περιφέρειες, δημιουργώντας χιλιάδες θέσεις εργασίας. Περαιτέρω, ο

κλάδος είναι έντονα εξωστρεφής αφού σχεδόν το 80% της παραγωγής διατίθεται στο εξωτερικό και κυρίως σε αγορές της Ευρωπαϊκής Ένωσης, συμβάλλοντας ουσιαστικά στην αύξηση του εμπορικού ισοζυγίου της χώρας. Οι ελληνικές υδατοκαλλιέργειες έχοντας συνειδητοποιήσει τον παγκόσμιο ρόλο τους στην συνεισφορά ιχθυηρών, στοχεύουν στην περιβαλλοντική αειφορία και υιοθετούν διαρκώς τις συστάσεις και κατευθυντήριες οδηγίες για χρήση αειφόρων ιχθυοτροφών που κάνουν χρήση εναλλακτικών και αειφόρων πρώτων υλών και ταυτόχρονα διασφαλίζουν τη βιώσιμη χρήση των ιχθυαλεύρων και ιχθυελαίων (ΣΕΘ 2020).

1.3 Εκτροφή τσιπούρας (*Sparus aurata*)

Η τσιπούρα (*S. aurata*), ανήκει στην οικογένεια των Σπαριδών (*Sparidae*) και αποτελεί ένα από τα κυριότερα εκτρεφόμενα είδη στις ελληνικές και Μεσογειακές υδατοκαλλιέργειες. Το είδος συναντάται κυρίως σε παράκτιες και υφάλμυρες περιοχές της Μεσογείου (Νεοφύτου 2015, FAO 2022a), είναι ανθεκτικό σε σχετικά μεγάλο εύρος θερμοκρασιών (από 4 έως 30 °C) με το μέγιστο ρυθμό ανάπτυξης να πετυχαίνεται μεταξύ 22 και 24 °C (Χώτος 2005, Παπουτσόγλου 2008, Pavlidis & Mylonas 2011). Το είδος είναι ευρύαλο με τα όρια αλατότητας στα οποία επιβιώνει να φτάνουν, από το 7‰, μέχρι και 40‰, με μέγιστη ανάπτυξη να παρατηρείται σε νερά αλατότητας από 28‰ έως 32‰ (Παπουτσόγλου 2008, Pavlidis & Mylonas 2011). Περαιτέρω, η τσιπούρα αποτελεί είδος που προσαρμόζεται εύκολα στην αιχμαλωσία, χαρακτηρίζεται από υψηλούς ρυθμούς ανάπτυξης, παρουσιάζει ανθεκτικότητα στις απότομες μεταβολές των φυσικοχημικών παραμέτρων των υδάτινων μαζών και γενικά παρέχει καλή ποιότητα κρέατος (Pavlidis & Mylonas 2011, Matos *et al.* 2016). Για όλα τα παραπάνω, η τσιπούρα έχει μεγάλο οικονομικό ενδιαφέρον και επιλέγεται για εντατική εκτροφή.

Η τσιπούρα παραδοσιακά εκτρέφονταν εκτατικά σε παράκτιες λιμνοθάλασσες και υφάλμυρες τεχνητές λίμνες που αποτελούσαν στην ουσία φυσικές παγίδες των μεταναστεύσεων των νεαρών ατόμων για αναζήτηση τροφής. Κατά την δεκαετία του '80, η μειωμένη διαθεσιμότητα του άγριου γόνου, σε συνδυασμό με την επιτυχή τεχνητή αναπαραγωγή της τσιπούρας σε συνθήκες αιχμαλωσίας, οδήγησε στην ανάπτυξη εντατικών συστημάτων εκτροφής του είδους. Σήμερα, η τσιπούρα εκτρέφεται κατά το πλείστον εντατικά σε θαλάσσιους ιχθυοκλωβούς. Μία σύντομη περιγραφή του πλήρη κύκλου παραγωγής (Pavlidis & Mylonas 2011, FAO 2022a) ξεκινάει με τον γόνο να παράγεται σε ιχθυογεννητικούς σταθμούς, όπου συνήθως η θερμοκρασία νερού και η φωτοπερίοδος προσαρμόζονται ώστε να προκαλέσουν αναπαραγωγική ωρίμανση των γεννητόρων. Κατόπιν, οι ιχθυονύμφες αφότου απορροφήσουν τον λεκιθικό τους σάκο κατά την 3^η-4^η ημέρα μετά την εκκόλαψη των αυγών, διατρέφονται για μία περίοδο περίπου 2 εβδομάδων με ζωοπλαγκτονικά είδη όπως τροχόζωα του είδους *Brachionus plicatilis* τα οποία έχουν διατραφεί με μικροφύκη και εμπλουτίζεται με διατροφικά συμπληρώματα. Κατά το τέλος της 2^{ης} εβδομάδας μετά την εκκόλαψη, η διατροφή των ιχθυονυμφών περιορίζεται σταδιακά με τροχόζωα και χορηγείται μικροσκοπική γαρίδα των υπεράλμυρων υδάτων του γένους *Artemia*, η οποία επίσης εμπλουτίζεται ώστε να έχει αυξημένα επίπεδα ω-3 πολυακόρεστων λιπαρών οξέων και άλλα θρεπτικά. Ο απογαλακτισμός των νυμφών με βιομηχανικά παρασκευασμένη μικροτροφή (κοκκομετρίας 100-500 μm) συνήθως αρχίζει από την 20^η ημέρα και ολοκληρώνεται κατά την 40-45^η όταν τα ιχθύδια αποκτήσουν μέσο βάρος 5-10 mg. Μετέπειτα, στο στάδιο της προπάχυνσης τα ιχθύδια διατρέφονται με τροφές όλο και μεγαλύτερης κοκκομετρίας (500 μm – 1,9 mm) έως ότου αποκτήσουν βάρος 2-10 g όπου κατόπιν θα μεταφερθούν σε θαλάσσιους ιχθυοκλωβούς για την κύρια πάχυνσή τους. Στην εντατική εκτροφή, η συνήθης ιχθυοπυκνότητα στους κλωβούς κυμαίνεται στα 10 – 25 Kg/m² και η συνολική διάρκεια της πάχυνσης διαρκεί συνήθως από 10 έως 16 μήνες για την

απόκτηση του πρώτου εμπορεύσιμου μεγέθους (350-400 g) ή παραπάνω για την απόκτηση μεγαλύτερου μεγέθους (Pavlidis & Mylonas 2011, FAO 2022a).

Η ετήσια παγκόσμια ιχθυοκαλλιεργητική παραγωγή της τσιπούρας ανήλθε σε περίπου 280.000 τόνους (FAO 2022b), με την Ελλάδα να αποτελεί την ηγέτιδα παραγωγό χώρα στη Ευρωπαϊκή ένωση με ετήσια παραγωγή 63.500 τόνους (ΣΕΘ 2020). Στην Ελλάδα, η μέση τιμή λιανικής πώλησης της τσιπούρας το 2019 ήταν 4,5 €/Kg και της βιολογικής τσιπούρας 8,5 €/Kg (ΣΕΘ 2020).

1.4 Διατροφικές απαιτήσεις της τσιπούρας

Στον Πίνακα 1.1 δίνονται οι ποσοτικές διατροφικές απαιτήσεις της τσιπούρας σε μακροθρεπτικά συστατικά σύμφωνα με τις ανασκοπήσεις των Παπουτσόγλου (2008) και FAO (2022c). Οι ποσοτικές διατροφικές απαιτήσεις της τσιπούρας έχουν μελετηθεί από διάφορους ερευνητές (Kaushik 1998, Oliva-Teles 2000, Koven *et al.* 2002, Lupatsch & Kissil 2005, Marcouli *et al.* 2005) παρουσιάζοντας κάποιες διαφοροποιήσεις. Όπως και σε άλλους οστειχθύες, τα νεαρότερα άτομα έχουν απαίτηση σε τροφές υψηλότερης περιεκτικότητας σε πρωτεΐνες, ενώ καθώς μεγαλώνουν η περιεκτικότητα της τροφής τους σε πρωτεΐνες φθίνει, και αντίστοιχα η περιεκτικότητα σε λίπη αυξάνεται. Έτσι, στο στάδιο της ιχθυονύμφης όπου διατρέφονται με μικροτροφές το επίπεδο των πρωτεϊνών είναι συνήθως 53-55% και των λιπών 12-13%, στο στάδιο της προπάχυνσης συνήθως 45-50% πρωτεΐνες και 13-16% λίπη, ενώ στο στάδιο του εμπορεύσιμου μεγέθους το επίπεδο των πρωτεϊνών μπορεί να μειωθεί στο 39-42% και των λιπών να αυξηθεί στο 18-21%. Αντίστοιχα, η αναλογία πεπτής πρωτεΐνης (DP) προς πεπτή ενέργεια (DE) μειώνεται με την αύξηση του μεγέθους των ψαριών, από 30 mg DP / kJ DE για ψάρια κάτω των 3 g έως 21,5 mg / kJ σε μεγάλου μεγέθους ψάρια.

Αναφορικά με τις απαιτήσεις του είδους σε απαραίτητα αμινοξέα, μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί χρησιμοποιώντας είτε καμπύλες δόσης-απόκρισης είτε τη συνολική αύξηση

πρωτεΐνης σώματος (Kaushik 1998, Tibaldi & Kaushik 2005, Peres & Oliva-Teles 2009). Για τα απαραίτητα λιπαρά οξέα, έχει τεκμηριωθεί η συνολική ποσοτική απαίτηση τους για μακράς αλυσού ω-3, κυρίως εικοσαπεντανοϊκό οξύ (EPA, 20:5n-3) και εικοσιδυενοϊκό οξύ (DHA, 22:6n-3) της τάξης περίπου 1% της τροφής για ενήλικα άτομα και 2% για ιχθύδια. Στον Πίνακα 1.2 δίνονται οι ποσοτικές διατροφικές απαιτήσεις της τσιπούρας σε απαραίτητα αμινοξέα και λιπαρά οξέα.

Πίνακας 1.1: Χαρακτηριστικές ποσοτικές διατροφικές απαιτήσεις (% της τροφής) της τσιπούρας στα στάδια του ιχθυδίου (προπάχυνσης) και ενήλικου ατόμου (κύρια πάχυνσης).

Θρεπτική σύσταση (%)	Στάδιο ανάπτυξης	
	Ιχθύδια	Ενήλικα άτομα
Ολικές πρωτεΐνες	50 - 60	42 - 50
Ολικές λιπαρές ουσίες	12 - 15	12 - 25
Ινώδεις ουσίες	1,0 - 1,2	0,7 - 1,8
Ολική ανόργανη ουσία	8 - 10	8 - 10
Ολικοί υδατάνθρακες	15 - 18	13 - 21
Ολική Ενέργεια (Kj/Kg)	19,5 – 20,0	20,5 – 22,0
Πεπτή Πρωτεΐνη/Ενέργεια (mg/Kj)	27,6 - 30,2	28,1 – 21,5

Πηγές: Παπουτσόγλου 2008, FAO 2022c.

Πίνακας 1.2: Ποσοτικές διατροφικές απαιτήσεις σε απαραίτητα και ημι-απαραίτητα αμινοξέα, και λιπαρά οξέα στη διατροφή της τσιπούρας.

Αμινοξέα	(% πρωτεϊνών τροφής)
Αργινίνη	2,5 – 7,0
Ιστιδίνη	1,5 – 3,5
Ισολευκίνη	2,5 – 5,0
Λευκίνη	4,5 – 7,0
Λυσίνη	5,0 – 8,0
Μεθειονίνη	3,5 – 4,0
Φαινυλαλανίνη	3,0 – 4,0
Θρεονίνη	3,0 – 4,5
Τρυπτοφάνη	0,5 – 1,0
Βαλίνη	3,0 – 5,5
Κυστεΐνη	1,5 – 2,0
Τυροσίνη	3,0 – 3,5
Λιπαρά οξέα	(% τροφής)
EPA + DHA	1 - 2

Πηγές: Παπουτσόγλου (2008), FAO (2022c), Καραπαναγιωτίδης (2011).

Στον Πίνακα 1.3 δίνονται οι ποσοτικές διατροφικές απαιτήσεις της τσιπούρας σε βιταμίνες και ανόργανα στοιχεία. Σχετικά με τη βιταμίνη C υπάρχουν ελάχιστα διαθέσιμα στοιχεία αν και πρόσθετη ποσότητα στο σιτηρέσιο θεωρείται ευεργετική για το ανοσοποιητικό και την ανθεκτικότητα σε στρες (FAO 2022c). Για τις απαιτήσεις σε ανόργανα στοιχεία, οι πληροφορίες στη διεθνή βιβλιογραφία είναι επίσης περιορισμένες.

Πίνακας 1.3: Ενδεικτικά προτεινόμενα επίπεδα βιταμινών και ανόργανων στοιχείων σε εναρκτήρια σιτηρέσια, σιτηρέσια κύριας εκτροφής και γεννητόρων τσιπούρας (ποσότητες/Kg τροφής με 10% υγρασία)

Βιταμίνες και ανόργανα στοιχεία	Εναρκτήρια σιτηρέσια	Σιτηρέσια κύριας εκτροφής	Σιτηρέσια γεννητόρων
Βιταμίνη Α (IU)	27.000	22.000	27.000
Βιταμίνη D (IU)	3.000	3.000	1.500
Βιταμίνη Ε (mg)	1.200	1.100	1.300
Βιταμίνη Κ (mg)	30	25	35
Βιταμίνη C (mg)	300	250	450
Θειαμίνη (mg)	50	30	50
Ριβοφλαβίνη (mg)	55	35	60
Παντοθενικό οξύ (mg)	130	120	130
Πυριδοξίνη (mg)	35	30	40
Κυανοκοβαλαμίνη (mg)	~0,1	~0,1	~0,1
Νιασίνη (mg)	550	400	550
Βιοτίνη (mg)	2,0	1,0-1,5	1,5
Χολίνη (mg)	2.500	2.400	2.500
Φυλλικό οξύ (mg)	15	8-10	10
Ινισιτόλη (mg)	250	250	300
Παραμινοβενζοϊκό οξύ (mg)	40	35	45
Φώσφορος (mg)	14	13	14
Χαλκός (mg)	6	4	5
Ιώδιο (mg)	3	2	2,5
Σίδηρος (mg)	60	50	60
Μαγγάνιο (mg)	80	70	75
Ψευδάργυρος (mg)	100	80	100
Κοβάλτιο (mg)	~2,5	~2,0	2,5
Σελήνιο (mg)	0,4-0,5	0,3-0,4	0,4-0,5

Πηγές: Παπουτσόγλου (2008), FAO (2022c).

1.5 Ιχθυάλευρα και εναλλακτικές των ιχθυαλεύρων πηγές πρωτεϊνών στις ιχθυοτροφές

Η διαρκώς αυξανόμενη ιχθυοκαλλιεργητική παραγωγή και η εντατικοποίησή της έχει οδηγήσει σε αυξανόμενη ζήτηση για βιομηχανικά παρασκευαζόμενες ιχθυοτροφές (FAO 2020). Οι ιχθυοκαλλιέργειες, ιδιαίτερα στην Ευρώπη, χρησιμοποιούν σαρκοφάγα είδη όπως

σολομό του Ατλαντικού (*Salmo salar*), ιριδίζουσα πέστροφα (*Oncorhynchus mykiss*), τσιπούρα (*S. aurata*) και λαβράκι (*D. labrax*) μεταξύ άλλων, με τις ιχθυοτροφές που χορηγούνταν στο παρελθόν για την παραγωγή αυτών των ειδών να εμπεριέχουν υψηλά επίπεδα ιχθυαλεύρων. Μέχρι πριν δύο δεκαετίες, αυτή η πρακτική είχε θεωρηθεί ορθή, καθώς το ιχθυάλευρο είναι πλούσιο σε απαραίτητα αμινοξέα, ελκυστικό και εύπεπτο από τους εκτρεφόμενους ιχθύες, αλλά συγχρόνως ήταν άμεσα διαθέσιμο και σχετικά οικονομικό για τους παραγωγούς (Καραπαναγιωτίδης 2011). Υπολογίζεται πως το 2000 περισσότερο από το 60% της παγκόσμιας παραγωγής ιχθυαλεύρου καταναλώνονταν από τις ιχθυοκαλλιέργειες (Tacon *et al.* 2012). Σε κάποια είδη, όπως για παράδειγμα στους σολομούς, τα χέλια και διάφορα άλλα θαλάσσια είδη, τα χαρακτηριστικά ποσοστά συμμετοχής των ιχθυαλεύρων στις ιχθυοτροφές ενός πλήρους κύκλου εκτροφής, ξεπερνούσαν το 50% επί του σιτηρεσίου (Πίν. 1.4). Επιπρόσθετα, το ιχθυάλευρο, μέσω του λιπιδικού του περιεχομένου, προσέφερε στους ιχθύες μια σημαντική ποσότητα ω-3 πολυακόρεστων λιπαρών οξέων, και ιδιαίτερα των 20:5ω-3 και 22:6ω-3, τα οποία θεωρούνται απαραίτητα λιπαρά οξέα στην διατροφή των ιχθύων και καρκινοειδών. Ως εκ τούτου, η συμπερίληψη ιχθυαλεύρων στις ιχθυοτροφές αποσκοπούσε εν μέρει και στην κάλυψη των συγκεκριμένων διατροφικών απαιτήσεων των οργανισμών.

Τα ιχθυάλευρα παράγονται κυρίως από την αλιεία συγκεκριμένων άγριων πελαγικών ιχθυοποθεμάτων (Cashion *et al.*, 2017), τα οποία πλέον έχουν φτάσει στα όρια της βιωσιμότητάς τους, με αποτέλεσμα η παγκόσμια παραγωγή ιχθυαλεύρων (περίπου 5-7 εκ. τόνοι ετησίως) να παραμένει στάσιμη τα τελευταία 30 χρόνια (FAO 2020). Η αυξανόμενη ζήτηση για ιχθυάλευρα, λόγω της στάσιμης διαθεσιμότητά τους, η μέση τιμή αγοράς τους εκτοξεύθηκε την τελευταία δεκαετία από περίπου 450 \$/ton στις αρχές του 2000 στα 1600 \$/ton το 2018 (Jannathulla *et al.* 2019). Οι αυξήσεις στην τιμή των ιχθυαλεύρων αντιστοίχως αυξάνουν το κόστος διατροφής και εν τέλει το κόστος παραγωγής των ιχθυοκαλλιεργειών.

Πίνακας 1.4. Χαρακτηριστικά επίπεδα συμμετοχής των ιχθυαλεύρων στις ιχθυοτροφές διαφόρων εκτρεφόμενων ειδών, όπως εφαρμόζονταν το 2000 (Tacon & Metian 2008).

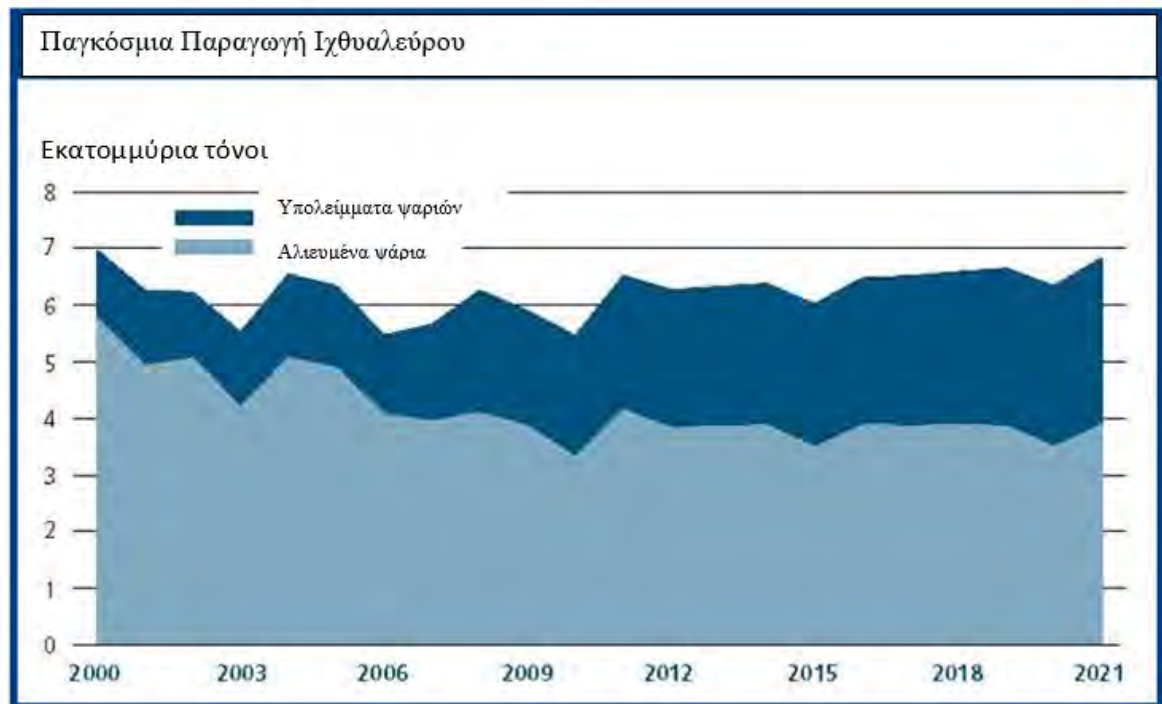
Είδος	Ποσοστό ιχθυάλευρου στην τροφή (%)
Χέλια	40 – 80
Σολομοί	20 – 50
Πέστροφες	15 – 55
Διάφορα θαλάσσια είδη	7 – 70
Θαλάσσιες γαρίδες	5 – 40
Γατόψαρα	3 – 40
Καρκινοειδή γλυκού νερού	5 – 25
Τιλάπιες	0 – 20
Κυπρινοειδή	0 – 20
<i>Chanos chanos</i>	1 – 5

Πέρα, όμως, από τη στάσιμη προσφορά των ιχθυαλεύρων στην παγκόσμια αγορά, επιπλέον έχουν διεγερθεί ηθολογικές αντιδράσεις σχετικά με τη χρησιμοποίηση αλιευμένων ιχθύων με σκοπό την παραγωγή ζωοτροφών και όχι για την απ' ευθείας πρόσληψή τους από τον άνθρωπο, ιδιαίτερα όταν ένα μεγάλο μέρος του παγκόσμιου ανθρώπινου πληθυσμού υποσιτίζεται από πρωτεΐνη ζωικής προέλευσης (Καραπαναγιωτίδης 2011). Επιπρόσθετα, διάφοροι οικολογικοί και μη κυβερνητικοί οργανισμοί ολοένα και περισσότερο εκφράζουν την ανησυχία τους για τη βιώσιμη εκμετάλλευση των ιχθυαποθεμάτων που προορίζονται για την παραγωγή ιχθυαλεύρων και τις αρνητικές επιδράσεις που έχουν υποστεί τα θαλάσσια οικοσυστήματα μέσω της υποβάθμισης της τροφικής αλυσίδας των θαλάσσιων θηλαστικών και πουλιών (Bell & Waagbø 2008). Διαφαίνεται, λοιπόν, πως είναι ζωτικής σημασίας πλέον ο κλάδος να μειώσει την εξάρτηση του στα ιχθυάλευρα και να παρασκευάσει βιώσιμες ιχθυοτροφές χρησιμοποιώντας κατάλληλες εναλλακτικές λύσεις.

Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Τροφίμων και Γεωργίας (FAO) ισχυρίζεται ότι η παγκόσμια παραγωγή των ιχθυαλεύρων μπορεί να αυξηθεί μέσω της αειφορικής διαχείρισης των αλιευτικών αποθεμάτων που προορίζονται για ιχθυάλευρα (FAO 2020). Όλοι οι υπεύθυνοι φορείς όπως ο Παγκόσμιος Οργανισμός Ιχθυαλεύρων & Ιχθυελαίων (International Fishmeal and Fish Oil Organization, IFFO), εταιρείες παραγωγής ιχθυοτροφών, παραγωγοί υδατοκαλλιεργειών, διάφοροι μη κυβερνητικοί οργανισμοί-περιβαλλοντικές οργανώσεις και άλλοι, συνεργάστηκαν προς αυτήν την κατεύθυνση με αποτέλεσμα να έχει εισαχθεί διεθνώς η «Παγκόσμια Οδηγία για Υπεύθυνη Προσφορά ιχθυαλεύρων και ιχθυελαίων» (Global Standard for Responsible Supply). Στη συμφωνία αυτή τέθηκαν συγκεκριμένες ρυθμίσεις και αυστηρά κριτήρια για την αλιεία, εμπορία και παραγωγή των ιχθυαλεύρων και ιχθυελαίων και είναι σε παράλληλη συμφωνία με τον Κώδικα Συμπεριφοράς για Υπεύθυνη Αλιεία (Code of Conduct for Responsible Fisheries) του παγκόσμιου Οργανισμού Τροφίμων και Γεωργίας (FAO). Επιπρόσθετα, η βιομηχανία παρασκευής ιχθυαλεύρων ολοένα και περισσότερο χρησιμοποιεί διάφορα υποπροϊόντα της μεταποίησης-φιλετοποίησης-κονσερβοποίησης των ιχθυηρών που προέρχονται είτε από την αλιεία είτε από την ιχθυοκαλλιέργεια.

Τα ιχθυάλευρα αυτού του τύπου, που αναφέρονται με τον διεθνή όρο «fish trimmings» ή «fish residues», σήμερα εκτιμάται ότι αποτελούν περίπου το 30% της παγκόσμιας ετήσιας παραγωγής ιχθυαλεύρων και εκτιμάται ότι στο μέλλον οι ποσότητες αυτών θα αυξηθούν (Εικ. 1.1, FAO 2020). Αυτές οι πρώτες ύλες προσφέρουν μια αειφόρο εναλλακτική λύση στα ιχθυάλευρα που προέρχονται από τα φυσικά ιχθυαποθέματα. Ωστόσο, αξίζει να αναφερθεί ότι αυτά τα υποπροϊόντα περιέχουν ένα χαμηλότερο πρωτεϊνικό επίπεδο και μια χαμηλότερη πεπτικότητα από ότι τα συμβατικά ιχθυάλευρα (Tacon & Metian 2008). Ταυτόχρονα, θα πρέπει να δοθεί ιδιαίτερη προσοχή στη χρήση αυτών των υποπροϊόντων ώστε να αποφευχθεί ο κίνδυνος επανασίτισης των εκτρεφόμενων οργανισμών με ιχθυάλευρα που προέρχονται από το ίδιο είδος λόγω της επικινδυνότητας του κανιβαλισμού, της

ανακύκλωσης πιθανών επιμολυντών στην τροφική τους αλυσίδα και την πιθανή έξαρση ασθενειών (Tacon & Metian 2008).



Εικόνα 1.1. Παγκόσμια παραγωγή ιχθυαλεύρων από αλιεία (ολόκληρα αλιευμένα ψάρια) και από υποπροϊόντα της μεταποίησης (υπολείμματα ψαριών) και μελλοντική εκτίμηση αυτής. Πηγή: FAO (2020).

Εδώ και περίπου δύο δεκαετίες ο τομέας των ιχθυοκαλλιεργειών έχει στραφεί στη χρήση φυτικών αλεύρων για την υποκατάσταση των ιχθυαλεύρων στις ιχθυοτροφές. Έτσι, έχει διεξαχθεί ένας τεράστιος αριθμός ερευνητικών προσπαθειών και μέσω σημαντικών χρηματοδοτούμενων ευρωπαϊκών προγραμμάτων (όπως π.χ. PEPPA, RAFOA, AQUAMAX) με αποτέλεσμα τα επίπεδα συμμετοχής των ιχθυαλεύρων στις ιχθυοτροφές να μειωθούν κατά 30-100% (Bell & Waagbø 2008), αναλόγως του είδους. Διάφορα άλευρα φυτικής προέλευσης έχουν χρησιμοποιηθεί ως υποκατάστατα του ιχθυαλεύρου, των οποίων

εξετάζεται η καταλληλότητα με κύριο γνώμονα την ανάπτυξη που προσδίδουν στους εκτρεφόμενους ιχθύες σε συνδυασμό με τη χαμηλή τιμή διάθεσής τους στο εμπόριο (Hartviksen *et al.* 2014). Τέτοια φυτικά άλευρα είναι κυρίως τα άλευρα ελαιούχων δημητριακών καρπών, όπως το σογιάλευρο, το κραμβάλευρο, το φοινικάλευρο, το φυστικάλευρο, το ηλιάλευρο, το σουσαμάλευρο, το καρυδάλευρο, αλλά και ειδικά προϊόντα σιτηρών όπως η γλουτένη αραβοσίτου, η γλουτένη σιταριού κ.α. (Μεντέ & Νέγκας 2011).

Όμως, τα άλευρα φυτικής προέλευσης, συγκριτικά με τα ιχθυάλευρα, περιέχουν χαμηλότερα επίπεδα ολικών πρωτεϊνών και ορισμένων απαραίτητων αμινοξέων, όπως π.χ. μεθειονίνης και λυσίνης μεταξύ άλλων. Επίσης, τα φυτικά άλευρα θεωρούνται λιγότερο εύγευστα και εύπεπτα, με αποτέλεσμα την απώλεια θρεπτικών συστατικών στην υδάτινη στήλη και μεγαλύτερη επιβάρυνση του υδάτινου περιβάλλοντος (ανασκόπηση από Bell & Waagbø 2008, Oliva-Teles *et al.* 2015). Επιπρόσθετα, έχουν αναφερθεί πολλές διαφοροποιήσεις στην έκφραση του γονιδιώματος (Gómez-Requeni *et al.*, 2005,) και σε ανοσολογικούς και αιματολογικούς δείκτες (Kumar *et al.* 2010) από την υποκατάσταση του ιχθυαλεύρου από φυτικές πρωτεΐνες. Παράλληλα, τα φυτικά άλευρα περιέχουν διάφορες αντιδιατροφικές ουσίες οι οποίες αν δεν αδρανοποιηθούν, μέσω της κατάλληλης επεξεργασίας τους, μπορεί να προκαλέσουν μείωση της πρόσληψης της τροφής, μείωση της ανάπτυξης του ιχθύος, τοξικά φαινόμενα και προβλήματα υγείας στους διατρεφόμενους ιχθύες (Francis *et al.* 2001). Επιπρόσθετα, σχετικά με τη χρησιμοποίηση φυτικών πρωτεϊνών υπάρχει μια σημαντική ανησυχία που έγκειται στην παρουσία των γενετικά τροποποιημένων προϊόντων που χρησιμοποιούνται σήμερα στη γεωργία και ιδιαίτερα εκείνων που προέρχονται από σόγια και καλαμπόκι (Pusztai & Bardocz 2006). Γι' αυτό έχει δειχθεί ότι η πλήρης αντικατάσταση του ιχθυαλεύρου στο σιτηρέσιο οδηγεί σε μείωση των αναπτυξιακών επιδόσεων των ιχθύων (ανασκοπήσεις από Watanabe *et al.* 1998, Bell & Waagbø 2008, Oliva-Teles *et al.* 2015). Παρόλα αυτά, οι φυτικές πρωτεΐνες έχουν ενσωματωθεί επιτυχώς

στα σιτηρέσια των εκτρεφόμενων ιχθύων, συμπεριλαμβανομένης της τσιπούρας. Σε αυτό συνετέλεσαν τα ευρήματα από διάφορες μελέτες όπουδείχθηκε ότι περίπου 20 με 75% των επιπέδων εκείνων των ιχθυαλεύρων που χρησιμοποιούνταν στα σιτηρέσια της τσιπούρας κατά τη δεκαετία του 2000-2010 μπορούσε να υποκατασταθεί από φυτικές πρωτεΐνες, χωρίς να επέρχεται μείωση του ρυθμού ανάπτυξης ή των επιπέδων των απαραίτητων αμινοξέων στο σώμα των ιχθύων (Pereira & Oliva-Teles 2002, Gomez-Requeni *et al.* 2003, 2004, Sitja-Bobadilla *et al.* 2005, Bell & Waagbø 2008).

Πρόσφατα, οι μεταποιημένες ζωικές πρωτεΐνες που προέρχονται από έντομα (εντομάλευρα) έχουν προσελκύσει το ερευνητικό και επενδυτικό ενδιαφέρον (Barroso *et al.* 2014). Τα έντομα μπορούν να αποτελέσουν μια διατροφικά κατάλληλη και παράλληλα αειφόρο εναλλακτική λύση των ιχθυαλεύρων δεδομένου ότι η χρήση τους παρουσιάζει πολλά πλεονεκτήματα. Καταρχάς, τα έντομα, αναλόγως του είδους και του σταδίου ανάπτυξης τους, περιέχουν υψηλά επίπεδα πρωτεϊνών (έως και 70% της θρεπτικής τους σύστασης) και λίπους (έως και 55%), γεγονός που θα μπορούσε να παρέχει κατάλληλες ποσότητες θρεπτικών συστατικών στη διατροφή των ιχθύων (Barroso *et al.* 2014, Karapanagiotidis *et al.* 2015). Παράλληλα, είναι πλούσιες πηγές των απαραίτητων αμινοξέων, πολλών βιταμινών και ανόργανων στοιχείων, ενώ κάποια είδη εντόμων περιέχουν ικανοποιητικά επίπεδα σε ω-3 και ω-6 πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (Sánchez-Muros *et al.* 2014). Επίσης, δεν θα πρέπει να αγνοείται το γεγονός πως τα έντομα αποτελούν τη φυσική τροφή πολλών ειδών ιχθύων, τόσο του γλυκού όσο και του θαλασσινού νερού (Henry *et al.* 2015). Επιπρόσθετα, πολλά είδη εντόμων (Lepidoptera, Diptera, Hymenoptera, Coleoptera, Trichoptera, Hemiptera, Odonata) έχει δειχθεί ότι έχουν αντι-μυκητιακές και αντι-βακτηριακές δράσεις, με αποτέλεσμα την ενίσχυση του ανοσοποιητικού συστήματος των ιχθύων και παράλληλα την αύξηση του χρόνου ζωής των ιχθυοτροφών που τα περιέχουν (Zhao *et al.* 2010).

Πέραν της θρεπτικής αξίας τους, η παραγωγή εντομαλεύρων και η ίδια η εκτροφή των εντόμων φαίνεται να έχει ένα χαμηλό οικολογικό αποτύπωμα σε σχέση με άλλες πρώτες ύλες ιχθυοτροφών και εκτροφές ζώων ή καλλιέργειες φυτικών προϊόντων (Sealey *et al.* 2011, Maiolo *et al.* 2021). Τα έντομα μπορούν να διατραφούν με διάφορα υπο-προϊόντα τροφίμων, όπως π.χ. υπολείμματα δημητριακών και σφαγίων ζώων, η εξάλειψη των οποίων έχει οικονομικό και περιβαλλοντικό κόστος (Sealey *et al.* 2011). Με τον τρόπο αυτό η εκτροφή των εντόμων προσφέρει στην ανακύκλωση θρεπτικών συστατικών παράγοντας μια υψηλής περιεκτικότητας ζωική πρωτεΐνη. Παράλληλα, η εκτροφή των εντόμων πραγματοποιείται σε μικρούς και κλειστούς χώρους, χωρίς την απαίτηση μεγάλων εκτάσεων γης και κατανάλωσης νερού, αλλά με χαμηλής τεχνολογίας μέσα και χαμηλής επένδυσης (Sánchez-Muros *et al.* 2014). Περαιτέρω, λόγω του γεγονότος ότι είναι εξώθερμοι οργανισμοί αποτελούν πολύ αποτελεσματικούς μετατροπείς τροφή, καθώς δεν ξοδεύουν μεταβολική ενέργεια για τη διατήρηση της θερμοκρασίας του σώματος τους (Nijdam *et al.* 2012).

Οι διάφορες μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί μέχρι σήμερα με τη χρησιμοποίηση εντομαλεύρων των ειδών *Tenebrio molitor* και *Hermetia illucens* στο σιτηρέσιο της τσιπούρας έχουν δείξει ότι είναι εφικτή μια μερική υποκατάσταση του ιχθυαλεύρου της τάξης του 25-30% (Karapanagiotidis *et al.* 2015, Piccolo *et al.* 2017). Εν τούτοις, και παρά το γεγονός πως από το 2017 επιτράπηκε η χρησιμοποίηση των εντομαλεύρων από 7 είδη εντόμων στις ευρωπαϊκές ιχθυοτροφές (ΕΚ 893/2017), ο κλάδος παρασκευής ιχθυοτροφών σήμερα παραμένει διστακτικός ως προς την ενσωμάτωσή τους στα σιτηρέσια. Αυτό συμβαίνει τόσο λόγω της μη εξοικείωσης/ανησυχίας των παραγωγών και των καταναλωτών προς αυτές τις πρώτες ύλες, αλλά και λόγω της χαμηλής διαθεσιμότητας και υψηλής τιμής τους στην αγορά (Makkar *et al.* 2014, Mulazzani *et al.* 2021, Rumbos *et al.* 2021).

Λαμβάνοντας υπόψη όλα τα παραπάνω, ο τομέας των ιχθυοκαλλιεργειών θα πρέπει να συνεχίσει τις προσπάθειες εξεύρεσης νέων εναλλακτικών των ιχθυαλεύρων πηγών

πρωτεϊνών και διερεύνησης της καταλληλότητας αυτών στα σιτηρέσια των εκτρεφόμενων ιχθύων.

1.6 Η χρήση Μεταποιημένων Ζωικών Πρωτεϊνών μη μηρυκαστικών στις ιχθυοτροφές

Οι Μεταποιημένες Ζωικές Πρωτεΐνες (MZΠ) μη μηρυκαστικών ζώων (Processed Animal Proteins from non-ruminant animals) αποτελούν άλευρα που παρασκευάζονται από ζωικά υποπροϊόντα, δηλαδή από προϊόντα της επεξεργασίας (σφαγή, μεταποίηση) που αυστηρά προέρχονται από μονογαστρικά εκτρεφόμενα ζώα (χοιρινά, πουλερικά) και όχι μηρυκαστικά (όπως π.χ. βοοειδή). Οι MZΠ αποτελούν υποπροϊόντα ζώων τα οποία προορίζονται για κατανάλωση από τον άνθρωπο και λαμβάνονται κατά τη στιγμή της σφαγής τους (γνωστά ως ύλες Κατηγορίας 3). Για την παρασκευή MZΠ δεν επιτρέπεται η χρησιμοποίηση υλών από άρρωστα ή υποπτευόμενα ως άρρωστα ζώα, υπολείμματα ζωικών τροφίμων για άνθρωπο, κοπριές και απορριπτόμενα προϊόντα για ανθρώπινη κατανάλωση. Η Ευρωπαϊκή Επιτροπή ορίζει τις MZΠ μη μηρυκαστικών ζώων τις «ζωικές πρωτεΐνες που προέρχονται εξολοκλήρου από ύλες Κατηγορίας 3, οι οποίες έχουν μεταποιηθεί ειδικώς ώστε να καθίστανται κατάλληλα προς απευθείας χρησιμοποίησή τους ως συστατικά ζωοτροφών» (EE/142/2011). Κάθε άλευρο MZΠ μη μηρυκαστικών είναι πλήρως ιχνηλατίσιμο και ποιοτικώς πιστοποιημένο για την ασφαλή χρησιμοποίησή του ως συστατικό των ζωοτροφών.

Ως χερσαίες ζωικές πρωτεΐνες, οι MZΠ μη μηρυκαστικών, διαθέτουν πολλά διατροφικά χαρακτηριστικά που τα καθιστούν κατάλληλα συστατικά για την αντικατάσταση των ιχθυαλεύρων στις ιχθυοτροφές. Έχουν υψηλότερη περιεκτικότητα σε ολικές πρωτεΐνες, ευνοϊκότερο προφίλ αμινοξέων και λιγότερους υδατάνθρακες συγκριτικά με τις φυτικές πρωτεΐνες, ενώ επίσης στερούνται των αντι-διατροφικών παραγόντων που είναι παρούσες σε πολλά φυτικά προϊόντα (Nollet & Toldrá 2012). Επίσης, περιέχουν πολύ υψηλά ποσοστά

φωσφόρου το οποίο είναι ένα περιορισμένο ανόργανο στοιχείο στις φυτικές πρώτες ύλες. Ιδιαίτερη σημασία έχει το γεγονός ότι οι ΜΖΠ μη μηρυκαστικών είναι άμεσα διαθέσιμες με εκτιμώμενη ετήσια παραγωγή περίπου 2,7 εκατομμύρια τόνους στην Ευρώπη (Render 2017), ενώ και η τιμή πώλησής τους στη διεθνή αγορά είναι σαφώς χαμηλότερη από εκείνη των ιχθυαλεύρων αλλά και πολλών φυτικών αλεύρων. Περαιτέρω, η χρήση των ΜΖΠ μη μηρυκαστικών στις ιχθυοτροφές εμπεριέχει την έννοια της ανακύκλωσης θρεπτικών συστατικών, προσφέροντας έτσι μία αξιόλογη λύση στη χρησιμοποίηση αυτών των ζωικών υποπροϊόντων που μέχρι σήμερα είτε καταστρέφονταν είτε χρησιμοποιούνταν λιγότερο αποτελεσματικά σε ζωοτροφές κατοικίδιων και ως βιοκαύσιμη ύλη. Στο εμπόριο είναι διαθέσιμες διάφορες ΜΖΠ μη μηρυκαστικών ανάλογα το είδος του ζώου από το οποίο προέρχονται και τον μεταποιημένο ιστό, όπως π.χ. άλευρα κρέατος πουλερικών, άλευρα κρέατος χοιρινών, άλευρα κρέατος και οστών πουλερικών, υδρολυμένα πτεράλευρα, αιματάλευρα, αιμογλοβίνες κ.λπ (Robaina, *et al* 1997, Karapanagiotidis, *et al* 2019).

Η συλλογή των ζωικών υποπροϊόντων και η μεταποίησή τους διέπεται από κανονισμούς και παρακολουθείται από τις αρμόδιες αρχές κάθε Ευρωπαϊκής χώρας (π.χ. τα σφαγεία χοίρων ή πουλερικών πρέπει να τηρούν τις απαιτούμενες προδιαγραφές). Το μεγαλύτερο ενδιαφέρον έχουν προσελκύσει τα διάφορα άλευρα υποπροϊόντων πουλερικών, τα υδρολυμένα πτεράλευρα και τα άλευρα υποπροϊόντων χοίρων. Το άλευρο υποπροϊόντων πουλερικών (εδώ θα αναφέρονται και ως «πτηνάλευρο») είναι ένα άλευρο καφέ-κίτρινου χρώματος που παρασκευάζεται από τα αφυδατωμένα και τετηγμένα καθαρά μέρη του σφάγιου πουλερικών όπως λαιμοί, κεφάλια, πόδια, σκελετοί, μη αναπτυγμένα αυγά, στομάχια, εντόσθια και έντερα (με την προϋπόθεση ότι έχει αφαιρεθεί το περιεχόμενό τους) , ενώ δεν περιέχουν φτερά (Feedipedia 2021). Κατά την επεξεργασία τους ζυμώνονται με μελάσα ώστε να μειωθεί το pH και να αποφευχθεί η ανάπτυξη επιβλαβών μικροοργανισμών. Η σταθεροποίηση του προϊόντος πετυχαίνεται και μέσω επεξεργασίας με οξέα ή βάσεις. Η

συνήθης επεξεργασία επίσης περιλαμβάνει την ξηρή θέρμανση και την αποστείρωση ώστε η περιεχόμενη υγρασία τους να είναι χαμηλότερη από 8%. Συνήθως, το περιεχόμενο λίπος εκχυλίζεται ώστε να αποφευχθούν πιθανά προβλήματα τάγγισης. Μια μέθοδος σταθεροποίησης του προϊόντος είναι και η λυοφιλοποίηση (ξήρανση σε θερμοκρασίες κατάψυξης).

Στον συγκριτικό Πίνακα 1.5, δίνεται η χαρακτηριστική σύσταση των πτηναλεύρων και η σύγκριση με εκείνη των ιχθυαλεύρων. Γενικά, τα πτηνάλευρα έχουν μια υψηλή περιεκτικότητα σε ολικές πρωτεΐνες (450-650 g/Kg νωπής ουσίας), η οποία βέβαια ποικίλλει ανάλογα με την πρώτη ύλη από την οποία παρασκευάζονται, αλλά και από τις διάφορες συνθήκες εκτροφής-διατροφής των πουλερικών από τα οποία παρασκευάστηκαν. Γενικά, θεωρείται ένα εύγεστο και υψηλής θρεπτικής αξίας συστατικό ζωοτροφών εξαιτίας της υψηλής περιεκτικότητάς του σε απαραίτητα αμινοξέα, λιπαρά οξέα, βιταμίνες και ανόργανα στοιχεία. Είναι ιδιαίτερα πλούσιο στα περισσότερα απαραίτητα αμινοξέα, εκτός από λυσίνη και μεθειονίνη (Zhou *et al.* 2011, González-Rodríguez *et al.* 2016). Επιπρόσθετα, η πεπτικότητα των πρωτεϊνών τους θεωρείται αρκετά υψηλή για πολλά σαρκοφάγα είδη ιχθύων (Hernández *et al.* 2010, Yu *et al.* 2013), συμπεριλαμβανομένης της τσιπούρας (Lupatsch *et al.* 1997, Davies *et al.* 2009), αν και μπορεί να ποικίλλει αρκετά επηρεαζόμενη από την πρώτη ύλη παραγωγής τους (Nengas *et al.* 1999). Το περιεχόμενο λίπος του κυμαίνεται από 5-35% και επίσης ποικίλλει ανάλογα με την πρώτη ύλη από την οποία παρασκευάζονται, αλλά και από τις διάφορες συνθήκες εκτροφής-διατροφής από την οποία προήλθαν τα πουλερικά (Feedepedia 2022, Psafakis *et al.* 2021). Περαιτέρω, το λίπος του αποτελείται κυρίως από κορεσμένα και λιγότερο από μονοακόρεστα λιπαρά οξέα. Αποτελεί καλή πηγή ασβεστίου και φωσφόρου ενώ και το ποσοστό της συνολικής ανόργανης ουσίας μπορεί να φτάσει σε υψηλά επίπεδα σε περίπτωση που το άλευρο πουλερικών περιέχει υψηλά ποσοστά οστών.

1.6.1 Άλευρο υποπροϊόντων πουλερικών

Τα πτηνάλευρα θα μπορούσαν να αποτελέσουν μια εναλλακτική λύση των ιχθυαλεύρων για την κάλυψη τουλάχιστον ενός μέρους των διατροφικών αναγκών των εκτρεφόμενων ψαριών, με την προϋπόθεση βέβαια ότι η ανάπτυξή τους και η ποιότητα της σάρκας τους δεν θα επηρεάζεται αρνητικά. Τα υποπροϊόντα του πτηναλεύρου θεωρούνται γενικά ως η περισσότερο αποδοτική χερσαία ζωική πρωτεΐνη στη διατροφή των εκτρεφόμενων ιχθύων (Davies *et al.* 2009). Στις διάφορες μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί μέχρι σήμερα, έχειδειχθεί ότι η πρωτεΐνη των υποπροϊόντων του πτηναλεύρου μπορεί να υποκαταστήσει μερικώς ή και πλήρως την πρωτεΐνη του ιχθυαλεύρου στο σιτηρέσιο διαφόρων ειδών ιχθύων χωρίς δυσμενείς επιπτώσεις στην ανάπτυξη τους. Συγκεκριμένα, έχειδειχθεί ότι η πρωτεΐνη του πτηναλεύρου μπορεί να υποκαταστήσει την πρωτεΐνη του ιχθυαλεύρου έως και 25% στο είδος *Tinca tinca* (González-Rodríguez *et al.* 2016) και στο *Psetta maeoticus* (Yigit *et al.* 2006), έως 30,7% στο *Rachycentron canadum* (Zhou *et al.*, 2011), έως 67% στο *Totoaba macdonaldi* (Zapata *et al.* 2016) και στο *Trachinotus carolinus* (Rossi & Davies 2012), έως 75 % στο *Oncorhynchus mykiss* (Parés-Sierra *et al.* 2014) και στο *Lutjanus guttatus* (Hernández *et al.* 2014) και μέχρι 100% στο *Cromileptes altivelis* (Shapawi *et al.* 2007) στο *Oreochromis niloticus* (El-Sayed 1998, Hernández *et al.* 2010) και στο υβρίδιο *Morone chrysops* × *M. saxatilis* (Rawles *et al.* 2011). Πέραν της επιτυχούς χρήσης του ατομικά ως υποκατάστατο του ιχθυαλεύρου, το πτηνάλευρο έχει χρησιμοποιηθεί επίσης επιτυχώς σε μίγματα με άλλες χερσαίες ζωικές πρωτεΐνες μη μηρυκαστικών (Liland *et al.* 2015, Hatlen *et al.* 2015).

Ένα από τα κυριότερα προβλήματα που εμφανίζει η χρησιμοποίηση των πτηναλεύρων ως συστατικά των ιχθυοτροφών αποτελεί το γεγονός ότι είναι ελλειμματικά, συγκριτικά με τα ιχθυάλευρα, σε ένα ή περισσότερα απαραίτητα αμινοξέα (π.χ. λυσίνη και μεθειονίνη), με αποτέλεσμα η προσθήκη αμινοξέων στο σιτηρέσιο να κρίνεται απαραίτητη (Subhara *et al.*

2006). Επίσης, τα πτηνάλευρα είναι πλούσια σε κορεσμένα λιπαρά οξέα που ενδεχομένως να μειώνουν την θρεπτική αξία των ιχθύων. Για να βελτιστοποιηθεί η χρήση αυτών των εναλλακτικών πηγών πρωτεϊνών, απαραίτητη προϋπόθεση αποτελεί η αξιολόγηση της επίδρασης αυτών των πρώτων υλών στην ανάπτυξη των ιχθύων, στην υγεία τους και ως προς την πεπτικότητα τους (Hartviksen *et al.* 2014).

Πίνακας 1.5. Χαρακτηριστική θρεπτική σύσταση (% επί ξηρής ουσίας) και προφίλ αμινοξέων (% πρωτεϊνών) του ιχθυαλεύρου, του αλεύρου υποπροϊόντων πουλερικών (πτηνάλευρο), του υδρολυμένου πετραλεύρου και του χοιραλεύρου.

	Ιχθυάλευρο	Πτηνάλευρο	Πτεράλευρο, υδρολυμένο	Χοιράλευρο
Θρεπτική σύσταση (% ξ.ο.)				
Υγρασία	6,7 – 12,3	2,2 - 14,7	3,6 - 20,4	2,4 - 5,6
Ολικές αζωτούχες ουσίες	58,2 – 78,6	47,3 – 86,1	69,7 – 98,1	53,7 - 68,8
Ολικές λιπαρές ουσίες	6,4 – 13,6	12,1 – 35,0	1,5 - 16,3	10,5 – 12,8
Τέφρα	11,4 – 28,4	2,7 – 23,8	1,2 – 20,8	13,4 – 24,1
Ολική Ενέργεια (Kj/g ξ.ο.)	18,4 – 22,8	19,9 - 27,4	22,3 – 26,9	18,1
Αμινοξέα (% πρωτεΐνης)				
Αλανίνη	6,3	5,5	4,7	7,5
Αργινίνη	6,2	6,6	6,8	6,6
Ασπαρτικό οξύ	9,1	6,9	6,7	9,2
Γλουταμινικό οξύ	12,6	10,9	10,5	16,6
Γλυκίνη	6,4	8,8	7,4	11,5
Ιστιδίνη	2,4	1,8	0,8	3,5
Ισολευκίνη	4,2	3,9	4,9	5,7
Κυστίνη	0,8	2,5	4,5	---
Λευκίνη	7,2	7Σ,0	8,0	8,0
Λυσίνη	7,5	4,4	2,1	6,5
Μεθειονίνη	2,7	1,4	0,7	2,2
Φαινυλαλανίνη	3,9	3,9	4,7	4,9
Προλίνη	4,2	8,0	9,6	--
Σερίνη	3,9	6,3	11,1	4,6
Θρεονίνη	4,1	3,9	4,7	2,3
Τρυπτοφάνη	1,0	0,7	0,6	--
Τυροσίνη	3,1	2,6	2,8	3,1
Βαλίνη	4,9	5,4	7,3	6,8

Πηγές: Στοιχεία ιχθυαλεύρου, πτηναλεύρου και υδρολυμένου πετραλεύρου από Feedipedia (2021). Στοιχεία χοιραλεύρου τροποποιημένα από Hernández *et al.* (2008) και Hernández *et al.* (2010).

1.6.2 Υδρολυμένο πτεράλευρο

Το υδρολυμένο πτεράλευρο είναι μία υψηλής βιολογικής αξίας ζωική πρωτεΐνη που παράγεται από την πλήρη υδρόλυση φρέσκων φτερών σφαγίων πουλερικών (όρνιθες κρεοπαραγωγής και γαλοπούλες) κατόπιν κατάλληλης επεξεργασίας (πλήρης υδρόλυση – θέρμανση – αποστείρωση - αποξήρανση – άλεση) (Feedipedia 2021). Είναι κατάλληλο για την παραγωγή ζωοτροφών, ιχθυοτροφών και τροφών κατοικίδιων ζώων μιας και έχει υψηλή περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη και ενέργεια. Συγκεκριμένα, η περιεκτικότητά του σε ολικές πρωτεΐνες κυμαίνεται στο 85%, αλλά η πεπτικότητά του από τα ψάρια θεωρείται χαμηλή επειδή περιέχουν υψηλά επίπεδα κερατίνης. Το πτεράλευρο θα πρέπει να ελέγχεται μέσω της πεπτικότητας της πεψίνης ώστε να διασφαλίζεται ότι η μεταποίηση του ήταν επαρκής.

Το πτεράλευρο, σε σχέση με το ιχθυάλευρο, είναι ελλειπές σε μεθειονίνη, λυσίνη και ιστιδίνη, αλλά περιέχει μεγάλη ποσότητα κυστίνης (Πιν. 1.5). Είναι πλούσιο σε υδατοδιαλυτά αμινοξέα όπως αργινίνη, προλίνη, γλυκίνη και ασπαρτικό οξύ. Η χαμηλή περιεκτικότητα φωσφόρου στο υδρολυμένο πτεράλευρο επιτρέπει την προσθήκη περισσότερων επαρκών πηγών φωσφόρου με αποτέλεσμα την καλύτερη πεπτικότητά του και τη χαμηλότερη περιεκτικότητά του στα περιττώματα και λύματα (Davies *et al.* 2009).

Οι μελέτες για τη χρήση του πτεραλεύρου στα σιτηρέσια των εκτρεφόμενων ιχθύων και καρκινοειδών είναι περιορισμένες, αλλά αποκτούν αυξημένο ερευνητικό ενδιαφέρον μετά την πρόσφατη επαναφορά των ΜΖΠ-μη μηρυκαστικών στην αλυσίδα ιχθυοτροφών της Ευρωπαϊκής Ένωσης. Έχει αποδειχθεί ότι η πρωτεΐνη του πτεραλεύρου, όταν χρησιμοποιείται ως η μοναδική χερσαία πηγή ζωικής πρωτεΐνης στο σιτηρέσιο, μπορεί να αντικαταστήσει με επιτυχία τα ιχθυάλευρα σε χαμηλά επίπεδα στα είδη όπως τα *Oncorhynchus tshawytscha* (Fowler 1990), *Epinephelus malabaricus* (Li *et al.*, 2009) και *Pacifastacus leniusculus* (Fuertes *et al.* 2014), σε σημαντικά επίπεδα αντικατάστασης στο *O. mykiss* (Bureau *et al.* 2000) και στο *Paralichthys olivaceus* (Kikuchi *et al.* 1994) και ακόμη και σε υψηλά επίπεδα

στο *Labeo rohita* (Hasan *et al.* 1997), *O. niloticus* (Bishop *et al.* 1995) και *D. labrax* (Campos *et al.* 2017). Ωστόσο, μελέτες αναφορικά με τη χρήση του περαλεύρου στη διατροφή της τσιπούρας (*S. aurata*) είναι εξαιρετικά περιορισμένες (Alexis 1997, Nengas *et al.* 1999, Nogueira *et al.* 2012).

1.6.3 Άλευρο υποπροϊόντων χοίρων

Το άλευρο υποπροϊόντων χοίρων (χοιράλευρο) είναι μια πηγή ζωικής πρωτεΐνης, η οποία παράγεται από υποπροϊόντα σφαγίων χοιρινών. Η περιεκτικότητά τους σε ολικές πρωτεΐνες είναι της τάξης του 80% και το περιεχόμενο λίπος άνω του 10%. Στον συγκριτικό Πίνακα 1.5 δίνεται η χαρακτηριστική σύσταση του χοιραλεύρου. Στη διεθνή βιβλιογραφία υπάρχουν ελάχιστες μελέτες για τη χρήση του χοιραλεύρου στα σιτηρέσια των εκτρεφόμενων ιχθύων, παρόλη την υψηλή διατροφική αξία του συγκεκριμένου αλεύρου. Ενδεικτικά, οι μελέτες των Hernández *et al.* (2008), Hernández *et al.* (2010) και Li *et al.* (2019) έδειξαν ότι το χοιράλευρο μπορεί να αντικαταστήσει σε υψηλά επίπεδα, αλλά όχι πλήρως, το ιχθυάλευρο της τροφής χωρίς να επιφέρει θνησιμότητες και μειωμένη απόδοση των μελετημένων ειδών όπως η γαρίδα (*Litopenaeus vannamei*), η τιλάπια του Νείλου (*Oreochromis niloticus*) και το γατόψαρο (*Ictalurus punctatus*).

1.7. Μεταβολικές επιδράσεις της αντικατάστασης του ιχθυαλεύρου από ΜΖΠ μη μηρυκαστικών στη θρεπτική σύσταση και στην ηπατική και εντερική ιστομορφολογία των ιχθύων

Αλλαγές στη θρεπτική σύσταση του σιτηρεσίου, και ιδιαίτερα αλλαγές στην πηγή της διαιτητικής πρωτεΐνης, ενδέχεται να επιφέρουν σημαντικές διαφοροποιήσεις σε μια σειρά από μεταβολικούς δείκτες των ιχθύων που με τη σειρά τους μπορούν να επηρεάσουν την φυσιολογία θρέψης τους και τελικά την επιβίωση, την υγεία και την ανάπτυξή τους. Στην παρούσα υποενότητα θα περιγραφεί η σημασία των μεταβολικών επιδράσεων της αντικατάστασης του ιχθυαλεύρου της τροφής από ΜΠΖ μη μηρυκαστικών, κυρίως στη θρεπτική σύσταση των ιχθύων και στην ιστομορφολογία των πεπτικών οργάνων, οι οποίες και μελετήθηκαν στην παρούσα διδακτορική διατριβή.

Η θρεπτική σύσταση των ιχθύων αναφέρεται στην περιεκτικότητα του σώματος και των διαφόρων ιστών τους σε θρεπτικά συστατικά, όπως οι ολικές πρωτεΐνες, τα ολικά λίπη, η ολική ανόργανη ουσία, η ολική ενέργεια και η ξηρή ουσία, μεταξύ άλλων. Η θρεπτική σύσταση των ιχθύων έχει ενδιαφέρον τόσο για τους ιχθυοκαλλιεργητές όσο και για τους καταναλωτές μιας και αποτελεί δείκτη τόσο της γενικότερης φυσιολογικής κατάστασης των ιχθύων (Shearer 1994), όσο και της θρεπτικής του αξίας (Huss 1995, Karapanagiotidis 2017) ως τρόφιμο για τον άνθρωπο. Παράλληλα, η μελέτη της θρεπτική σύστασης των ιχθύων επιτρέπει την αξιολόγηση της αποδοτικότητας του μεταβολισμού, της πεπτικότητας και της εναπόθεσης των θρεπτικών συστατικών της τροφής στο σώμα των ιχθύων (Shearer 1994, Chowdhury & Bureau 2009). Επίσης, η θρεπτική σύσταση των ιχθύων επηρεάζει σημαντικά την επιβίωση, την ανάπτυξη, την αναπαραγωγή και τη γενικότερη υγεία των ιχθύων (Gardiner & Geddes 1980, Thorpe *et al.* 1998).

Είναι καθολικά γνωστό ότι η τροφή επηρεάζει σημαντικά τη θρεπτική σύσταση του σώματος και των ιστών των ιχθύων (Karapanagiotidis 2017; Shearer 1994). Επίσης, είναι γνωστό ότι αλλαγές στην πρωτεϊνική πηγή του σιτηρεσίου επιφέρουν αλλαγές στη θρεπτική σύσταση των ιχθύων (El-Sayed 1998, Hernandez *et al.* 2014). Σε μελέτες που έχουν διεξαχθεί για την αντικατάσταση του ιχθυαλεύρου από διάφορες ΜΖΠ μη μηρυκαστικών στα σιτηρέσια διαφόρων ειδών ιχθύων έχει αποδειχθεί αυτή η επίδραση, χωρίς ωστόσο να διαφαίνεται μια ξεκάθαρη τάση. Για παράδειγμα, η μερική αντικατάσταση του ιχθυαλεύρου έχει οδηγήσει τόσο σε αυξημένη (El-Sayed 1998, Baboli *et al.* 2013, González-Rodríguez *et al.* 2016) όσο και σε μειωμένη λιποπεριεκτικότητα (Gallagher & LaDouceur 1995, Nengas *et al.* 1999) στους ιστούς των ιχθύων, η οποία εξαρτάται από διάφορους παράγοντες όπως τη συνολική κατανάλωση της τροφής, το ολικό λίπος, το προφίλ λιπαρών οξέων της τροφής και την πεπτικότητα του. Κάποιες μελέτες έχουν υποστηρίξει ότι ακόμα και υψηλά ποσοστά αντικατάστασης του ιχθυαλεύρου από ΜΖΠ μη μηρυκαστικών δεν επηρεάζουν τη συνολική θρεπτική σύσταση των ιχθύων (Rawles *et al.* 2011; Hernandez *et al.* 2014). Σε κάποια είδη έχει δειχθεί ότι η περιεκτικότητα του σώματος και των ιστών τους σε ολικές πρωτεΐνες παραμένει ανεπηρέαστη από την αντικατάσταση του ιχθυαλεύρου (Gallagher & LaDouceur, 1995, El-Sayed 1998; Rawles *et al.* 2011; Zapata *et al.* 2016), ενώ αντίθετα σε άλλα είδη έχουν ανακοινωθεί σημαντικές διαφοροποιήσεις που οφείλονται στη διαφορετική εναπόθεση της πρωτεΐνης και των αμινοξέων των ΜΖΠ (Baboli *et al.* 2013; González-Rodríguez *et al.* 2016).

Πέραν της θρεπτικής σύστασης των ιχθύων, είναι γνωστό ότι οποιαδήποτε μεταβολή της πρωτεϊνικής πηγής στο σιτηρέσιο επηρεάζει και τη λειτουργικότητα του πεπτικού συστήματος, κυρίως εκείνη του ήπατος και του εντέρου (Martínez-Llorens *et al.* 2012, Hartviksen *et al.* 2014). Στους ιχθύες ο κύριος ρόλος του ήπατος είναι ο μεταβολισμός των τελικών προϊόντων, της απορρόφησης από τον πεπτικό σωλήνα, η σύνθεση μεγάλων μορίων

από μικρομοριακές ενώσεις, η αποδόμηση τοξικών ουσιών και η παραγωγή χολής (Genten *et al.* 2009). Στο ηπατικό παρέγχυμα εντοπίζονται πολυγωνικά ηπατοκύτταρα (έχουν ευδιάκριτο κεντρικό πυρήνα με έντονη ετεροχρωματίνη), κολποειδή (στα οποία λαμβάνει χώρα η ανταλλαγή ουσιών μεταξύ ηπατοκυττάρων και αίματος), χοληφόροι πόροι, αρτηρίες, φλέβες και παγκρεατικές νησίδες εξωκρινούς και ενδοκρινούς παγκρέατος (Βερίλλης & Μεντέ 2017). Σε ιχθύες που έχουν τραφεί, τα κυψελοειδή κύτταρα του εξωκρινούς πεγκρέατος περιέχουν μεγάλο αριθμό από διπλοθλαστικά εκκριτικά προενζυμικά κοκκία. Τα πεπτικά ένζυμα εκκρίνονται από τα κύτταρα αυτά μέσα στο πρόσθιο μέρος του εντέρου με σκοπό τη λύση των πρωτεϊνών, των λιπιδίων και των υδατανθράκων (Genten *et al.* 2009). Το έντερο είναι ο σημαντικότερος ιστός απορρόφησης θρεπτικών στοιχείων όπου λαμβάνει χώρα η έκκριση ενζύμων που ολοκληρώνουν την πεπτική διεργασία. Το έντερο των ιχθύων αποτελείται από τον βλεννογόνο χιτώνα όπου υπάρχει μονό κυλινδρικό επιθήλιο (Genten *et al.* 2009). Τα κύτταρα που αποτελούν τον χιτώνα αυτών είναι τα εντεροκύτταρα και τα βλεννοπαραγωγά κύτταρα (goblet cells). Τα βλεννοπαραγωγά κύτταρα είναι διάσπαρτα ανάμεσα στα εντεροκύτταρα των λαχμών, αυξάνονται προς την έδρα και περιέχουν σφαιρίδια βλέννης με όξινες γλυκοπρωτεΐνες, που αποβάλλονται στον αυλό.

