



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΙΧΘΥΟΛΟΓΙΑΣ
ΚΑΙ ΥΔΑΤΙΝΟΥ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ**



ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**«Φυσιολογία θρέψης τσιπούρας, εντερικό μικροβίωμα και σύνδεση με
σιτηρέσια που περιέχουν εντομόαλευρα»**

Ευάγγελος Σταμόπουλος

ΒΟΛΟΣ 2023

«Φυσιολογία θρέψης εκτρεφόμενης τσιπούρας (*Sparus aurata*), εντερικό μικροβίωμα και σύνδεση με σιτηρέσια που περιέχουν εντομάλευρα»

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή:

1. Κωνσταντίνος Κορμάς, Καθηγητής, Μικροβιακή οικολογία υδάτινου περιβάλλοντος, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Επιβλέπων.

2. Ελένη Μεντέ, Καθηγήτρια, Φυσιολογία Θρέψης Υδρόβιων Ζωικών Οργανισμών. Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

3. Ιωάννης Καραπαναγιωτίδης, Αν. Καθηγητής, Διατροφή Υδρόβιων Οργανισμών, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να εκφράσω τις ειλικρινείς μου ευχαριστίες σε όλους όσους συνέβαλαν στο να φέρω σε πέρας την παρούσα Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία. Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Επιβλέποντα της εργασίας αυτής, κο Κωνσταντίνο Κορμά για την πολύτιμη βοήθειά του και τη διαρκή υποστήριξή του, τόσο κατά τη διεξαγωγή του πειράματος όσο και κατά τη συγγραφή της παρούσας εργασίας, καθώς και τα υπόλοιπα μέλη της εξεταστικής επιτροπής μου, αποτελούμενη από τους Ελένη Μεντέ και Ιωάννη Καραπαναγιωτίδη, για τις χρήσιμες συμβουλές τους και την καθοδήγησή τους καθ' όλα τα στάδια διεκπεραίωσης της εργασίας. Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την Ελένη Νικούλη για την βοήθεια της στο εργαστήριο και την Άννα Τάμπου για την άμεση και ανιδιοτελή βοήθεια και υποστήριξή της κατά τη διάρκεια του πειράματος και της εκπόνησης της διατριβής. Τέλος, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στην οικογένειά μου για την αμέριστη συμπαράσταση, βοήθεια και προ πάντων κατανόηση και ανοχή καθ' όλο το χρονικό διάστημα των σπουδών μου.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο πεπτικός σωλήνας των ιχθύων φιλοξενεί μια πληθώρα μικροβιακών κοινοτήτων. Οι μικροοργανισμοί των υδρόβιων οργανισμών είναι πολύ ευαίσθητοι στις διατροφικές αλλαγές του ξενιστή, καθώς επηρεάζονται από τη μορφή της τροφής (νωπή ή σύμψηκτα), τα λιπαρά οξέα (το επίπεδό τους, την πηγή τους και την ακορεστότητά τους), τα αντιβιοτικά, τα προβιοτικά, τα πρεβιοτικά, τις πρωτεϊνικές πηγές που περιέχονται στις τροφές. Οι μικροοργανισμοί του πεπτικού σωλήνα και τα μεταβολικά τους προϊόντα διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη, τη διατροφή, την θρέψη, τις ασθένειες, την αντοχή και την ανοσία του ξενιστή. Οι σαρκοφάγοι ιχθύες στις υδατοκαλλιέργειες ταΐζονται κυρίως με ιχθυοτροφές παρασκευασμένες από ιχθυάλευρα και ιχθυέλαια. Ωστόσο η αυξανόμενη ζήτηση για ιχθυηρά σε συνδυασμό με την μείωση των ιχθυοπληθυσμών οδήγησε σε αναζήτηση εναλλακτικών και βιώσιμων πηγών πρωτεϊνών και λιπαρών οξέων για την παραγωγή ιχθυοτροφών. Ένα προτεινόμενο συστατικό για τις ιχθυοτροφές είναι το εντομάλευρο. Τα έντομα αποτελούν μέρος της φυσικής διατροφής ορισμένων ιχθύων, αφήνουν μικρό οικολογικό αποτύπωμα και η εκτροφή τους δεν απαιτεί μεγάλες εκτάσεις καλλιεργήσιμης γης καθώς ούτε μεγάλα αποθέματα ενέργειας και νερού. Αποτελούν μια βιώσιμη πηγή πρωτεϊνών, αμινοξέων και λιπαρών οξέων, είναι πλούσια σε βιταμίνες και ιχνοστοιχεία και παρουσιάζουν και αντιμικροβιακές ιδιότητες. Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι ο προσδιορισμός τυχόν σχέσεων μεταξύ της διατροφικής μεταχείρισης με σιτηρέσια που περιέχουν εντομάλευρα και των μικροβιακών κοινοτήτων στον εντερικό σωλήνα της τσιπούρας (*Sparus aurata*). Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης δείχνουν ότι υφίσταται άμεση συσχέτιση μεταξύ της περιεκτικότητας του σιτηρεσίου σε εντομάλευρο η οποία ευνοεί την αύξηση συγκεκριμένων OTUs, ωστόσο το σιτηρέσιο με Fish meal (μάρτυρας) παρουσίασε τη μεγαλύτερη ποικιλία φύλων του

πειράματος και κατά συνέπεια το εντερικό μικροβίωμα φαίνεται να παρουσιάζει μεγαλύτερη ποικιλομορφία χωρίς την παρουσία εντομάλευρου *Zophobas morio*.

Λέξεις κλειδιά: Τσιπούρα (*Sparus aurata*), εντερικό μικροβίωμα, *Zophobas morio*, σιτηρέσιο εντόμων.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Ευχαριστίες	3
Περίληψη	4
Περιεχόμενα	5
1. Εισαγωγή	7
1.1 Ιχθυοκαλλιέργεια & παραγωγή στην Ελλάδα	7
1.2 Ενδιαίτημα, χαρακτηριστικά και βιολογικός κύκλος της τσιπούρας	10
1.3 Διατροφικές απαιτήσεις εκτρεφόμενης τσιπούρας	16
1.4 Υποκατάσταση ιχθυαλεύρων στις ιχθυοτροφές με εντομάλευρα.	18
1.5 Το είδος <i>Zophobas morio</i>	23
1.6 Εντερικό Μικροβίωμα	26
1.7 Σκοπός της μεταπτυχιακής διατριβής	30
2. Υλικά και Μέθοδοι	30
2.1 Δειγματοληψία	30
2.2 Πρωτόκολλο εργαστηριακής διαδικασίας	31
3. Αποτελέσματα	32
4. Συζήτηση	43
5. Συμπεράσματα	49
Abstract	50
Βιβλιογραφία	51

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Ιχθυοκαλλιέργεια & παραγωγή στην Ελλάδα

Η ιχθυοκαλλιέργεια στην Ελλάδα, αποτελεί έναν από τους σημαντικότερους κλάδους στον τομέα της πρωτογενούς ζωικής παραγωγής, λόγω της σημαντικής συμμετοχής της στην οικονομική και κοινωνική ανάπτυξη της χώρας. Για το έτος 1980 αναφέρεται ότι η υδατοκαλλιέργεια κάλυπτε μόνο το 2% της εγχώριας προσφοράς αλιευτικών προϊόντων (2.000 τόνοι) και η συλλεκτική αλιεία το υπόλοιπο 98% (105.651 τόνοι). Σύμφωνα με τα πιο πρόσφατα στοιχεία του FAO, αυτή η αναλογία άρχισε να μεταβάλλεται. Πλέον η υδατοκαλλιέργεια προσφέρει το 63% της εγχώριας παραγωγής και η συλλεκτική αλιεία 37%. Πρόκειται για μια ιδιαίτερα ανταγωνιστική δραστηριότητα στην Ελλάδα, η οποία κατέχει ηγετική θέση στην παραγωγή μεσογειακών ειδών σε ευρωπαϊκό και διεθνές επίπεδο (ΣΕΘ, 2020).

Πίνακας 1. Παραγωγή τσιπούρας 2019. Οι 10 κορυφαίες χώρες παραγωγής παγκοσμίως¹ (Πηγή: Compassion in food business, 2021).

Χώρα	Παραγωγή (τόνοι)	Μερίδιο στην παγκόσμια παραγωγή (%)	Εκτιμώμενη παραγωγή σε αριθμούς (εκατομμύρια)
Τουρκία	99,730	38.54	50 - 399
Ελλάδα	55,452	21.43	28 - 222
Αίγυπτος	35,880	13.87	18 - 144
Τυνησία	18,017	6.96	9 - 72
Ισπανία	12,475	4.82	6 - 50
Ιταλία	7,350	2.84	4 - 29
Κροατία	6,750	2.61	3 - 27
Κύπρος	5,168	2	3 - 21
Ισραήλ	2,950	1.14	1 - 12

¹ Οι αριθμοί ψαριών ελήφθησαν χρησιμοποιώντας ένα εύρος εκτιμώμενου μέσου βάρους 0.250-2 kg [15].

Αλβανία	2,450	0.95	1 - 10
----------------	-------	------	--------

Σχήμα 1: Η παραγωγή τσιπούρας των 10 σημαντικότερων χωρών εκτροφής, σε ποσοστά % για το έτος 2019 (από Πίνακα 1).

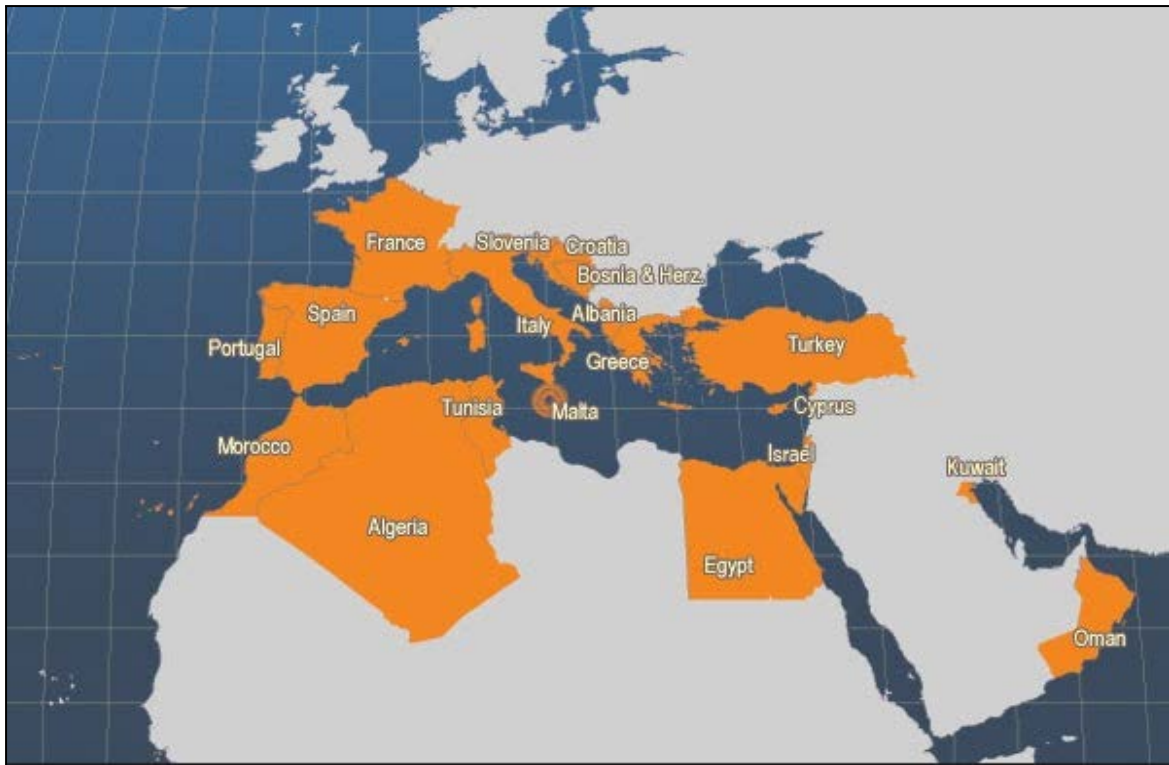


Το 2019 το 50% όλων των θαλασσινών που παράγονται για ανθρώπινη κατανάλωση προέρχεται από την υδατοκαλλιέργεια, με πρόβλεψη το ποσοστό αυτό να φτάσει το 62% έως το 2030. Δεδομένου ότι η υπεραλίευση των ωκεανών και άλλων φυσικών πόρων αυξάνεται συνεχώς κάθε χρόνο, χρειάζονται εναλλακτικές πηγές θαλασσινών για να τροφοδοτηθεί ο συνεχώς αυξανόμενος πληθυσμός του πλανήτη. Η υδατοκαλλιέργεια είναι το εργαλείο για την κάλυψη του κενού της προσφοράς τροφίμων από τη θάλασσα. Η εκτροφή ψαριών με υπευθυνότητα και βιωσιμότητα είναι η λύση, παρέχοντας υγιεινές και φιλικές προς το περιβάλλον επιλογές πρωτεϊνών. Η υδατοκαλλιέργεια αποτελεί βιώσιμη επιλογή για τους καταναλωτές, ειδικά σε σύγκριση με άλλες πρωτεΐνες προερχόμενες από εκτροφή. Τα θαλασσινά είναι εξαιρετικά αποδοτικά σε πόρους - έχουν την υψηλότερη κατακράτηση πρωτεϊνών σε σύγκριση με το κοτόπουλο, το χοιρινό και το βόειο κρέας. Έχει επίσης τη χαμηλότερη Αναλογία Μετατροπής Τροφής (Feed Conversion Ratio -

FCR) μεταξύ των ίδιων μορφών πρωτεΐνης. Η υδατοκαλλιέργεια έχει χαμηλότερες εκπομπές αερίων θερμοκηπίου από άλλες μορφές γεωργίας. Με αναμενόμενα 10 δισεκατομμύρια άτομα που αναμένεται να κατοικήσουν στον πλανήτη έως το 2050, η ζήτηση για ζωικές πρωτεΐνες θα αυξηθεί κατά 52%. Οι βιώσιμες προσεγγίσεις στην ανθρώπινη διατροφή είναι κρίσιμες, προκειμένου να τροφοδοτηθεί ο αυξανόμενος πληθυσμός με άπαχη πρωτεΐνη. Η πρωταρχική ευθύνη της υδατοκαλλιέργειας είναι η βελτίωση της υγείας του πληθυσμού, αρκεί να γίνεται με σεβασμό προς το περιβάλλον, κοινωνικά υπεύθυνο και να λαμβάνει υπόψη την ασφάλεια των τροφίμων και την σωστή διαβίωση των ζώων (GAA - Global Aquaculture Alliance, 2019).

Η Μεσόγειος έχει χαμηλή σχετικά φυσική παραγωγικότητα και σε συνδυασμό με την υπεραλίευση, την εξάντληση των αλιευτικών αποθεμάτων, την αύξηση της αγοραστικής δύναμης των Ευρωπαίων καταναλωτών, αλλά και την ολοένα ανερχόμενη τάση για υγιεινή διατροφή, οδήγησαν τον τομέα των θαλάσσιων υδατοκαλλιεργειών σε σημαντική ανάπτυξη. Χώρες όπως η Ελλάδα, η Ισπανία, η Ιταλία, η Τουρκία και άλλες συμμετέχουν ενεργά στην παραγωγή τσιπούρας (Εικόνα 1).

Τα τελευταία 20 χρόνια η Ελλάδα έχει αναλάβει ηγετικό ρόλο στην ανάπτυξη της θαλάσσιας υδατοκαλλιέργειας στη Μεσόγειο και στην αγορά υπάρχει μεγάλη ζήτηση Μεσογειακών ειδών με υψηλή διατροφική αξία (φαγκρί, ερυθρός τόνος, λαβράκι, μυτάκι, τσιπούρα, μύδια, στρείδια, κλπ.). Έτσι, η Ελλάδα χάρη στις άριστες γεωμορφολογικές και κλιματολογικές συνθήκες, το υψηλό επίπεδο τεχνογνωσίας που την καθιστούν κατάλληλη για εκτροφή αλλά και οι υψηλές προοπτικές των Ευρωπαϊκών και παγκόσμιων αγορών, έχει γίνει πρωτοπόρος στην πρόοδο της Μεσογειακής υδατοκαλλιέργειας.



Εικόνα 1: Χώρες με την κυριότερη παραγωγή τσιπούρας (Πηγή: FAO, 2006)

Η Ελλάδα αποτελεί πλέον παγκοσμίως τον μεγαλύτερο παραγωγό και εξαγωγέα Μεσογειακών ειδών ψαριών. Στις ελληνικές θάλασσες καλλιεργούνται κυρίως το λαβράκι και η τσιπούρα, ενώ σε μικρότερη κλίμακα καλλιεργούνται ακόμη ο σαργός, το λυθρίνι, το μυτάκι, το φαγκρί, η συναγρίδα και ο ερυθρός τόνος. Το 2020 η παραγωγή (εξαλιεύσεις) τσιπούρας και λαβρακιού ανήλθε σε 117.000 τόνους (65.000 τόνοι τσιπούρας και 52.000 τόνοι λαβρακιού) συνολικής αξίας 546,26 εκατ. ευρώ.

1.2 Ενδιαίτημα, χαρακτηριστικά και βιολογικός κύκλος της τσιπούρας

Η τσιπούρα (*Sparus aurata*, Linnaeus 1758) (Εικόνα 2), ανήκει στην οικογένεια των σπαρίδων (*Sparidae*) και στην κατηγορία των σαρκοφάγων, αρπακτικών ψαριών. Ως ενδημικό είδος, συναντάται κυρίως στη Μεσόγειο Θάλασσα, ωστόσο εμφανίζεται και στη Μαύρη θάλασσα και σποραδικά στις νότιες ακτές των Βρετανικών νησιών καθώς και των δυτικών ακτών της Ευρώπης, της Βόρειας Αφρικής και των Κανάριων νήσων.



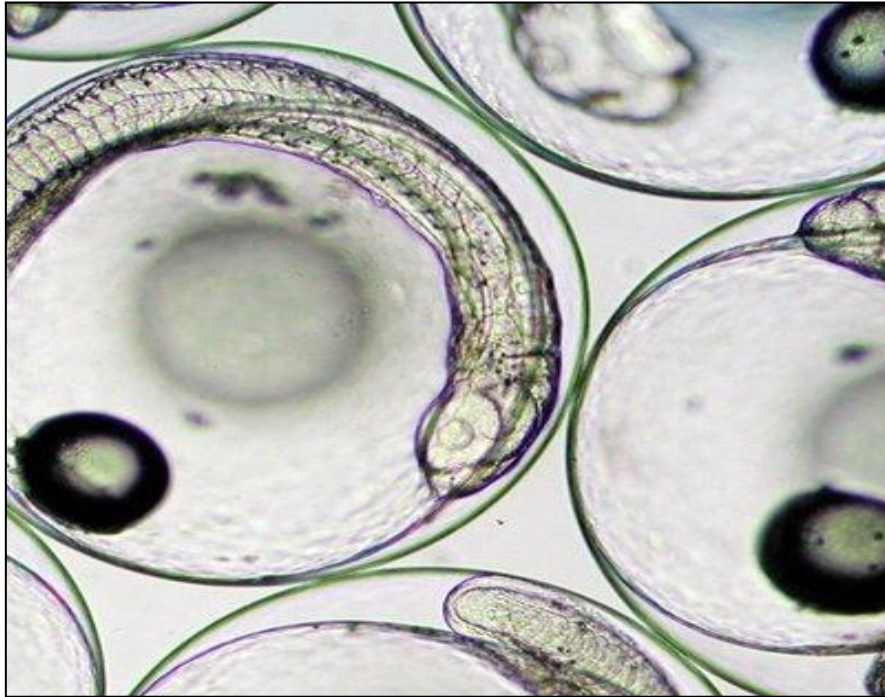
Εικόνα 2: *Sparus aurata* (Πηγή: FAO, 2009).

