

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

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**«Σύγκριση της εντερικής βακτηριακής ποικιλότητας σε λαβράκια
(*Dicentrarchus labrax*) ως απόκριση της σίτισης με σιτηρέσια που
περιείχαν εντομοάλευρο»**

Κλείτος Αλεξάνδρου



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ & ΚΕΝΤΡΟ ΠΛΗΡΟΦΟΡΗΣΗΣ
ΕΙΔΙΚΗ ΣΥΛΛΟΓΗ «ΓΚΡΙΖΑ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ»

Αριθ. Εισ.: ~~163237~~ 16245/1
Ημερ. Εισ.: 12/06/2017
Δωρεά: Συγγραφέα
Ταξιθετικός Δ
Κωδικός: 572.41
ΑΛΕ

ΒΟΛΟΣ 2016

**«Σύγκριση της εντερικής βακτηριακής ποικιλότητας σε λαβράκια
(*Dicentrarchus labrax*) ως απόκριση της σίτισης με σιτηρέσια που
περιείχαν εντομοάλευρο»**

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή:

- 1) Έλενα Μεντέ, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Φυσιολογία Θρέψης Υδρόβιων Ζωϊκών Οργανισμών, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, *Επιβλέπων*,
- 2) Κωνσταντίνος Κορμάς, Καθηγητής, Οικολογία Υδρόβιων Μικροοργανισμών, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, *Μέλος*,
- 3) Ευθυμία Αντωνοπούλου, Επίκουρη Καθηγήτρια, Ζωολογία, Τμήμα Βιολογίας, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, *Μέλος*

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/ουσα της εργασίας αυτής, κα Έλενα Μεντέ για την πολύτιμη βοήθειά της και τη διαρκή υποστήριξή του/της, τόσο κατά τη διεξαγωγή του πειράματος, όσο και κατά τη συγγραφή της παρούσας εργασίας, καθώς και τα μέλη της εξεταστικής επιτροπής μου, αποτελούμενη από τους 1) κ. Κωνσταντίνο Κορμά , και 2) κα Ευθυμία Αντωνοπούλου για τις χρήσιμες συμβουλές τους και την καθοδήγησή τους καθ' όλα τα στάδια διεκπεραίωσης της εργασίας.

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την κα Μεζίτη Αλεξάνδρα για την άμεση και ανιδιοτελή βοήθειά της, όσον αφορά στην προμήθεια εργαστηριακού υλικού, καθώς επίσης τις κυρίες Τουμπουλου Άννα και Νικούλη Ελένη για την αμέριστη συμπαράστασή τους κατά τη διάρκεια της συγγραφής της παρούσας μεταπτυχιακής.

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

Η μεταπτυχιακή αυτή μελέτη έγινε με σκοπό να διαπιστωθεί κατά πόσο η σίτιση του λαβρακιού (*Dicentrarchus labrax*) με εντομόαλευρο μπορεί να επηρεάσει τη βακτηριακή ποικιλότητα του εντέρου του. Άτομα λαβρακιού αρχικού μέσου βάρους περίπου 5 γρ. σιτίστηκαν για 70 ημέρες με ισοπρωτεϊνικά και ισολιπιδικά σιτηρέσια στα οποία είχε γίνει μερική υποκατάσταση (50%) των ιχθυαλεύρων με εντομοάλευρα, προερχόμενα από νύμφες του είδους *Tenebrio molitor*. Για τις εργαστηριακές αναλύσεις χρησιμοποιήθηκαν 6 ψάρια τα οποία συλλεχθηκαν από 6 διαφορετικές δεξαμενές εκ των οποίων 3 άτομα ταΐστηκαν με σιτηρέσιο που περιείχε 50% εντομόαλευρο και τα άλλα 3 με μια δίαιτα έλεγχου η οποία περιείχε 0% εντομόαλευρο (100% ιχθυάλευρο). Το ολικό DNA από τα περιεχόμενα της κάθε ομάδας ομαδοποιήθηκαν και χρησιμοποιήθηκαν ως μήτρα για ενίσχυση του 16S rRNA γονιδίου με PCR και αλληλούχιση με 454 πυραλληλούχιση. Τα αποτελέσματα των αναλύσεων έδειξαν ότι στην ομάδα ελέγχου το κυρίαρχο φύλο ήταν τα Proteobacteria όπως και στην ομάδα που ταΐστηκε με 50% εντομόαλευρο αλλά παρατηρήθηκε πτώση της αφθονίας αυτού του φύλου. Επιπλέον, στη δίαιτα που περιείχε 50% εντομόαλευρο εντοπίστηκαν διάφορα φύλα που δεν υπήρχαν στην ομάδα ελέγχου όπως τα Gemmatimonadetes, τα Acidobacteria, οι Planctomycetes και τα Chloroflexi. Μεταξύ των δύο ομάδων βρέθηκαν να υπάρχουν 12 κοινές λειτουργικές ταξινομικές μονάδες (OTUs). Η παρούσα μελέτη έδειξε ότι η υποκατάσταση με εντομοάλευρο οδηγεί σε αλλαγές στη δομή των βακτηριακών κοινοτήτων του εντέρου που με τη σειρά της μπορεί να επηρεάσει την οικοφυσιολογία θρέψης του λαβρακιού.