Η ιστολογική εξέταση του ήπατος και του εντέρου των ιχθύων διερευνάται για την αξιολόγηση της επίδρασης της τροφής ή των συστατικών αυτής στο μεταβολισμό και στη φυσιολογία θρέψης τους και είναι σημαντική για την κατανόηση πιθανών παθολογικών αλλοιώσεων και αντιδράσεων σε μη ισορροπημένη διατροφή. Είναι γνωστό ότι οποιαδήποτε μεταβολή της πρωτεϊνικής πηγής στο σιτηρέσιο επηρεάζει τη λειτουργικότητα του πεπτικού συστήματος (Martínez-Llorens *et al.* 2012, Hartviksen *et al.* 2014). Ένα λειτουργικό πεπτικό σύστημα αποτελεί προϋπόθεση για τη βέλτιστη ανάπτυξη των ψαριών και επομένως η μελέτη τυχόν πιθανών αλλοιώσεων και μεταβολών στην ιστομορφολογία του πεπτικού συστήματος είναι θεμελιώδης για την αξιολόγηση της χρήσης μιας εναλλακτικής πρωτεΐνης στο

σιτηρέσιο. Στη βιβλιογραφία, οι περισσότερες μελέτες έχουν επικεντρωθεί στις επιδράσεις που έχουν οι φυτικές πρωτεΐνες ως υποκατάστατα των ιχθυάλευρων (Baeza-Ariño *et al.* 2016) με την υψηλή υποκατάσταση να επιφέρει σημαντικές αλλοιώσεις στους ηπατικούς και εντερικούς ιστούς των υπό εξέταση ιχθύων, όπως ο μειωμένος αριθμός βλεννοπαραγωγών κυττάρων, αυξημένη συσσώρευση λιπιδίων στα ηπατοκύτταρα, λεπτότερος βλεννογόνος χιτώνας, βραχύτερες και λεπτότερες εντερικές λάχνες, στεάτωση, υπερτροφία του υποβλεννογόνου στρώματος και λύση της δομικής ακεραιότητας του εντέρου και του ήπατος (Martínez-Llorens *et al.* 2012, Baeza-Ariño *et al.* 2016; Sitjà-Bobadilla *et al.* 2005, Kokou *et al.* 2015). Αυτές οι μεταβολές οφείλονται κυρίως στην παρουσία διαφόρων αντιθρεπτικών ουσιών (Krogdahl *et al.* 2010) που περιέχονται στα φυτικά άλευρα, και οι οποίες με τη σειρά τους προκαλούν παθοφυσιολογικές αλλαγές στο γαστρεντερικό σωλήνα μειώνοντας την πεπτικότητα των θρεπτικών ουσιών για τους ιχθύες.

Αντίθετα, πολύ λίγα είναι γνωστά για τις επιδράσεις των χερσαίων ζωικών πρωτεϊνών ως υποκατάστατων των ιχθυάλευρων στην ιστομορφολογία του ήπατος και του εντέρου των ιχθύων. Τα ευρήματα από τις περιορισμένες μελέτες που έχουν αναφερθεί μέχρι σήμερα έχουν αποκαλύψει ότι τα υψηλά επίπεδα ένταξης χερσαίων ζωικών πρωτεϊνών στο σιτηρέσιο μπορεί να προκαλέσουν ηπατική στεάτωση και να αυξήσουν την συσσώμатωση λιπιδίων στα ηπατοκύτταρα στο *Lateolabrax japonicus* (Hu *et al.* 2013), στο υβρίδιο *Epinephelus fuscoguttatus* ♀ × *Epinephelus lanceolatus* ♂ (Ye *et al.* 2019, Zhou *et al.* 2020) και στο *Lates calcarifer* (Chaklader *et al.* 2020). Επιπλέον, έχουν αναφερθεί αρνητικές επιπτώσεις στην εντερική ιστολογία με την αντικατάσταση ιχθυάλευρου από χερσαίες ζωικές πρωτεΐνες (Chaklader *et al.* 2020, Yu *et al.* 2020).

1.8 Σκοπός διδακτορικής διατριβής

Είναι πλέον αποδεκτό πως μελλοντικά τα ιχθυάλευρα θα χρησιμοποιούνται με φειδώ στις ιχθυοτροφές και ίσως τελικά αποτελέσουν συστατικά-κλειδιά μόνο για συγκεκριμένους τύπους ιχθυοτροφών (π.χ. ατελών ιχθυδίων, προπάχυνση, γεννήτορες) και μειωθούν κατά πολύ στις τροφές της κύριας ανάπτυξης (Tacon & Metian 2008). **Οι σημερινές προκλήσεις για τη βιομηχανία των ιχθυοκαλλιέργειών είναι η αναζήτηση εναλλακτικών πρωτεϊνικών πηγών για τους εκτρεφόμενους ιχθύες, η παραγωγή των οποίων θα είναι οικονομικά βιώσιμη και φιλική προς το περιβάλλον.**

Η παρούσα διδακτορική διατριβή διεξήχθη προς την κατεύθυνση εξεύρεσης εναλλακτικών διατροφικών πηγών, με βάση τις πρωτεΐνες των ΜΖΠ μη μηρυκαστικών, για την διατροφή ιχθύων στις υδατοκαλλιέργειες. Σκοπός της μελέτης ήταν η διερεύνηση της δυνατότητας χρήσης διαφόρων ΜΖΠ μη μηρυκαστικών, και συγκεκριμένα του αλεύρου υποπροϊόντων πουλερικών, του υδρολυμένου περαλεύρου και του χοιρινού αλεύρου, ως υποκατάστατα του ιχθυαλεύρου στο σιτηρέσιο της εκτρεφόμενης τσιπούρας (*S. aurata*). Τα τρία αυτά άλευρα θεωρούνται από τις πλέον κατάλληλες ΜΖΠ μη μηρυκαστικών στη διατροφή των εκτρεφόμενων ιχθύων, όπως περιγράφηκε προηγουμένως, και γίνεται χρήση τους στις εμπορικές ιχθυοτροφές. Για τον σκοπό αυτόν, πραγματοποιήθηκαν συνολικά πέντε (5) διατροφικά πειράματα με την τσιπούρα και η αξιολόγηση της χρήσης των ΜΖΠ μη μηρυκαστικών στο σιτηρέσιο περιλάμβανε διάφορες παραμέτρους ανάπτυξης των ιχθύων και αξιοποίησης της τροφής, την επίδρασή τους στη θρεπτική σύσταση ολόκληρου του σώματος και του μυϊκού ιστού των ιχθύων. Επιπρόσθετα, αξιολογήθηκε η επίδρασή τους στην ιστολογία του ήπατος, που αποτελεί το κύριο όργανο αποθήκευσης θρεπτικών στους ιχθύες, αλλά και του εντέρου, όπου συμβαίνει η κύρια πέψη και απορρόφηση των θρεπτικών. Τέλος, μελετήθηκε η επίδραση αυτών των διατροφικών μεταχειρίσεων στο κόστος και την οικονομικότητα του σιτηρεσίου.

Λαμβάνοντας υπόψη την εγκεκριμένη επανεισαγωγή των ΜΖΠ μη μηρυκαστικών ζώων στην αλυσίδα ιχθυοτροφών της Ευρωπαϊκής Ένωσης, καθίσταται αναγκαία η αξιολόγηση της χρήσης τους στη διατροφή των εκτρεφόμενων ιχθύων. Η έρευνα θα πρέπει να επικεντρωθεί στη διερεύνηση της καταλληλότητας και των μέγιστων επιπέδων συμπερίληψής τους στα σιτηρέσια, αντικαθιστώντας περαιτέρω τα ιχθυάλευρα στις ιχθυοτροφές. Οι προκύπτουσες ερευνητικές γνώσεις θα βοηθήσουν την ιχθυοκαλλιέργεια να μειώσει ενδεχομένως περαιτέρω τα επίπεδα ένταξης των ιχθυάλεурων στα σιτηρέσια, ενισχύοντας τη βιωσιμότητα και την αποδοτικότητα του τομέα. Επίσης, οι ερευνητικές γνώσεις θα βοηθήσουν στην ενίσχυση των στόχων της Κοινής Αλιευτικής Πολιτικής για ταυτόχρονη βιώσιμη αλιεία και υδατοκαλλιέργεια.

Ειδικότερα, η καταλληλότητα των ΜΖΠ μη μηρυκαστικών στις ιχθυοτροφές θα μπορούσε να βοηθήσει τον τομέα της ιχθυοκαλλιέργειας να πετύχει (Karapanagiotidis 2014, Hu *et al.* 2013, Aragao *et al.* 2020, Hodar *et al.* 2020):

- Μείωση της αλιευτικής πίεσης στους αλιευόμενους ιχθυοπληθυσμούς από όπου προέρχονται τα ιχθυάλευρα.
- Περαιτέρω μείωση της εξάρτησης του τομέα σε έναν πεπερασμένο φυσικό πόρο που βρίσκεται υπό διαρκή μείωση, όπως τα ιχθυάλευρα.
- Ενίσχυση της ευρωπαϊκής επάρκειας και διαθεσιμότητας των ιχθυοτροφών.
- Μείωση των ευρωπαϊκών εισαγωγών σε συγκεκριμένα άλευρα που χρησιμοποιούνται σήμερα εκτενώς σε ιχθυοτροφές, και δεν παράγονται εντός της ΕΕ., όπως άλευρο σόγιας, καλαμπόκι κ.λπ.
- Μείωση του κόστους των ιχθυοτροφών.
- Υιοθέτηση «καλών πρακτικών» που ενισχύουν την περιβαλλοντική αειφορία της ιχθυοκαλλιέργειας και παράλληλα διασφαλίζουν την ποιότητα και ασφάλεια του ιχθύος ως τελικού προϊόντος.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

Υλικά και μέθοδοι

Στο παρόν κεφάλαιο περιγράφονται τα υλικά και οι μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν σε όλα τα διατροφικά πειράματα που διεξήχθησαν για τις ανάγκες της διδακτορικής διατριβής. Οι επιμέρους διαφοροποιήσεις των πειραματικών συνθηκών αναφέρονται στα αντίστοιχα κεφάλαια.

2.1 Πειραματικά σιτηρέσια και παρασκευή ιχθυοτροφών

Για τις ανάγκες των διατροφικών πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν: α) ένα ιχθυάλευρο με περιεκτικότητα ολικών πρωτεϊνών 640 g/Kg, β) ένα άλευρο υποπροϊόντων πουλερικών με περιεκτικότητα ολικών πρωτεϊνών 682 g/Kg, γ) ένα υδρολυμένο πετράλευρο με περιεκτικότητα ολικών πρωτεϊνών 856 g/Kg και δ) ένα άλευρο υποπροϊόντων χοίρων με περιεκτικότητα ολικών πρωτεϊνών 626 g/Kg (Πίν. 2.1). Σε όλα τα διατροφικά πειράματα, καταρτίστηκαν μια σειρά από ισοπρωτεϊνικά και ισοενεργειακά σιτηρέσια, όπου η πρωτεΐνη του ιχθυαλεύρου της τροφής-μάρτυρα (FM) αντικαταστάθηκε μερικώς ή πλήρως από ένα εκ των τριών υπό μελέτη Μεταποιημένων Ζωικών Πρωτεϊνών (MZΠ) μη μηρυκαστικών. Το σιτηρέσιο μάρτυρας (FM) κάθε διατροφικού πειράματος καταρτίστηκε σύμφωνα με τις γνωστές θρεπτικές απαιτήσεις των ιχθυδίων τσιπούρας στο στάδιο της έναρξης της πάχυνσης (Παπουτσόγλου 2008, FAO 2022c), ικανοποιώντας πλήρως τις απαιτήσεις σε απαραίτητα αμινοξέα (Kaushik 1998) και απαραίτητα λιπαρά οξέα (Ibeas *et al.* 2004) περιέχοντας ένα μίγμα πρωτεϊνών από ιχθυάλευρο κατά 75% και από φυτικά άλευρα (25%), ομοιάζοντας μια τυπική μίξη πρωτεϊνών των εμπορικών τροφών της τσιπούρας σε αυτό το στάδιο ανάπτυξης.

Η γλουτένη καλαμποκιού χρησιμοποιήθηκε ως πηγή φυτικών πρωτεϊνών, ενώ το σιτάρι χρησιμοποιήθηκε ως ενεργειακή πηγή και ως πρωτεϊνικό αντιστάθμισμα για τον καθορισμό των ισοπρωτεϊνικών και ισοενεργειακών σιτηρεσίων. Ταυτόχρονα, το σιτάρι χρησιμοποιήθηκε ως ενισχυτικό της συνεκτικότητας του συμπέκτου.

Πίνακας 2.1. Θρεπτική σύσταση (% ως έχει) και προφίλ αμινοξέων (% πρωτεΐνης) του ιχθυαλεύρου, του αλεύρου υποπροϊόντων πουλερικών (πτηνάλευρο), του υδρολυμένου πτεράλευρου και του αλεύρου υποπροϊόντων χοίρων (χοιράλευρο), που χρησιμοποιήθηκαν στις πειραματικές ιχθυοτροφές.

Θρεπτική σύσταση (%)	Ιχθυάλευρο	Πτηνάλευρο	Πτεράλευρο	Χοιράλευρο
Υγρασία	7,9	4,9	4,0	4,8
Ολικές αζωτούχες ουσίες	75,4	68,2	85,6	62,6
Ολικές λιπαρές ουσίες	11,0	7,9	6,8	15,4
Υδατάνθρακες	1,6	6,2	1,7	6,9
Τέφρα	13,6	12,7	1,8	10,3
Ενέργεια (KJ/g)	21,09	20,3	23,9	22,1
Σύσταση αμινοξέων (% πρωτεΐνης)				
Αλανίνη	6,1	6,9	4,7	8,9
Αργινίνη	5,8	6,4	6,8	7,1
Ασπαρτικό οξύ	7,8	8,0	6,7	8,4
Κυστίνη	0,8	0,9	3,5	0,8
Γλουταμινικό οξύ	12,6	12,4	10,5	14,5
Γλυκίνη	5,9	10,1	7,9	17,3
Ιστιδίνη	2,2	1,8	1,0	2,0
Ισολευκίνη	4,3	3,6	4,8	3,1
Λευκίνη	7,0	6,6	8,3	6,3
Λυσίνη	7,5	5,9	2,0	6,0
Μεθειονίνη	2,8	1,9	0,6	1,6
Φαινυλαλανίνη	3,8	3,6	4,9	3,5
Προλίνη	3,8	6,3	12,4	---
Σερίνη	4,0	3,6	8,8	3,6
Θρεονίνη	4,1	3,6	4,6	3,5
Τρυπτοφάνη	1,1	0,9	0,6	---
Τυροσίνη	2,9	2,9	2,8	6,4
Βαλίνη	4,9	4,6	7,6	4,3

Το ιχθυέλαιο χρησιμοποιήθηκε ως κύρια πηγή λίπους, ενέργειας και ταυτόχρονα για την ικανοποίηση των διαιτητικών απαιτήσεων των ιχθυδίων σε ω-3 πολυακόρεστα λιπαρά οξέα. Όλα τα σιτηρέσια κάθε διατροφικού πειράματος περιείχαν παρόμοια επίπεδα

προμιγμάτων βιταμινών και ανόργανων στοιχείων (0,3%), φωσφορικού μονοασβέστιου (0,3%), και βιταμινών E (0,1%) και C (0,1%), ενώ σε κάποιες περιπτώσεις προστέθηκε και αντιμυκητιακή ουσία κατά 0,2% για την μακρόχρονη συντήρηση των τροφών.

Όλες οι πρώτες ύλες αλέσθηκαν σε μύλο άλεσης (KoMo Fidibus, PGS, Germany) και αναμίχθηκαν, ανάλογα με τον καταρτισμό, σε αναμίκτη (Maxximum MUMXL20G, Bosch). Το ιχθυέλαιο και το ζεστό νερό προστέθηκαν έπειτα, ώστε να παραχθεί ομοιογενής ζύμη, η οποία κατόπιν πελλετοποιήθηκε στις εγκαταστάσεις του Τμήματος Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος (Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Βόλος), μέσω πελλετοποίησης απλής συμύκνωσης με τη χρήση πελλετομηχανής τύπου California Pellet Mill (CL-2, Imeco GmbH, Ολλανδία, Εικ. 2.1) στη μορφή βυθιζόμενου σύμπηκτου διαμέτρου 1,5 mm. Τα σύμπηκτα στη συνέχεια ξηράνθηκαν σε απαγωγό αερίων και σε θερμοκρασία δωματίου για 24 ώρες, για να αποκτήσουν επιθυμητή υγρασία (<12%) και μετά αποθηκεύτηκαν σε σφραγισμένους από αέρα σάκους, στους 4 ° C μέχρι να χρησιμοποιηθούν.

2.2 Συνθήκες εκτροφής των ιχθυδίων

Για τις ανάγκες των διατροφικών πειραμάτων, χρησιμοποιήθηκαν ιχθύδια τσιπούρας που προήλθαν από τον ιχθυογεννητικό σταθμό «ΣΕΛΟΝΤΑ ΙΧΘΥΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ Α.Ε (νυν PHILOSOFISH) (Πελασγία Φθιώτιδας)» και τα οποία μεταφέρθηκαν στον πειραματικό σταθμό του Τμήματος. Η μεταφορά έλαβε χώρα σε δεξαμενές 500 L και με συνεχή παροχή οξυγόνου. Το μέγεθος των ιχθυδίων που επιλέχθηκε ήταν τέτοιο ώστε να μελετηθεί η επίδραση των ΜΖΠ μη μηρυκαστικών στο νεαρό στάδιο ανάπτυξής τους. Τα ιχθύδια τοποθετήθηκαν σε γυάλινα ενυδρεία χωρητικότητας 125 L (50 cm x 50 cm x 50 cm) (Εικ. 2.2), το καθένα με κλειστό σύστημα ανακύκλωσης θαλασσινού νερού. Κάθε ενυδρείο ήταν εξοπλισμένο με μηχανικό και βιολογικό φίλτρο (τύπου «SUB»), με δυνατότητα διήθησης 2000 L/h, κλασματοποιητή πρωτεϊνών (protein skimmer), αντλία νερού, οξονιστή,

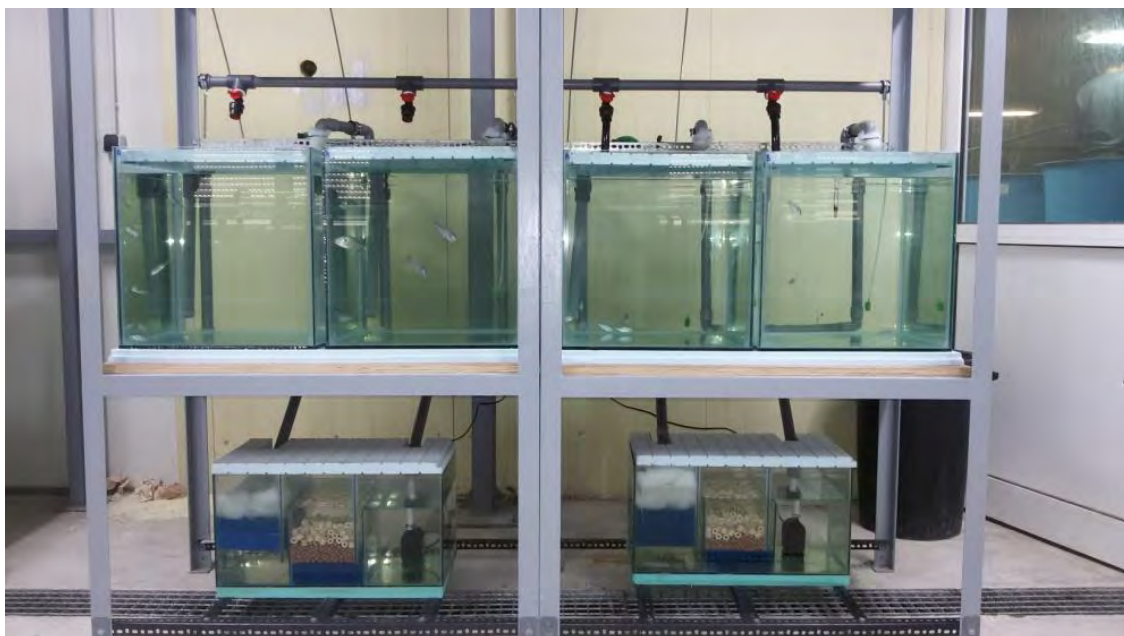
θερμαντήρα, αντλία αέρα και αερόπετρα για τη διάχυσή του. Το νερό βρύσης που χρησιμοποιήθηκε διηθείτο αρχικά μέσα από συσκευή αντίστροφης ώσμωσης και στη συνέχεια λάμβανε χώρα πρόσθεση συνθετικού αλατιού (Aquaforest-Sea Salt) δημιουργώντας συνθετική αλατότητα 33 ‰. Η θερμοκρασία του νερού και του χώρου ήταν σταθερή καθ' όλη τη διάρκεια των διατροφικών πειραμάτων με την χρήση κλιματιστικού και θερμαντικών σωμάτων εμποτισμένων στα ενυδρεία.



Εικόνα 2.1. Πελλετομηχανή τύπου California Pellet Mill CL-2, Imeco GmbH (Φωτογραφία συγγραφέα).

Η συνεχή παρακολούθηση των φυσικοχημικών παραμέτρων του νερού των πειραματικών δεξαμενών ελάμβανε χώρα καθ' όλη τη διάρκεια των πειραμάτων με τη χρήση φορητών ηλεκτρονικών οργάνων και χρωματομετρικών εξετάσεων. Η θερμοκρασία του νερού διατηρήθηκε στους $21,0 \pm 1,0$ °C, το pH στους $8,0 \pm 0,4$, η αλατότητα στους $33 \pm 0,5$ g/L και το διαλυμένο οξυγόνο $>6,5$ mg/L. Επίσης, σε τακτά χρονικά διαστήματα προσδιορίστηκε η συγκέντρωση της ολικής αμμωνίας (<0.1 mg/L), καθώς επίσης και των νιτρωδών (NO_2) και νιτρικών (NO_3) ιόντων με την χρήση εμπορικών χρωματογραφικών δοκιμαστικών διαλυμάτων. Για τη διατήρηση καλής ποιότητας του νερού πραγματοποιήθηκε σε καθημερινή

βάση μερική ανταλλαγή (περίπου 5%) του όγκου νερού του κάθε ενυδρείου με παράλληλο σιφωνισμό των στερεών υπολειμμάτων. Η τεχνητή φωτοπερίοδος που εφαρμόστηκε ήταν 12 ώρες φως – 12 ώρες σκότος με την εναλλαγή να πραγματοποιείται στις 08:00 και 20:00, αντίστοιχα.



Εικόνα 2.2: Κλειστό σύστημα εκτροφής (Φωτογραφία συγγραφέα).

2.3 Δειγματοληψίες

Πριν την έναρξη των διατροφικών πειραμάτων, συλλέχθηκαν 20 ιχθύδια από κάθε έναν από τους αρχικούς πληθυσμούς με σκοπό την πραγματοποίηση αναλύσεων θρεπτικής σύστασης στο ολικό τους σώμα. Τα δείγματα αποθηκεύτηκαν σε κατάψυξη (-40 °C) μέχρι την περάτωση των αναλύσεων.

Κατά τη διάρκεια των διατροφικών πειραμάτων πραγματοποιήθηκαν κάθε 30 ημέρες και μέχρι την τελική δειγματοληψία, μετρήσεις του ολικού βάρους ατομικά για κάθε ιχθύδιο χρησιμοποιώντας ζυγό ακριβείας δύο δεκαδικών ψηφίων (0,01 g), με σκοπό τον προσδιορισμό των παραμέτρων ανάπτυξής τους. Σε όλες τις μεταχειρίσεις τα ιχθύδια αναισθητοποιήθηκαν με φαινοξυαιθανόλη σε συγκέντρωση 0,10 ml/L. Στο τέλος κάθε

διατροφικού πειράματος, αφέθηκαν σε ασιτία για 24 ώρες πριν την τελική δειγματοληψία, έτσι ώστε να απορροφηθεί όλη η τροφή από τους οργανισμούς τους. Στη συνέχεια τα ιχθύδια θανατώθηκαν παρατείνοντας την παραμονή τους σε αναισθητικό αυξανόμενης δοσολογίας (φαινοξυαιθανόλη σε συγκέντρωση 1,0 ml/L) και μετά άμεση τοποθέτησή τους σε πάγο, σύμφωνα με την οδηγία 2010/63/EE για την προστασία των ζώων που χρησιμοποιούνται για επιστημονικούς σκοπούς. Κατόπιν, πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις βάρους σώματος και ολικού μήκους ατομικά για κάθε ιχθύδιο και στη συνέχεια τα δείγματα αποθηκεύτηκαν στους -40 °C, με σκοπό την ανάλυση της θρεπτικής σύστασης ολόκληρου του σώματός τους, του μυϊκού ιστού τους και του ήπατός τους. Η μέτρηση του ολικού μήκους σώματος των ιχθυδίων πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια ιχθυόμετρου (ακρίβεια 0,1 cm).

Για τις αναλύσεις της θρεπτικής σύστασης ολόκληρου του σώματος των ιχθυδίων δειγματίστηκε τυχαία ένας αριθμός τεσσάρων ατόμων από κάθε ενυδρείο και συνολικά τουλάχιστον 12 άτομα από κάθε διατροφική ομάδα. Τα ιχθύδια ομογενοποιήθηκαν με χρήση οικιακού μίξερ (Delonghi) και πάρθηκαν δείγματα ομογενοποιημένου σώματος από κάθε άτομο. Επιπρόσθετα, για τις αναλύσεις της θρεπτικής σύστασης του μυϊκού ιστού τους δειγματίστηκε τυχαία στο τέλος της πειραματικής διαδικασίας ένας αριθμός τεσσάρων ατόμων από κάθε ενυδρείο και συνολικά τουλάχιστον 12 άτομα από κάθε διατροφική ομάδα. Από κάθε άτομο πάρθηκε, με τη βοήθεια λαβίδας και νυστεριού, τμήμα του ραχιαίου μυϊκού ιστού αποφεύγοντας οστά, δέρμα, αίμα και το τμήμα που εφάπτεται στο δέρμα και κατόπιν ομογενοποιήθηκαν και αποθηκεύτηκαν στους -40 °C, μέχρι τη στιγμή των χημικών αναλύσεων. Από κάθε άτομο, επίσης, συλλέχθηκε επιμελώς και αμέσως το ήπαρ και τα σπλάχνα για την καταγραφή του ηπατοσωματικού και του ενδοσπλαχνικού δείκτη, αντίστοιχα. Στη συνέχεια, το ήπαρ και το πρόσθιο έντερο κάθε ατόμου τεμαχίστηκε και τα ιστοτεμαχίδια τοποθετήθηκαν σε διάλυμα Davidson για 24 ώρες και κατόπιν σε διάλυμα

ουδέτερης ρυθμιζόμενης φορμόλης 10% (Johnson *et al.* 2009) με σκοπό την πραγματοποίηση ιστολογικών αναλύσεων.

2.4 Αναλύσεις θρεπτικής σύστασης

2.4.1 Προσδιορισμός υγρασίας και ξηρής ουσίας

Ο προσδιορισμός υγρασίας και ξηρής ουσίας στα πειραματικά σιτηρέσια και στα δείγματα μυϊκού ιστού, ήπατος και ολόκληρου του σώματος των ψαριών, πραγματοποιήθηκε μέσω της ξήρανσης 1-2 g των δειγμάτων σε φούρνο αέρα για 24 ώρες στους 105 °C, μέχρι απόκτησης σταθερού βάρους (Association of Official Analytical Chemists, AOAC 1995). Μετά τη ξήρανση, τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε αφυγραντήρα και αφέθηκαν να ψυχθούν. Το ποσοστό της υγρασίας/ ξηρής ουσίας υπολογίζεται ως εξής:

$$W_{\text{ξηρής ουσίας}} (g) = W_{\text{μικτό δείγματος και δισκίου}} (g) - W_{\text{δισκίου}} (g)$$

$$\text{Ξηρή ουσία \%} = (W_{\text{ξηρής ουσίας}} (g) \times 100) / W_{\text{δείγματος}} (g)$$

Όμοια,

$$W_{\text{υγρασία}} (g) = W_{\text{δείγματος}} (g) - ((W_{\text{δείγματος μετά την ξήρανση}} (g) - W_{\text{δισκίου}} (g)))$$

$$\text{Υγρασία \%} = (W_{\text{υγρασία}} (g) \times 100) / W_{\text{δείγματος}} (g)$$

όπου W = βάρος σε g

2.4.2 Προσδιορισμός ολικών λιπαρών ουσιών

Ο προσδιορισμός των ολικών λιπαρών ουσιών στα πειραματικά σιτηρέσια και στα δείγματα μυϊκού ιστού, ήπατος και ολόκληρου του σώματος των ψαριών έγινε με τη μέθοδο εκχύλισης Soxhlet (AOAC 1995). Σε γυάλινο δοχείο εκχύλισης προστέθηκαν 3 πέτρες βρασμού και καταγράφηκε το μικτό βάρος τους σε ζυγό ακριβείας 4 δεκαδικών ψηφίων. Στη συνέχεια τοποθετήθηκε χάρτινος ηθμός στα δοχεία. Ζυγίστηκε ποσότητα δείγματος βάρους 2 g και μεταφέρθηκε στον ηθμό του δοχείου. Στο γυάλινο δοχείο εκχύλισης προστέθηκαν 150

ml πετρελαϊκού αιθέρα, στον οποίο εμβαπτίστηκε ο χάρτινος ηθμός που περιείχε το δείγμα. Το γυάλινο δοχείο εκχύλισης μαζί με τον χάρτινο ηθμό μεταφέρθηκε σε ειδική συσκευή εκχύλισης λιπαρών ουσιών (Soxtherm Multistat/SX PC, Sox-416 Macro, Gerhard, Germany, Εικ. 2.3).



Εικόνα 2.3. Συσκευή εκχύλισης λίπους (Φωτογραφία συγγραφέα).

Κατά τη διαδικασία της εκχύλισης, το δείγμα θερμάνθηκε στους 150 °C με την παρουσία του οργανικού διαλύτη, όπου έλαβε χώρα το πρώτο στάδιο της εκχύλισης. Έπειτα, ο οργανικός διαλύτης απορροφήθηκε και εκπλύθηκε στο δείγμα για 1,5 h, όπου έλαβε χώρα το δεύτερο στάδιο της εκχύλισης. Κατόπιν, απορροφήθηκε ο διαλύτης για 15 min με αποτέλεσμα τα ολικά λιπίδια του δείγματος να παραμείνουν στον πάτο του δοχείου εκχύλισης. Για την απομάκρυνση των υπολειμμάτων πετρελαϊκού αιθέρα το δοχείο (χωρίς τον χάρτινο ηθμό) μεταφέρθηκε σε φούρνο για 15 min στους 60 °C. Στη συνέχεια, τοποθετήθηκε σε αφυγραντήρα για τουλάχιστον 1 h και πάρθηκε η μέτρηση μικτού βάρους. Το καθαρό βάρος των λιπαρών ουσιών δίνεται από τον τύπο:

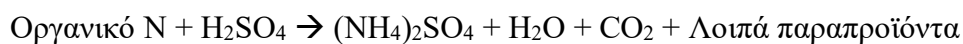
$$\text{Ολικά λιπίδια (\%)} = (W_{\text{τελικό δοχείου εκχύλισης (g)}} - W_{\text{αρχικό δοχείου εκχύλισης (g)}}) * 100$$

όπου W = βάρος σε g

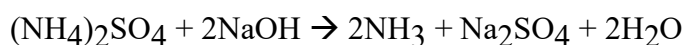
2.4.3 Προσδιορισμός ολικών αζωτούχων ενώσεων

Ο προσδιορισμός των ολικών αζωτούχων ουσιών των πειραματικών σιτηρεσίων, του μυϊκού ιστού, του ήπατος και ολόκληρου του σώματος των ιχθύων πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο Kjeldahl (AOAC 1995). Η διαδικασία προσδιορισμού των αζωτούχων ενώσεων έχει ως εξής:

Σε ζυγό ακριβείας τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων ζυγίστηκαν δείγματα βάρους 0,2g και μεταφέρθηκαν σε δοκιμαστικούς σωλήνες πέψης. Έπειτα, προστέθηκαν 2 ταμπλέτες καταλύτη Kjeltabs (5g Potassium Sulphate (K_2SO_4) και 5g Copper (II) Sulphate ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$) για να επιταχυνθεί η αντίδραση της πέψης. Στη συνέχεια, προστέθηκαν στα δείγματα 15 ml πυκνού θειικού οξέος (H_2SO_4) και τοποθετήθηκαν στην συσκευή πέψης (Kjeltec 2000, Εικ. 2.4). Η διαδικασία της πέψης πραγματοποιείται στους 150 °C για 85 min. Με την συσκευή πέψης πετυχαίνεται το βράσιμο των δειγμάτων και με την βοήθεια του πυκνού θειικού οξέος πραγματοποιείται διάσπαση των αζωτούχων ενώσεων. Το αδέσμευτο άζωτο (N) δεσμεύεται με την μορφή θειικού αμμωνίου (άλας), με την εξής αντίδραση:



Αφού είχε ολοκληρωθεί η διαδικασία της πέψης, τα δείγματα αφέθηκαν να κρυσώσουν για 15 min σε θερμοκρασία δωματίου. Κατόπιν, τα δείγματα τοποθετούνται σε συσκευή απόσταξης (Behr Labor-Technik, Germany, Εικ. 2.5), στην οποία προστέθηκε 100 ml απεσταγμένου H_2O , 80 ml NaOH και 50 ml H_3BO_3 . Η διαδικασία διαρκούσε 6 min. Το θειικό αμμώνιο, που είχε παραχθεί κατά τη διαδικασία της πέψης, αντιδρά με υδροξείδιο του νατρίου (NaOH) και αποδεσμεύεται αμμωνία (σε αέρια μορφή) και θειικό νάτριο (Na_2SO_4). Η αμμωνία (NH_4) έπειτα αντιδρά με βορικό οξύ (H_3BO_4) και το άζωτο του δείγματος δεσμεύεται σε μορφή βορικού αμμωνίου, σύμφωνα με τις εξής αντιδράσεις:



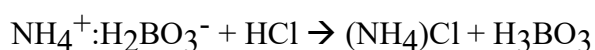


Εικόνα 2.4. Συσκευή πέψης
(Φωτογραφία συγγραφέα).



Εικόνα 2.5. Συσκευή απόσταξης
(Φωτογραφία συγγραφέα).

Το βορικό αμμώνιο συγκεντρωνόταν σε κωνική φιάλη που περιείχε 4 σταγόνες ερυθρού του μεθυλενίου (δείκτη pH). Το τελικό στάδιο της διαδικασίας αποτελούσε η τιτλοδότηση του διαλύματος βορικού αμμωνίου με αραιό διάλυμα υδροχλωρικού οξέος (0,1N) υπό καθεστώς συνεχούς κίνησης σύμφωνα με την αντίδραση:



Η συγκέντρωση (σε moles) των ιόντων υδρογόνου που απαιτούνται για να καταλύσουν την αντίδραση έως το τελικό σημείο, ισοδυναμεί με τη συγκέντρωση του αζώτου που περιέχει το δείγμα. Η αλλαγή του χρώματος του δείκτη, από κίτρινο σε φούξια, καταδεικνύει το τελικό σημείο της αντίδρασης. Η περιεκτικότητα του δείγματος σε άζωτο (N %) και σε ολικές πρωτεΐνες (%) υπολογίστηκαν από τις σχέσεις:

$$\text{N (\%)} = [(\text{ml HCl} - \text{ml τυφλού}) \times 0,8754] / W_{\text{δείγματος}}$$

$$\text{Ολικές Πρωτεΐνες (\%)} = \text{N (\%)} \times 6,25$$

όπου W = βάρος σε g

2.4.4 Προσδιορισμός ολικής ανόργανης ουσίας

Ο προσδιορισμός της ολικής ανόργανης ουσίας (τέφρας) στα πειραματικά σιτηρέσια και στα δείγματα μυϊκού ιστού και ολόκληρου του σώματος των ιχθύων πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με το πρωτόκολλο AOAC (1995), ως εξής: Σε προζυγισμένο πυρίμαχο δισκίο ζυγίστηκε δείγμα βάρους 1,5 g σε ζυγαριά ακρίβειας 4 δεκαδικών ψηφίων. Στη συνέχεια το δείγμα τοποθετήθηκε σε αποτεφρωτήρα (Nabertherm L9/12/C6, Lilienthal, Germany, Εικ. 2.6) στους 600 °C για 5 h. Μετά το πέρας της αποτέφρωσης το δείγμα τοποθετήθηκε σε αφυγραντήρα ώστε να αποκτήσει θερμοκρασία δωματίου πριν την επαναζύγισή του. Η περιεκτικότητα του δείγματος σε τέφρα (%) υπολογίζεται με τον εξής τύπο:

$$\text{Τέφρα (\%)} = (W_{\text{αποτεφρωμένου δείγματος (g)}} \times 100) / W_{\text{δείγματος (g)}}$$

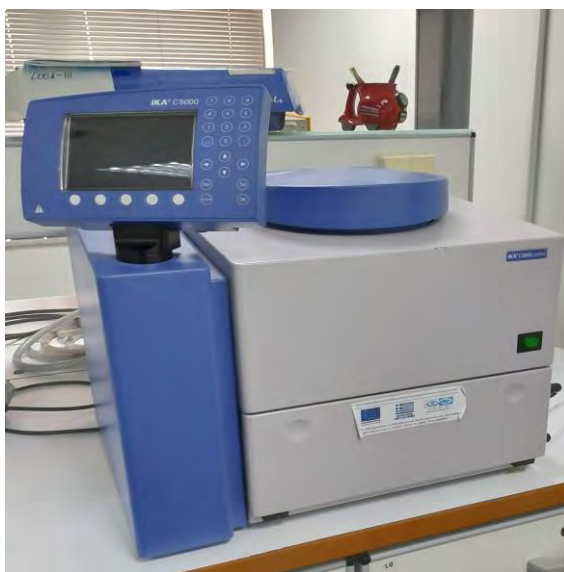
όπου W = βάρος σε g



Εικόνα 2.6. Συσκευή αποτέφρωσης (Φωτογραφία συγγραφέα)

2.4.5 Προσδιορισμός ολικής ενέργειας

Ο προσδιορισμός της ολικής ενέργειας στα πειραματικά σιτηρέσια και στα δείγματα μυϊκού ιστού και ολόκληρου του σώματος των ιχθυδίων έγινε σύμφωνα με το πρωτόκολλο AOAC (1995) με τη βοήθεια αδιαβατικού θερμιδόμετρου (C5000; IKA Werke GmbH, Staufen, Germany, Εικ. 2.7). Κατά την πλήρη καύση ενός δείγματος εκλύεται θερμότητα, η οποία αποτελεί τη θερμιδική αξία (ολική ενέργεια) του δείγματος. Η καύση πραγματοποιείται μέσα σε ένα κλειστό ανοξείδωτο δοχείο τύπου οβίδας. Η θερμότητα που εκλύεται θερμαίνει το νερό, το οποίο με τη σειρά του θερμαίνει ένα εξωτερικό δοχείο γνωστής θερμοκρασίας. Η αύξηση της θερμοκρασίας του εξωτερικού δοχείου καταγράφεται από ένα θερμόμετρο και έπειτα υπολογίζεται η θερμιδική αξία στο περιεχόμενο του δείγματος που κάηκε. Τα αποτελέσματα δίνονται ηλεκτρονικά σε Kcal/g.



Εικόνα 2.7. Αδιαβατικό θερμιδόμετρο (Φωτογραφία συγγραφέα)

2.4.6 Προσδιορισμός αμινοξέων

Στις πρώτες ύλες ιχθυοτροφών (ιχθυάλευρα, πτηνάλευρο, πτεράλευρο, χοιράλευρο) και στις πειραματικές ιχθυοτροφές πραγματοποιήθηκαν αναλύσεις αμινοξέων από εξωτερικά

πιστοποιημένα εργαστήρια και συγκεκριμένα από την εταιρεία Mérieux NutriSciences laboratories (CHELAB S.R.L., Resana, Italy)(www.merieuxnutrisciences.it) και από την εταιρεία Eurofins Steins Laboratorium A/S (Vejen, Denmark)(www.eurofins.dk) σε συμμόρφωση με ISO 17025:2005 standard και ISO 13903:2005 (EU 152/2009).

2.5 Παράμετροι ανάπτυξης των ιχθυδίων και αξιοποίησης της τροφής

2.5.1 Επιβίωση των ιχθυδίων

Οι καταγραφή θνησιμότητας των ιχθυδίων ελάμβανε χώρα καθημερινά σε κάθε ενυδρείο ξεχωριστά και συνολικά για κάθε διατροφική ομάδα. Η επιβίωση των ιχθύων υπολογίστηκε ως εξής (Goddard 1996, Houlihan *et al.* 2001, Guillaume *et al.* 2001):

Επιβίωση (%) = $100 \times (\text{αρχικός αριθμός ψαριών} - \text{τελικός αριθμός ψαριών}) / \text{αρχικός αριθμός ψαριών}$

2.5.2 Αύξηση σωματικού βάρους των ιχθυδίων

Η αύξηση του σωματικού βάρους είναι το καθαρό βάρος του σώματος των ιχθυδίων που αποκτήθηκε κατά τη διάρκεια του πειράματος και υπολογίστηκε από την παρακάτω σχέση (Goddard 1996, Houlihan *et al.* 2001, Guillaume *et al.* 2001):

$$\text{Αύξηση ολικού βάρους (g)} = (W_2, \text{ g}) - (W_1, \text{ g})$$

όπου W_1 και W_2 , το αρχικό και τελικό βάρος ιχθύος, αντίστοιχα.

2.5.3 Πρόσληψη τροφής

Ως πρόσληψη τροφής μετρήθηκε η χορηγηθείσα τροφή, αφού εφαρμόστηκε σίτιση σε φαινομενικό κορεσμό. Η πρόσληψη τροφής καθόλη τη διάρκεια του κάθε πειράματος υπολογίστηκε ομαδικά για τα ιχθύδια κάθε ενυδρείου και έπειτα εκτιμήθηκε ατομικά για το κάθε άτομο μέσω της σχέσης (Goddard 1996, Houlihan *et al.* 2001, Guillaume *et al.* 2001):

Πρόσληψη τροφής (g) = $(\text{συνολική χορηγηθείσα τροφή στο ενυδρείο (g)} / ((\text{αρχικός αριθμός ψαριών} + \text{τελικός αριθμός ψαριών}) / 2))$.

2.5.4 Ειδικός ρυθμός ανάπτυξης

Ο ημερήσιος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης (Specific Growth Rate, SGR) εκφράζει την ημερήσια ποσοστιαία αύξηση του ολικού βάρους του ιχθύος στο χρονικό διάστημα που σιτίστηκε και δίνεται από τη σχέση (Goddard 1996, Houlihan *et al.* 2001, Guillaume *et al.* 2001):

$$\text{SGR (\% / ημέρα)} = \{100 \times [\text{Ln} (W_2) - \text{Ln} (W_1)] / \text{ημέρες σίτισης}\}$$

Όπου,

$\text{Ln} (W_2)$ = ο νεπέριος λογάριθμος του τελικού σωματικού βάρους

$\text{Ln} (W_1)$ = ο νεπέριος λογάριθμος του αρχικού σωματικού βάρους

2.5.5 Συντελεστής μετατρεψιμότητας της τροφής

Ο συντελεστής μετατρεψιμότητας της τροφής (Feed Conversion Ratio, FCR) εκφράζει το βαθμό αξιοποίησης της τροφής από τα ψάρια και δίνεται από τον λόγο της ποσότητας της τροφής που χορηγήθηκε προς την αύξηση του σωματικού βάρους τους. Ο συντελεστής μετατρεψιμότητας τροφής υπολογίζεται από τη σχέση (Goddard 1996, Houlihan *et al.* 2001, Guillaume *et al.* 2001):

$$\text{FCR} = \text{τροφή που καταναλώθηκε (g)} / \text{αύξηση σωματικού βάρους ιχθύων (g)}.$$

2.5.6 Οικονομικότητα σιτηρεσίου

Ο οικονομικός συντελεστής μετατρεψιμότητας τροφής (Economic Conversion Ratio, ECR) υπολογίστηκε βάσει της παρακάτω εξίσωσης (Martinez-Llorens *et al.* 2008):

$$\text{ECR (€ / Kg)} = \text{FCR} \times \text{κόστος σιτηρεσίου (€ / Kg τροφής)}$$

Το κόστος κάθε σιτηρεσίου προσδιορίστηκε πολλαπλασιάζοντας το αντίστοιχο επίπεδο ένταξης κάθε συστατικού του σιτηρεσίου με το αντίστοιχο κόστος ανά Kg και αθροίζοντας τις τιμές που λαμβάνονται για όλα τα συστατικά σε κάθε σιτηρέσιο. Το κόστος (€/Kg τροφής) κάθε συστατικού ήταν ο μέσος όρος των τιμών αγοράς (έτους 2015) που μας δόθηκε από την πλειοψηφία της ελληνικής βιομηχανίας παρασκευής ιχθυοτροφών (προσωπικές επικοινωνίες) ως εξής: ιχθυάλευρο = 1,43 €/Kg, Πτηνάλευρο = 0,78 €/Kg, γλουτένη καλαμποκιού = 0,85 €/Kg, υδρολυμένο πετράλευρο = 0,78 €/Kg, αλεύρι σίτου = 0,22 €/Kg, ιχθυέλαιο = 1,50 €/Kg; πρόμιγμα βιταμινών και ανόργανων στοιχείων = 3,00 €/Kg, Φωσφορικό μονοασβέστιο (MCP) = 0,62 €/Kg, βιταμίνη E = 6,50 €/Kg, βιταμίνη C = 4,20 €/Kg, αντι-μυκητιακή ουσία = 2,00 €/Kg, L-lysine = 5,00 €/Kg, DL-methionine = 5,00 €/Kg.

2.5.7 Συντελεστής αποδοτικότητας πρωτεϊνών

Ο συντελεστής αποδοτικότητας των πρωτεϊνών (Protein Efficiency Ratio, PER) εκφράζει την αναλογία μεταξύ της αύξησης σωματικού βάρους των ιχθύων και της πρωτεΐνης που καταναλώθηκε. Ο συντελεστής υπολογίζεται από την σχέση (Goddard 1996, Houlihan *et al.* 2001, Guillaume *et al.* 2001):

PER = αύξηση σωματικού βάρους (g) / πρωτεΐνη που καταναλώθηκε (g).

2.5.8 Συντελεστής κατακράτησης πρωτεΐνης

Ο συντελεστής κατακράτησης της πρωτεΐνης (Protein Retention, PR) εκφράζει την ποσοστιαία μεταβολή της περιεκτικότητας ενός ιστού σε πρωτεΐνη σε συνάρτηση με την ποσότητα διαιτητικής πρωτεΐνης που χορηγήθηκε. Ο συντελεστής διατήρησης της πρωτεΐνης υπολογίστηκε για ολόκληρο το σώμα των ιχθύων σύμφωνα με τη σχέση (Goddard 1996, Houlihan *et al.* 2001, Guillaume *et al.* 2001):

$PR (\%) = 100 \times \text{μεταβολή πρωτεΐνης σε ολόκληρο το σώμα (g)} / \text{πρωτεΐνη που καταναλώθηκε (g)}.$

Όπου μεταβολή πρωτεΐνης (g) = ((τελική περιεκτικότητα πρωτεΐνης (%)) × τελικό βάρος (g)) - ((αρχική περιεκτικότητα πρωτεΐνης (%)) × αρχικό βάρος (g)).

2.5.9 Συντελεστής κατακράτησης λίπους

Ο συντελεστής κατακράτησης λίπους (Lipid Retention, LR) εκφράζει την ποσοστιαία μεταβολή της περιεκτικότητας ενός ιστού σε λίπος σε συνάρτηση με την ποσότητα διαιτητικού λίπους που χορηγήθηκε. Ο συντελεστής διατήρησης του λίπους υπολογίστηκε για ολόκληρο το σώμα των ιχθυδίων σύμφωνα με τη σχέση (Goddard 1996, Houlihan *et al.* 2001, Guillaume *et al.* 2001):

$LR (\%) = 100 \times \text{μεταβολή λίπους σε ολόκληρο το σώμα (g)} / \text{λίπος που καταναλώθηκε (g)}.$

Όπου μεταβολή λίπους (g) = ((τελική περιεκτικότητα λίπους (%)) × τελικό βάρος (g)) - ((αρχική περιεκτικότητα λίπους (%)) × αρχικό βάρος (g))

2.5.10 Σωματομετρικοί δείκτες

Οι σωματομετρικοί δείκτες που υπολογίστηκαν ήταν: ο ηπατοσωματικός δείκτης (Hepatosomatic index, HSI), ο ενδοσπλαχνικός δείκτης (Viscerosomatic index, VSI) και ο δείκτης ευρωστίας (K) σύμφωνα με τις παρακάτω σχέσεις (Goddard 1996, Houlihan *et al.* 2001, Guillaume *et al.* 2001):

$HSI (\%) = \text{Βάρος ήπατος (g)} \times 100 / \text{Βάρος σώματος (g)} \text{ (εκτός εντόσθιων και ήπατος)}$

$VSI (\%) = \text{Βάρος εντόσθιων (g)} \times 100 / \text{Βάρος σώματος (g)} \text{ (εκτός εντόσθιων και ήπατος)}$

$K = \text{Ολικό βάρος σώματος (g)} \times 100 / \text{Ολικό μήκος}^3 \text{ (cm)}$

2.6 Ιστολογική εξέταση

Για την ιστολογική εξέταση του ήπατος και του εντέρου των ιχθυδίων των διατροφικών πειραμάτων υιοθετήθηκαν τα γνωστά πρωτόκολλα (Johnson *et al.* 2009, Genten *et al.* 2009). Τα ιχθύδια αρχικά αναισθητοποιήθηκαν πλήρως με αυξημένες δόσεις φαινοξαιθανόλης συγκέντρωσης 1,0 mg/L και θανατώθηκαν έπειτα σε πάγο. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε τομή στην σπλαχνική κοιλότητα από όπου αφαιρέθηκε ολόκληρο το ήπαρ, το οποίο και ζυγίστηκε, και τμήμα του πρόσθιου τμήματος του εντέρου (foregut). Τόσο το ήπαρ όσο και το τμήμα του εντέρου τεμαχίστηκαν και τοποθετήθηκαν σε διάλυμα “Davidson” για 24 ώρες. Με το πέρας των 24 ωρών το διάλυμα “Davidson” αντικαταστάθηκε με διάλυμα φορμόλης 10% σε απιονισμένο νερό. Ακολουθούσε αφυδάτωση σε ανιούσα σειρά αλκοολικών διαλυμάτων (70%, 80%, 90%, 95% και 100%), εμβάπτιση σε ξυλόλη και εγκλεισμός σε παραφίνη. Λεπτές τομές ιστών (4-7μm) πάρθηκαν με χρήση μικροτόμου, αποπαραφινώθηκαν, αφυδατώθηκαν και χρωματίστηκαν με αιματοξυλίνη και εωσίνη, στερεοποιήθηκαν και ακολούθως εξετάστηκαν σε οπτικό μικροσκόπιο.

Για τη μικροσκοπική ανατομική μελέτη των ιστών χρησιμοποιήθηκαν τεχνικές ιστολογίας οι οποίες περιλαμβάνουν τα εξής στάδια (Johnson *et al.* 2009, Genten *et al.* 2009):

- α) Μονιμοποίηση του ιστού σε διάλυμα “Davidson” για 24 ώρες και αντικατάσταση του μονιμοποιητικού διαλύματος με διάλυμα ουδέτερης φορμόλης 10%, για περαιτέρω αποθήκευσή τους.
- β) Αφυδάτωση με διαδοχικές εμβάπτισεις του ιστού σε βαθμιαίες σειρές από υδατικά διαλύματα αιθανόλης με αύξουσα συγκέντρωση (από 70% μέχρι 100%). Για το σκοπό αυτό, χρησιμοποιήθηκε συσκευή ιστοκινέτας (Εικ. 2.8).
- γ) Διαύγαση ιστού σε διάλυμα ξυλόλης.
- δ) Εμβάπτιση και εγκλεισμός ιστού σε παραφίνη.
- ε) Τομή του εμποτισμένου σε παραφίνη ιστού στη μικροτόμο (Εικ. 2.8) μεγέθους 4-7 μm.

στ) Αποπαραφίνωση και ενυδάτωση των τομών.

ζ) Χρώση του ιστού σε διάλυμα χρώσης αιματοξυλίνης – εωσίνης.

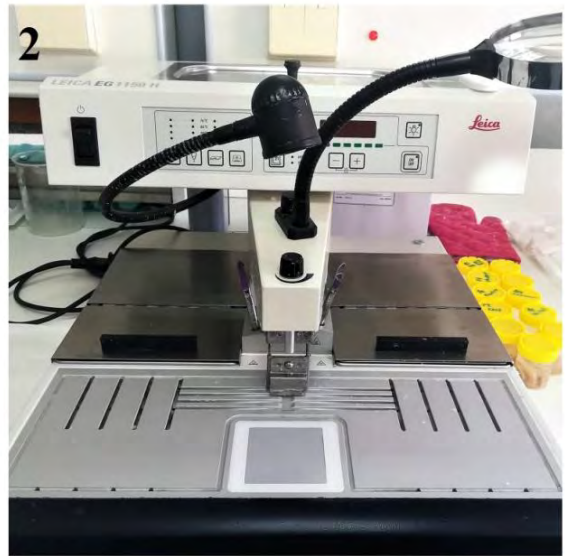
η) Στερεοποίηση των τομών.

Η συνολική διάρκεια της αφυδάτωσης, διαύγασης, εγκλισμού σε παραφίνη, αφυδάτωσης και χρώσης ήταν 19 ώρες σύμφωνα με το πρωτόκολλο του Πίνακα 2.2.

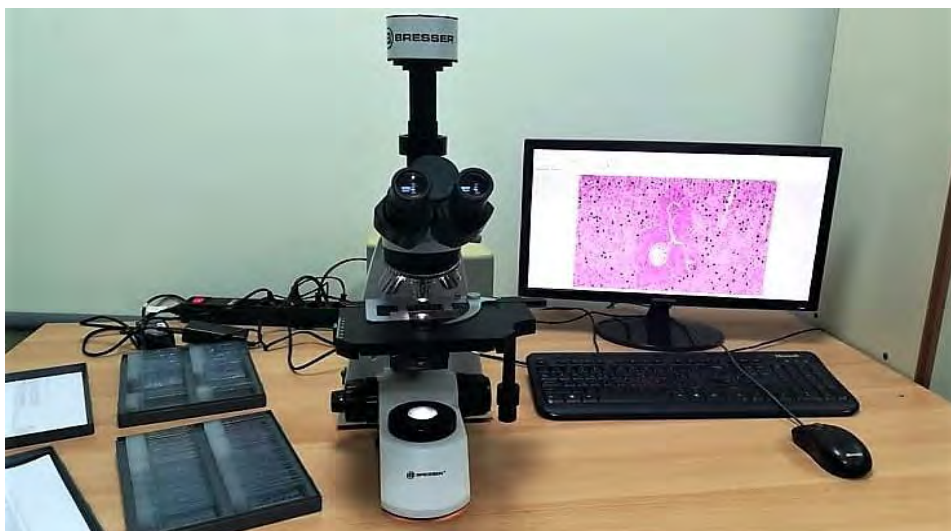
Πίνακας 2.2. Πρωτόκολλο αφυδάτωσης, διαύγασης και εγκλισμού σε παραφίνη (Johnson *et al.* 2009, Genten *et al.* 2009).

Πρωτόκολλο αφυδάτωσης, διαύγασης και εγκλισμού σε παραφίνη		
Βήματα	Ουσία	Διάρκεια
1	Αιθανόλη 70%	1h
2	Αιθανόλη 80%	1h
3	Αιθανόλη 95%	1h
4	Αιθανόλη 95%	2h
5	Αιθανόλη 100%	1h
6	Αιθανόλη 100%	1h
7	Αιθανόλη 100%	2h
8	Ξυλόλη	2h
9	Ξυλόλη	2h
10	Παραφίνη	2h
11	Παραφίνη	4h
Πρωτόκολλο αφυδάτωσης και χρώσης		
1	Ξυλόλη I	15min
2	Ξυλόλη II	15min
3	Αλκοόλη 100%	5min
4	Αλκοόλη 100%	5min
5	Αλκοόλη 95%	5min
6	Αλκοόλη 95%	5min
7	Αλκοόλη 70%	5min
8	H ₂ O (βρύσης)	2min
9	Αιματοξυλίνη	7min
10	H ₂ O (Τρεχούμενο βρύσης)	2min
11	Διάλυμα διαφοροποίησης	2 εμβαπτίσεις
12	H ₂ O (Τρεχούμενο βρύσης)	2min
13	Ηωσίνη	5min
14	H ₂ O (βρύσης)	30'' εμβαπτίσεις
15	Αλκοόλη 70%	1min
16	Αλκοόλη 95%	1min
17	Αλκοόλη 95%	1min
18	Αλκοόλη 100%	1min
19	Αλκοόλη 100%	1min
20	Ξυλόλη	15min

Οι ιστολογικές τομές μελετήθηκαν σε οπτικό μικροσκόπιο (Axiostar plus Carl Zeiss Light Microscopy, Carl Zeiss Ltd, Gottingen, Germany, Εικ. 2.9) σε μεγέθυνση $\times 400$. Οι απεικονίσεις κάθε παρασκευάσματος φωτογραφήθηκαν μέσω ειδικής προσαρμοσμένης στο μικροσκόπιο φωτογραφικής κάμερας. Οι απεικονίσεις κάθε ιστού χρησιμοποιήθηκαν για την ιστολογική εξέταση και μελέτη πιθανών ιστολογικών αλλοιώσεων των ιχθυδίων που σιτίστηκαν με τις πειραματικές ιχθυοτροφές. Στο μικροσκόπιο παρατηρήθηκαν πιθανές μετατοπίσεις του πυρήνα, η εμφάνιση και το μέγεθος των λιποσταγονιδίων στα ηπατοκύτταρα, η περιπαγκρεατική εναπόθεση λίπους, πιθανή στεάτωση, θρόμβωση και αιμορραγίες. Για την αξιολόγηση των απεικονίσεων του κάθε εξεταζόμενου ιστού χρησιμοποιήθηκε ένα ημι-ποσοτικό σύστημα βαθμολόγησης για τον προσδιορισμό των ιστοπαθολογικών αλλοιώσεων του σύμφωνα με τους Caballero *et al.* (2004) και Baeza-Arino *et al.* (2016) : Βαθμός 0 (μη αξιοσημείωτη), Βαθμός 1 (ελάχιστη αλλοίωση), Βαθμός 2 (ήπια αλλοίωση), Βαθμός 3 (μέτρια αλλοίωση) και Βαθμός 4 (σοβαρή αλλοίωση).



Εικόνα 2.8. Εξοπλισμός ιστολογίας 1: ιστοκινέτα 2: συσκευή σκλήνωσης 3:υδατόλουτρο 4:παλινδρομική μικροτόμος



Εικόνα 2.9. Οπτικό μικροσκόπιο με κάμερα υψηλής ανάλυσης από την αίθουσα μικροσκοπίας του Τμήματος Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος του Π.Θ.

2.7 Στατιστική ανάλυση

Τα δεδομένα των παραμέτρων ανάπτυξης των ιχθύων και αξιοποίησης της τροφής, καθώς και της θρεπτικής σύστασης των ιχθυδίων παρουσιάζονται ως μέσοι όροι $\pm$ τυπική απόκλιση. Τα ποσοστιαία δεδομένα τροποποιήθηκαν πριν την στατιστική τους επεξεργασία. Τα δεδομένα ελέγχθηκαν για την κανονικότητα τους μέσω του test Shapiro-Wilk's και για την ομοιογένεια των παραλλακτικότητων τους μέσω του Levene's test και τροποποιήθηκαν (λογαρίθμηση κ.ά.) όταν αυτό απαιτείτο πριν την επεξεργασία τους με τη μέθοδο της Ανάλυσης της Διακύμανσης Μονής Κατεύθυνσης (one-way ANOVA). Οι διαφορές κρίθηκαν στατιστικά σημαντικές για τιμές $P < 0,05$. Στις περιπτώσεις όπου η ANOVA έδειξε στατιστικά σημαντικές διαφορές, τα δεδομένα υποβλήθηκαν στο Tukey's test για τον εντοπισμό των διαφορών μεταξύ των διαφορετικών μεταχειρίσεων (Zar 1999). Το στατιστικό πρόγραμμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν το SPSS 18.0 (SPSS, Chicago, IL, USA).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Αντικατάσταση του ιχθυαλεύρου από πτηνάλευρο στο σιτηρέσιο των ιχθυδίων τσιπούρας (*Sparus aurata*)

3.1 Εισαγωγή

Μέχρι σήμερα, οι γνώσεις μας για την καταλληλότητα του πτηναλεύρου στη διατροφή της τσιπούρας είναι ελλιπής. Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η διερεύνηση των επιδράσεων της αντικατάστασης της πρωτεΐνης του ιχθυαλεύρου από πρωτεΐνη πτηναλεύρου στην ανάπτυξη της τσιπούρας και την αξιοποίηση της τροφής από αυτήν. Προκειμένου να διερευνηθούν οι επιδράσεις της διαιτητικής αντικατάστασης του ιχθυαλεύρου από πτηνάλευρο στην ανάπτυξη των ιχθυδίων τσιπούρας και την αξιοποίηση της τροφής από αυτήν, διεξήχθησαν δύο (2) διατροφικά πειράματα. Στο πρώτο διατροφικό πείραμα δοκιμάστηκαν υψηλά επίπεδα αντικατάστασης της πρωτεΐνης του ιχθυαλεύρου και συγκεκριμένα 50% και 100% (πλήρης αντικατάσταση) από πρωτεΐνη πτηναλεύρου. Τα συγκεκριμένα ποσοστά επιλέχθηκαν για να διερευνήσουν αν θα μπορούσε το πτηνάλευρο να αντικαταστήσει πλήρως ή κατά το ήμισυ το ιχθυάλευρο και αν όχι τι επιπτώσεις θα είχε στην ανάπτυξη και στην υγεία της τσιπούρας. Στη συνέχεια στο δεύτερο πείραμα δοκιμάστηκαν χαμηλότερα επίπεδα αντικατάστασης, και συγκεκριμένα 25% και 50% με ή χωρίς προσθήκη απαραίτητων αμινοξέων στο σιτηρέσιο έτσι ώστε να εξεταστεί η βέλτιστη ανάπτυξη της τσιπούρας.

Για τις ανάγκες του παρόντος έργου, το πτηνάλευρο που χρησιμοποιήθηκε (Πιν. 2.1) ήταν το “Sonac Poultry Meal 70” της εταιρείας SONAC - Darling Ingredients International (The Netherlands, Denmark), το οποίο παρασκευάστηκε σύμφωνα με τις Ευρωπαϊκές Οδηγίες EC 1069/2009 και EC 142/2011 (method 7) και είναι κατάλληλο για χρησιμοποίηση σε ιχθυοτροφές και απόλυτα συμβατό με την Οδηγία EC 56/2013.