Είναι ευρύθερμο είδος και συναντάται σε νερά με θερμοκρασίες από 5 έως 27°C και προτιμά νερά με βάθος από 50 έως και 60m, ωστόσο τα νεαρά άτομα φτάνουν έως 30m, ενώ τα ενήλικα μπορούν να φτάσουν και τα 150m. Επίσης είναι ευρύαλο ψάρι με ικανότητα να επιβιώνει σε αλατότητες μεγάλου εύρους, με το ιδανικό εύρος ανάπτυξης να είναι σε νερά με αλατότητα από 25 - 40‰ (Νεοφύτου 2001). Ζει σε παράκτιες περιοχές και προτιμά αμμώδεις πυθμένες και λιβάδια ποσειδωνίας (FAO). Φτάνει μέγιστο μήκος τα 70cm, αλλά συνήθως κυμαίνεται στα 30cm (FAO), μέγιστο βάρος τα 16-18kg και μέγιστη ηλικία 10-15 έτη (Παπουτσόγλου, 2008).

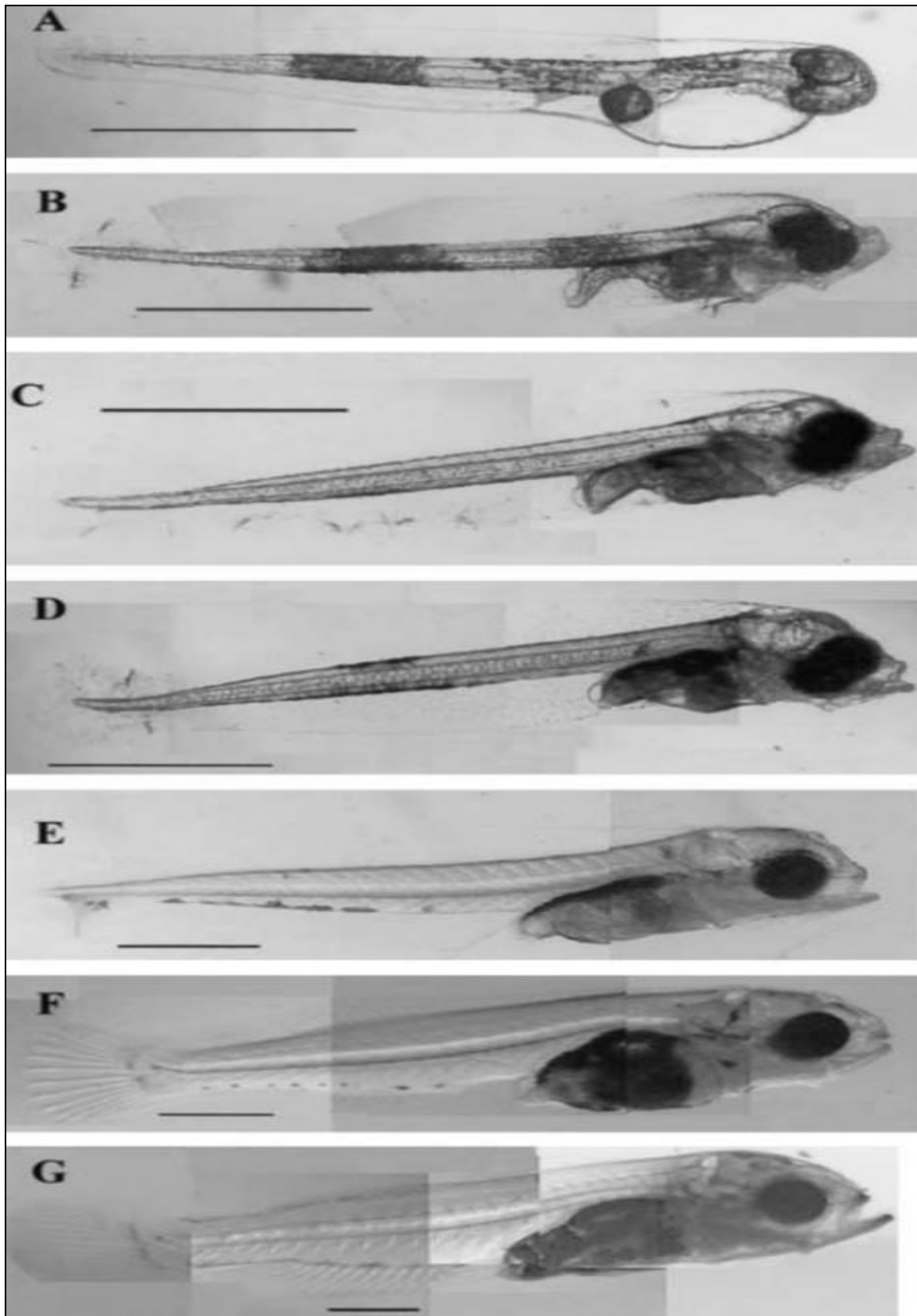
Η ανάπτυξη της τσιπούρας επηρεάζεται κατά κύριο λόγο από τη θερμοκρασία, την αλατότητα και το pH. Η θερμοκρασία των υδάτων συμβάλλει άμεσα στην όρεξη και την αφομοίωση της τροφής και έχει την πιο διακριτή επίδραση στην απόδοση ανάπτυξης και τη σύνθεση θρεπτικών (Izquierdo et al., 2003).

Η αναπαραγωγική περίοδος κυμαίνεται από Οκτώβριο έως Δεκέμβριο στην ανοικτή θάλασσα. Η τσιπούρα γεννά πελαγικού τύπου αυγά (Εικόνα 3), τα οποία μετά την εκκόλαψη έχουν τον εξής βιολογικό κύκλο (Εικόνα 4): 1. Προνύμφες (λεκιθικός σάκος) 2. Νύμφες (πρόσληψη τροφής, λειτουργική νηκτική κύστη). 3. Μεταμόρφωση σε ιχθύδια

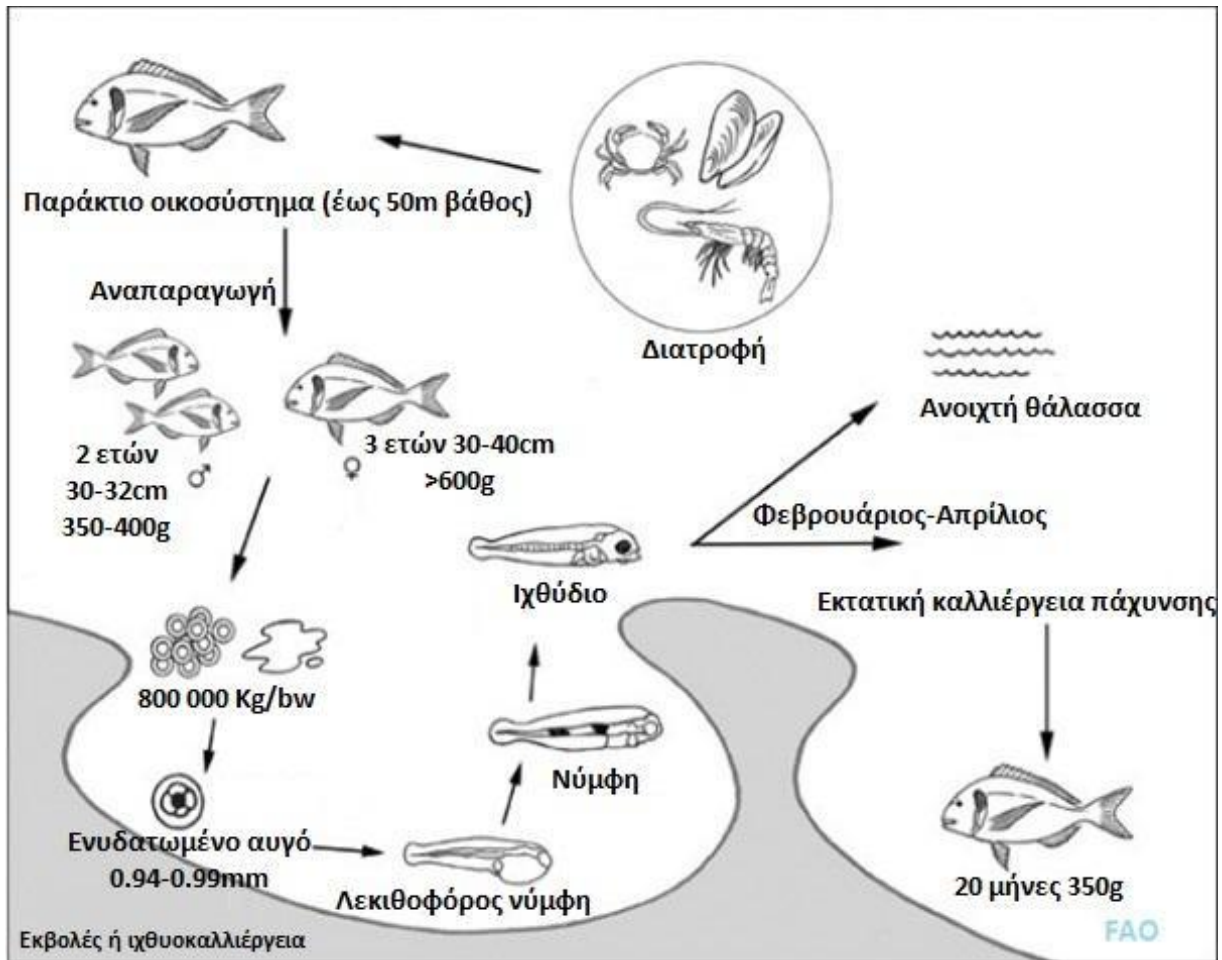
(λειτουργικά πτερύγια, λέπια). Τέλη Φεβρουαρίου έως και τα τέλη Απριλίου, μετακινείται σε παράκτιες περιοχές και λιμνοθάλασσες (αφθονία τροφής και υψηλότερη θερμοκρασία) και με την πτώση της θερμοκρασίας τον Οκτώβριο μετακινείται στις περιοχές ωοτοκίας (Εικόνα 6) (Κλαουδάτος, 2012).



Εικόνα 3. Αυγά *Sparus aurata* (Πηγή: Norman Y.S. Woo 2003).



Εικόνα 4. Μορφολογικά χαρακτηριστικά νυμφών τσιπούρας σε ποικίλα στάδια ανάπτυξης (Πηγή: Norman Y. S. Woo, 2003).



Εικόνα 5. Βιολογικός κύκλος *Sparus aurata* (Πηγή: FAO, 2009).

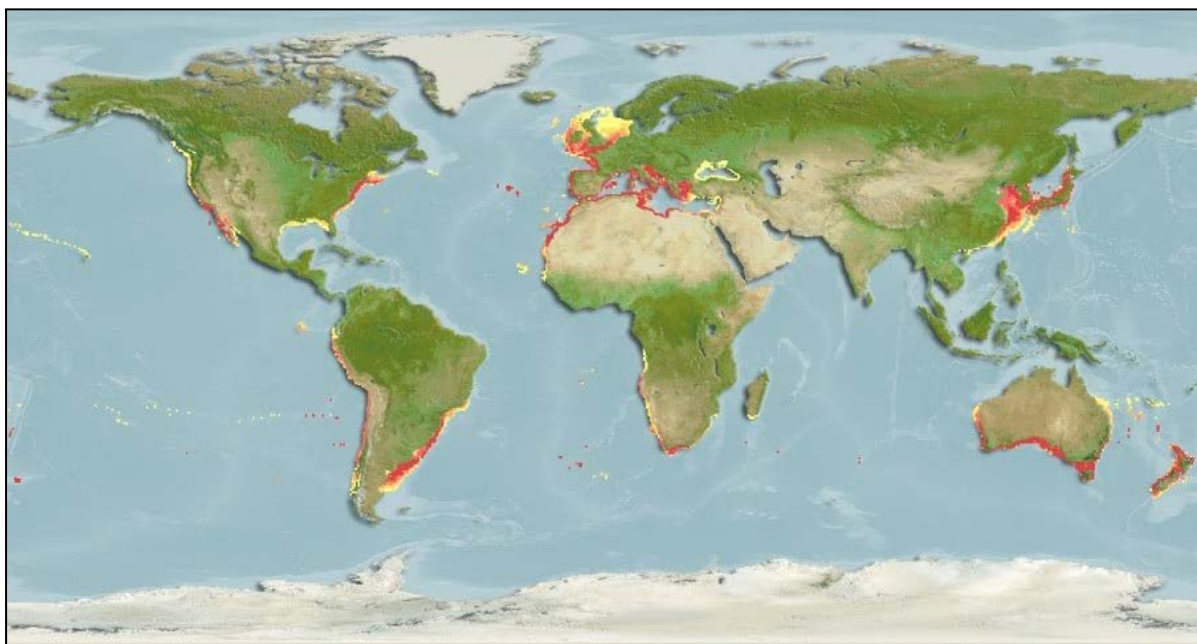
Η τσιπούρα εμφανίζει πρωτανδρικό ερμαφροδιτισμό με αναστροφή του φύλου μετά το τέλος της αναπαραγωγικής περιόδου. Με τη συμπλήρωση του δεύτερου έτους ζωής το ποσοστό των δύο φύλων είναι ισοδύναμο (Κλαουδάτος, 2012).

Η τσιπούρα είναι σαρκοφάγο είδος, η διατροφή της ποικίλει ανάλογα με το στάδιο ανάπτυξής της αλλά και τη διαθεσιμότητά της. Τρέφεται με καρκινοειδή, μαλάκια, πολύχαιτους, τελεόστεους και εχινόδερμα (FAO), ενώ ευκαιριακά μπορεί να καταναλώσει άλλους ιχθύς και έντομα (Pita *et al.* 2002). Τα ιχθύδια μήκους 3-10cm τρέφονται κυρίως με ζωοπλαγκτονικούς οργανισμούς (κωπήποδα), πολύχαιτους και μικρά καρκινοειδή. Οι ιχθύες μήκους 10-25cm τρέφονται με δίθυρα, αμφίποδα και άλλους ιχθύες (FAO). Στον Πίνακα 2 συνοψίζονται αυτές οι διατροφικές συνήθειες της τσιπούρας, ενώ στην Εικόνα 6

φαίνονται οι περιοχές του πλανήτη που καλύπτουν αυτές τις απαιτήσεις για τις διατροφικές συνήθειες της τσιπούρας.

Πίνακας 2. Διατροφικές συνήθειες και είδη που καταναλώνει το είδος *Sparus aurata* (Πηγή Wassef, Elham & Eisawy, A., 1985).

Είδη τροφής	% επί του συνόλου
Καρκινοειδή	49.8
Μαλάκια	35.6
Πολύχαιτοι	6.5
Άλλα ψάρια	2.8
Εχινόδερμα	2.4
Ασκίδια	0.9
Άλλο	2



Εικόνα 6: Περιοχές με κατάλληλο ενδιαίτημα για διαβίωση και εξάπλωση *Sparus aurata* (Πηγή: Aquamaps.org, 2019, October).

Πρόκειται για ένα από τα πρώτα μεσογειακά είδη στα οποία εφαρμόστηκε αποτελεσματικά η ελεγχόμενη εντατική εκτροφή σε μαζική κλίμακα, στην Ιταλία, την Γαλλία και την Ισπανία, στις αρχές της δεκαετίας του 1980. Στο τέλος της δεκαετίας,

ξεκίνησε και στην Ελλάδα η εκτροφή της τσιπούρας με εντατικά συστήματα παραγωγής σε ιχθυοκλωβούς. Ο σημαντικά αυξανόμενος ρυθμός ανάπτυξης των εκτροφών κατέστησε την Ελλάδα πρώτη σε παραγωγή χώρα της Μεσογείου και της Ευρώπης (Παπουτσόγλου 2008).

Η τσιπούρα αποτελεί πολύ δημοφιλές είδος προς εκτροφή λόγω της μεγάλης εμπορικής αξίας της. Διαθέτει ιδιότητες οι οποίες της προσδίδουν μεγάλο εμπορικό ενδιαφέρον και την καθιστούν ιδανική επιλογή για εντατική εκτροφή. Χαρακτηρίζεται από γρήγορη ανάπτυξη, εύκολη προσαρμογή στην αιχμαλωσία, είναι ανθεκτική στις φυσικοχημικές μεταβολές του υδάτινου περιβάλλοντος και προσφέρει φιλέτο εξαιρετικής ποιότητας (Klaoudatos & Apostolopoulos 1986).

1.3 Διατροφικές απαιτήσεις εκτρεφόμενης τσιπούρας

Οι πρωτεϊνικές ανάγκες της τσιπούρας μεταβάλλονται ανάλογα με το βιολογικό της στάδιο (Παπουτσόγλου, 2008). Οι απαιτήσεις είναι υψηλότερες στα αναπτυσσόμενα άτομα, οπότε οι δίαιτες που προορίζονται για την εκτροφή της πρέπει να περιέχουν 45-55 % πρωτεΐνη (σε ξηρές τροφές με υγρασία 9,5-10 %) (Oliva-Teles, 2000). Οι απαιτήσεις σε αμινοξέα, συμφωνούν και με άλλα είδη ιχθύων (Oliva-Teles, 2000). Τα 10 απαραίτητα αμινοξέα (AA) είναι η ιστιδίνη, τρυπτοφάνη, αργινίνη, ισολευκίνη, θρεονίνη, μεθειονίνη, φαινυλαλανίνη, λυσίνη, λευκίνη, βαλίνη (Καραπαναγιωτίδης & Μεντέ, 2009).

Λόγω της σύνθεσής του, το ιχθυάλευρο αποτελεί την βέλτιστη πηγή πρωτεΐνης στην διατροφή των ψαριών. Κατά συνέπεια, η μειωμένη διαθεσιμότητά του και λόγω αυτής, η υψηλή τιμή του στις διεθνείς αγορές, δημιουργούν την ανάγκη αντικατάστασής του με εναλλακτικές πηγές πρωτεϊνών (Oliva-Teles, 2000). Η αντικατάσταση αυτή έχει και μειονεκτήματα, όπως η μείωση της ελκυστικότητας των χορηγούμενων τροφών, η

πιθανότητα παρουσίασης αντιδιαιτητικών παραγόντων και πρόκλησης ανισορροπίας και έλλειψης των απαραίτητων αμινοξέων (π.χ. μεθειονίνη), (Παπουτσόγλου, 2008).