Λέξεις κλειδιά: εντομόαλευρο, βακτηριακή ποικιλότητα, *Tenebrio molitor*, λαβράκι

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	3
1.1 Εντατικοποίηση ιχθυοκαλλιέργειας.....	3
1.2 Προβληματισμοί με τα ιχθυάλευρα (fishmeal, FM) και τα άλλα συμβατικά συστατικά.....	5
1.3 Πεπτικό σύστημα λαβρακιού.....	7
1.4 Βακτηριακή ποικιλότητα του εντέρου των ψαριών.....	9
1.5 Παράγοντες που επηρεάζουν την εντερική μικροχλωρίδα.....	11
2. ΣΥΜΠΛΗΡΩΜΑΤΑ ΚΑΙ ΑΝΤΙΚΑΤΑΣΤΑΣΕΙΣ ΙΧΘΥΑΛΕΥΡΟΥ ΣΕ ΙΧΘΥΟΤΡΟΦΕΣ.....	13
2.1 Διατροφικά συμπληρώματα ιχθυοτροφών: προβιοτικά, πρεβιοτικά και αντιβιοτικά.....	13
2.1.1 Προβιοτικά.....	13
2.1.2 Πρεβιοτικά.....	13
2.1.3 Αντιβιοτικά.....	14
2.2 Χρήση εντομάλευρων στις ιχθυοκαλλιέργειες.....	14
2.2.1 Σιτηρέσια από προνύμφες κοινής μύγας (<i>Musca domestica Linnaeus</i>).....	16
2.2.2 Σιτηρέσια από προνύμφες μύγας μαύρος στρατιώτης (black soldier flies, BSF).....	17
2.2.3 Χρήση των κολεόπτρων ως αντικατάσταση του ιχθυαλεύρου στη διατροφή των ψαριών.....	17
2.2.4 Ποιότητα των ψαριών που τράφηκαν με εντομάλευρο.....	19
2.3 Σκοπός της παρούσας μεταπτυχιακής εργασίας.....	19
3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	21
3.1 Εργαστηριακές αναλύσεις.....	21
3.2 Στατιστική Επεξεργασία.....	22

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	23
5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	28
6. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	40
7. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	42
ABSTRACT	50

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Εντατικοποίηση ιχθυοκαλλιέργειας

Η αλιεία από αρχαιοτάτων χρόνων αποτελεί βασική πηγή διατροφής του ανθρώπου. Η πληθυσμιακή αύξηση του ανθρώπου στο διάβα του χρόνου τον οδήγησε στην αιχμαλωσία των ψαριών με στόχο την εκτροφή τους και τη συστηματική εκμετάλλευσή τους. Πολλά χρόνια μετά όχι μόνο η εκτροφή αλλά και η αναπαραγωγή, καθώς και η προσέγγιση των διατροφικών συνηθειών κάθε είδους ψαριών, δημιούργησαν μεγάλη πρόκληση στον τομέα της επιστημονικής έρευνας. Η αντιμετώπιση κάθε τόσο νέων προβλημάτων που αφορούν κυρίως την καλύτερη λειτουργία των ιχθυοκαλλιεργειών και την αποτελεσματικότερη αντικατάσταση των φυσικών πηγών διατροφής των ιχθύων με άλλες πηγές φυτικής ή ζωικής προέλευσης αποτελεί αντικείμενο επιστημονικής έρευνας (Μεντέ & Νέγκας 2011).