3.2 1^ο διατροφικό πείραμα – μερική (50%) και ολική (100%) αντικατάσταση ιχθυαλεύρου από άλευρο υποπροϊόντων πουλερικών

3.2.1 Πειραματικά σιτηρέσια και συνθήκες εκτροφής

Στο 1^ο διατροφικό πείραμα, καταρτίστηκαν τρία ισοπρωτεϊνικά (50% ολικές πρωτεΐνες επί νωπού) και ισοενεργειακά (21 KJ/g) σιτηρέσια, όπου η πρωτεΐνη του ιχθυαλεύρου της τροφής-μάρτυρα (FM) αντικαταστάθηκε κατά 50% από άλευρο υποπροϊόντων πουλερικών (poultry by-product meal) (PBM50) και 100% (PBM100) (Πίν. 3.1). Στον Πίνακα 3.2 δίνονται οι αναλύσεις των αμινοξέων των ιχθυοτροφών. Το ποσοστό συμμετοχής του ιχθυαλεύρου στην τροφή-μάρτυρα (FM) ήταν 58%.

Πίνακας 3.1. Καταρτισμός σιτηρεσιών και θρεπτική σύσταση πειραματικών ιχθυοτροφών που χρησιμοποιήθηκαν για τη μερική (50%) και ολική (100%) αντικατάσταση του ιχθυαλεύρου από πτηνάλευρο (1^ο διατροφικό πείραμα).

1^ο Διατροφικό Πείραμα			
Συστατικά (%) / Σιτηρέσιο	FM	PBM50	PBM100
Ιχθυάλευρο	58	29	0
Πτηνάλευρο	0	27,2	54,4
Γλουτένη καλαμποκιού	19,5	18,9	18,2
Σιτάρι, αλεύρι	10,4	13,9	17,6
Ιχθυέλαιο	11,1	10	8,8
Βιταμίνες & ανόργανα στοιχεία	0,3	0,3	0,3
MCP (φωσφορικό μονοασβέστιο)	0,3	0,3	0,3
Βιταμίνη E	0,1	0,1	0,1
Βιταμίνη C	0,1	0,1	0,1
Αντιμυκητιακή ουσία	0,2	0,2	0,2
Λυσίνη	0	0	0
Μεθειονίνη	0	0	0

Θρεπτική σύσταση (%)¹

Ξηρή ουσία	92,1	91,9	91,8
Ολικές αζωτούχες ουσίες	50,3	50,6	50,2
Ολικές λιπαρές ουσίες	16,9	15,9	15,3
Υδατάνθρακες ²	16,0	17,7	19,4
Τέφρα	8,9	7,6	6,6
Ενέργεια (KJ/g)	21,4	21,3	21,4

¹ Οι τιμές της θρεπτικής σύστασης αντιπροσωπεύουν μέσους όρους από n=6.

² Το ποσοστό των υδατανθράκων εκτιμήθηκε με αφαίρεση από το 100 του συνόλου των ποσοστών, ολικών πρωτεϊνών, ολικών λιπιδίων και τέφρας.

Πρώτες ύλες: Ιχθυάλευρο (Sardine fishmeal, Köster Marine Proteins GmbH, Hamburg, Germany), πτηνάλευρο (Poultry meal, Sonac, Son, The Netherlands), γλουτένη καλαμποκιού (Glutalys®, Roquette Italia S.p.A, Cassano Spinola, Italy), σιτάρι (τοπική αγορά), ιχθυέλαιο (Tuna oil, Inproquisa SA, Madrid, Spain), MCP (Astron Chemicals SA, Attica, Greece), βιταμίνες E και C (DSM Nutritional Products Hellas LTD, Athens, Greece), αντιμυκητιακή ουσία (Mycu CURB®, Kemin, Herentals, Belgium), λυσίνη (Ajinomoto Eurolysine S.A.S., Paris, France), μεθειονίνη (MetAMINO® DL-Methionine Feed Grade, Evonik Nutrition & Care GmbH, Athens, Greece). Πρόμιγμα βιταμινών και ανοργάνων στοιχείων (kg⁻¹ μίγματος): Vitamins: E, 58.3 g; K3, 3.3 g; B1, 3.3 g; B2, 6.6 g; B6, 3.3 mg; B12, 10 mg; Folic acid, 3.3 g; Biotin, 100 mg; C, 33.3 g; Nicotinic acid, 16.6 g; Pantothenic acid, 13.3 g. Minerals: Co, 170 mg; I, 248 mg (Ca(IO₃)₂); Mn, 10 g (MnO); Zn, 33 g (ZnO); Ca 235 g; Se 2,5 mg (Na₂SeO₃); Na 247,5 mg (Na₂SeO₃).

Πίνακας 3.2. Σύσταση σε αμινοξέα (% πρωτεΐνης) των πειραματικών ιχθυοτροφών που χρησιμοποιήθηκαν για τη μερική (50%) και ολική (100%) αντικατάσταση του ιχθυαλεύρου από πτηνάλευρο (1^ο διατροφικό πείραμα).

1 ^ο διατροφικό πείραμα				Απαιτήσεις (% πρωτεΐνης) ²
Αμινοξέα ¹	FM	PBM50	PBM100	
<u>Απαραίτητα αμινοξέα</u>				
Αργινίνη	5,69	5,83	6,14	5,4
Ιστιδίνη	2,62	2,46	2,01	1,7
Ισολευκίνη	3,92	3,72	3,46	2,6
Λευκίνη	9,73	9,44	9,01	4,5
Λυσίνη	6,48	5,77	5,04	5,0
Μεθειονίνη	2,32	1,99	1,86	2,4
Φαινυλαλανίνη	4,76	4,53	4,36	2,9
Θρεονίνη	4,30	4,41	3,87	2,8
Τρυπτοφάνη	0,61	0,65	0,59	0,6
Βαλίνη	4,64	4,49	4,28	3,0
<u>Μη απαραίτητα αμινοξέα</u>				
Αλανίνη	7,06	7,31	7,55	
Ασπαρτικό οξύ	8,64	8,32	7,88	
Κυστίνη	1,17	1,15	1,20	
Γλουταμινικό οξύ	16,39	16,42	16,66	
Γλυκίνη	5,95	7,06	8,62	
Προλίνη	7,69	8,49	9,78	
Σερίνη	4,70	4,71	4,63	
Τυροσίνη	3,33	3,27	3,07	

¹Μέθοδος για τρυπτοφάνη: UNI 22618:2000 + UNI 22630:2000, μέθοδος για υπόλοιπα αμινοξέα: REG CE 152/09 27/01/09 ALL III MET F PTO 5.3.

²Απαιτήσεις (% πρωτεΐνης) των ιχθυδίων *S. aurata* κατά Kaushik (1998).

Για το 1^ο διατροφικό πείραμα, χρησιμοποιήθηκαν συνολικά 300 ιχθύδια τσιπούρας μέσου σωματικού βάρους $2,52 \pm 0,25$ g, μέσου ολικού μήκους $6,1 \pm 0,1$ cm και τοποθετήθηκαν σε 12 γυάλινα ενυδρεία. Τα ιχθύδια αφέθηκαν να εγκλιματιστούν στις ελεγχόμενες συνθήκες του σταθμού για 10 ημέρες σιτιζόμενα με το σιτηρέσιο FM, έως την έναρξη χορήγησης των πειραματικών σιτηρεσίων. Οι φυσικοχημικές παράμετροι του νερού των ενυδρείων παρακολουθήθηκαν καθημερινά και καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος με τη χρήση φορητών ηλεκτρονικών οργάνων και χρωματομετρικών τεστ ελέγχων, όπως έχουν περιγραφεί στο κεφάλαιο Υλικά και Μέθοδοι. Πριν την έναρξη του διατροφικού πειράματος, τα ιχθύδια διαχωρίστηκαν τυχαία σε συνολικά τρεις διατροφικές ομάδες με τετραπλή επαναληψιμότητα (25 ψάρια/ενυδρείο, 4 ενυδρεία/διατροφική ομάδα) με την κάθε μία να διατρέφεται με διαφορετικό σιτηρέσιο. Συγκεκριμένα, η ομάδα ιχθύων FM διατράφηκε με την τροφή που περιείχε αποκλειστικά ιχθυάλευρο ως πηγή ζωικής πρωτεΐνης και θεωρήθηκε η ομάδα μάρτυρας, ενώ οι υπόλοιπες δύο ομάδες ιχθύων PM50 και PM100 διατράφηκαν με τα σιτηρέσια που περιείχαν πτηνάλευρο στις αντίστοιχες αντικαταστάσεις. Η σίτιση των ιχθυδίων πραγματοποιήθηκε με το χέρι καθημερινά, μέχρι το φαινόμενο κορεσμού (*ad libitum*), δύο φορές την ημέρα (10:00 και 16:00). Ιδιαίτερη προσοχή δόθηκε ώστε να διασφαλιστεί ότι όλη η καθημερινά χορηγούμενη ποσότητα τροφής καταναλώθηκε από τα ιχθύδια. Τυχόν θνησιμότητες που υπήρξαν ελάμβανε χώρα καθημερινή καταγραφή και η συνολική διάρκεια του διατροφικού πειράματος ήταν 100 ημέρες.

3.2.2 Αποτελέσματα

3.2.2.1 Παράμετροι ανάπτυξης ιχθυδίων και αξιοποίησης της τροφής

Τα αποτελέσματα της ανάπτυξης των ιχθυδίων τσιπούρας του 1ου διατροφικού πειράματος μερικής (50%) και ολικής αντικατάστασης (100%) του ιχθυαλεύρου από άλευρο υποπροϊόντων πουλερικών στο σιτηρέσιο, παρουσιάζονται στους Πίνακες 3.3 (30 ημέρες

εκτροφής), 3.4 (60 ημέρες εκτροφής) και 3.5 (ολοκλήρωση πειραματισμού έπειτα από 100 ημέρες εκτροφής) (Παράρτημα - διάγραμμα 1.1).

Πίνακας 3.3. Παράμετροι ανάπτυξης των ιχθυδίων τσιπούρας (*S. aurata*) διατρεφόμενοι με ιχθυοτροφές που χρησιμοποιήθηκαν για τη μερική (50%) και ολική (100%) αντικατάσταση του ιχθυαλεύρου από πτηνάλευρο (1^ο διατροφικό πείραμα), έπειτα από **30 ημέρες** εκτροφής

Παράμετροι /	FM	PBM50	PBM100
Διατροφικές ομάδες			
Επιβίωση (%)	100	100	100
Πρόσληψη τροφής (g/ψάρι)	5,56±0,43	5,67±0,37	4,99±0,45
Αρχικό βάρος (g/ψάρι)	2,52±0,00	2,52±0,00	2,52±0,00
Τελικό βάρος (g/ψάρι)	7,79±0,46 ^a	7,31±0,50 ^a	5,96±0,46 ^b
SGR (%/ημέρα)	3,76±0,20 ^a	3,54±0,23 ^a	2,86±0,25 ^b
FCR	1,05±0,02	1,19±0,06	1,46±0,07

Οι τιμές αντιπροσωπεύουν μέσους όρους ± τυπική απόκλιση (n=4). Οι τιμές που δεν αντιπροσωπεύονται από τον ίδιο εκθέτη δείχνουν στατιστικώς σημαντική διαφορά (P<0,05) μεταξύ των διατροφικών ομάδων.

Πίνακας 3.4. Παράμετροι ανάπτυξης των ιχθυδίων τσιπούρας (*S. aurata*) διατρεφόμενα με ιχθυοτροφές που χρησιμοποιήθηκαν για τη μερική (50%) και ολική (100%) αντικατάσταση του ιχθυαλεύρου από πτηνάλευρο (1^ο διατροφικό πείραμα), έπειτα από **60 ημέρες** εκτροφής

Παράμετροι / Διατροφικές ομάδες	FM	PBM50	PBM100
Επιβίωση (%)	100	100	100
Πρόσληψη τροφής (g/ψάρι)	15,4±1,44 ^a	15,21±1,12 ^a	12,49±0,93 ^b
Αρχικό βάρος (g/ψάρι)	2,52±0,00	2,52±0,00	2,52±0,00
Τελικό βάρος (g/ψάρι)	15,81±1,29 ^a	13,53±1,39 ^b	9,62±0,95 ^c
SGR (%/ημ.)	3,06±0,13 ^a	2,79±0,17 ^b	2,23±0,16 ^c
FCR	1,16±0,03 ^a	1,39±0,07 ^b	1,77±0,15 ^c

Οι τιμές αντιπροσωπεύουν μέσους όρους ± τυπική απόκλιση (n=4). Οι τιμές που δεν αντιπροσωπεύονται από τον ίδιο εκθέτη δείχνουν στατιστικώς σημαντική διαφορά (P<0,05) μεταξύ των διατροφικών ομάδων.

Πίνακας 3.5. Παράμετροι ανάπτυξης, αξιοποίησης τροφής, οικονομικότητας σιτηρεσίου και μορφομετρικά χαρακτηριστικά των ιχθυδίων τσιπούρας διατρεφόμενοι με ιχθυοτροφές που χρησιμοποιήθηκαν για τη μερική (50%) και ολική (100%) αντικατάσταση του ιχθυαλεύρου από πτηνάλευρο (1^ο διατροφικό πείραμα), έπειτα από **100 ημέρες** εκτροφής

1^ο διατροφικό πείραμα			
Παράμετροι /			
Διατροφικές ομάδες	FM	PBM50	PBM100
Επιβίωση (%)	100 ^a	100 ^a	100 ^a
Πρόσληψη τροφής (g/ψάρι)	35,50 ± 2,83 ^a	32,6 ± 2,76 ^a	26,80 ± 1,50 ^b
Ολικό μήκος (cm)	12,80 ± 0,22 ^a	11,90 ± 0,37 ^b	10,30 ± 0,23 ^c
Αρχικό βάρος (g/ψάρι)	2,52 ± 0,00	2,52 ± 0,00	2,52 ± 0,00
Τελικό βάρος (g/ψάρι)	32,90 ± 2,10 ^a	25,90 ± 2,32 ^b	18,30 ± 1,81 ^c
Αύξηση βάρους (g/ψάρι)	30,40 ± 2,09 ^a	23,40 ± 2,32 ^b	15,80 ± 1,81 ^c
SGR (%/ημέρα)	2,57 ± 0,06 ^a	2,33 ± 0,09 ^b	1,98 ± 0,10 ^c
FCR	1,17 ± 0,03 ^a	1,40 ± 0,02 ^b	1,71 ± 0,13 ^c
PER	1,70 ± 0,05 ^a	1,41 ± 0,02 ^b	1,17 ± 0,09 ^c
Κατακράτηση πρωτεΐνης (%)	27,70 ± 0,82 ^a	22,3 ± 0,38 ^b	18,50 ± 1,35 ^c
Κατακράτηση λίπους (%)	67,90 ± 2,08 ^a	61,0 ± 0,69 ^b	48,0 ± 2,95 ^c
HSI (%)	1,96 ± 0,26	1,90 ± 0,50	1,93 ± 0,34
VSI (%)	8,50 ± 1,42 ^a	7,59 ± 1,97 ^{ab}	6,48 ± 1,49 ^b
K	1,55 ± 0,02	1,49 ± 0,04	1,56 ± 0,06
Κόστος σιτηρεσίου (€/Kg)	1,21	0,90	0,77
Μεταβολή κόστους σιτηρεσίου (%)	0,00	-18,00	-36,00
ECR (€/Kg ψαριού)	1,41±0.04	1,38±0.02	1,32±0.10

Οι τιμές αντιπροσωπεύουν μέσους όρους ± τυπική απόκλιση (n=4). Οι τιμές κάθε παραμέτρου που φέρουν διαφορετικό εκθέτη, μεταξύ των διατροφικών ομάδων, υποδηλώνουν στατιστικώς σημαντική διαφορά (P < 0.05) μεταξύ τους. SGR - ειδικός ρυθμός ανάπτυξης, FCR - συντελεστής μετατρεψιμότητας τροφής, PER – συντελεστής αποδοτικότητας πρωτεΐνης, HSI – ηπατοσωματικός δείκτης, VSI – ενδοσπλαχνικός δείκτης, K – δείκτης ευρωστίας.

Κατά τη διάρκεια του 1^{ου} διατροφικού πειράματος δεν παρατηρήθηκαν θνησιμότητες σε κάποια διατροφική ομάδα. Η πρόσληψη της τροφής PBM50 από την τσιπούρα ήταν ελαφρώς χαμηλότερη, αλλά μη σημαντικά διαφορετική ($P>0,05$) από την πρόσληψη της τροφής-μάρτυρα (FM) (Πιν. 3.5). Ωστόσο, η τροφή PBM100 καταναλώθηκε σημαντικά ($P<0,05$) λιγότερο από τις παραπάνω τροφές και αυτό ήταν εμφανές ήδη από την 60^η ημέρα διατροφής (Πιν. 3.4). Έπειτα από 100 ημέρες διατροφής, το μέσο τελικό σωματικό βάρος της FM ομάδας ιχθύων ήταν σημαντικά υψηλότερο ($P<0,05$) από όλες τις άλλες ομάδες, ενώ το τελικό βάρος της ομάδας PBM100 ήταν σημαντικά χαμηλότερο ($P<0,05$) από εκείνο της PBM50 ομάδας και αυτό ήταν εμφανές ήδη από την 60^η ημέρα εκτροφής (Πιν. 3.4). Αντίστοιχα, η αύξηση σωματικού βάρους και ο ειδικός ρυθμός ανάπτυξης (SGR) των ιχθύων ήταν σημαντικά υψηλότερος για τις τσιπούρες που διατρέφονταν με FM συγκριτικά με εκείνες που διατρέφονταν με τις τροφές που περιείχαν πτηνάλευρο, με την ομάδα PBM100 να έχει τον χαμηλότερο ($P<0,05$) ρυθμό ανάπτυξης. Παρόμοια εικόνα μεταξύ των διατροφικών ομάδων παρουσιάστηκε και στον συντελεστή αποδοτικότητας της πρωτεΐνης (PER) και στους συντελεστές κατακράτησης πρωτεΐνης και λίπους, όπου η ομάδα των ιχθυδίων που διατράφηκε με την FM τροφή παρουσίασε τις υψηλότερες ($P<0,05$) τιμές (Πιν. 3.5). Ο συντελεστής μετατρεψιμότητας τροφής (FCR) ήταν σημαντικά χαμηλότερος στην FM ομάδα των ιχθυδίων και αυξήθηκε βαθμιαία με την αύξηση του επιπέδου χορήγησης του πτηναλεύρου στην τροφή (Πιν. 3.5). Αναφορικά με τον ηπατοσωματικό δείκτη (HSI) και το δείκτη ευρωστίας (K), όλες οι διατροφικές ομάδες παρουσίασαν παρόμοιες τιμές. Η FM ομάδα των ιχθυδίων είχε τον υψηλότερο ($P<0,05$) ενδοσπλαχνικό δείκτη (VSI), ο οποίος μειώθηκε σημαντικά με την αύξηση του επιπέδου χορήγησης του πτηναλεύρου στην τροφή (Πιν. 3.5).

Όσον αφορά την οικονομική αποδοτικότητα των σιτηρεσίων, τα διαφορετικά επίπεδα ένταξης του PBM επηρέασαν το κόστος του σιτηρεσίου και τον οικονομικό συντελεστή

μετατρεψιμότητας της τροφής (ECR) (Πιν. 3.5). Λόγω του ότι το PBM είναι φθηνότερο από το ιχθυάλευρο, η μείωση του κόστους σιτηρεσίου ήταν από 18% στο σιτηρέσιο PBM50 έως και 36% στο σιτηρέσιο PBM100. Το ECR, επίσης, μειώθηκε αισθητά καθώς το επίπεδο ένταξης των PBM αυξήθηκε στο σιτηρέσιο (Παράρτημα - διαγράμματα 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 1.7).

3.2.2.2 Θρεπτική σύσταση των ιχθυδίων

Στον Πίνακα 3.6 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της θρεπτικής σύστασης ολόκληρου του σώματος, του μυϊκού ιστού και του ήπατος των ιχθυδίων τσιπούρας του 1ου διατροφικού πειράματος ολικής αντικατάστασης του ιχθυαλεύρου από άλευρο υποπροϊόντων πουλερικών. Αναφορικά με τη θρεπτική σύσταση του ολικού σώματος των ιχθυδίων του 1ου διατροφικού πειράματος, οι περιεκτικότητες σε υγρασία, ολικές πρωτεΐνες και τέφρα δεν διαφοροποιήθηκαν ($P>0,05$) μεταξύ των τριών διατροφικών ομάδων. Ωστόσο, τα ιχθύδια της ομάδας PBM100 είχαν χαμηλότερη ($P<0,05$) λιποπεριεκτικότητα και ολική ενέργεια στο σώμα τους συγκριτικά με τις άλλες δύο ομάδες. Παρομοίως, οι περιεκτικότητες του μυϊκού ιστού των ιχθυδίων σε υγρασία, ολικές πρωτεΐνες και τέφρα δεν διαφοροποιήθηκαν ($P>0,05$) μεταξύ των τριών διατροφικών ομάδων, ενώ η ομάδα PBM100 είχε χαμηλότερη ($P<0,05$) λιποπεριεκτικότητα, αν και η ολική ενέργεια του μυϊκού τους ιστού δεν διέφερε συγκριτικά με των υπολοίπων ιχθυδίων. Αναφορικά με τη χημική σύσταση του ήπατος των ιχθυδίων του 1ου διατροφικού πειράματος, η περιεκτικότητά τους σε υγρασία ήταν παρόμοια ($P>0,05$) μεταξύ των ομάδων. Η περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες του ήπατος των ιχθυδίων της PBM100 ήταν χαμηλότερη ($P<0,05$) από των άλλων ομάδων, ενώ οι λιποπεριεκτικότητες του ήπατος τους, τόσο της PBM100 όσο και της PBM50 ομάδας ήταν χαμηλότερες ($P<0,05$) από εκείνη της FM ομάδας.

Πίνακας 3.6. Θρεπτική σύσταση (% επί της ξηρής ουσίας δείγματος) ολόκληρου σώματος, του μυϊκού ιστού και του ήπατος των ιχθυδίων που χρησιμοποιήθηκαν για τη μερική (50%) και ολική (100%) αντικατάσταση του ιχθυαλεύρου από πτηνάλευρο (1^ο διατροφικό πείραμα)

Θρεπτική σύσταση (%)	FM	PBM50	PBM100
<u>Θρεπτική σύσταση ολικού σώματος (%)</u>			
Υγρασία (νωπού)	67,43 ± 1,63	67,52 ± 1,37	68,10 ± 1,60
Ολικές πρωτεΐνες	49,59 ± 2,47	48,21 ± 1,11	49,13 ± 3,34
Ολικά λιπίδια	38,34 ± 2,62 ^a	38,38 ± 2,23 ^a	35,21 ± 3,01 ^b
Τέφρα	10,71 ± 1,00	10,98 ± 0,63	11,92 ± 1,05
Ενέργεια (kJ/g)	26,10 ± 0,88 ^a	26,14 ± 0,65 ^a	24,80 ± 1,03 ^b
<u>Θρεπτική σύσταση μυϊκού ιστού (%)</u>			
Υγρασία (νωπού)	71,46 ± 1,74	71,36 ± 1,50	70,77 ± 2,21
Ολικές πρωτεΐνες	69,80 ± 3,36	68,34 ± 3,01	70,91 ± 3,92
Ολικά λιπίδια	26,30 ± 4,02 ^a	25,13 ± 4,89 ^a	19,75 ± 3,57 ^b
Τέφρα	5,20 ± 0,41	5,56 ± 0,22	5,19 ± 0,35
Ενέργεια (kJ/g)	25,66 ± 0.82	25,40 ± 0.94	24,41 ± 1.03
<u>Θρεπτική σύσταση ήπατος (%)</u>			
Υγρασία (νωπού)	66,72 ± 0,84	66,42 ± 1,02	65,78 ± 0,92
Ολικές πρωτεΐνες	35,72 ± 0,48 ^a	34,98 ± 0,22 ^a	31,10 ± 0,11 ^b
Ολικά λιπίδια	38,61 ± 1,16 ^a	42,01 ± 1,23 ^b	42,51 ± 1,11 ^b

Οι τιμές αντιπροσωπεύουν μέσους όρους ± τυπική απόκλιση (n=12). Οι τιμές κάθε παραμέτρου που φέρουν διαφορετικό εκθέτη μεταξύ των διατροφικών ομάδων υποδηλώνουν στατιστικώς σημαντική διαφορά (P < 0.05) μεταξύ τους.

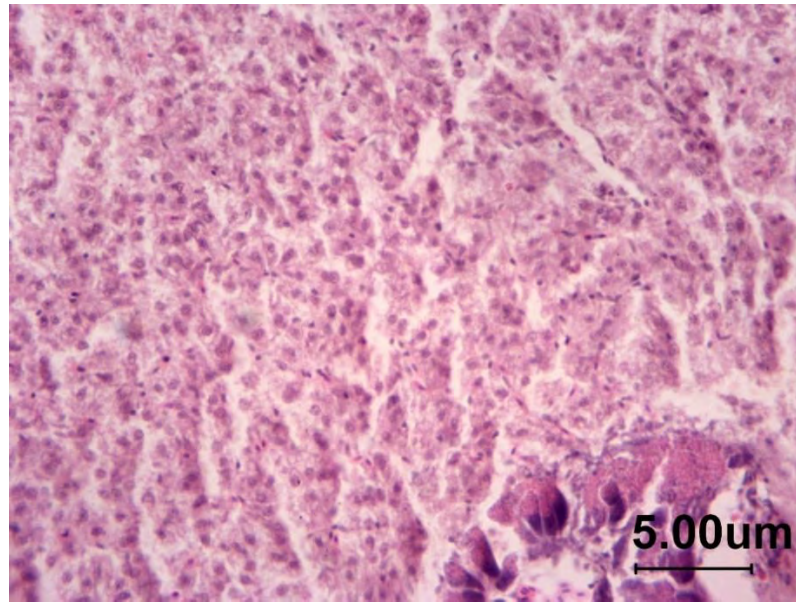
3.2.2.3 Ιστολογική εξέταση των ιχθυδίων

Για την ιστολογική εξέταση των ιχθυδίων του συγκεκριμένου διατροφικού πειράματος πάρθηκαν 2 άτομα από κάθε δεξαμενή και συνολικά 8 ανά διατροφική ομάδα, αφού πρώτα αναισθητοποιήθηκαν πλήρως με αυξημένες δόσεις φαινοξαιθανόλης συγκέντρωσης 1,0 mg/l και θανατώθηκαν έπειτα σε πάγο. Τα αποτελέσματα της ιστολογικής εξέτασης του ήπατος των ιχθυδίων του μελετηθέντος είδους (Εικ. 3.1) έδειξαν ότι τα άτομα που διατράφηκαν με ιχθυάλευρο (FM ομάδα) είχαν φυσιολογική ιστολογική εικόνα του ήπατος, υπήρχαν λίγα και μικρά λιποσταγονίδια και απουσία αιμορραγιών (Βαθμός 1, ελάχιστες αλλοιώσεις, Πιν. 3.7). Οι πυρήνες των ηπατοκυττάρων ήταν φυσιολογικοί και κεντρικοί. Τα παγκρεατικά νησίδια ήταν εμφανή και εντός των κυψελοειδών κυττάρων υπήρχε μεγάλος αριθμός από ηωσινόφιλα εκκριτικά προενζυμικά κοκκία. Τα ιχθύδια που διατράφηκαν με την τροφή PBM50 είχαν γενικά φυσιολογική ιστολογική εικόνα του ήπατος αλλά υπήρχαν και ήπιες αλλοιώσεις (Βαθμός 2, Πιν 3.8, Εικ. 3.2).

Πίνακας 3.7. Βαθμολογία ιστολογικής αλλοίωσης του ήπατος και του εντέρου των ιχθυδίων του 1^{ου} διατροφικού πειράματος.

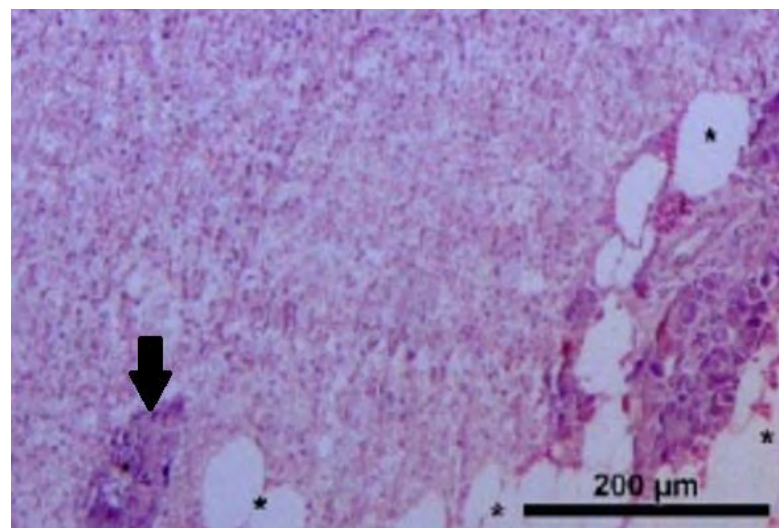
Βαθμολογία Αλλοίωσης			
	FM	PBM50	PBM100
Ήπαρ	1	2	3
Έντερο	0	0	0

Συγκεκριμένα, σε κάποια ηπατοκύτταρα ο πυρήνας δεν ήταν κεντρικά τοποθετημένος αλλά μετατοπισμένος περιφερειακά του κυττάρου, ενώ υπήρχαν και μερικά μεσαίου μεγέθους λιποσταγονίδια. Ωστόσο, σε κανένα ιχθύδιο της ομάδας PBM50 δεν παρατηρήθηκαν ενδείξεις στεάτωσης ή αιμορραγιών ή οποιασδήποτε άλλης σοβαρής αλλοίωσης.



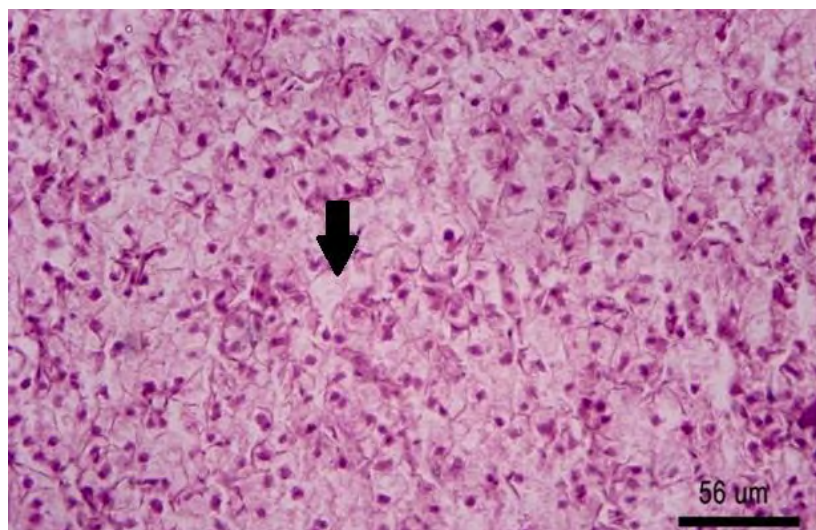
Εικόνα 3.1. Φυσιολογική ιστολογική εικόνα ήπατος της ομάδας του μάρτυρα (FM).

Σε ένα από τα οκτώ εξεταζόμενα ιχθυδία της PBM50 ομάδας παρουσιάστηκε μικρής έκτασης φλεγμονή με παρουσία υγρού και λευκοκυττάρων σε αυτό (Εικόνα 3.2), χωρίς όμως να αποκλείεται να πρόκειται και για μικρή νεκρωτική περιοχή του ήπατος.

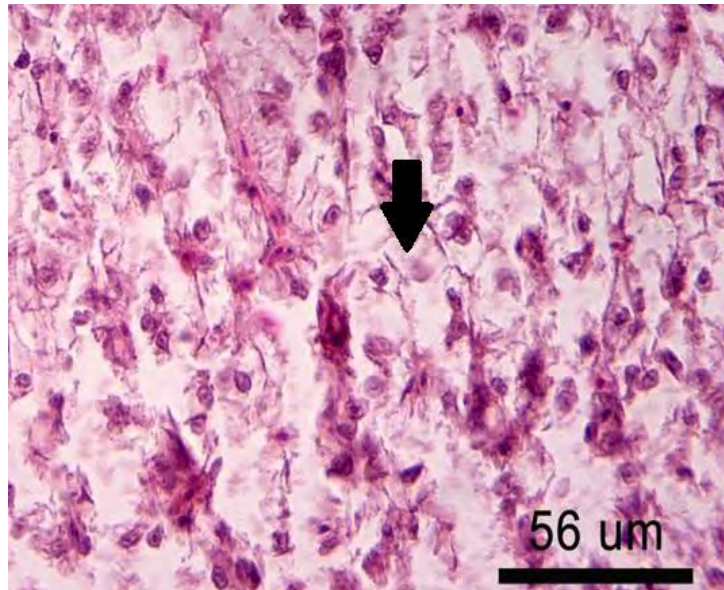


Εικόνα 3.2. Ιστολογική τομή ήπατος ιχθυδίων τσιπούρας που διατράφηκε με την PBM50 τροφή. Ύπαρξη φλεγμονής με παρουσία υγρού και λευκοκυττάρων.

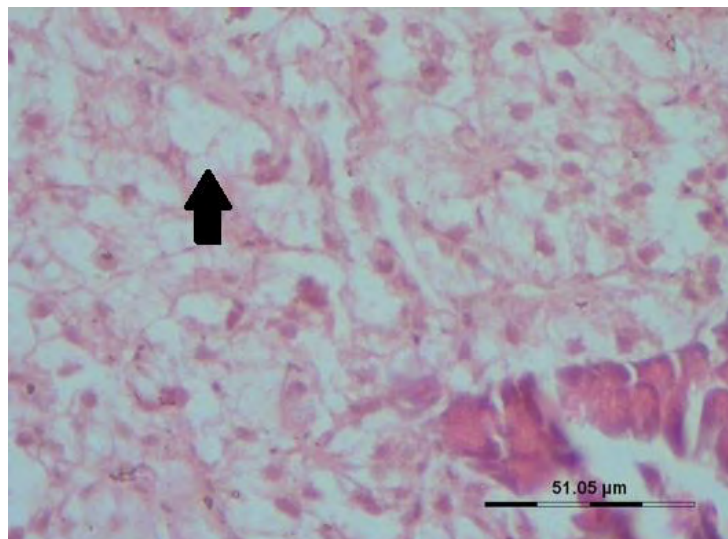
Για τα ιχθύδια που διατράφηκαν με την τροφή PBM100 η γενική ιστολογική εικόνα τους ήταν σαφώς πιο υποβαθμισμένη (Βαθμός 3, μέτρια αλλοίωση) από εκείνη των ιχθυδίων των ομάδων FM και PBM50 (Εικ. 3.3). Συγκεκριμένα, σε κάποια ηπατοκύτταρα ο πυρήνας δεν ήταν κεντρικά τοποθετημένος αλλά μετατοπισμένος περιφερειακά του κυττάρου, ενώ υπήρχαν και αρκετά μεσαίου μεγέθους λιποσταγονίδια. Ωστόσο, σε κανένα ιχθύδιο της ομάδας PBM100 δεν παρατηρήθηκαν ενδείξεις στεάτωσης ή αιμορραγιών ή οποιασδήποτε άλλης σοβαρής αλλοίωσης. Παρατηρήθηκε, όμως, εκφύλιση ηπατοκυττάρων σε 2 από τα 8 εξεταζόμενα ιχθύδια (Εικ. 3.4 & Εικ. 3.5).



Εικόνα 3.3. Ιστολογικές τομές ήπατος ιχθυδίων τσιπούρας που διατράφηκε με την PBM50 τροφή. Μεσαίου μεγέθους λιποσταγονίδια και μερική μετατόπιση του πυρήνα των ηπατοκυττάρων



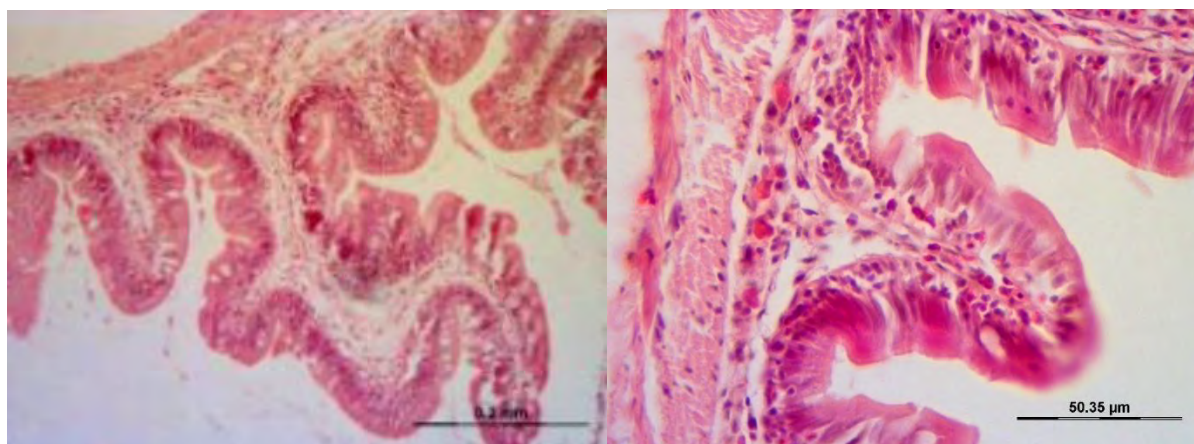
Εικόνα 3.4. Αρκετά λιποσταγονίδια μεσαίου μεγέθους στην ομάδα PBM100.



Εικόνα 3.5. Αρκετά λιποσταγονίδια μεσαίου μεγέθους και εκφύλιση ηπατοκυττάρων στην ομάδα (PBM100)

Αναφορικά με την ιστολογική εξέταση του εντέρου των ιχθυδίων του είδους που μελετήθηκε, όλες οι διατροφικές ομάδες είχαν μια φυσιολογική ιστολογική εικόνα (Εικ. 3.6). Τα εντεροκύτταρα και τα βλεννογόνα κύτταρα (goblet cells) ήταν ευδιάκριτα. Στον υποβλεννογόνο χιτώνα υπήρχαν άφθονα ηωσινόφιλα λευκά αιμοσφαίρια, το οποίο είναι

φυσιολογικό σε ιχθύες (Βερίλλης & Μεντέ 2017). Σε κανέναν εξεταζόμενο ιστό δεν παρατηρήθηκαν ενδείξεις φλεγμονής ή εντερίτιδων.



Εικόνα 3.6. Ιστολογική τομή εντέρου τσιπούρας που διατράφηκε με την FM (αριστερά) και PBM100 (δεξιά) τροφή. Φυσιολογική ιστολογική εικόνα με ευδιάκριτα εντεροκύτταρα και βλεννοπαραγωγά κύτταρα.

3.3 2^ο διατροφικό πείραμα – μερική (25% και 50%) αντικατάσταση ιχθυαλεύρου από άλευρο υποπροϊόντων πουλερικών με ταυτόχρονη εξισορρόπηση σε αμινοξέα

3.3.1 Πειραματικά σιτηρέσια και συνθήκες εκτροφής

Στο 2^ο διατροφικό πείραμα, καταρτίστηκαν τέσσερα ισοπρωτεϊνικά (50% ολικές πρωτεΐνες) και ισοενεργειακά (21 KJ/g) σιτηρέσια, χρησιμοποιώντας την τροφή μάρτυρα (FM) του 1^{ου} διατροφικού πειράματος, αλλά η πρωτεΐνη του ιχθυαλεύρου αντικαταστάθηκε σε χαμηλότερα επίπεδα με ή χωρίς συμπλήρωση απαραίτητων αμινοξέων: κατά 25% (PBM25), κατά 25% με ταυτόχρονη συμπλήρωση λυσίνης και μεθειονίνης (PBM25+) και κατά 50% με συμπλήρωση των συγκεκριμένων αμινοξέων (PBM50+) (Πιν. 3.8). Η λυσίνη και η μεθειονίνη αποτέλεσαν τα δύο περισσότερο ελλειμματικά απαραίτητα αμινοξέα στο πτηνάλευρο συγκριτικά με το ιχθυάλευρο (Πιν. 3.9).

Για τις ανάγκες του 2^{ου} διατροφικού πειράματος χρησιμοποιήθηκαν συνολικά 300 ιχθύδια τσιπούρας μέσου σωματικού βάρους $2,97 \pm 0,31$ g, μέσου ολικού μήκους $6,35 \pm 0,03$ cm και τοποθετήθηκαν σε 12 γυάλινα ενυδρεία (125 L) και αφέθηκαν να εγκλιματιστούν στις ελεγχόμενες συνθήκες του σταθμού για 10 ημέρες σιτιζόμενα με το σιτηρέσιο FM, έως την έναρξη χορήγησης των πειραματικών σιτηρεσίων. Τα ιχθύδια διαχωρίστηκαν τυχαία σε συνολικά τέσσερις διατροφικές ομάδες με τριπλή επαναληψιμότητα (25 ψάρια/ενυδρείο, 3 ενυδρεία/διατροφική ομάδα) με την κάθε μία να διατρέφεται με διαφορετικό σιτηρέσιο. Συγκεκριμένα, η ομάδα ιχθύων FM διατρέφονταν με την τροφή που περιείχε αποκλειστικά ιχθυάλευρο ως πηγή ζωικής πρωτεΐνης και θεωρήθηκε η ομάδα μάρτυρας, ενώ οι υπόλοιπες τρεις ομάδες ιχθύων PBM25, PBM25+ και PBM50+ διατρεφόταν με τα σιτηρέσια που περιείχαν πτηνάλευρο στις αντίστοιχες αντικαταστάσεις. Το σύμβολο (+) υποδηλώνει ότι στα συγκεκριμένα σιτηρέσια υπήρχε η προσθήκη λυσίνης και μεθειονίνης. Η ποιότητα του νερού, οι καθημερινές μεταχειρίσεις και η διαχείριση της σίτισης ήταν παρόμοιες όπως έχουν

περιγραφεί στο 1^ο διατροφικό πείραμα. Το 2^ο διατροφικό πείραμα διήρκησε συνολικά 110 ημέρες.

Πίνακας 3.8. Καταρτισμός σιτηρεσίων και θρεπτική σύσταση πειραματικών ιχθυοτροφών που χρησιμοποιήθηκαν για τη μερική (25% και 50%) αντικατάσταση του ιχθυαλεύρου από πτηνάλευρο με ταυτόχρονη εξισορρόπηση σε αμινοξέα (2^ο διατροφικό πείραμα)

2^ο διατροφικό πείραμα				
Συστατικά (%) / Σιτηρέσιο	FM	PBM25	PBM25+	PBM50+
Ιχθυάλευρο	58	43,5	43,5	29
Πτηνάλευρο	0	13,6	13,6	27,2
Γλουτένη καλαμποκιού	19,5	19,3	19	18,5
Σιτάρι, αλεύρι	10,4	11,6	11,65	12,95
Ιχθυέλαιο	11,1	11	11	10,85
Βιταμίνες & ανόργανα στοιχεία	0,3	0,3	0,3	0,3
MCP (φωσφορικό μονοασβέστιο)	0,3	0,3	0,3	0,3
Βιταμίνη E	0,1	0,1	0,1	0,1
Βιταμίνη C	0,1	0,1	0,1	0,1
Αντιμυκητιακή ουσία	0,2	0,2	0,2	0,2
Λυσίνη	0	0	0,15	0,3
Μεθειονίνη	0	0	0,1	0,2
<u>Θρεπτική σύσταση (%)¹</u>				
Ξηρή ουσία	92,2	92,3	92,7	92,4
Ολικές αζωτούχες ουσίες	50,1	49,8	48,8	50,2
Ολικές λιπαρές ουσίες	17,0	16,6	16,8	14,8
Υδατάνθρακες ²	16,6	18,0	19,4	20,1
Τέφρα	8,5	7,8	7,7	7,2
Ενέργεια (KJ/g)	21,5	21,4	21,4	21,6

¹ Οι τιμές της θρεπτικής σύστασης αντιπροσωπεύουν μέσους όρους από n=6.

² Το ποσοστό των υδατανθράκων εκτιμήθηκε με αφαίρεση από το 100 του συνόλου των ποσοστών, ολικών πρωτεϊνών, ολικών λιπιδίων και τέφρας.

Πρώτες ύλες: Ιχθυάλευρο (Sardine fishmeal, Köster Marine Proteins GmbH, Hamburg, Germany), πτηνάλευρο (Poultry meal, Sonac, Son, The Netherlands), γλουτένη καλαμποκιού (Glutalys®, Roquette Italia S.p.A, Cassano Spinola, Italy), σιτάρι (τοπική αγορά), ιχθυέλαιο (Tuna oil, Inproquisa SA, Madrid, Spain), MCP (Astron Chemicals SA, Attica, Greece), βιταμίνες E και C (DSM Nutritional Products Hellas LTD, Athens, Greece), αντιμυκητιακή ουσία (Mycocurb®, Kemin, Herentals, Belgium), λυσίνη (Ajinomoto Eurolysine S.A.S., Paris, France), μεθειονίνη (MetAMINO® DL-Methionine Feed Grade, Evonik Nutrition & Care GmbH, Athens, Greece). Πρόμικτο βιταμινών και ανοργάνων στοιχείων (kg⁻¹ μίγματος): Vitamins: E, 58.3 g; K3, 3.3 g; B1, 3.3 g; B2, 6.6 g; B6, 3.3 mg; B12, 10 mg; Folic acid, 3.3 g; Biotin, 100 mg; C, 33.3 g; Nicotinic acid, 16.6 g; Pantothenic acid, 13.3 g. Minerals: Co, 170 mg; I, 248 mg (Ca(IO₃)₂); Mn, 10 g (MnO); Zn, 33 g (ZnO); Ca 235 g; Se 2,5 mg (Na₂SeO₃); Na 247,5 mg (Na₂SeO₃).

Πίνακας 3.9. Σύσταση σε αμινοξέα (% πρωτεΐνης) των πειραματικών ιχθυοτροφών που χρησιμοποιήθηκαν για τη μερική (25% και 50%) αντικατάσταση του ιχθυαλεύρου από πτηνάλευρο με ταυτόχρονη εξισορρόπηση σε αμινοξέα (2^ο διατροφικό πείραμα)

2 ^ο Διατροφικό Πείραμα					
Αμινοξέα ¹	FM	PBM25	PBM25+	PBM50+	Απαιτήσεις (% πρωτεΐνης) ²
<u>Απαραίτητα αμινοξέα</u>					
Αργινίνη	5,69	5,83	5,78	5,92	5,4
Ιστιδίνη	2,62	2,44	2,54	2,29	1,7
Ισολευκίνη	3,92	3,66	3,43	3,46	2,6
Λευκίνη	9,73	9,59	9,48	9,28	4,5
Λυσίνη	6,48	5,99	6,24	6,27	5,0
Μεθειονίνη	2,32	2,17	2,44	2,32	2,4
Φαινυλαλανίνη	4,76	4,63	4,59	4,45	2,9
Θρεονίνη	4,30	4,34	4,36	4,36	2,8
Τρυπτοφάνη	0,61	0,62	0,56	0,61	0,6
Βαλίνη	4,64	4,44	4,13	4,22	3,0
<u>Μη απαραίτητα αμινοξέα</u>					
Αλανίνη	7,06	7,23	7,25	7,27	
Ασπαρτικό οξύ	8,64	8,47	8,57	8,34	
Κυστίνη	1,17	1,14	1,07	1,16	
Γλουταμινικό οξύ	16,39	16,53	16,56	16,37	
Γλυκίνη	5,95	6,69	6,71	7,31	
Προλίνη	7,69	8,22	8,14	8,46	
Σερίνη	4,70	4,77	4,83	4,71	
Τυροσίνη	3,33	3,24	3,33	3,18	

¹Μέθοδος για τρυπτοφάνη: UNI 22618:2000 + UNI 22630:2000, μέθοδος για υπόλοιπα αμινοξέα: REG CE 152/09 27/01/09 ALL III MET F PTO 5.3.

²Απαιτήσεις (% πρωτεΐνης) των ιχθυδίων *S. aurata* κατά Kaushik (1998).

3.3.2 Αποτελέσματα

3.3.2.1 Παράμετροι ανάπτυξης των ιχθυδίων και αξιοποίησης τροφής

Τα αποτελέσματα της ανάπτυξης των ιχθυδίων τσιπούρας του 2^{ου} διατροφικού πειράματος χαμηλής υποκατάστασης του ιχθυαλεύρου από άλευρο υποπροϊόντων πουλερικών στο σιτηρέσιο της τσιπούρας παρουσιάζονται στους Πίνακες 3.10 (30 ημέρες εκτροφής), 3.11 (60 ημέρες εκτροφής) και 3.12 (ολοκλήρωση πειραματισμού έπειτα από 110 ημέρες εκτροφής) (Παράρτημα - διάγραμμα 2.1).

Στο τέλος του 2^{ου} διατροφικού πειράματος (Πιν. 3.12), η επιβίωση των ιχθυδίων ήταν υψηλή (>92%) και παρόμοια μεταξύ των ομάδων. Η πρόσληψη της τροφής, το τελικό σωματικό βάρος, η αύξηση βάρους, ο ειδικός ρυθμός ανάπτυξης (SGR), ο συντελεστής μετατρεψιμότητας της τροφής (FCR) και ο συντελεστής αποδοτικότητας της πρωτεΐνης (PER) ήταν παρόμοιοι ($P>0,05$) μεταξύ των τεσσάρων διατροφικών ομάδων. Αν και ο δείκτης κατακράτησης λίπους ήταν, επίσης, παρόμοιος μεταξύ των ομάδων, ο δείκτης κατακράτησης πρωτεΐνης ήταν μειούμενος καθώς το επίπεδο χορήγησης του πτηναλεύρου αυξανόταν στο σιτηρέσιο με αποτέλεσμα η ομάδα PBM50+ να έχει σημαντικά χαμηλότερο δείκτη από την ομάδα FM. Παρόμοια εικόνα παρατηρήθηκε και με τον ενδοσπλαχνικό δείκτη (VSI), ο οποίος μειώθηκε σημαντικά με την αύξηση του επιπέδου χορήγησης του πτηναλεύρου στην τροφή, ενώ ο ηπατοσωματικός δείκτης (HSI) και ο δείκτης ευρωστίας (K) ήταν παρόμοιοι σε όλες τις διατροφικές ομάδες. Όσον αφορά την οικονομική αποδοτικότητα των σιτηρεσίων, τα διαφορετικά επίπεδα ένταξης του PBM επηρέασαν το κόστος του σιτηρεσίου και τον οικονομικό συντελεστή μετατρεψιμότητας της τροφής (ECR) (Πιν. 3.12). Λόγω του ότι το PBM είναι φθηνότερο από το ιχθυάλευρο, η μείωση του κόστους σιτηρεσίου ήταν από 8,3% στα σιτηρέσια PBM25 και PBM25+ έως και 16,5% στο σιτηρέσιο PBM50+. Το ECR, επίσης, μειώθηκε σημαντικά, καθώς το επίπεδο ένταξης των PBM αυξήθηκε στο σιτηρέσιο (Παράρτημα – διαγράμματα 2.2, 2.3, 2.4, 2.5, 2.6, 2.7).

Πίνακας 3.10. Παράμετροι ανάπτυξης ιχθυδίων τσιπούρας διατρεφόμενοι με ιχθυοτροφές που χρησιμοποιήθηκαν για τη μερική (25% και 50%) αντικατάσταση του ιχθυαλεύρου από πτηνάλευρο με ταυτόχρονη εξισορρόπηση σε αμινοξέα (2^ο διατροφικό πείραμα), έπειτα από **30 ημέρες** εκτροφής

2^ο διατροφικό πείραμα				
Παράμετροι / Διατροφικές ομάδες	FM	PBM25	PBM25+	PBM50+
Επιβίωση (%)	98,7±2,3	100	98,7±2,3	97,3±4,6
Πρόσληψη τροφής (g/ψάρι)	8,13±0,16	8,34±0,73	8,07±0,71	8,18±0,29
Αρχικό βάρος (g/ψάρι)	2,97±0,01	2,97±0,00	2,97±0,01	2,97±0,01
Τελικό βάρος (g/ψάρι)	9,57±0,25	10,03±1,08	9,65±0,60	9,85±0,67
SGR (%/ημέρα)	3,91±0,10	4,04±0,38	3,92±0,21	3,99±0,22
FCR	1,23±0,02	1,19±0,11	1,21±0,01	1,19±0,07

Οι τιμές αντιπροσωπεύουν μέσους όρους ± τυπική απόκλιση (n=3). Δεν υπάρχουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές των τιμών (P>0,05) μεταξύ των διατροφικών ομάδων σε όλες τις παραμέτρους που εξετάστηκαν.

Πίνακας 3.11. Παράμετροι ανάπτυξης ιχθυδίων τσιπούρας διατρεφόμενοι με ιχθυοτροφές που χρησιμοποιήθηκαν για τη μερική (25% και 50%) αντικατάσταση του ιχθυαλεύρου από πτηνάλευρο με ταυτόχρονη εξισορρόπηση σε αμινοξέα (2^ο διατροφικό πείραμα), έπειτα από **60 ημέρες** εκτροφής

2^ο διατροφικό πείραμα				
Παράμετροι / Διατροφικές ομάδες	FM	PBM25	PBM25+	PBM50+
Επιβίωση (%)	96,0±0,0	98,7±2,3	98,7±2,3	96,0±6,9
Πρόσληψη τροφής (g/ψάρι)	21,62±1,09	22,86±1,76	23,09±0,58	22,84±1,23
Αρχικό βάρος (g/ψάρι)	2,97±0,01	2,97±0,00	2,97±0,01	2,97±0,01
Τελικό βάρος (g/ψάρι)	20,00±2,30	22,06±2,64	22,64±0,35	22,07±2,02
Αύξηση βάρους (g/ψάρι)	17,04±2,29	19,09±2,64	19,67±0,36	19,10±2,01
SGR (%/ημέρα)	3,02±0,19	3,17±0,20	3,22±0,03	3,18±0,15
FCR	1,28±0,12	1,21±0,09	1,17±0,04	1,20±0,07

Οι τιμές αντιπροσωπεύουν μέσους όρους ± τυπική απόκλιση (n=3). Δεν υπάρχουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές των τιμών (P>0,05) μεταξύ των διατροφικών ομάδων σε όλες τις παραμέτρους που εξετάστηκαν.

Πίνακας 3.12. Παράμετροι ανάπτυξης, αξιοποίησης τροφής, οικονομικότητας σιτηρεσίου και μορφομετρικοί παράμετροι ιχθύων τσιπούρας (*S. aurata*) διατρεφόμενοι με ιχθυοτροφές που χρησιμοποιήθηκαν για τη μερική (25% και 50%) αντικατάσταση του ιχθυαλεύρου από πτηνάλευρο με ταυτόχρονη εξισορρόπηση σε αμινοξέα (2^ο διατροφικό πείραμα), έπειτα από **110 ημέρες** εκτροφής

2^ο διατροφικό πείραμα				
Παράμετροι / Διατροφικές ομάδες	FM	PBM25	PBM25+	PBM50+
Επιβίωση (%)	92,00 ± 4,00	98,70 ± 2,30	93,30 ± 2,30	92,00 ± 5,60
Πρόσληψη (g/ψάρι)	48,40 ± 0,97	48,40 ± 2,39	49,70 ± 1,83	49,40 ± 0,61
Ολικό μήκος (cm)	13,80 ± 0,22	13,80 ± 0,47	13,80 ± 0,06	13,90 ± 0,37
Αρχικό βάρος (g/ψάρι)	2,97 ± 0,01	2,97 ± 0,00	2,97 ± 0,01	2,97 ± 0,01
Τελικό βάρος (g/ψάρι)	41,40 ± 1,17	40,70 ± 3,54	41,70 ± 1,57	39,80 ± 1,39
Αύξηση βάρους (g/ψάρι)	38,40 ± 1,17	37,70 ± 3,54	38,80 ± 1,57	36,40 ± 1,39
SGR (%/ημέρα)	2,40 ± 0,02	2,38 ± 0,08	2,40 ± 0,04	2,35 ± 0,03
FCR	1,26 ± 0,01	1,29 ± 0,07	1,28 ± 0,02	1,36 ± 0,07
PER	1,59 ± 0,02	1,56 ± 0,09	1,60 ± 0,03	1,47 ± 0,15
Κατακράτηση πρωτεΐνης (%)	29,10 ± 0,28 ^a	27,30 ± 1,51 ^{ab}	26,80 ± 0,43 ^{ab}	24,70 ± 1,23 ^b
Κατακράτηση λίπους (%)	59,20 ± 0,51	60,20 ± 3,12	57,10 ± 0,87	62,60 ± 3,02
HSI (%)	1,96 ± 0,36	1,91 ± 0,40	2,00 ± 0,40	1,86 ± 0,29
VSI (%)	7,02 ± 0,88 ^a	6,41 ± 0,97 ^{ab}	6,27 ± 0,86 ^{ab}	5,90 ± 1,18 ^b
K	1,54 ± 0,05	1,51 ± 0,06	1,59 ± 0,04	1,48 ± 0,04
Κόστος σιτηρεσίου (€/Kg)	1,21	1,11	1,11	1,01
Μεταβολή κόστους σιτ.(%)	0	8,3	8,3	16,5
ECR (€/Kg ψαριού)	1,52±0,02 ^a	1,43±0,08 ^{ab}	1,42±0,02 ^{ab}	1,37±0,05 ^b

Οι τιμές αντιπροσωπεύουν μέσους όρους ± τυπική απόκλιση (n=3). Οι τιμές κάθε παραμέτρου που φέρουν διαφορετικό εκθέτη μεταξύ των διατροφικών ομάδων υποδηλώνουν στατιστικώς σημαντική διαφορά (P < 0.05) μεταξύ τους. SGR - ειδικός ρυθμός ανάπτυξης, FCR - συντελεστής μετατρεψιμότητας τροφής, PER - συντελεστής αποδοτικότητας πρωτεΐνης, HSI - ηπατοσωματικός δείκτης, VSI - ενδοσπλαχνικός δείκτης, K - δείκτης ευρωστίας.

3.3.2.2 Θρεπτική σύσταση των ιχθυδίων

Στον Πίνακα 3.13 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της θρεπτικής σύστασης ολόκληρου του σώματος, του μυϊκού ιστού και του ήπατος των ιχθυδίων τσιπούρας του 2^{ου} διατροφικού πειράματος χαμηλής υποκατάστασης του ιχθυαλεύρου από άλευρο υποπροϊόντων πουλερικών. Η θρεπτική σύσταση του ολικού σώματος τους στο 2^ο διατροφικό πείραμα, οι περιεκτικότητες σε υγρασία, ολικές πρωτεΐνες, ολικά λιπίδια τέφρα και ενέργεια, δεν διαφοροποιήθηκαν ($P>0,05$) μεταξύ των τεσσάρων διατροφικών ομάδων.

Πίνακας 3.13. Θρεπτική σύσταση (% επί της ξηρής ουσίας δείγματος) ολόκληρου σώματος, του μυϊκού ιστού και του ήπατος των ιχθύων που χρησιμοποιήθηκαν για τη μερική (25% και 50%) αντικατάσταση του ιχθυαλεύρου από πτηνάλευρο με ταυτόχρονη εξισορρόπηση σε αμινοξέα (2^ο διατροφικό πείραμα)

	FM	PM25	PM25+	PM50+
<u>Θρεπτική σύσταση ολικού σώματος (%)</u>				
Υγρασία (νωπού)	67,4±1,7	66,4±1,7	67,5±1,8	67,6±0,9
Ολικές πρωτεΐνες	55,1±3,8	51,1±4,5	50,7±3,0	51,2±3,7
Ολικά λιπίδια	36,6±3,0	36,0±5,5	35,5±6,4	36,5±3,9
Τέφρα	10,9±1,3	10,7±0,9	10,9±1,4	11,2±0,9
Ενέργεια (kJ/g)	26,2±0,8	26,2±0,1	26,1±0,1	26,1±0,2
<u>Θρεπτική σύσταση μυϊκού ιστού (%)</u>				
Υγρασία (νωπού)	72,2±1,0	73,0±1,3	72,3±1,0	73,1±0,9
Ολικές πρωτεΐνες	75,2±2,1	76,1±2,1	73,7±2,2	75,0±2,6
Ολικά λιπίδια	21,1±2,4 ^a	18,0±3,9 ^{ab}	18,4±1,8 ^{ab}	17,0±1,8 ^b
Τέφρα	5,0±0,2	5,3±0,3	5,1±0,3	5,2±0,2
Ενέργεια (kJ/g)	25,3±0,03	24,7±0,07	25,3±0,05	25,3±0,05
<u>Θρεπτική σύσταση ήπατος (%)</u>				
Υγρασία (νωπού)	67,5±0,8	68,3±0,9	69,7±0,7	69,9±0,7
Ολικά λιπίδια	37,5±1,3 ^a	36,2±1,5 ^a	40,6±1,6 ^{ab}	43,6±1,6 ^{bc}

Οι τιμές αντιπροσωπεύουν μέσους όρους ± τυπική απόκλιση (n=12). Οι τιμές κάθε παραμέτρου που φέρουν διαφορετικό εκθέτη μεταξύ των διατροφικών ομάδων υποδηλώνουν στατιστικώς σημαντική διαφορά ($P < 0.05$) μεταξύ τους.

Ωστόσο, τα ιχθύδια της ομάδας PBM25+ είχαν χαμηλότερη λιποπεριεκτικότητα στο σώμα τους συγκριτικά με τις άλλες δύο ομάδες χωρίς να υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά. Παρομοίως, οι περιεκτικότητες του μυϊκού ιστού των ιχθύων σε υγρασία, ολικές πρωτεΐνες και τέφρα δεν διαφοροποιήθηκαν ($P>0,05$) μεταξύ των τεσσάρων διατροφικών ομάδων, ενώ η ομάδα PBM50+ είχε χαμηλότερη λιποπεριεκτικότητα ($P<0,05$) σε σχέση με τις υπόλοιπες τρεις ομάδες. Αναφορικά με τη χημική σύσταση του ήπατος των ιχθύων του 2ου διατροφικού πειράματος, η περιεκτικότητά τους σε υγρασία ήταν παρόμοια ($P>0,05$) μεταξύ των ομάδων. Οι λιποπεριεκτικότητες του ήπατος των ομάδων PBM25+ και PBM50+ ήταν αυξημένες συγκριτικά με των άλλων ομάδων ιχθύων.

3.3.2.3 Ιστολογική εξέταση των ιχθυδίων

Για την ιστολογική εξέταση των ιχθυδίων πάρθηκαν 2 άτομα από κάθε δεξαμενή και συνολικά 8 ιχθύδια ανά διατροφική ομάδα. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα ιχθύδια που διατράφηκαν με ιχθυάλευρο (FM) είχαν φυσιολογική ιστολογική εικόνα του ήπατος, ύπαρξη λίγων και μικρών λιποσταγονιδίων και απουσία αιμορραγιών (Βαθμός 1, Πιν. 3.14, ελάχιστες αλλοιώσεις, Εικ. 3.7).

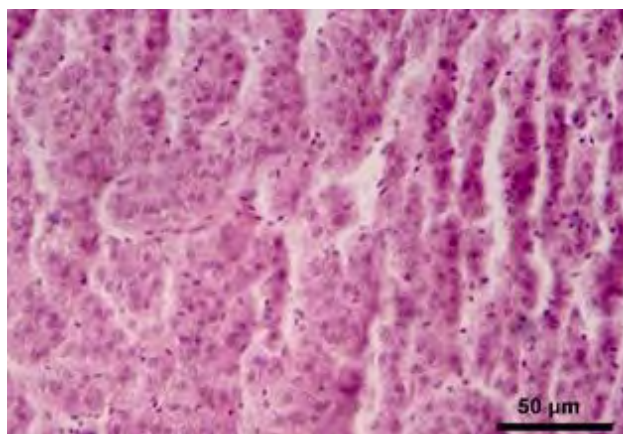
Πίνακας 3.14. Βαθμολογία ιστολογικής αλλοίωσης του ήπατος και του εντέρου των ιχθυδίων του 2^{ου} διατροφικού πειράματος.