Όμοια με τις πρωτεΐνες, οι ανάγκες της τσιπούρας σε λίπη διαφοροποιούνται ανάλογα με το βιολογικό τους στάδιο (Παπουτσόγλου, 2008). Τα σπονδυλωτά έχουν απαιτήσεις για n-3 και n-6 λιπαρά οξέα. Στα νεαρά άτομα του είδους, οι διατροφικές απαιτήσεις σε λιπαρά οξέα υπολογίζονται στο 0,9 % πολυακόρεστα λιπαρά οξέα και η ιδανική σχέση για την ανάπτυξη τους σε εικοσιπεντανοϊκό/ εικοσιδιεξαενοϊκό οξύ εκτιμάται στο επίπεδο 2:1. Ακόμη πρέπει να περιλαμβάνεται ποσοστό τουλάχιστον 15-16 % σε λιπίδια και να περιέχει σημαντική ποσότητα ιχθυελαίου ώστε να καλύπτονται οι ανάγκες σε λιπαρά οξέα, διότι είναι η μόνη πηγή με n-3 πολυακόρεστων λιπαρών οξέων. Ακόμη, προϋπόθεση για την παραγωγή αυγών υψηλής ποιότητας, απαιτείται ποσοστό 0,42 % πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (Oliva-Teles, 2000).

Πίνακας 3. Προσδιορισθέντα όρια των επιπέδων των αναγκών αναπτυσσόμενων ατόμων τσιπούρας σε απαραίτητα και μη αμινοξέα (Παπουτσόγλου, 2008).

Επίπεδο θρεπτικών	Ανάγκες (% των πρωτεϊνών της τροφής)
Αργινίνη	2,5-7,0
Λυσίνη	5,0-8,0
Μεθειονίνη	3,5-4,0
Κυστεΐνη	1,5-2,0
Τρυπτοφάνη	0,5-1,0
Ιστιδίνη	1,5-3,5
Ισολευκίνη	2,5-5,0
Λευκίνη	4,5-7,0
Βαλίνη	3,0-5,5
Φαινυλαλανίνη	3,0-4,0

Τυροσίνη	3,0-3,5
Θρεονίνη	3,0-4,5
Γλυκίνη	6,0-7,0
Γλουταμίνη	14,0-14,5
Σερίνη	4,0-4,5
Αλανίνη	6,0-6,5
Ασπαραγινικό οξύ	10,0-10,5
Απαραίτητα αμινοξέα/μη απαραίτητα αμινοξέα	∞ 1,27-1,30

Πίνακας 4. Θρεπτικές απαιτήσεις το είδους *Sparus aurata* με βάση το ηλικιακό στάδιο (FAO, 2009).

Προσεγγιστική σύνθεση (% βάση ξηράς τροφής)	Ηλικιακό στάδιο			
	Γόνος	Λεκιθοφόρος νύμφη	Ιχθύδιο	Αναπτυσσόμενο
Ακατέργαστη πρωτεΐνη % (ελάχιστη)	-	-	50-60	45-50
Ακατέργαστα λιπίδια % (ελάχιστα)	15-20	12-24	12-25	12-25
Ακατέργαστες ίνες % (μέγιστο)	-	3	3	3
Υδατάνθρακες % (μέγιστο)	-	20	20	20
Πεπτικές πρωτεΐνες προς αναλογία πεπτικής ενέργειας mg/kJ	27.6-30.2	22.7-25.9	20.8-22.4	21.5-28.1
Φώσφορος % (ελάχιστο)	-	0.75	0.65	-

1.4 Υποκατάσταση ιχθυαλεύρων στις ιχθυοτροφές με εντομάλευρα.

Μία από τις προκλήσεις που αντιμετωπίζει ο κλάδος των τροφών της υδατοκαλλιέργειας είναι η υποκατάσταση των ιχθυαλεύρων από εναλλακτικές πηγές πρωτεΐνης λόγω των ανησυχιών για την οικονομική και οικολογική βιωσιμότητα. Το ενδιαφέρον στην χρήση εντομοτροφών, ως πηγή πρωτεϊνών στις ιχθυοτροφές είναι ολοένα

αυξανόμενο (Εικόνα 7) στον τομέα της υδατοκαλλιέργειας, με σκοπό να μετριαστεί η πίεση της χρήσης ιχθυάλευρων. Οι εντομοτροφές θεωρούνται μία από τις πιο υποσχόμενες νέες πηγές πρωτεΐνης στις τροφές υδατοκαλλιέργειας, όχι μόνο λόγω της ευνοϊκής διατροφικής τους σύνθεσης, ιδίως όσον αφορά την περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες και το προφίλ αμινοξέων, αλλά επίσης λόγω της δυνατότητας αύξησης της παραγωγής για την κάλυψη της ζήτησης για εναλλακτικές πηγές πρωτεΐνης στις τροφές υδατοκαλλιέργειας σε σχέση με τις διαθέσιμες τεχνολογίες επεξεργασίας, το κόστος και την επεκτασιμότητα (Hua et al., 2019).



Εικόνα 7. Εντομάλευρο προοριζόμενο για αντικατάσταση ιχθυάλευρου (Πηγή: All about feed, 2017).

Η σύγχρονη έλλειψη των ιχθυαλεύρων έχει ωθήσει τους ερευνητές να αναζητήσουν διαφορετικές πηγές πρωτεΐνης με παρόμοια θρεπτική σύσταση και περιεκτικότητα σε βασικά αμινοξέα, λιπαρά οξέα και φωσφολιπίδια τα οποία προωθούν τη ιδανική ανάπτυξη

και αναπαραγωγή (Ayoola, 2010). Με τον τρόπο αυτό η παραγωγή της υδατοκαλλιέργειας θα παραμείνει μακροπρόθεσμα βιώσιμη, οικονομικά και περιβαλλοντικά.

Τα έντομα αποτελούν τμήμα της φυσικής διατροφής των ιχθύων, τόσο στα γλυκά νερά όσο και στη θάλασσα, διότι είναι πλούσια σε βιταμίνες, αμινοξέα, ανόργανα στοιχεία και λιπίδια και φυσικά έχουν χαμηλότερο οικολογικό αποτύπωμα σε σχέση με την εκτροφή άλλων ζώων (οι ανάγκες για καλλιεργήσιμη γη, ενέργεια και νερό είναι σημαντικά μειωμένες) και έχουν εκτιμηθεί ως πιθανές εναλλακτικές λύσεις έναντι των ιχθυαλεύρων και των ιχθυελαίων (van Huis *et al.* 2013).

Από διατροφικής άποψης, ανάλογα με το είδος ή/και στάδιο, τα έντομα είναι πλούσια σε πρωτεΐνες και λιπίδια, παρόλα αυτά η παρουσία της χιτίνης *a priori* υποδηλώνει αρνητικό χαρακτηριστικό. Το βασικό αυτό δομικό συστατικό του εξωσκελετού των εντόμων, η χιτίνη δεν είναι μεταβολίσιμη από τα ψάρια. Με σκοπό την συμπερίληψη των εντόμων στην τροφή, είναι δυνατόν η χιτίνη να αφαιρεθεί από το έντομο μέσω αλκαλικής εκχύλισης ή μέσω άλλων χημικών ή ενζυματικών διεργασιών, διεργασίες που αυξάνουν το κόστος του σιτηρεσίου (Henry *et al.* 2015). Ωστόσο, τα μαλακόστρακα, τα οποία επίσης αποτελούν τμήμα της διαίτας των ψαριών και καταναλώνονται ευρέως, περιέχουν επίσης χιτίνη.

Για να αξιολογηθεί η αποτελεσματικότητα των εντόμων, είναι απαραίτητο να εξεταστούν άλλα πλεονεκτήματα όπως περιβαλλοντικά οφέλη (Εικόνα 8). Τα έντομα μπορούν να τραφούν με απόβλητα που παράγονται από τον άνθρωπο, έχοντας σημαντικό ρόλο στην ανακύκλωση υλικών στην επίγεια βίοςφαιρα (Katayama *et al.*, 2008).

Η μεγάλη ποικιλία ειδών εντόμων (70–75% των ζωικών ειδών), από διαφορετικά οικοσυστήματα, με διαφορετικές δίαιτες και στάδια ανάπτυξης (προνύμφη, νύμφη, ενήλικο) προσφέρει σημαντική μεταβλητότητα στη σύσταση του σώματος (Barroso *et al.*,

2013). Αρκετά είδη εντόμων έχουν εντοπιστεί την τελευταία δεκαετία ως εναλλακτική πηγή πρωτεϊνών που θα μπορούσε να περιλαμβάνεται στην ανθρώπινη τροφή, αλλά και των ζώων, καθώς έχουν πολλά πλεονεκτήματα (Van Huis 2013, Gasco et al. 2019).

Συγκεκριμένα, είναι εξαιρετικά θρεπτικά (Rumpold και Schlüter 2013), αποδοτικοί μετατροπείς τροφοδοσίας (Oonincx et al. 2015, Halloran et al. 2016), μπορούν εύκολα να εκτραφούν σε οργανικά και γεωργικά απόβλητα και συνάδουν με τις στρατηγικές κυκλικής οικονομίας (Gasco et al. 2020), ενώ η παραγωγή τους έχει χαμηλό περιβαλλοντικό αποτύπωμα (Van Huis and Oonincx 2017).

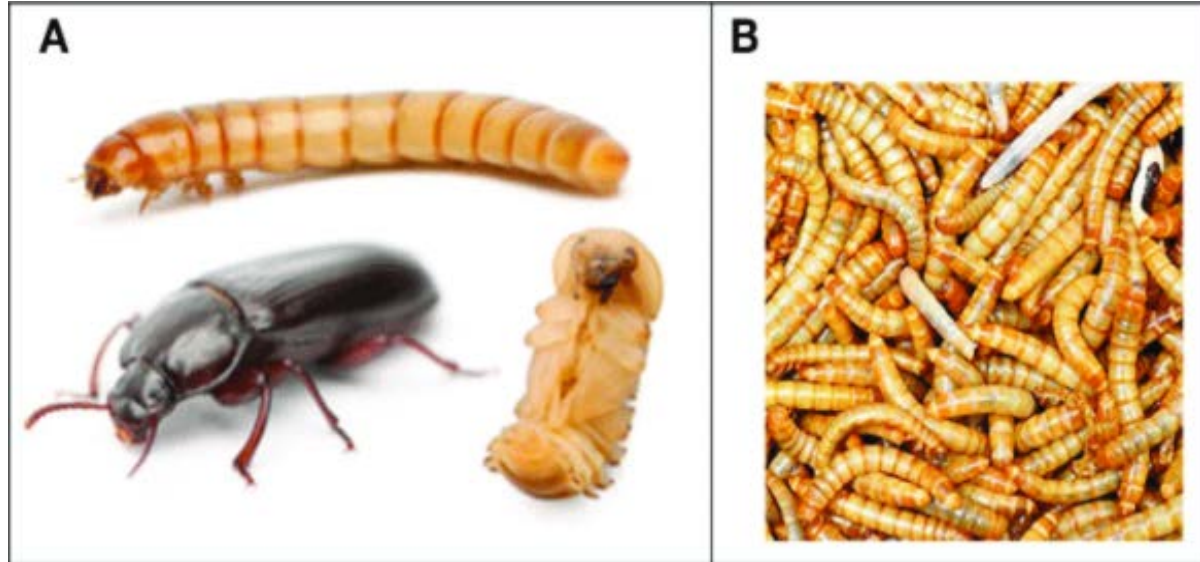
Εκτός από τα προαναφερθέντα πλεονεκτήματα, αρκετά είδη έχουν συγκεκριμένα φυσιολογικά χαρακτηριστικά, όπως π.χ υψηλός ρυθμός αναπαραγωγής, σύντομος κύκλος ζωής, ταχεία ανάπτυξη, καθώς και ευκολία στο χειρισμό και την κατεργασία, που ευνοούν την εμπορευματοποίησή τους.



Εικόνα 8. Βιώσιμες λύσεις για την οικονομία των εντόμων (Πηγή: Natural Resources Institute Finland, 2016).

Τα τρία είδη εντόμων που έχουν μελετηθεί ευρέως και εντάσσονται στα εγκεκριμένα από την Ευρωπαϊκή Επιτροπή είδη (ΕΕ 2017/893) είναι:

1. Οι προνύμφες του σκαθαριού του αλευριού (*Tenebrio molitor*, *Linnaeus 1758*)



Εικόνα 9. Προνύμφη του σκαθαριού του αλευριού (Πηγή: De Loof and Schoofs, 2019)

2. Οι προνύμφες της μύγας στρατιώτη (*Hermetia illucens*, *Linnaeus 1758*)



Εικόνα 10. Προνύμφη της μύγας στρατιώτη (Πηγή: van Huis and Oonincx, 2017)

3. Οι προνύμφες της κοινής οικιακής μύγας (*Musca domestica*, *Linnaeus 1758*)



Εικόνα 11. Βιολογικός κύκλος της κοινής οικιακής μύγας (Πηγή: Jim Kalisch, University of Nebraska-Lincoln, 2020).

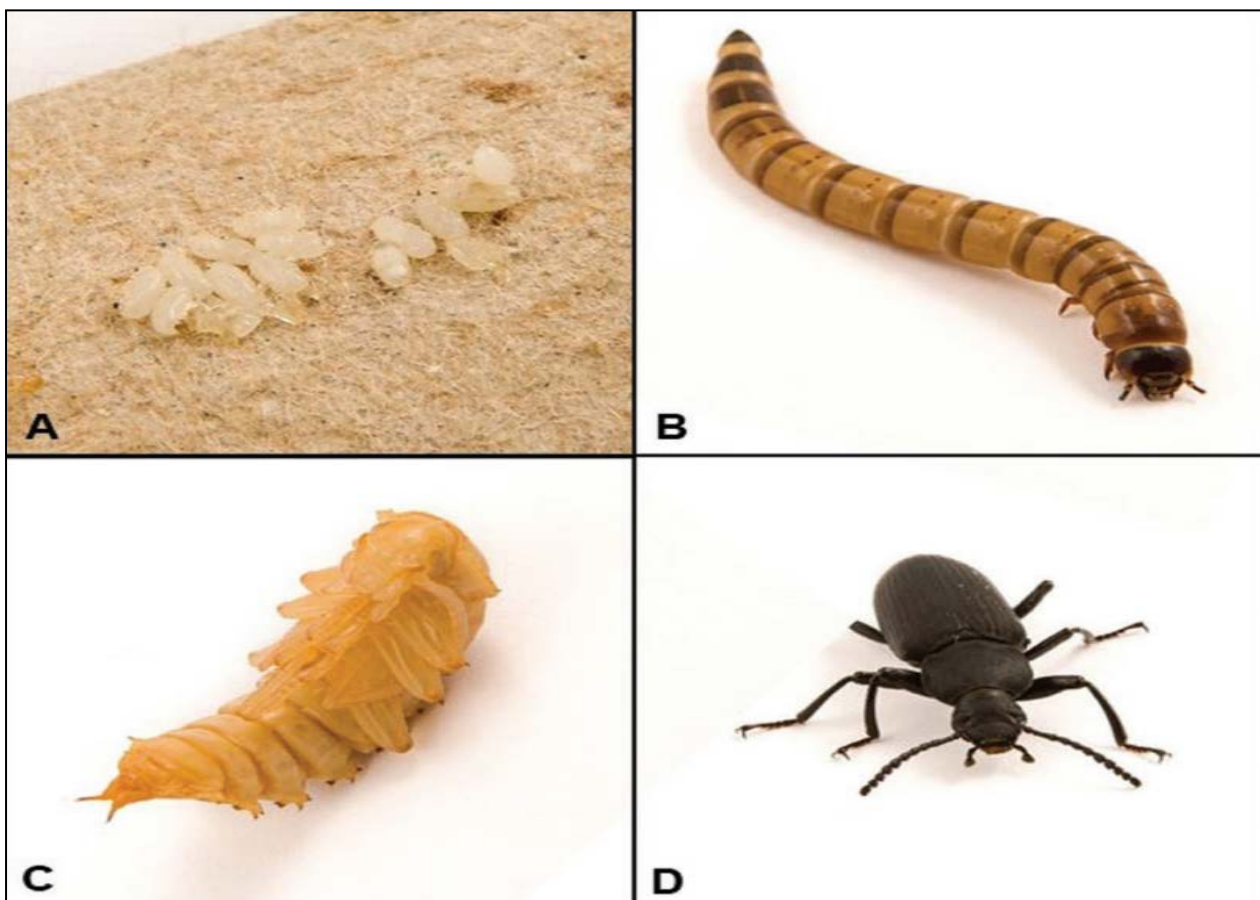
1.5 Το είδος *Zophobas morio*

Για τη διεξαγωγή της πειραματικής διαδικασίας, χρησιμοποιήθηκαν σιτηρέσια στα οποία αντικαταστάθηκε το ιχθυάλευρο (FM) με το είδος *Zophobas*, σε ποικίλα ποσοστά αντικατάστασης (%). Το *Zophobas morio* (Fabricius, 1776) (Εικόνα 12) ανήκει στη μεγάλη οικογένεια των σκαθαριών Tenebrionidae, που περιέχει πολλά είδη εντόμων “αποθηκευμένων προϊόντων”, όπως το *T. molitor* και το *A. diaperinus*, αλλά και τα σκαθάρια αλευριού, *Tribolium confusum* Jacquelin du Val (Coleoptera: Tenebrionidae), και το κόκκινο σκαθάρι του αλευριού, *Tribolium castaneum* (Herbst) (Coleoptera: Tenebrionidae).

Αν και αναφέρεται μεταξύ των εντόμων αποθηκευτικών χώρων, το *Z. morio* έχει συσχετιστεί με μόνο ένα αποθηκευμένο εμπόρευμα, το αλεύρι σίτου (Hagstrum and Subramanyam, 2009), υποδηλώνοντας την αμελητέα σημασία του ως παράσιτο

δευτερεύουσας αποθήκευσης. Στη φύση, έχει συσχετιστεί με το γκουανό της φρουτονυχτερίδας και τα οργανικά απορρίμματα (Tschinkel and Willson 1971).

Εντοπίζει τις ρίζες του στις τροπικές περιοχές της Κεντρικής και Νότιας Αμερικής (Marcuzzi 1984, Tschinkel 1984, Hagstrum and Subramanyam 2009); ωστόσο έχει εισαχθεί και σε άλλες περιοχές της Ευρώπης και της Ασίας (Yuan et al. 2012, Furson and Cherney 2018), στον Καναδά (Cotton, 1963) και τοπικά διαθέσιμο στη Μαλαισία χάρη στην καλή προσαρμογή του στο τροπικό κλίμα (Ghaly και Alkoaik, 2009).



Εικόνα 12. Στάδια ζωής του *Zophobas morio*, από αυγό σε ενήλικο: (Α) αυγά, (Β) προνύμφη όψιμης ηλικίας, (Γ) νύμφη και (Δ) ενήλικο (Πηγή: Rumbos & Athanassiou, 2020).

Καθώς είναι γνωστό ως καλύτερη πρωτεϊνική ζωοτροφή, το “σούπερ” σκουλήκι (*Zophobas morio*) είναι διαδεδομένο ως συμπληρωματικό ζωοτροφών για τα πουλιά και τα ψάρια (Ebeling, 1975).

Τα έντομα έχουν προσδιοριστεί ως εναλλακτική λύση στα ιχθυάλευρα στο μέλλον και η διαίτα με βάση το *Z. morio* είναι η πιο πολλά υποσχόμενη για να αξιολογηθεί εάν μπορεί να προσφέρει παρόμοια ανάπτυξη στα ψάρια όπως μια διαίτα βασισμένη σε ιχθυάλευρο. (Jabir et al, 2012).

Πίνακας 5. Προσεγγιστική σύνθεση προνυμφών και ενηλίκων *Z. morio* (Rumbos & Athanassiou, 2020).