Η παγκόσμια παραγωγή από υδατοκαλλιέργειες παρουσιάζει μια σταθερή αύξηση τις τελευταίες δεκαετίες. Συγκεκριμένα, το έτος 1990 η παραγωγή ανέρχονταν κοντά στους 13 εκατομμύρια τόνους, ενώ το έτος 2012 ξεπέρασε τους 66,5 εκατομμύρια τόνους. Σημαντικότερη παραγωγός χώρα είναι η Κίνα με παραγωγή πάνω από 41 εκατομμύρια τόνους το 2012, που αντιστοιχεί στο 61,7% της παγκόσμιας παραγωγής για το εν λόγω έτος. Τα κυριότερα είδη εκτρεφόμενων ιχθύων παγκοσμίως είναι ο κυπρίνος (*Cyprinus carpio*), ο σολομός του Ατλαντικού (*Salmo salar*), η ιριδίζουσα πέστροφα (*Oncorhynchus mykiss*) και η τιλάπια (*Oreochromis niloticus*) (FAO 2014).

Το 2013 η Ευρωπαϊκή παραγωγή υδατοκαλλιέργειας αντιπροσώπευε το 3,1% της συνολικής παγκόσμιας παραγωγής σε ποσότητα και το 7,9% σε αξία. Το σύνολο της παραγωγής υδατοκαλλιέργειας στην Ευρώπη για το 2013 ήταν 2.8 εκ. τόνοι σε όγκο, και πάνω από 8.798 εκατομμύρια δολάρια σε αξία. Περισσότερο από το 82% της παραγωγής της υδατοκαλλιέργειας προήλθε από θαλάσσια ύδατα, ενώ το μερίδιο των γλυκών και υφάλμυρων υδάτων για το 2013 ήταν 15 και 3%, αντίστοιχα. Η επέκταση της υδατοκαλλιέργειας έχει λάβει χώρα κυρίως στις θαλάσσιες περιοχές κατά την τελευταία δεκαετία. Ο όγκος παραγωγής του σολομού του Ατλαντικού, *Salmo salar*,

που αποτελεί το σημαντικότερο είδος της Ευρωπαϊκής υδατοκαλλιέργειας, σε θαλάσσιους κλωβούς, αυξήθηκε σχεδόν 40 φορές μεταξύ 1984 και 2013 (Βουλτσιάδου *et al.* 2015).

Όσον αφορά τον όγκο της παραγωγής υδατοκαλλιέργειας στις Ευρωπαϊκές χώρες, οι πιο σημαντικοί παραγωγοί είναι η Νορβηγία (44%), η Ισπανία (8%), το Ηνωμένο Βασίλειο και η Γαλλία (από 7%), ενώ, η Ιταλία και η Ελλάδα ελέγχουν η κάθε μία περίπου το 5% της συνολικής ευρωπαϊκής παραγωγής το 2013. Ο αριθμός των καλλιεργούμενων ειδών είναι μάλλον περιορισμένος στην Ευρώπη. Το 2013, έξι είδη αντιπροσώπευαν περίπου το 76% της συνολικής ποσότητας και 77% της αξίας της παραγωγής ως εξής: ο σολομός του Ατλαντικού (*Salmo salar*) (42,8% σε ποσότητα και 47% σε αξία), η ιριδιζουσα πέστροφα (*salmo trutta fario*) (11,5% σε ποσότητα και 14,2% σε αξία), το μπλε μύδι (*Mytilus edulis*) (6,9% σε ποσότητα και 3,6% σε αξία), ο κυπρίνος (*Cyprinus carpio*) (6,3% σε ποσότητα και 4,7% σε αξία), το Μεσογειακό μύδι (*Mytilus galloprovincialis*), (4,8% σε ποσότητα και 1,3% σε αξία), και η τσιπούρα (*Sparus aurata*) (3,9% σε ποσότητα και 5,9% σε αξία) (Βουλτσιάδου *et al.* 2015).