Βαθμολογία Αλλοίωσης				
	FM	PBM25	PBM25+	PBM50+
Ήπαρ	1	1	1	2
Έντερο	0	0	0	0

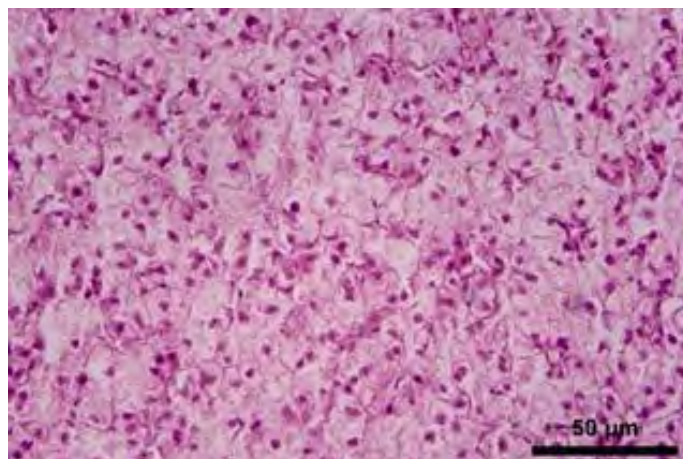
Οι πυρήνες των ηπατοκυττάρων εμφανίσθηκαν φυσιολογικοί και κεντρικοί. Τα παγκρεατικά νησίδια ήταν εμφανή και εντός των κυψελοειδών κυττάρων υπήρχε μεγάλος αριθμός από διπλοθλαστικά εκκριτικά προενζυμικά κοκκία. Δεν παρατηρήθηκαν αιμορραγίες

ή κάποια σοβαρή αλλοίωση. Οι ομάδες που διατράφηκαν με χαμηλή υποκατάσταση ιχθυαλεύρου από άλευρο πουλερικών (PBM25, PBM25+) έδειξαν μια παρόμοια ιστολογική εικόνα (Βαθμός 1, Πιν. 3.14, ελάχιστες αλλοιώσεις, Εικ. 3.8) με εκείνη της ομάδας FM και μόνο σε δύο άτομα παρατηρήθηκαν μεγάλα λιποσταγονίδια γύρω από τα παγκρεατικά νησίδια. Ωστόσο, η ομάδα με την υψηλότερη υποκατάσταση ιχθυαλεύρου από άλευρο πουλερικών (PBM50+) εμφάνισε κάποιες αλλοιώσεις και εκφυλισμούς (Βαθμός 2, ήπια αλλοίωση, Εικ. 3.9). Συγκεκριμένα, σε κάποια ηπατοκύτταρα ο πυρήνας δεν ήταν κεντρικά τοποθετημένος αλλά μετατοπισμένος περιφερειακά του κυττάρου, ενώ υπήρχαν και μερικά μεσαίου μεγέθους λιποσταγονίδια, χωρίς ωστόσο ενδείξεις στεάτωσης ή αιμορραγίας σε κανένα από τα εξεταζόμενα δείγματα (Εικ. 3.9).

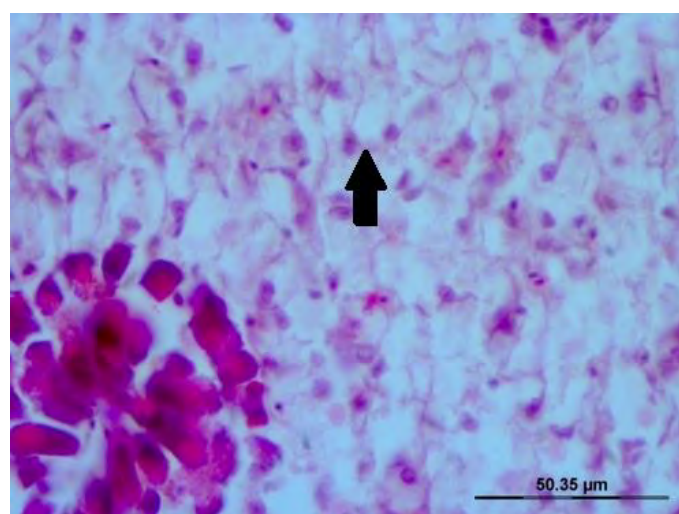
Αναφορικά με την ιστολογική εξέταση του εντέρου των ιχθυδίων, όλες οι διατροφικές ομάδες είχαν μια φυσιολογική ιστολογική εικόνα (Εικ. 3.10). Τα εντεροκύτταρα και τα βλεννογόνα κύτταρα (goblet cells) ήταν ευδιάκριτα. Στον υποβλεννογόνο χιτώνα υπήρχαν άφθονα ηωσινόφιλα λευκά αιμοσφαίρια και σε κανέναν εξεταζόμενο ιστό δεν παρατηρήθηκαν ενδείξεις φλεγμονής ή εντερίτιδων.



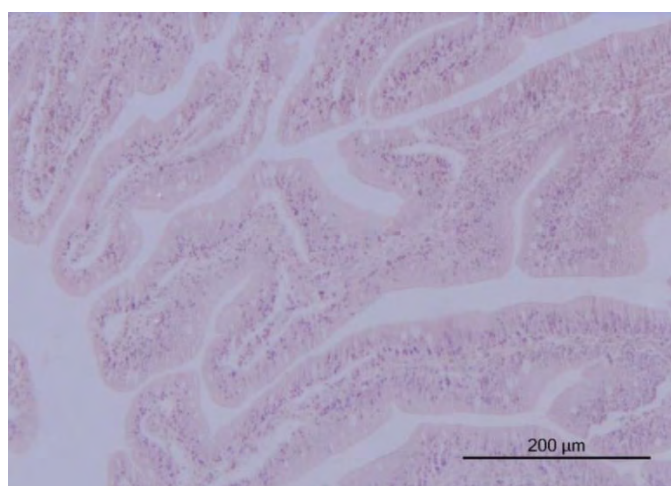
Εικόνα 3.7. Φυσιολογική ιστολογική εικόνα ήπατος της ομάδας του μάρτυρα (FM)



Εικόνα 3.8. Φυσιολογική ιστολογική εικόνα ήπατος της ομάδας PBM25+



Εικόνα 3.9. Μεσαία λιποσταγονίδια με μετατοπισμένους τους πυρήνες, σε ήπαρ της ομάδας PBM50+



Εικόνα 3.10. Φυσιολογική ιστολογική εικόνα εντέρου ιχθυδίων της ομάδας PBM50+

3.4 Συζήτηση

Στην παρούσα μελέτη η αντικατάσταση κατά 50%, καθώς και η ολική αντικατάσταση (100%) της πρωτεΐνης του ιχθυαλεύρου από πρωτεΐνη πτηναλεύρου οδήγησε σε μειωμένο ρυθμό ανάπτυξης, αποδοτικότητα τροφής και κατακράτηση θρεπτικών ουσιών στα ιχθύδια της τσιπούρας, αν και η επιβίωση τους δεν επηρεάστηκε. Η μειωμένη αυτή απόδοση οφείλεται στα πολύ χαμηλότερα επίπεδα μεθειονίνης στα σιτηρέσια PBM50 και PBM100 σε σχέση με το σιτηρέσιο-μάρτυρα (FM) και στην πραγματικότητα οι περιεκτικότητες αυτών σε μεθειονίνη ήταν χαμηλότερες από τις απαιτήσεις μεθειονίνης που έχει το είδος που μελετήθηκε. Τα σιτηρέσια PBM50 και PBM100 παρείχαν, επίσης, χαμηλότερα επίπεδα λυσίνης και άλλων απαραίτητων αμινοξέων και να υπάρχει και μειωμένη πρόσληψη σε σύγκριση με το σιτηρέσιο FM (Πίν. 3.2). Ωστόσο, τα επίπεδα της λυσίνης στα σιτηρέσια PBM50 και PBM100 ήταν υψηλότερα από τις γνωστές απαιτήσεις της τσιπούρας σε λυσίνη, με αποτέλεσμα να μην φέρουν αρνητική επίδραση στην απόδοση των ιχθυδίων. Είναι γνωστό ότι η πρωτεΐνη του πτηναλεύρου περιέχει χαμηλότερα επίπεδα λυσίνης και μεθειονίνης, καθώς και των περισσότερων άλλων απαραίτητων αμινοξέων, σε σύγκριση με το ιχθυάλευρο (Hernández *et al.* 2014, González-Rodríguez *et al.* 2016, Zapata *et al.* 2016). Αυτές οι χαμηλότερες περιεκτικότητες των αμινοξέων στο πτηνάλευρο θα μπορούσαν ενδεχομένως να επιβραδύνουν το ρυθμό ανάπτυξης των ψαριών κατά την αντικατάσταση του ιχθυαλεύρου σε υψηλά επίπεδα (Yigit *et al.* 2006, González-Rodríguez *et al.* 2016), αν και αυτό δεν έχει παρατηρηθεί σε πολλές περιπτώσεις (Zhou *et al.* 2011, Hernández *et al.* 2010, 2014). Η διαφοροποίηση στα ευρήματα μεταξύ των διαφόρων μελετών θα μπορούσαν να αποδοθούν στο κατά πόσον τα πειραματικά σιτηρέσια που βασίζονται σε πτηνάλευρο πληρούν τις ποσοτικές θρεπτικές απαιτήσεις σε αμινοξέα του είδους-στόχου. Για παράδειγμα, οι Rossi & Davies (2012) σημείωσαν ότι η λυσίνη και η μεθειονίνη δεν ήταν οι αιτιολογικοί παράγοντες της μειωμένης ανάπτυξης στο είδος *Trachinotus carolinus* που είχε διατραφεί με σιτηρέσιο

που απουσίαζε το ιχθυάλευρο, διότι το σιτηρέσιο ούτως ή άλλως ικανοποιούσε πλήρως τις απαιτήσεις σε αμινοξέα των ιχθύων.

Στην παρούσα μελέτη, η ενσωμάτωση του πτηναλεύρου στο σιτηρέσιο, υποκαθιστώντας το ιχθυάλευρο κατά 25%, με ή χωρίς συμπληρωματική προσθήκη λυσίνης και μεθειονίνης (2^ο διατροφικό πείραμα) δεν άσκησαν αρνητική επίδραση στην ανάπτυξη και την αποτελεσματικότητα της διατροφής των ιχθυδίων της τσιπούρας. Αυτό πιθανώς οφείλεται στο γεγονός ότι και τα τρία υπό εξέταση σιτηρέσια παρείχαν σημαντικές ποσότητες όλων των απαραίτητων αμινοξέων, αν και τα επίπεδα της μεθειονίνης στο σιτηρέσιο PBM25 ήταν κάτω από τις απαιτήσεις του είδους (Πίν. 3.2). Είναι ενδιαφέρον ότι, η συμπληρωματική προσθήκη αμινοξέων στο σιτηρέσιο 50% (PBM50+) υποκατάστασης του ιχθυαλεύρου στο 2^ο διατροφικό πείραμα, επέφερε παρόμοια απόδοση ανάπτυξης με το σιτηρέσιο-μάρτυρας, ενώ αντίθετα η μη προσθήκη αμινοξέων στο σιτηρέσιο PBM50% (1^ο διατροφικό πείραμα) οδήγησε σε μειωμένη ανάπτυξη των ιχθύων συγκριτικά με τον μάρτυρα. Το γεγονός αυτό δείχνει ότι η προσθήκη αμινοξέων, και ιδιαίτερα μεθειονίνης, είναι απαραίτητα όταν υποκαθιστάται το ιχθυάλευρο από πτηνάλευρο σε υψηλά επίπεδα. Αξίζει να αναφερθεί, επίσης, ότι η ταυτόχρονη συμπλήρωση λυσίνης και μεθειονίνης στο σιτηρέσιο PBM50+, ενίσχυσε την απόδοση των ιχθυδίων, παρά το γεγονός ότι η κατακράτηση πρωτεϊνών σε αυτή την ομάδα ήταν χαμηλότερη από εκείνη των ατόμων του μάρτυρα (FM).

Οι μελέτες με τη χρήση υποπροϊόντων πουλερικών στα σιτηρέσια ιχθυδίων τσιπούρας είναι περιορισμένες. Οι Alexis (1997) και Nengas *et al.* (1999) διαπίστωσαν ότι μια ολική αντικατάσταση της πρωτεΐνης του ιχθυαλεύρου μπορεί να επιτευχθεί χρησιμοποιώντας ένα πτηνάλευρο υψηλής ποιότητας, αλλά όταν χρησιμοποιήθηκε ένα πτηνάλευρο χαμηλότερης ποιότητας η αντικατάσταση ήταν επιτυχής μόνο έως 50%. Αυτή η διαφοροποίηση στην ποιότητα των υπό εξέταση πτηναλεύρων και των υπό εξέταση σιτηρεσίων οφείλεται σε διαφορές που έχουν στη σύσταση των θρεπτικών ουσιών, των απαραίτητων αμινοξέων, αλλά

και της πεπτικότητάς τους. Θα πρέπει να αναφερθεί εδώ ότι τα πτηνάλευρα που χρησιμοποιήθηκαν στις παλαιότερες μελέτες με το είδος *S. aurata* διαφέρουν από το πτηνάλευρο που δοκιμάστηκε στην παρούσα μελέτη, μιας και το τελευταίο παράχθηκε υπό τις πρόσφατες κατευθυντήριες γραμμές της ΕΕ για την επεξεργασία των ΜΖΠ-μη μηρυκαστικών (κανονισμός ΕΚ 142/2011). Ως εκ τούτου, τα ευρήματα από τις προηγούμενες μελέτες ενδέχεται να μην ισχύουν πλέον, δεδομένου ότι αυτά τα πτηνάλευρα δεν είναι πλέον διαθέσιμα στην αγορά.

Επίσης, τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης έδειξαν ότι η εθελούσια πρόσληψη τροφής των ιχθυδίων τσιπούρας επιβραδύνθηκε μόνο όταν το πτηνάλευρο αντικατέστησε πλήρως το ιχθυάλευρο της τροφής. Αυτό καταδεικνύει τη σχετικά υψηλή γευστικότητα αυτής της ζωικής χερσαίας πρωτεΐνης. Παρόμοια αποτελέσματα έχουν αναφερθεί σε άλλα σαρκοφάγα είδη ιχθύων όπως το *L. guttatus* (Hernández *et al.* 2014), το *O. mykiss* (Parés-Sierra *et al.* 2014) και το *Trachinotus ovatus* (Ma *et al.* 2014) με τα υψηλότερα επίπεδα υποκατάστασης που εξέτασαν οι συγγραφείς. Αντίθετα, έχουν αναφερθεί μειώσεις στην πρόσληψη τροφής σε άλλα είδη (Booth *et al.* 2012). Υψηλή πρόσληψη τροφής έχει αναφερθεί και σε μελέτες όπου τα σιτηρέσια περιείχαν πτηνάλευρο σε μίξη με άλλες ΜΖΠ (Hatlen *et al.* 2015, Liland *et al.* 2015).

Αναφορικά με τη θρεπτική σύσταση ολόκληρου του σώματος και του μυϊκού ιστού της τσιπούρας, η υποκατάσταση του ιχθυαλεύρου από πτηνάλευρο δεν επέφερε σημαντικές διαφοροποιήσεις πέραν της μειωμένης λιποπεριεκτικότητας και ενέργειας που παρατηρήθηκε στα ιχθύδια όπου διατράφηκαν με 100% αντικατάσταση ιχθυαλεύρου. Το τελευταίο πιθανόν να οφείλεται στο ότι τα ιχθύδια της συγκεκριμένης ομάδας παρουσίασαν σημαντικά χαμηλότερη πρόσληψη τροφής και συνεπώς διέθεταν λιγότερη πλεονάζουσα ενέργεια για αποθήκευση ως λιπίδια στο σώμα τους. Από την άλλη πλευρά, μειωμένα επίπεδα λίπους στον μυϊκό ιστό παρατηρήθηκαν σε όλα τα ιχθύδια που είχαν διατραφεί με πτηνάλευρο, παρά το

γεγονός ότι η πρόσληψη τροφής ήταν παρόμοια με εκείνη των ιχθυδίων του μάρτυρα. Αυτό μπορεί επίσης να αποδοθεί στα χαμηλότερα επίπεδα λίπους στα σιτηρέσιά τους, τα οποία με τη σειρά τους οφείλονται στο γεγονός ότι το πτηνάλευρο που χρησιμοποιήθηκε περιείχε χαμηλότερο επίπεδο λιπών σε σύγκριση με το ιχθυάλευρο. Στη βιβλιογραφία έχουν αναφερθεί αντιφατικές επιπτώσεις στη θρεπτική σύσταση των ειδών έπειτα από την αντικατάσταση του ιχθυαλεύρου από πτηνάλευρο. Μία χαμηλότερη λιποπεριεκτικότητα σε είδη που είχαν διατραφεί με υψηλά επίπεδα αντικατάστασης από πτηνάλευρο, έχει προηγουμένως αναφερθεί στα νεαρά άτομα τσιπούρας (Nengas *et al.* 1999) και στο υβρίδιο του ριγωτού λαβρακιού (*Dicentrarchus labrax*) (Gallagher & LaDouceur 1995). Αντίθετα, τα υψηλά επίπεδα αντικατάστασης ιχθυαλεύρου από πτηνάλευρο οδήγησαν σε υψηλότερη περιεκτικότητα λιπών στο *T. tinca* (González-Rodríguez *et al.* 2016), στο *O. niloticus* (El-Sayed 1998) και στο *O. mykiss* (Baboli *et al.* 2013). Άλλες μελέτες έχουν υποστηρίξει ότι το πτηνάλευρο, ακόμη και σε υψηλά επίπεδα αντικατάστασης του ιχθυαλεύρου, δεν ασκεί σαφή επίδραση στη θρεπτική σύσταση των ιχθύων (Rawles *et al.* 2011, Hernández *et al.* 2014). Στην παρούσα μελέτη, η περιεκτικότητα πρωτεΐνης ολόκληρου του σώματος και των μυών στα ιχθύδια τσιπούρας δεν επηρεάστηκε από τη διατροφή, παρόλο που η κατακράτηση πρωτεϊνών μειώθηκε με την αύξηση του πτηναλεύρου στο σιτηρέσιο. Παρομοίως, αδιαφοροποίητη πρωτεϊνική περιεκτικότητα του σώματος έχει βρεθεί και σε άλλα είδη ιχθύων που διατράφηκαν με πτηνάλευρο ως υποκατάστατο του ιχθυαλεύρου σε ισο-αζωτούχα σιτηρέσια (Gallagher & LaDouceur 1995, El-Sayed 1998, Rawles *et al.* 2011, Zapata *et al.* 2016). Αντίθετα, σημαντικές αλλαγές έχουν αναφερθεί σε άλλες μελέτες (Baboli *et al.* 2013, González-Rodríguez *et al.* 2016) πιθανώς λόγω διαφορών στην κατακράτηση πρωτεϊνών και αμινοξέων.

Ο ηπατοσωματικός δείκτης (HSI) δεν επηρεάστηκε σημαντικά από τη διατροφή, ενώ ο ενδοσπλαχνικός δείκτης (VSI) μειώθηκε σημαντικά στα υψηλά επίπεδα αντικατάστασης. Η

ασήμαντη επίδραση του πτηναλεύρου στον HSI έχει επίσης αναφερθεί σε άλλα είδη ιχθύων (Shapawi *et al.* 2007, Rawles *et al.* 2011, Ma *et al.* 2014, Panicz *et al.* 2017), αλλά ένας θετικός συσχετισμός του δείκτη με την αυξανόμενη ενσωμάτωση του πτηναλεύρου στο σιτηρέσιο επίσης έχει παρατηρηθεί (Rawles *et al.* 2006, Zhou *et al.* 2011) λόγω των αυξημένων ενεργειακών αποθέσεων στο ήπαρ. Ο μειωμένος VSI στα ιχθυδία των ομάδων PBM50 και PBM100 αποδίδεται στο χαμηλότερο σπλαχνικό τους λίπος, όπως αποδεικνύεται από τη χαμηλότερη κατακράτηση λιπιδίων σε αυτές τις ομάδες ιχθυδίων.

Στην παρούσα μελέτη, εξετάστηκαν παράλληλα και οι επιδράσεις της μερικής και ολικής αντικατάστασης του ιχθυαλεύρου από πτηνάλευρο στην ιστομορφολογία του ήπατος και του πρόσθιου τμήματος του εντέρου των ιχθυδίων τσιπούρας προκειμένου να μελετηθούν οι μεταβολικές επιδράσεις του πτηναλεύρου. Η αντικατάσταση του ιχθυαλεύρου από πτηνάλευρο σε όλα τα δοκιμαζόμενα ποσοστά (από 25% έως και 100%) δεν προκάλεσε ιστολογικές αλλοιώσεις στο έντερο τους και δεν υπήρξαν ενδείξεις υποσιτισμού ή φλεγμονών, όπως π.χ. εντερίτιδων. Σε όλα τα ιχθυδία υπήρχαν ευδιάκριτα εντεροκύτταρα με άφθονα ηωσινόφιλα κύτταρα, επιθηλιακά κενοτόπια (apical epithelial vacuoles) και βλεννοπαραγωγά κύτταρα (goblet cells) σε όλον τον ιστό. Τα βλεννοπαραγωγά κύτταρα ενισχύουν την υγεία και τη διατροφή των ιχθύων, καθώς η βλέννα που εκκρίνεται από αυτά δρα ως μέσο προστασίας του επιθηλίου, ενώ λιπαίνει επίσης τα άπεπτα μέρη της τροφής για προώθησή τους προς την έξοδο (Deplancke & Gaskins 2001, Berillis & Mente 2017). Επιπλέον, τα επιθηλιακά κενοτόπια αποτελούν αναπόσπαστα δομικά συστατικά του εντέρου που είναι υπεύθυνα για την απορρόφηση των θρεπτικών ουσιών (Ferguson 2006). Τα παρόντα ευρήματα υποδηλώνουν ότι το πτηνάλευρο πέπτεται και απορροφάται φυσιολογικά και στον ίδιο βαθμό όπως το ιχθυάλευρο, στο πρόσθιο έντερο των ιχθυδίων τσιπούρας, ακόμη και όταν η αντικατάσταση είναι πλήρης. Παρόμοια αποτελέσματα (καμία επίδραση ιστολογική αλλοίωση του εντέρου) έχουν αναφερθεί και για το είδος *Salmo. salar* που

διατράφηκε με υψηλά επίπεδα πτηναλεύρου υποκαθιστώντας το ιχθυάλευρο (Hu *et al.* 2016). Οι Hartviksen *et al.* (2014) επίσης, δουλεύοντας με το *S. salar* δεν παρατήρησαν ενδείξεις εντερίτιδας και ανέφεραν ότι ο αριθμός των ηωσινοφιλικών κοκκωδών κυττάρων ήταν ανεπηρέαστος σε ιχθύες που διατράφηκαν με πτηνάλευρο σε ποσοστό 50% υποκατάσταση του ιχθυαλεύρου. Ωστόσο, οι ίδιοι συγγραφείς ανέφεραν ότι το πτηνάλευρο οδήγησε σε μειωμένο πλάτος του υποβλεννογόνου χιτώνα. Περαιτέρω, οι Chaklader *et al.* (2020) παρατήρησαν μια απορυθμισμένη εντερική μορφολογία με μικρότερες λάχνες μικρότερης διαμέτρου σε νεαρά άτομα του είδους *L. calcarifer* που διατρέφονταν με πτηνάλευρο αντικαθιστώντας πλήρως το ιχθυάλευρο της τροφής

Αναφορικά με την επίδραση του πτηναλεύρου στην ιστολογία του ήπατος των ιχθυδίων τσιπούρας, τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης έδειξαν ότι αυτό επιφέρει από καμία έως και κάποιες αξιοσημείωτες αλλοιώσεις, ανάλογα με το επίπεδο αντικατάστασης της πρωτεΐνης του ιχθυαλεύρου. Η ιστομορφολογία του ήπατος των μελετηθέντων ατόμων δεν επηρεάστηκε όταν το πτηνάλευρο αντικατέστησε το ιχθυάλευρο κατά 25%. Ωστόσο, σε υψηλότερα επίπεδα αντικατάστασης παρατηρήθηκαν περισσότερα λιποσταγονίδια μεγάλου μεγέθους και μια αυξημένη ηπατική λιποεναπόθεση. Παρόλο που δεν υπήρξαν ενδείξεις στεάτωσης, η οποία προκαλείται από την αυξημένη συσσώμатωση των λιπιδίων, η μερική (50%) και πολύ περισσότερο η ολική (100%) αντικατάσταση του ιχθυαλεύρου από πτηνάλευρο προκάλεσαν ήπιες έως μέτριες ηπατικές αλλοιώσεις στην ιστομορφολογία του ήπατος των ιχθυδίων τσιπούρας. Η συμπληρωματική χορήγηση λυσίνης και μεθειονίνης στο σιτηρέσιο, φάνηκε να βοηθά την φυσιολογία πέψης, καθώς τα ψάρια που διατράφηκαν με αυτά τα σιτηρέσια έδειξαν λιγότερες ηπατικές αλλοιώσεις και δυσμορφίες σε σύγκριση με εκείνα που διατράφηκαν με σιτηρέσια παρόμοιου επιπέδου αντικατάστασης αλλά χωρίς συμπλήρωση αμινοξέων.

Τα ευρήματα αυτά έρχονται σε αντίθεση με εκείνα που ανακοινώθηκαν από τους Sabbagh *et al.* (2019), όπου η πλήρης (100%) αντικατάσταση του ιχθυαλεύρου από πτηνάλευρο δεν προκάλεσε καμία ηπατική αλλοίωση στην τσιπούρα. Παρόλο που και στις δύο μελέτες η ολική αντικατάσταση δεν οδήγησε σε ενδείξεις στεάτωσης, η ήπια συσσωμάτωση λιποσταγονιδίων που παρατηρήθηκε στην παρούσα μελέτη υποδηλώνει μια χαμηλότερη πεπτικότητα του λίπους του πτηναλεύρου συγκριτικά με του ιχθυαλεύρου. Αυτό το συμπέρασμα ενισχύεται από το γεγονός ότι τα ιχθύδια που κατανάλωσαν τις τροφές με τα υψηλά επίπεδα χορήγησης πτηναλεύρου είχαν αυξημένο λίπος στο ήπαρ τους (Πίν. 3.6 και 3.13). Έχει υποστηριχθεί ότι μια συσσώρευση λιπιδίων στο ήπαρ συμβαίνει έπειτα από μια υπερβολική πρόσληψη λιπιδίων και ενέργειας από την τροφή που υπερβαίνει τη φυσιολογική ικανότητα του ήπατος να τα β-οξειδώσει, οδηγώντας έτσι σε μεγαλύτερα σταγονίδια λιπιδίων και επακόλουθη στεάτωση (Spisni *et al.* 1998). Ωστόσο, στα δύο διατροφικά πειράματά μας η πρόσληψη λιπιδίων των ιχθυδίων που διατράφηκαν με πτηνάλευρο ήταν χαμηλότερη από εκείνη που διατράφηκαν με ιχθυάλευρο, το οποίο υποδηλώνει ότι είναι ο τύπος του λίπους του σιτηρεσίου, και συγκεκριμένα το λίπος του πτηναλεύρου, και όχι η υπερβολική πρόσληψη λίπους, εκείνο που προκάλεσε τη συσσώρευση λιπιδίων στο ήπαρ των ιχθυδίων τσιπούρας. Με άλλα λόγια, το λίπος του πτηναλεύρου δεν μεταβολίζεται/οξειδώνεται σε παρόμοιο ρυθμό όπως του ιχθυαλεύρου.

Αυξημένα λιποσταγονίδια λιπιδίων και αυξημένη συσσωμάτωση λίπους με ενδείξεις, ωστόσο, φλεγμονής έχουν επίσης αναφερθεί στο *L. calcarifer* (Siddik *et al.* 2017, Chaklader *et al.* 2020) και στο *T. tinca* (Panicz *et al.* 2017) όταν τα είδη αυτά διατράφηκαν με τροφές που το ιχθυάλευρο είχε πλήρως αντικατασταθεί από πτηνάλευρο. Επιπλέον, οι Zhou *et al.* (2020) ανέφεραν ότι προκλήθηκε σημαντική στεάτωση στα ηπατοκύτταρα του υβριδίου *Epinephelus fuscoguttatus* ♀ × *Epinephelus lanceolatus* ♂ ακόμη και όταν οι ιχθύες διατράφηκαν με επίπεδα αντικατάστασης του ιχθυαλεύρου κατά 50-70% από πτηνάλευρο.

Επίσης, η ολική αντικατάσταση δεν προκάλεσε αυξημένη κενοποίηση ή αλλοιώσεις στα ηπατοκύτταρα του *Salmo. salar* (Hartviksen *et al.* 2014) και του *O. niloticus* (Ayđın *et al.* 2015).

Συνοπτικά, από τα αποτελέσματα της ιστομορφολογικής εξέτασης της παρούσας έρευνας εξάγεται το συμπέρασμα ότι η αντικατάσταση της πρωτεΐνης του ιχθυαλεύρου στο σιτηρέσιο των ιχθυδίων τσιπούρας κατά 50% από πτηνάλευρο (PBM) δεν επιφέρει σημαντικές αρνητικές αλλοιώσεις στη φυσιολογική λειτουργία του ήπατος των ιχθυδίων, αλλά υψηλότερα επίπεδα αντικατάστασης (της τάξης του 100%) οδηγούν σε κάποια υποβάθμιση της φυσιολογίας και λειτουργικότητας αυτού του σημαντικού για τη θρέψη των ιχθύων πεπτικού οργάνου. Αντίθετα, δεν παρατηρήθηκε καμία αρνητική επίδραση στην ιστολογία του εντέρου των ιχθυδίων.

Στο σημείο αυτό, αξίζει να αναφερθούν και τα παράλληλα ευρήματα των μελετών (Karapanagiotidis *et al.* 2019, Psafakis *et al.* 2021) όπου μελετήθηκαν παράλληλα οι επιδράσεις των διαφόρων επιπέδων αντικατάστασης του ιχθυαλεύρου από πτηνάλευρο στην ενεργότητα των πεπτικών ενζύμων, σε αιματολογικές παραμέτρους, στη διαφοροποίηση της έκφρασης του ηπατικού γονιδιώματος και στη διαφοροποίηση του εντερικού μικροβιώματος της τσιπούρας. Η μελέτη της ενεργότητας των πεπτικών ενζύμων των ιχθύων δίνει πληροφορίες αναφορικά με τον βαθμό πέψης και απορρόφησης των θρεπτικών συστατικών και επομένως την καταλληλότητα μιας πηγής πρωτεϊνών στο σιτηρέσιο (Silva *et al.* 2010). Περαιτέρω, η αιματολογική και βιοχημική αξιολόγηση του αίματος των ιχθύων είναι σημαντική για την αξιολόγηση της υγείας των ιχθύων (Metochis *et al.* 2017). Επιπλέον, είναι γνωστό ότι διατροφικοί παράγοντες, όπως ο τύπος της πρωτεΐνης του σιτηρεσίου και πιθανές ελλείψεις στα απαραίτητα αμινοξέα, ενδέχεται να επηρεάσουν τη ρύθμιση της αυξητικής ορμόνης (growth hormone, GH) και του ινσουλινοειδούς αυξητικού παράγοντα (Insulin-like

Growth Factor, IGF) με αποτέλεσμα μειωμένη πρόσληψη τροφής, ανάπτυξη και κατακράτηση θρεπτικών συστατικών στους ιχθύες (Gómez-Requeni *et al.* 2004).

Τα αποτελέσματα αυτών των ερευνών έδειξαν γενικά ότι η υποκατάσταση έως και 50% του ιχθυαλεύρου από πτηνάλευρο δεν είχε καμία σημαντική επίδραση στις ενεργότητες της τρυψίνης, χυμοτρυψίνης και πεψίνης της τσιπούρας. Συγκεκριμένα, τα ιχθύδια τσιπούρας που διατράφηκαν με πτηνάλευρο (50% αντικατάσταση ιχθυαλεύρου) είχαν παρόμοια ενεργότητα τρυψίνης και χυμοτρυψίνης με εκείνη των ιχθύων που διατράφηκαν με ιχθυάλευρο. Αυτό υποδηλώνει τη σχετικά υψηλή πεπτικότητα του πτηναλεύρου, απόλυτα συγκρίσιμη με εκείνη του ιχθυαλεύρου, όπως έχει αποδειχθεί και σε πολλά είδη ιχθύων (Hernández *et al.* 2010, Yu *et al.* 2013) και στο *S. aurata* (Alexis 1997, Nengas *et al.* 1999, Davies *et al.* 2009). Όσον αφορά την αυξημένη ενεργότητα της πεψίνης του στομάχου στα ιχθύδια που διατράφηκαν με πτηνάλευρο χρειάζεται περαιτέρω διερεύνηση, αλλά ενδεχομένως δείχνει μια προσπάθεια των ιχθυδίων για αύξηση της πεπτικής ικανότητάς τους ως απάντηση στη χαμηλότερη πεπτικότητα του σιτηρεσίου. Οι χερσαίες ζωικές πρωτεΐνες είναι γνωστό ότι περιέχουν αναστολείς πρωτεάσης, δηλαδή την δυσκολότερη αποδόμηση των πρωτεϊνών διασπώντας τους εσωτερικούς πεπτιδικούς δεσμούς, παράγοντας έτσι πεπτίδια. Αν και η επίδρασή τους στην ενεργότητα των πεπτικών πρωτεασών της τσιπούρας έχειδειχθεί ότι είναι χαμηλότερη από την επίδραση που έχουν οι φυτικές πρωτεΐνες (Alarcón *et al.* 1999). Οι Hartviksen *et al.* (2014) έδειξαν ότι η χρήση του πτηναλεύρου ως υποκατάστατου του ιχθυαλεύρου στη διατροφή του *S. salar* δεν επηρέασε τις ενζυμικές ενεργότητες εκτός από εκείνη της εντερικής λιπάσης. Αυξημένες, αλλά όχι σημαντικά, ενεργότητες εντερικής πεψίνης, τρυψίνης και χυμοτρυψίνης έχουν αναφερθεί για σιτηρέσια που χορηγήθηκαν στην τσιπούρα με υψηλά επίπεδα οστεοκρεαταλεύρου αντικαθιστώντας τα ιχθυάλευρα (Moutinho *et al.* 2017).

Οι μελέτες που αξιολογούν την επίδραση της αντικατάστασης του ιχθυαλεύρου από ΜΖΠ στις αιματολογικές παραμέτρους των ιχθύων είναι εξαιρετικά περιορισμένες. Στην παράλληλη έρευνα που πραγματοποίησε η ερευνητική μας ομάδα (Karapanagiotidis *et al.* 2019) έδειξε ότι η αντικατάσταση έως και 50% του ιχθυαλεύρου από πτηνάλευρο δεν μεταβάλλει καμία από τις αιματολογικές και βιοχημικές παραμέτρους του αίματος που εξετάστηκαν συμπεριλαμβανομένων των ερυθρών αιμοσφαιρίων, των λευκών αιμοσφαιρίων, του αιματοκρίτη, των λεμφοκυττάρων, των μονοκυττάρων, των κοκκιοκυττάρων, της γλυκόζης, της χοληστερόλης και των τριγλυκεριδίων, υποδεικνύοντας έτσι ότι η υγεία των ψαριών δεν επηρεάστηκε από τη συμπερίληψη του πτηναλεύρου. Αυτή η ασήμαντη επιρροή στις βιοχημικές παραμέτρους του αίματος που ασκούνται από το πτηνάλευρο ως υποκατάστατο του ιχθυαλεύρου έχει επίσης αναφερθεί σε άλλα είδη ιχθύων όπως στα (Hernández *et al.* 2014), *S. salar* (Liland *et al.* 2015) και *T. tinca* (Panicz *et al.* 2017), αν και αυξημένα επίπεδα γλυκόζης έχουν αναφερθεί στο είδος *R. canadum* (Zhou *et al.* 2011). Ειδικά οι Zhu *et al.* (2011), χρησιμοποιώντας πτηνάλευρο σε ένα μείγμα χερσαίων ζωικών πρωτεϊνών, διαπίστωσαν ότι το 50% της υποκατάστασης του ιχθυαλεύρου δεν είχε καμία επίδραση στα επίπεδα γλυκόζης και χοληστερόλης στον ορό αίματος, αλλά οδήγησε σε υψηλότερο επίπεδο τριγλυκεριδίων στο *Acipenser baerii*. Περαιτέρω, το πτηνάλευρο δεν άλλαξε τον αιματοκρίτη των ιχθυδίων τσιπούρας και παρόμοια αποτελέσματα έχουν αναφερθεί και για άλλα είδη ιχθύων (Steffens 1994, Zhou *et al.* 2011, Hernández *et al.* 2014). Οι Metochis *et al.* (2017) ανίχνευσαν έναν αυξανόμενο αιματοκρίτη στα ιχθύδια του είδους *S. salar* καθώς αυξάνονταν το ποσοστό ένταξης του πτηναλεύρου στο σιτηρέσιο, με τους συγγραφείς να ισχυρίζονται ότι αυτό συνεπάγεται με βελτιωμένη κατάσταση της υγείας των ιχθύων.

Δείγματα ήπατος των ιχθυδίων του 1^{ου} διατροφικού πειράματος αναλύθηκαν από συνεργάτες προκειμένου να μελετηθούν οι μεταβολικές επιδράσεις της αντικατάστασης του

ιχθυαλεύρου από πτηνάλευρο στην έκφραση γονιδίων του ήπατος, που ρυθμίζουν την παραγωγή ορμονών και των υποδοχέων που ρυθμίζουν την ανάπτυξη των ιχθυδίων (Karapanagiotidis *et al.* 2019).. Στη συγκεκριμένη μελέτη δείχθηκε ότι μειώθηκε σημαντικά η έκφραση συγκεκριμένων γονιδίων του άξονα «Growth Hormone-Insulin-like Growth Factor (GH-IGF)» στα ψάρια που διατράφηκαν με σιτηρέσια υψηλής αντικατάστασης ιχθυαλεύρου (PBM50 και PBM100). Το γεγονός αυτό ερμηνεύει τη μείωση του ρυθμού ανάπτυξης των συγκεκριμένων ομάδων ιχθυδίων, όπως περιγράφηκε αναλυτικά στο 1^ο διατροφικό πείραμα. Αυτά τα αποτελέσματα υποδηλώνουν ότι το πτηνάλευρο μπορεί να μειώσει σημαντικά τις μεταγραφές των γονιδίων «Growth Hormone Receptor-1 (GHR-1)» και «Insulin-like Growth Factor-1 (IGF-1)», περιορίζοντας έτσι τη δράση του άξονα GH-IGF που ρυθμίζεται από αυτά τα γονίδια και με τη σειρά του αυτό υποστέλλει την ανάπτυξη των ιχθυδίων. Αυτή η μειωμένη γονιδιακή έκφραση του άξονα GH-IGF στα ιχθύδια τσιπούρας που διατράφηκαν με πτηνάλευρο μπορεί να αποδοθεί στις διαφοροποιήσεις στο προφίλ των απαραίτητων αμινοξέων του σιτηρεσίου, όπως έχει προταθεί προηγουμένως για την τσιπούρα (Gómez-Requeni *et al.* 2004, Azizi *et al.* 2016) διατρεφόμενο με φυτικές πρωτεΐνες, αλλά και σε άλλα είδη ιχθύων (Rolland *et al.*, 2015, Kumar *et al.* 2017). Μειωμένη απόδοση ανάπτυξης ταυτόχρονα με μείωση της γονιδιακής έκφρασης του άξονα GHR-IGF έχει επίσης παρατηρηθεί στο *Silurus glanis* που διατράφηκε με ΜΖΠ (Kumar *et al.* 2017). Επίσης, οι Hatlen *et al.* (2015) διαπίστωσαν μειωμένα επίπεδα mRNA των γονιδίων IGF-1 στο ήπαρ και στους μυς του *S. salar* που τρέφονταν με σιτηρέσια βασισμένα σε πτηνάλευρο, αλλά η ανάπτυξη των ιχθύων δεν υστέρησε συγκριτικά με εκείνη του μάρτυρα. Αντίθετα, ο Panicz (2016) διαπίστωσε ότι η ολική αντικατάσταση του ιχθυαλεύρου από πτηνάλευρο στη διατροφή του *T. tinca* δεν επηρέασε το επίπεδο έκφρασης των γονιδίων GHR και GH στους περισσότερους ιστούς, εκτός από τη σπλήνα.

Επιπλέον, μελετήθηκε η γονιδιακή έκφραση της καθεψίνης D (catD) (Karapanagiotidis *et al.* 2019). Οι κύριες φυσιολογικές λειτουργίες του γονιδίου catD συνίστανται στον καταβολισμό των πρωτεϊνών, καθώς και στην ενεργοποίηση και μεταβολισμό των ορμονών και των αυξητικών παραγόντων. Δείχθηκε, λοιπόν, ότι η αντικατάσταση του ιχθυαλεύρου από πτηνάλευρο είχε ως αποτέλεσμα τη μειωμένη γονιδιακή έκφραση του γονιδίου catD στο ήπαρ των ιχθυδίων της τσιπούρας. Αυτές οι διαφοροποιήσεις στη γονιδιακή έκφραση υποδηλώνουν μια ρύθμιση στο μεταβολισμό των πρωτεϊνών στο ήπαρ των ατόμων του είδους που μελετήθηκε που διατρέφονται με πτηνάλευρο και μπορεί να εξηγήσουν τη μειωμένη κατακράτηση πρωτεΐνης που παρατηρήθηκε σε αυτές τις ομάδες ιχθυδίων σε σύγκριση με αυτά που διατράφηκαν με ιχθυάλευρο (1^ο διατροφικό πείραμα). Είναι γνωστό ότι οι αλλαγές στην πηγή πρωτεΐνης του σιτηρεσίου επηρεάζουν την έκφραση του γονιδίου catD στους μυς των ιχθυδίων (Alami-Dourante *et al.* 2010, Tacchi *et al.* 2012). Οι Tacchi *et al.* (2012) παρατήρησαν μια αναστολή της έκφρασης του catD στο *Salmo salar* που διατράφηκε με φυτικές πρωτεΐνες, ενώ το αντίθετο έχει παρατηρηθεί στο *O. mykiss* (Alami-Dourante *et al.* 2010).

Παράλληλα, δείγματα του μέσου τμήματος του εντέρου των ιχθυδίων του 1^{ου} διατροφικού πειράματος αναλύθηκαν από συνεργάτες, στο πλαίσιο του ευρύτερου χρηματοδοτούμενου έργου, προκειμένου να μελετηθούν οι μεταβολικές επιδράσεις της αντικατάστασης του ιχθυαλεύρου από πτηνάλευρο στη μικροβιακή κοινότητα (μικροβίωμα) του εντέρου (Psoufakis *et al.* 2021). Το μικροβίωμα του εντέρου των ιχθύων είναι απαραίτητο τόσο για τη διατροφή όσο και για την ανοσία του ξενιστή, με τις όποιες αλλαγές στη σύνθεση της κοινότητάς του να σχετίζονται με τη διατροφή, την καταπόνηση και τη διαταραχή της ομοιόστασης του μικροβιώματος (δυσβίωση) (Bakke *et al.* 2013, Perry *et al.* 2020). Είναι γνωστό ότι η σύνθεση του εντερικού μικροβιώματος των ιχθυδίων μεταβάλλεται από την τροφή και τη γενικότερη διατροφική κατάσταση του οργανισμού και ενδέχεται να

διαφοροποιήσουν την έκκριση των διαφόρων πεπτικών ενζύμων, όπως πρωτεασών, λιπασών και καρβουδρασών, επηρεάζοντας τελικά την πεπτικότητα της τροφής (Ray *et al.* 2012, Wu *et al.* 2015). Επιπρόσθετα, έχειδειχθεί ότι η αλλαγή της πρωτεϊνικής πηγής στο σιτηρέσιο των ιχθυδίων επιφέρει αλλαγές στο εντερικό τους μικροβίωμα ενισχύοντας την ανάπτυξη και το ανοσοποιητικό σύστημα με την ενεργοποίηση των βακτηρίων του γαλακτικού οξέος και των κυτοκινών.

Στη μελέτη των Psafakis *et al.* (2021) βρέθηκε ότι η σύνθεση του μικροβιώματος των ιχθυδίων τσιπούρας που είχαν διατραφεί είτε με ιχθυάλευρο είτε με πτηνάλευρο ήταν παρόμοιο και χαρακτηρίζονταν από συνήθεις ομάδες μικροοργανισμών του εντέρου των ιχθυδίων (Gajardo *et al.* 2017), όπως των γενών *Pseudomonas*, *Cutibacterium*, *Staphylococcus* και *Delftia*. Τα πρωτεοβακτήρια και τα ακτινοβακτήρια ήταν οι κυρίαρχες ομάδες μικροοργανισμών σε όλα τα ιχθύδια, αλλά σε επίπεδο ειδών μικροοργανισμών υπήρξαν αρκετές διαφοροποιήσεις μεταξύ των ιχθυδίων, ανεξαρτήτως αν είχαν διατραφεί με ιχθυάλευρο ή με πτηνάλευρο. Αυτή η μη ξεκάθαρη εικόνα αλλαγής του εντερικού μικροβιώματος υποδεικνύει ότι η ατομικότητα των ιχθυδίων είχε μεγαλύτερη επίδραση από την ίδια την τροφή. Η επιστημονική γνώση για την επίδραση της αντικατάστασης του ιχθυαλεύρου της τροφής από ΜΖΠ μη μηρυκαστικών στο εντερικό μικροβίωμα των ιχθυδίων είναι εξαιρετικά αμυδρή. Οι Gajardo *et al.* (2017) ανίχνευσαν σημαντικές διαφοροποιήσεις στο εντερικό μικροβίωμα του είδους *S. salar* μεταξύ ιχθύων που διατράφηκαν είτε με πτηνάλευρο είτε με ιχθυάλευρο. Στο ίδιο είδος, οι Hartviksen *et al.* (2014) έδειξαν ότι η αντικατάσταση του ιχθυαλεύρου της τροφής από πτηνάλευρο αύξησε τους αριθμούς των ολικών αυτόχθονων και αλλόχθονων μικροοργανισμών του πρόσθιου τμήματος του εντέρου, αλλά όχι εκείνους του οπίσθιου τμήματος του εντέρου. Οι ίδιοι συγγραφείς ανακοίνωσαν ότι η προσθήκη του πτηναλεύρου στην τροφή αύξησε τους αριθμούς των *Corynebacteriaceae* και μείωσε τους αριθμούς των *b-Proteobacteria*, *Bacilli-like*, *Peptostreptococcaceae* και των

Vibrionaceae. Ασφαλώς, χρειάζεται καλύτερη κατανόηση των λειτουργικών ρόλων των διαφόρων ομάδων, γενών και ειδών των μικροοργανισμών του εντέρου των ιχθυδίων και σε ποιο βαθμό αυτές οι κοινότητες επηρεάζονται από τη χρήση των χερσαίων ζωικών πρωτεϊνών στο σιτηρέσιο.

Σχετικά με την οικονομικότητα του σιτηρεσίου, το κόστος του και το κόστος της διατροφής των ιχθυδίων αντιπροσωπεύει τη σημαντικότερη δαπάνη στην παραγωγική διαδικασία της ιχθυοκαλλιέργειας. Έτσι, οποιαδήποτε μείωση του κόστους θα μπορούσε να ωφελήσει την κερδοφορία της παραγωγής. Στην παρούσα μελέτη, τα αυξημένα επίπεδα ένταξης του πτηναλεύρου στο σιτηρέσιο οδήγησαν σε μειούμενο κόστος σιτηρεσίου και οικονομικό συντελεστή μετατρεψιμότητας της τροφής (ECR). Η αντικατάσταση του ιχθυαλεύρου από πτηνάλευρο της τάξης του 50%, με συμπλήρωση λυσίνης και μεθειονίνης, που είναι και το προτεινόμενο επίπεδο αντικατάστασης, φάνηκε να είναι επίσης το καλύτερο επίπεδο από πλευράς ECR, μεγιστοποιώντας έτσι την κερδοφορία. Έτσι, η αντικατάσταση του ιχθυαλεύρου από πτηνάλευρο στην τσιπούρα φαίνεται να είναι ταυτόχρονα και οικονομικά ωφέλιμη και παρόμοια ευρήματα έχουν αναφερθεί σε άλλα είδη (El-Sayed 1998, Hernandez *et al.* 2014).

3.5 Συμπεράσματα

Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης δείχνουν ότι η αντικατάσταση της πρωτεΐνης του ιχθυαλεύρου της τροφής από πτηνάλευρο έως και 50% είναι επιτυχής για τα νεαρά άτομα της τσιπούρας (*S. aurata*) εφόσον το σιτηρέσιο συμπληρώνεται με μεθειονίνη και λυσίνη, χωρίς να μειώνεται σημαντικά η αποτελεσματικότητα της τροφής, η απόδοση της ανάπτυξης, η θρεπτική σύσταση και η ιστομορφολογία του εντέρου και του ήπατος των ιχθυδίων. Επί του πρακτέου, τα ερευνητικά αποτελέσματα φανερώνουν ότι, για τις τροφές τσιπούρας, μέσου βάρους 3-40 g, μπορεί να

χρησιμοποιηθεί πτηνάλευρο σε ένα επίπεδο χορήγησης της τάξης του 27% επί της τροφής με συνχορήγηση λυσίνης, χωρίς να επιφέρει μειωμένη παραγωγική απόδοση, δεδομένου ότι το επίπεδο χορήγησης του ιχθυαλεύρου στην τροφή του μάρτυρα ήταν 58% και η πρωτεϊνική περιεκτικότητά του ήταν 64%.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Αντικατάσταση του ιχθυαλεύρου από υδρολυμένο πετράλευρο στο σιτηρέσιο των ιχθυδίων τσιπούρας (*Sparus aurata*)

4.1 Εισαγωγή

Μέχρι σήμερα, οι γνώσεις μας για την καταλληλότητα του υδρολυμένου πετράλευρου στη διατροφή της τσιπούρας είναι ελλιπείς. Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν μεταξύ των άλλων και η διερεύνηση των επιδράσεων της αντικατάστασης της πρωτεΐνης του ιχθυαλεύρου από πρωτεΐνη υδρολυμένου πετράλευρου στην ανάπτυξη των ιχθυδίων τσιπούρας και την αξιοποίηση της τροφής από αυτήν. Προκειμένου να διερευνηθούν οι επιδράσεις της διαιτητικής αντικατάστασης του ιχθυαλεύρου από υδρολυμένο πετράλευρο στην ανάπτυξη του μελετηθέντος είδους και την αξιοποίηση της τροφής από αυτό, διεξήχθησαν δύο διατροφικά πειράματα (3^ο και 4^ο διατροφικό πείραμα). Στο 3^ο διατροφικό πείραμα εξετάστηκε η μερική (50%) και ολική (100%) αντικατάσταση της πρωτεΐνης του ιχθυαλεύρου από πρωτεΐνη υδρολυμένου πετράλευρου, και στη συνέχεια στο 4^ο πείραμα εξετάστηκε η μερική (25% και 50%) αντικατάσταση με ή χωρίς προσθήκη απαραίτητων αμινοξέων στο σιτηρέσιο.

Για τις ανάγκες του παρόντος πειράματος, το υδρολυμένο πετράλευρο που χρησιμοποιήθηκε (Πιν. 2.1) ήταν το “Sonac kerapro” της εταιρείας SONAC - Darling Ingredients International (The Netherlands, Denmark), το οποίο παρασκευάστηκε σύμφωνα με τις Ευρωπαϊκές Οδηγίες EC 1069/2009 και EC 142/2011 (method 7). Είναι κατάλληλο για χορήγηση σε ιχθυοτροφές και απόλυτα συμβατό με την Οδηγία EC 56/2013.

4.2 3^ο διατροφικό πείραμα – μερική (50%) και ολική (100%) αντικατάσταση ιχθυαλεύρου από υδρολυμένο πτεράλευρο

4.2.1 Πειραματικά σιτηρέσια και συνθήκες εκτροφής

Για το 3^ο πείραμα καταρτίστηκαν συνολικά τρία ισοαζωτούχα (ολικές πρωτεΐνες 50% της τροφής) και ισοενεργειακά (ολική ενέργεια 21 MJ/Kg της τροφής) σιτηρέσια (Πίν. 4.1), όπου η πρωτεΐνη του ιχθυαλεύρου της τροφής-μάρτυρα (FM) αντικαταστάθηκε κατά 50% από άλευρο υδρολυμένου πτεράλευρου (hydrolyzed feather meal) κατά 50% (HFM50) και κατά 100% (HFM100) (Πίν. 4.1). Στον Πίνακα 4.2 δίνονται οι αναλύσεις των αμινοξέων των πειραματικών σιτηρεσίων. Το επίπεδο του ιχθυαλεύρου στην τροφή-μάρτυρα (FM) ήταν 58%.

Για το 3^ο διατροφικό πείραμα, χρησιμοποιήθηκαν συνολικά 300 ιχθύδια τσιπούρας μέσου σωματικού βάρους $2,52 \pm 0,25$ g, μέσου ολικού μήκος $6,1 \pm 0,1$ cm και τοποθετήθηκαν σε 12 γυάλινα ενυδρεία. Τα ιχθύδια αφέθηκαν να εγκλιματιστούν στις ελεγχόμενες συνθήκες του σταθμού για 10 ημέρες σιτιζόμενα με το σιτηρέσιο FM, έως την έναρξη χορήγησης των πειραματικών σιτηρεσίων. Οι φυσικοχημικές παράμετροι του νερού των ενυδρείων καταγράφονταν συχνά και καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος με τη χρήση φορητών ηλεκτρονικών οργάνων και χρωματομετρικών τεστ, όπως περιγράφηκαν στα Υλικά και Μεθόδους. Πριν την έναρξη του διατροφικού πειράματος, τα ιχθύδια διαχωρίστηκαν τυχαία σε συνολικά τρεις διατροφικές ομάδες με τετραπλή επαναληψιμότητα (25 ιχθύδια/ενυδρείο, 4 ενυδρεία/διατροφική ομάδα) με την κάθε μία να διατρέφεται με διαφορετικό σιτηρέσιο. Συγκεκριμένα, η ομάδα ιχθυδίων FM διατρέφονταν με την τροφή που περιείχε αποκλειστικά ιχθυάλευρο ως πηγή ζωικής πρωτεΐνης και θεωρήθηκε η ομάδα μάρτυρας, ενώ οι υπόλοιπες δύο ομάδες ιχθυδίων HFM50 και HFM100 διατρέφονταν με τα σιτηρέσια που περιείχαν υδρολυμένο πτεράλευρο στις αντίστοιχες αντικαταστάσεις.

Πίνακας 4.1. Καταρτισμός σιτηρεσιών και θρεπτική σύσταση πειραματικών ιχθυοτροφών που χρησιμοποιήθηκαν για τη μερική (50%) και ολική (100%) αντικατάσταση του ιχθυαλεύρου από υδρολυμένο πτεράλευρο (3^ο διατροφικό πείραμα).

3^ο διατροφικό πείραμα			
Συστατικά (%) / Σιτηρέσιο	FM	HFM50	HFM100
Ιχθυάλευρο	58,0	29,0	0
Πτεράλευρο, υδρολυμένο	0	21,6	43,3
Γλουτένη καλαμποκιού	19,5	17,5	15,3
Σιτάρι, αλεύρι	10,4	22,3	34,3
Ιχθυέλαιο	11,1	8,6	6,1
Βιταμίνες & ανόργανα στοιχεία	0,3	0,3	0,3
MCP	0,3	0,1	0,1
Βιταμίνη E	0,1	0,1	0,1
Βιταμίνη C	0,1	0,2	0,2
Αντιμυκητιακή ουσία	0,2	0,2	0,2
Λυσίνη	0	0	0
Μεθειονίνη	0	0	0
Θρεπτική σύσταση (%)¹			
Υγρασία	92,1	91,8	92,1
Ολικές αζωτούχες ουσίες	50,3	50,2	49,8
Ολικές λιπαρές ουσίες	16,8	12,7	11,6
Υδατάνθρακες ¹	16,0	23,1	29,2
Τέφρα	8,9	5,8	1,4
Ενέργεια (KJ/g)	21,39	21,02	21,75

¹ Οι τιμές της θρεπτικής σύστασης αντιπροσωπεύουν μέσους όρους από n=6.

² Το ποσοστό των υδατανθράκων εκτιμήθηκε με αφαίρεση από το 100 του συνόλου των ποσοστών υγρασίας, ολικών πρωτεϊνών, ολικών λιπιδίων και τέφρας.

Πρώτες ύλες: Ιχθυάλευρο (Sardine fishmeal, Köster Marine Proteins GmbH, Hamburg, Germany), πτηνάλευρο (Poultry meal, Sonac, Son, The Netherlands), γλουτένη καλαμποκιού (Glutalys®, Roquette Italia S.p.A, Cassano Spinola, Italy), σιτάρι (τοπική αγορά), ιχθυέλαιο (Tuna oil, Inproquisa SA, Madrid, Spain), MCP (Astron Chemicals SA, Attica, Greece), βιταμίνες E και C (DSM Nutritional Products Hellas LTD, Athens, Greece), αντιμυκητιακή ουσία (MycO CURB®, Kemin, Herentals, Belgium), λυσίνη (Ajinomoto Eurolysine S.A.S., Paris, France), μεθειονίνη (MetAMINO® DL-Methionine Feed Grade, Evonik Nutrition & Care GmbH, Athens, Greece). Πρόμιγμα βιταμινών και ανοργάνων στοιχείων (kg⁻¹ μίγματος): Vitamins: E, 58.3 g; K3, 3.3 g; B1, 3.3 g; B2, 6.6 g; B6, 3.3 mg; B12, 10 mg; Folic acid, 3.3 g; Biotin, 100 mg; C, 33.3 g; Nicotinic acid, 16.6 g; Pantothenic acid, 13.3 g. Minerals: Co, 170 mg; I, 248 mg (Ca(IO₃)₂); Mn, 10 g (MnO); Zn, 33 g (ZnO); Ca 235 g; Se 2,5 mg (Na₂SeO₃); Na 247,5 mg (Na₂SeO₃).

Πίνακας 4.2. Σύσταση σε αμινοξέα (% πρωτεΐνης) των πειραματικών ιχθυοτροφών που χρησιμοποιήθηκαν για τη μερική (50%) και ολική (100%) αντικατάσταση του ιχθυαλεύρου από υδρολυμένο πετράλευρο (3^ο διατροφικό πείραμα).

3 ^ο διατροφικό πείραμα				
Αμινοξέα ¹	FM	HFM50	HFM100	Απαιτήσεις (% πρωτεΐνης) ²
<u>Απαραίτητα αμινοξέα</u>				
Αργινίνη	5,69	5,41	5,10	5,4
Ιστιδίνη	2,67	1,72	1,56	1,7
Ισολευκίνη	3,93	4,34	4,48	2,6
Λευκίνη	9,53	9,84	10,05	4,5
Λυσίνη	6,52	4,03	3,81	5,0
Μεθειονίνη	2,52	1,97	1,02	2,4
Φαινυλαλανίνη	4,61	4,93	5,16	2,9
Θρεονίνη	4,14	4,29	4,42	2,8
Τρυπτοφάνη	0,98	0,90	0,89	0,6
Βαλίνη	4,62	5,89	6,11	3,0
<u>Μη απαραίτητα αμινοξέα</u>				
Αλανίνη	7,12	6,29	6,00	
Ασπαρτικό οξύ	8,73	7,40	7,28	
Κυστίνη	1,23	1,86	1,94	
Γλουταμινικό οξύ	16,91	15,38	14,52	
Γλυκίνη	5,98	6,50	7,25	
Προλίνη	6,33	7,95	8,21	
Σερίνη	4,73	7,21	8,15	
Τυροσίνη	3,53	3,53	3,36	

¹Μέθοδος για τρυπτοφάνη: UNI 22618:2000 + UNI 22630:2000, μέθοδος για υπόλοιπα αμινοξέα: REG CE 152/09 27/01/09 ALL III MET F PTO 5.3.

²Απαιτήσεις (% πρωτεΐνης) των ιχθυδίων *S. aurata* κατά Kaushik (1998)

Η σίτιση των ιχθυδίων ελάμβανε χώρα καθημερινά με το χέρι, μέχρι το φαινόμενο κορεσμού (*ad libitum*), δύο φορές την ημέρα (10:00 και 16:00). Ιδιαίτερη προσοχή δόθηκε ώστε να διασφαλιστεί ότι όλη η καθημερινά χορηγούμενη ποσότητα τροφής καταναλωνόταν

από τους ιχθύες. Τυχόν θνησιμότητες καταγράφηκαν καθημερινά και η συνολική διάρκεια του διατροφικού πειράματος ήταν 100 ημέρες.

4.2.2 Αποτελέσματα

4.2.2.1 Παράμετροι ανάπτυξης των ιχθυδίων και αξιοποίησης της τροφής

Τα αποτελέσματα της ανάπτυξης των ιχθυδίων του 3^{ου} διατροφικού πειράματος μερικής (50%) και ολικής (100%) αντικατάστασης του ιχθυαλεύρου από υδρολυμένο πετράλευρο στο σιτηρέσιο της τσιπούρας παρουσιάζονται στους Πίνακες 4.3 (30 ημέρες εκτροφής), 4.4 (60 ημέρες εκτροφής) και 4.5 (ολοκλήρωση πειραματισμού έπειτα από 100 ημέρες εκτροφής) (Παράρτημα – διάγραμμα 3.1).

Πίνακας 4.3. Παράμετροι ανάπτυξης ιχθυδίων τσιπούρας (*S. aurata*) διατρεφόμενοι με ιχθυοτροφές που χρησιμοποιήθηκαν για τη μερική (50%) και ολική (100%) αντικατάσταση του ιχθυαλεύρου από του υδρολυμένο πετράλευρο (3^ο διατροφικό πείραμα), έπειτα από **30** ημέρες εκτροφής.