	Νύμφες (a)	Ενήλικα (b)
Ξηρή ύλη (Dry Matter DM % as fed)	35.2-42.1	38.2
Συνολικό άζωτο (% DM)	6.2-8.6	10.9
Ακατέργαστο λίπος (%DM)	35.0-43.6	14.3
Τέφρα (%DM)	2.4-8.2	6.2
Αδιάλυτη ουδέτερη ίνα (Neutral detergent fiber NDF %DM)	9.3-13.0	50.1
Αδιάλυτη όξινη ίνα (Acid detergent fiber ADF %DM)	6.3-6.5	32.1
Ενέργεια (kcal/100g DM)	559.2-575.5	n.r
(n.r) not reported (a). Οι τιμές δείχνουν το εύρος των μέσων τιμών από δημοσιευμένες πηγές (Barker et al. 1998; Finke 2002,2007,2015; Yi et al. 2013; Barroso et al. 2014; Bosh et al 2014; Adamkova et al. 2016,2017; Araujo et al. 2019) (b). Πηγή Oonincx and Dierenfeld (2012).		

Πίνακας 6. Περιεκτικότητα σε αμινοξέα (% DM) των προνυμφών *Zophobas morio* (Rumbos & Athanassiou, 2020).

Αργινίνη	2.2-3.5	Βαλίνη	2.4-3.4
Ιστιδίνη	1.4-2.3	Αλανίνη	3.4-4.0
Λευκίνη	3.4-4.5	Ασπαραγινικό οξύ	3.8-4.7
Λυσίνη	2.4-2.9	Γλυκίνη	2.3-3.0
Ισολευκίνη	2.2-2.4	Σερίνη	2.2-2.7

Φαινυλαλανίνη	1.6-2.2	Προλίνη	2.6-3.7
Μεθειονίνη	0.5-1.0	Κυστίνη	0.4-0.5
Θρεονίνη	1.9-2.0	Γλουταμινικό οξύ	5.7-6.6
Τρυπτοφάνη	0.4-0.5	Τυροσίνη	3.3-3.9
Οι τιμές δείχνουν το εύρος των μέσων τιμών από δημοσιευμένες πηγές (Finke 2002, 2007, 2015; Bosch et al. 2014).			

1.6 Εντερικό Μικροβίωμα

Οι συμβιωτικοί μικροοργανισμοί και οι ζωικοί ξενιστές τους βρίσκονται σε διαρκώς δυναμική σχέση. Κάθε είδος έχει ξεχωριστές διατροφικές απαιτήσεις και αυτό δημιουργεί συγκεκριμένες περιβαλλοντικές συνθήκες που θέτουν διαφορετικές επιλεκτικές πιέσεις στους μικροβιώτες του εντέρου, ενώ οι μικροβιώτες αλληλεπιδρούν με τον ξενιστή (McKenney et al, 2018) και επηρεάζει την ανάπτυξη και την υγεία του ξενιστή (Martiny et al, 2015). Για τους μικροβιώτες του εντέρου διαφόρων ζώων, μια τέτοια συμβιωτική σχέση είναι συχνά ρυθμιζόμενη σε κάποιο βαθμό από την παρεχόμενη δίαιτα (Ringø et al, 2016) και επίσης σχετίζεται με μη διατροφικούς παράγοντες, όπως η επιλογή από τον ξενιστή (π.χ. Brooks et al, 2016, Astudillo-Garcia et al, 2017, Suzuki et al, 2019), ειδικά για συγκεκριμένη απόκριση, όπως η προσαρμογή σε χαμηλότερες θερμοκρασίες (Kokou et al, 2018).

Ένας από τους κύριους λόγους για τη μελέτη του μικροβιώματος του εντέρου των ψαριών είναι η ιδέα ότι, αυτές οι κοινότητες μπορούν να τροποποιηθούν για να βελτιώσουν την υγεία του ξενιστή. Προϋπόθεση αυτής της προσέγγισης είναι ο προσδιορισμός του μικροβιώματος του εντέρου του υπό εξέταση είδους. Πολλοί παράγοντες συμβάλλουν στη σύνθεση του μικροβιώματος του εντέρου στα σπονδυλωτά, όπως η γενετική του ξενιστή, το περιβάλλον και η διατροφή μεταξύ άλλων. Η ανακάλυψη

ενός κεντρικού (core) μικροβιώματος, δηλαδή των μελών της μικροβιακής κοινότητας που υπάρχουν σε όλα τα άτομα ενός είδους, ήταν πρωταρχικός στόχος για πολλούς ερευνητές που ενδιαφέρονται να κατανοήσουν τις μικροβιακές κοινότητες του εντέρου (Turnbaugh et al. 2007). Ωστόσο, ο καθορισμός ενός πυρήνα μικροβιώματος έχει αποδειχθεί ότι είναι δύσκολο έργο σε πολλά είδη, συμπεριλαμβανομένων των ανθρώπων, καθώς οι οικολογικές σχέσεις σε κάθε κοινότητα είναι περίπλοκες και πολλές παράμετροι πρέπει να ληφθούν υπόψη, όπως η σύνθεση, η φυλογένεση, η ανθεκτικότητα και η συνδεσιμότητα (Shade and Handelsman 2012).

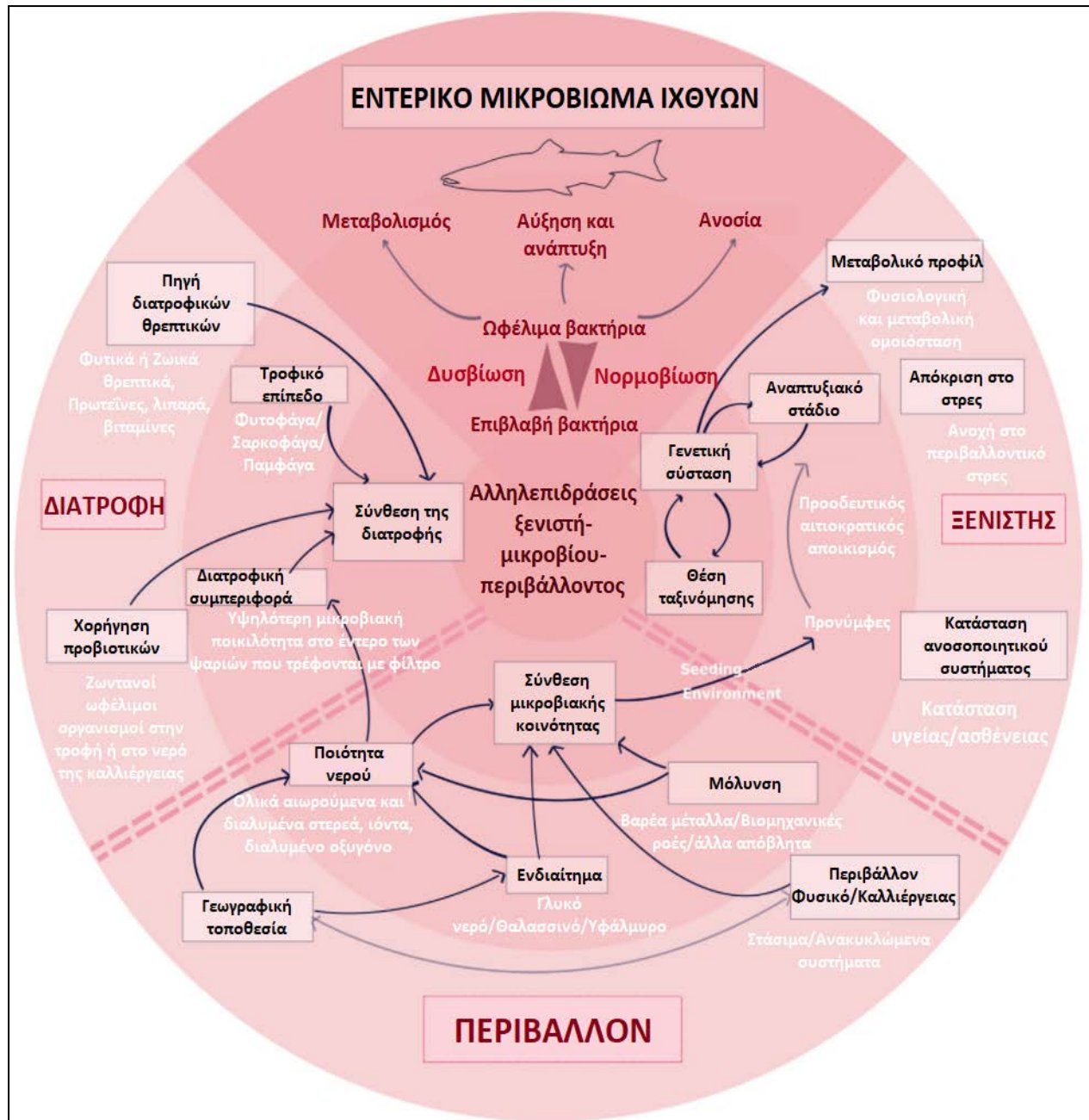
Το μικροβίωμα των ψαριών μπορεί να είναι ποικίλο, συμπεριλαμβάνοντας ιούς, προκαρυώτες και μονοκύτταρους ευκαρυώτες (Merrifield and Rodiles, 2015). Ωστόσο, τα βακτήρια αποτελούν τους κυρίαρχους μικροβιώτες του εντέρου του ψαριού (Rombout et al., 2011) και έχουν αποτελέσει σχεδόν το μοναδικό επίκεντρο της έρευνας σε αυτόν τον τομέα έως σήμερα.

Συνολικά, το μικροβίωμα του εντέρου των ψαριών φαίνεται να κυριαρχείται από το γένος *Proteobacteria*, ακολουθούμενο από τα *Fusobacteria* και *Firmicutes* και σε μικρότερο ποσοστό τα *Bacteroidetes*, *Actinobacteria* και *Verrucomicrobia* (Llewellyn et al., 2014), για μια περίληψη των κύριων φυλών που εντοπίστηκαν σε πρόσφατες μελέτες). Επίσης έχει παρατηρηθεί το γένος *Patescibacteria* σε τιλάπιες που είχαν τραφεί με σύμπηκτα εμπορικών ζωοτροφών μαζί με γλυκοπατάτα και σε άλλη μεταχείριση με διαλυμένο ανόργανο λίπασμα (Lara Parata et al. 2023). Τα *Proteobacteria*, τα *Fusobacteria* και τα *Firmicutes* φέρονται να κυριαρχούν στο μικροβίωμα του εντέρου των περισσότερων ειδών ψαριών που έχουν μελετηθεί μέχρι σήμερα, συμπεριλαμβανομένων των θαλάσσιων (Hennersdorf et al. 2016) και των ειδών του γλυκού νερού (Larsen et al. 2014; Eichmiller et al. 2016;), και. μπορούν να αντιπροσωπεύουν έως και το 90% των

κοινοτήτων. Όλα αυτά τα φύλα βρίσκονται τόσο σε αλλόχθονες (παροδικές) όσο και σε αυτόχθονες (προσκολλημένες) μικροβιακές κοινότητες. Η πυκνότητα, η σύνθεση και η λειτουργία των μικροβιωτών αλλάζουν στα διάφορα τμήματα του γαστρεντερικού σωλήνα του ψαριού (Clements et al., 2014), όπου παρόμοια με τα ανώτερα σπονδυλωτά, βρίσκεται ο πυκνότερος πληθυσμός μικροβίων στους τελεόστεους ιχθύες (Egerton et al, 2018).

Η σύνθεση των εντερικών μικροβιακών κοινοτήτων των ιχθύων έχει αποδειχθεί ότι προσαρμόζεται, όταν ο ξενιστής τρέφεται με διαφορετικά συστατικά. Τα ιχθυάλευρα και η σόγια είναι οι συμβατικές πηγές πρωτεΐνης που χρησιμοποιείται σε ιχθυοτροφές. Ωστόσο, αυτές οι επιλογές τροφοδοσίας δεν είναι πλέον βιώσιμες λόγω της προοδευτικής εξάντλησης των αποθεμάτων άγριων ψαριών και το σημαντικό περιβαλλοντικό κόστος της χερσαίας, πλούσιας σε πρωτεΐνες, καλλιέργειας φυτών (Rimoldi et al, 2019).

Ως κυρίαρχες ταξινομικές ομάδες στο στομάχι της τσιπούρας (*Sparus aurata*), αναφέρθηκαν τα Firmicutes, Proteobacteria και Bacteroidetes (de Paula Silva et al., 2011). Ωστόσο, μια μεταγενέστερη μελέτη ανέφερε ότι οι κυρίαρχες συνομοταξίες ήταν τα Firmicutes, Proteobacteria και Actinobacteria (Estruch et al., 2015). Και οι δύο μελέτες βρήκαν ότι τα Vibrionaceae είναι μια κυρίαρχη οικογένεια, αναφέροντας το γένος *Photobacterium*.



Εικόνα 16. Παράγοντες που επηρεάζουν την ποικιλομορφία και τη λειτουργία του μικροβιώματος του εντέρου των ψαριών (Πηγή: Talwar et al. 2018).

Εκτός από αυτό, οι Estruch et al. (2015) ανέφεραν επίσης την οικογένεια Enterobacteriaceae, τα γένη Streptococcus και Clostridium of Firmicutes και το γένος *Corynebacterium* των Actinobacteria, ενώ οι de Paula Silva et al. (2011) βρήκαν βακτήρια που σχετίζονται με το γένος *Vibrio* μαζί με είδη από την οικογένεια Bacillales of Firmicutes και το γένος Flavobacteriaceae των Bacteroidetes.

Τα αποτελέσματα στους μικροβιώτες του στομάχου πρέπει να αντιμετωπίζονται με προσοχή. Αυτές οι δύο μελέτες χρησιμοποίησαν το περιεχόμενο του στομάχου για ανάλυση το οποίο είναι πιθανό να επηρεάζεται από παροδική τροφή.

1.7 Σκοπός της μεταπτυχιακής διατριβής

Ο σκοπός της μεταπτυχιακής διατριβής είναι να προσδιοριστούν πιθανές σχέσεις ανάμεσα στις διατροφικές μεταχειρίσεις με σιτηρέσια που περιέχουν εντομόλευρα και τις μικροβιακές κοινότητες που διαβιούν στον εντερικό σωλήνα της τσιπούρας. Η μελέτη της αποτελεσματικής χρήσης των αλεύρων τους ως εναλλακτικές πηγές θρεπτικών συστατικών και σίτισης, είναι ιδιαίτερα σημαντική για τη βελτίωση της ποιότητας των ψαριών και της παραγωγής στην ελληνική υδατοκαλλιέργεια.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Δειγματοληψία

Για την πραγματοποίηση της μελέτης, έγινε εξαγωγή DNA από δείγματα που συλλέχθηκαν από μεσέντερο (midgut) τσιπούρας (*Sparus aurata*). Το διατροφικό πείραμα έγινε με το είδος *Zophobas morio* και πραγματοποιήθηκε σε ενυδρεία στις εγκαταστάσεις του Τμήματος Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, στο ΤΟΛ Υδατοκαλλιεργειών.

Οι προνύμφες του *Zophobas morio* προήλθαν από φυσικό πληθυσμό που εκτρέφεται στο Εργαστήριο Εντομολογίας και Γεωργικής Ζωολογίας του Τμήματος Γεωπονίας, Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος.

Οι τροφές που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι:

- ❖ Control με 100% ιχθυάλευρο (Fishmeal, FM) ως κύρια πηγή πρωτεϊνών (Μάρτυρας)
- ❖ 10% αντικατάσταση ιχθυαλεύρου με *Zophobas morio* χαμηλών λιπαρών (low fat)
- ❖ 20% αντικατάσταση ιχθυαλεύρου με *Zophobas morio* χαμηλών λιπαρών (low fat)
- ❖ 30% αντικατάσταση ιχθυαλεύρου με *Zophobas morio* χαμηλών λιπαρών (low fat)
- ❖ 10% αντικατάσταση ιχθυαλεύρου με *Zophobas morio* με πλήρη λιπαρά (full fat)

2.2 Πρωτόκολλο εργαστηριακής διαδικασίας

Το πρωτόκολλο εξαγωγής DNA που εφαρμόστηκε ήταν το Qiagen DNA extraction protocol.

1. Χρησιμοποιήθηκαν 25mg δείγματος σε σωλήνα μικροφυγοκέντρωσης 1,5ml. Προστέθηκαν 180μL Buffer ATL και 20μL Proteinase K, πραγματοποιήθηκε ανάδευση (vortex) και ακολούθησε περίοδος επώασης 3 ωρών στους 56 °C, με επανάληψη της ανάδευσης κάθε 30 λεπτά.
2. Προστέθηκαν 200μL Buffer AL, έγινε ανάδευση για 15s και επώαση για 10 λεπτά στους 70 °C. Ακολούθησε προσθήκη 200μL ethanol (96-100%) και ανάδευση για 15s.
3. Το μείγμα του προηγούμενου βήματος (συμπεριλαμβανομένου του ιζήματος), μεταφέρθηκε σε στήλη QIAamp mini spin (σε σωλήνα συλλογής 2 ml) και φυγοκεντρήθηκε στα 6.000xg (8.000 rpm) για 1 λεπτό.
4. Η στήλη QIAamp mini spin τοποθετήθηκε σε σωλήνα συλλογής 2ml, προστέθηκαν 500μL Buffer AW1 και φυγοκεντρήθηκε στα 6000xg (8.000 rpm) για 1 λεπτό.

5. Η στήλη QIAamp mini spin τοποθετήθηκε σε σωλήνα συλλογής 2ml, προστέθηκαν 500μL Buffer AW2 και ακολούθησε φυγοκέντρωση στα 20.000xg για 3 λεπτά.
6. Η στήλη QIAamp mini spin τοποθετήθηκε στον ίδιο σωλήνα συλλογής και φυγοκεντρήθηκε στα 20.000xg για 1 λεπτό.
7. Η στήλη QIAamp mini spin τοποθετήθηκε σε σωλήνα συλλογής 1.5ml, προστέθηκαν 70μL Buffer AE. Ακολούθησε επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά και στη συνέχεια φυγοκέντρωση στα 6.000xg για 1 λεπτό. Στη συνέχεια τα δείγματα καταψύχθηκαν στους -40°C.