Η εμπορική ιχθυοκαλλιέργεια έχει αναπτυχθεί ταχέως τα τελευταία χρόνια σε μια προσπάθεια να ανταποκριθεί στη ραγδαία αύξηση της παγκόσμιας ζήτησης. Με τη σειρά του, αυτό έχει ως αποτέλεσμα την ταχύτερη ανάπτυξη της παραγωγή της ιχθυοτροφών (Buentello *et al.* 2015).

Σύμφωνα με στατιστικά στοιχεία από τον Οργανισμό Τροφίμων και Γεωργίας των Ηνωμένων Εθνών (FAO), η παγκόσμια παραγωγή των εμπορικών ιχθυοτροφών αυξήθηκε από 7.6 μετρικούς τόνους το 1995 σε 29,7 μετρικούς τόνους το 2011, με μέσο ετήσιο ρυθμό αύξησης 11%. Η παγκόσμια παραγωγή ιχθυοτροφών αναμένεται να φθάσει τους 51 μετρικούς τόνους μέχρι το 2015 και 71 μετρικούς τόνους το 2020 (Buentello *et al.* 2015).

Για τα τελευταία 20 χρόνια η παραγωγή ιχθυαλεύρου και ιχθυελαίων έχει παραμείνει σχετικά σταθερή σε περίπου 6 εκατομμύρια τόνους για τα ιχθυάλευρα και 1 εκατομμύριο τόνους για το ιχθυέλαιο (Suárez *et al.* 2009). Ωστόσο, η υποβάθμιση του θαλάσσιου περιβάλλοντος και η συρρίκνωση των ιχθυοαποθεμάτων λόγω υπεραλίευσης μελλοντικά θα οδηγήσουν στη μείωση της παγκόσμιας παραγωγής

ιχθυάλευρου, η οποία σε συνδυασμό με την αυξημένη του ζήτηση, είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της τιμής του (Εικόνα 2) τα τελευταία χρόνια (Sanchez-Muros et al. 2014).

1.2 Προβληματισμοί με τα ιχθυάλευρα (fishmeal, FM) και τα άλλα συμβατικά συστατικά

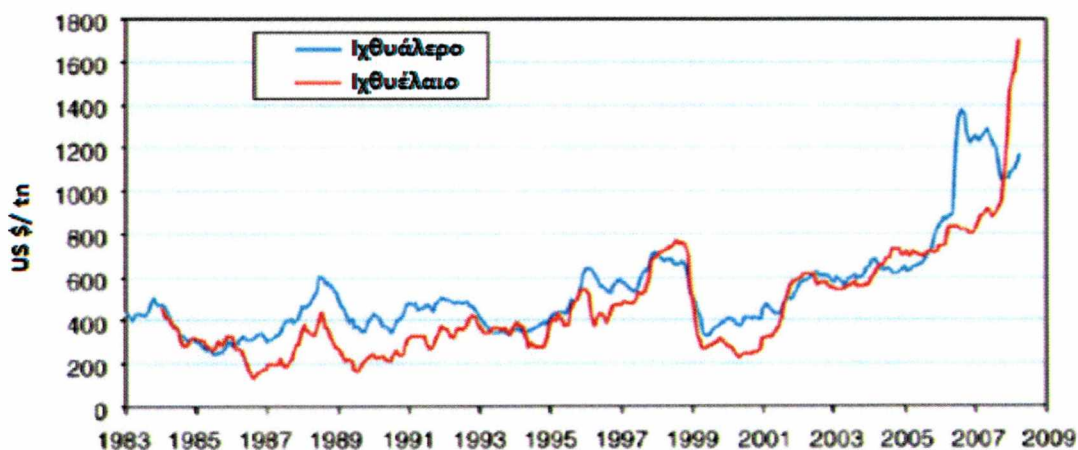
Η συνεχής ανάπτυξη των υδατοκαλλιεργειών σε παγκόσμιο επίπεδο, σε ποσοστό έως και 9% από έτος σε έτος, αυξάνει συγχρόνως και την ανάγκη για χρήση υψηλής ποιότητας και ποσότητας πρωτεϊνών στις ιχθυοτροφές (Carter & Hauler 2000). Σημαντικό μέρος αυτών των τροφών είναι τα ιχθυάλευρα, μια πρωτεϊνική πηγή υψηλής διατροφικής αξίας και γευστικότητας. Η παγκόσμια εκμετάλλευση αυτού του πόρου γίνεται όλο και μεγαλύτερη (Allan *et al.* 2000). Ωστόσο, η αβέβαια διαθεσιμότητα και οι διακυμάνσεις στο κόστος και την ποιότητα έχουν οδηγήσει σε μια παγκόσμια αναζήτηση για νέες εναλλακτικές πηγές πρωτεΐνης (Molina-Poveda *et al.* 2013). Επίσης η παγκόσμια παραγωγή ιχθυάλευρου χρησιμοποιεί ήδη περίπου το 35% των συνολικών παγκόσμιων αλιευμάτων. Περίπου 4 κιλά νωπών ψαριών είναι απαραίτητα για να παραχθεί 1 κιλό ιχθυαλεύρου (Allan *et al.* 2000).