Παράμετροι /	FM	HFMM50	HFMM100
Διατροφικές ομάδες			
Επιβίωση (%)	100 ^a	100 ^a	92,0±3,27 ^b
Πρόσληψη τροφής (g/ψάρι)	5,56±0,43 ^a	4,90±0,30 ^b	1,70±2,84 ^c
Αρχικό βάρος (g/ψάρι)	2,52±0,00	2,52±0,00	2,52±0,00
Τελικό βάρος (g/ψάρι)	7,79±0,46 ^a	6,50±0,39 ^b	2,79±0,10 ^c
SGR (%/ημέρα)	3,76±0,20 ^a	3,16±0,20 ^b	0,34±0,12 ^c
FCR	1,05±0,02 ^a	1,23±0,05 ^b	7,04±2,84 ^c

Οι τιμές αντιπροσωπεύουν μέσους όρους ± τυπική απόκλιση (n=4). Οι τιμές κάθε παραμέτρου που φέρουν διαφορετικό εκθέτη μεταξύ των διατροφικών ομάδων υποδηλώνουν στατιστικώς σημαντική διαφορά (P < 0.05) μεταξύ τους. SGR - ειδικός ρυθμός ανάπτυξης, FCR – συντελεστής μετατρεψιμότητας τροφής

Πίνακας 4.4. Παράμετροι ανάπτυξης ιχθυδίων τσιπούρας (*S. aurata*) διατρεφόμενοι με ιχθυοτροφές που χρησιμοποιήθηκαν για την υψηλή αντικατάσταση του ιχθυαλεύρου από υδρολυμένο πετράλευρο (3^ο διατροφικό πείραμα), έπειτα από **60 ημέρες** εκτροφής

Παράμετροι /	FM	HFMM50	HFMM100
Διατροφικές ομάδες			
Επιβίωση (%)	100 ^a	100 ^b	84,00±7,30 ^c
Πρόσληψη τροφής (g/ψάρι)	15,40±1,44 ^a	12,91±1,29 ^b	3,40±0,04 ^c
Αρχικό βάρος (g/ψάρι)	2,52±0,00	2,52±0,00	2,52±0,00
Τελικό βάρος (g/ψάρι)	15,81±1,29 ^a	12,23±1,12 ^b	2,78±0,10 ^c
SGR (%/ημέρα)	3,06±0,13 ^a	2,63±0,16 ^b	0,16±0,06 ^c
FCR	1,16±0,03 ^a	1,33±0,03 ^b	16,53±11,01 ^c

Οι τιμές αντιπροσωπεύουν μέσους όρους ± τυπική απόκλιση (n=4). Οι τιμές κάθε παραμέτρου που φέρουν διαφορετικό εκθέτη μεταξύ των διατροφικών ομάδων υποδηλώνουν στατιστικώς σημαντική διαφορά (P < 0.05) μεταξύ τους. SGR - ειδικός ρυθμός ανάπτυξης, FCR – συντελεστής μετατρεψιμότητας τροφής

Πίνακας 4.5. Παράμετροι ανάπτυξης, αξιοποίησης τροφής, οικονομικότητας σιτηρεσίου και μορφομετρικοί παράμετροι ιχθυδίων τσιπούρας (*S. aurata*) διατρεφόμενοι με ιχθυοτροφές που χρησιμοποιήθηκαν για τη μερική (50%) και ολική (100%) αντικατάσταση του ιχθυαλεύρου από υδρολυμένο πτεράλευρο (3^ο διατροφικό πείραμα), έπειτα από **100 ημέρες** εκτροφής

Παράμετροι /	3^ο διατροφικό πείραμα		
Διατροφικές ομάδες	FM	HFM50	HFM100
Επιβίωση (%)	100 ^a	100 ^a	84,0 ± 3,2 ^b
Πρόσληψη τροφής (g/ψάρι)	35,5 ± 2,83 ^a	30,0 ± 3,33 ^b	5,23 ± 0,28 ^c
Ολικό μήκος (cm)	12,8 ± 0,22 ^a	11,7 ± 0,55 ^b	6,2 ± 0,10 ^c
Αρχικό βάρος (g/ψάρι)	2,52 ± 0,0	2,52 ± 0,0	2,52 ± 0,0
Τελικό βάρος (g/ψάρι)	32,9 ± 2,10 ^a	24,8 ± 2,41 ^b	3,13 ± 0,07 ^c
Αύξηση βάρους (g/ψάρι)	30,4 ± 2,09 ^a	22,2 ± 2,41 ^b	0,60 ± 0,07 ^c
SGR (%/ημέρα)	2,57 ± 0,06 ^a	2,28 ± 0,10 ^b	0,21 ± 0,02 ^c
FCR	1,17 ± 0,03 ^a	1,35 ± 0,03 ^b	8,72 ± 0,66 ^c
PER	1,70 ± 0,05 ^a	1,48 ± 0,03 ^b	0,23 ± 0,02 ^c
Κατακράτηση πρωτεΐνης (%)	27,7 ± 0,82 ^a	23,0 ± 0,43 ^b	0,58 ± 0,30 ^c
Κατακράτηση λίπους (%)	67,9 ± 2,08 ^b	81,9 ± 1,72 ^a	3,60 ± 0,17 ^c
HSI (%)	1,96 ± 0,26 ^a	2,07 ± 0,38 ^a	1,17 ± 0,52 ^b
VSI (%)	8,50 ± 1,42 ^a	6,59 ± 0,95 ^b	6,96 ± 1,02 ^b
K	1,55 ± 0,02 ^a	1,54 ± 0,11 ^a	1,25 ± 0,12 ^b
Κόστος σιτηρεσίου (€/Kg)	1,21	0,90	0,59
Μεταβολή κόστους σιτ.(%)	0	25,4	50,9
ECR (€/Kg ψαριού)	1,41±0,04 ^a	1,21±0,02 ^b	5,17±0,30 ^c

Οι τιμές αντιπροσωπεύουν μέσους όρους ± τυπική απόκλιση (n=4). Οι τιμές κάθε παραμέτρου που φέρουν διαφορετικό εκθέτη μεταξύ των διατροφικών ομάδων υποδηλώνουν στατιστικώς σημαντική διαφορά ($P < 0.05$) μεταξύ τους. SGR - ειδικός ρυθμός ανάπτυξης, FCR - συντελεστής μετατρεψιμότητας τροφής, PER - συντελεστής αποδοτικότητας πρωτεΐνης, HSI - ηπατοσωματικός δείκτης, VSI - ενδοσπλαχνικός δείκτης, K - δείκτης ευρωστίας.

Με το πέρας των 100 ημερών του 3^{ου} διατροφικού πειράματος παρατηρήθηκαν σημαντικά υψηλότερες θνησιμότητες ($P<0,05$) στην HFM100 διατροφική ομάδα. Ταυτόχρονα, η πρόσληψη τροφής, το τελικό βάρος σώματος, η αύξηση βάρους, ο ειδικός ρυθμός ανάπτυξης (SGR), ο συντελεστής μετατρεψιμότητας της τροφής (FCR) και ο συντελεστής αποδοτικότητας της πρωτεΐνης (PER) ήταν σταδιακά και σημαντικά ($P<0,05$) μειούμενοι με την αύξηση του επιπέδου χορήγησης του πετραλεύρου στο σιτηρέσιο (Πιν. 4.5). Αυτή η τάση ήταν εμφανής ήδη κατά τις πρώτες 30 ημέρες εκτροφής (Πιν. 4.3) και συνεχίστηκε στις 60 ημέρες (Πιν. 4.4) και με το πέρας του πειράματος. Αξίζει να σημειωθεί ότι η τροφή HFM100 παρουσίασε μια εξαιρετικά χαμηλή πρόσληψη και ένα μη αποδεκτά υψηλό συντελεστή μετατρεψιμότητας της τροφής. Η κατακράτηση πρωτεΐνης ακολούθησε την ίδια τάση μεταξύ των τριών ομάδων ιχθύων, όπου μειώνονταν με την αύξηση της χορήγησης υδρολυμένου πτηναλεύρου στο σιτηρέσιο. Ωστόσο, παρατηρήθηκε μια σημαντικά υψηλότερη κατακράτηση λίπους στην ομάδα HFM50 συγκριτικά με εκείνη της ομάδας FM, ενώ η ομάδα HFM100 είχε μια υπερβολικά χαμηλή τιμή.

Αναφορικά με τον ηπατοσωματικό δείκτη (HSI) και τον δείκτη ευρωστίας (K), αυτοί ήταν παρόμοιοι στις ομάδες FM και HFM50 αλλά σημαντικά ($P<0,05$) μειωμένοι στην ομάδα HFM100 (Πιν. 4.5). Περαιτέρω, ο ενδοσπλαχνικός δείκτης (VSI) ήταν σημαντικά μειωμένος στις ομάδες HFM50 και HFM100. Όσον αφορά την οικονομική αποδοτικότητα των σιτηρεσίων, τα διαφορετικά επίπεδα ένταξης του HFM μείωσαν το κόστος του σιτηρεσίου έως και 50,9% στην ομάδα HFM100, λόγω της συγκριτικά χαμηλότερης τιμής του πετραλεύρου. Ο οικονομικός συντελεστής μετατρεψιμότητας της τροφής (ECR) μειώθηκε σημαντικά στην ομάδα HFM50 συγκριτικά με την ομάδα του μάρτυρα, αλλά η ομάδα HFM100 εμφάνισε ένα πολλαπλάσιο ECR. (Πιν. 4.5) (Παράρτημα – διαγράμματα 3.2, 3.3, 3.4, 3.5, 3.6, 3.7).

4.2.2.2 Θρεπτική σύσταση των ιχθυδίων

Στον Πίνακα 4.6 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της θρεπτικής σύστασης ολόκληρου του σώματος, του μυϊκού ιστού και του ήπατος των ιχθυδίων τσιπούρας του 3^{ου} διατροφικού πειράματος υψηλής αντικατάστασης του ιχθυαλεύρου από υδρολυμένο πτεράλευρο.

Πίνακας 4.6. Θρεπτική σύσταση (% επί της ξηρής ουσίας δείγματος) ολόκληρου σώματος, του μυϊκού ιστού και του ήπατος των ιχθυδίων που χρησιμοποιήθηκαν για τη μερική (50%) και ολική (100%) αντικατάσταση του ιχθυαλεύρου από πτεράλευρο (3^ο διατροφικό πείραμα)

	FM	HFM50	HFM100
<u>Θρεπτική σύσταση ολικού σώματος (%)</u>			
Υγρασία (νωπού)	67,43 ± 1,07 ^a	67,10 ± 0,58 ^a	78,50 ± 1,87 ^b
Ολικές πρωτεΐνες	49,51 ± 1,68 ^a	46,89 ± 1,62 ^a	58,37 ± 0,31 ^b
Ολικά λιπίδια	38,36 ± 1,69 ^a	39,21 ± 1,76 ^a	12,27 ± 0,5 ^b
Τέφρα	10,71 ± 0,62 ^a	10,77 ± 1,06 ^a	21,32 ± 0,33 ^b
Ενέργεια (kJ/g)	26,10 ± 0,7 ^a	2,64 ± 0,6 ^a	1,81 ± 0,5 ^b
<u>Θρεπτική σύσταση μυϊκού ιστού (%)</u>			
Υγρασία (νωπού)	71,37 ± 1,43 ^a	71,67 ± 2,01 ^a	78,17 ± 1,58 ^b
Ολικές πρωτεΐνες	69,77 ± 2,78 ^a	67,55 ± 2,38 ^a	74,19 ± 1,11 ^b
Ολικά λιπίδια	26,96 ± 3,96 ^a	24,95 ± 3,87 ^a	7,72 ± 1,10 ^b
Τέφρα	5,19 ± 0,41 ^a	5,29 ± 0,55 ^a	1,21 ± 0,40 ^b
Ενέργεια (kJ/g)	25,66 ± 0.42 ^a	25,30 ± 1.10 ^a	17,60 ± 0.60 ^b
<u>Θρεπτική σύσταση ήπατος (%)</u>			
Υγρασία (νωπού)	66,72 ± 0,84 ^a	65,78 ± 1,02 ^a	52,84 ± 0,92 ^b
Ολικές πρωτεΐνες	35,72 ± 0,48 ^a	32,56 ± 0,19 ^b	36,62 ± 0,10 ^a
Ολικά λιπίδια	38,61 ± 1,16 ^a	42,71 ± 1,08 ^b	7,81 ± 0,57 ^c

Οι τιμές αντιπροσωπεύουν μέσους όρους ± τυπική απόκλιση (n=12). Οι τιμές κάθε παραμέτρου που φέρουν διαφορετικό εκθέτη μεταξύ των διατροφικών ομάδων υποδηλώνουν στατιστικώς σημαντική διαφορά (P < 0.05) μεταξύ τους.

Αναφορικά με τη θρεπτική σύσταση του ολικού σώματος των ιχθυδίων του πειράματος αυτού, η περιεκτικότητα τους σε υγρασία της ομάδας HFM100 ήταν σημαντικά υψηλότερη ($P<0,05$) από των υπολοίπων ομάδων. Η ίδια ομάδα (HFM100) είχε παράλληλα σημαντικά υψηλότερη ($P<0,05$) περιεκτικότητα σε ολικές πρωτεΐνες και τέφρα και σημαντικά χαμηλότερη περιεκτικότητα σε ολικά λιπίδια και ενέργεια συγκριτικά με τις υπόλοιπες ομάδες. Μια παρόμοια εικόνα παρουσιάστηκε στη θρεπτική σύσταση του μυϊκού ιστού των ιχθυδίων, όπου η ομάδα HFM100 είχε σημαντικά υψηλότερες περιεκτικότητες σε υγρασία και πρωτεΐνες και σημαντικά χαμηλότερες περιεκτικότητες σε ολικά λιπίδια, ενέργεια και τέφρα συγκριτικά με τις άλλες δύο ομάδες ιχθυδίων. Αναφορικά με τη θρεπτική σύσταση του ήπατος των ιχθυδίων, η περιεκτικότητα σε υγρασία και ολικών λιπιδίων της ομάδας HFM100 ήταν χαμηλότερη ($P<0,05$) από των υπολοίπων ομάδων. Η περιεκτικότητα σε ολικές πρωτεΐνες ήταν σημαντικά υψηλότερη ($P<0,05$) στις ομάδες FM και HFM100.

4.2.2.3 Ιστολογική εξέταση των ιχθυδίων

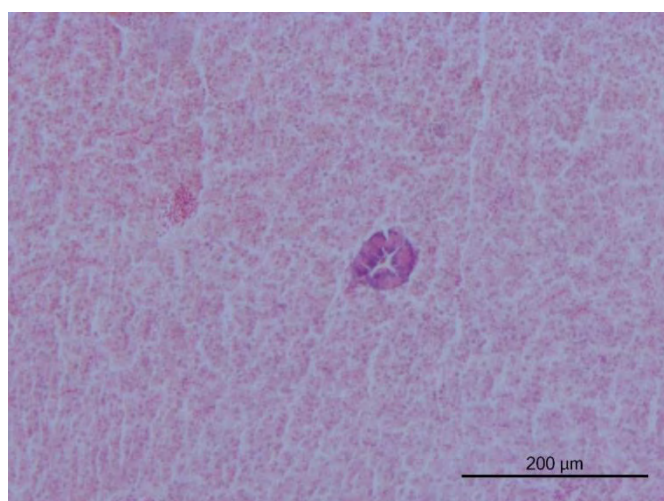
Για την ιστολογική εξέταση των ιχθυδίων πάρθηκαν 2 ιχθύδια από κάθε δεξαμενή και συνολικά 8 ιχθύδια ανά διατροφική ομάδα. Τα αποτελέσματα της ιστολογικής εξέτασης του ήπατος των ιχθυδίων τσιπούρας (Εικ. 4.1) έδειξαν ότι αυτά που διατράφηκαν με ιχθυάλευρο (FM ομάδα) είχαν φυσιολογική ιστολογική εικόνα του ήπατος, ύπαρξη λίγων και μικρών λιποσταγονιδίων και απουσία αιμορραγιών (Βαθμός 1, Πιν. 4.7, ελάχιστες αλλοιώσεις). Οι πυρήνες των ηπατοκυττάρων εμφανίστηκαν φυσιολογικοί και κεντρικοί. Τα παγκρεατικά νησίδια ήταν εμφανή και εντός των κυψελοειδών κυττάρων υπήρχε μεγάλος αριθμός από ηωσινόφιλα εκκριτικά προενζυμικά κοκκία. Ωστόσο, τα ιχθύδια που διατράφηκαν με τα σιτηρέσια που περιείχαν υδρολυμένο πτεράλευρο έδειξαν από μέτριες (Βαθμός 3, HFM50, Εικ. 4.2) έως αρκετά σοβαρές αλλοιώσεις (Βαθμός 4, Πιν. 4.7, HFM100, Εικ. 4.3).

Πίνακας 4.7. Βαθμολογία ιστολογικής αλλοίωσης του ήπατος και του εντέρου των ιχθυδίων του 3^{ου} διατροφικού πειράματος.

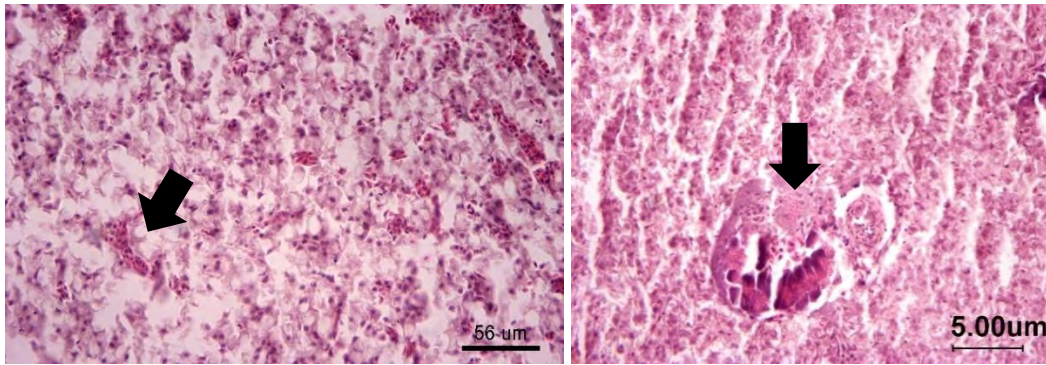
Βαθμολογία Αλλοίωσης			
	FM	HFM50	HFM100
Ήπαρ	1	3	4
Έντερο	0	0	0*

* Δεν κατέστη δυνατόν να γίνει παρατήρηση εντέρου στην ομάδα HFM100 λόγω μικρού μεγέθους

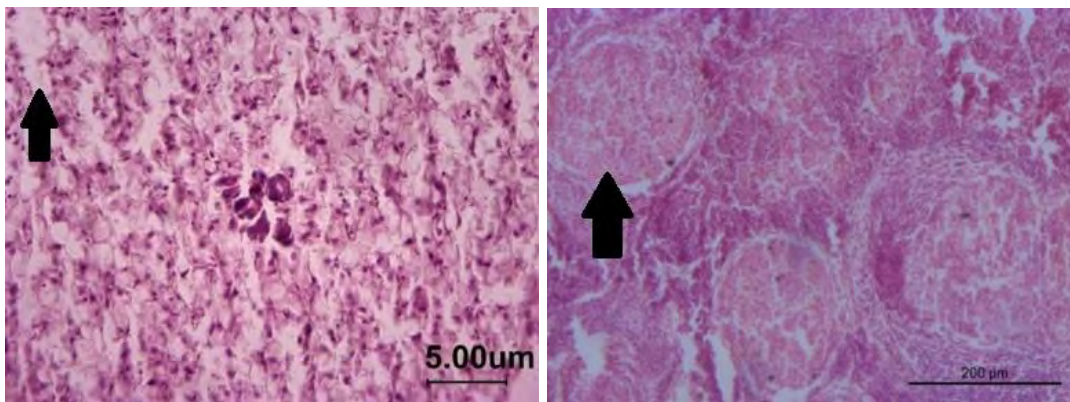
Τα ιχθύδια αυτών των ομάδων περιείχαν αυξημένο αριθμό λιποσταγονιδίων μεγάλου μεγέθους στα ηπατοκύτταρά τους, με ενδείξεις νέκρωσης των παγκρεατικών νησιδίων τους και κάποιες αιμορραγίες (Εικ. 4.4). Οι αλλοιώσεις αυτές ήταν περισσότερο εμφανείς στα ιχθύδια της ομάδας HFM100, κάποια από τα οποία εμφάνισαν κύρωση του ήπατος με τα αναγεννητικά οζίδια των ηπατοκυττάρων να περιβάλλονται από ινώδη συνδετικό ιστό (Εικ. 4.3).



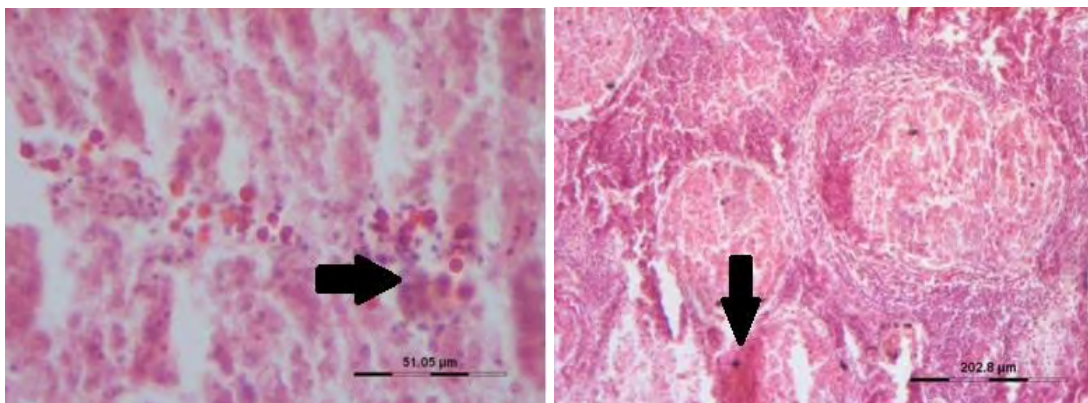
Εικόνα 4.1. Φυσιολογική ιστολογική εικόνα ήπατος της ομάδας του μάρτυρα FM.



Εικόνα 4.2. Λιποσταγονίδια μεγάλου μεγέθους με ενδείξεις νέκρωσης των παγκρεατικών νησιδίων στα ηπατοκύτταρα της ομάδας HFM50 (αριστερά) και HFM100 (δεξιά).



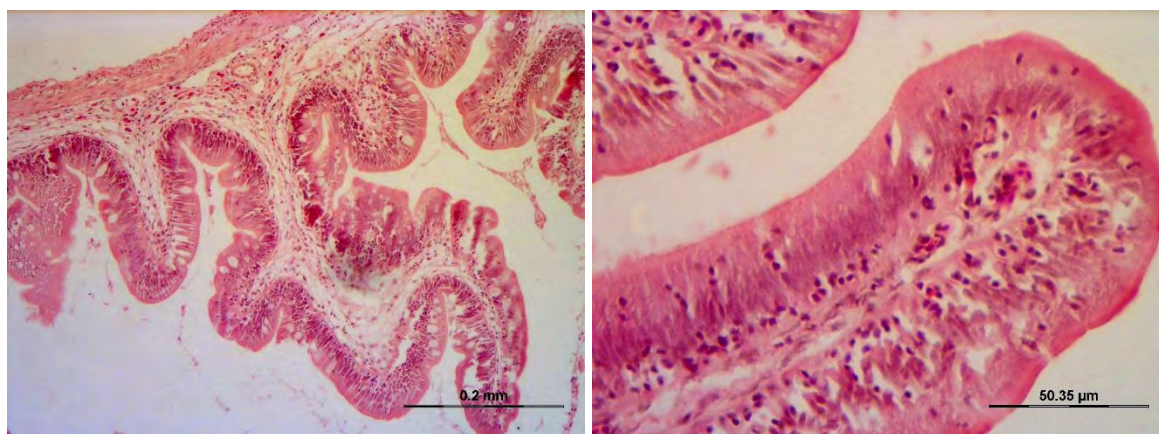
Εικόνα 4.3. Λιποσταγονίδια μεγάλου μεγέθους (αριστερά) και κύρωση ήπατος (δεξιά) στο ήπαρ της ομάδας HFM100.



Εικόνα 4.4. Αιμορραγίες στα ηπατοκύτταρα της ομάδας HFM50 (αριστερά) και HFM100 (δεξιά).

Αναφορικά με την ιστολογική εξέταση του εντέρου των ιχθυδίων, δυστυχώς, τεχνικές δυσκολίες δεν επέτρεψαν την ιστολογική εξέταση του εντέρου των ατόμων της ομάδας (HFM100) και έτσι η αξιολόγηση της επίδρασης της ολικής αντικατάστασης δεν ήταν εφικτή.

Ωστόσο, οι άλλες δύο διατροφικές ομάδες (FM και HFM50) είχαν μια φυσιολογική ιστολογική εικόνα (Εικ. 4.5). Τα εντεροκύτταρα και τα βλεννογόνα κύτταρα (goblet cells) ήταν ευδιάκριτα. Στον υποβλεννογόνο χιτώνα υπήρχαν άφθονα ηωσινόφιλα λευκά αιμοσφαίρια, το οποίο είναι φυσιολογικό σε ιχθύες (Βερίλλης & Μεντέ 2017). Σε κανέναν εξεταζόμενο ιστό δεν παρατηρήθηκαν ενδείξεις φλεγμονής ή εντερίτιδων.



Εικόνα 4.5. Ιστολογική τομή εντέρου ιχθυδίων τσιπούρας της ομάδας FM (αριστερά) και HFM50 (δεξιά). Φυσιολογική ιστολογική εικόνα με ευδιάκριτα εντεροκύτταρα και βλεννοπαραγωγά κύτταρα

4.3 4^ο διατροφικό πείραμα – μερική (25% και 50%) αντικατάσταση ιχθυαλεύρου από υδρολυμένο πετράλευρο με ταυτόχρονη εξισορρόπηση σε αμινοξέα

4.3.1 Πειραματικά σιτηρέσια και συνθήκες εκτροφής

Στο 4^ο διατροφικό πείραμα, καταρτίστηκαν τέσσερα ισοπρωτεϊνικά (50% ολικές πρωτεΐνες) και ισοενεργειακά (21 KJ/g) σιτηρέσια, χρησιμοποιώντας την τροφή μάρτυρα (FM) του 3^{ου} διατροφικού πειράματος, αλλά η πρωτεΐνη του ιχθυαλεύρου αντικαταστάθηκε σε χαμηλότερα επίπεδα με ή χωρίς συμπλήρωση απαραίτητων αμινοξέων: κατά 25% (HFM25), κατά 25% με ταυτόχρονη συμπλήρωση λυσίνης και μεθειονίνης (HFM25+) και κατά 50% με συμπλήρωση των συγκεκριμένων αμινοξέων (HFM50+) (Πιν. 4.8 και Πιν 4.9). Η λυσίνη και η μεθειονίνη αποτέλεσαν τα δύο περισσότερα ελλειμματικά απαραίτητα αμινοξέα στο υδρολυμένο πετράλευρο, συγκριτικά με το ιχθυάλευρο. Για τις ανάγκες του 4^{ου} διατροφικού πειράματος χρησιμοποιήθηκαν συνολικά 300 ιχθύδια τσιπούρας μέσου σωματικού βάρους $2,97 \pm 0,31$ g, μέσου ολικού μήκους $6,3 \pm 0,3$ cm και τοποθετήθηκαν σε 12 γυάλινα ενυδρεία (125 L) και αφέθηκαν να εγκλιματιστούν στις ελεγχόμενες συνθήκες του σταθμού για 10 ημέρες σιτιζόμενα με το σιτηρέσιο FM, έως την έναρξη χορήγησης των πειραματικών σιτηρεσίων. Τα ιχθύδια διαχωρίστηκαν τυχαία σε συνολικά τέσσερις διατροφικές ομάδες με τριπλή επαναληψιμότητα (25 ιχθύδια/ενυδρείο, 3 ενυδρεία/διατροφική ομάδα) με την κάθε μία να διατρέφεται με διαφορετικό σιτηρέσιο. Συγκεκριμένα, η ομάδα ιχθύων FM διατράφηκε με την τροφή που περιείχε αποκλειστικά ιχθυάλευρο ως πηγή ζωικής πρωτεΐνης και θεωρήθηκε η ομάδα μάρτυρας, ενώ οι υπόλοιπες τρεις ομάδες ιχθύων HFM25, HFM25+ και HFM50+ διατράφηκαν με τα σιτηρέσια που περιείχαν υδρολυμένο πετράλευρο στις αντίστοιχες αντικαταστάσεις. Το σύμβολο (+) υποδηλώνει ότι στα συγκεκριμένα σιτηρέσια υπήρχε η προσθήκη λυσίνης και μεθειονίνης. Η ποιότητα του νερού, οι καθημερινές μεταχειρίσεις και η διαχείριση της σίτισης ήταν παρόμοιες όπως περιγράφηκαν στο 3^ο διατροφικό πείραμα. Το 4^ο διατροφικό πείραμα διήρκησε συνολικά 110 ημέρες. (Παράρτημα – διάγραμμα 4.1).

Πίνακας 4.8. Καταρτισμός σιτηρεσιών και θρεπτική σύσταση πειραματικών ιχθυοτροφών που χρησιμοποιήθηκαν για την μερική (25% και 50%) αντικατάσταση του ιχθυαλεύρου από υδρολυμένο πετράλευρο με ταυτόχρονη εξισορρόπηση σε αμινοξέα (4^ο διατροφικό πείραμα).

Συστατικά (%) / Σιτηρέσιο	4 ^ο διατροφικό πείραμα			
	FM	HFM25	HFM25+	HFM50+
Ιχθυάλευρο	58	43,5	43,5	29
Υδρολυμένο πετράλευρο	0	10,8	10,8	21,6
Γλουτένη καλαμποκιού	19,5	18,4	16,9	23,4
Σιτάρι, αλεύρι	10,4	11,6	11,6	12,9
Ιχθυέλαιο	11,1	9,5	9,5	7,9
Βιταμίνες & ανόργανα στοιχεία	0,3	0,3	0,3	0,3
MCP (φωσφορικό μονοασβέστιο)	0,3	0,3	0,3	0,3
Βιταμίνη E	0,1	0,1	0,1	0,1
Βιταμίνη C	0,1	0,1	0,1	0,1
Αντιμυκητιακή ουσία	0,2	0,2	0,2	0,2
Λυσίνη	0	0	0,5	1,0
Μεθειονίνη	0	0	0,2	0,4
<u>Θρεπτική σύσταση (%)¹</u>				
Ξηρή ουσία	92,2	92,2	92,1	92,2
Ολικές αζωτούχες ουσίες	50,1	50,2	49,5	50,4
Ολικές λιπαρές ουσίες	17	14,5	14,7	11,9
Υδατάνθρακες ²	16,6	20,7	21,1	24,9
Τέφρα	8,5	6,7	6,7	4,9
Ενέργεια (KJ/g)	21,5	21,3	21,7	21,3

¹ Οι τιμές της θρεπτικής σύστασης αντιπροσωπεύουν μέσους όρους από n=6.

² Το ποσοστό των υδατανθράκων εκτιμήθηκε με αφαίρεση από το 100 του συνόλου των ποσοστών υγρασίας, ολικών πρωτεϊνών, ολικών λιπιδίων και τέφρας.

Πρώτες ύλες: Ιχθυάλευρο (Sardine fishmeal, Köster Marine Proteins GmbH, Hamburg, Germany), πτηνάλευρο (Poultry meal, Sonac, Son, The Netherlands), γλουτένη καλαμποκιού (Glutalys®, Roquette Italia S.p.A, Cassano Spinola, Italy), σιτάρι (τοπική αγορά), ιχθυέλαιο (Tuna oil, Inproquisa SA, Madrid, Spain), MCP (Astron Chemicals SA, Attica, Greece), βιταμίνες E και C (DSM Nutritional Products Hellas LTD, Athens, Greece), αντιμυκητιακή ουσία (Mycocurb®, Kemin, Herentals, Belgium), λυσίνη (Ajinomoto Eurolysine S.A.S., Paris, France), μεθειονίνη (MetAMINO® DL-Methionine Feed Grade, Evonik Nutrition & Care GmbH, Athens, Greece). Πρόμιγμα βιταμινών και ανοργάνων στοιχείων (kg⁻¹ μίγματος): Vitamins: E, 58.3 g; K3, 3.3 g; B1, 3.3 g; B2, 6.6 g; B6, 3.3 mg; B12, 10 mg; Folic acid, 3.3 g; Biotin, 100 mg; C, 33.3 g; Nicotinic acid, 16.6 g; Pantothenic acid, 13.3 g. Minerals: Co, 170 mg; I, 248 mg (Ca(IO₃)₂); Mn, 10 g (MnO); Zn, 33 g (ZnO); Ca 235 g; Se 2,5 mg (Na₂SeO₃); Na 247,5 mg (Na₂SeO₃).

Πίνακας 4.9. Σύσταση σε αμινοξέα (% πρωτεΐνης) των πειραματικών ιχθυοτροφών που χρησιμοποιήθηκαν για τη μερική (25% και 50%) αντικατάσταση του ιχθυαλεύρου από υδρολυμένο πετράλευρο με ταυτόχρονη εξισορρόπηση σε αμινοξέα (4^ο διατροφικό πείραμα).

4 ^ο διατροφικό πείραμα					
Αμινοξέα ¹	FM	HFM25	HFM25+	HFM50+	Απαιτήσεις (% πρωτεΐνης) ²
<u>Απαραίτητα αμινοξέα</u>					
Αργινίνη	5,69	5,51	5,78	5,41	5,4
Ιστιδίνη	2,67	1,87	2,00	1,72	1,7
Ισολευκίνη	3,93	4,15	4,25	4,32	2,6
Λευκίνη	9,53	9,57	9,65	9,39	4,5
Λυσίνη	6,52	5,61	6,15	5,64	5,0
Μεθειονίνη	2,52	2,37	2,74	2,52	2,4
Φαινυλαλανίνη	4,61	4,72	4,76	4,70	2,9
Θρεονίνη	4,14	4,22	4,11	4,30	2,8
Τρυπτοφάνη	0,98	0,96	0,97	0,92	0,6
Βαλίνη	4,62	5,13	5,52	5,86	3,0
<u>Μη απαραίτητα αμινοξέα</u>					
Αλανίνη	7,12	6,67	6,60	5,87	
Ασπαρτικό οξύ	8,73	8,31	7,87	7,47	
Κυστίνη	1,23	1,51	1,51	1,80	
Γλουταμινικό οξύ	16,91	16,64	15,70	14,78	
Γλυκίνη	5,98	6,32	6,44	6,43	
Προλίνη	6,33	6,67	6,89	7,87	
Σερίνη	4,73	5,82	5,52	7,39	
Τυροσίνη	3,53	3,42	3,43	3,28	

¹Μέθοδος για τρυπτοφάνη: UNI 22618:2000 + UNI 22630:2000, μέθοδος για υπόλοιπα αμινοξέα: REG CE 152/09 27/01/09 ALL III MET F PTO 5.3.

²Απαιτήσεις (% πρωτεΐνης) των ιχθυδίων *S. aurata* κατά Kaushik (1998).

4.3.2 Αποτελέσματα

4.3.2.1 Παράμετροι ανάπτυξης των ιχθυδίων και αξιοποίησης τροφής

Τα αποτελέσματα της ανάπτυξης των ιχθυδίων του 4^{ου} διατροφικού πειράματος μερικής (25% και 50%) αντικατάστασης του ιχθυαλεύρου από υδρολυμένο πετράλευρο με ταυτόχρονη εξισορρόπηση σε αμινοξέα στο σιτηρέσιο του μελετηθέντος είδους παρουσιάζονται στον Πίνακα 4.10 (30 ημέρες εκτροφής), Πίνακα 4.11 (60 ημέρες εκτροφής) και Πίνακα 4.12 (ολοκλήρωση πειραματισμού έπειτα από 110 ημέρες εκτροφής).

Στο τέλος του 4^{ου} διατροφικού πειράματος (Πιν. 4.12), η επιβίωση των ιχθυδίων ήταν υψηλή (>92%) και παρόμοια μεταξύ των ομάδων. Η ομάδα ιχθυδίων HFM50+ είχε τη χαμηλότερη πρόσληψη τροφής, ενώ τα ιχθύδια της ομάδας HFM25+ είχαν παρόμοια πρόσληψη τροφής με εκείνα της FM ομάδας. Οι ομάδες ιχθυδίων FM και HFM25+ είχαν τις υψηλότερες ($P < 0,05$) τιμές στο τελικό σωματικό βάρος, την αύξηση βάρους, SGR και PER, με τις χαμηλότερες τιμές να εμφανίζονται από την ομάδα HFM50+. Τα ιχθύδια της FM ομάδας παρουσίασαν τον χαμηλότερο ($P < 0,05$) FCR, ενώ της ομάδας HFM50+ τον υψηλότερο. Η κατακράτηση πρωτεϊνών στα ιχθύδια των ομάδων FM και HFM25+ ήταν σημαντικά υψηλότερη από εκείνη των HFM50+, ενώ η κατακράτηση λιπιδίων ήταν παρόμοια σε όλες τις διατροφικές ομάδες, αν και υψηλότερες τιμές βρέθηκαν στα ιχθύδια της ομάδας HFM50+. Ο δείκτης ευρωστίας, ο HSI και ο VSI δεν επηρεάστηκαν ($P > 0,05$) από τη διατροφή.

Όσον αφορά την οικονομική αποδοτικότητα των σιτηρεσίων, τα διαφορετικά επίπεδα ένταξης του HFM επηρέασαν το κόστος του σιτηρεσίου και τον οικονομικό συντελεστή μετατρεψιμότητας της τροφής (ECR) (Πιν. 4.12). Λόγω του ότι το HFM είναι φθηνότερο από το ιχθυάλευρο, η μείωση του κόστους σιτηρεσίου ήταν από 12,4% στο σιτηρέσιο HFM25+ έως και 25% στο σιτηρέσιο HFM50+. Το ECR, επίσης, μειώθηκε αισθητά αν και όχι σημαντικά ($P > 0,05$) καθώς το επίπεδο ένταξης του HFM αυξήθηκε στο σιτηρέσιο (Παράρτημα – διαγράμματα 4.2, 4.3, 4.4, 4.5, 4.6, 4.7).

Πίνακας 4.10. Παράμετροι ανάπτυξης ιχθυδίων τσιπούρας (*S. aurata*) διατρεφόμενοι με ιχθυοτροφές που χρησιμοποιήθηκαν για τη μερική (25% και 50%) αντικατάσταση του ιχθυαλεύρου από υδρολυμένο πετράλευρο με ταυτόχρονη εξισορρόπηση σε αμινοξέα (4^ο διατροφικό πείραμα), έπειτα από **30 ημέρες** εκτροφής

Παράμετροι / Διατροφικές ομάδες	FM	HFM25	HFM25+	HFM50+
Επιβίωση (%)	98,7±2,3	98,7±2,3	98,7±2,3	100
Πρόσληψη τροφής (g/ψάρι)	8,13±0,16	7,43±0,23	7,90±0,15	7,06±0,20
Αρχικό βάρος (g/ψάρι)	2,97±0,01	2,97±0,00	2,97±0,01	2,97±0,01
Τελικό βάρος (g/ψάρι)	9,57±0,25 ^a	8,54±0,39 ^{ab}	8,86±0,51 ^{ab}	7,69±0,50 ^b
SGR (%/ημέρα)	3,91±0,10 ^a	3,51±0,15 ^{ab}	3,64±0,19 ^{ab}	3,17±0,10 ^b
FCR	1,23±0,02 ^a	1,34±0,12 ^{ab}	1,35±0,10 ^{ab}	1,50±0,02 ^b

Οι τιμές αντιπροσωπεύουν μέσους όρους ± τυπική απόκλιση (n=3). Οι τιμές κάθε παραμέτρου που φέρουν διαφορετικό εκθέτη μεταξύ των διατροφικών ομάδων υποδηλώνουν στατιστικώς σημαντική διαφορά (P < 0.05) μεταξύ τους. SGR - ειδικός ρυθμός ανάπτυξης, FCR – συντελεστής μετατρεψιμότητας τροφής.

Πίνακας 4.11. Παράμετροι ανάπτυξης ιχθυδίων τσιπούρας (*S. aurata*) διατρεφόμενοι με ιχθυοτροφές που χρησιμοποιήθηκαν για τη μερική (25% και 50%) αντικατάσταση του ιχθυαλεύρου από υδρολυμένο πετράλευρο με ταυτόχρονη εξισορρόπηση σε αμινοξέα (4^ο διατροφικό πείραμα), έπειτα από **60 ημέρες** εκτροφής

Παράμετροι / Διατροφικές ομάδες	FM	HFM25	HFM25+	HFM50+
Επιβίωση (%)	96,0±0,0	97,3±2,3	97,3±2,3	100,0±0,0
Πρόσληψη τροφής (g/ψάρι)	21,62±1,09	20,42±0,73	21,80±1,02	19,65±0,35
Αρχικό βάρος (g/ψάρι)	2,97±0,01	2,97±0,00	2,97±0,01	2,97±0,01
Τελικό βάρος (g/ψάρι)	20,00±2,30	17,82±2,10	19,40±2,10	16,35±1,34
Αύξηση βάρους (g/ψάρι)	17,04±2,29	14,84±2,08	16,43±1,82	13,38±1,33
SGR (%/ημέρα)	3,02±0,19	2,83±0,19	2,97±0,15	2,70±0,13
FCR	1,28±0,12	1,39±0,18	1,33±0,09	1,47±0,12

Οι τιμές αντιπροσωπεύουν μέσους όρους ± τυπική απόκλιση (n=3). Δεν υπάρχουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές των τιμών (P>0,05) μεταξύ των διατροφικών ομάδων σε όλες τις παραμέτρους που εξετάστηκαν.

Πίνακας 4.12. Παράμετροι ανάπτυξης, αξιοποίησης τροφής, οικονομικότητας σιτηρεσίου και μορφομετρικοί παράμετροι ιχθυδίων τσιπούρας (*S. aurata*) διατρεφόμενοι με ιχθυοτροφές που χρησιμοποιήθηκαν για τη μερική (25% και 50%) αντικατάσταση του ιχθυαλεύρου από υδρολυμένο πετράλευρο με ταυτόχρονη εξισορρόπηση σε αμινοξέα (4^ο διατροφικό πείραμα), έπειτα από **110 ημέρες** εκτροφής.

Παράμετροι /	4 ^ο πείραμα			
Διατροφικές ομάδες	FM	HFM25	HFM25+	HFM50+
Επιβίωση (%)	92,0 ± 4,0	96,0 ± 4,0	96,0 ± 0,0	98,0 ± 2,8
Πρόσληψη (g/ψάρι)	48,4 ± 0,97 ^a	44,9 ± 0,30 ^{bc}	46,9 ± 1,12 ^{ab}	43,3 ± 1,85 ^c
Ολικό μήκος (cm)	13,8 ± 0,22 ^a	13,1 ± 0,22 ^{ab}	13,5 ± 0,34 ^a	12,5 ± 0,40 ^b
Αρχικό βάρος (g/ψάρι)	2,97 ± 0,01	2,97 ± 0,00	2,97 ± 0,01	2,97 ± 0,01
Τελικό βάρος (g/ψάρι)	41,4 ± 1,17 ^a	34,52 ± 2,76 ^{ab}	39,11 ± 3,68 ^a	30,23 ± 3,59 ^b
Αύξηση βάρους (g/ψάρι)	38,4 ± 1,17 ^a	31,54 ± 2,76 ^{ab}	36,14 ± 3,68 ^a	27,26 ± 3,59 ^b
SGR (%/ημέρα)	2,40 ± 0,02 ^a	2,23 ± 0,07 ^{ab}	2,34 ± 0,08 ^a	2,11 ± 0,11 ^b
FCR	1,26 ± 0,01 ^a	1,43 ± 0,13 ^{ab}	1,31 ± 0,10 ^{ab}	1,60 ± 0,14 ^b
PER	1,59 ± 0,02 ^a	1,40 ± 0,12 ^{ab}	1,55 ± 0,12 ^a	1,25 ± 0,11 ^b
Κατακράτηση πρωτεΐνης (%)	29,1 ± 0,28 ^a	24,3 ± 1,99 ^{ab}	27,1 ± 2,07 ^a	22,1 ± 1,89 ^b
Κατακράτηση λίπους (%)	59,2 ± 0,51	61,1 ± 4,76	62,1 ± 4,50	67,5 ± 5,30
HSI (%)	1,96 ± 0,36	1,82 ± 0,29	1,84 ± 0,41	2,12 ± 0,49
VSI (%)	7,02 ± 0,88	7,02 ± 0,54	6,88 ± 0,34	6,93 ± 0,83
K	1,54 ± 0,05	1,51 ± 0,03	1,56 ± 0,03	1,52 ± 0,03
Κόστος σιτηρεσίου (€/Kg)	1,21	1,05	1,06	0,91
Μεταβολή κόστους σιτ.(%)	0	13,2	12,4	25,0
ECR (€/Kg ψαριού)	1,52±0,02	1,50±0,13	1,38±0,10	1,45±0,09

Οι τιμές αντιπροσωπεύουν μέσους όρους ± τυπική απόκλιση (n=3). Οι τιμές κάθε παραμέτρου που φέρουν διαφορετικό εκθέτη μεταξύ των διατροφικών ομάδων υποδηλώνουν στατιστικώς σημαντική διαφορά ($P < 0.05$) μεταξύ τους. SGR - ειδικός ρυθμός ανάπτυξης, FCR – συντελεστής μετατρεψιμότητας τροφής, PER – συντελεστής αποδοτικότητας πρωτεΐνης, HSI – ηπατοσωματικός δείκτης, VSI – ενδοσπλαχνικός δείκτης, K – δείκτης ευρωστίας.

4.3.2.2 Θρεπτική σύσταση των ιχθυδίων

Η θρεπτική σύσταση τόσο του ολικού σώματος όσο και του μυϊκού ιστού των ιχθυδίων του 4^{ου} διατροφικού πειράματος ήταν παρόμοια ($P>0,05$) μεταξύ των διαφορετικών διατροφικών ομάδων (Πίν. 4.13). Επιπροσθέτως, το λίπος στο ήπαρ των ιχθυδίων της ομάδας HFM50+ ήταν σημαντικά χαμηλότερο ($P<0,05$) συγκριτικά με των άλλων.

Πίνακας 4.13. Θρεπτική σύσταση (% επί της ξηρής ουσίας δείγματος) ολόκληρου σώματος, του μυϊκού ιστού και του ήπατος των ιχθυδίων που χρησιμοποιήθηκαν για τη μερική (25% και 50%) αντικατάσταση του ιχθυαλεύρου από υδρολυμένο πετράλευρο με ταυτόχρονη εξισορρόπηση σε αμινοξέα (4^ο διατροφικό πείραμα).

Θρεπτική σύσταση (%)	FM	HFM25	HFM25+	HFM50+
<u>Θρεπτική σύσταση ολικού σώματος (%)</u>				
Υγρασία (νωπού)	67,41±0,50	66,96±0,61	67,85±0,76	66,60±0,59
Ολικές πρωτεΐνες	55,26±2,13	51,40±1,75	52,93±2,32	51,72±2,41
Ολικά λιπίδια	36,68±1,45	35,16±2,73	34,67±1,58	35,35±2,24
Τέφρα	10,87±1,30	10,24±0,98	10,64±1,17	11,00±1,40
Ενέργεια (kJ/g)	26,2±0,4	26,5±0,6	26,3±0,5	26,4±0,7
<u>Θρεπτική σύσταση μυϊκού ιστού (%)</u>				
Υγρασία (νωπού)	72,17±0,64	73,23±0,67	72,32±0,74	73,46±0,73
Ολικές πρωτεΐνες	75,01±2,25	74,17±1,66	73,41±1,37	75,69±1,13
Ολικά λιπίδια	21,15±2,41	18,96±0,92	20,83±1,07	18,43±2,01
Τέφρα	4,90±0,13	4,96±1,3	4,71±0,21	4,75±0,24
Ενέργεια (kJ/g)	25,3±0,3	25,3±0,8	25,3±0,5	24,9±0,8
<u>Θρεπτική σύσταση ήπατος (%)</u>				
Υγρασία (νωπού)	67,5±0,8	68,3±0,9	69,7±0,7	69,9±0,7
Ολικά λιπίδια	37,8±0,3 ^a	36,2±0,0 ^a	43,1±0,6 ^a	28,8±3,8 ^b

Οι τιμές αντιπροσωπεύουν μέσους όρους ± τυπική απόκλιση (n=12). Οι τιμές κάθε παραμέτρου που φέρουν διαφορετικό εκθέτη μεταξύ των διατροφικών ομάδων υποδηλώνουν στατιστικώς σημαντική διαφορά ($P < 0.05$) μεταξύ τους.

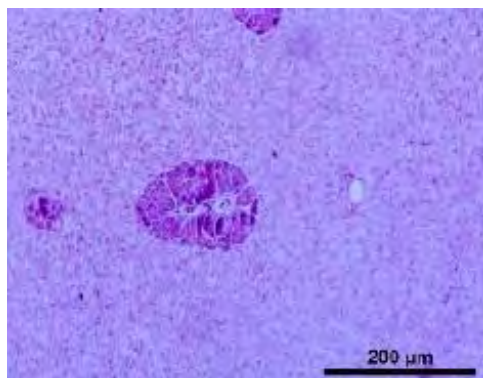
4.3.2.3 Ιστολογική εξέταση των ιχθυδίων

Για την ιστολογική εξέταση των ιχθυδίων πάρθηκαν 2 άτομα από κάθε δεξαμενή και συνολικά 8 ιχθύδια ανά διατροφική ομάδα. Τα αποτελέσματα της ιστολογικής εξέτασης του ήπατος των ιχθυδίων τσιπούρας (Εικ. 4.6) έδειξαν ότι τα ιχθύδια που διατράφηκαν με ιχθυάλευρο (FM ομάδα) είχαν φυσιολογική ιστολογική εικόνα του ήπατος, ύπαρξη λίγων και μικρών λιποσταγονιδίων και απουσία αιμορραγιών (Βαθμός 1, Πιν. 4.14, ελάχιστες αλλοιώσεις).

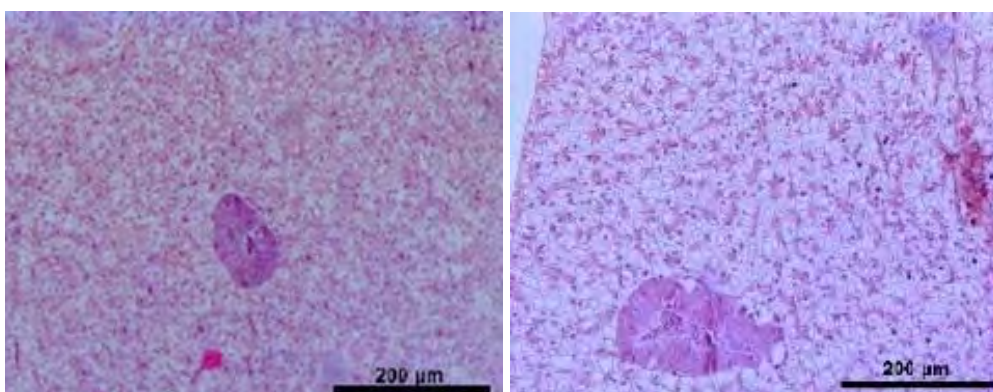
Πίνακας 4.14. Βαθμολογία ιστολογικής αλλοίωσης του ήπατος και του εντέρου των ιχθυδίων του 4^{ου} διατροφικού πειράματος.

Βαθμολογία Αλλοίωσης				
	FM	HFM25	HFM25+	HFM50+
Ήπαρ	1	1	1	2
Έντερο	0	0	0	0

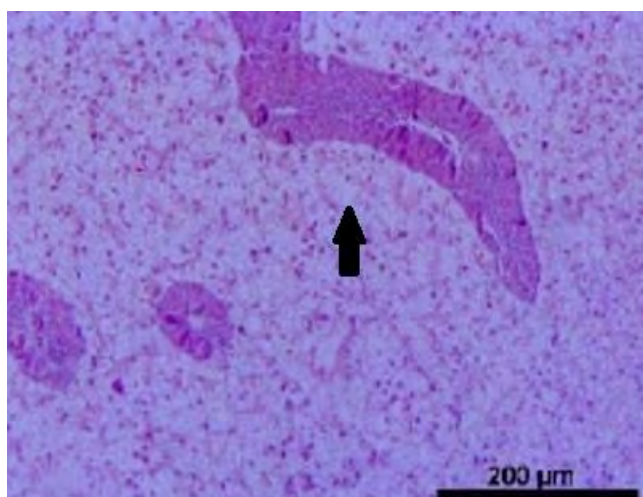
Οι πυρήνες των ηπατοκυττάρων εμφανίζονταν φυσιολογικοί και κεντρικοί. Τα παγκρεατικά νησίδια ήταν εμφανή και εντός των κυψελοειδών κυττάρων υπήρχε μεγάλος αριθμός από διπλοθλαστικά εκκριτικά προενζυμικά κοκκία. Παρόμοια φυσιολογική εικόνα ήπατος έδειξαν και τα ιχθύδια των ομάδων HFM25 και HFM25+ (Βαθμός 1, Πιν. 4.14, ελάχιστες αλλοιώσεις, Εικ. 4.7). Ωστόσο, τα ιχθύδια της ομάδας HFM50+ εμφάνισαν μια ήπια αλλοίωση (Βαθμός 1, ήπιες αλλοιώσεις, Εικ. 4.8) με αυξημένο αριθμό λιποσταγονιδίων μεγάλου μεγέθους και σε κάποια ηπατοκύτταρα ο πυρήνας τους ήταν τοποθετημένος περιφερειακά του κυττάρου. Σε κανένα εξεταζόμενο ιστό δεν παρατηρήθηκε στεάτωση.



Εικόνα 4.6. Φυσιολογική ιστολογική εικόνα ήπατος της ομάδας του μάρτυρα FM.

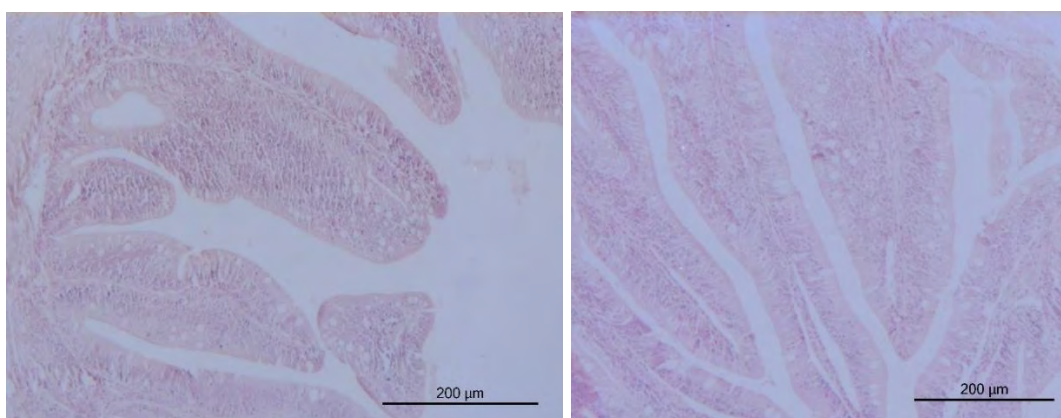


Εικόνα 4.7. Φυσιολογική ιστολογική εικόνα ήπατος των ιχθυδίων HFM25 (αριστερά) και HFM25+ (δεξιά).



Εικόνα 4.8. Λιποσταγονίδια μεγάλου μεγέθους στο ήπαρ των ιχθυδίων της ομάδας HFM50+.

Αναφορικά με την ιστολογική εξέταση του εντέρου των μελετηθέντων ιχθυδίων, όλες οι διατροφικές ομάδες είχαν μια φυσιολογική ιστολογική εικόνα (Εικ. 4.9). Τα εντεροκύτταρα και τα βλεννογόνα κύτταρα (goblet cells) ήταν ευδιάκριτα. Στον υποβλεννογόνο χιτώνα υπήρχαν άφθονα ηωσινόφιλα λευκά αιμοσφαίρια, κάτι το οποίο είναι φυσιολογικό σε ιχθύδια (Βερίλλης & Μεντέ 2017). Σε κανέναν εξεταζόμενο ιστό δεν παρατηρήθηκαν ενδείξεις φλεγμονής ή εντερίτιδων.



Εικόνα 4.9. Φυσιολογική ιστολογική εικόνα εντέρου των ιχθυδίων της ομάδας FM (αριστερά) και HFM50+ (δεξιά).

4.4 Συζήτηση

Οι μελέτες για τη χρήση του περαλεύρου (HFM) στα σιτηρέσια των εκτρεφόμενων ιχθύων και καρκινοειδών είναι περιορισμένες, αλλά αποκτούν αυξημένο ερευνητικό ενδιαφέρον μετά την πρόσφατη επαναφορά των ΜΖΠ-μη μηρυκαστικών στην αλυσίδα ιχθυοτροφών της ΕΕ. Έχει αποδειχθεί ότι η πρωτεΐνη του περαλεύρου, όταν χρησιμοποιείται ως η μοναδική χερσαία πηγή ζωικής πρωτεΐνης στο σιτηρέσιο, μπορεί να αντικαταστήσει με επιτυχία τα ιχθυάλευρα σε χαμηλά επίπεδα στα είδη όπως τα *Oncorhynchus tshawytscha* (Fowler 1990), *Epinephelus malabaricus* (Li *et al.*, 2009) και *Pacifastacus leniusculus* (Fuertes *et al.* 2014), σε σημαντικά επίπεδα αντικατάστασης στο *O. mykiss* (Bureau *et al.* 2000) και στο *Paralichthys olivaceus* (Kikuchi *et al.* 1994) και ακόμη και σε υψηλά επίπεδα

στο *Labeo rohita* (Hasan *et al.* 1997), *O. niloticus* (Bishop *et al.* 1995) και *D. labrax* (Campos *et al.* 2017). Ωστόσο, μελέτες αναφορικά με τη χρήση του περαλεύρου στη διατροφή της τσιπούρας (*S. aurata*) είναι εξαιρετικά περιορισμένες (Alexis 1997, Nengas *et al.* 1999, Nogueira *et al.* 2012).

Στην παρούσα μελέτη, αυξανόμενα ποσοστά ένταξης του HFM στο σιτηρέσιο των ιχθυδίων τσιπούρας μείωσαν την εθελούσια πρόσληψη τροφής. Αυτό υποδηλώνει μια αρκετά υποβαθμισμένη γευστικότητα και αποδεκτικότητα του περαλεύρου από τα ιχθύδια, ακόμη και σε επίπεδο αντικατάστασης 25%. Ωστόσο, η συμπληρωματική χορήγηση λυσίνης και μεθειονίνης σε επίπεδο αντικατάστασης 25% φάνηκε να ενισχύει την πρόσληψη της τροφής και να είναι όμοια με εκείνη της ομάδας του μάρτυρα (Πιν. 4.12). Στην περίπτωση όπου το περάλευρο αντικαθιστά πλήρως το ιχθυάλευρο στην τροφή (HFM100) τότε η εν λόγω τροφή έχει πολύ χαμηλή πρόσληψη και αποδεκτικότητα. Παράλληλα, παρατηρήθηκε ότι η HFM100 τροφή είχε μια πιο σκληρή υφή, λόγω της σκληρής υφής του περαλεύρου, το οποίο μπορεί να επέδρασε αρνητικά στην αποδεκτικότητα της τροφής από τα ιχθύδια. Η σκληρή υφή του περαλεύρου πιθανώς να οφείλεται στην παρουσία αυξημένων ποσοτήτων κερατίνης που περιλαμβάνουν τα φτερά των πουλερικών από τα οποία παρασκευάστηκε το άλευρο αυτό και η οποία είναι μια σκληρή, ινώδης και άπεπτη πρωτεΐνη.

Το HFM είναι γνωστό για τη χαμηλή αποδοχή του ακόμη και σε χαμηλά επίπεδα συγχορήγησης στο σιτηρέσιο σε πολλά είδη που μελετήθηκαν, όπως στο υβρίδιο της τιλάπιας (Fasakin *et al.* 2005), *O. mykiss* (Poppi *et al.* 2011) και *T. tinca* (González-Rodriguez *et al.* 2014), αν και όταν χρησιμοποιείται σε μείγματα με άλλες χερσαίες ζωικές πρωτεΐνες μπορεί να μην έχει τόσο αρνητικό αντίκτυπο στην πρόσληψη της τροφής (Xue *et al.* 2012, Wang *et al.* 2010, Hu *et al.* 2013), συμπεριλαμβανομένης της τσιπούρας (Nogueira *et al.* 2012). Είναι ενδιαφέρον ότι οι Campos *et al.* (2017) δουλεύοντας με το *D. labrax* πρότειναν ότι ακόμη και

τα υψηλά επίπεδα HFM επιφέρουν μια γεύση στην τροφή, που όμως τελικά δεν επηρεάζει την πρόσληψή της από τα ψάρια.

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης έδειξαν ότι μια αντικατάσταση της πρωτεΐνης του ιχθυαλεύρου από πρωτεΐνη πετράλεου κατά 25%, με ή χωρίς συμπληρωματική προσθήκη λυσίνης και μεθειονίνης, δεν άσκησε καμία αρνητική επίδραση στην ανάπτυξη των νεαρών ατόμων της τσιπούρας και στην αποδοτικότητα του σιτηρεσίου. Η προσθήκη λυσίνης και μεθειονίνης, σε αυτό το επίπεδο αντικατάστασης, δεν βελτίωσε τον ρυθμό ανάπτυξης των ιχθυδίων μεταξύ των δύο αυτών ομάδων (HFM25 και HFM25+). Αυτό δείχνει ότι σε χαμηλά επίπεδα αντικατάστασης του ιχθυαλεύρου από πετράλεο δεν είναι απαραίτητη η προσθήκη των συγκεκριμένων αμινοξέων. Παρόμοια αποτελέσματα έχουν προκύψει και για άλλα είδη (Kikuchi *et al.* 1994, Pfeffer *et al.* 1994) με τη χρήση λυσίνης και μεθειονίνης σε χαμηλή αντικατάσταση του ιχθυαλεύρου από πετράλεο.

Αυτά τα αποτελέσματα υποδηλώνουν ότι το πετράλεο μπορεί να αντικαταστήσει επιτυχώς την πρωτεΐνη του ιχθυαλεύρου κατά 25% χωρίς να επιβραδύνεται ο ρυθμός ανάπτυξης των ιχθυδίων τσιπούρας και η αποδοτικότητα της τροφής. Ένα υψηλότερο επίπεδο αντικατάστασης της τάξης του 50%, είτε με (4^ο διατροφικό πείραμα) είτε χωρίς (3^ο διατροφικό πείραμα) συμπλήρωση λυσίνης και μεθειονίνης οδήγησε σε μειωμένους ρυθμούς ανάπτυξης των νεαρών ιχθυδίων και αποδοτικότητα τροφής, ενώ η ολική αντικατάσταση του ιχθυαλεύρου οδήγησε σε μια ιδιαίτερα χαμηλή αποδοτικότητά τους. Η μειωμένη απόδοση των ιχθυδίων διατρεφόμενα με υψηλά επίπεδα αντικατάστασης, εξηγείται από το γεγονός ότι οι τροφές αυτές (HFM50 και HFM100) δεν ικανοποιούσαν πλήρως τις απαιτήσεις του μελετηθέντος είδους σε απαραίτητα αμινοξέα (Πιν. 4.2). Είναι γνωστό ότι το πετράλεο περιέχει χαμηλότερα επίπεδα λυσίνης και μεθειονίνης, καθώς και άλλων απαραίτητων αμινοξέων, σε σύγκριση με τα ιχθυάλευρα (Πιν. 1.5). Τα χαμηλότερα αυτά επίπεδα αμινοξέων μπορούν να περιορίσουν το ρυθμό ανάπτυξης των ιχθυδίων όταν το ιχθυάλευρο

του σιτηρεσίου αντικατασταθεί σε υψηλά επίπεδα, όπως έχει δειχθεί σε διάφορες μελέτες (Kikuchi *et al.* 1994, Pfeffer *et al.* 1994, Hasan *et al.* 1997, Fasakin *et al.* 2005). Το σιτηρέσιο HFM50+, αν και ήταν ισορροπημένο σε απαραίτητα αμινοξέα ως προς της απαιτήσεις των ιχθυδίων του μελετηθέντος είδους, αποδείχθηκε τελικά λιγότερο αποτελεσματικό από τα σιτηρέσια μερικής αντικατάστασης (HFM25 και HFM25+). Αυτό υποδηλώνει μια μικρότερη μεταβολική αποτελεσματικότητα της πρωτεΐνης του υδρολυμένου περαλεύρου στα υψηλά επίπεδα συμπερίληψής του στο σιτηρέσιο και αυτό υποστηρίζεται επιπλέον από το γεγονός ότι αυτές οι ομάδες ιχθυδίων είχαν σημαντικά χαμηλότερες τιμές κατακράτησης πρωτεϊνών στο σώμα τους.

Για την τσιπούρα, είχε επισημανθεί και παλαιότερα η χαμηλή θρεπτική αξία του περαλεύρου συγκριτικά με του ιχθυαλεύρου από τους Alexis (1997) και Nengas *et al.* (1999). Οι συγγραφείς είχαν δείξει ότι η ολική αντικατάσταση του ιχθυαλεύρου από μια μίξη περαλεύρου και πτηναλεύρου σε αναλογία 1:3 μείωσε την ανάπτυξη των ιχθυδίων τσιπούρας, κυρίως λόγω της χαμηλότερης πεπτικότητας του σιτηρεσίου (Nengas *et al.* 1995). Αν και η διαδικασία της υδρόλυσης μπορεί να βελτιώσει την πεπτικότητα του περαλεύρου (Bureau *et al.*, 1999), αυτή θεωρείται ότι παραμένει χαμηλότερη από εκείνη των ιχθυαλεύρων στα περισσότερα εκτρεφόμενα είδη (Yu 2008), συμπεριλαμβανομένης της τσιπούρας (Davies *et al.* 2009), κυρίως λόγω της υψηλής περιεκτικότητας του σε κερατίνη (Fasakin *et al.* 2005). Είναι γνωστό ότι η πηγή της πρωτεΐνης του σιτηρεσίου επηρεάζει σημαντικά την ενεργότητα των πεπτικών ενζύμων των ιχθύων και επομένως την πεπτικότητα του ίδιου του σιτηρεσίου (Silva *et al.* 2010, Moutinho *et al.* 2017, Gisbert *et al.* 2018).