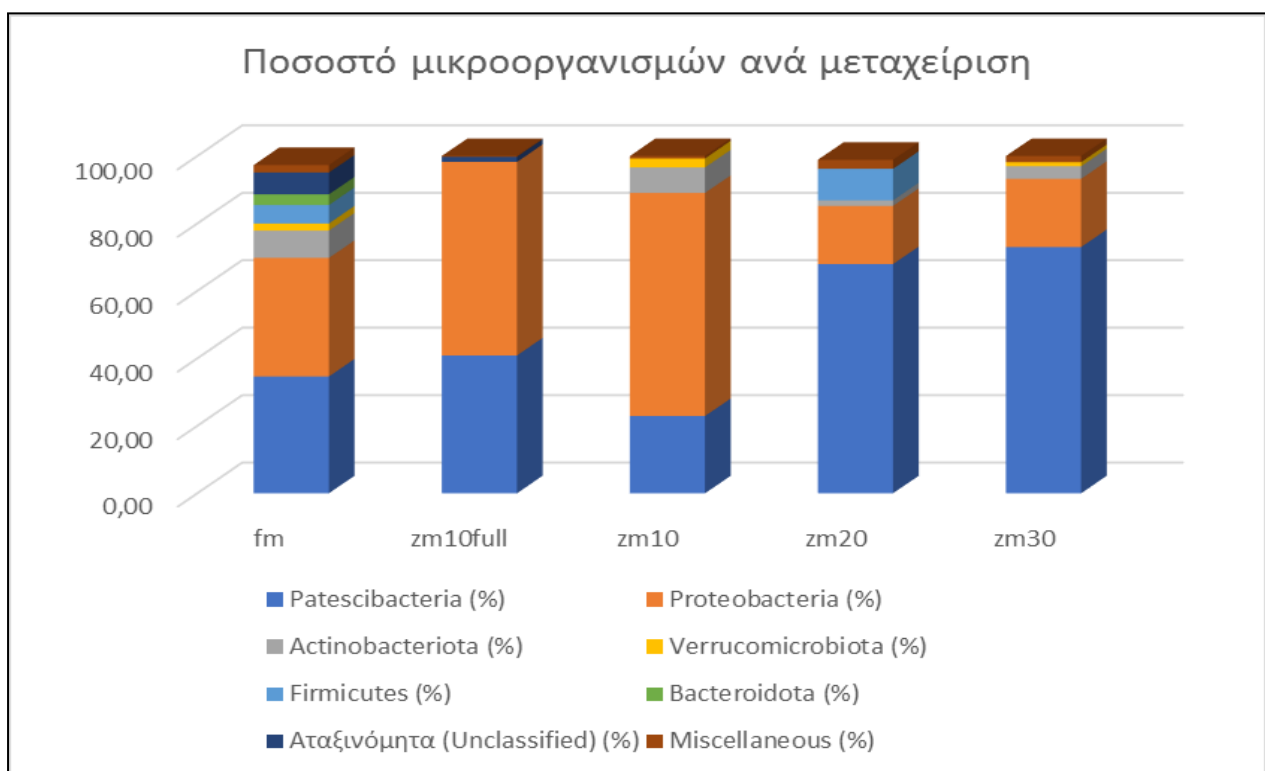
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Οι λειτουργικές ταξινομικές μονάδες (OTUs - Operational Taxonomic Unit) που ανιχνεύθηκαν κατά την ανάλυση των δειγμάτων είναι οι εξής: Patescibacteria, Proteobacteria, Actinobacteria, Firmicutes, Dependuntiae, Verrucomicrobiota, Bacteroidota, Acidobacteriota, Planctomycetes, Myxococcus, Desulfobacterota, Chloroflexi, Cyanobacteria, Gemmatimonadota και Campylobacterota. Τα κυριότερα OTUs, τα οποία εμφανίζονται στην πλειοψηφία των δειγμάτων και σε υψηλούς αριθμούς είναι τα Patescibacteria και τα Proteobacteria, καθώς και σε μικρότερη κλίμακα τα Actinobacteria. Τα υπόλοιπα OTUs εμφανίζονται σε χαμηλότερους ή και αμελητέους αριθμούς καθώς και κάποια τα οποία δεν αναγνωρίστηκαν και καταχωρήθηκαν ως αταξινόμητα (Unclassified) (Πίν. 7, Διάγρ. 1).

Πίνακας 7: Κατανομή ποσοστών περιεκτικότητας ανά φύλο και μεταχείριση.

Φύλο	FM	<i>Zophobas morio</i> 10% Full fat	<i>Zophobas morio</i> 10% Low fat	<i>Zophobas morio</i> 20% Low fat	<i>Zophobas morio</i> 30% Low fat
Patescibacteria	34.64%	40.87%	22.91%	67.97%	73.02%
Proteobacteria	35.16%	57.38%	66.16%	17.24%	20.24%

Actinobacteriota	8.11%	Αμελητέα	7.56%	1.66%	3.71%
Verrucomicrobiota	2.09%	Αμελητέα	2.66%	Αμελητέα	1.21%
Firmicutes	5.48%	Αμελητέα	Αμελητέα	9.34%	Αμελητέα
Bacteroidetes	3.15%	Αμελητέα	Αμελητέα	Αμελητέα	Αμελητέα
Αταξινόμητα (Unclassified)	6.48%	1.54%	Αμελητέα	Αμελητέα	Αμελητέα
Miscellaneous	2.23%	0.21%	0.71%	2.68%	1.82%



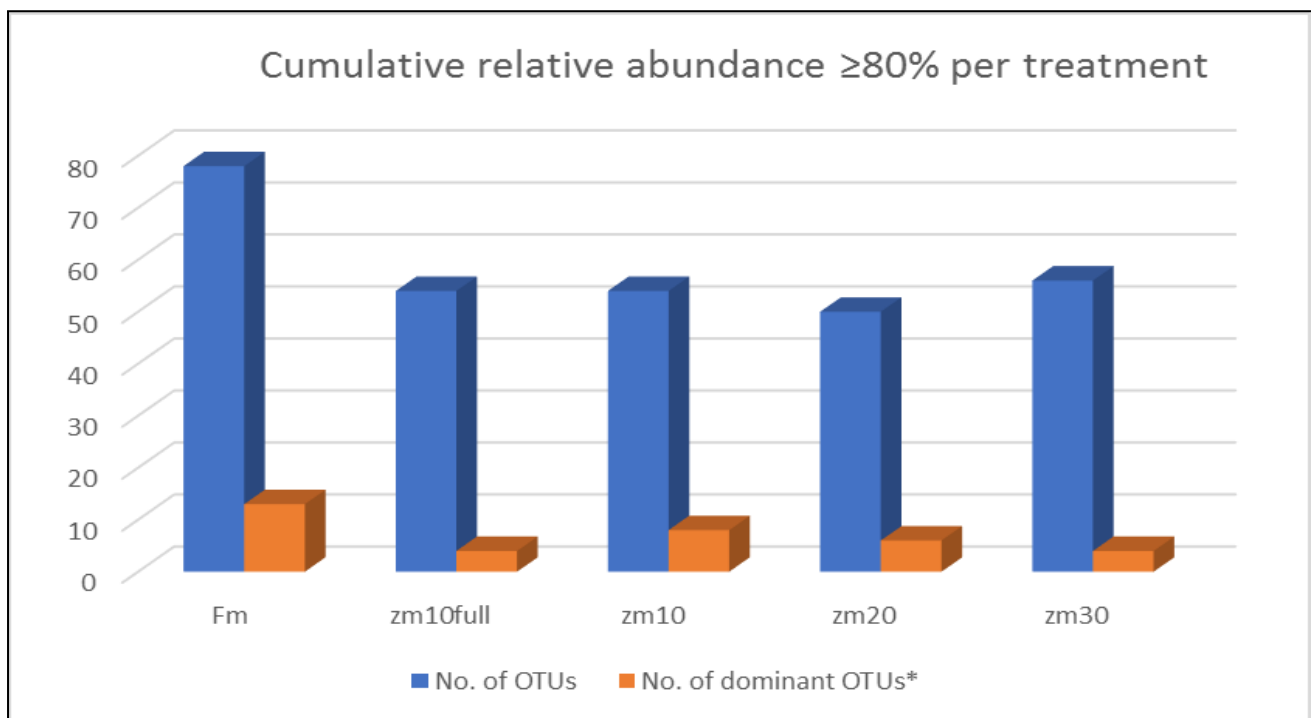
Διάγραμμα 1: Κατανομή ποσοστών περιεκτικότητας ανά φύλο βακτηρίων και μεταχείριση.

Στο FM (μάρτυρας) υπάρχει περίπου ισότιμη συμμετοχή μεταξύ των Patescibacteria και Proteobacteria που καλύπτουν περίπου το 35% του συνολικού πληθυσμού έκαστο. Υπάρχουν επίσης μικρά ποσοστά αρκετών ακόμα φύλων. Συγκριτικά με τα αποτελέσματα παρόμοιων ερευνών σε *S. aurata*, στις οποίες πραγματοποιήθηκαν πειραματισμοί με *T. molitor* και *M. domestica* (Panteli et al., 2021), στη μεταχείριση με FM παρατηρήθηκε η

μεγαλύτερη αφθονία σε OTU's, ενώ στις μεταχειρίσεις με *Z. morio*, η συμμετοχή των Patescibacteria και Proteobacteria υπερκαλύπτει τη συμμετοχή των υπόλοιπων βακτηρίων.

Σε σχέση με το FM, το ZM 10% Full fat παρουσιάζει μεγαλύτερα ποσοστά παρουσίας και για τα 2 κύρια φύλα, με τα Proteobacteria να υπερτερούν στο γενικό σύνολο σε ποσοστό 57%. Τα υπόλοιπα φύλα εμφάνισαν πολύ χαμηλή αφθονία.

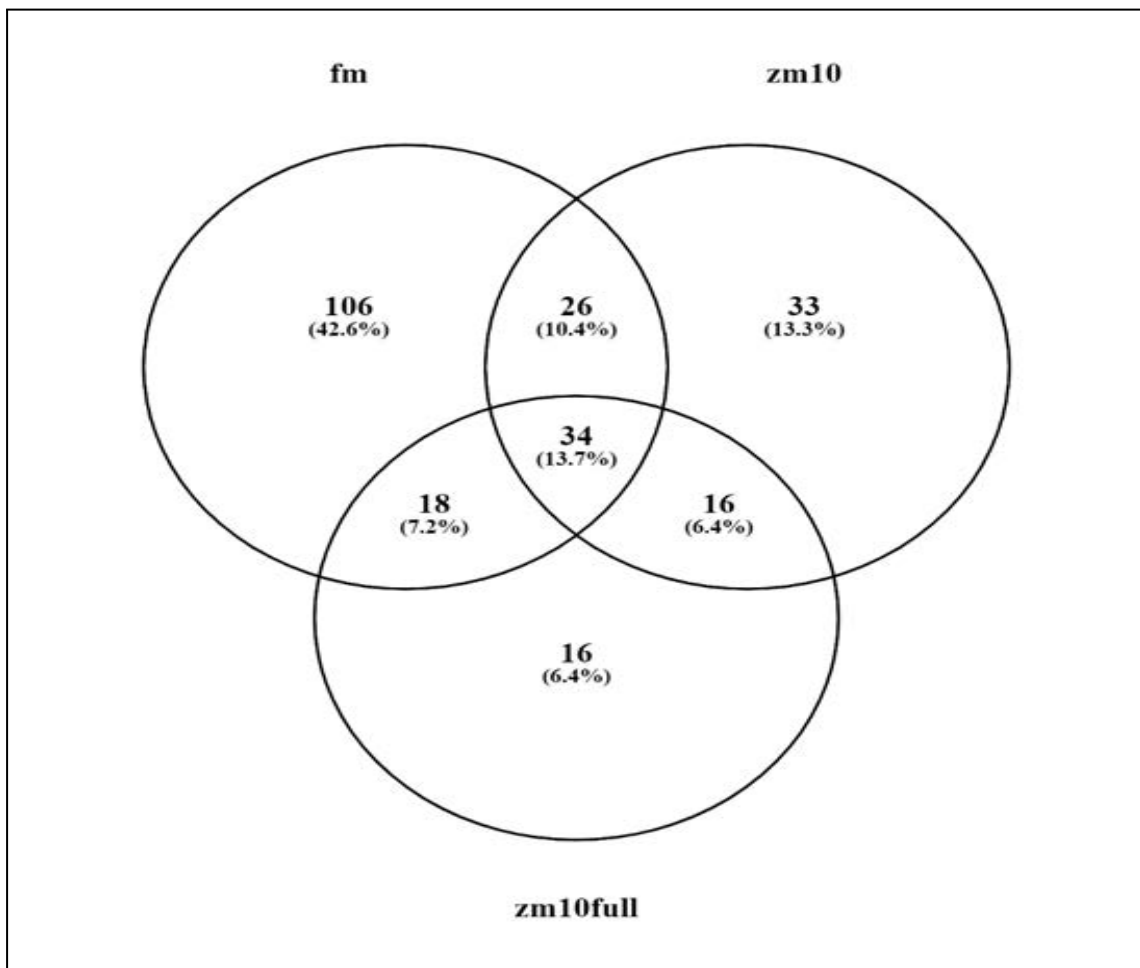
Παρόμοια η μεταχείριση με ZM 10% Low fat ευνόησε ακόμη περισσότερο τα Proteobacteria. Ωστόσο σε σχέση με το ZM 10% Full fat, το ZM 10% Low fat παρουσιάζει μικρότερη ανάπτυξη των Patescibacteria με ποσοστό 23%, αλλά σημαντικά υψηλότερη στα Proteobacteria τα οποία πρωτοστατούν σε ποσοστό 66% του συνόλου. Ακολουθούν τα Actinobacteria και τα Verrucomicrobiota με μικρότερα αλλά παρατηρήσιμα ποσοστά και τα απομένοντα φύλα παρουσίασαν αμελητέα παρουσία.



Διάγραμμα 2: Αθροιστική σχετική αφθονία οικογενειών βακτηρίων με ποσοστό $\geq 80\%$ ανά μεταχείριση.

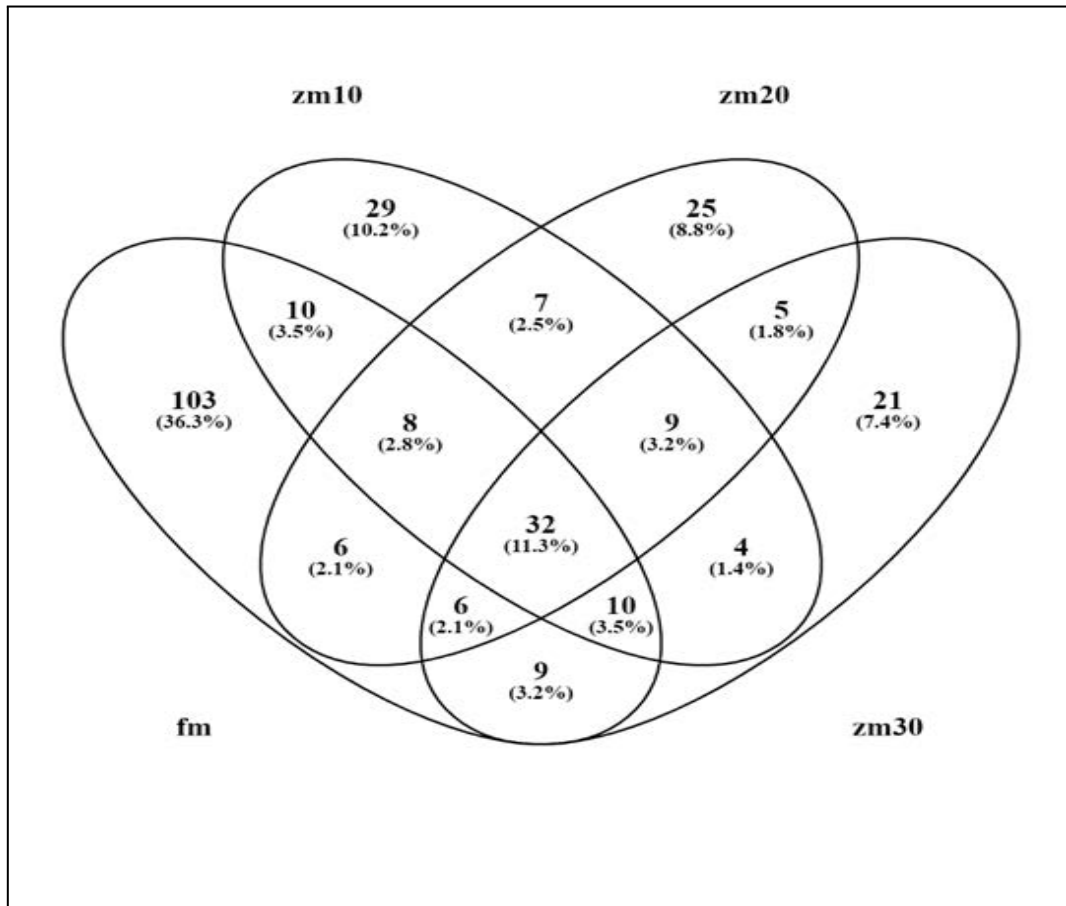
Όπως φαίνεται και στο Διάγραμμα 2, υπάρχει μεγάλη αφθονία σε οικογένειες βακτηρίων, αλλά αυτές που συνεισφέρουν έτσι ώστε η συγκέντρωση σε βακτήρια να είναι μεγαλύτερη από 80% είναι πολύ λίγες σχετικά με το σύνολό τους.

Σύμφωνα με το Venn Διάγραμμα 3, από τις συνολικά 184 οικογένειες που συμμετέχουν στη μεταχείριση FM, οι κοινές οικογένειες που συμμετέχουν και στη διαχείριση ZM 10% Low fat είναι 60, ενώ οι κοινές οικογένειες που συμμετέχουν και στη διαχείριση ZM 10% Full fat είναι 52, και αποτελούν σε ποσοστό το 55% των οικογενειών που συμμετέχουν στη διαχείριση ZM 10% Low fat και αντίστοιχα το 62% των οικογενειών που συμμετέχουν στη διαχείριση ZM 10 % Full Fat.



Διάγραμμα 3: Αριθμός κοινών λειτουργικών οικογενειών για τις μεταχειρίσεις FM, ZM 10% Low fat και ZM 10% Full fat.

Αντίστοιχα, οι οικογένειες που συμμετείχαν από κοινού στις μεταχειρίσεις ZM 20% Low fat με FM και ZM 30% Low fat με FM, ήταν 52 και 57, σε ποσοστό 53% και 60% αντίστοιχα των συνολικών οικογενειών που συμμετείχαν σε αυτές τις μεταχειρίσεις (Διάγραμμα 4).