Αρκετά ψάρια απαιτούν συνήθως υψηλά επίπεδα πρωτεΐνης στη διατροφή τους, αντανακλώντας την υψηλή περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη της φυσικής τους διατροφής. Η συνήθης πηγή αυτής της πρωτεΐνης στη διατροφή τους είναι το ιχθυάλευρο. Λόγω της υψηλής τιμής των ιχθυαλεύρων (Εικόνα 1) και της μείωση της αλιευτικής πίεσης επί των ειδών της βιομηχανικής αλιείας, οι διατροφολόγοι των ψαριών και οι υδατοκαλλιεργητές σε όλο τον κόσμο προσπαθούν να αντικαταστήσουν τα ιχθυάλευρα με δίαιτες βασισμένες σε πρωτεΐνες φυτικής προέλευσης (Hien *et al.* 2015).

Οι φυτικές πηγές πρωτεϊνών συνιστούν μια σημαντική εναλλακτική πηγή καθώς εκτός του χαμηλού τους κόστους είναι και ευρέως διαθέσιμες στη φύση. Τα μειονεκτήματά τους έγκεινται στην χαμηλή τους περιεκτικότητα σε ορισμένα απαραίτητα αμινοξέα, ενέργεια και ιχνοστοιχεία, όπως ο φώσφορος (Alexis & Nengas 2001), στη σχετικά χαμηλή τους γευστικότητα και στην υψηλή τους περιεκτικότητα σε μη-αμυλούχους πολυσακχαρίτες, τα οποία καθιστούν απαραίτητο τον συνδυασμό τους και με άλλες πηγές πρωτεϊνών (Sanchez-Muros et al. 2014). Το σογιάλευρο είναι η πιο

κοινή πηγή αντικατάστασης, σε σχέση με άλλες πηγές φυτικής πρωτεΐνης έχει το καλύτερο προφίλ αμινοξέων, αλλά παράλληλα περιέχει κάποιες αντιθρεπτικές ενώσεις, όπως το φυτικό οξύ (Hien *et al.* 2015). Παρ' όλα αυτά, η χρήση υψηλών επιπέδων πρωτεΐνης σόγιας μπορεί να επηρεάσουν την ανάπτυξη και την αύξηση των υδρόβιων ζώων, το μεταβολισμό και την κατάσταση της υγείας τους, λόγω των αντι-θρεπτικών παραγόντων (Antinutritional Factors, ANFs) που εμπεριέχονται στο σογιάλευρο (Ding *et al.* 2015).