Οι μελέτες που έχουν αξιολογήσει την επίδραση της αντικατάστασης του ιχθυαλεύρου από χερσαίες ζωικές πρωτεΐνες στην ενεργότητα των ενζύμων στην τσιπούρα είναι σπάνιες. Στο σημείο αυτό, αξίζει να αναφερθούν τα αποτελέσματα της μελέτης των Psafakis *et al.* (2020) όπου μελετήθηκε παράλληλα η επίδραση της αντικατάστασης της πρωτεΐνης του

ιχθυαλεύρου από πρωτεΐνη πτηναλεύρου κατά 50% στην ενεργότητα της θρυψίνης και της χυμοθρυψίνης στο έντερο και της πεψίνης στον στόμαχο των ιχθυδίων. Το γεγονός ότι δεν ανιχνεύθηκε καμία σημαντική επίδραση του περαλεύρου στις ενεργότητες των παραπάνω ενζύμων φανερώνει ότι η πεπτικότητα του περαλεύρου δεν ήταν ο κύριος παράγοντας που μείωσε την ανάπτυξη των ιχθυδίων. Οι Moutinho *et al.* (2017) ανέφεραν επίσης όμοιες ενεργότητες της θρυψίνης, της χυμοθρυψίνης και της πεψίνης σε τσιπούρες που σιτίστηκαν με υψηλά επίπεδα αντικατάστασης του ιχθυαλεύρου από οστεοκρεατάλευρο. Αντίθετα, σε παρόμοια μελέτη που είχε γίνει με τη χρήση του πτηναλεύρου (Karapanagiotidis *et al.* 2019) ανιχνεύθηκαν σημαντικές αυξήσεις της ενεργότητας της πεψίνης στον στόμαχο των ιχθυδίων τσιπούρας.

Αναφορικά με τη θρεπτική σύσταση ολόκληρου του σώματος και του μυϊκού ιστού των ιχθυδίων του μελετηθέντος είδους, η αντικατάσταση του ιχθυαλεύρου από περάλευρο δεν επέφερε σημαντικές διαφοροποιήσεις πέραν της ολικής αντικατάστασης (HFM100), όπου τα ιχθύδια είχαν μειωμένα επίπεδα λιπιδίων και ενέργειας και αυξημένα επίπεδα υγρασίας και πρωτεϊνών. Αυτό κυρίως οφείλεται στη χαμηλότερη πρόσληψη της τροφής των ιχθυδίων της ομάδας HFM100 και συνεπώς στη χαμηλότερη πρόσληψη ενέργειας για αποθήκευση ως λιπίδια στους ιστούς. Μία μειωμένη περιεκτικότητα λιπιδίων που σχετίζεται με τα πολύ υψηλά επίπεδα συμπερίληψης του περαλεύρου στο σιτηρέσιο, έχει επίσης παρατηρηθεί στα ιχθύδια του Ινδικού κοινού κυπρίνου (*Labeo rohita*) (Hasan *et al.* 1997) και στην Ιαπωνική χωματίδα (Kikuchi *et al.* 1994). Από την άλλη, το περάλευρο έχειδειχθεί ότι δεν επηρεάζει σημαντικά τη θρεπτική σύσταση σε άλλα είδη ιχθύων (Fowler 1990, Bureau *et al.* 2000, Fasakin *et al.* 2005, Li *et al.* 2009) ακόμη και όταν χορηγείται σε υψηλά επίπεδα (Campos *et al.* 2017).

Η ιστολογική εξέταση του ήπατος και του εντέρου των ιχθυδίων διερευνήθηκε για την αξιολόγηση της επίδρασης της μερικής και ολικής αντικατάστασης του ιχθυαλεύρου από

υδρολυμένο πετράλευρο στο μεταβολισμό και στη φυσιολογία θρέψης τους και είναι σημαντική για την κατανόηση πιθανών παθολογικών αλλοιώσεων και φυσιολογικών αντιδράσεων σε μια μη ισορροπημένη διαίτα. Πολύ λίγα είναι γνωστά για τις επιδράσεις των χερσαίων ζωικών πρωτεϊνών, και ιδιαίτερα του πετράλευρου, ως υποκατάστατων των ιχθυάλευρων στην ιστομορφολογία του ήπατος και του εντέρου των ιχθύων (Hartviksen *et al.* 2014, Yu *et al.* 2020).

Στην παρούσα μελέτη, η αντικατάσταση (από 25% έως και 100%) του ιχθυαλεύρου από πετράλευρο δεν προκάλεσε ιστολογικές αλλοιώσεις στο έντερο των ιχθυδίων τσιπούρας, χωρίς ενδείξεις υποσιτισμού ή φλεγμονών, όπως π.χ. εντερίτιδων. Σε όλα τα ιχθύδια υπήρχαν ευδιάκριτα εντεροκύτταρα, επιθηλιακά κενοτόπια (apical epithelial vacuoles) και βλεννοπαραγωγά κύτταρα (goblet cells) σε όλον τον ιστό. Τα βλεννοπαραγωγά κύτταρα ενισχύουν την υγεία και τη διατροφή των ιχθυδίων, καθώς η βλέννα που εκκρίνεται από αυτά δρα ως μέσο προστασίας του επιθηλίου, ενώ λιπαίνει επίσης τα άπεπτα μέρη της τροφής για προώθηση τους προς την έξοδο της έδρας (Deplancke & Gaskins 2001, Berillis & Mente 2017). Επιπλέον, τα επιθηλιακά κενοτόπια αποτελούν αναπόσπαστα δομικά συστατικά του εντέρου που είναι υπεύθυνα για την απορρόφηση των θρεπτικών ουσιών (Ferguson 2006).

Τα παρόντα ευρήματα υποδηλώνουν ότι το πετράλευρο πέπτει και απορροφάται φυσιολογικά, και στον ίδιο βαθμό όπως το ιχθυάλευρο, στο πρόσθιο έντερο των ιχθυδίων τσιπούρας, ακόμη και όταν η αντικατάσταση είναι σε υψηλά επίπεδα της τάξης του 50%. Δυστυχώς, τεχνικές δυσκολίες δεν επέτρεψαν την ιστολογική εξέταση του εντέρου των ιχθυδίων της ομάδας (HFM100) και έτσι η αξιολόγηση της επίδρασης της ολικής αντικατάστασης δεν ήταν εφικτή. Παρόμοια αποτελέσματα (μηδαμινή ιστολογική αλλοίωση του εντέρου) έχουν αναφερθεί και για το είδος *S. salar* που είχε σιτισθεί με υψηλά επίπεδα πετράλευρου αντικαθιστώντας το ιχθυάλευρο κατά 50% (Hartviksen *et al.* 2014). Ωστόσο, οι ίδιοι ερευνητές ανέφεραν παράλληλα και μειωμένο αριθμό βλεννοπαραγωγών κυττάρων και

αυξημένο αριθμό επιθηλιακών κενотоπίων. Επιπλέον, οι Yu *et al.* (2020) δουλεύοντας με το *Carassius auratus* (υβρίδιο Pengze) ανέφεραν μικρότερου μεγέθους λάχνες και εντεροκύτταρα και έναν λεπτότερο μυϊκό χιτώνα όταν το πετράλευρο αντικατέστησε περίπου το 30% της διαιτητικής πρωτεΐνης του ιχθυάλευρου.

Αναφορικά με την επίδραση του πετράλευρου στην ιστολογία του ήπατος των ιχθυδίων του μελετηθέντος είδους, τα αποτελέσματα έδειξαν ότι αυτό επιφέρει από καμία έως και κάποιες σημαντικές αλλοιώσεις, ανάλογα με το επίπεδο αντικατάστασης της πρωτεΐνης του ιχθυάλευρου. Η ιστομορφολογία του ήπατος δεν επηρεάστηκε όταν το πετράλευρο αντικατέστησε το ιχθυάλευρο κατά 25%. Ωστόσο, σε υψηλότερα επίπεδα αντικατάστασης παρατηρήθηκαν περισσότερα λιποσταγονίδια μεγάλου μεγέθους και μια αυξημένη ηπατική λιποεναπόθεση. Συγκριτικά, μάλιστα, με την επίδραση του πτηναλεύρου (1^ο και 2^ο διατροφικό πείραμα), αυτές οι αλλαγές ήταν περισσότερο εμφανείς στα ιχθύδια που σιτιστήκαν με τα αντίστοιχα επίπεδα αντικατάστασης από πτηνάλευρο. Τα υψηλά επίπεδα συμπερίληψης του πετράλευρου προκάλεσαν μέτριες έως πολύ πιο σοβαρές ηπατικές αλλοιώσεις σε σύγκριση με τα υψηλά επίπεδα συμπερίληψης του πτηναλεύρου. Παρόλο που δεν υπήρξαν ενδείξεις στεάτωσης, η οποία προκαλείται από την αυξημένη συσσώματωση των λιπιδίων, η ολική αντικατάσταση του ιχθυαλεύρου από πετράλευρο, σε αντίθεση με το πτηνάλευρο, οδήγησε σε αιμορραγίες, νέκρωση παγκρεατικών νησιδίων και κίρρωση ήπατος σε σημαντικό αριθμό ιχθυδίων που εξετάστηκαν. Η συμπληρωματική χορήγηση λυσίνης και μεθειονίνης στο σιτηρέσιο, φάνηκε να βοηθά την φυσιολογία πέψης, καθώς τα ψάρια που σιτίστηκαν με αυτά τα σιτηρέσια έδειξαν λιγότερες ηπατικές αλλοιώσεις και δυσμορφίες σε σύγκριση με εκείνα που σιτίστηκαν με σιτηρέσια παρόμοιου επιπέδου αντικατάστασης, αλλά χωρίς συμπλήρωση αμινοξέων.

Έχει υποστηριχθεί ότι μια συσσώρευση λιπιδίων στο ήπαρ συμβαίνει έπειτα από μια υπερβολική πρόσληψη λιπιδίων και ενέργειας από την τροφή που υπερβαίνει τη φυσιολογική

ικανότητα του ήπατος να τα β-οξειδώσει, οδηγώντας έτσι σε μεγαλύτερα σταγονίδια λιπιδίων και επακόλουθη στεάτωση (Spisni *et al.* 1998). Ωστόσο, στα δύο διατροφικά πειράματά μας με το πετράλευρο, η πρόσληψη λιπιδίων των ιχθυδίων που σιτίστηκαν με αυτό ήταν χαμηλότερη από εκείνη των ιχθυδίων που σιτίστηκαν με ιχθυάλευρο, το οποίο υποδηλώνει ότι ο τύπος του λίπους του σιτηρεσίου, και συγκεκριμένα το λίπος του πετράλευρου, και όχι η υπερβολική πρόσληψη λίπους, είναι ο κύριος παράγοντας που προκάλεσε τη συσσώρευση λιπιδίων στο ήπαρ των ιχθυδίων τσιπούρας. Θα μπορούσε πιθανολογικά να ειπωθεί ότι το λίπος του πετράλευρου δεν μεταβολίζεται/οξειδώνεται σε παρόμοιο βαθμό όπως του ιχθυαλεύρου.

Οι επιδράσεις του πετράλευρου ως υποκατάστατο του ιχθυαλεύρου στην ιστομορφολογία του ήπατος των ιχθυδίων δεν έχει μελετηθεί επαρκώς. Οι Hartviksen *et al.* (2014) ανέφεραν ότι μια ολική αντικατάσταση δεν έδειξε σημάδια στεάτωσης στο *S. salar*, με τα ηπατοκύτταρά τους μάλιστα να έχουν χαμηλότερη συσσώρευση λίπους σε σύγκριση με αυτά που σιτίστηκαν με ιχθυάλευρο. Μελέτες που χρησιμοποίησαν πετράλευρο σε μείγμα με άλλες χερσαίες ζωικές πρωτεΐνες, συμπεριλαμβανομένου του πτηναλεύρου, για την αντικατάσταση του ιχθυαλεύρου, έχουν αναφέρει ότι τα υψηλά επίπεδα αντικατάστασης προκαλούν ηπατική λιπιδωση και στεάτωση στο είδος *Lateolabrax japonicus* (Hu *et al.* 2013) και στο υβρίδιο *E. fuscoguttatus* ♀ × *E. lanceolatus* ♂ (Ye *et al.* 2019).

Στο σημείο αυτό, αξίζει να αναφερθούν και τα παράλληλα ευρήματα των μελετών Psoufakis *et al.* (2020) και Psoufakis *et al.* (2021), όπου μελετήθηκαν παράλληλα οι επιδράσεις των διαφόρων επιπέδων αντικατάστασης του ιχθυαλεύρου από υδρολυμένο πετράλευρο σε αιματολογικές παραμέτρους, στη διαφοροποίηση της έκφρασης του ηπατικού γονιδιώματος και στη διαφοροποίηση του εντερικού μικροβιώματος των ιχθυδίων τσιπούρας.

Τα αποτελέσματα της έρευνας (Psoufakis *et al.* 2020) έδειξαν ότι η υποκατάσταση έως και 50% του ιχθυαλεύρου από πετράλευρο δεν μετάβαλε καμία από τις αιματολογικές και

βιοχημικές παραμέτρους του αίματος που εξετάστηκαν, συμπεριλαμβανομένων του αιματοκρίτη, του αριθμού των ερυθρών αιμοσφαιρίων, των λευκών αιμοσφαιρίων, των λεμφοκυττάρων, των μονοκυττάρων και των κοκκιοκυττάρων, καθώς και των συγκεντρώσεων της γλυκόζης, της χοληστερόλης και των τριγλυκεριδίων, υποδεικνύοντας έτσι μια φυσιολογική αιματολογική κατάσταση για τα νεαρά ιχθύδια της τσιπούρας. Παρόμοια μηδαμινή επίδραση στο αιματολογικό προφίλ παρατηρήθηκε και με τη χρήση του πτηναλεύρου στο σιτηρέσιο των ιχθυδίων τσιπούρας (Karapanagiotidis *et al.* 2019). Ο Steffens (1994), επίσης δεν παρατήρησε κάποια σημαντική αλλαγή στον αιματοκρίτη και στον αριθμό των ερυθρών αιμοσφαιρίων της ιριδίζουσας πέστροφας, που σιτίστηκε με ένα μείγμα περαλεύρου και πτηναλεύρου αντικαθιστώντας πλήρως το ιχθυάλευρο του σιτηρεσίου. Αντίθετα, οι Kikuchi *et al.* (1994) ανέφεραν μια ασήμαντη επίδραση του περαλεύρου στον αριθμό των ερυθρών αιμοσφαιρίων και των συγκεντρώσεων των τριγλυκεριδίων και της γλυκόζης στην Ιαπωνική χωματίδα (*Paralichthys olivaceus*), αλλά ο αιματοκρίτης έτεινε να μειώνεται καθώς αυξάνονταν το ποσοστό ένταξης του περαλεύρου στο σιτηρέσιο. Από την άλλη, οι Hartviksen *et al.* (2014) παρατήρησαν αυξημένα επίπεδα γλυκόζης και μειωμένα επίπεδα χοληστερόλης στον σολομό του Ατλαντικού (*S. salar*) που σιτίστηκε με σιτηρέσια όπου το ιχθυάλευρο είχε υποκατασταθεί κατά 20% από περάλευρο.

Όπως έχει προαναφερθεί, διατροφικοί παράγοντες, όπως ο τύπος της πρωτεΐνης του σιτηρεσίου και πιθανές ελλείψεις στα απαραίτητα αμινοξέα, ενδέχεται να επηρεάσουν τη ρύθμιση της αυξητικής ορμόνης (growth hormone, GH) και του ινσουλινοειδούς αυξητικού παράγοντα (Insulin-like Growth Factor, IGF) με αποτέλεσμα μια μειωμένη πρόσληψη τροφής, ανάπτυξη και κατακράτηση θρεπτικών συστατικών στους ιχθύες (Gómez-Requeni *et al.* 2004). Στην έρευνα των Psoufakis *et al.* (2020) δείχθηκε ότι η υψηλή ένταξη του περαλεύρου στο σιτηρέσιο (50% αντικατάσταση ιχθυαλεύρου, HFM50) μείωσε τη γονιδιακή έκφραση του άξονα GH-IGF και των γονιδίων του, όπως των Growth Hormone Receptor-1

(GHR-1), Insulin-like Growth Factor-1 (IGF-1), Insulin like Growth Factor Binding Protein-4 (IGFBP-4) και chicken telomerase RNA gene-1(CHTR-1). Αυτά τα αποτελέσματα θα μπορούσαν επίσης να εξηγήσουν τη χαμηλότερη αποδοτικότητα τροφής και το χαμηλότερο σωματικό βάρος των ιχθυδίων που σιτίστηκαν με πετράλευρο (HFM50) συγκριτικά με αυτά του μάρτυρα (FM), καθώς αυτά τα γονίδια είναι υπεύθυνα για το μεταβολισμό των θρεπτικών συστατικών και την ανάπτυξη των ιχθύων (Kumar *et al.* 2017).

Έχει προταθεί ότι η μειωμένη ηπατική έκφραση των γονιδίων του άξονα GH/IGF στα ιχθύδια τσιπούρας συνδέεται με διατροφικές ανεπάρκειες σε απαραίτητα αμινοξέα που προκύπτουν από την αντικατάσταση του ιχθυαλεύρου από φυτικές (Gómez-Requeni *et al.* 2004) και χερσαίες ζωικές πρωτεΐνες (Karapanagiotidis *et al.* 2019). Η αρνητική επίδραση των χερσαίων ζωικών πρωτεϊνών στα γονίδια που κωδικοποιούν τον άξονα GH/IGF έχει επίσης παρατηρηθεί σε άλλα είδη ψαριών, όπως το *T. tinca* (Kumar *et al.* 2017) και το *S. salar* (Hatlen *et al.* 2015), αν και στο τελευταίο δεν παρατηρήθηκε μειωμένη ανάπτυξη των ιχθύων. Περαιτέρω, η αντικατάσταση της πρωτεΐνης του ιχθυαλεύρου από πρωτεΐνη πετράλευρου οδήγησε σε μειωμένη γονιδιακή έκφραση του γονιδίου της καθεψίνης D (catD) στο ήπαρ των ιχθυδίων τσιπούρας, υποδηλώνοντας μια διαφοροποίηση στη ρύθμιση του μεταβολισμού των πρωτεϊνών. Αυτό το αποτέλεσμα, με τη σειρά του, θα μπορούσε να εξηγήσει τη μειωμένη κατακράτηση πρωτεΐνης που παρατηρήθηκε στα ιχθύδια HFM50 σε σύγκριση με εκείνα της ομάδας του μάρτυρα (FM). Μειωμένη γονιδιακή έκφραση της catD διαπιστώθηκε επίσης και στη χρήση του πτηναλεύρου στο σιτηρέσιο των ιχθυδίων τσιπούρας (Karapanagiotidis *et al.* 2019).

Παράλληλα, δείγματα του μέσου τμήματος του εντέρου των ιχθυδίων του 3^{ου} διατροφικού πειράματος αναλύθηκαν, προκειμένου να μελετηθούν οι μεταβολικές επιδράσεις της αντικατάστασης του ιχθυαλεύρου από υδρολυμένο πετράλευρο στη μικροβιακή κοινότητα (μικροβίωμα) του εντέρου (Psafakis *et al.* 2021). Όπως προαναφέρθηκε, μια

αλλαγή της πρωτεϊνικής πηγής στο σιτηρέσιο των ιχθυδίων επιφέρει αλλαγές στο εντερικό τους μικροβίωμα επηρεάζοντας την ανάπτυξη τους και τη λειτουργία του ανοσοποιητικού τους συστήματος (Ray *et al.* 2012, Wu *et al.* 2015). Στη μελέτη των Psoufakis *et al.* (2021), βρέθηκε ότι η σύνθεση του εντερικού μικροβιώματος των ιχθυδίων τσιπούρας που είχαν διατραφεί είτε με ιχθυάλευρο είτε με πετράλευρο ήταν παρόμοιοι και χαρακτηρίζονταν από συνήθεις ομάδες μικροοργανισμών του εντέρου τους (Gajardo *et al.* 2017), όπως των γενών *Pseudomonas*, *Cutibacterium*, *Staphylococcus* και *Delftia*. Τα πρωτεοβακτήρια και τα ακτινοβακτήρια ήταν οι κυρίαρχες ομάδες μικροοργανισμών σε όλα τα ιχθύδια, αλλά σε επίπεδο ειδών μικροοργανισμών υπήρξαν αρκετές διαφοροποιήσεις μεταξύ των ιχθυδίων, ανεξαρτήτως αν είχαν διατραφεί με ιχθυάλευρο ή με πετράλευρο. Αυτή η μη ξεκάθαρη εικόνα αλλαγής του εντερικού μικροβιώματος υποδεικνύει ότι η ατομικότητα των ιχθυδίων είχε μεγαλύτερη επίδραση από την ίδια την τροφή. Αξίζει να αναφερθεί, επίσης, ότι στα ιχθύδια που σιτίστηκαν με πετράλευρο παρατηρήθηκε ιδιαίτερη κυριαρχία των ακτινοβακτηρίων που θα μπορούσε να σχετίζεται με τις αντιμικροβιακές τους λειτουργίες που προστατεύουν τον ξενιστή, όπως έχει προταθεί σε άλλες μελέτες (Abd El-Rhman *et al.* 2009; Akayli *et al.* 2016). Επιπλέον, η ανίχνευση διαφόρων ειδών σφιγγομονάδων στα ιχθύδια τσιπούρας που σιτίστηκαν με πετράλευρο εξηγούν το μειωμένο ρυθμό ανάπτυξης αυτής της διατροφικής ομάδας σε σύγκριση με τον μάρτυρα, μιας και η παρουσία τους έχει σχετιστεί αρνητικά με την ανάπτυξη του ξενιστή (Dvergedal *et al.* 2020).

Όπως προαναφέρθηκε, η επιστημονική γνώση για την επίδραση της αντικατάστασης του ιχθυαλεύρου της τροφής από πετράλευρο και άλλες ΜΖΠ μη μηρυκαστικών στο εντερικό μικροβίωμα των ιχθύων είναι εξαιρετικά αμυδρή. Οι Hartviksen *et al.* (2014) έδειξαν ότι η αντικατάσταση του ιχθυαλεύρου της τροφής από πετράλευρο αύξησε τους αριθμούς των ολικών αυτόχθονων και αλλόχθονων μικροοργανισμών του πρόσθιου τμήματος του εντέρου, αλλά όχι εκείνους του οπίσθιου τμήματος του εντέρου στο είδος *S. salar*. Οι ίδιοι συγγραφείς

ανακοίνωσαν ότι η προσθήκη του περαλεύρου στην τροφή αύξησε σημαντικά την παρουσία συγκεκριμένων γενών όπως των *Corynebacteriaceae*, *Lactobacillaceae*, *Streptococcaceae*, *Pseudomonadaceae*, *Xanthomonadaceae* και μείωσε την παρουσία των *Vibrionaceae*. Ασφαλώς, χρειάζεται καλύτερη κατανόηση των λειτουργικών ρόλων των διαφόρων ομάδων, γενών και ειδών των μικροοργανισμών του εντέρου των ιχθύων και σε ποιο βαθμό αυτές οι κοινότητες επηρεάζονται από τη χρήση των χερσαίων ζωικών πρωτεϊνών στο σιτηρέσιο.

Σχετικά με την οικονομικότητα του σιτηρεσίου, το κόστος του σιτηρεσίου και επομένως το κόστος της διατροφής των ιχθύων αντιπροσωπεύει τη σημαντικότερη δαπάνη στην παραγωγική διαδικασία μιας ιχθυοκαλλιέργειας. Είναι αποδεδειγμένο ότι οποιαδήποτε μείωση του κόστους ωφελεί την κερδοφορία της παραγωγής. Η συμπερίληψη του περαλεύρου στο σιτηρέσιο μείωσε το κόστος του από 12% (HFM25+) έως και 50% (HFM100) σε σύγκριση με το κόστος του σιτηρεσίου του μάρτυρα (FM). Με εξαίρεση το σιτηρέσιο HFM100, η συμπερίληψη του περαλεύρου στο σιτηρέσιο βελτίωσε τον οικονομικό συντελεστή μετατρεψιμότητας της τροφής (ECR). Ένα μειωμένο κόστος σιτηρεσίου και βελτιωμένες τιμές ECR στην τσιπούρα έχουν επίσης αναφερθεί από τους Nogueira *et al.* (2012) χρησιμοποιώντας χαμηλά επίπεδα περαλεύρου σε μίγμα με αιματάλευρο αντικαθιστώντας το ιχθυάλευρο, ενώ παρόμοια ευρήματα έχουν αναφερθεί σε άλλα είδη που χρησιμοποίησαν χαμηλά επίπεδα χορήγησης περαλεύρου (Arunlertaree & Rakyuttithamkul 2006).

4.5 Συμπεράσματα

Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης έδειξαν ότι η αντικατάσταση της πρωτεΐνης του ιχθυαλεύρου της τροφής από περάλευρο έως και 25%, με ή χωρίς προσθήκη λυσίνης και μεθειονίνης, είναι επιτυχής για τα νεαρά άτομα της τσιπούρας, χωρίς να μειώνεται σημαντικά η αποτελεσματικότητα της τροφής, οι αναπτυξιακές αποδόσεις, η θρεπτική σύσταση και η ιστομορφολογία του εντέρου και του ήπατος των

ιχθύων. Σε υψηλότερα επίπεδα αντικατάστασης, το φτωχότερο προφίλ αμινοξέων του πετράλευρου και η χαμηλότερη μεταβολική αποτελεσματικότητά του είναι οι κυριότεροι παράγοντες που μειώνουν την απόδοση των ψαριών. Επί του πρακτέου, τα ερευνητικά αποτελέσματα προτείνουν ότι για τις τροφές ιχθυδίων τσιπούρας, μέσου βάρους 3-40 g, μπορεί να χρησιμοποιηθεί υδρολυμένο πετράλευρο σε ένα επίπεδο ένταξης στο σιτηρέσιο της τάξης του 10,8% (Πιν. 4,8), χωρίς να επιφέρει μειωμένη παραγωγική απόδοση, δεδομένου ότι το επίπεδο χορήγησης του ιχθυαλεύρου στην τροφή του μάρτυρα ήταν 58% και η πρωτεϊνική περιεκτικότητα του ήταν 64%.

Συμπερασματικά, η χαμηλή υποκατάσταση της πρωτεΐνης του ιχθυαλεύρου στο σιτηρέσιο των ιχθυδίων της τσιπούρας μέχρι και 25% από υδρολυμένο πετράλευρο (HFM) δεν επιφέρει αλλοιώσεις στο έντερο και στο ήπαρ τους. Αντίθετα, η υψηλότερη αντικατάσταση της τάξης του 50%, ακόμα και με χορήγηση λυσίνης και μεθειονίνης, επιφέρει κάποιες ήπιες αλλοιώσεις στη μορφολογία του ήπατος, αλλά όχι σε εκείνη του εντέρου. Η δε ολική αντικατάσταση του ιχθυαλεύρου από υδρολυμένο πετράλευρο επιφέρει σημαντικές αρνητικές αλλοιώσεις του ήπατος που οδηγούν σε φαινόμενα εκφυλίσεων.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Αντικατάσταση του ιχθυαλεύρου από άλευρο χοίρων στο σιτηρέσιο των ιχθυδίων της τσιπούρας (*Sparus aurata*)

5.1 Εισαγωγή

Μέχρι σήμερα, οι γνώσεις μας για την καταλληλότητα του χοιραλεύρου στη διατροφή της τσιπούρας είναι ελλιπείς. Σκοπός της παρούσας έρευνας ήταν η διερεύνηση των επιδράσεων της αντικατάστασης της πρωτεΐνης του ιχθυαλεύρου από πρωτεΐνη χοιραλεύρου στην ανάπτυξη της τσιπούρας και την αξιοποίηση της τροφής από αυτήν. Προκειμένου να διερευνηθούν αυτές οι επιδράσεις πραγματοποιήθηκε ένα διατροφικό πείραμα (5^ο διατροφικό πείραμα), όπου η πρωτεΐνη του ιχθυαλεύρου αντικαταστάθηκε από πρωτεΐνη χοιραλεύρου κατά 25%, 35% και 45%, (τροφές POM25, POM35 και POM45) χωρίς ή με συμπληρωματική προσθήκη λυσίνης (τροφές POM25+, POM35+ και POM45+), η οποία αποτέλεσε το οριακό αμινοξύ. Για τις ανάγκες της παρούσας έρευνας, το άλευρο χοίρων που χρησιμοποιήθηκε (Πίν. 2.1) προήλθε από την εταιρεία SONAC - Darling Ingredients International (Belgium, The Netherlands, Denmark), το οποίο παρασκευάστηκε σύμφωνα με τις Ευρωπαϊκές Οδηγίες EC 1069/2009 και EC 142/2011 (method 7). Είναι κατάλληλο για χορήγηση σε ιχθυοτροφές και απόλυτα συμβατό με την Οδηγία EC 56/2013.

5.2 5ο διατροφικό πείραμα – αντικατάσταση ιχθυαλεύρου από άλευρο χοίρων

5.2.1 Πειραματικά σιτηρέσια και συνθήκες εκτροφής

Συνολικά, καταρτίστηκαν επτά ισοαζωτούχα (52% της τροφής) και ισοενεργειακά (21 MJ/Kg της τροφής) σιτηρέσια (Πίν. 5.1). Η τροφή μάρτυρας (FM) περιείχε αποκλειστικά ιχθυάλευρο ως πηγή ζωικής πρωτεΐνης. Για την αντικατάσταση του ιχθυαλεύρου στις λοιπές πειραματικές τροφές χρησιμοποιήθηκε άλευρο χοίρων (POM, ολικών πρωτεϊνών 62%). Στις υπό εξέταση τροφές, η πρωτεΐνη του ιχθυαλεύρου αντικαταστάθηκε από πρωτεΐνη

χοιραλεύρου κατά 25% (POM25), 35% (POM35) και 45% (POM45). Επίσης, σε άλλες τρεις πειραματικές τροφές η πρωτεΐνη του ιχθυαλεύρου υποκαταστάθηκε από πρωτεΐνη χοιραλεύρου κατά 25%, 35% και 45% με παράλληλη προσθήκη λυσίνης (POM25+, POM35+, POM45+, αντίστοιχα) σε ποσοστά ένταξης στο σιτηρέσιο τέτοια που εκτιμήθηκαν ότι εξισορροπούν τη μείωση της λυσίνης που επέρχεται λόγω της αντικατάστασης του ιχθυαλεύρου.

Ως βασική πρωτεϊνική πηγή ζωικής προέλευσης χρησιμοποιήθηκε υψηλής ποιότητας ιχθυάλευρο (ολικών πρωτεϊνών 66%). Στα σιτηρέσια, επίσης χρησιμοποιήθηκε γλουτένη καλαμποκιού ως πρωτεϊνική πηγή φυτικής προέλευσης και πηγή υδατανθράκων σύμφωνα με τα μέσα επίπεδα χορήγησης φυτικών πρωτεϊνών σε εμπορικές τροφές της τσιπούρας σήμερα. Το άλευρο σίτου χρησιμοποιήθηκε ως ενεργειακή πηγή, ως ενεργειακό αντιστάθμισμα των ισοενεργειακών σιτηρεσίων και ως ενισχυτικό της συνεκτικότητας του συμπέκτου. Το ιχθυέλαιο χρησιμοποιήθηκε ως κύρια πηγή λίπους και ενέργειας και ταυτόχρονα για την ικανοποίηση των διαιτητικών απαιτήσεων των ιχθυδίων τσιπούρας σε ω₃ πολυακόρεστα λιπαρά οξέα. Επιπρόσθετα οι υδατάνθρακες σε σχέση με το λίπος αντισταθμίστηκαν έτσι ώστε να ισοσκελιστεί η ολική ενέργεια των τροφών. Μικροσυστατικά που χρησιμοποιήθηκαν ως εμπλουτιστικά των τροφών και διατηρήθηκαν σε σταθερές ποσότητες στα διαφορετικά σιτηρέσια ήταν ένα εμπορικό πρόμιγμα βιταμινών και ανόργανων στοιχείων (για τσιπούρα και λαβράκι) με συμμετοχή 0,4%, καθώς και οι βιταμίνες E και C σε ποσοστό 0,1%.

Πίνακας 5.1. Συστατικά και θρεπτική σύσταση (% επί της νωπής ουσίας) των πειραματικών σιτηρεσίων που χρησιμοποιήθηκαν για την αντικατάσταση του ιχθυαλεύρου από χοιράλευρο (5^ο διατροφικό πείραμα).

5 ^ο διατροφικό πείραμα							
Συστατικά (%)	FM	POM25	POM25+	POM35	POM35+	POM45	POM45+
Ιχθυάλευρο	59,00	44,25	44,25	38,35	38,35	32,45	32,45
Χοιράλευρο	0,00	15,55	15,55	21,80	21,80	28,00	28,00
Γλουτ. καλαμπ.	19,00	18,95	18,50	18,40	17,80	18,70	17,80
Αλεύρι σίτου	9,70	11,70	11,75	13,00	13,00	13,30	13,45
Ιχθυέλαιο	11,00	8,55	8,55	7,45	7,45	6,55	6,60
Βιτ.&αν.στ.	0,40	0,40	0,40	0,30	0,30	0,40	0,40
MCP	0,40	0,40	0,40	0,30	0,30	0,40	0,40
Λυσίνη	0,00	0,00	0,40	0,00	0,60	0,00	0,75
Βιταμίνη E	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10
Βιταμίνη C	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10
Θρεπτική σύσταση (%)							
Υγρασία	8,19	7,70	7,95	8,29	8,32	8,16	8,36
Πρωτεΐνη	51,51	51,51	51,42	51,22	51,42	51,48	51,82
Λίπος	15,64	13,87	13,54	13,14	12,68	11,11	10,59
Υδατάνθρακες ¹	14,57	17,85	18,15	18,80	18,96	19,33	19,48
Τέφρα	10,08	9,08	8,94	8,55	8,62	9,91	9,75
Ενέργεια (KJ/g)	21,47	21,09	21,23	20,93	21,11	21,38	21,17

¹ Το ποσοστό των υδατανθράκων εκτιμήθηκε με αφαίρεση από το 100 του συνόλου των ποσοστών πρωτεΐνης, λιπιδίων και τέφρας. Τα περισσότερα συστατικά (εκτός του αλεύρου σίτου) ήταν μια ευγενική χορηγία της εταιρίας BioMar Hellenic ABEEI.

Πρώτες ύλες: Ιχθυάλευρο (Sardine fishmeal, Köster Marine Proteins GmbH, Hamburg, Germany), χοιράλευρο (Sonac, Son, The Netherlands), γλουτένη καλαμποκιού (Glutalys®, Roquette Italia S.p.A, Cassano Spinola, Italy), σιτάρι (τοπική αγορά), ιχθυέλαιο (Tuna oil, Inproquisa SA, Madrid, Spain), MCP (Astron Chemicals SA, Attica, Greece), βιταμίνες E και C (DSM Nutritional Products Hellas LTD, Athens, Greece), λυσίνη (Ajinomoto Eurolysine S.A.S., Paris, France). Πρόμικτο βιταμινών και ανοργάνων στοιχείων (kg-1 μίγματος): Vitamins: E, 58.3 g; K3, 3.3 g; B1, 3.3 g; B2, 6.6 g; B6, 3.3 mg; B12, 10 mg; Folic acid, 3.3 g; Biotin, 100 mg; C, 33.3 g; Nicotinic acid, 16.6 g; Pantothenic acid, 13.3 g. Minerals: Co, 170 mg; I, 248 mg (Ca(IO3)2); Mn, 10 g (MnO); Zn, 33 g (ZnO); Ca 235 g; Se 2,5 mg (Na2SeO3); Na 247,5 mg (Na2SeO3).

Πίνακας 5.2. Εκτιμήσεις του προφίλ αμινοξέων (% της τροφής) των πειραματικών σιτηρεσίων.

5^ο διατροφικό πείραμα							
Αμινοξέα	FM	POM25	POM25+	POM35	POM35+	POM45	POM45+
<u><i>Απαραίτητα αμινοξέα</i></u>							
Αργινίνη	3,14	3,16	3,15	3,17	3,16	3,18	3,17
Ιστιδίνη	1,75	1,58	1,57	1,51	1,50	1,44	1,43
Ισολευκίνη	2,50	2,31	2,30	2,23	2,21	2,15	2,13
Λευκίνη	5,43	5,16	5,12	5,05	4,98	4,95	4,86
Λυσίνη	4,22	3,82	4,21	3,66	4,25	3,49	4,23
Μεθειονίνη	1,42	1,31	1,30	1,28	1,27	1,26	1,25
Φαινυλαλανίνη	2,62	2,50	2,48	2,45	2,42	2,40	2,37
Θρεονίνη	3,04	2,73	2,72	2,61	2,59	2,49	2,47
Τρυπτοφάνη	0,46	0,36	0,36	0,34	0,34	0,31	0,31
Βαλίνη	2,95	2,78	2,77	2,71	2,69	2,64	2,62
<u><i>Μη απαραίτητα αμινοξέα</i></u>							
Αλανίνη	4,15	4,24	4,22	4,28	4,25	4,32	4,28
Ασπαρτικό οξύ	0,78	1,60	1,59	1,93	1,90	2,26	2,23
Κυστίνη	0,54	0,54	0,53	0,54	0,53	0,53	0,52
Γλουτ. οξύ	2,70	4,10	4,05	4,67	4,58	5,23	5,12
Γλυκίνη	0,36	2,05	2,05	2,73	2,72	3,41	3,39
Προλίνη	1,14	1,13	1,11	1,13	1,09	1,13	1,08
Σερίνη	0,66	1,01	0,99	1,15	1,12	1,29	1,26
Τυροσίνη	1,72	2,07	2,05	2,21	2,19	2,35	2,32

Στον Πίνακα 5.2 δίνεται η εκτίμηση του προφίλ των απαραίτητων αμινοξέων των επτά σιτηρεσίων βάσει των εγνωσμένων περιεκτικοτήτων σε αμινοξέα κάθε πρώτης ύλης (feedipedia.org) και το ποσοστό ένταξης αυτής στο σιτηρέσιο. Για το 5^ο διατροφικό πείραμα, χρησιμοποιήθηκαν συνολικά 630 ιχθύδια τσιπούρας μέσου σωματικού βάρους $2,27 \pm 0,20$ g, μέσου ολικού μήκους $6,0 \pm 0,2$ cm και τοποθετήθηκαν σε 21 γυάλινα ενυδρεία. Τα ιχθύδια

αφέθηκαν να εγκλιματιστούν στις ελεγχόμενες συνθήκες του σταθμού για 10 ημέρες σιτιζόμενα με το σιτηρέσιο FM, έως την έναρξη χορήγησης των πειραματικών σιτηρεσίων. Οι φυσικοχημικές παράμετροι του νερού των ενυδρείων παρακολουθήθηκαν καθόλη τη διάρκεια του πειράματος με τη χρήση φορητών ηλεκτρονικών οργάνων και χρωματομετρικών τεστ, όπως περιγράφηκαν στα Υλικά και Μέθοδοι. Πριν την έναρξη του διατροφικού πειράματος, τα ιχθύδια διαχωρίστηκαν τυχαία σε συνολικά επτά διατροφικές ομάδες με τριπλή επαναληψιμότητα (30 ιχθύδια/ενυδρείο, 3 ενυδρεία/διατροφική ομάδα) με την κάθε μία να διατρέφεται με διαφορετικό σιτηρέσιο. Συγκεκριμένα, η ομάδα ιχθυδίων FM σιτίστηκαν με την τροφή που περιείχε αποκλειστικά ιχθυάλευρο ως πηγή ζωικής πρωτεΐνης και θεωρήθηκε η ομάδα μάρτυρας, ενώ οι υπόλοιπες δύο ομάδες ιχθύων σιτίστηκαν με ένα εκ των POM25, POM25+, POM35, POM35+, POM45 και POM45+ σιτηρεσίων. Η σίτιση των ιχθυδίων πραγματοποιήθηκε καθημερινά με το χέρι, μέχρι φαινόμενο κορεσμό (*ad libitum*), δύο φορές την ημέρα (10:00 και 16:00). Ιδιαίτερη προσοχή δόθηκε ώστε να διασφαλιστεί ότι όλη η καθημερινά χορηγούμενη ποσότητα τροφής καταναλώθηκε από τα ιχθύδια. Καθημερινά ελάμβανε χώρα καταγραφή των θνησιμοτήτων. Η συνολική διάρκεια του διατροφικού πειράματος ήταν 90 ημέρες.

5.2.2. Αποτελέσματα

5.2.2.1 Παράμετροι ανάπτυξης των ιχθυδίων και αξιοποίησης τροφής

Τα αποτελέσματα της ανάπτυξης των ιχθυδίων του 5^{ου} διατροφικού πειράματος με την αντικατάσταση του ιχθυαλεύρου από χοιράλευρο (POM) στο σιτηρέσιο των ιχθυδίων τσιπούρας παρουσιάζονται στον Πίνακα 5.3 (30 ημέρες εκτροφής), Πίνακα 5.4 (60 ημέρες εκτροφής) και Πίνακα 5.5 (ολοκλήρωση πειραματισμού έπειτα από 90 ημέρες εκτροφής) (Παράρτημα – διάγραμμα 5.1).

Στο τέλος του 5^{ου} διατροφικού πειράματος (Πιν. 5.5), η επιβίωση των ψαριών ήταν σχετικά υψηλή (>83%) και παρόμοια μεταξύ των ομάδων ($P>0,05$). Οι ομάδες ιχθυδίων που σιτίστηκαν με υψηλότερα επίπεδα χοιραλεύρου στο σιτηρέσιό τους (POM35, POM35+, POM45, POM45+) επέδειξαν μια αυξημένη πρόσληψη τροφής και αυτή η τάση παρατηρήθηκε ακόμα και από τις πρώτες 30 ημέρες του πειράματος (Πιν. 5.3 και 5.4). Ωστόσο, με την ολοκλήρωση της πειραματικής διαδικασίας στις 90 ημέρες εκτροφής, η πρόσληψη τροφής (g/ψάρι) ήταν παρόμοια ($P>0,05$) μεταξύ όλων των ομάδων (Πιν. 5.5). Αξίζει να σημειωθεί πως όταν τα δεδομένα της πρόσληψης τροφής αναχθούν στην μονάδα % σ.β./ημέρα, όπου συνυπολογίζεται το σωματικό βάρος των ιχθυδίων, τότε φαίνεται μια περισσότερο ξεκάθαρη τάση αυξημένης πρόσληψης τροφής, αν και πάλι μη σημαντική ($P>0,05$) με την αύξηση του επιπέδου χορήγησης του POM στο σιτηρέσιο.

Στο τέλος του πειράματος, το τελικό σωματικό βάρος, η αύξηση βάρους και ο ειδικός ρυθμός ανάπτυξης (SGR) των ιχθυδίων ήταν παρόμοιοι ($P>0,05$) μεταξύ των διατροφικών ομάδων (Πιν. 5.5), και αυτό ίσχυε τόσο κατά την 30^η (Πιν. 5.3), όσο και κατά την 60^η ημέρα σίτισης (Πιν. 5.4). Αξίζει, ωστόσο, να επισημανθεί πως οι χαμηλότερες τιμές των παραπάνω δεικτών ανιχνεύθηκαν στις ομάδες POM45 και POM45+. Ο συντελεστής μετατρεψιμότητας της τροφής (FCR) ήταν σημαντικά ($P<0,05$) χαμηλότερος στις ομάδες FM και POM25 συγκριτικά με την ομάδα POM45+ (Πιν. 5.5), ενώ στις ομάδες POM25+, POM35, POM35+ και POM45 οι τιμές του FCR δεν διαφοροποιήθηκαν σημαντικά ούτε ως προς την τιμή του μάρτυρα (FM) ούτε ως προς την τιμή των POM45+ ιχθυδίων. Αυτή η τάση ήταν εμφανής ήδη από τις 30 ημέρες του πειράματος (Πιν. 5.3 και 5.4). Περαιτέρω, οι ομάδες FM και POM25 είχαν σημαντικά ($P<0,05$) υψηλότερο συντελεστή αποδοτικότητας πρωτεϊνών (PER) συγκριτικά με την ομάδα POM45+ (Πιν. 5.5), και παρατηρήθηκε μια τάση μείωσης του PER με την αύξηση του επιπέδου χορήγησης του POM στο σιτηρέσιο. Παρόμοια αποτελέσματα

αναφορικά με τον συντελεστή PER παρατηρήθηκαν τόσο στις 30 ημέρες (Πιν. 5.3) όσο και στις 60 ημέρες (Πιν. 5.4) του πειράματος.

Ο συντελεστής κατακράτησης της πρωτεΐνης δεν διέφερε σημαντικά ($P>0,05$) μεταξύ των επτά διατροφικών ομάδων, αν και οι χαμηλότερες τιμές παρατηρήθηκαν στις ομάδες POM45 και POM45+. Αντίθετα, ο συντελεστής κατακράτησης των λιπών αυξανόταν με την αύξηση του επιπέδου χορήγησης του POM στο σιτηρέσιο, με αποτέλεσμα να είναι σημαντικά αυξημένος στις ομάδες POM45 και POM45+, συγκριτικά με τον μάρτυρα (FM). Αναφορικά με τους σωματομετρικούς δείκτες, τα ιχθύδια όλων των διατροφικών ομάδων είχαν παρόμοιο ($P>0,05$) δείκτη ευρωστίας (K). Ο ηπατοσωματικός δείκτης (HSI), επίσης ήταν παρόμοιος μεταξύ των ομάδων, αν και υψηλότερες τιμές βρέθηκαν στις ομάδες POM45 και POM45+. Περαιτέρω, τα ιχθύδια των ομάδων POM35+ και POM45+ παρουσίασαν τον χαμηλότερο ($P<0,05$) ενδοσπλαχνικό δείκτη σε σχέση με αυτά των ομάδων POM25 και FM που είχαν τις υψηλότερες τιμές (Παράρτημα – διαγράμματα 5.2, 5.3, 5.4, 5.5, 5.6, 5.7).

5.2.2.2 Θρεπτική σύσταση των ιχθυδίων

Στον Πίνακα 5.6 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της θρεπτικής σύστασης ολόκληρου του σώματος και του μυϊκού ιστού των ιχθυδίων τσιπούρας του 5^{ου} διατροφικού πειράματος αντικατάστασης του ιχθυαλεύρου από χοιράλευρο. Γενικά, η θρεπτική σύσταση τόσο του ολικού σώματος όσο και του μυϊκού ιστού τους στο 5^ο διατροφικό πείραμα ήταν παρόμοια ($P>0,05$) μεταξύ των διαφορετικών διατροφικών ομάδων, εκτός της τέφρας του σώματος που ήταν σημαντικά ($P<0,05$) αυξημένη και της υγρασίας του σώματος που ήταν σημαντικά ($P<0,05$) μειωμένη στις ομάδες POM 35+, POM45 και POM45+ συγκριτικά με των άλλων ομάδων.

Πίνακας 5.3. Παράμετροι ανάπτυξης ιχθυδίων τσιπούρας (*S. aurata*) διατρεφόμενοι με ιχθυοτροφές που χρησιμοποιήθηκαν για την αντικατάσταση του ιχθυαλεύρου από χοιράλευρο (5^ο διατροφικό πείραμα), έπειτα από **30 ημέρες** εκτροφής

Παράμετροι / Διατροφικές ομάδες	FM	POM25	POM25+	POM35	POM35+	POM45	POM45+
Επιβίωση (%)	94,4±5,1	94,8±5,1	97,8±1,9	95,6±3,8	97,8±1,9	95,6±5,1	91,1±1,9
Πρόσληψη τροφής (g/ψάρι)	5,96±0,10 ^{ab}	5,77±0,21 ^a	5,87±0,25 ^{ab}	6,71±0,13 ^c	6,58±0,32 ^c	6,34±0,13 ^{abc}	6,47±0,31 ^{bc}
Αρχικό βάρος (g/ψάρι)	2,27±0,00	2,27±0,00	2,27±0,00	2,27±0,00	2,27±0,00	2,27±0,00	2,27±0,00
Τελικό βάρος (g/ψάρι)	7,14±0,18	6,89±0,06	7,04±0,38	7,23±0,04	7,14±0,42	6,86±0,03	6,67±0,35
SGR (%/ημέρα)	2,39±0,11	2,22±0,04	2,31±0,25	2,44±0,03	2,38±0,27	2,20±0,02	2,06±0,25
FCR	1,22±0,06 ^a	1,35±0,03 ^a	1,23±0,06 ^a	1,35±0,04 ^{ab}	1,35±0,05 ^{ab}	1,38±0,03 ^{ab}	1,48±0,14 ^b
PER	1,59±0,08 ^a	1,55±0,04 ^a	1,58±0,08 ^a	1,44±0,04 ^{ab}	1,44±0,05 ^{ab}	1,41±0,03 ^{ab}	1,31±0,12 ^b

Οι τιμές αντιπροσωπεύουν μέσους όρους ± τυπική απόκλιση (n=3). Οι τιμές που δεν αντιπροσωπεύονται από τον ίδιο εκθέτη δείχνουν στατιστικώς σημαντική διαφορά (P<0,05) μεταξύ των διατροφικών ομάδων.

Πίνακας 5.4. Παράμετροι ανάπτυξης ιχθυδίων τσιπούρας (*S. aurata*) διατρεφόμενοι με ιχθυοτροφές που χρησιμοποιήθηκαν για την αντικατάσταση του ιχθυαλεύρου από χοιράλευρο (5^ο διατροφικό πείραμα), έπειτα από **60 ημέρες** εκτροφής

Παράμετροι / Διατροφικές ομάδες	FM	POM25	POM25+	POM35	POM35+	POM45	POM45+
Επιβίωση (%)	85,56±5,09	87,78±15,75	96,67±3,33	95,56±3,85	96,67±0,0	91,11±13,47	87,8±10,2
Πρόσληψη τροφής (g/ψάρι)	17,98±0,36 ^{ab}	17,34±0,51 ^a	17,89±0,87 ^{ab}	19,16±0,17 ^b	19,06±1,25 ^{ab}	18,88±0,43 ^{ab}	18,37±0,71 ^{ab}
Αρχικό βάρος (g/ψάρι)	2,27±0,00	2,27±0,00	2,27±0,00	2,27±0,00	2,27±0,00	2,27±0,00	2,27±0,00
Τελικό βάρος (g/ψάρι)	15,87±0,36	14,98±0,58	15,19±1,02	15,86±0,32	15,74±1,13	14,58±0,22	14,30±1,21
SGR (%/ημ.)	3,19±0,03	3,09±0,06	3,11±0,11	3,19±0,03	3,17±0,12	3,05±0,02	3,01±0,14
FCR	1,32±0,06 ^a	1,37±0,02 ^{ab}	1,39±0,04 ^{abc}	1,42±0,03 ^{abc}	1,48±0,11 ^{abc}	1,53±0,05 ^{bc}	1,54±0,15 ^c
PER	1,47±0,06 ^a	1,42±0,03 ^{ab}	1,40±0,04 ^{abc}	1,38±0,04 ^{abc}	1,37±0,03 ^{abc}	1,27±0,04 ^{bc}	1,27±0,12 ^c

Οι τιμές αντιπροσωπεύουν μέσους όρους ± τυπική απόκλιση (n=3). Οι τιμές που δεν αντιπροσωπεύονται από τον ίδιο εκθέτη δείχνουν στατιστικώς σημαντική διαφορά (P<0,05) μεταξύ των διατροφικών ομάδων.

Πίνακας 5.5. Παράμετροι ανάπτυξης ιχθυδίων τσιπούρας (*S. aurata*) διατρεφόμενοι με ιχθυοτροφές που χρησιμοποιήθηκαν για την αντικατάσταση του ιχθυαλεύρου από χοιράλευρο (5^ο διατροφικό πείραμα), έπειτα από **90 ημέρες** εκτροφής.

Παράμετροι /Διατροφικές Ομάδες	FM	POM25	POM25+	POM35	POM35+	POM45	POM45+
Επιβίωση (%)	84,44±3,85	85,56±7,07	93,33±8,82	92,22±6,94	92,22±5,09	86,67±11,55	83,33±11,55
Πρόσληψη τροφής (g/ψάρι)	27,41±0,69	26,69±0,73	27,75±1,85	29,52±0,81	29,49±2,73	28,85±0,17	28,59±1,38
Πρόσληψη τροφής (% σ.β./ημέρα)	2,18±0,07	2,14±0,07	2,21±0,07	2,29±0,09	2,28±0,06	2,43±0,13	2,50±0,17
Ολικό μήκος (cm)	11,98±0,16	12,11±0,31	12,11±0,31	12,19±0,04	11,85±0,54	11,85±0,29	11,83±0,38
Αρχικό βάρος (g/ψάρι)	2,27±0,00	2,27±0,00	2,27±0,00	2,27±0,00	2,27±0,00	2,27±0,00	2,27±0,00
Τελικό βάρος (g/ψάρι)	26,03±1,01	25,80±1,66	26,00±2,50	26,69±1,12	26,85±3,40	24,49±1,51	23,44±1,91
Αύξηση βάρους (g/ψάρι)	23,76±1,01	23,53±1,66	23,72±2,50	24,42±1,12	24,58±3,40	22,22±1,51	21,17±1,91
SGR (%/ημέρα)	2,74±0,04	2,73±0,07	2,73±0,11	2,77±0,05	2,77±0,14	2,67±0,07	2,62±0,09
FCR	1,15±0,05 ^a	1,14±0,05 ^a	1,17±0,06 ^{ab}	1,21±0,05 ^{ab}	1,20±0,06 ^{ab}	1,30±0,08 ^{ab}	1,36±0,11 ^b
PER	1,68±0,07 ^a	1,71±0,08 ^a	1,66±0,08 ^{ab}	1,62±0,07 ^{ab}	1,62±0,07 ^{ab}	1,50±0,10 ^{ab}	1,43±0,11 ^b
Κατακράτηση πρωτεΐνης (%)	29,61±1,17	29,02±1,26	29,61±1,38	28,60±1,21	29,31±1,28	27,59±1,76	27,28±2,06
Κατακράτηση λίπους (%)	64,13±2,43 ^a	73,26±2,90 ^{ab}	75,90±3,18 ^{abc}	72,58±2,95 ^{ab}	78,27±2,91 ^{ab}	85,03±5,14 ^{bc}	89,57±6,44 ^c
HSI (%)	1,51±0,29	1,63±0,22	1,74±0,36	1,56±0,37	1,69±0,29	1,80±0,30	1,78±0,42
VSI (%)	4,17±0,70 ^{ab}	4,68±0,85 ^a	3,81±1,10 ^{abc}	3,63±1,02 ^{bc}	3,31±0,79 ^c	3,66±0,78 ^{abc}	3,44±1,17 ^c
K	1,61±0,08	1,58±0,11	1,54±0,04	1,59±0,04	1,58±0,08	1,64±0,21	1,51±0,11

Οι τιμές αντιπροσωπεύουν μέσους όρους ± τυπική απόκλιση (n=3). Οι τιμές κάθε παραμέτρου που φέρουν διαφορετικό εκθέτη μεταξύ των διατροφικών ομάδων υποδηλώνουν στατιστικώς σημαντική διαφορά (P < 0.05) μεταξύ τους. SGR - ειδικός ρυθμός ανάπτυξης, FCR – συντελεστής μετατρεψιμότητας τροφής, PER – συντελεστής αποδοτικότητας πρωτεΐνης, HSI – ηπατοσωματικός δείκτης, VSI – ενδοσπλαχνικός δείκτης, K – δείκτης ευρωστίας.

Πίνακας 5.6. Θρεπτική σύσταση (% επί της ξηρής ουσίας δείγματος) ολόκληρου σώματος και του μυϊκού ιστού ιχθυδίων τσιπούρας (*S. aurata*) διατρεφόμενοι με ιχθυοτροφές που χρησιμοποιήθηκαν για την αντικατάσταση του ιχθυαλεύρου από χοιράλευρο (5^ο διατροφικό πείραμα).

Θρεπτική σύσταση (%)	FM	POM25	POM25+	POM35	POM35+	POM45	POM45+
<u>Θρεπτική σύσταση ολικού σώματος (%)</u>							
Υγρασία (νωπού)	68,91±1,12 ^a	69,25±1,74 ^a	67,98±1,33 ^a	68,49±1,08 ^a	67,43±0,90 ^{ab}	67,01±0,78 ^{ab}	65,99±0,92 ^b
Ολικές πρωτεΐνες	55,79±1,43	54,55±2,44	54,88±1,88	55,40±2,41	54,77±2,49	54,88±1,46	54,92±0,93
Ολικά λιπίδια	34,83±2,06	35,10±2,87	35,16±2,41	34,29±2,08	34,33±2,42	34,60±1,65	34,90±1,82
Τέφρα	9,99±0,63 ^{ab}	10,23±0,70 ^{ab}	9,72±0,44 ^a	10,63±0,76 ^{bc}	11,20±1,08 ^{cd}	11,39±0,58 ^{cd}	11,73±0,57 ^d
Ενέργεια (kJ/g)	25,43±0,44	25,69±0,73	25,69±0,53	25,82±0,56	25,78±0,62	25,84±0,43	25,70±0,58
<u>Θρεπτική σύσταση μυϊκού ιστού (%)</u>							
Υγρασία (νωπού)	72,33±0,56	73,07±1,03	72,81±0,88	73,58±1,31	71,64±0,79	73,13±0,81	72,06±0,77
Ολικές πρωτεΐνες	72,11±1,95	74,89±3,23	73,95±1,58	72,80±1,36	72,11±1,12	73,33±1,82	72,60±2,42
Ολικά λιπίδια	23,75±0,48	21,47±2,79	23,25±2,40	22,10±1,71	24,56±2,14	21,12±1,97	23,22±2,71
Τέφρα	5,34±0,24	5,46±0,17	5,31±0,17	5,49±0,35	5,01±0,26	5,38±0,15	5,31±0,48
Ενέργεια (kJ/g)	25,77±0,48	25,07±0,55	25,45±0,51	25,10±0,96	26,19±0,44	25,39±0,44	25,78±0,62

Οι τιμές αντιπροσωπεύουν μέσους όρους ± τυπική απόκλιση (n=12). Οι τιμές κάθε παραμέτρου που φέρουν διαφορετικό εκθέτη μεταξύ των διατροφικών ομάδων υποδηλώνουν στατιστικώς σημαντική διαφορά (P < 0.05) μεταξύ τους.

5.3 Συζήτηση

Στο παρόν πείραμα μελετήθηκε η αντικατάσταση της πρωτεΐνης του ιχθυαλεύρου από πρωτεΐνη χοιραλεύρου κατά 25%, 35% και 45%, με ή χωρίς εξισορρόπηση λυσίνης, στο σιτηρέσιο ιχθυδίων τσιπούρας. Τα αποτελέσματα, έπειτα από 90 ημέρες σίτισης, έδειξαν πως η αντικατάσταση της πρωτεΐνης του ιχθυαλεύρου από πρωτεΐνη χοιραλεύρου έως και 45%, με προσθήκη ή χωρίς λυσίνη, δεν επηρέασε αρνητικά την επιβίωση των ιχθυδίων, η οποία ήταν υψηλή (>83%) σε όλες τις διατροφικές ομάδες. Αυτό δείχνει ότι το χοιράλευρο είναι ένα συστατικό το οποίο δεν επιφέρει σημαντικές θνησιμότητες όταν χρησιμοποιηθεί στη διατροφή του είδους που μελετήθηκε σε επίπεδα αντικατάστασης του ιχθυαλεύρου έως και 45%, το οποίο ήταν το υψηλότερο εξεταζόμενο επίπεδο. Παρόμοια συμπεράσματα ανακοινώθηκαν από τους Hernández *et al.* (2008) όπου εξέτασαν τη μερική αντικατάσταση της πρωτεΐνης του ιχθυαλεύρου σε ποσοστά 25%, 35%, 45%, 55% και 65% από χοιράλευρο στην εκτροφή της γαρίδας (*Litopenaeus vannamei*), όπου η επιβίωσή της ήταν υψηλή (>90%) και μη επηρεαζόμενη από τη σύνθεση του σιτηρεσίου. Επίσης, οι Hernández *et al.* (2010) έδειξαν ότι η πλήρης αντικατάσταση (100%) του ιχθυαλεύρου από χοιράλευρο οδήγησε σε υψηλή επιβίωση (97-100%) της τιλάπιας του Νείλου (*O. niloticus*). Το γεγονός πως το χοιράλευρο δεν επιφέρει αυξημένες θνησιμότητες έχει δειχθεί, επίσης, και στο γατόψαρο (*I. punctatus*, Li *et al.* 2019).

Η αύξηση του ποσοστού χορήγησης του χοιραλεύρου στο σιτηρέσιο οδήγησε σε μια αυξανόμενη εθελούσια πρόσληψη τροφής, αν και η τάση αυτή ήταν μη σημαντική ($P>0,05$). Το αποτέλεσμα αυτό δείχνει ότι το χοιράλευρο δεν επιφέρει κάποια αρνητική επίδραση στην αποδεκτικότητα της τροφής στο σύνολό της, και καταδεικνύει την υψηλή γευστικότητά του. Έχει υποστηριχθεί ότι, οι ιχθύες ενδέχεται να αυξήσουν την πρόσληψη της τροφής τους ως μια προσπάθεια στο να συγκεράσουν πιθανές ελλείψεις κάποιων αμινοξέων της τροφής (Peres & Oliva-Teles 2006). Είναι γνωστό ότι το χοιράλευρο έχει μειωμένα επίπεδα κάποιων

απαραίτητων αμινοξέων, όπως π.χ. λυσίνης, μεθειονίνης και αργινίνης, συγκριτικά με το ιχθυάλευρο (Πιν. 2.1). Συνεπώς, η αυξανόμενη ενσωμάτωση του χοιραλεύρου στο σιτηρέσιο οδηγεί σε μειωμένα επίπεδα των παραπάνω αμινοξέων στην τροφή (Πιν. 5.2). Για αυτόν τον λόγο, κατά τον καταρτισμό των σιτηρεσίων έγινε προσθήκη λυσίνης σε κάθε εξεταζόμενο ποσοστό αντικατάστασης της πρωτεΐνης του ιχθυαλεύρου (POM25+, POM35+, POM45+, Πιν. 5.1). Ωστόσο, η πρόσληψη της τροφής αυξήθηκε ελαφρώς, συγκριτικά με το μάρτυρα, τόσο στις ομάδες ιχθυδίων που σιτίστηκαν με τα σιτηρέσια που δεν περιείχαν πρόσθετη λυσίνη (POM25, POM35, POM45), όσο και σε εκείνες τις ομάδες ιχθυδίων που διατράφηκαν με σιτηρέσια που συμπληρώθηκαν με το συγκεκριμένο αμινοξύ (POM25+, POM35+, POM45+). Αυτό δείχνει ότι η ελαφρώς αυξημένη πρόσληψη τροφής στα ιχθύδια που σιτίστηκαν με χοιράλευρο δεν οφείλεται στα μειωμένα επίπεδα της λυσίνης στην τροφή.

Επιπρόσθετα, είναι γνωστό πως η πρόσληψη τροφής από τους ιχθύες αυξάνεται όταν σιτίζονται με τροφές που είτε δεν καλύπτουν τις ενεργειακές τους ανάγκες είτε είναι λιγότερο πυκνές σε ενέργεια από άλλες τροφές (Guillaume *et al.* 1999). Ωστόσο, στην παρούσα μελέτη όλα τα σιτηρέσια που χρησιμοποιήθηκαν ήταν ισοενεργειακά (21 KJ/g) και ισοαζωτούχα καλύπτοντας επαρκώς τις ενεργειακές ανάγκες του μελετηθέντος είδους στο συγκεκριμένο στάδιο ανάπτυξης. Οπότε, η αυξημένη πρόσληψη τροφής από τα ιχθύδια που σιτίστηκαν με χοιράλευρο δεν οφείλεται ούτε στην ολική ενέργεια της τροφής, αλλά ούτε και στην αναλογία ενέργειας/πρωτεΐνης της τροφής. Επίσης, είναι γνωστό, ότι τα ποσοστά των ολικών πρωτεϊνών και της ολικής ενέργειας μιας τροφής δεν απορροφούνται εξ ολοκλήρου από τον οργανισμό, αλλά μεταβολίζονται σε ένα βαθμό που εξαρτάται από την πεπτικότητα των ίδιων των συστατικών της τροφής. Συνεπώς, η διαφορετική πεπτικότητα των συστατικών ενός σιτηρεσίου οδηγεί σε διαφορετικού βαθμού απορρόφηση των θρεπτικών συστατικών από τον οργανισμό, που με τη σειρά του μπορεί να οδηγεί σε διαφοροποίηση του ρυθμού πρόσληψης της τροφής, προκειμένου να ισοσκελίσει τις ανάγκες του οργανισμού σε θρεπτικά συστατικά.