Διάγραμμα 4: Αριθμός κοινών OTUs για τις μεταχειρίσεις

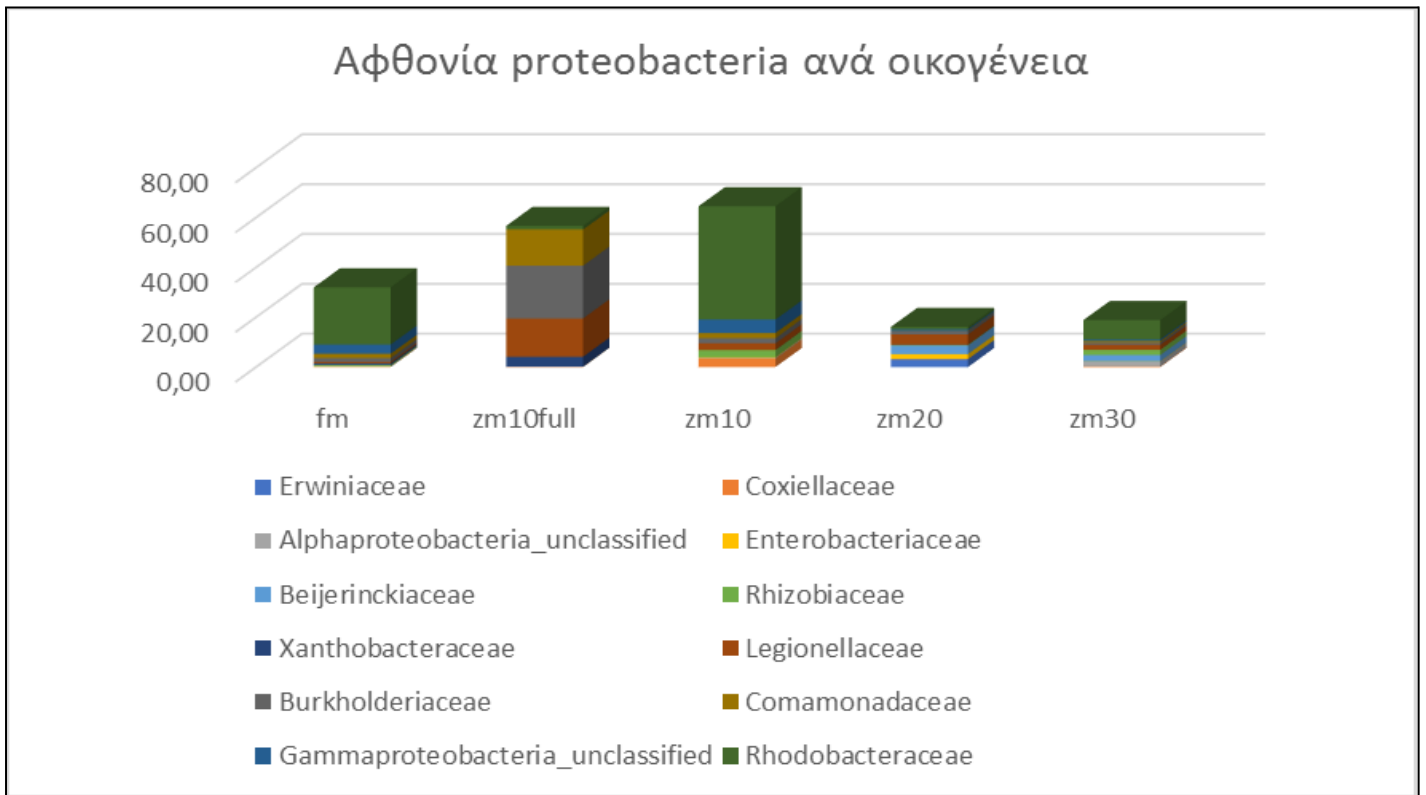
Τα αποτελέσματα των διαγραμμάτων Venn, για τις μεταχειρίσεις με εντομάλευρα συγκριτικά με το δείγμα μάρτυρα, παρουσιάζονται συνοπτικά στον Πίνακα 8.

Πίνακας 8: Αριθμός και ποσοστό κοινών OTUs για τις μεταχειρίσεις, συγκριτικά με τη διαχείριση FM.

Μεταχείριση	FM	<i>Zophobas morio</i> 10% Full fat	<i>Zophobas morio</i> 10% Low fat	<i>Zophobas morio</i> 20% Low fat	<i>Zophobas morio</i> 30% Low fat
-------------	----	------------------------------------	-----------------------------------	-----------------------------------	-----------------------------------

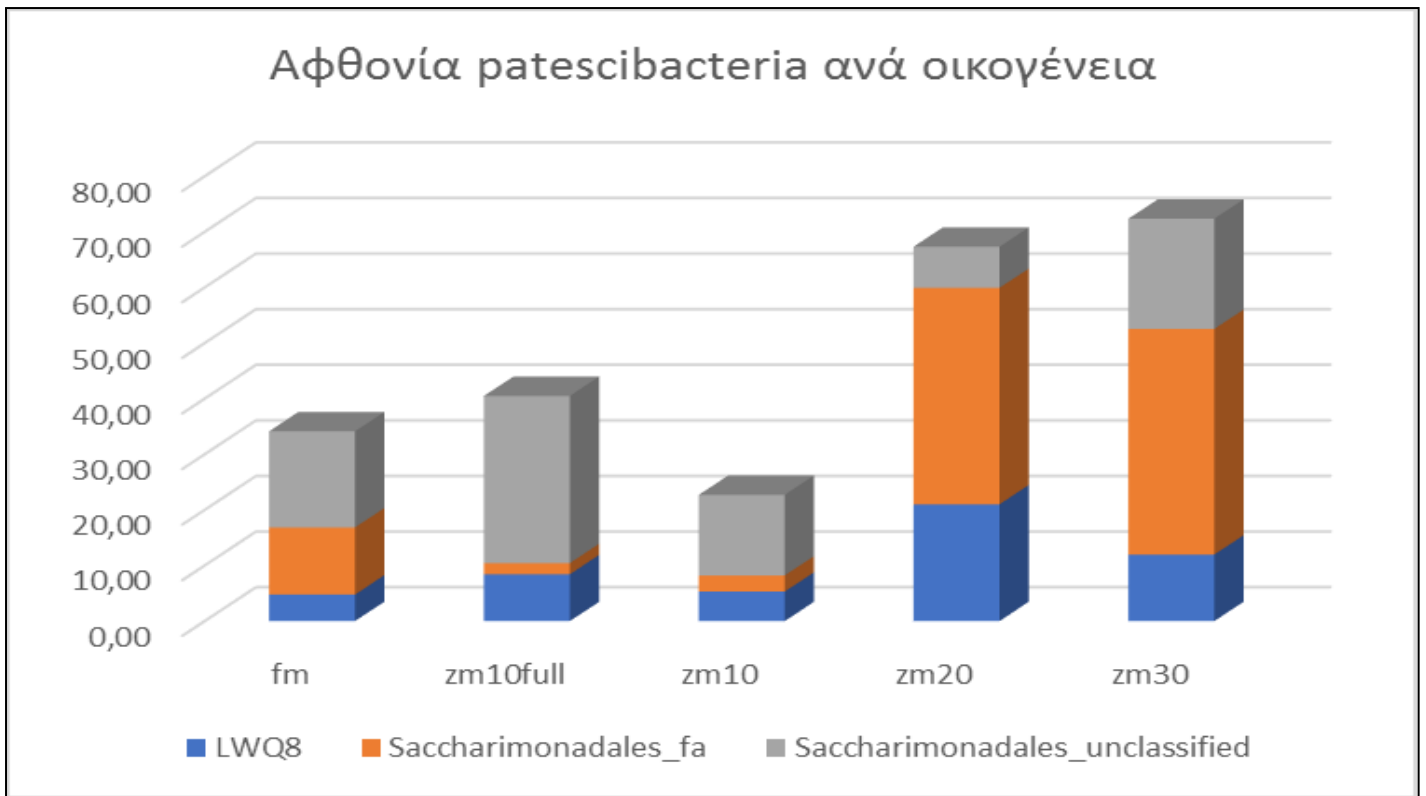
Οικογένειες που συμμετείχαν	184	84	109	98	96
Κοινές οικογένειες με FM (αριθμός)	184	52	60	52	57
Κοινές οικογένειες με FM (ποσοστό)	100%	62%	55%	53%	59%

Τα Proteobacteria παρουσιάζουν τη μεγαλύτερη ποικιλία σε αριθμό οικογενειών που τα εκπροσωπούν, με το σύνολο οικογενειών να είναι 12. Σε όλες τις μεταχειρίσεις με προσθήκη αλεύρου χαμηλών λιπαρών, εμφανίζονται επίσης πολλές οικογένειες, με ορισμένες να υπερτερούν, όπως οι Rhodobacteraceae, Burkholderiaceae και Legionellaceae (Διάγραμμα 5). Οι υπόλοιπες οικογένειες εκπροσωπούνται συνήθως σε χαμηλότερα ποσοστά. Η διαφορά εντοπίζεται στη διαχείριση ZM 10% Full fat, όπου στο Διάγραμμα 5 φαίνεται αντί για την οικογένεια των Rhodobacteraceae, να υπερτερεί η οικογένεια των Enterobacteriaceae, ενώ η οικογένεια Burkholderiaceae βρίσκεται σε σχεδόν ισάξιο ποσοστό με τις άλλες δύο, κάτι το οποίο δεν παρατηρείται στις υπόλοιπες μεταχειρίσεις. Τέλος, παρατηρείται ότι όσο αυξάνεται η προσθήκη αλεύρου, η αφθονία των οικογενειών υπάρχει αλλά τα ποσοστά συμμετοχής τους είναι πολύ πιο χαμηλά. Βέβαια αυτό συνδέεται και με το γεγονός ότι η συμμετοχή των proteobacteria στα δείγματα ZM 20% και ZM 30% είναι πολύ μικρότερη από αυτή στα δείγματα ZM 10% Low fat, FM και ZM 10% Full fat.



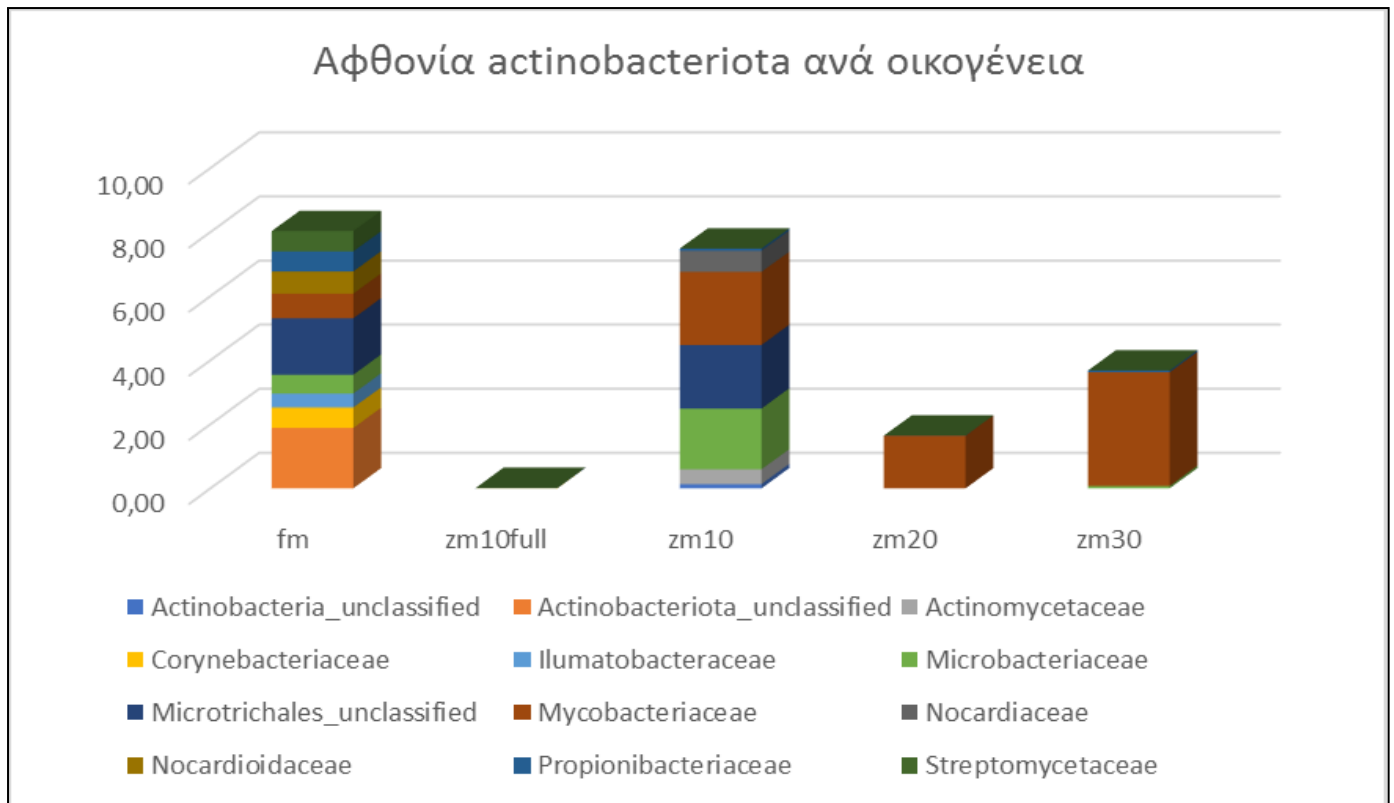
Διάγραμμα 5: Αφθονία Proteobacteria ανά οικογένεια για τις διάφορες μεταχειρίσεις

- Τα Patescibacteria παρουσιάζουν μικρή ποικιλία οικογενειών που υπερτερούν και εμφανίζονται σε όλες τις μεταχειρίσεις. Οι μεταχειρίσεις με FM και ZM 10% Full fat, ενόησαν την οικογένεια Saccharimonadales. Το ZM 20% Low fat και ZM 30% Low fat ενόησαν περισσότερο όλες τις οικογένειες που παρατηρήθηκαν, με τον συνολικό αριθμό των οργανισμών να είναι σημαντικά υψηλότερος σε σχέση με τις υπόλοιπες μεταχειρίσεις και ιδιαίτερα την οικογένεια Saccharimonadales_fa (Διάγραμμα 6).



Διάγραμμα 6: Αφθονία Patescibacteria ανά οικογένεια για τις διάφορες μεταχειρίσεις.

- Τα Actinobacteria παρουσιάζουν μέτρια ποικιλία οικογενειών, ωστόσο υπάρχουν μεγάλες διαφορές ανά μεταχείριση, όπου για τις FM και ZM 10% Low fat παρατηρείται ότι ευνόησαν περισσότερες οικογένειες συνολικά. Παρόλα αυτά, στην μεταχείριση με ZM 10% Full fat δεν παρατηρήθηκαν σχεδόν καθόλου Actinobacteria. Στις μεταχειρίσεις ZM 20% Low fat και ZM 30% Low fat παρατηρείται σχεδόν αποκλειστικά η οικογένεια των Mycobacteriaceae (Διάγραμμα 7).



Διάγραμμα 7: Αφθονία Actinobacteria ανά οικογένεια για τις διάφορες μεταχειρίσεις

Στατιστικά, τα αποτελέσματα παρουσιάζουν ακρίβεια (Πίνακας 10), οπότε θεωρείται ότι τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης μπορούν να συγκριθούν με τα αποτελέσματα άλλων μελετών, όπως θα συμβεί στο επόμενο Κεφάλαιο.

Πίνακας 10: Έλεγχος κανονικότητας, σύμφωνα με την εξίσωση των Kolmogorov-Smirnov.

Tests of Normality							
Factor	Kolmogorov-Smirnov ^a				o-Wilk	df	Sig.
					c		
Dietary FM	0,387	184	0,000		0,258	184	0,000
ZM10F	0,460	84	0,000		0,293	84	0,000
ZM10	0,369	109	0,000		0,356	109	0,000
ZM20	0,413	98	0,000		0,225	98	0,000
ZM30	0,414	96	0,000		0,215	96	0,000

Συνολικά, τα αποτελέσματα που προέκυψαν στο εντερικό μικροβίωμα της τσιπούρας από την εκτροφή της με σιτηρέσια που περιείχαν ιχθυάλευρο (μάρτυρας) και εντομάλευρο *Zophobas morio* ήταν τα εξής:

- ❖ Το σιτηρέσιο με Fish meal (μάρτυρας) παρουσιάζει τη μεγαλύτερη ποικιλία φύλων σε όλο το πείραμα. Κατά συνέπεια το εντερικό μικροβίωμα φαίνεται να παρουσιάζει μεγαλύτερη ποικιλομορφία χωρίς την παρουσία εντομάλευρου *Zophobas morio*.
- ❖ Στα δύο σιτηρέσια με ZM 10% Full fat και Low fat παρατηρείται η εμφανής ανάπτυξη των πληθυσμών των Proteobacteria σε ποσοστά άνω του 57%, γεγονός που υποδεικνύει την προτίμησή τους σε χαμηλότερες περιεκτικότητες του σιτηρεσίου με εντομάλευρο. Επίσης όλα τα εναπομείναντα OTUs εμφανίζονται σε μικρότερα ποσοστά σε σχέση με τις υπόλοιπες μεταχειρίσεις, με τα Actinobacteria να εμφανίζονται σε χαμηλό ποσοστό.
- ❖ Στα δύο σιτηρέσια με ZM 20% Low fat και ZM 30% Low fat, παρατηρείται η μεγαλύτερη πληθυσμιακή ανάπτυξη των Patescibacteria σε όλες τις μεταχειρίσεις, σε υψηλά ποσοστά, άνω του 67%. Τα Proteobacteria είναι το επόμενο σε πληθυσμιακή ανάπτυξη φύλο και παρατηρούνται τα χαμηλότερα ποσοστά εμφάνισής τους στο πείραμα. Το γεγονός αυτό οδηγεί στο συμπέρασμα ότι, τα Patescibacteria έδειξαν μεγαλύτερη προτίμηση στα σιτηρέσια με υψηλότερη περιεκτικότητα σε εντομάλευρο, σε αντίθεση με τα Proteobacteria τα οποία πρωτοστατούσαν σε όλες τις μεταχειρίσεις, ενώ εδώ εμφανίζουν τους χαμηλότερους πληθυσμούς τους.

- ❖ Το φύλο Actinobacteria είναι το τρίτο σε κατάταξη στην συχνότητα εμφάνισης, έχοντας όμως χαμηλούς πληθυσμούς, με μέγιστο ποσοστό 8.11% στην μεταχείριση με ιχθυάλευρο και ακολουθεί η μεταχείριση *Z.morio* 10% Low fat με 7,56%.
- ❖ Αν και με την προσθήκη εντομάλευρου, τα κυρίαρχα βακτήρια συνέχισαν να είναι τα Proteobacteria και Patescibacteria, η αναλογία τους μεταβλήθηκε. Στο δείγμα αναφοράς FM η αναλογία τους ήταν σχεδόν 1:1, ενώ στα δείγματα με *Z.morio* η αναλογία ήταν διαφορετική, ευνοώντας τα Patescibacteria στις περισσότερες μεταχειρίσεις, με μοναδική εξαίρεση τη μεταχείριση ZM 10% Low fat.
- ❖ Για τα Proteobacteria, η οικογένεια Rhodobacteraceae βρίσκεται πάντα σε αφθονία με εξαίρεση τη μεταχείριση ZM 10% Full fat, όπου εκεί δε βρίσκεται σε αφθονία. Επίσης, το ποσοστό αφθονίας της συγκριτικά με τις υπόλοιπες οικογένειες είναι πολλαπλάσιο για το δείγμα αναφοράς αλλά και για το δείγμα ZM 10% Low fat, κάτι το οποίο δεν παρατηρείται στις μεταχειρίσεις με ZM 20% Low fat και ZM 30% Low fat.
- ❖ Για τα Patescibacteria, η οικογένεια Saccharimonadales ευνοείται τόσο στο δείγμα αναφοράς όσο και στις μεταχειρίσεις με τη προσθήκη *Z.morio*, με μικρές αλλαγές στις αναλογίες.
- ❖ Για τα Actinobacteria, η προσθήκη *Z.morio* ευνοεί την οικογένεια Mycobacteriaceae, σχεδόν με αποκλειστικό ποσοστό αυτής, κάτι το οποίο δεν παρατηρείται στο δείγμα αναφοράς.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η παρούσα εργασία αποτελεί μια προσπάθεια αξιολόγησης της εισαγωγής των εντομάλευρων στα σιτηρέσια της εκτρεφόμενης τσιπούρας και της επίδρασής τους στην ανάπτυξη των βακτηριακών πληθυσμών στο έντερο.

Οι οικογένειες που παρατηρήθηκαν ως κυρίαρχες στην τσιπούρα, έχουν παρατηρηθεί και σε παρόμοιες έρευνες που πραγματοποιήθηκαν σε τσιπούρα και λαβράκι, όπου η προσθήκη εντομάλευρου από *Tenebrio molitor* (Antonopoulou et al, 2018), επηρέασε το βακτηριακό προφίλ σε σχέση με τις μεταχειρίσεις με Fish meal, όμοια με την παρούσα εργασία.