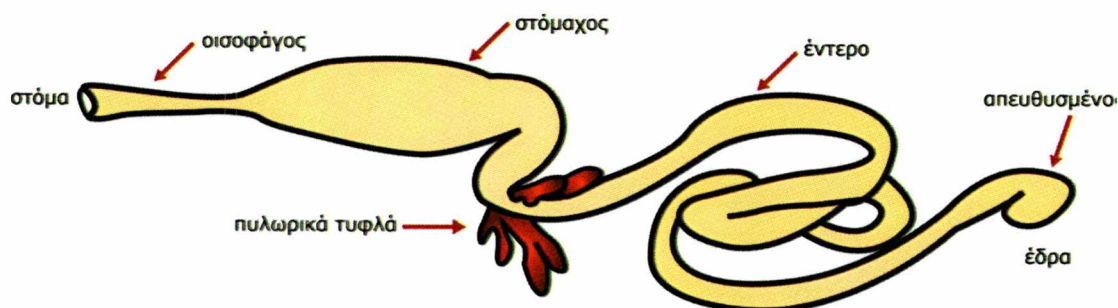
Πολλά από τα βασικά συστατικά που παραδοσιακά χρησιμοποιούνται σε συνταγές για ιχθυοτροφές αποτελούν αντικείμενο διεθνών συναλλαγών εμπορευμάτων. Από το 2005, ο δείκτης τιμών των βασικών εμπορευμάτων (CPI) αυξήθηκε κατά περίπου 50% και οι τιμές του σογιάλεου, ιχθυάλευρα, καλαμποκιού και του σιταριού αυξήθηκαν κατά 67%, 55%, 284% και 180%, αντίστοιχα. Παρομοίως, το κόστος των σημαντικότερων ελαίων που χρησιμοποιούνται στη βιομηχανία ιχθυοτροφών έχει αυξηθεί έως και 250%. Αυτό οφείλεται κυρίως σε απρόβλεπτες καιρικές συνθήκες, οι οποίες οδήγησαν σε μια κρίσιμη έλλειψη των σημαντικότερων σιτηρών και των ελαιούχων σπόρων, συστατικά που χρησιμοποιούνται στις ιχθυοτροφές καθώς και για άλλες εμπορικές τροφές (Rana *et al.* 2009).



Εικόνα 1: Διακύμανση της τιμής του ιχθυαλεύρου και του ιχθυελαίου (Tacon & Metian 2008)

1.3 Πεπτικό σύστημα λαβρακιού

Το πεπτικό σύστημα του λαβρακιού (Εικόνα 2) είναι τυπικό των σαρκοφάγων ιχθύων και αποτελείται από το στόμα, τον οισοφάγο, τον στομάχο, τον πυλωρό, τα πυλωρικά τυφλά, το έντερο (πρόσθιο και οπίσθιο) τμήμα και την έδρα. Αν και η σημασία του στόματος και του οισοφάγου για την πρόσληψη, κατάποση ή και τον τεμαχισμό της τροφής είναι αδιαμφισβήτητη, Δεν έχει αποδειχτεί ως σήμερα έκκριση ενζύμων στα τμήματα αυτά του πεπτικού σωλήνα (Αντωνοπούλου, 2015).



Εικόνα 2: Σχηματική αναπαράσταση πεπτικού συστήματος του λαβρακιού στην οποία διακρίνονται τα βασικά τμήματά του (Αντωνοπούλου, 2015).

Τα ένζυμα που μετέχουν στην χημική πέψη των ιχθύων είναι υδρολάσες (πρωτεϊνικής δομής, υδατοδιαλυτά ένζυμα) που καταλύουν την υδρόλυση πρωτεϊνών (πρωτεολυτικά ένζυμα - πρωτεάσες, πεπτιδάδες και πρωτεϊνάσες), εστέρων (λιπολυτικά ένζυμα - εστεράσες, λιπάσες) και υδατανθράκων (αμυλολυτικά ένζυμα, καρβοϋδράσες) (Λουκά, 2010).