Αν και μελέτες πεπτικότητας δεν πραγματοποιήθηκαν στο συγκεκριμένο πείραμα, τόσο ο συντελεστής αποδοτικότητας των πρωτεϊνών (PER) όσο και η αποδοτικότητα της τροφής (υψηλός συντελεστής FCR) στις διατροφικές ομάδες ιχθυδίων μειώθηκαν με την αύξηση του επιπέδου ενσωμάτωσης του χοιραλεύρου στην τροφή. Οπότε, η ελαφρώς αυξημένη πρόσληψη τροφής από τα ιχθύδια που σιτίζονταν με χοιράλευρο πιθανώς να οφείλεται στην χαμηλότερη αποδοτικότητα της πεπτής πρωτεΐνης και ενέργειας του χοιραλεύρου και στην προσπάθεια των ιχθυδίων να ισοσκελίσουν τις ανάγκες τους, συγκριτικά με την ομάδα του μάρτυρα. Η φαινόμενη πεπτικότητα πρωτεΐνης και ενέργειας του χοιραλεύρου έχειδειχθεί ότι είναι μειωμένη συγκριτικά με εκείνη του ιχθυαλεύρου στην γαρίδα (*L. vannamei*) (Hernandez *et al.* 2008) και στην τιλάπια του Νείλου (*O. niloticus*) (Hernandez *et al.* 2010).

Στη διεθνή βιβλιογραφία υπάρχουν ελάχιστες μελέτες για τη χρήση του χοιραλεύρου στα σιτηρέσια των εκτρεφόμενων ιχθύων, παρόλη την υψηλή διατροφική αξία του συγκεκριμένου αλεύρου. Σε συμφωνία με τα αποτελέσματα της παρούσης μελέτης, οι Vélez-Calabria *et al.* (2021) ανέφεραν παρόμοια πρόσληψη τροφής σε νεαρές τσιπούρες αρχικού σωματικού μεγέθους 64 g, που σιτίστηκαν με σιτηρέσια στα οποία αντικαταστάθηκε πλήρως το ιχθυάλευρο από μίγμα χοιραλεύρου και φυτικών πρωτεϊνών. Επίσης, οι Li *et al.* (2016) αντικαθιστώντας 100% την πρωτεΐνη του ιχθυαλεύρου από μίξη προϊόντων χοιραλεύρου (κρέας, οστά και αίμα χοιραλεύρου) σε ένα υβρίδιο γατόψαρου (*Ictalurus punctatus* × *Ictalurus furcatus*) ανέφεραν αυξημένη, αλλά μη στατιστικά σημαντικά, πρόσληψη τροφής στα ιχθύδια που λάμβαναν τις τροφές που περιείχαν χοιράλευρο. Στο γατόψαρο (*I. punctatus*) η πρόσληψη τροφής των νεαρών ιχθυδίων που σιτίστηκαν με σιτηρέσια που το χοιράλευρο αντικατέστησε πλήρως το ιχθυάλευρο ήταν παρόμοια μεταξύ των διαφορετικών ομάδων (Li *et al.* 2019). Οι Hernández *et al.* (2008) ανέφεραν ότι η πρόσληψη της τροφής στην γαρίδα (*L. vannamei*) δεν επηρεάστηκε από την αντικατάσταση της πρωτεΐνης του ιχθυαλεύρου από χοιράλευρο έως και 65%, το οποίο ήταν το μέγιστο εξεταζόμενο ποσοστό αντικατάστασης.

Ανεπηρέαστη ήταν η πρόσληψη της τροφής και στο ασιατικό λαβράκι (*Lateolabrax japonicus*) όταν το ιχθυάλευρο αντικαταστάθηκε από χοιράλευρο σε ένα ποσοστό περίπου 50% (Wang *et al.* 2012). Αντίθετα, η πρόσληψη της τροφής μειώθηκε σημαντικά στην τιλάπια του Νείλου (*O. niloticus*) όταν το ιχθυάλευρο αντικαταστάθηκε πλήρως από χοιράλευρο (Hernandez *et al.* 2010).

Τα αποτελέσματα της παρούσης μελέτης έδειξαν ότι η αντικατάσταση της πρωτεΐνης του ιχθυαλεύρου από πρωτεΐνη χοιραλεύρου έως και 45%, που ήταν το μέγιστο εξεταζόμενο επίπεδο, δεν μείωσε σημαντικά το σωματικό βάρος και τον ειδικό ρυθμό ανάπτυξης (SGR) των ιχθυδίων τσιπούρας. Ωστόσο, τα υψηλά ποσοστά αντικατάστασης (45%) οδήγησαν σε σημαντικά μειωμένη αξιοποίηση της τροφής (υψηλό FCR) και αποδοτικότητας των πρωτεϊνών (PER). Ήταν φανερή μια τάση αύξησης του FCR και μείωσης του PER καθώς το επίπεδο αντικατάστασης του ιχθυαλεύρου από χοιράλευρο αυξάνονταν στο σιτηρέσιο. Αν και μελέτες πεπτικότητας του χοιραλεύρου δεν έχουν πραγματοποιηθεί μέχρι σήμερα στην τσιπούρα, πιθανώς η αύξηση του FCR και η ταυτόχρονη μείωση του PER στις ομάδες με υψηλή χορήγηση χοιραλεύρου να οφείλεται στη χαμηλότερη πεπτικότητά του, συγκριτικά με του ιχθυαλεύρου, όπως έχει δείχθει από μελέτες σε άλλα είδη (Hernandez *et al.* 2008, Hernandez *et al.* 2010). Η πιθανώς χαμηλότερη πεπτικότητα του χοιραλεύρου οδηγεί σε διαφορετικό βαθμό αξιοποίησης της καταναλωθείσας πρωτεΐνης και των απαραίτητων αμινοξέων από τον οργανισμό. Όπως φαίνεται στον Πίνακα 5.5, οι ομάδες POM45 και POM45+ είχαν όντως τις χαμηλότερες, αν και μη στατιστικά σημαντικά διαφορετικές τιμές του δείκτη κατακράτησης πρωτεϊνών στο σώμα συγκριτικά με τις υπόλοιπες ομάδες. Στην μελέτη των Vélez-Calabria *et al.* (2021) με τα ενήλικα άτομα τσιπούρας απέδειξαν ότι η αντικατάσταση του ιχθυαλεύρου από χοιράλευρο σε ποσοστά 90% και 100% οδηγεί σε σημαντική μείωση της κατακράτησης πρωτεϊνών, της κατακράτησης ενέργειας και της κατακράτησης απαραίτητων αμινοξέων στο σώμα, που οι συγγραφείς απέδωσαν στη

χαμηλότερη πεπτικότητα του χοιραλεύρου. Αξίζει να αναφερθεί, ωστόσο, ότι στην ίδια μελέτη οι παραπάνω δείκτες κατακράτησης δεν επηρεάστηκαν σημαντικά όταν τα ιχθυύδια σιτίστηκαν με σιτηρέσιο που το ιχθυάλευρο αντικαταστάθηκε κατά 75% από χοιράλευρο, ένα επίπεδο σαφώς υψηλότερο από αυτά που δοκιμάστηκαν στην παρούσα μελέτη.

Αξίζει, επίσης, να σημειωθεί ότι η συμπλήρωση του σιτηρεσίου με λυσίνη, που θεωρήθηκε το αμινοξύ με την μεγαλύτερη μείωση που προκύπτει από τις αντικαταστάσεις ιχθυαλεύρου, δεν βελτίωσε τις αποδόσεις των τροφών. Έτσι, η προσθήκη λυσίνης στο σιτηρέσιο με ποσοστό 45% αντικατάστασης ιχθυαλεύρου (POM45+) οδήγησε σε ακόμα υψηλότερη τιμή του συντελεστή FCR και ακόμα χαμηλότερη τιμή του συντελεστή PER σε σύγκριση με το σιτηρέσιο POM45 (χωρίς προσθήκη λυσίνης). Το ίδιο συνέβη και στα υπόλοιπα ποσοστά αντικατάστασης 25% (τροφές POM25 και POM25+) και 35% (POM35 και POM35+). Αυτό δείχνει ότι η λυσίνη δεν αποτελεί το οριακό αμινοξύ κατά την αντικατάσταση του ιχθυαλεύρου από χοιράλευρο, και πιθανώς η προσθήκη άλλων απαραίτητων αμινοξέων, όπως π.χ. μεθειονίνης, να είναι απαιτούμενη. Τα ποσοστά μεθειονίνης (1,25% της τροφής) στα σιτηρέσια POM45 και POM45+ οριακά ικανοποιούσαν τις απαιτήσεις των ιχθυδίων του μελετηθέντος είδους, οπότε μια πιθανώς μειωμένη πεπτικότητα της μεθειονίνης ή/και άλλων απαραίτητων αμινοξέων να είναι αυτή που τελικά καθόρισε τη μειωμένη απόδοση των σιτηρεσίων με υψηλή αντικατάσταση ιχθυαλεύρου.

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης έδειξαν ότι η αντικατάσταση της πρωτεΐνης του ιχθυαλεύρου από πρωτεΐνη χοιραλεύρου έως και 35%, με ή χωρίς προσθήκη λυσίνης, δεν επέφερε καμία αρνητική επίδραση σε όλους τους δείκτες ανάπτυξης των ιχθυδίων και αξιοποίησης της τροφής. Αυτό δείχνει ότι το χοιράλευρο μπορεί επιτυχώς να αντικαταστήσει το ιχθυάλευρο σε αυτό το ποσοστό αντικατάστασης. Όπως προαναφέρθηκε, μέχρι σήμερα έχουν πραγματοποιηθεί ελάχιστες μελέτες για τη χρήση του χοιραλεύρου στα σιτηρέσια των εκτρεφόμενων ιχθύων. Στην μελέτη των Vélez-Calabria *et al.* (2021) με την τσιπούρα

δείχθηκε ότι η αντικατάσταση του ιχθυαλεύρου από χοιράλευρο μπορεί να επιτευχθεί σε ένα αρκετά υψηλότερο ποσοστό, έως και 75%, χωρίς να μειώνει την ανάπτυξή της (σωματικό βάρος, SGR), και την αποδοτικότητα της τροφής (FCR, PER, κατακράτηση θρεπτικών). Σε υψηλότερα ποσοστά αντικατάστασης (90% και 100%) η συνολική απόδοση των ενήλικων ατόμων τσιπούρας επηρεάστηκε σημαντικά αρνητικά. Βεβαία, το ποσοστό 75% στην μελέτη των Vélez-Calabria *et al.* (2021) αναφέρεται στην αντικατάσταση του ποσοστού συμμετοχής του ιχθυαλεύρου στο σιτηρέσιο και όχι της πρωτεΐνης του. Αν και οι συγγραφείς δεν ανέφεραν την περιεκτικότητα πρωτεϊνών του εξεταζόμενου ιχθυαλεύρου και του χοιραλεύρου, η επιτυχής αντικατάσταση κατά 75%, στην πραγματικότητα, είναι σαφώς χαμηλότερη όταν αυτή αναχθεί σε πρωτεϊνικό ποσοστό αντικατάστασης. Εξάλλου, αυτό το 75% επιτυχούς αντικατάστασης στη μελέτη των Vélez-Calabria *et al.* (2021) αντιστοιχεί σε ένα ποσοστό συμμετοχής 23,7% του χοιραλεύρου στο σιτηρέσιο, μια τιμή που είναι πολύ κοντά στο 21,8% που ήταν το επιτυχημένο ποσοστό συμμετοχής (POM35, POM35+) του χοιραλεύρου στην παρούσα μελέτη. Οι όποιες διαφοροποιήσεις των αποτελεσμάτων των δύο μελετών πιθανόν να οφείλονται και στις διαφορετικές συνθήκες των πειραμάτων. Για παράδειγμα, οι Vélez-Calabria *et al.* (2021) δούλεψαν με αρκετά μεγαλύτερο αρχικό σωματικό βάρος (64 g) τσιπούρας από ότι στην παρούσα μελέτη (2,2 g), που πιθανώς είναι λιγότερο ευάλωτο στη μείωση του διαιτητικού ποσοστού του ιχθυαλεύρου. Επιπρόσθετα, στην παρούσα μελέτη εξετάστηκε η αντικατάσταση του ιχθυαλεύρου σε σιτηρέσιο-μάρτυρα που περιείχε υψηλότερο πρωτεϊνικό ποσοστό (51,5%) συγκριτικά με την άλλη μελέτη (45%), αν και τα ποσοστά συμμετοχής του ιχθυαλεύρου στο σιτηρέσιο-μάρτυρα στα δύο πειράματα ήταν ίδια (59%).

Οι Hernández *et al.* (2008) ανακοίνωσαν ένα παρόμοιο ποσοστό (35%) επιτυχούς αντικατάστασης της πρωτεΐνης του ιχθυαλεύρου από κρέας χοιραλεύρου στο σιτηρέσιο της γαρίδας (*Litopenaeus vannamei*). Στη μελέτη αυτή, τα υψηλότερα επίπεδα αντικατάστασης

από 45% έως 65% οδήγησαν σε σημαντική μείωση του SGR της γαρίδας και ότι υπήρχε μια σημαντικά αρνητική συσχέτιση της ανάπτυξης με την αύξηση του ποσοστού αντικατάστασης του ιχθυαλεύρου. Οι συγγραφείς απέδωσαν τη μείωση του ρυθμού ανάπτυξης στα μειωμένα ποσοστά της μεθειονίνης του σιτηρεσίου, καθώς το ποσοστό συμμετοχής του χοιραλεύρου αυξανόταν. Οι Wang *et al.* (2012) δουλεύοντας με το ασιατικό λαβράκι (*L. japonicus*) δοκίμασαν μια αντικατάσταση ιχθυαλεύρου κατά 50% από χοιράλευρο, με ή χωρίς προσθήκη λυσίνης, μεθειονίνης και θρεονίνης και ανέφεραν ότι η συμπλήρωση του σιτηρεσίου με τα συγκεκριμένα αμινοξέα οδήγησε σε παρόμοια απόδοση με την τροφή μάρτυρα, σε αντίθεση με το σιτηρέσιο που δεν συμπληρώθηκε με τα αμινοξέα. Στην τιλάπια του Νείλου, επιχειρήθηκε μια πλήρης αντικατάσταση του ιχθυαλεύρου από χοιράλευρο η οποία τελικά οδήγησε σε σημαντική μείωση του σωματικού βάρους, του SGR και του PER και σε σημαντική αύξηση του FCR (Hernández *et al.* 2010). Αντίθετα, στο γατόψαρο (*I. punctatus*, Li *et al.* 2016) και στο υβρίδιο του γατόψαρου (*I. × I. furcatus*, Li *et al.* 2019) η μίξη προϊόντων χοιραλεύρου (κρέας, οστά και αίμα) αντικατέστησαν πλήρως το ιχθυάλευρο της τροφής χωρίς αρνητικές επιδράσεις στη βιομάζα, στην ανάπτυξη των ιχθύων και στο FCR. Παρομοίως, στο είδος *Lepomis macrochirus* μια μίξη χοιραλεύρου και σογιαλεύρου αντικατέστησε πλήρως το ιχθυάλευρο του σιτηρεσίου χωρίς να επιφέρει μείωση της ανάπτυξης και της αξιοποίησης της τροφής (Masagounder *et al.* 2014). Στην τσιπούρα, οι Tapia-Paniagua *et al.* (2019) εξέτασαν την επίδραση αντικατάστασης ενός πολύ χαμηλού επιπέδου του ιχθυαλεύρου (<3%) από ένα προϊόν αποξηραμένου αίματος χοίρων και ανέφεραν ότι αυτό βελτίωσε την ανάπτυξη των ιχθύων και παράλληλα έδρασε ως ανοσοενισχυτικό.

Αναφορικά με την επίδραση του χοιραλεύρου στη θρεπτική σύσταση του σώματος και του μυϊκού ιστού των ιχθυδίων τσιπούρας, δεν υπήρξε κάποια εκτεταμένη διαφοροποίηση από τις αντικαταστάσεις του ιχθυαλεύρου. Η σημαντικά αυξημένη τέφρα στο σώμα των

ιχθυδίων που σιτίστηκαν με υψηλότερα ποσοστά αντικατάστασης (POM35+, POM45 και POM45+) δεν είναι εύκολο να εξηγηθεί, μιας και τα σιτηρέσια αυτά είχαν σαφώς χαμηλότερα επίπεδα τέφρας σε σχέση με τον μάρτυρα και τα σιτηρέσια με την χαμηλότερη αντικατάσταση (Πιν. 5.1), το οποίο οφείλεται στη χαμηλότερη περιεκτικότητα τέφρας του χοιραλεύρου συγκριτικά με του ιχθυαλεύρου (Πιν. 2.1). Ωστόσο, η αυξημένη τέφρα στις ομάδες POM35+, POM45 και POM45+ υποδηλώνει πως η αύξηση του σωματικού τους βάρους προέκυψε από μια αναλογικά μεγαλύτερη αύξηση του βάρους των οστών και των οστέινων μερών τους, καθώς και μια αναλογικά μικρότερη αύξηση του βάρους του μυϊκού ιστού τους συγκριτικά με των άλλων ομάδων. Αυτό φυσικά δεν είναι επιθυμητό σε συνθήκες εκτροφής όπου είναι προτιμότερο η τροφή να αποδίδει το μέγιστο της μυϊκής μάζας στα ιχθύδια.

Αξίζει επίσης να σχολιαστεί το γεγονός πως όλες οι ομάδες ιχθυδίων που σιτίστηκαν με χοιράλευρο είχαν μια αυξημένη κατακράτηση λίπους στο σώμα τους, η οποία ήταν σημαντικά αυξημένη στις ομάδες με την υψηλότερη αντικατάσταση (POM45, POM45+) σε σχέση με το μάρτυρα. Η αυξημένη κατακράτηση λίπους ξεκάθαρα δείχνει μια μειωμένη πεπτικότητα και αξιοποίηση του λίπους της τροφής και/ή μια αυξημένη λιπογένεση στο σώμα των ιχθυδίων που διατράφηκαν με χοιράλευρο. Αυτό με τη σειρά του υποδηλώνει μια σαφώς χαμηλότερη λιπιδική ποιότητα του χοιραλεύρου. Είναι γνωστό πως το χοιράλευρο περιέχει αυξημένα επίπεδα κορεσμένων λιπαρών οξέων συγκριτικά με το ιχθυάλευρο (Liland *et al.* 2015) που ομολογουμένως να οδήγησαν σε αυξημένη κατακράτηση στο σώμα της τσιπούρας. Είναι γνωστό πως στους ιχθύες τόσο το ποσοστό όσο και η πηγή των πρωτεϊνών του σιτηρεσίου μπορεί να επηρεάσει το μεταβολισμό και τη βιοσύνθεση των λιπαρών οξέων και να διαφοροποιήσει τελικά την λιποεναπόθεση και λιπογένεση στους ιστούς και κυρίως στο ήπαρ (Dias *et al.*, 2005).

5.4 Συμπεράσματα

Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης δείχνουν ότι η αντικατάσταση της πρωτεΐνης του ιχθυαλεύρου της τροφής από χοιράλευρο έως και 35%, με ή χωρίς προσθήκη λυσίνης, είναι επιτυχής για τα νεαρά άτομα της τσιπούρας (*S. aurata*), χωρίς να μειώνεται σημαντικά η αποτελεσματικότητα της τροφής, η απόδοση της ανάπτυξης και η θρεπτική σύσταση των ιχθυδίων. Σε υψηλότερα ποσοστά αντικατάστασης, της τάξης του 45%, η χαμηλότερη μεταβολική αποτελεσματικότητά του είναι ο κυριότερος παράγοντας που μειώνουν την απόδοση των ψαριών. Επί του πρακτέου, τα ερευνητικά αποτελέσματα προτείνουν ότι για τις τροφές ιχθυδίων τσιπούρας, μέσου βάρους 2-26 g, μπορεί να χρησιμοποιηθεί χοιράλευρο σε ένα ποσοστό ένταξης στο σιτηρέσιο της τάξης του 21,8%, χωρίς να επιφέρει μειωμένη παραγωγική απόδοση, δεδομένου ότι το επίπεδο χορήγησης του ιχθυαλεύρου στην τροφή του μάρτυρα ήταν 59% και η πρωτεϊνική περιεκτικότητα του ήταν 66%.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

Γενικά συμπεράσματα

Οι Μεταποιημένες ζωικές πρωτεΐνες (ΜΖΠ) μη μηρυκαστικών παγκοσμίως αποτελούν σημαντικά συστατικά ζωοτροφών. Πρόκειται για ζωικά υποπροϊόντα υψηλής θρεπτικής αξίας, πλούσια σε πρωτεΐνες, βιταμίνες και ανόργανα στοιχεία. Η χρήση τους είχε απαγορευτεί καθολικά στις ζωοτροφές της Ευρωπαϊκής Ένωσης το 2001, αλλά η απαγόρευση αυτή άρθηκε για τις ιχθυοτροφές την 1η Ιουνίου 2013, μετά τη διαπίστωση πως η χρησιμοποίησή τους στις ιχθυοτροφές παρουσιάζει αμελητέο κίνδυνο για την ανθρώπινη υγεία. Μέχρι σήμερα, η επιστημονική γνώση είναι περιορισμένη για την καταλληλότητα των ΜΖΠ μη μηρυκαστικών στις ιχθυοτροφές των ευρωπαϊκών εκτρεφόμενων ειδών ψαριών, συμπεριλαμβανομένης της τσιπούρας.

Στην παρούσα Διδακτορική Διατριβή, διερευνήθηκε η δυνατότητα αντικατάστασης της πρωτεΐνης του ιχθυαλεύρου από άλευρα Μεταποιημένων Ζωικών Πρωτεϊνών μη μηρυκαστικών ζώων στο σιτηρέσιο των ιχθυδίων τσιπούρας (*S. aurata*). Συγκεκριμένα, διερευνήθηκαν οι επιδράσεις της αντικατάστασης του ιχθυαλεύρου: 1) από άλευρο υποπροϊόντων πουλερικών (πτηνάλευρο), 2) από άλευρο υδρολυμένου πετραλεύρου (πετράλευρο) και 3) από άλευρο υποπροϊόντων χοίρων (χοιράλευρο) α) στην ανάπτυξη, β) τη θρεπτική σύσταση και γ) στην ιστομορφολογία της τσιπούρας.

Για τον σκοπό αυτόν διεξήχθησαν συνολικά πέντε διατροφικά πειράματα. Στο 1^ο διατροφικό πείραμα διερευνήθηκε η μερική (50%) και ολική (100%) αντικατάσταση της πρωτεΐνης του ιχθυαλεύρου από πρωτεΐνη υποπροϊόντων πουλερικών (πτηνάλευρο), και στη συνέχεια στο 2^ο διατροφικό πείραμα εξετάστηκε η μερική (25% και 50%) αντικατάσταση της πρωτεΐνης του ιχθυαλεύρου από πρωτεΐνη πτηναλεύρου με ταυτόχρονη εξισορρόπηση σε αμινοξέα.. Στο 3^ο διατροφικό πείραμα διερευνήθηκε η μερική (50%) και ολική (100%) αντικατάσταση της πρωτεΐνης του ιχθυαλεύρου από πρωτεΐνη υδρολυμένου πετραλεύρου, και

στη συνέχεια στο 4^ο διατροφικό πείραμα εξετάστηκε η μερική (25% και 50%) αντικατάσταση της πρωτεΐνης του ιχθυαλεύρου από πρωτεΐνη υδρολυμένου περαλεύρου με ταυτόχρονη εξισορρόπηση σε αμινοξέα. Τέλος, στο 5^ο διατροφικό πείραμα διερευνήθηκε η αντικατάσταση της πρωτεΐνης του ιχθυαλεύρου από πρωτεΐνη υποπροϊόντων χοίρου (χοιράλευρο) κατά 25%, 35% και 45% με ή χωρίς προσθήκη λυσίνης στο σιτηρέσιο.

Τα αποτελέσματα του 1^{ου} και του 2^{ου} διατροφικού πειράματος, με τη χρήση του πτηναλεύρου έδειξαν ότι η αντικατάσταση της πρωτεΐνης του ιχθυαλεύρου της τροφής από πρωτεΐνη πτηναλεύρου έως και 50% ήταν επιτυχής για τα νεαρά άτομα της τσιπούρας, εφόσον το σιτηρέσιο συμπληρωθεί με μεθειονίνη και λυσίνη, χωρίς να μειώνεται σημαντικά η κατανάλωση και η αποτελεσματικότητα της τροφής, η απόδοση της ανάπτυξης, η θρεπτική σύσταση και η ιστομορφολογία του εντέρου και του ήπατος των ιχθυδίων. Τα αποτελέσματα προτείνουν ότι για τις τροφές ιχθυδίων τσιπούρας, μέσου βάρους 3-40 g, μπορεί να χρησιμοποιηθεί πτηνάλευρο σε ένα επίπεδο χορήγησης της τάξης του 27% επί της τροφής με συνχορήγηση λυσίνης και μεθειονίνης, χωρίς να επιφέρει μειωμένη παραγωγική απόδοση, δεδομένου ότι το επίπεδο χορήγησης του ιχθυαλεύρου στην τροφή του μάρτυρα ήταν 58% και η πρωτεϊνική περιεκτικότητα του ήταν 64%.

Τα αποτελέσματα του 3^{ου} και του 4^{ου} διατροφικού πειράματος, με τη χρήση του υδρολυμένου περαλεύρου δείχνουν ότι η αντικατάσταση της πρωτεΐνης του ιχθυαλεύρου της τροφής από πρωτεΐνη περαλεύρου, έως και 25%, με ή χωρίς προσθήκη λυσίνης και μεθειονίνης, είναι επιτυχής για τα νεαρά άτομα της τσιπούρας, χωρίς να μειώνεται σημαντικά η αποτελεσματικότητα της τροφής, η απόδοση της ανάπτυξης, η θρεπτική σύσταση και η ιστομορφολογία του εντέρου και του ήπατος των ιχθυδίων. Σε υψηλότερα ποσοστά αντικατάστασης όπως 50% και 100%, το φτωχότερο προφίλ αμινοξέων του περαλεύρου και η χαμηλότερη μεταβολική αποτελεσματικότητά του είναι οι κυριότεροι παράγοντες που μειώνουν την απόδοση των ιχθυδίων. Τα αποτελέσματα της παρούσας έρευνας φανερώνουν

ότι για τις τροφές των ιχθυδίων τσιπούρας, μέσου βάρους 3-40 g, μπορεί να χρησιμοποιηθεί περάλευρο σε ένα ποσοστό ένταξης στο σιτηρέσιο της τάξης του 10,8%, χωρίς να επιφέρει μειωμένη παραγωγική απόδοση, δεδομένου ότι το ποσοστό χορήγησης του ιχθυαλεύρου στην τροφή του μάρτυρα ήταν 58% και η πρωτεϊνική περιεκτικότητά του ήταν 64%.

Τα αποτελέσματα του 5^{ου} διατροφικού πειράματος, με τη χρήση του χοιραλεύρου δείχνουν ότι η αντικατάσταση της πρωτεΐνης του ιχθυαλεύρου της τροφής από πρωτεΐνη χοιραλεύρου έως και 35% με ή χωρίς προσθήκη λυσίνης, είναι επιτυχής για τα νεαρά άτομα της τσιπούρας, χωρίς να μειώνεται σημαντικά η αποτελεσματικότητα της τροφής, η απόδοση της ανάπτυξης και η θρεπτική της σύσταση. Σε υψηλότερα ποσοστά αντικατάστασης της τάξης του 45%, η χαμηλότερη μεταβολική αποτελεσματικότητά του είναι ο κυριότερος παράγοντας που μειώνει την απόδοση των ψαριών. Τα αποτελέσματα της παρούσας έρευνας φανερώνουν ότι για τις τροφές ιχθυδίων τσιπούρας, βάρους 2,26 g, μπορεί να χρησιμοποιηθεί χοιράλευρο σε ένα ποσοστό ένταξης στο σιτηρέσιο της τάξης του 21,8%, χωρίς να επιφέρει μειωμένη παραγωγική απόδοση, δεδομένου ότι το επίπεδο χορήγησης του ιχθυαλεύρου στην τροφή του μάρτυρα ήταν 59% και η πρωτεϊνική περιεκτικότητά του ήταν 66%.

Τα αποτελέσματα της παρούσας Διδακτορικής Διατριβής φανερώνουν ότι οι Μεταποιημένες Ζωικές Πρωτεΐνες μη μηρυκαστικών, και συγκεκριμένα το άλευρο υποπροϊόντων πουλερικών, το άλευρο υδρολυμένου περαλεύρου και το άλευρο υποπροϊόντων χοίρων, είναι σε μεγάλο βαθμό κατάλληλες και αξιοποιήσιμες από τα ιχθύδια τσιπούρας και μπορούν να αντικαταστήσουν επιτυχώς το ιχθυάλευρο στο σιτηρέσιο των νεαρών ατόμων χωρίς να επιφέρουν αρνητικές επιδράσεις στην απόδοσή τους και την αποτελεσματικότητα της τροφής. Το επίπεδο της επιτυχούς αντικατάστασης της πρωτεΐνης του ιχθυαλεύρου διαφέρει μεταξύ των χερσαίων αυτών ζωικών πρωτεϊνών με το πτηνάλευρο να έχει την καλύτερη αποδοτικότητα (50% επιτυχής αντικατάσταση), ακολουθούμενο από το

χοιράλευρο (35% επιτυχής αντικατάσταση) και το πετράλευρο (25% επιτυχής αντικατάσταση). Τα επίπεδα αυτά αντικατάστασης είναι πολύ σημαντικά στο να οδηγήσουν τον κλάδο των υδατοκαλλιεργειών στην περαιτέρω μείωση των ιχθυαλεύρων, ιδιαίτερα αν αναλογιστεί κανείς ότι εφαρμόστηκαν στο νεαρό στάδιο ανάπτυξης της τσιπούρας (σωματικό μέγεθος 2-40 g) . Η εφαρμογή αυτών των αποτελεσμάτων στην πράξη με τη μείωση των ιχθυαλεύρων από ΜΖΠ-μη μηρυκαστικών στο σιτηρέσιο της τσιπούρας μπορεί να ενισχύσει την περιβαλλοντική βιωσιμότητα και την αποδοτικότητα της παραγωγής της, μειώνοντας ταυτόχρονα το κόστος παραγωγής της ιχθυοκαλλιεργητικής προσπάθειας.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- A.O.A.C (Assosiation of Official Agricultural Chemist) (). (1995). Official methods of analysis of AOAC international. Published by Journal of AOAC International, Eds. W, Horwitz, G.W.Lotimar. Maryland, USA, pp 82.
- Abd El-Rhman, A.M., Khattab, Y.A.E., Shalaby, A.M.E. (2009). *Micrococcus luteus* and *Pseudomonas* species as probiotics for promoting the growth performance and health of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. Fish Shellfish Immunol. 27, 175–180.
- Akayli, T., Albayrak, G., Ürkü, Ç., Çanak, Ö., Yörük, E. (2016). Characterization of *Micrococcus luteus* and *Bacillus marisflavi* recovered from common dentex (*Dentex dentex*) larviculture System. Mediterranean Marine Science 17, 163–169.
- Alami-Durante, H., Médale, F., Cluzeaud, M., Kaushik, S. J. (2010). Skeletal muscle growth dynamics and expression of related genes in white and red muscles of rainbow trout fed diets with graded levels of a mixture of plant protein sources as substitutes for fishmeal. Aquaculture, 303, 50-58.
- Alarcón, F.J., Moyano, F. J., Díaz, M., (1999). Effect of inhibitors present in protein sources on digestive proteases of juvenile sea bream (*Sparus aurata*). Aquatic Living Resources, 12, 233-238.
- Alexis, M. N. (1997). Fish meal and fish oil replacers in Mediterranean marine fish diets. In A. G. J. Tacon & B. Basurco (Eds.), Feeding tomorrow's fish (pp. 183-204). CIHEAM, Zaragoza, Spain.
- Aragão, C., Cabano, M., Colen, R., Fuentes, J., Dias, J. (2020). Alternative formulations for gilthead seabream diets: Towards a more sustainable production. Aquaculture Nutrition 26, 444-455.

- Arunlertaree, C., Rakyuttithamkul, E. (2006). Utilization of Fermented Feather Meal as a Replacement of Fish Meal in the Diet of Hybrid Clarias Catfish. *Natural Science*, 40, 436 – 448.
- Aydin, B., Gümüş, E., Balci, B.A.(2015). Effect of dietary fish meal replacement by poultry by-product meal on muscle fatty acid composition and liver histology of fry of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (Actinopterygii: Perciformes: Cichlidae). *Acta Ichthyologica et Piscatoria* 2015, 45, 343-351.
- Azizi, S., Nematollahi, M. A., Mojazi Amiri, B., Vélez, E. J., Lutfi, E., Navarro, I., Capilla, E., Gutiérrez, J. (2016). Lysine and leucine deficiencies affect myocytes development and IGF signaling in gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *PLoS ONE*, 11: e0147618.
- Baboli, M. J., Dawodi, M., Gorjipor, A. (2013). Effect of replacement fish meal by poultry meal on growth, survival and body composition of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *International Research Journal of Applied and Basic Sciences*, 4, 4197-4201.
- Baeza-Ariño, R., Martínez-Llorens, S., Nogales-Mérida, S., Jover-Cerda, M., Tomás-Vidal, A. (2016). Study of liver and gut alterations in sea bream, *Sparus aurata* L., fed a mixture of vegetable protein concentrates. *Aquaculture Research*, 47(2), 460–471.
- Bakke, I., Skjermo, J., Vo, T.A. & Vadstein, O. (2013) Live feed is not a major determinant of the microbiota associated with cod larvae (*Gadus morhua*). *Environ. Microbiol. Rep.* 5, 537–548.
- Barroso F.G., deHaro C., Sanchez-Muros M.J., Venegas E., Martinez-Sanchez A., Perez-Ban C. (2014). The potential of various insects species for use as food. *Aquaculture* 422–423, 193–201.
- Bell, J. G., Waagbø, R. (2008). Safe and nutritious aquaculture produce: Benefits and risks of alternative sustainable aquafeeds. *Aquaculture in the Ecosystem*, 185–225.

- Berillis, P., Mente, E. (2017). Histology of goblet cells in the intestine of the rainbow trout can lead to improvement of the feeding management. *Journal of Fisheries Sciences.com*, 11, 32-33.
- Bishop, C. D., Angus, R. A., Watts, S. A. (1995). The use of feather meal as a replacement for fish meal in the diet of *Oreochromis niloticus* fry. *Bioresource Technology*, 54, 291-295.
- Booth, M. A., Allan, G. L., Anderson A. J. (2012). Influence of poultry meal, meat meal or soybean meal inclusion on weight gain and production characteristics of Australian snapper *Pagrus auratus*. *Aquaculture International*, 20, 99-115.
- Bureau, D. P., Harris, A. M., Cho, C. Y. (1999). Apparent digestibility of rendered animal protein ingredients for rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture*, 180, 345–358.
- Bureau, D. P., Harris, A. M., Bedan, D. J., Simmons, L. A., Azevedo, P. A., Cho, C. Y. (2000). Feather meals and meat and bone meals from different origins as protein sources in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) diets. *Aquaculture*, 181, 281–291.
- Caballero, M.J., Izquierdo, M.S., Kjørsvik, E., Fernandez, A.J., Rosenlund, G., 2004. Histological alterations in the liver of sea bream, *Sparus aurata*, caused by short- or long-term feeding with vegetable oils. Recovery of normal morphology after feeding fish oil as the sole lipid source. *Journal of Fish Diseases* 27, 531-541.
- Campos, I., Matos, E., Marques, A., Valente, L. M. P. (2017). Hydrolyzed feather meal as a partial fishmeal replacement in diets for European seabass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles. *Aquaculture*, 476, 152-159.
- Cashion, T., Le Manach, F., Zeller, D., Pauly, D., 2017. Most fish destined for fishmeal production are food-grade fish. *Fish and Fisheries* 18, 837-844.
- Chaklader, Md.R., Siddik, M.A.B., Fotedar, R. (2020). Total replacement of fishmeal with poultry byproduct meal affected the growth, muscle quality, histological structure,

- antioxidant capacity and immune response of juvenile barramundi, *Lates calcarifer*. PLoS ONE, e0242079.
- Chowdhury, M.A., and D.P. Bureau. 2009. Predicting body composition of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). Asian Fisheries Science 22:597-605.
- Davies, S. J., Gouveia, A., Laporte, J., Woodgate, S. L., Nates, S. (2009). Nutrient digestibility profile of premium (category III grade) animal protein by-products for temperate marine fish species (European sea bass, gilthead sea bream and turbot). Aquaculture Research, 40(15), 1759–1769.
- Den Hartog, L.A., Sijtsma, S.R. (2013). Sustainable feed ingredients. Proceedings of the 12th International Symposium of Australian Renderers Association “Rendering for Sustainability”, Victoria, Australia, 23-26 July 2013, p. 18-26.
- Deplancke, B., Gaskins, H.R. (2001). Microbial modulation of innate defense: goblet cells and the intestinal mucus layer. The American Journal of Clinical Nutrition 2001, 73, 1131S-1141S.
- Dias, J., Alvarez, M. J., Arzel, J., Corraze, G., Diez, A., Bautista, J. M., & Kaushik, S. J. (2005). Dietary protein source affects lipid metabolism in the European seabass (*Dicentrarchus labrax*). Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology, 142, 19–31.
- Dvergedal, H., Sandve, S.R., Angell, I.L., Klemetsdal, G., Rudi, K. (2020). Association of gut microbiota with metabolism in juvenile Atlantic salmon. Microbiome 8, 160.
- EFSA Journal. (2011). Scientific Opinion on the revision of the quantitative risk assessment (QRA) of the BSE risk posed by processed animal proteins (PAPs). 9(1).
- El-Sayed, A., F., M., (1998). Total replacement of fish meal with animal protein sources in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L), feeds. Aquaculture Research, 29, 275–280.

- FAO (2020). The State of World Fisheries and Aquaculture 2020. Sustainability in action. Rome. <https://doi.org/10.4060/ca9229en> (πρόσβαση 29-3-2022).
- FAO (2022a). Cultured Aquatic Species Information Programme, *Sparus aurata* Linnaeus 1758. https://www.fao.org/fishery/en/culturedspecies/sparus_aurata/en (πρόσβαση 10-1-2022).
- FAO (2022b). Fishery and Aquaculture Statistics. Global aquaculture production 1950-2020 (FishStatJ), in: FAO Fisheries and Aquaculture Division [online]. Rome. Updated 2022. www.fao.org/fishery/statistics/software/fishstatj/en (πρόσβαση 29-3-2022).
- FAO (2022c). Food and Agricultural Organization: Gilthead seabream - Nutritional requirements. <https://www.fao.org/fishery/affris/species-profiles/gilthead-seabream/nutritional-requirements/en/> (πρόσβαση 29-3-2022).
- FAO/WHO (2010). Joint Expert Consultation on the Risks and Benefits of Fish Consumption. Executive Summary. 25-29 January 2010, Rome, Italy ftp://ftp.fao.org/FI/DOCUMENT/risk_consumption/executive_summary.pdf (πρόσβαση 11/10/2020)
- Fasakin, E. A., Serwata, R. D., Davies, S. J. (2005). Comparative utilization of rendered animal derived products with or without composite mixture of soybean meal in hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus* × *Oreochromis mossambicus*) diets. Aquaculture, 249, 329–338.
- Feedipedia (Animal Feed Resources Information System) (2021). Animal by-products. <https://www.feedipedia.org/content/feeds?category=13586> (πρόσβαση 11/10/2020).
- Ferguson, H.W. (2006). Systemic pathology of fish. A text and atlas of comparative tissue responses in diseases of teleosts. Scotian Press, 2nd edition, London, UK.
- Fontinha, F., Magalhaes, R., Moutinho, S., Santos, R., Campos, P., Serra, C. R., Aires, T., Oliva – Teles, A., Peres, H. (2021). Effect of dietary poultry meal and oil on growth,

- digestive capacity, and gut microbiota of gilthead seabream (*Sparus aurata*) juveniles. *Aquaculture*, 540.
- Fowler, L. G. (1990). Feather meal as a dietary protein source during parr-smolt transformation in fall Chinook salmon diets. *Aquaculture*, 89, 301-314.
- Francis, G., Makkar, H. P. S., Becker, K. (2001). Antinutritional factors present in plant-derived alternate fish feed ingredients and their effects in fish. *Aquaculture*, 199(3–4), 159-168.
- Fuertes, J. B., Celada, J. D., Carral, J. M., Sáez-Royuela, M., González- Rodríguez, Á. (2014). Effects of fishmeal replacement by feather meal in practical diets for juvenile crayfish (*Pacifastacus leniusculus* Dana, Astacidae). *Aquaculture Nutrition*, 20, 36-43.
- Gajardo, K., Jaramillo-Torres, A., Kortner, T.M., Merrifield, L., Tinsley, J., Bakke, A.M., Krogh, A. (2017). Alternative protein sources in the diet modulate microbiota and functionality in the distal intestine of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Applied and Environmental Microbiology* 83, e02615-16.
- Gallagher, M., LaDouceur, M. (1995). The use of blood Meal and poultry products as partial replacements for fish meal in diets for juvenile palmetto bass (*Morone saxatilis* × *M. chrysops*). *Journal of Applied Aquaculture*, 5, 57-65.
- Gardiner, W.R., and P. Geddes. 1980. The influence of body composition on the survival of juvenile salmon. *Hydrobiologia* 69, 67–72.
- Genten, F., Terwinghe, E., Danguy, A. (2009). *Atlas of fish histology*, 1st edition, CRC Press, Boca Raton, USA. p. 224.
- Gisbert, E., Nolasco, H., Solovyev, M. (2018). Towards the standardization of brush border purification and intestinal alkaline phosphatase quantification in fish with notes on other digestive enzymes. *Aquaculture*, 487, 102-108.
- Goddard, S. (1996). *Feed Management in Intensive Aquaculture*. Chapman and Hall, pp. 194.

- Gómez-Requeni, P., Calduch-Giner, J., Vega-Rubín de Celis, S., Médale, F., Kaushik, S. J., Pérez-Sánchez, J. (2005). Regulation of the somatotrophic axis by dietary factors in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *British Journal of Nutrition*, 94(3), 353–361.
- Gómez-Requeni, P., Mingarro, M., Calduch-Giner, J. A., Médale, F., Martin, S. A. M., Houlihan, D. F., Kaushik, S., Pérez-Sánchez, J. (2004). Protein growth performance, amino acid utilisation and somatotrophic axis responsiveness to fish meal replacement by plant protein sources in gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Aquaculture*, 232(1–4), 493–510.
- Gómez-Requeni, P., Mingarro, M., Kirchner, S., Calduch-Giner, J. A., Médale, F., Corraze, G., Panserat, S., Martin, S. A. M., Houlihan, D. F., Kaushik, S. J., & Pérez-Sánchez, J. (2003). Effects of dietary amino acid profile on growth performance, key metabolic enzymes and somatotrophic axis responsiveness of gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Aquaculture*, 220(1–4), 749–767.
- González-Rodríguez, A., Celada, J. D., Carral, J. M., Sáez-Royuela, M., García, V., Fuertes, J. B. (2016). Evaluation of poultry by-product meal as partial replacement of fish meal in practical diets for juvenile tench (*Tinca tinca* L.) *Aquaculture Research*, 47, 1612–1621.
- González-Rodríguez, Á., Celada, J. D., Carral, J. M., Sáez-Royuela, M., García, V., & Fuertes, J. B. (2014). Evaluation of soy protein concentrate as replacement of fish meal in practical diets for juvenile tench (*Tinca tinca* L.). *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 14(3), 807–815.
- Guillaume, J., Kaushik, S., Bergot, P. & Métailler R. (1999). *Nutrition et Alimentation des Poissons et Crustacés*. INRA Editions, Paris.
- Guillaume, J., Kaushik, S., Bergot, P., Metailler, R. (2001). *Nutrition and Feeding of Fish and Crustaceans*. Springer-Verlag London, pp. 408.

- Hartviksen, M., Vecino, J. L. G., Ringø, E., Bakke, A. M., Wadsworth, S., Krogdahl, Å., Ruohonen, K., Kettunen, A. (2014). Alternative dietary protein sources for Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) effect on intestinal microbiota, intestinal and liver histology and growth. *Aquaculture Nutrition*, 20(4), 381–398.
- Hasan, M. R., Haq, M. S., Das, P. M., Mowlag, G. (1997). Evaluation of poultry-feather meal as a dietary protein source for Indian major carp, *Labeo rohita* fry. *Aquaculture*, 151, 47-54.
- Hatlen, B., Oalnd, Ø., Tvenning, L., Breck, O., Jakobsen, J. V., Skarlet, J. (2013). Growth performance, feed utilization and product quality in slaughter size Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) fed a diet with porcine blood meal, poultry oil and salmon oil. *Aquaculture Nutrition*, 19, 573-584.
- Hatlen, B., Jakobsen, J. V., Crampton, V., Alm, M., Langmyhr, E., Espe, M., Hervøy, E. M., Torstensen, B. E., Liland, N., Waagbø, R. (2015). Growth, feed utilization and endocrine responses in Atlantic salmon (*Salmo salar*) fed diets added poultry by-product meal and blood meal in combination with poultry oil. *Aquaculture Nutrition*, 21, 714-725.
- Henry M., L. Gasco, G. Piccolo, and E. Fountoulaki (2015). Review on the use of insects in the diet of farmed fish: Past and future. *Animal Feed Science and Technology* 203, 1–22.
- Hernández, C., Migel, A. Olvera-Novoa., Aguilar-Vejar, K., González-Rodríguez, B., Abdo de la Parra, I. (2008). Partial replacement of fish meal by porcine meat meal in practical diets for Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Aquaculture Nutrition*, 20, 623–631.
- Hernández, C., Olvera-Novoa, M. A., Hardy, R. W., Hermosillo, A., Reyes, C., Gonzalez, B. (2010). Complete replacement of fish meal by porcine and poultry by-product meals in practical diets for fingerling Nile tilapia *Oreochromis niloticus*: Digestibility and growth performance. *Aquaculture Nutrition*, 16(1), 44–53.

- Hernández, C., Sanchez-Gutierrez, Y., Hardy, R. W, Benitez-Hernández, A., Domínguez-Jimenez, P., González-Rodríguez, B., Osuna-Osuna, L., Tortoledo, O. (2014). The potential of pet-grade poultry by-product meal to replace fish meal in the diet of the juvenile spotted rose snapper *Lutjanus guttatus* (Steindachner, 1869). *Aquaculture Nutrition*, 20, 623–631.
- Hodar, A.R., Vasana, R.J., Mahavadiya, D.R., Joshi, N. H. (2020). Fish meal and fish oil replacement for aqua feed formulation by using alternative sources: A review. *J. Exp. Zool. India* 23, 13-21.
- Houlihan, D., Boujard, T., Jobling, M. (2001). Food Intake in Fish. 2nd Edition, In: Published by Blackwell Science Ltd, London.
- Hu, H., Kortner, T. M., Gajardo, K., Chikwati, E., Tinsley, J., Kroghdahl, Å. (2016). Intestinal fluid permeability in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) is affected by dietary protein source. *PLoS ONE*, 11(12), e0167515.
- Hu, L., Yun, B., Xue, M., Wang, J., Wu, X., Zheng, Y., Han, F. (2013). Effects of fish meal quality and fish meal substitution by animal protein blend on growth performance, flesh quality and liver histology of Japanese seabass (*Lateolabrax japonicus*). *Aquaculture*, 372–375, 52–61.
- Huss, H.H. (1995). Quality and Quality changes in fresh fish. FAO Fisheries Technical paper No.348, Food and Agriculture Organization (FAO) of the United Nations, Rome, Italy, pp. 195.
- Ibeas, C., Izquierdo, M.S., Lorenzo, A., 1994. Effect of different levels of n – 3 highly unsaturated fatty acids on growth and fatty acid composition of juvenile gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Aquaculture* 127, 177–188.
- Jannathulla, R., Rajaram, V., Kalanjiam, R., Ambasankar, K., Muralidhar, M., Dayal, J. S. (2019). Fishmeal availability in the scenarios of climate change: Inevitability of fishmeal

- replacement in aquafeeds and approaches for the utilization of plant protein sources. *Aquaculture Research*, 50(12), 3493–3506.
- Johnson, R., Wolf, J., Braunbeck, T. (2009). OECD guidance document for the diagnosis of endocrine-related histopathology of fish gonads. Organization for Economic Co-operation and Development, 96.
- Karapanagiotidis I.T. (2014). The Re-Authorization of Non-Ruminant Processed Animal Proteins in European Aqua feeds. *Fisheries and Aquaculture Journal*, 5:4 <http://dx.doi.org/10.4172/2150-3508.1000e111>.
- Karapanagiotidis I.T., Daskalopoulou E., Vogiatzis I., Rumbos C., Mente E., Athanassiou C.G. (2015). *Hermetia illucens* prepupae meal as a protein source in the diet of gilthead seabream *Sparus aurata*. European Aquaculture Society, Rotterdam, The Netherlands, 20-23 October.
- Karapanagiotidis I.T. (2017). Nutrient profiles of tilapia. In: *Tilapia in Intensive Co-culture* (P. W. Perschbacher & R.R. Stickney, Eds). World Aquaculture Society Book series, John Wiley & Sons, pp. 261-305.
- Karapanagiotidis, I. T., Psoufakis, P., Mente, E., Malandrakis, E., & Golomazou, E. (2019). Effect of fishmeal replacement by poultry by-product meal on growth performance, proximate composition, digestive enzyme activity, haematological parameters and gene expression of gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Aquaculture Nutrition*, 25(1).
- Kaushik, S. J. (1998). Whole body amino acid composition of European seabass (*Dicentrarchus labrax*), gilthead seabream (*Sparus aurata*) and turbot (*Psetta maxima*) with an estimation of their IAA requirement profiles. *Aquatic Living Resources*, 11(5), 355–358.
- Kikuchi, K., Furuta, T., Honda, H. (1994). Utilization of feather meal as a protein source in the diet of juvenile Japanese flounder. *Fisheries Science*, 60, 203–206.

- Klaoudatos, S., Apostolopoulos, J. (1986). Food intake, growth maintenance and food conversion efficiency in the gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Aquaculture*, 51, 217–224.
- Kokou, F., Sarropoulou, E., Cotou, E., Rigos, G., Henr, M., Alexis, M., Kentouri, M. (2015). Effects of fish meal replacement by a soybean protein on growth, histology, selected immune and oxidative status markers of gilthead sea bream, (*Sparus aurata*). *Journal of the World Aquaculture Society*, 46, 115-128.
- Koven, W., Van Anholt, R., Lutzky, S., Atia, I. Ben, Nixon, O., Ron, B., & Tandler, A. (2002). The effect of dietary arachidonic acid on growth, survival, and cortisol levels in different-age gilthead seabream larvae (*Sparus auratus*) exposed to handling or daily salinity change. *Aquaculture*, 228(1–4), 307–320.
- Kroghdahl, A., Penn, M., Thorsen, J., Refstie, S., Bakke, A.M. (2010). Important antinutrients in plant feedstuffs for aquaculture: An up-date on recent findings regarding responses in salmonids. *Aquaculture Research*, 41, 333–344.
- Kumar, S., Sándor Zs, J., Nagy1, Z., Fazekas, G., Havasi, M., Sinha, A. K., De Boeck, G., Gál, D. (2017). Potential of processed animal protein versus soybean meal to replace fish meal in practical diets for European catfish (*Silurus glanis*): growth response and liver gene expression. *Aquaculture Nutrition*, 23, 1179-1189.
- Kumar, V., Makkar, H. P. S., Amselgruber, W., Becker, K. (2010). Physiological, haematological and histopathological responses in common carp (*Cyprinus carpio* L.) fingerlings fed with differently detoxified *Jatropha curcas* kernel meal. *Food and Chemical Toxicology*, 48(8–9), 2063–2072.
- Li, K., Wang, Y., Zheng, Z. X., Jiang, R. L., Xie, N. X. (2009). Replacing fishmeal with rendered animal protein ingredients in diets for Malabar grouper, (*Epinephelus malabaricus*), reared in net pens. *Journal of the World Aquaculture Society*, 40, 67-75.

- Li, M. H., Wise, D. J., Mischke, C. C., Lucas, P. M. (2016). Effects of dietary protein concentrations and sources on production characteristics of pond-raised hybrid catfish fingerlings. *North American Journal of Aquaculture*, 78, 295–300.
- Li, M. H., Wise, D. J., Mischke, C. C., Kumar, G., Greenway, T. E., Tiwari, A., Lucas, P. M. (2019). Reducing dietary protein concentrations and replacing fish meal with porcine meat and bone meal do not affect growth or feed conversion of pond-raised fingerling channel catfish, (*Ictalurus punctatus*). *World Aquaculture Society*, 1-19.
- Li, P. Y., Wang, J.-Y., Song, Z.-D., Zhang, L.-M., Zhang, H., Li, X.-X., & Pan, Q. (2017). Evaluation of soy protein concentrate as a substitute for fishmeal in diets for juvenile starry flounder (*Platichthys stellatus*). *Aquaculture*, 448, 578-585.
- Liland, N. S., Hatlen, B., Takle, H., Venegas, C., Espe, M., Torstensen, B. E., Waagbø, R. (2015). Including processed poultry and porcine by-products in diets high in plant ingredients reduced liver TAG in Atlantic salmon, (*Salmo salar* L). *Aquaculture Nutrition*, 21, 655-669.
- Lupatsch, I., Kissil, G. W. M., Sklan, D., Pfeffer, E. (1997). Apparent digestibility coefficients of feed ingredients and their predictability in compound diets for gilthead seabream, (*Sparus aurata* L). *Aquaculture Nutrition*, 3(2), 81–89.
- Lupatsch, I., & Kissil, G. W. (2005). Feed formulations based on energy and protein demands in white grouper (*Epinephelus aeneus*). *Aquaculture*, 248(1–4), 83–95.
- Ma, X., Wang, F., Han, H., Wang, Y., Lin, Y. (2014). Replacement of dietary fish meal with poultry by-product meal and soybean meal for golden pompano, (*Trachinotus ovatus*), reared in net pens. *Journal of the World Aquaculture Society*, 45, 662-671.
- Maiolo, S., Cristiano, S., Gonella, F., Pastres, R. (2021). Ecological sustainability of aquafeed: An emergy assessment of novel or underexploited ingredients. *Journal of Cleaner Production* 294, 126266.

- Makkar, H.P.S., Tran, G., Heuze, V., Ankers, P. (2014). State of the art on use of insects as animal feed. *Anim. Feed Sci. Technol.* 197, 1–33.
- Marcouli, P., Alexis, M. N., Andriopoulou, A., Iliopoulou-Georgudaki, J. (2005). Amino acid nutrition of gilthead seabream *Sparus aurata* juveniles: preliminary results on dietary lysine and methionine requirements. *Cahiers Options Méditerranéennes*, 63, 67–71.
- Martínez-Llorens, S., Vidal, A. T., Monino, A. V., Gómez Ader, J., Torres, M. P., Cerdá, M. J. (2008). Blood and haemoglobin meal as protein sources in diets for gilthead sea bream (*Sparus aurata*): effects on growth, nutritive efficiency and fillet sensory differences. *Aquaculture Research*, 39, 1028–1037.
- Martínez-Llorens, S., Baeza-Ariño, R., Nogales-Mérida, S., Jover-Cerdá, M., Tomás-Vidal, A. (2012). Carob seed germ meal as a partial substitute in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) diets: Amino acid retention, digestibility, gut and liver histology. *Aquaculture* 338-341, 124–133.
- Masagounder, K., Hayward, S. I., Firman, J. D. (2014). Replacing fish meal with increasing levels of meat and bone meal, soybean meal and corn gluten meal, in diets of juvenile bluegill, *Lepomis macrochirus*. *Aquaculture Research*, 45, 1202–1211.
- Matos, E., Dias, J., Dinis, M.T., Silva, T.S., 2016. Sustainability vs. quality in gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) farming: are trade-offs inevitable? *Reviews in Aquaculture* 9, 388-409.
- Metochis, C. P., Crampton, V. O., Ruohonen, K., El-Mowafi, A., Bell, G. J., Adams, A., Thompson, K. D. (2017). Effects of marine protein-, marine oil- and marine-free diets on the growth performance and innate immune responses of Atlantic salmon (*Salmo salar*, L.) post-smolts. *Aquaculture Research*, 48, 2495-2515.
- Moutinho, S., Peres, H., Serra, C., Martínez-Llorens, S., Tomás-Vidal, A., Jover-Cerdá, M., Oliva-Teles, A. (2017). Meat and bone meal as partial replacement of fishmeal in diets

- for gilthead sea bream (*Sparus aurata*) juveniles: Diets digestibility, digestive function, and microbiota modulation. *Aquaculture*, 479, 721-731.
- Mulazzani, L., Madau, F.A., Pulina, P., Malorgio, G. (2021). Acceptance of insect meal in aquaculture feeding: A stakeholder analysis for the Italian supply chains of trout and seabass. *Journal of the World Aquaculture Society* 52, 378-394.
- Nengas, I., Alexis, M., Davies, S. J., Petichakis, G. (1995). Investigation to determine digestibility coefficients of various raw materials in diets for gilthead seabream, (*Sparus aurata* L). *Aquaculture Research*, 26(3), 185–194.
- Nengas, I., Alexis, M. N., Davies, S. J. (1999). High inclusion levels of poultry meals and related byproducts in diets for gilthead seabream (*Sparus aurata* L). *Aquaculture*, 179, 13–23.
- Nijdam, D., Rood, T., Westhoek, H. (2012). The price of protein: Review of land use and carbon footprints from life cycle assessments of animal food products and their substitutes. *Food Policy* 37, 760e770.
- Nogueira, N., Cordeiro, N., Andrade, C. Aires, T. (2012). Inclusion of low levels of blood and feathermeal in practical diets for gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 12, 641-650.
- Nollet, L., Toldra, F. (2012). *Food for analysis by HPLC*. CRC Press, 3rd edition, Boca Raton, London.
- Oliva-Teles, A. (2000). Recent advances in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*), and gilthead seabream (*Sparus aurata*) nutrition. *Aquaculture International*, 8, 477–492.
- Oliva-Teles, A., Enes, P., Peres, H. (2015). 8 - Replacing fishmeal and fish oil in industrial aquafeeds for carnivorous fish. *Feed and Feeding Practices in Aquaculture*. In: “Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition, N. 287” Davis, D.A. (Ed.), 203-233.

- Panicz, R. (2016). Validation of reference genes for RT-qPCR analysis of growth hormone receptor and growth hormone expression in the tench (*Tinca tinca*) fed substituting poultry meal for fish meal. *Aquaculture*, 465, 179-188.
- Panicz, R., Zochowska-Kujawska, J., Sadowski, J., Sobczak, M. (2017). Effect of feeding various levels of poultry by-product meal on the blood parameters, filet composition and structure of female tenches (*Tinca tinca*). *Aquaculture Research*, 48, 5373-5384.
- Parés-Sierra, G., Durazo, E., Ponce, M. A., Badillo, D., Correa-Reyes, G., Viana, M. T. (2014). Partial to total replacement of fishmeal by poultry by-product meal in diets for juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and their effect on fatty acids from muscle tissue and the time required to retrieve the effect. *Aquaculture Research*, 45(9), 1459–1469.
- Pavlidis, M.A., Mylonas, C.C. (2011). Sparidae: Biology and aquaculture of gilthead sea bream and other species. Blackwell Publishing Ltd., p. 390.
- Pereira, T. G., Oliva-Teles, A. (2002). Preliminary evaluation of pea seed meal in diets for gilthead seabream (*Sparus aurata*) juveniles. *Aquaculture Research*, 33(14), 1183–1189.
- Peres, H., Oliva-Teles, A. (2006). Effect of the dietary essential to non-essential amino acid ratio on growth, feed utilization and nitrogen metabolism of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture*, 256, 395-402.
- Peres, H., Oliva-Teles, A. (2009). The optimum dietary essential amino acid profile for gilthead seabream (*Sparus aurata*) juveniles. *Aquaculture*, 296(1–2), 81–86.
- Perry, W.B.; Lindsay, E.; Payne, C.J.; Brodie, C.; Kazlauskaitė, R. (2020). The role of the gut microbiome in sustainable teleost aquaculture. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 287: 20200184.
- Pfeffer, E., Wiesmann, D., Henrichfreise, B. (1994). Hydrolyzed feather meal as feed component in diets for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and effects of dietary

- protein energy ratio on the efficiency of utilization of digestible energy and protein. Archives of Animal Nutrition, 46, 111–119.
- Piccolo, G., Laconisi, V., Marono, S., Gasco, L., Loponte, R., Nissa, S., Bovera, F., Parisi, G. (2017). Effect of *Tenebrio molitor* larvae meal on growth performance, in vivo nutrients digestibility, somatic and marketable indexes of gilthead sea bream (*Sparus aurata*). Animal Feed Science and Technology 226 (2017) 12–20.
- Poppi, D. A., Quinton, V. M., Hua, K. Bureau, D. P. (2011). Development of a test diet for assessing the bioavailability of arginine in feather meal fed to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquaculture, 314, 100-109.
- Psafakis, P., Karapanagiotidis, I. T., Malandrakis, E. E., Golomazou, E., Exadactylos, A., Mente, E. (2020). Effect of fishmeal replacement by hydrolyzed feather meal on growth performance, proximate composition, digestive enzyme activity, haematological parameters and growth-related gene expression of gilthead seabream (*Sparus aurata*). Aquaculture, 521(June 2019), 735006.
- Psafakis, P., Meziti, A., Berillis, P., Mente E., Kormas, K.A., Karapanagiotidis, I.T. (2021). Effects of dietary fishmeal replacement by poultry by-product meal and hydrolyzed feather meal on liver and intestinal histomorphology and on intestinal microbiota of gilthead seabream (*Sparus aurata*). Applied Sciences (Switzerland) 11(19), 8806.
- Pusztai, A., Bardocz, S. (2006). Biology of growing animals. Chapter 17 GMO in animal nutrition: potential benefits and risks. Volume 4, 513-540.
- Rawles, S. D., Riche, M., Gaylord, T. G., Webb, J., Freeman, D. W., Davis, M. (2006). Evaluation of poultry by-product meal in commercial diets for hybrid striped bass (*Morone chrysops* ♀ × *M. saxatilis* ♂) in recirculated tank production. Aquaculture, 259, 377-389.

- Rawles, S. D., Thompson, K. R., Brady, Y. J., Metts, L. S., Aksoy, M. Y., Gannam, A. L., Twibell, R. G., Ostrand, S., Webster, C. D. (2011). Effects of replacing fish meal with poultry by-product meal and soybean meal and reduced protein level on the performance and immune status of pond-grown sunshine bass (*Morone chrysops* × *M. saxatilis*). *Aquaculture Nutrition*, 17, e708-e721.
- Ray, A.K., Ghosh, K., Ringø, E. (2012). Enzyme-producing bacteria isolated from fish gut: a review. *Aquaculture Nutrition*, 18, 465–492.
- Render (2017). European production stays on track. RENDER, The International Magazine of Rendering, August Issue, 12-13. www.rendermagazine.com (πρόσβαση 15-7-2020).
- Robaina, L., Moyano, F. J., Izquierdo, M. S., Socorro, J., Vergara, J. M., Montero, D. (1997). Corn gluten and meat and bone meals as protein sources in diets for gilthead seabream (*Sparus aurata*): nutritional and histological implications. *Aquaculture*, 157, 347–359.
- Rolland, M., Dalsgaard, J., Holm, J., Gómez-Requeni, P., & Skov, P. V. (2015). Dietary methionine level affects growth performance and hepatic gene expression of GH-IGF system and protein turnover regulators in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed plant protein-based diets. *Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology*, 181, 33-41.
- Rossi, W., Davis, D. A. (2012). Replacement of fishmeal with poultry by-product meal in the diet of Florida pompano (*Trachinotus carolinus*) L. *Aquaculture*, 338–341, 160–166.
- Rumbos, C.I., Mente, E., Karapanagiotidis, I.T., Vlontzos, G., Athanassiou, C.G. (2021). Insect-based feed ingredients for aquaculture: A case study for their acceptance in Greece. *Insects* 12, 586.
- Sabbagh, M., Schiavone, R., Brizzi, G., Sicuro, B., Zilli, L., Vilella, S. (2019). Poultry by-product meal as an alternative to fish meal in the juvenile gilthead seabream (*Sparus aurata*) diet. *Aquaculture*, 511, 734220.