Η μεταχείριση με ιχθυάλευρο (FM) παρουσιάζει την μεγαλύτερη ποικιλία με οκτώ τουλάχιστον φύλα μικροοργανισμών, με τα περισσότερα ωστόσο να εμφανίζονται σε χαμηλά ποσοστά, που δεν υπερβαίνουν το 30% του συνολικού πληθυσμού του εντέρου. Όμοια με τις μεταχειρίσεις με *Zophobas morio*, υπερτερούν σημαντικά τα φύλα Proteobacteria και Patescibacteria με ισορροπημένη ανάπτυξη μεταξύ τους σε ποσοστό $\approx 35\%$ έκαστο προσεγγιστικά. Τα υπόλοιπα φύλα παρουσίασαν μικρότερους πληθυσμούς με τους υψηλότερους των Actinobacteria στο $\approx 8\%$ και των αταξινόμητων (unclassified) στο $\approx 6.5\%$.

Το σιτηρέσιο *Zophobas morio* 10% Full fat, παρουσιάζει την μικρότερη ποικιλία φύλων, με μόλις δύο αναγνωρισμένα φύλα σε υψηλά ποσοστά, τα Proteobacteria και Patescibacteria που συναθροίζονται στο $\approx 98\%$ του συνόλου και όσα απομένουν να είναι Αταξινόμητα ή σε τόσο αμελητέους αριθμούς που καθίσταται ασήμαντη η αναγνώρισή τους. Παρατηρείται ότι τα Proteobacteria ευνοήθηκαν περισσότερο σε αυτή τη μεταχείριση με ποσοστό 57% σε σχέση με το $\approx 41\%$ των Patescibacteria.

Το *Z.morio* 10% Low fat, ομοίως, συνέβαλε κυρίως στην ανάπτυξη των Proteobacteria και Patescibacteria, ωστόσο τα Proteobacteria εμφανίζουν τριπλάσιο πληθυσμό με ποσοστό 66%, σε σχέση με το $\approx 23\%$ των Patescibacteria. Πρόκειται για το υψηλότερο ποσοστό ανάπτυξης των Proteobacteria και ταυτόχρονα το μικρότερο ποσοστό ανάπτυξης των Patescibacteria, σε όλο το πείραμα με σημαντική διαφορά από τα υπόλοιπα.

Εντοπίστηκε επίσης παρουσία Actinobacteria και Verrucomicrobiota σε μικρότερους όμως πληθυσμούς σε ποσοστά 7.5% και 2% αντίστοιχα. Παρατηρήθηκε ότι στη μεταχείριση με *Z.morio* 10% Low fat το ποσοστό τους είναι το ήμισυ σε σχέση με το *Z.morio* 10% Full fat, κατά συνέπεια ευνοήθηκαν περισσότερο από τη συγκεκριμένη μεταχείριση.

Το σιτηρέσιο *Zophobas morio* 20% Low fat, εμφανίζει τη δεύτερη μεγαλύτερη ποικιλία φύλων στο πείραμα. Υπάρχει σαφής διαφορά στον υψηλό πληθυσμό των Patescibacteria με ποσοστό $\approx 68\%$ του συνόλου. Το ποσοστό των Proteobacteria είναι το μικρότερο που παρατηρήθηκε σε όλα τα σιτηρέσια, στο $\approx 17\%$. Παρατηρείται επίσης η υψηλότερη ανάπτυξη του φύλου Firmicutes στο πείραμα, σε ποσοστό 9.3%, γεγονός το οποίο δεν εμφανίστηκε σε άλλες μεταχειρίσεις, με εξαίρεση το αρκετά μικρότερο ποσοστό 5.4% στο Fish meal (μάρτυρας).

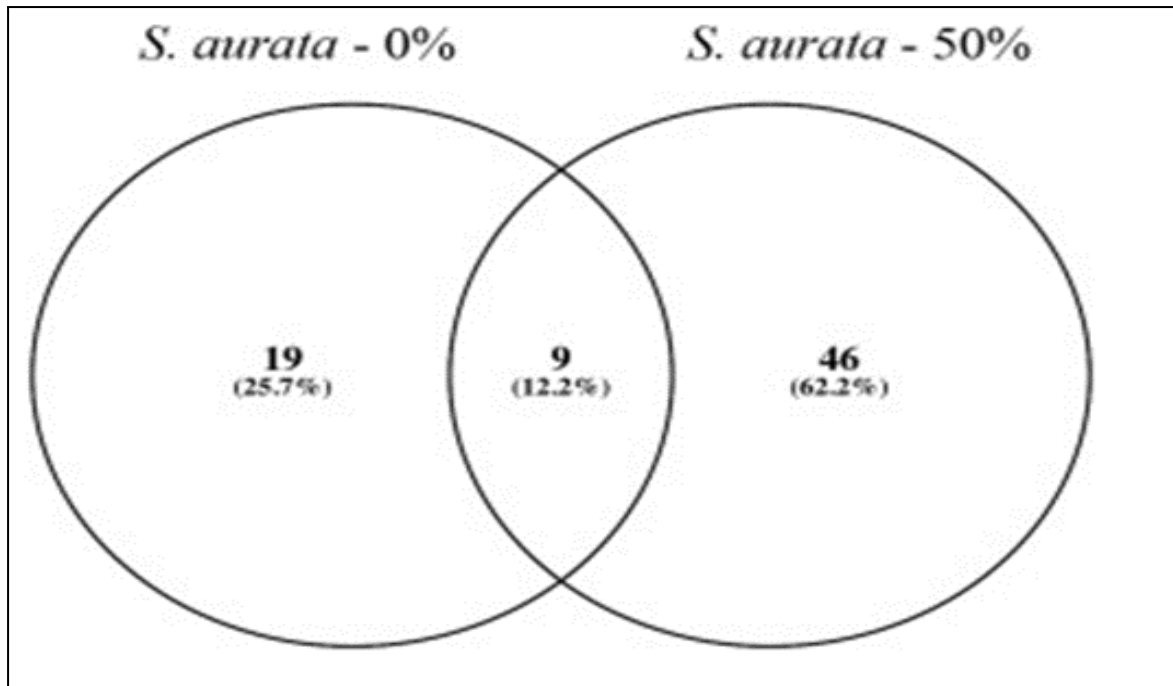
Το σιτηρέσιο *Zophobas morio* 30% Low fat, εμφανίζει το μεγαλύτερο ποσοστό πληθυσμού Patescibacteria στο πείραμα με 73%. Εκτός των Proteobacteria που αγγίζουν το χαμηλό ποσοστό του 20%, δεν παρουσιάζεται μεγάλη ποικιλομορφία στα φύλα, με χαμηλούς έως και αμελητέους πληθυσμούς Actinobacteria και Verrucomicrobiota.

Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας συγκρίνονται σε αυτό το κεφάλαιο με δύο μελέτες που βρέθηκαν στη βιβλιογραφία και θεωρήθηκαν συγκρίσιμες με την παρούσα.

Η πρώτη μελέτη με την οποία συγκρίνονται τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας είναι η μελέτη των Antonopoulou et al. (2018), στην οποία συγκρίνονται τα αποτελέσματα σε *Sparus aurata* σε δύο δείγματα, το δείγμα αναφοράς και το δείγμα με προσθήκη αλεύρου *Tenebrio molitor* (TM) σε ποσοστό 50%. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης μελέτης, η συμμετοχή των κύριων βακτηρίων δεν μεταβλήθηκε σε μεγάλο ποσοστό, όπως συνέβη με την προσθήκη *Z.morio* στην παρούσα μελέτη.

Η αφθονία σε οικογένειες βακτηρίων στις διάφορες μεταχειρίσεις διέφεραν, με το δείγμα μάρτυρα να έχει 28 οικογένειες σε αφθονία, ενώ το δείγμα με 50% προσθήκη TM είχε 54 οικογένειες σε αφθονία. Βέβαια και στα δύο δείγματα οι 12 και οι 10 οικογένειες αντίστοιχα είχαν συμμετοχή που έφτανε αθροιστικά ποσοστό μεγαλύτερο του 80%. Αυτό έρχεται σε αντίθεση με την παρούσα μελέτη, όπου οι οικογένειες είχαν συμμετοχή που έφτανε αθροιστικά ποσοστό μεγαλύτερο του 80% και διέφεραν στις μεταχειρίσεις με το δείγμα αναφοράς κατά μεγάλο αριθμό.

Για τα Proteobacteria στη συγκεκριμένη μελέτη, φαίνεται ότι με τη προσθήκη αλεύρου η αθροιστική αφθονία των οικογενειών που συμμετέχουν σε ποσοστό που ξεπερνά το 80% αυξάνεται, ενώ αντίστοιχα στα Actinobacteria μειώνεται. Στη περίπτωση της παρούσας μελέτης, όμως, τόσο στα Actinobacteria, όσο και στα Proteobacteria, η αθροιστική αφθονία των οικογενειών που συμμετέχουν σε ποσοστό που ξεπερνά το 80% μειώνεται με την προσθήκη *Z.morio*.

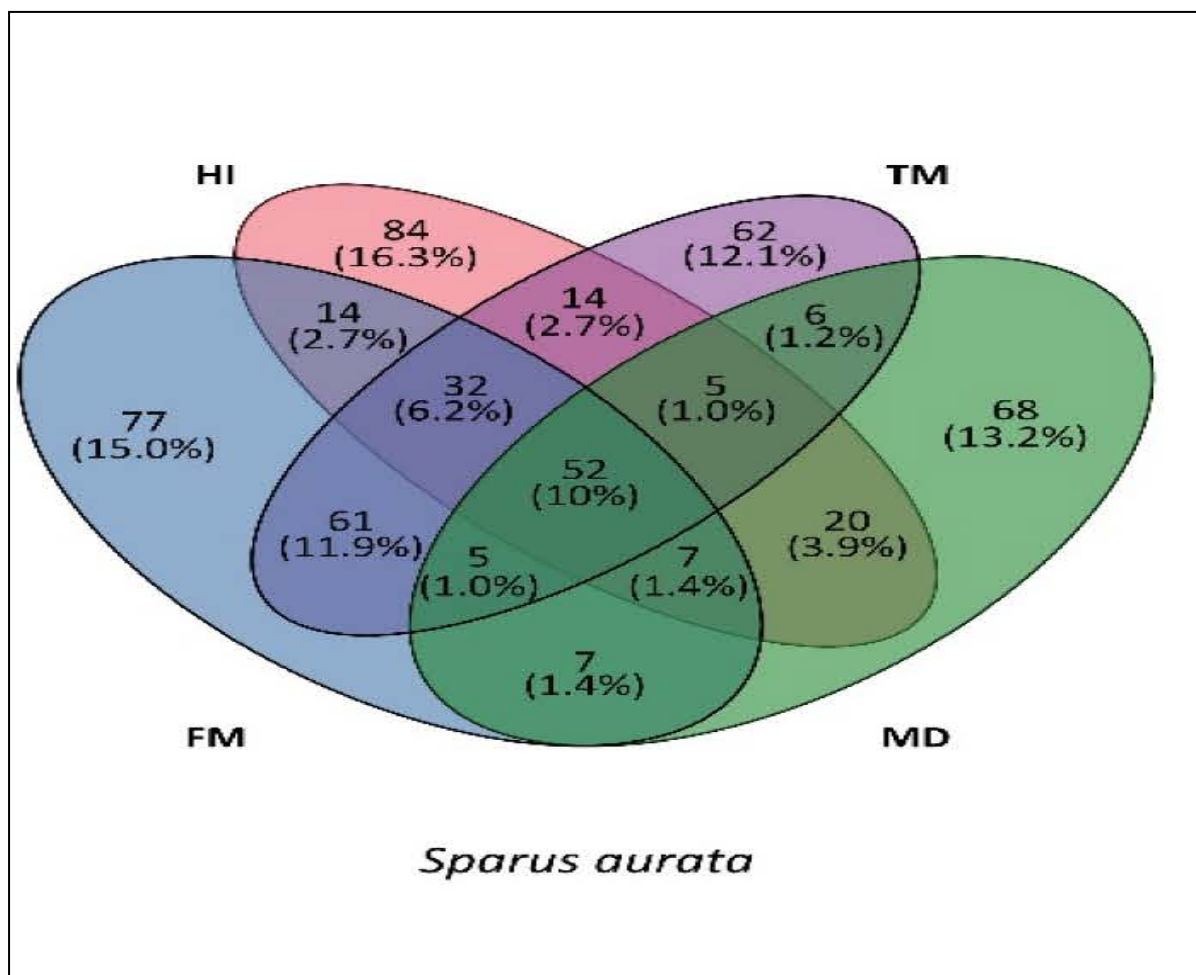


Διάγραμμα 9: Διάγραμμα Venn από την μελέτη των Efthimia Antonopoulou et al.

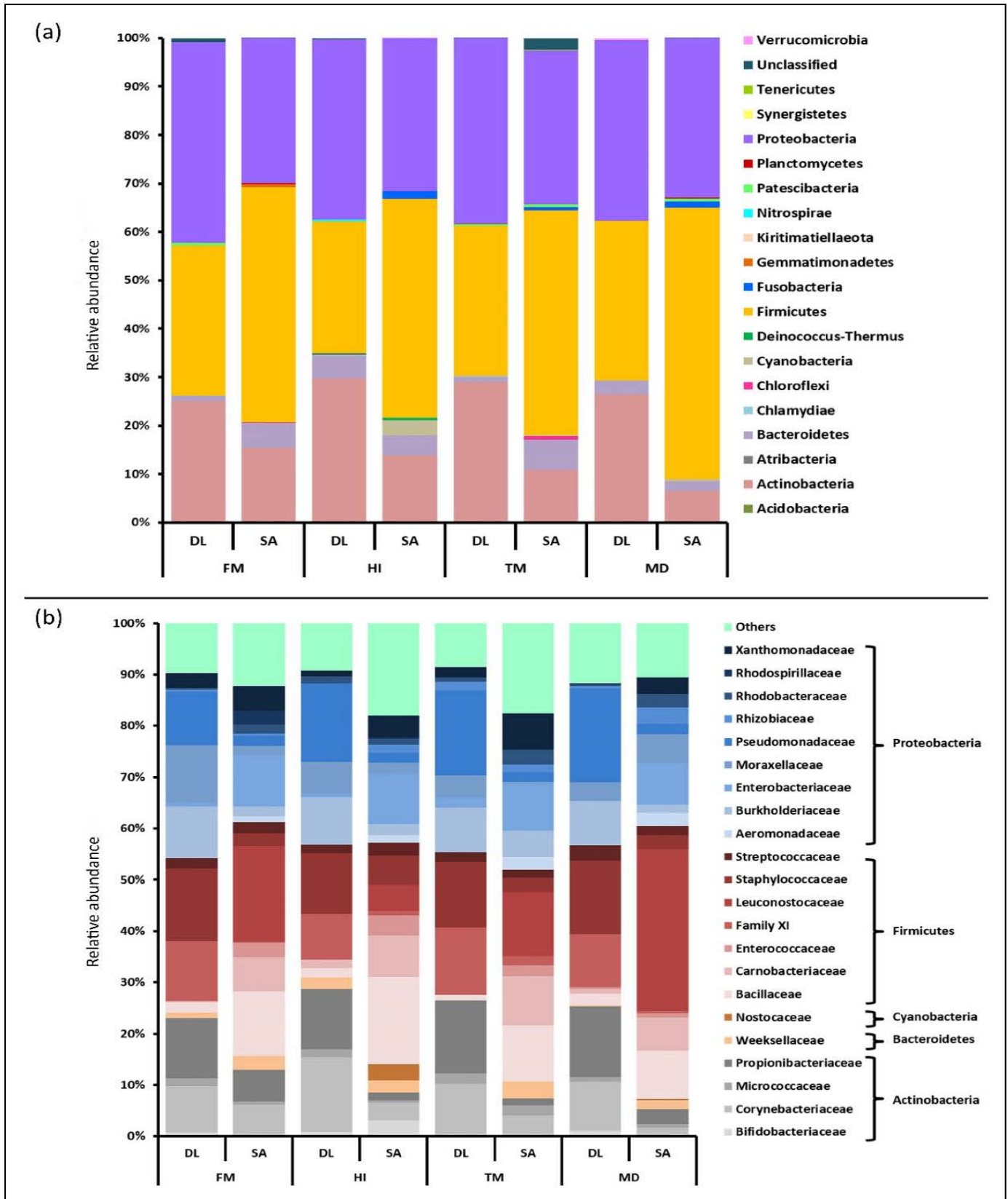
Συγκρίνοντας το Διάγραμμα 9 με τα αντίστοιχα Διαγράμματα 3 και 4 της παρούσας μελέτης, διαπιστώνεται ότι για τα δείγματα αναφοράς και της προσθήκης 50% TM, το ποσοστό κοινών οικογενειών βακτηρίων, να συμμετέχουν στη διατροφική περιεκτικότητά τους, εμφανίζεται σε πολύ μικρότερο επίπεδο, από ότι εμφανίζεται στην παρούσα μελέτη, με όποια προσθήκη *Z.morio*.

Η δεύτερη μελέτη με την οποία συγκρίνεται η παρούσα εργασία είναι αυτή των Panteli, et al. (2021) όπου συγκρίνονται τα αποτελέσματα σε *Sparus aurata* σε 4 δείγματα, το δείγμα αναφοράς και τα δείγματα με προσθήκη αλεύρων νυμφών *T. molitor*, *H. illucens*, and *M. domestica*. Και στη συγκεκριμένη μελέτη φαίνεται ότι τα Proteobacteria υπερτερούν των άλλων βακτηρίων σε όλες τις μεταχειρίσεις, με κάποιες λίγες οικογένειες να είναι κοινές με την παρούσα μελέτη (Διάγραμμα 11). Συγκρίνοντας το Διάγραμμα 10 με τα αντίστοιχα Διαγράμματα 3 και 4 της παρούσας μελέτης, διαπιστώνεται ότι για τα δείγματα αναφοράς και της προσθήκης των αντίστοιχων αλεύρων, ότι το ποσοστό κοινών

οικογενειών βακτηρίων, που συμμετέχουν στη διατροφική περιεκτικότητά τους, εμφανίζεται σε παρόμοια επίπεδα με την παρούσα μελέτη, στην οποία έγινε προσθήκη *Z.morio*.



Διάγραμμα 10: Διάγραμμα Venn από την μελέτη των Nikolas Panteli, et al.



Διάγραμμα 11: Ταξινομική σύνθεση της μικροβιακής κοινότητας του εντέρου σε τέσσερις διατροφικές μεταχειρίσεις σε *Dicentrarchus labrax* και *Sparus aurata*. Από τη μελέτη των Nikolas Panteli, et al.

5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Τα αποτελέσματα της μελέτης δείχνουν ότι υφίσταται άμεση συσχέτιση μεταξύ της περιεκτικότητας του σιτηρεσίου σε εντομάλευρο η οποία ευνοεί την αύξηση συγκεκριμένων OTUs ανά μεταχείριση, όπου τα φύλα Proteobacteria και Patescibacteria εκδήλωσαν την σημαντικότερη παρατηρήσιμη ανάπτυξη.