Ο στομάχος είναι το όργανο αποθήκευσης, ανάμειξης και πρωτογενούς πέψης της τροφής. Παρουσιάζει ιδιαίτερη ποικιλομορφία ανάλογα τις τροφικές συνήθειες του οργανισμού και μπορεί να απουσιάζει σε κάποια είδη χαμηλότερου τροφικού επιπέδου. Η μορφή του στομάχου (στα είδη όπου υπάρχει) ποικίλλει από έναν μακρύ και πλατύ σωλήνα έως έναν διαφοροποιημένο σάκο που κάποιες φορές μπορεί να παίρνει τη μορφή ενός J ή Y. Μορφολογικά και λειτουργικά, ο στομάχος χωρίζεται στην καρδιακή και την πυλωρική μοίρα. Η πρώτη έχει λεπτά, ελαστικά τοιχώματα, ενώ η δεύτερη παχιά τοιχώματα από μυϊκό ιστό. Η τροφή που εισέρχεται στην καρδιακή μοίρα

αποθηκεύεται για σύντομο χρονικό διάστημα, ενώ με την κατάποση χαλαρώνουν τα τοιχώματα και ο στόμαχος μπορεί να δεχτεί ακόμη μεγαλύτερη ποσότητα τροφής. Εν συνεχεία, οι συσπάσεις των τοιχωμάτων του στομάχου οδηγούν την τροφή στην πυλωρική μοίρα κι από εκεί προς τον πυλωρό, όπου συμπιέζεται και συνθλίβεται. Το επιθήλιο του στομάχου εκκρίνει πεπτικά ένζυμα και υδροχλωρικό οξύ, ενώ επίσης εκκρίνονται, από άλλους τύπους κυττάρων, ορμόνες και βλέννα (Αντωνοπούλου, 2015).

Στο λαβράκι (*Dicentrarchus labrax*) ο στόμαχος αποτελείται από τέσσερις χιτώνες, παρόμοιους με εκείνους του πεπτικού συστήματος των σπονδυλωτών, το βλεννογόνο, τον υποβλεννογόνο, το μυϊκό και τον ορογόνο χιτώνα. Ο στόμαχος του λαβρακιού εμφανίζει τρεις ευδιάκριτες περιοχές, μια αρχική, μια μεσαία και μια τελική, αντίστοιχες με την καρδιακή περιοχή, τον θόλο και την πυλωρική περιοχή του στομάχου των θηλαστικών (Caceci *et al.*, 1997).

Στα ψάρια, όπως συμβαίνει και στα θηλαστικά, τα σαρκοφάγα είδη τείνουν να έχουν κοντότερο έντερο σε σχέση με τα φυτοφάγα, στα οποία υπάρχουν εκτεταμένες περιτυλίξεις και πιθανόν μεγάλα τυφλά σακίδια που προορίζονται για ζυμωτική μικροβιακή πέψη. Πολλά είδη διαθέτουν πυλωρικά τυφλά και τυφλές εκφύσεις με πολύ-αναδιπλούμενο, εντερικού τύπου, επιθήλιο, που εντοπίζονται στο πρόσθιο άκρο του εντέρου. Ορισμένα είδη διαθέτουν επιμήκεις πτυχές του βλεννογόνου, αλλά μόνο λίγα είδη διαθέτουν κατασκευές που μοιάζουν με τις εντερικές λάχνες των θηλαστικών (Ferguson 2006).

Συνέχεια του στομάχου αποτελεί το έντερο, το οποίο μοιάζει με το λεπτό έντερο των θηλαστικών. Ωστόσο, όπως προαναφέρθηκε, το σχήμα του ποικίλλει. Μπορεί να είναι ένας ευθύ σωλήνας, αλλά μπορεί να είναι ένα σύνολο από πολύπλοκους βρόγχους και περιελίξεις. Σημαντικό ρόλο στο σχήμα του εντέρου παίζει και το σχήμα του σώματος του ψαριού, το οποίο βέβαια σχετίζεται με το ενδιαίτημά του, ενώ φαίνεται να υπάρχει επίσης συσχέτιση ανάμεσα στην απόσταση οισοφάγου-έδρας με το ολικό μήκος του σώματος και το μήκος εντέρου (Αντοπούλου, 2015). Στο λαβράκι το πρόσθιο έντερο, το οπίσθιο έντερο και το ορθό είναι δύσκολο να διακριθούν ιστολογικά. Ο βλεννογόνος χιτώνας κατά μήκος του εντέρου καλύπτεται από απλό κυλινδρικό επιθήλιο, που απαρτίζεται από κυλινδρικά κύτταρα με ψηκτροειδή παρυφή και από καλυκοειδή κύτταρα (Λουκά, 2010)..