- Sanchez-Muros, M.-J., Barroso, F.G., Manzano-Agugliaro, F. (2014). Insect meal as renewable source of food for animal feeding: a review. *J. Clean. Prod.* 65, 16–27
- Sealey, W.M., Gaylord, T.G., Barrows, F.T., Ross, C., St-Hilaire, S. (2011). Sensory analysis of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, fed enriched black soldier fly prepupae, *Hermetia illucens*. *Journal of the World Aquaculture Society* 42, 34-45.
- Shapawi, R., Ng, W.-K., Mustafa, S. (2007). Replacement of fish meal with poultry by-product meal in diets formulated for the humpback grouper, *Cromileptes altivelis*. *Aquaculture*, 273, 118-126.
- Shearer, K.D. (1994). Factors affecting the proximate composition of cultured fishes with emphasis on salmonids. *Aquaculture* 119, 63-88.
- Siddik, M.A.B.; Chungu, P.; Fotedar, R.; Howieson, J. (2017). Bioprocessed poultry by-product meals on growth, gut health and fatty acid synthesis of juvenile barramundi, *Lates calcarifer* (Bloch). *PLoS ONE*, 14, e0215025.
- Silva, F. C. P., Nicoli, J. R., Zambonino-Infante, J. L., Le Gall, M. M., Kaushik, S., Gatesoupe, F. J. (2010). Influence of partial substitution of dietary fish meal on the activity of digestive enzymes in the intestinal brush border membrane of gilthead sea bream, *Sparus aurata* and goldfish, *Carassius auratus*. *Aquaculture*, 306, 233–237.
- Sitjà-Bobadilla, A., Peña-Llopis, S., Gómez-Requeni, P., Médale, F., Kaushik, S., Pérez-Sánchez, J. (2005). Effect of fish meal replacement by plant protein sources on non-specific defence mechanisms and oxidative stress in gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Aquaculture*, 249(1–4), 387–400.
- Spisni, E., Tugnoli M., Ponticelli A., Mordenti T., Tomasi, V. (1998). Hepatic steatosis in artificially fed marine teleosts. *Journal of Fish Diseases*, 21, 177–184.
- Steffens, W. (1994). Replacing fish meal with poultry by-product meal in diets for rainbow trout, (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 124, 27–34.

- Subhadra, B., Lochmann, R., Rawles, S., Chen, R. (2006). Effect of dietary lipid source on the growth, tissue composition and hematological parameters of largemouth bass (*Micropterus salmoides*). *Aquaculture*, 255(1–4), 210–222.
- Tacchi, L., Secombes, C. J., Bickerdike, R., Adler, M. A., Venegas, C., Takle, H., Martin, S. A. (2012). Transcriptomic and physiological responses to fishmeal substitution with plant proteins in formulated feed in farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*). *BMC Genomics*, 13, 363.
- Tacon, A. G. J., Metian, M. (2008). Global overview on the use of fish meal and fish oil in industrially compounded aquafeeds: Trends and future prospects. *Aquaculture*, 285(1–4), 146–158.
- Tacon, A.G.J., Hasan, M.R., Allan, G., El-Sayed, A.-F., Jackson, A., Kaushik, S.J., Ng, W-K., Suresh, V. & Viana, M.T. (2012). Aquaculture feeds: addressing the longterm sustainability of the sector. In R.P. Subasinghe, J.R. Arthur, D.M. Bartley, S.S. De Silva, M. Halwart, N. Hishamunda, C.V. Mohan & P. Sorgeloos, eds. *Farming the Waters for People and Food. Proceedings of the Global Conference on Aquaculture 2010*, Phuket, Thailand. 22–25 September 2010. pp. 193–231. FAO, Rome and NACA, Bangkok.
- Tapia-Paniagua, S. T., Balebona, M. C., Firmino, J. P., Rodríguez, C., Polo, J., Moriñigo, M. A., Gisbert, E. (2019). The effect of spray-dried porcine plasma on gilthead seabream (*Sparus aurata*) intestinal microbiota. *Aquaculture Nutrition*, 26, 801–811.
- Thorpe, J.E., Mangel, N.B., Metcalfe, F.A., Hungerford (1998). Modelling the proximate basis of salmonid life-history variation, with application to Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Evolutionary Ecology* 12, 581–599.
- Tibaldi, E., Kaushik, S. J. (2005). Amino acid requirements of Mediterranean fish species. *Cahiers Options Méditerranéennes*, Volume 63, 59-65.

- Vélez-Calabria, G., Martínez-Llorens, S., Milián-Sorribes, M. C., Jauralde, I., Jover-Cerdá, M., Tomás-Vidal, A. (2021). Fishmeal substitution by Iberian pig meal and vegetable proteins blend and inclusion of *Isochrysis* aff. *galbana* (T-Iso) in diets for gilthead seabream (*Sparus aurata* L.): Effects on growth and feed utilization efficiency. *Aquaculture Nutrition*, 00, 1–13.
- Wang, J., Yun, B., Xue, M., Wu, X., Zheng, Y., Li, P. (2012). Apparent digestibility coefficients of several protein sources, and replacement of fishmeal by porcine meal in diets of Japanese seabass, (*Lateolabrax japonicus*), are affected by dietary protein levels. *Aquaculture Research*, 43, 117–127.
- Wang, Y., Kong, L., Li, C., Bureau, D. P. (2010). The potential of land animal protein ingredients to replace fish meal in diets for cuneate drum, (*Nibea miichthioides*), affected by dietary protein level. *Aquaculture Nutrition*, 16, 37–43.
- Watanabe, T., Aoki, H., Shimamoto, K., Hadzuma, M., Maita, M., Yamagata, Y., Kiron, V., Satoh, S. (1998). A trial to culture yellowtail with non-fishmeal diets. *Fisheries science*, 64(4), 505-512.
- Wu, S., Ren, Y., Peng, C., Hao, Y., Xiong, F., Wang, G. (2015). Metatranscriptomic discovery of plant biomass-degrading capacity from grass carp intestinal microbiomes. *FEMS Microbiology Ecology*, 91, fiv107.
- Xue, M., Yun, B., Wang, J., Sheng, H., Zheng, Y., Wu, X., Qin, Y. Li, P. (2012). Performance, body compositions, input and output of nitrogen and phosphorus in Siberian sturgeon, *Acipenser baerii* Brandt, as affected by dietary animal protein blend preplacing fishmeal and protein levels. *Aquaculture Nutrition*, 18, 493-501.
- Ye, H., Zhou, Y., Su, N., Wang, A., Tan, X., Sun, Z., Zou, C., Liu, Q., Ye, C. (2019). Effects of replacing fish meal with rendered animal protein blend on growth performance,

- hepatic steatosis and immune status in hybrid grouper (*Epinephelus fuscoguttatus*♀ × *Epinephelus lanceolatus*♂). *Aquaculture*, 511, 734203.
- Yigit, M., Erdem, M., Koshio, S., Ergun, S., Turker, A., Karaali, B. (2006). Substituting fish meal with poultry by-product meal in diets for black Sea turbot (*Psetta maeotica*). *Aquaculture Nutrition*, 12, 340–347.
- Yu, H. R., Zhang, Q., Cao, H., Wang, X. Z., Huang, G. Q., Zhang, B. R., Fan, J. J., Liu, S. W., Li, W. Z., Cui, Y. (2013). Apparent digestibility coefficients of selected feed ingredients for juvenile snakehead, (*Ophiocephalus argus*). *Aquaculture Nutrition*, 19(2), 139–147.
- Yu, M., Li, Z., Chen, W., Rong, T., Wang, G., Wang, F., Ma, X. (2020). Evaluation of full-fat *Hermetia illucens* larvae meal as a fishmeal replacement for weanling piglets: Effects on the growth performance, apparent nutrient digestibility, blood parameters and gut morphology. *Animal Feed Science and Technology*, 264, 114431.
- Yu, Y. (2008). Replacement of fishmeal with poultry byproduct meal and meat and bone meal in shrimp, tilapia and trout diets. *International symposium of nutrition Acicula*, 16-19.
- Zapata, D. B., Lazo, J. P., Herzka, S. Z., Viana, M. T. (2016). The effect of substituting fishmeal with poultry by-product meal in diets for totoaba juveniles (*Totoaba macdonaldi*). *Aquaculture Research*, 47(6), 1778–1789.
- Zar, J. H. (1999). *Biostatistical analysis*, 4th edition. Prentice-Hall, Upper Saddle River Cliffs N.J 3:167-186.
- Zhao, W., Lu, L., Tang, Y. (2010). Research and application progress of insect antimicrobial peptides on food industry. *Int. J. Food. Eng.* 6, Article 10.
- Zhou, Q. C., Zhao, J., Li, P., Wang, H. L., Wang, L. G. (2011). Evaluation of poultry by-product meal in commercial diets for juvenile cobia (*Rachycentron canadum*). *Aquaculture*, 322–323, 122–127.
- Zhu, H., Gong, G., Wang, J., Wu, X., Xue, M., Niu, C.,

- Guo, L., & Yu, Y. (2011). Replacement of fish meal with blend of rendered animal protein in diets for Siberian sturgeon (*Acipenser baerii* Brandt), results in performance equal to fish meal fed fish. *Aquaculture Nutrition*, 17, e389-395.
- Zhou, Z., Yao, W., Ye, B., Wu, X., Li, X., Dong, Y. (2020). Effects of replacing fishmeal protein with poultry by-product meal protein and soybean meal protein on growth, feed intake, feed utilization, gut and liver histology of hybrid grouper (*Epinephelus fuscoguttatus* ♀ × *Epinephelus lanceolatus* ♂) juveniles. *Aquaculture*, 516, 734503.

Ελληνική Βιβλιογραφία

- Βερίλλης, Π., Μεντέ, Ε. (2017). Ιστοφυσιολογία Ιχθύων και Καρκινοειδών. Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Θεσσαλίας, σελ. 196-197. Κανονισμός της Ευρωπαϊκής Επιτροπής (56/2013). Κανονισμός της Ευρωπαϊκής Επιτροπής για τη θέσπιση κανόνων πρόληψης, καταπολέμησης και εξάλειψης ορισμένων μεταδοτικών σπογγωδών εγκεφαλοπαθειών.
- Κανονισμός της Ευρωπαϊκής Επιτροπής (2017/893). Κανονισμός της Ευρωπαϊκής Επιτροπής για την τροποποίηση των παραρτημάτων I και IV του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 999/2001 του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου και των παραρτημάτων X, XIV και XV του κανονισμού (ΕΕ) αριθ. 142/2011 της Επιτροπής όσον αφορά τις διατάξεις για τη μεταποιημένη ζωική πρωτεΐνη.
- Καραπαναγιωτίδης Ι. (2018). Σημειώσεις του μαθήματος «Διατροφή Υδρόβιων Ζωικών Οργανισμών» του Τμήματος Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, σελ. 117. https://eclass.uth.gr/courses/DIAE_U_126/ (πρόσβαση 10-12-2020).
- Καραπαναγιωτίδης, Ι.Θ. (2011). 5^ο Κεφάλαιο, Λιπίδια. Στο: “Στοιχεία φυσιολογίας θρέψεως και εφαρμοσμένη διατροφή ιχθύων και καρκινοειδών”, Μεντέ, Ε. & Νέγκας, Ι., Εκδόσεις Παπαζήση ΑΕΒΕ, Αθήνα, σελ. 163-250.

- Μεντέ, Ε., Νέγκας, Ι. (2011). Στοιχεία Φυσιολογίας Θρέψεως και Εφαρμοσμένη Διατροφή Ιχθύων και Καρκινοειδών. Εκδόσεις Παπαζήση, σελ. 163-250.
- Νεοφύτου Χ.Ν. (2015). Βιολογία ιχθύων και θαλάσσιων θηλαστικών. University Studio Press, Θεσσαλονίκη, σελ. 599.
- Παπουτσόγλου Σ.Ε. (2008) Διατροφή ιχθύων. Εκδόσεις Σταμούλη, Αθήνα, σελ. 846 – 863.
- Χώτος, Γ. Ν. (2005). Υδατοκαλλιέργειες ευρύαλων ψαριών. Εκδόσεις Ίων, σελ. 451.

Ηλεκτρονική Βιβλιογραφία

- Σύνδεσμος Ελληνικών Θαλασσοκαλλιεργειών (ΣΕΘ) (2020). Ελληνική υδατοκαλλιέργεια.
https://www.fgm.com.gr/uploads/file/FGM_20_GR_WEB2.pdf .

Ιστοσελίδες

www.merieuxnutrisciences.it

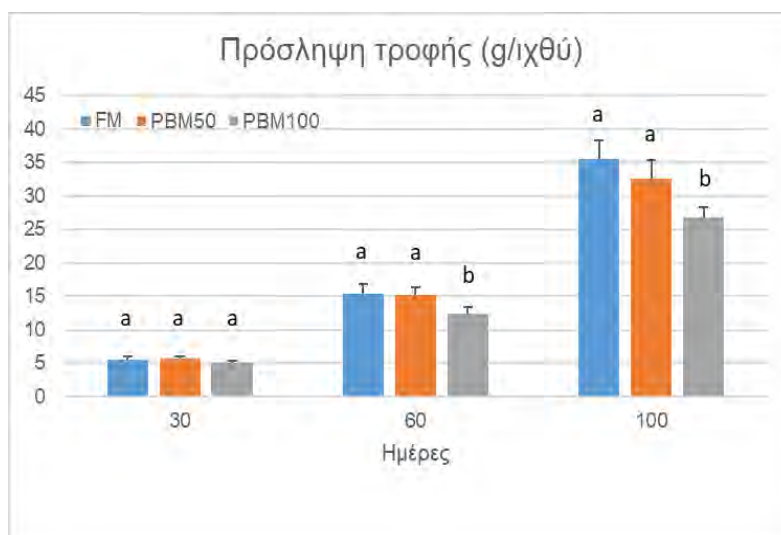
www.eurofins.dk

Παράρτημα

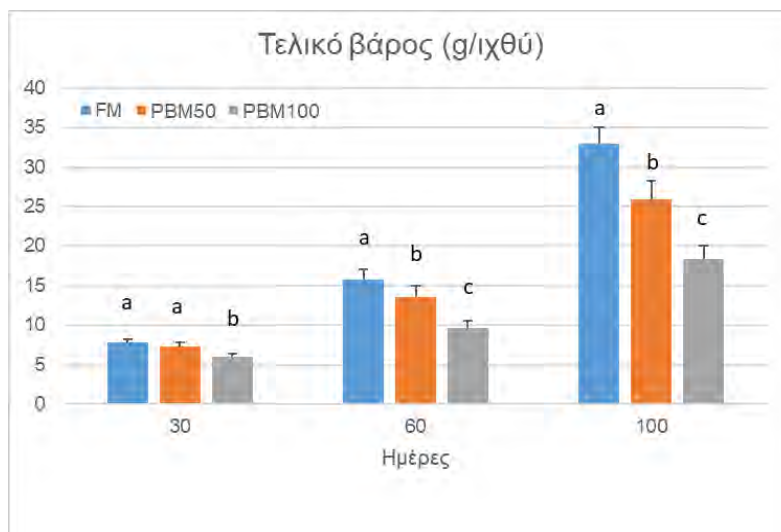
Διαγράμματα αποτελεσμάτων 1^{ου} διατροφικού πειράματος

Παράμετροι ανάπτυξης, αξιοποίησης τροφής, και μορφομετρικά χαρακτηριστικά των ιχθυδίων τσιπούρας για τη μερική (50%) και ολική (100%) αντικατάσταση του ιχθυαλεύρου από άλευρο υποπροϊόντων πουλερικών.

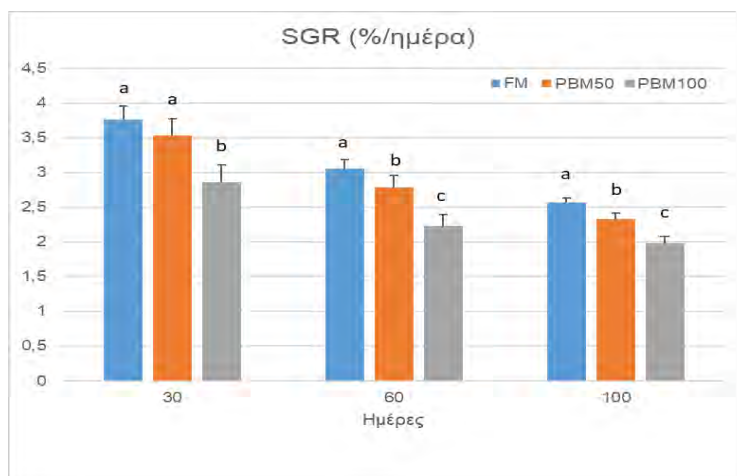
Διάγραμμα 1.1: Αποτελέσματα πρόσληψης τροφής για 30, 60 και 100 ημέρες πειράματος



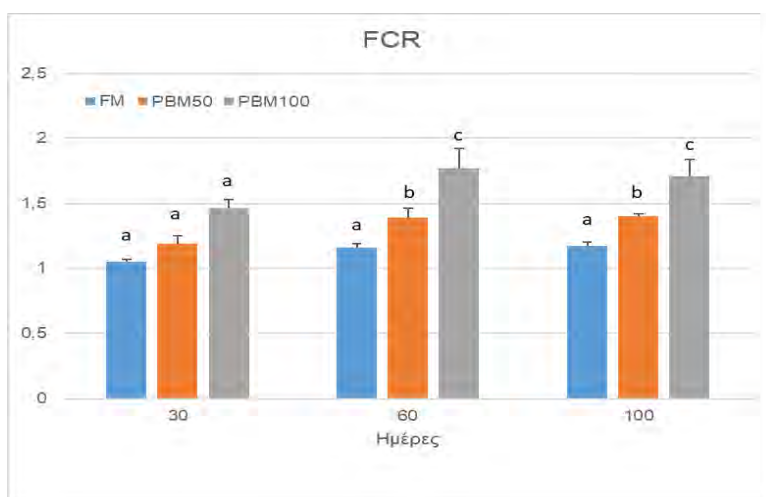
Διάγραμμα 1.2: Αποτελέσματα τελικού βάρους για 30, 60 και 100 ημέρες πειράματος



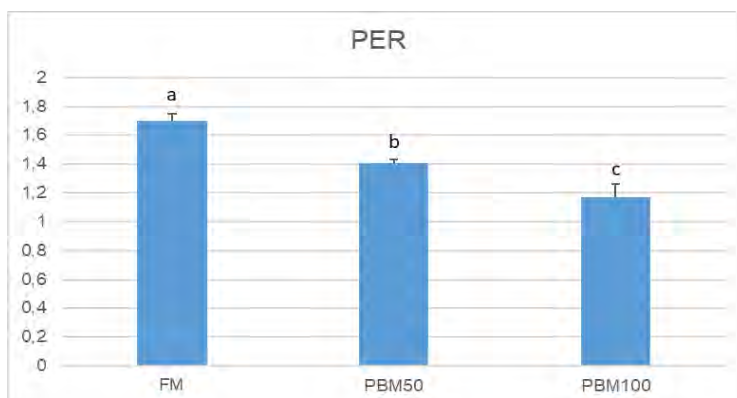
Διάγραμμα 1.3: Αποτελέσματα του ειδικού ρυθμού ανάπτυξης (SGR) για 30, 60 και 100 ημέρες πειράματος



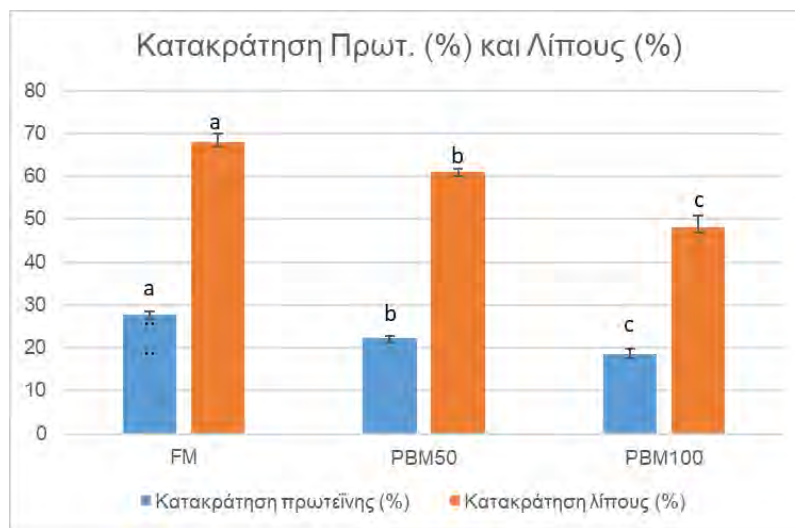
Διάγραμμα 1.4: Αποτελέσματα του συντελεστή μετατρεψιμότητας της τροφής (FCR) για 30, 60 και 100 ημέρες πειράματος



Διάγραμμα 1.5: Αποτελέσματα του δείκτη αποδοτικότητας της πρωτεΐνης (PER) για 100 ημέρες πειράματος

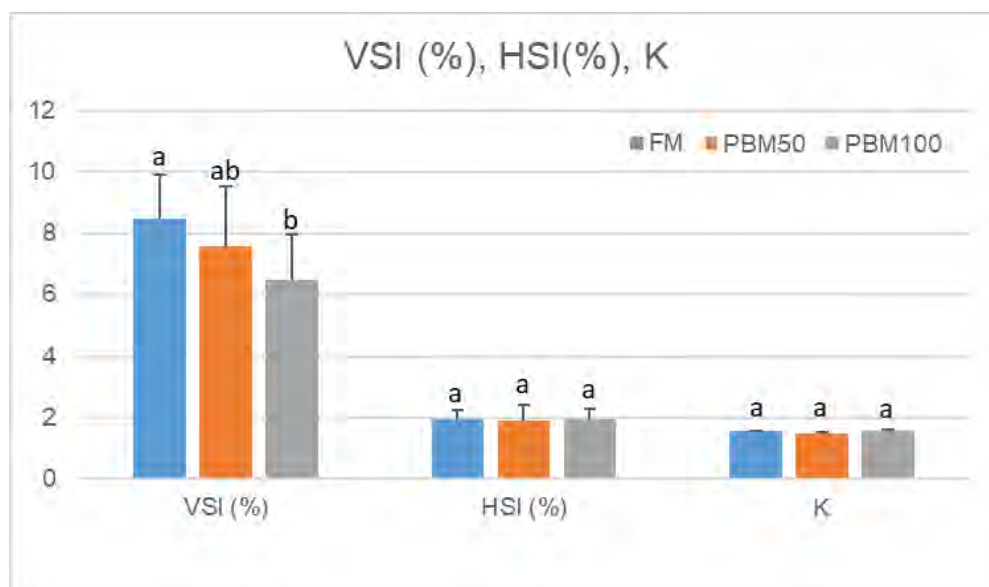


Διάγραμμα 1.6: Αποτελέσματα στους δείκτες κατακράτησης πρωτεΐνης και λίπους για 100 ημέρες πειράματος



Σωματομετρικοί δείκτες 1^{ου} διατροφικού πειράματος

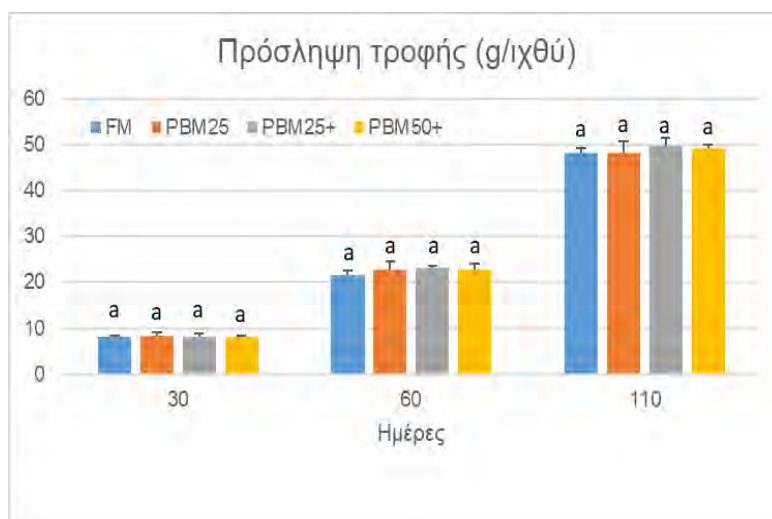
Διάγραμμα 1.7: Αποτελέσματα του ενδοσπλαχνικού (VSI %), ηπατοσωματικού δείκτη (HSI %) και του δείκτη ευρωστίας (K) για 100 ημέρες πειράματος



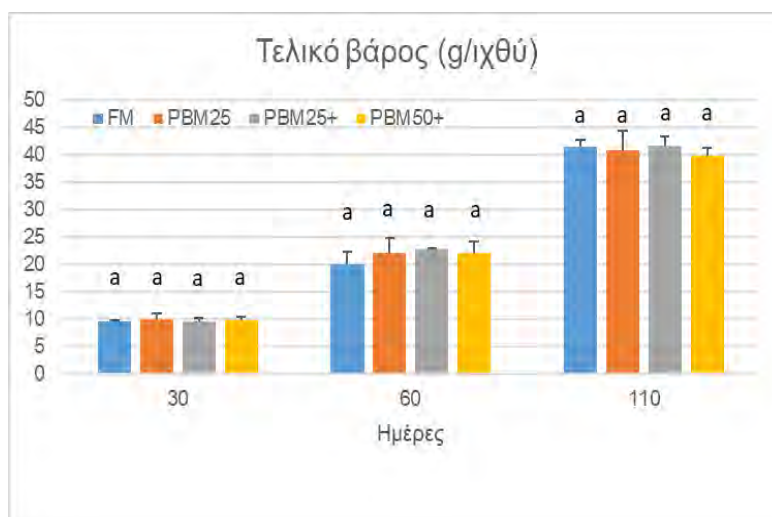
Διαγράμματα αποτελεσμάτων 2^{ου} διατροφικού πειράματος

Παράμετροι ανάπτυξης των ιχθυδίων τσιπούρας & αξιοποίησης τροφής από τη μερική (25% και 50%) αντικατάσταση του ιχθυαλεύρου από άλευρο υποπροϊόντων πουλερικών με ταυτόχρονη εξισορρόπηση σε αμινοξέα.

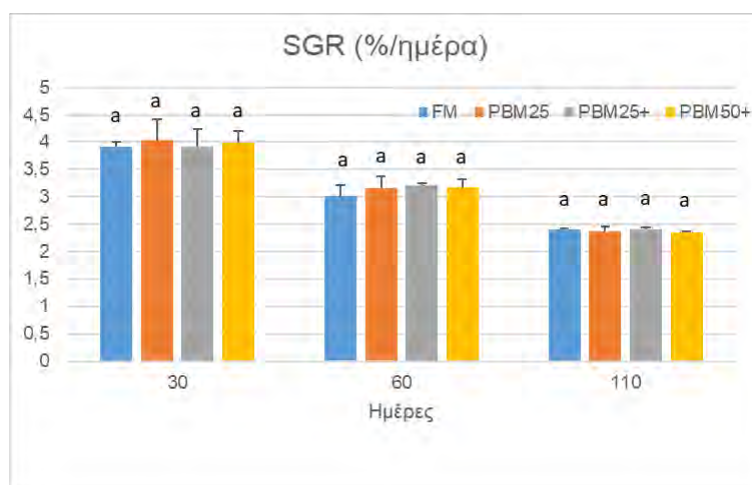
Διάγραμμα 2.1: Αποτελέσματα πρόσληψης τροφής για 30, 60 και 110 ημέρες πειράματος



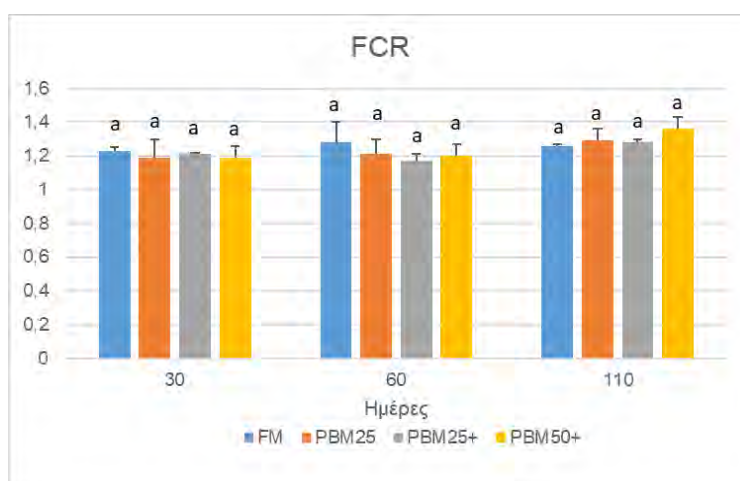
Διάγραμμα 2.2: Αποτελέσματα τελικού βάρους για 30, 60 και 110 ημέρες πειράματος



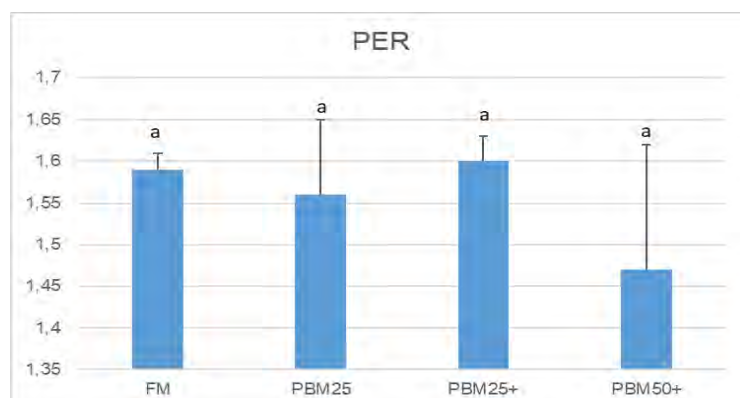
Διάγραμμα 2.3: Αποτελέσματα του ειδικού ρυθμού ανάπτυξης (SGR) για 30, 60 και 110 ημέρες πειράματος



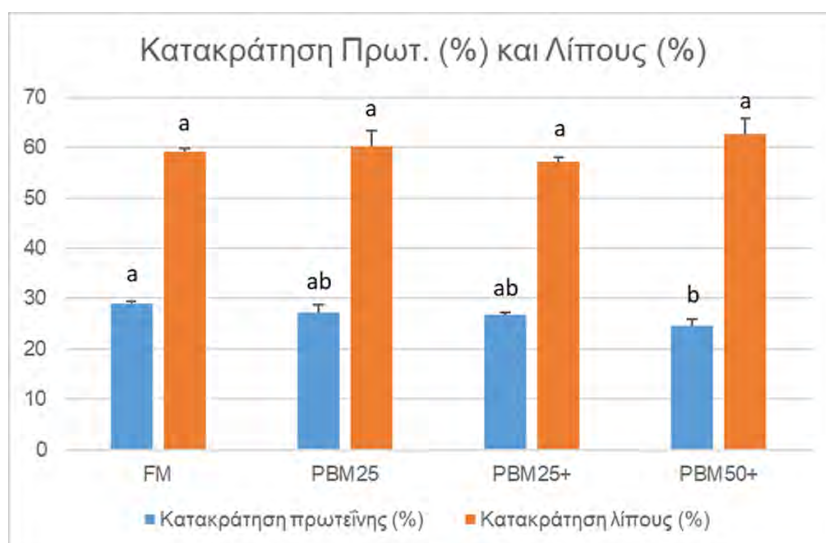
Διάγραμμα 2.4: Αποτελέσματα του συντελεστή μετατρεψιμότητας της τροφής (FCR) για 30, 60 και 110 ημέρες πειράματος



Διάγραμμα 2.5: Αποτελέσματα του δείκτη αποδοτικότητας της πρωτεΐνης (PER) για 110 ημέρες πειράματος

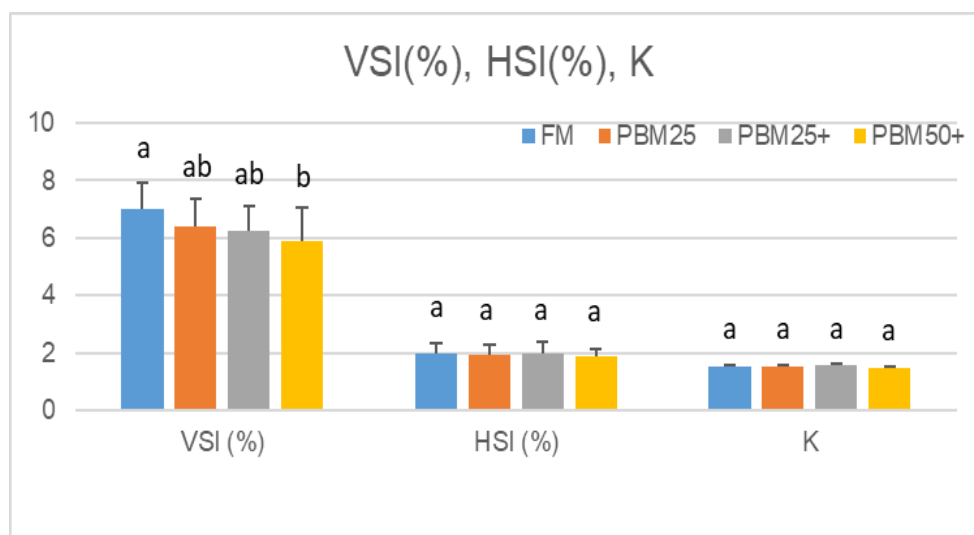


Διάγραμμα 2.6: Αποτελέσματα στους δείκτες κατακράτησης πρωτεΐνης και λίπους για 110 ημέρες πειράματος



Σωματομετρικοί δείκτες 2^{ου} διατροφικού πειράματος

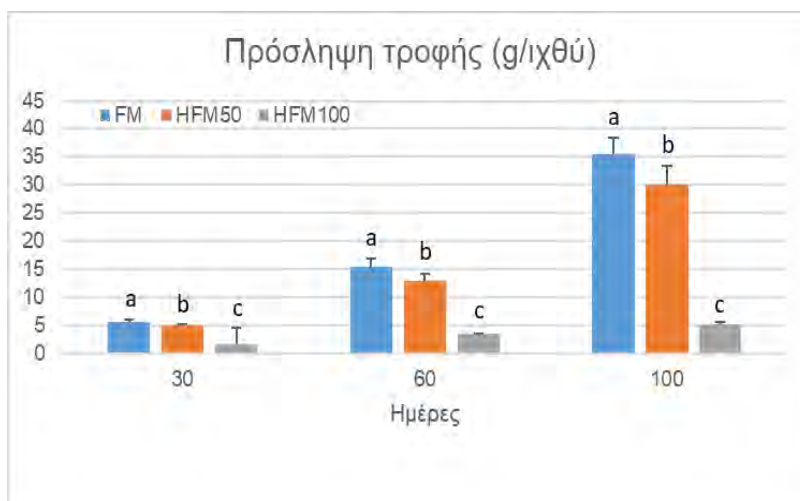
Διάγραμμα 2.7: Αποτελέσματα του ενδοσπλαχνικού (VSI %), ηπατοσωματικού δείκτη (HSI %) και του δείκτη ευρωστίας (K) για 110 ημέρες πειράματος



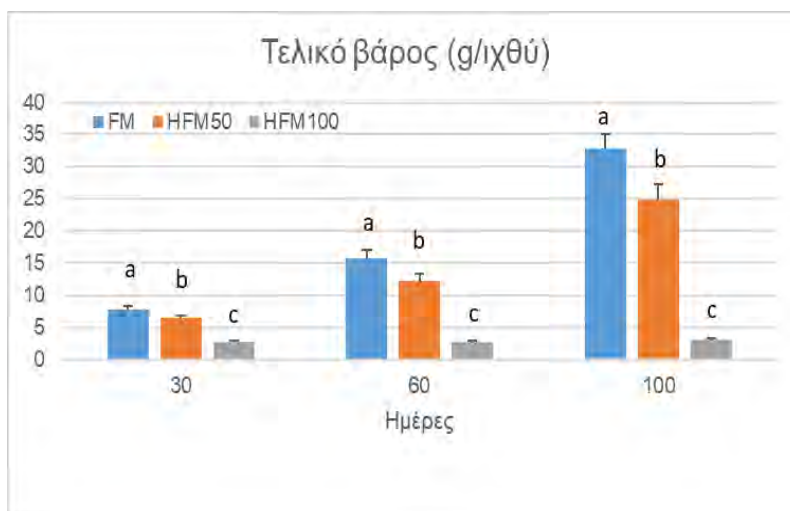
Διαγράμματα αποτελεσμάτων 3^{ου} διατροφικού πειράματος

Παράμετροι ανάπτυξης, αξιοποίησης τροφής, και μορφομετρικά χαρακτηριστικά των ιχθυδίων τσιπούρας για τη μερική (50%) και ολική (100%) αντικατάσταση του ιχθυαλεύρου από υδρολυμένο πετράλευρο.

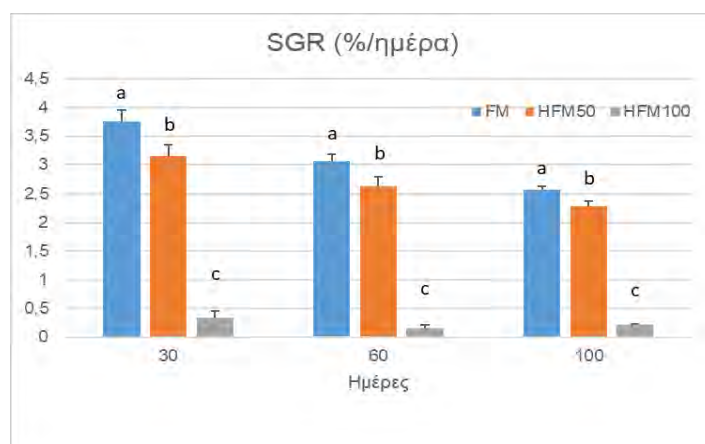
Διάγραμμα 3.1: Αποτελέσματα πρόσληψης τροφής για 30, 60 και 100 ημέρες πειράματος



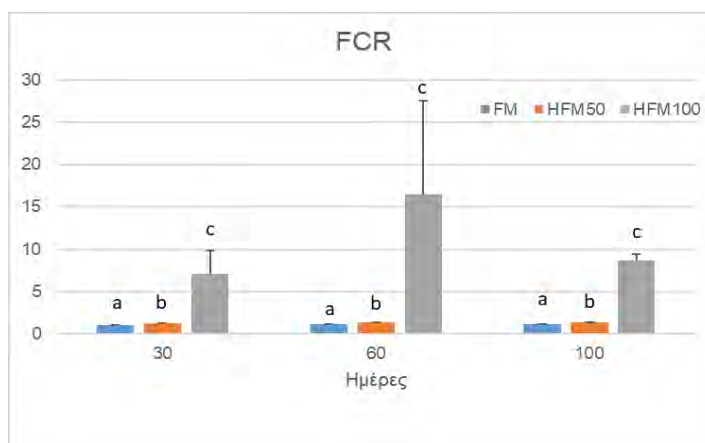
Διάγραμμα 3.2 : Αποτελέσματα τελικού βάρους για 30, 60 και 100 ημέρες πειράματος



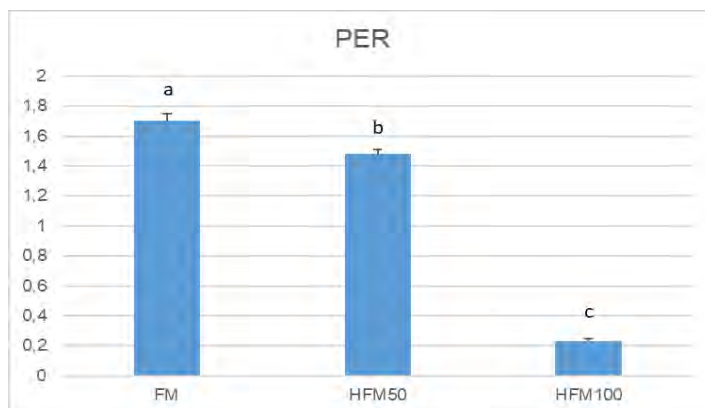
Διάγραμμα 3.3: Αποτελέσματα του ειδικού ρυθμού ανάπτυξης (SGR) για 30, 60 και 100 ημέρες πειράματος



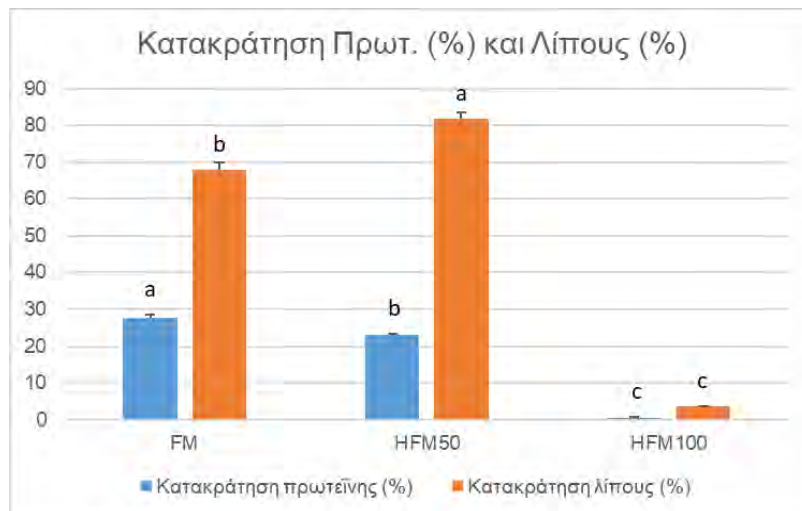
Διάγραμμα 3.4: Αποτελέσματα του συντελεστή μετατρεψιμότητας της τροφής (FCR) για 30, 60 και 100 ημέρες πειράματος



Διάγραμμα 3.5: Αποτελέσματα του δείκτη αποδοτικότητας της πρωτεΐνης (PER) για 100 ημέρες πειράματος

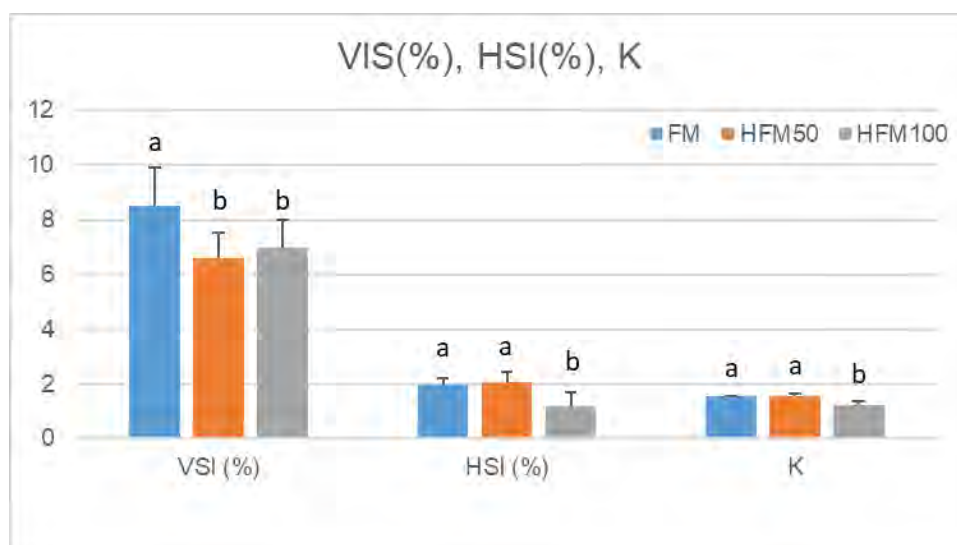


Διάγραμμα 3.6: Αποτελέσματα στους δείκτες κατακράτησης πρωτεΐνης και λίπους για 100 ημέρες πειράματος



Σωματομετρικοί δείκτες 3^{ου} διατροφικού πειράματος

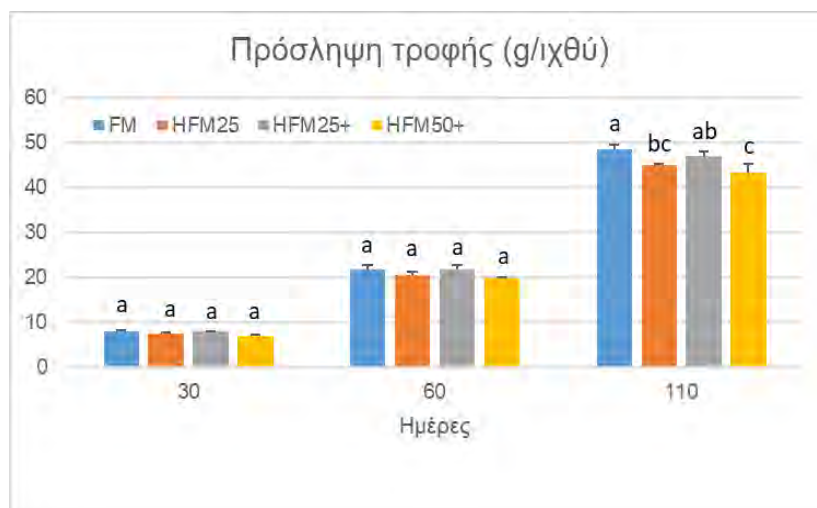
Διάγραμμα 3.7: Αποτελέσματα του ενδοσπλαχνικού (VSI %), ηπατοσωματικού δείκτη (HSI %) και του δείκτη ευρωστίας (K) για 100 ημέρες πειράματος



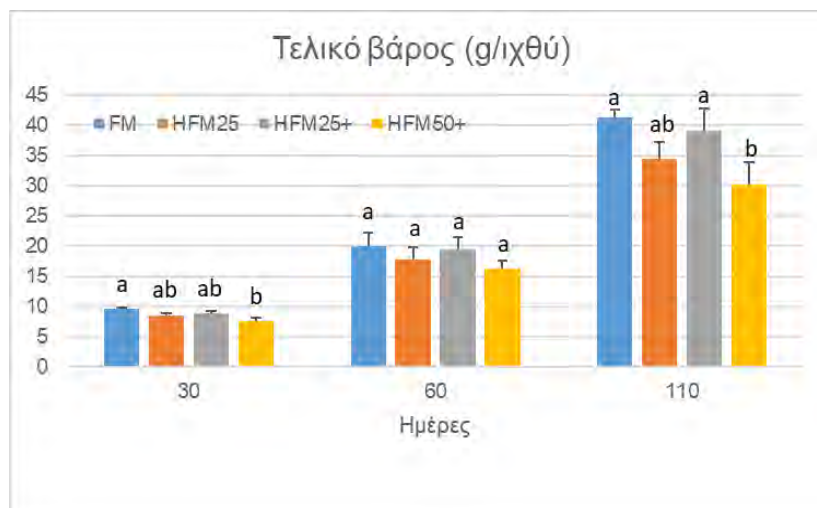
Διαγράμματα αποτελεσμάτων 4^{ου} διατροφικού πειράματος

Παράμετροι ανάπτυξης των ιχθυδίων τσιπούρας & αξιοποίησης τροφής από τη μερική (25% και 50%) αντικατάσταση του ιχθυαλεύρου από υδρολυμένο πετράλευρο με ταυτόχρονη εξισορρόπηση του με αμινοξέα.

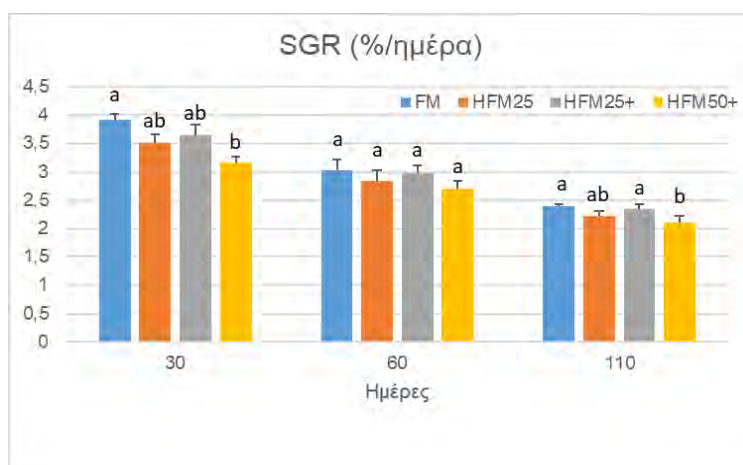
Διάγραμμα 4.1: Αποτελέσματα πρόσληψης τροφής για 30, 60 και 110 ημέρες πειράματος



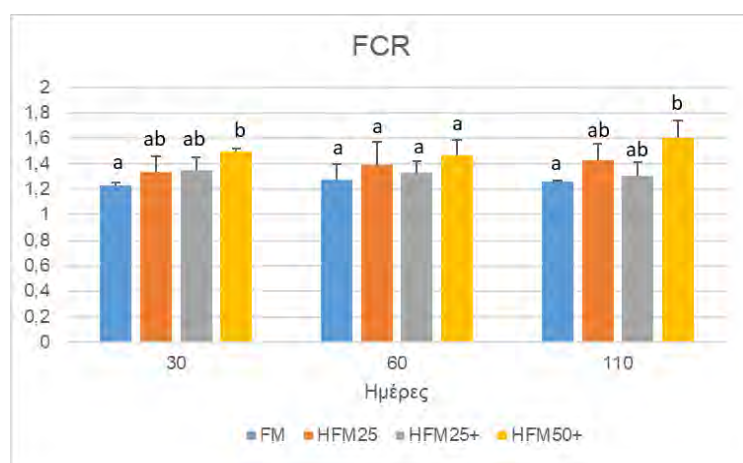
Διάγραμμα 4.2: Αποτελέσματα τελικού βάρους για 30, 60 και 110 ημέρες πειράματος



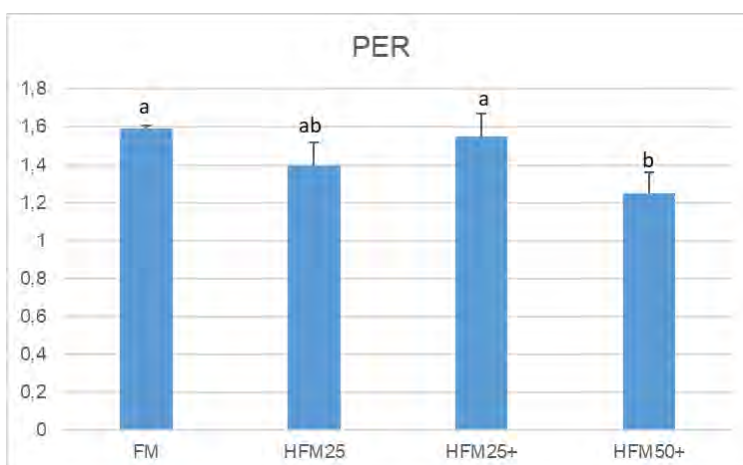
Διάγραμμα 4.3: Αποτελέσματα του ειδικού ρυθμού ανάπτυξης (SGR) για 30, 60 και 110 ημέρες πειράματος



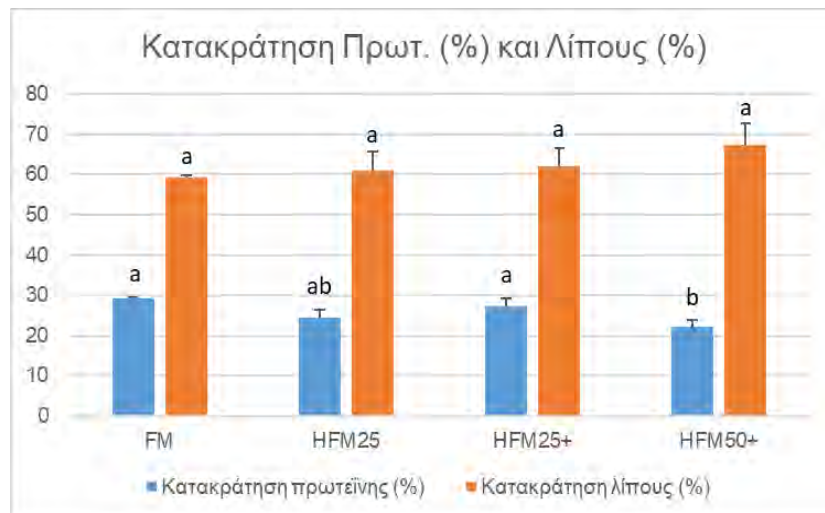
Διάγραμμα 4.4: Αποτελέσματα του συντελεστή μετατρεψιμότητας της τροφής (FCR) για 30, 60 και 110 ημέρες πειράματος



Διάγραμμα 4.5: Αποτελέσματα του δείκτη αποδοτικότητας της πρωτεΐνης (PER) για 110 ημέρες πειράματος

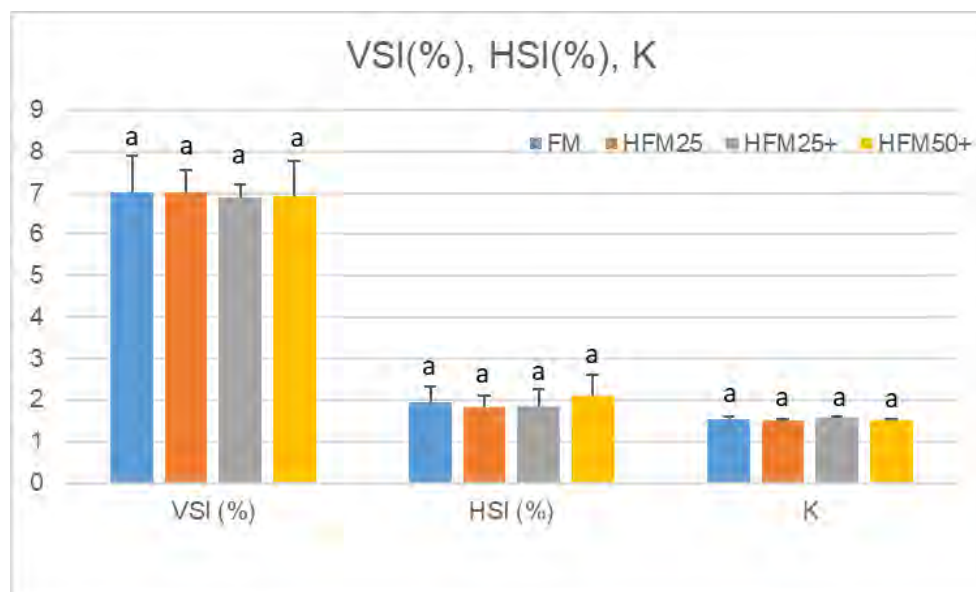


Διάγραμμα 4.6: Αποτελέσματα στους δείκτες κατακράτησης πρωτεΐνης και λίπους για 110 ημέρες πειράματος



Σωματομετρικοί δείκτες 4^ο διατροφικού πειράματος

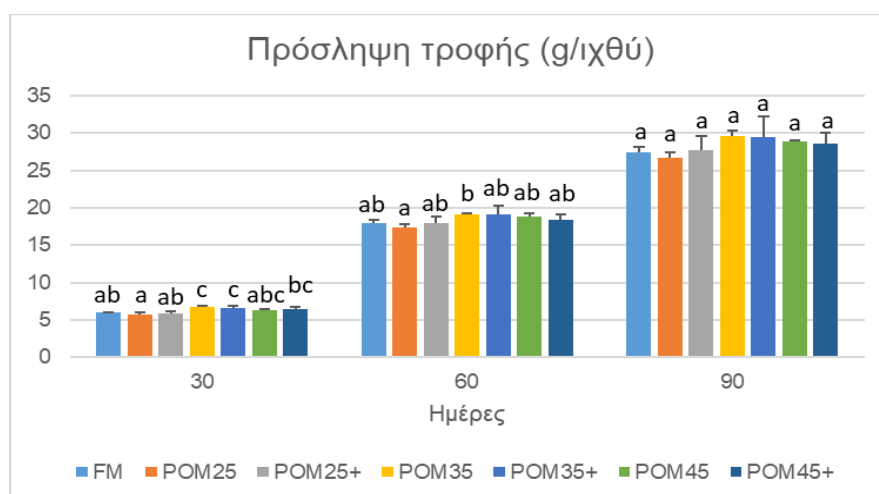
Διάγραμμα 4.7: Αποτελέσματα του ενδοσπλαχνικού (VSI %), ηπατοσωματικού δείκτη (HSI %) και του δείκτη ευρωστίας (K) για 110 ημέρες πειράματος



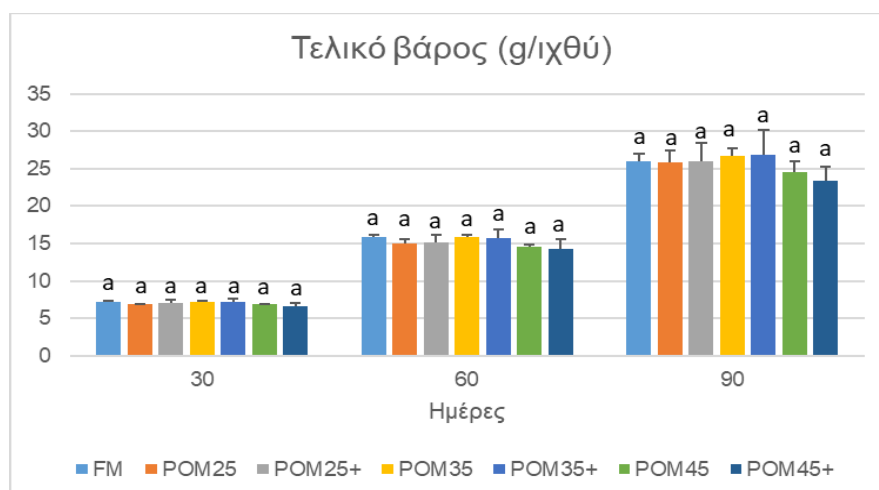
Διαγράμματα αποτελεσμάτων 5^{ου} διατροφικού πειράματος

Παράμετροι ανάπτυξης των ιχθυδίων τσιπούρας & αξιοποίησης τροφής από αντικατάσταση του ιχθυαλεύρου με χοιράλευρο.

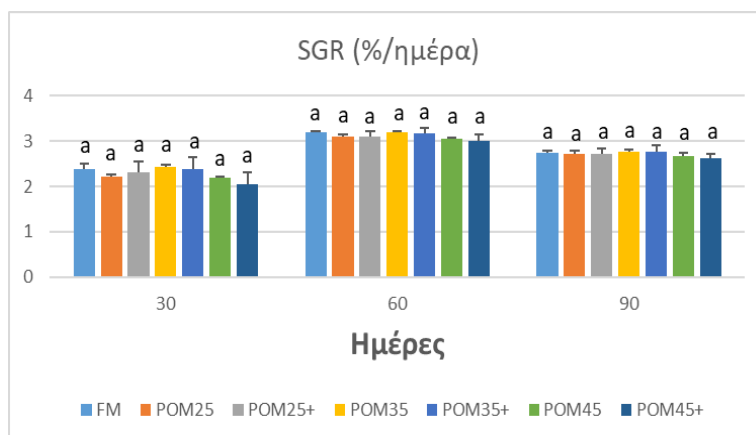
Διάγραμμα 5.1: Αποτελέσματα πρόσληψης τροφής για 30, 60 και 90 ημέρες πειράματος



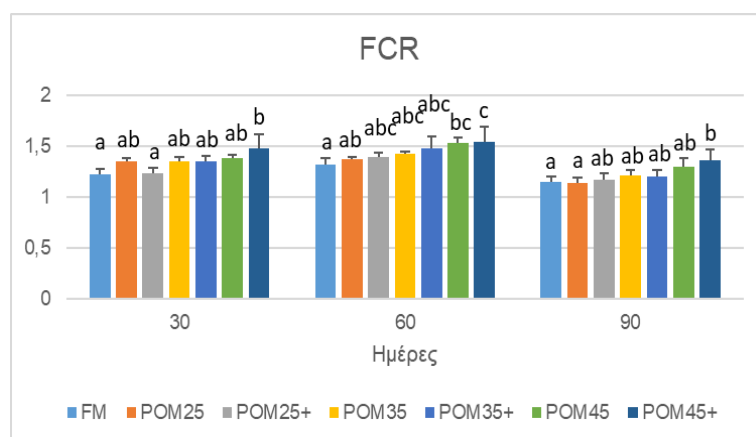
Διάγραμμα 5.2: Αποτελέσματα τελικού βάρους για 30, 60 και 90 ημέρες πειράματος



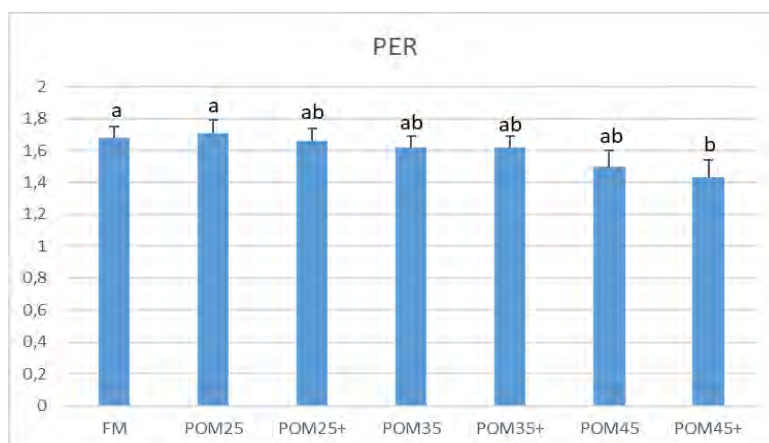
Διάγραμμα 5.3: Αποτελέσματα του ειδικού ρυθμού ανάπτυξης (SGR) για 30, 60 και 90 ημέρες πειράματος



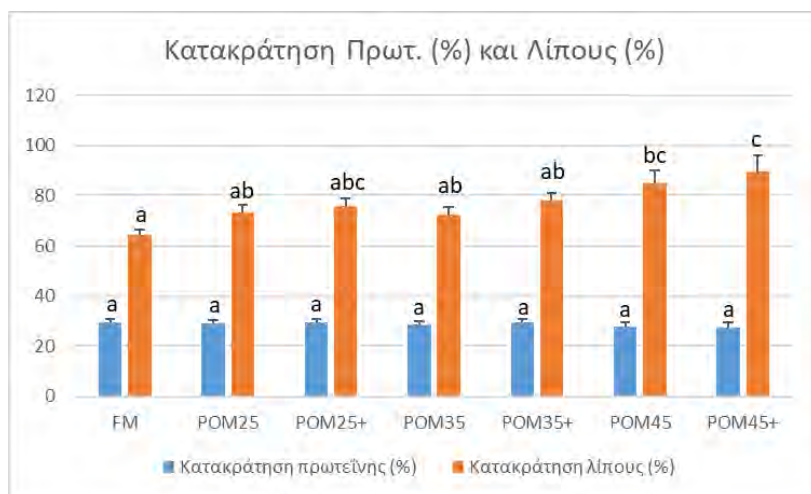
Διάγραμμα 5.4: Αποτελέσματα του συντελεστή μετατρεψιμότητας της τροφής (FCR) για 30, 60 και 90 ημέρες πειράματος



Διάγραμμα 5.5: Αποτελέσματα του δείκτη αποδοτικότητας της πρωτεΐνης (PER) για 90 ημέρες πειράματος



Διάγραμμα 5.6: Αποτελέσματα στους δείκτες κατακράτησης πρωτεΐνης και λίπους για 90 ημέρες πειράματος



Σωματομετρικοί δείκτες 5^{ον} διατροφικού πειράματος

Διάγραμμα 5.7: Αποτελέσματα του ενδοσπλαχνικού (VSI %), ηπατοσωματικού δείκτη (HSI %) και του δείκτη ευρωστίας (K) για 90 ημέρες πειράματος