Ο αριθμός των οικογενειών βακτηρίων που συμμετείχαν στο δείγμα αναφοράς FM, ήταν μεγαλύτερος από τις αντίστοιχες μεταχειρίσεις με προσθήκη *Z.morio*. Μείωση υπήρξε, επίσης, και στον αριθμό των οικογενειών που αθροιστικά συμμετείχαν σε ποσοστό μεγαλύτερο του 80%, δηλαδή με την προσθήκη *Z.morio*, η περιεκτικότητα σε βακτήρια καλύπτεται με μικρότερο πλήθος οικογενειών. Κατά συνέπεια το εντερικό μικροβίωμα φαίνεται να παρουσιάζει μεγαλύτερη ποικιλομορφία χωρίς την παρουσία εντομάλευρου *Zophobas morio*.

Η σύγκριση των αποτελεσμάτων της παρούσας έρευνας με αντίστοιχες έρευνες που αφορούν την μερική αντικατάσταση του ιχθυάλευρου στα σιτηρέσια με άλευρο *Z. morio*, είναι δύσκολη, καθώς η βιβλιογραφία σχετική με πειραματικά σιτηρέσια εντομάλευρου στα εκτρεφόμενα ψάρια και πιο συγκεκριμένα στην τσιπούρα είναι περιορισμένη.

Τα αποτελέσματα είναι συγκρίσιμα αλλά η σύγκρισή τους δε μπορεί να αποφέρει μεγάλα συμπεράσματα καθώς πρέπει πρώτα να προηγηθεί μία ανασκόπηση των αλεύρων που χρησιμοποιήθηκαν στις άλλες εργασίες, ώστε τα χαρακτηριστικά τους να συγκριθούν με αυτά του αλεύρου που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία, να βρεθούν κοινά σημεία και διαφορές που θα δικαιολογούν τις διαφορές και τις ομοιότητες μεταξύ των μελετών.

ABSTRACT

The digestive tract of fish is home to a variety of microbial communities. The microorganisms of aquatic organisms are very sensitive to the dietary changes of the host, as they are affected by the form of food (fresh or compacted), fatty acids (their level, source and unsaturation), antibiotics, probiotics, prebiotics, protein sources as well as the amino acids that make up proteins. The microorganisms of the digestive tract and their metabolic products play an important role in the development, diet, nutrition, diseases, resistance and immunity of the host. Carnivorous fish in aquaculture are mainly fed fish feed made from fishmeal and fish oils. However, the growing demand for fish combined with the reduction of fish populations has led to the search for alternative and sustainable sources of protein and fatty acids for the production of fish feed. A recommended ingredient for fish feed is insect flour. Insects are part of the natural diet of some fish, they leave a small ecological footprint and their breeding does not require large areas of arable land as well as large reserves of energy and water. They are a sustainable source of proteins, amino acids and fatty acids, are rich in vitamins and minerals and have antimicrobial properties. The aim of this study was to determine any relationship between dietary treatment with diets containing insect meal and microbial communities in the intestinal tract of sea bream (*Sparus aurata*).

Keywords: Gilt-head Seabream (*Sparus aurata*), intestinal microbiome, *Zophobas morio*, insect diet.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Ελληνική βιβλιογραφία

1. Κλαουδάτος, Σ. 2005. Υδατοκαλλιέργειες Ι, Πανεπιστημιακές εκδόσεις Θεσσαλίας, Βόλος
2. Κλαουδάτος Σ.,Δ., Κλαουδάτος Δ.,Σ., (2012), <<Καλλιέργειες φυτικών και εκτροφές υδρόβιων ζωικών οργανισμών>>, Εκδόσεις Προπομπός, Αθήνα.
3. Νεοφύτου Χ., (2001). Βιολογία Θαλάσσιων Οργανισμών. Πανεπιστημιακές παραδόσεις, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.
4. Παπουτσόγλου Σ.Ε. (2008). Διατροφή Ιχθύων, Εκδοση: Σταμούλη Α.Ε, Αθήνα.

Ξενόγλωσση βιβλιογραφία

1. Oliva- Teles A. (2000). Recent advances in European sea bass and gilthead sea bream nutrition, Aquaculture International, 8: 477-92.
2. Katheline Hua, 2020. A meta-analysis of the effects of replacing fish meals with insect meals on growth performance of fish.
3. Fernando G. Barroso, Carolina de Haro, María-José Sánchez-Muros, Elena Venegas, Anabel Martínez-Sánchez, Celeste Pérez-Bañón, 2013. The potential of various insect species for use as food for fish.
4. Katayama, N., Ishikawa, Y., Takaoki, M., Yamashita, M., Nakayama, S., Kiguchi, K., Kok, R., Wada, H., Mitsuhashi, J., 2008. Entomophagy: a key to space agriculture. Adv. Space Res. 41, 701–705.

5. Henry M, Gasco L, Piccolo G, Fountoulaki E (2015) Review on the use of insects in the diet of farmed fish: past and future. *Animal Feed Science and Technology* 203: 1–22.
6. Silvia Nogales-Merida, Paola Gobbi, Damian Jozefiak, Jan Mazurkiewicz, Krzysztof Dudek, Mateusz Rawski, Bartosz Kieronczyk and Agata Jozefiak, 2018. Insect meals in fish nutrition.
7. van Huis, A., van Itterbeeck, J., Klunder, H., Mertens, E., Halloran, A., Muir, G., Vantomme, P., (2013). Edible Insects – Future Prospects for Food and Feed Security. FAO, pp. 171, Forestry Paper.
8. Simona Rimoldi, Elisabetta Gini, Federica Iannini, Laura Gasco and Genciana Terova, 2019. The Effects of Dietary Insect Meal from *Hermetia illucens* Prepupae on Autochthonous Gut Microbiota of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*).
5. Merrifield, D. L., and Rodiles, A. (2015). “The fish microbiome and its interactions with mucosal tissues,” in *Mucosal Health in Aquaculture*, ed. E. Peatman (San Diego, CA: Academic Press), 273–295.
6. Rombout, J. H., Abelli, L., Picchietti, S., Scapigliati, G., and Kiron, V. (2011). Teleost intestinal immunology. *Fish Shellfish Immunol.* 31, 616–626.
7. Clements, K. D., Angert, E. R., Montgomery, W. L., and Choat, J. H. (2014). Intestinal microbiota in fishes: what’s known and what’s not. *Mol. Ecol.* 23, 1891–1898
8. Sian Egerton, Sarah Culloty, Jason Whooley, Catherine Stanton and R. Paul Ross (2018). The Gut Microbiota of Marine Fish.
9. de Paula Silva, F. C., Nicoli, J. R., Zambonino-Infante, J. L., Kaushik, S., and Gatesoupe, F.-J. (2011). Influence of the diet on the microbial diversity of faecal

- and gastrointestinal contents in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) and intestinal contents in goldfish (*Carassius auratus*). *FEMS Microbiol. Ecol.* 78, 285–296.
10. Estruch, G., Collado, M., Peñaranda, D., Vidal, A. T., Cerdá, M. J., Martínez, G. P., et al. (2015). Impact of fishmeal replacement in diets for gilthead sea bream (*Sparus aurata*) on the gastrointestinal microbiota determined by pyrosequencing the 16S rRNA gene. *PLoS One* 10:e0136389.
 11. Jabir, M.D.A.R., Razak, S.A. and Vikineswary, S. (2012). Nutritive potential and utilization of super worm (*Zophobas morio*) meal in the diet of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) juvenile. *African Journal of Biotechnology*, 11(24): 6592-6598. doi: 10.5897/AJB11.1084
 12. Ebeling W (1975). Urban entomology. Pest of stored food products. Division of Agriculture Sciences, University of California. Berkeley, USA.
 13. Rumbos, C I; Athanassiou, C G (2021-04-09). "The Superworm, *Zophobas morio* (Coleoptera:Tenebrionidae): A 'Sleeping Giant' in Nutrient Sources". *Journal of Insect Science*. 21 (2).
 14. Hagstrum, D. W., and B. Subramanyam. 2009. Stored-product insect resource. AACC International Inc., St. Paul, MN.
 15. Tschinkel, W. R., and C. D. Willson. 1971. Inhibition of pupation due to crowding in some tenebrionid beetles. *J. Exp. Zool.* 176: 137–145.
 16. Tschinkel, W. R. 1984. *Zophobas atratus* (Fab.) and *Z. rugipes* Kirsch are the same species. *Coleopt. Bull.* 38: 325–333
 17. Marcuzzi, G. 1984. A catalogue of Tenebrionid beetles (Coleoptera: Heteromera) of the West Indies. *Folia Ent. Hung.* 45: 69–108.

18. Yuan, J., Z. Yinan, M. Ling, W. Hui, H. Liyu, and H. Jie. 2012. Identification of alive female and male adult of *Zophobas morio* (Coleoptera: Tenebrionidae). *Scientia Silvae Sinicae* 48: 175–177.
19. Cotton RT (1963). Pest of stored grain and grain products. Burgess Publishing Company. Minneapolis, Minnesota.
20. Ghaly AE, Alkoaik FN (2009). The yellow mealworm as a novel source of protein. *Am. J. Agric. Biol. Sci.* 4: 319-331.
21. Gasco, L., I. Biasato, S. Dabbou, A. Schiavone, and F. Gai. 2019. Animals fed insect-based diets: State-of-the-art on digestibility, performance and product quality. *Animals* 9: 170.
22. Gasco, L., I. Biancarosa, and N. S. Liland. 2020. From waste to feed: a review of recent knowledge on insects as producers of protein and fat for animal feeds. *Curr. Opin. Green Sustain. Chem.* 23: 67–79.
23. Rumpold, B. A., and O. K. Schlüter. 2013. Nutritional composition and safety aspects of edible insects. *Mol. Nutr. Food Res.* 57: 802–823.
24. Oonincx, D. G., S. van Broekhoven, A. van Huis, and J. J. van Loon. 2015. Feed conversion, survival and development, and composition of four insect species on diets composed of food by-products. *PLoS One*. 10: e0144601.
25. Halloran, A., N. Roos, J. Eilenberg, A. Cerutti, and S. Bruun. 2016. Life cycle assessment of edible insects for food protein: a review. *Agron. Sustain. Dev.* 36: 57.
26. Finke, M. D. 2002. Complete nutrient composition of commercially raised invertebrates used as food for insectivores. *Zoo Biol.* 21: 269–285.
27. Finke, M. D. 2007. Estimate of chitin in raw whole insects. *Zoo Biol.* 26:

- 105–115.
28. Finke, M. D. 2015. Complete nutrient content of four species of commercially available feeder insects fed enhanced diets during growth. *Zoo Biol.* 34:554–564.
 29. Shade, A. and Handelsman, J. (2012) Beyond the Venn diagram: the hunt for the core microbiota. *Environ Microbiol* 14, 4–12.
 30. Turnbaugh, P.J., Ley, R.E., Hamady, M., Fraser-Liggett, C.M., Knight, R. and Gordon, J.I. (2007) The human microbiota project. *Nature* 449, 804–810.
 31. Llewellyn, M.S., Boutin, S., Hoseinifar, S.H. and Derome, N. (2014) Teleost microbiotas: the state of the art in their characterization, manipulation, and importance in aquaculture and fisheries. *Front Microbiol* 5, 207.
 32. Hennersdorf, P., Kleinertz, S., Theisen, S., Abdul-Aziz, M.,
 33. Mrotzek, G., Palm, H.W. and Saluz, H.P. (2016a) Microbial diversity and parasitic load in tropical fish of different environmental conditions. *PLoS ONE* 11, e0151594.
 34. Larsen, A.M., Mohammed, H.H. and Arias, C.R. (2014a) Characterization of the gut microbiota of three commercially valuable warmwater fish species. *J Appl Microbiol* 116, 1396–1404.
 35. Eichmiller, J.J., Hamilton, M.J., Staley, C., Sadowsky, M.J. and Sorensen, P.W. (2016) Environment shapes the fecal microbiome of invasive carp species. *Microbiome* 4, 44.
 36. Liu, H., Guo, X., Gooneratne, R., Lai, R., Zeng, C., Zhan, F. and Wang, W. (2016) The gut microbiota and degradation enzyme activity of wild freshwater fishes influenced by their trophic levels. *Sci Rep* 6, 24340.

37. Chandni Talwar, Shekhar Nagar, Rup Lal, Ram Krishan Negi (2018). Fish Gut Microbiome: Current Approaches and Future Perspectives. *Indian J Microbiol* (Oct–Dec 2018) 58(4):397–414.
38. McKenney EA, Koelle K, Dunn RR, Yoder AD (2018) The ecosystem services of animal microbiomes. *Mol Ecol* 27:2164–2172. <https://doi.org/10.1111/mec.14532>
39. Martiny JBH, Jones SE, Lennon JT, Martiny AC (2015) Microbiomes in light of traits: a phylogenetic perspective. *Science* 350:aac9323. <https://doi.org/10.1126/science.aac9323>
40. Ringø E, Zhou Z, Vecino JLG, Wadsworth S, Romero J, Krogh A, Olsen RE, Dimitroglou A, Foey A, Davies S, Owen M, Lauzon HL, Martinsen LL, De Schryver P, Bossier P, Sperstad S, Merrifield DL (2016) Effect of dietary components on the gut microbiota of aquatic animals. A never-ending story? *Aquac Nutr* 22:219–282. <https://doi.org/10.1111/anu.12346>
41. Brooks AW, Kohl KD, Brucker RM, van Opstal EJ, Bordenstein SR (2016) Phyllosymbiosis: relationships and functional effects of microbial communities across host evolutionary history. *PLoS Biol* 14:e2000225. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2000225>.
42. Astudillo-García C, Bell JJ, Webster NS, Glasl B, Jompa J, Montoya JM, Taylor MW (2017). Evaluating the core microbiota in complex communities: a systematic investigation. *Environ Microbiol* 19:1450–1462. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13647>.
43. Suzuki TA, Phifer-Rixey M, Mack KL, Sheehan MJ, Lin D, Bi K, Nachman MW (2019) Host genetic determinants of the gut microbiota of wild mice. *Mol Ecol* 28:3197–3207. <https://doi.org/10.1111/mec.15139>

44. Kokou F, Sasson G, Nitzan T, Doron-Faigenboim A, Harpaz S, Cnaani A, Mizrahi I (2018) Host genetic selection for cold tolerance shapes microbiome composition and modulates its response to temperature. *eLife* 7:e36398. <https://doi.org/10.7554/eLife.36398>.
45. Eleni Nikouli & Alexandra Meziti & Evangelia Smeti & Efthimia Antonopoulou & Eleni Mente & Konstantinos Ar. Kormas (2020). Gut Microbiota of Five Sympatrically Farmed Marine Fish Species in the Aegean Sea. *Microbial Ecology* (2021) 81:460–470. <https://doi.org/10.1007/s00248-020-01580-z>
46. Efthimia Antonopoulou, Eleni Nikouli, Giovanni Piccolo, Laura Gasco, Francesco Gai, Stavros Chatzifotis, Eleni Mente, Konstantinos Ar Kormas, Reshaping gut bacterial communities after dietary *Tenebrio molitor* larvae meal supplementation in three fish species, *Aquaculture*, Volume 503, 2019, Pages 628-635, ISSN 0044-8486, <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.12.013>
47. Ignacio Llorente and Ladislao Luna (2013). The Competitive Advantages Arising from Different Environmental Conditions in Seabream, *Sparus aurata*, Production in the Mediterranean Sea. *Journal of the world aquaculture society*.
48. Izquierdo M.S., Obach A., Arantzamendi L., Montero D., Robaina L., Rosenlund G., (2003), Dietary lipid sources for seabream and seabass: growth performance, tissue composition and flesh quality. *Aquac Nutr.* 2003; 9: 397–407.
49. Pita, C., Gamito, S., & Erzini, K. (2002). Feeding habits of the gilthead seabream (*Sparus aurata*) from the Ria Formosa (southern Portugal) as compared to the black seabream (*Spondylus cantharus*) and the annular seabream (*Diplodus annularis*). *Journal of Applied Ichthyology*, 18(2), 81-86.

50. Deane, E & Kelly, Scott & Collins, Peter & Woo, Norman. (2003). Larval development of silver sea bream (*Sparus sarba*): ontogeny of RNA-DNA ratio, GH, IGF-I, and Na(+)-K(+)-ATPase. Marine biotechnology (New York, N.Y.). 5. 79-91. 10.1007/s10126-002-0052-7.
51. Wassef, Elham & Eisawy, A.. (1985). Food and feeding habits of wild and reared gilthead bream *Sparus aurata* L. Cybium. 9. 233-242.
52. Panteli, N.; Mastoraki, M.; Lazarina, M.; Chatzifotis, S.; Mente, E.; Kormas, K.A.; Antonopoulou, E. Configuration of Gut Microbiota Structure and Potential Functionality in Two Teleosts under the Influence of Dietary Insect Meals. Microorganisms 2021, 9, 699. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9040699>.
53. Lara Parata, Joshua Noiney, Marwan E. Majzoub, Debashish Mazumder, Suhelen Egan, Jesmond Sammut, The role of farming practice in nutrient assimilation in small-scale tilapia farming, Aquaculture, Volume 563, Part 2, 2023, 739005, ISSN 0044-8486, <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2022.739005>.
(<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S004484862201122X>)

Ιστοσελίδες

<https://www.fao.org/home/en/>

https://www.fao.org/fileadmin/user_upload/affris/docs/Gilthead_Seabream/English/table_2.htm

<https://www.fao.org/fishery/affris/species-profiles/gilthead-seabream/natural-food-and-feeding-habits/en/>

<https://www.fishbase.se/summary/Sparus-aurata.html>

https://www.aquamaps.org/receive.php?type_of_map=regular

<https://www.compassioninfoodbusiness.com/media/7447728/gilthead-seabream-in-numbers.pdf>

<https://www.aquaculturealliance.org/blog/what-is-aquaculture-why-do-we-need-it/>

<http://www.alieia.minagric.gr/node/22>

<https://www.frontiersin.org/>

<https://www.ajol.info/index.php/ajb/article/view/102010>

<https://blog.dhigroup.com/2017/09/21/the-secret-to-supporting-sustainable-marine-aquaculture/>

<https://mote.org/news/article/moving-u.s.-marine-aquaculture-forward-the-gulf-aquaculture-plan>

<https://www.statista.com/statistics/262618/forecast-about-the-development-of-the-world-population/>

<http://bigbusiness.gr/index.php/epixeiriseis/43113-nees-prooptikes-gia-tin-elliniki-ydatokalliergeia>

<https://fishfromgreece.com/elopy/h-organwsh-mas/>

<http://lebaneseaquacultureconsultancy.blogspot.com/2015/10/gilt-head-sea-bream-s-parus-aurata.html>

<https://www.allaboutfeed.net/all-about/new-proteins/heading-towards-total-replacement-of-fish-meal/>

<https://www.luke.fi/en/expert-services/insectlab-your-road-to-the-insect-economy/>

<https://link.springer.com/article/10.1007/s12088-018-0760-y/figures/1>

<https://alchetron.com>

<https://www.lifeder.com/proteobacterias/>

<http://coo.fieldofscience.com/2020/04/actinobacteria-from-monads-to-moulds.html>

<https://eol.org/media/8019653>

https://www.researchgate.net/figure/Morphologic-characteristics-of-silver-sea-bream-larvae-at-varying-stages-of-development_fig1_10607779