Στο λαβράκι, από μια έρευνα σε προνούμφες, φαίνεται ότι υπάρχει μια βαλβίδα στο σημείο σύνδεσης μεταξύ του στομάχου και του πρόσθιου εντέρου και μια δεύτερη βαλβίδα στο σημείο σύνδεσης του οπίσθιου εντέρου με το ορθό (Giffard-Mena *et al.*, 2006).

Ο υποβλεννογόσιος χιτώνας του εντέρου, στο λαβράκι, είναι λεπτός και παρουσιάζει στοιχεία πυκνού συνδετικού ιστού. Ο μυϊκός χιτώνας αποτελείται, σε όλο το μήκος του εντέρου, από ένα εσωτερικό κυκλοτερές και ένα εξωτερικό επίμηκες στρώμα λείων μυϊκών ινών. Ανάμεσα στα δύο αυτά στρώματα υπάρχει πάλι, όπως και στο στομάχι, το νευρικό πλέγμα του Auerbach. Στην πορεία του εντέρου από το αρχικό και το μεσαίο τμήμα προς το τελικό, το εσωτερικό κυκλοτερές στρώμα αυξάνει σε πάχος σε σχέση με το εξωτερικό επίμηκες στρώμα και το νευρικό πλέγμα του Auerbach αυξάνει σε μέγεθος. Εξωτερικά το έντερο περιβάλλεται από τον ορογόνο χιτώνα, ο οποίος αποτελείται από απλό πλακώδες επιθήλιο πάνω σε ένα λεπτό στρώμα συνδετικού ιστού (Λουκά, 2010).

1.4 Βακτηριακή ποικιλότητα του εντέρου των ψαριών

Παρομοίως με τα θηλαστικά μετά τη γέννησή τους, οι προνούμφες των ψαριών αποικούνται από τη στιγμή που εκκολάπτονται από το αυγό από βακτήρια που υπάρχουν στο νερό. Αν και η παρουσία μιας γηγενούς μικροχλωρίδας σε προνούμφες ψαριών έχει ιστορικά αμφισβητηθεί είναι πλέον κοινώς αποδεκτό ότι η κοινότητα των μικροοργανισμών του γαστρεντερικού σωλήνα (gastrointestinal tract) των νυμφών των ψαριών αποικείται από τη στιγμή που εκκολάπτονται από το αυγό, ακόμη και πριν από την πρώτη σίτιση (Hansen & Olafsen, 1999).

Όσον αφορά τους ιχθύες υπήρχε η θεωρία ότι η βακτηριακή ποικιλότητα του εντέρου ήταν λιγότερο άφθονη και ποικίλη σε σχέση με τα ενδόθερμα θηλαστικά. Ωστόσο αποτελέσματα νεότερων ερευνών καταρρίπτουν αυτή την αρχική διαπίστωση. Ως αποτέλεσμα της συν-εξέλιξης, οι ιχθύες όπως και τα άλλα ζώα, έχουν αναπτύξει μια συμβιωτική σχέση με την εντερική βακτηριακή ποικιλότητά τους, παρέχοντας με αυτό τον τρόπο οφέλη τόσο για τον ξενιστή όσο και για τα μικρόβια. Η επιφάνεια του βλεννογόνου αντιπροσωπεύει την κύρια περιοχή της αλληλεπίδρασης μεταξύ του ξενιστή και των βακτηρίων και παρέχει στα βακτήρια υποστρώματα καθώς και θέσεις πρόσδεσης τους (Pérez *et al.*, 2010).

Η μικροβιακή πυκνότητα του γαστρεντερικού σωλήνα είναι υψηλότερη από εκείνη του γύρω περιβάλλοντος, υποδεικνύοντας ότι το έντερο αποτελείται από πολλές κόγχες κατάλληλες για αποικισμό από βακτήρια. Ο αποικισμός του γαστρεντερικού σωλήνα στα ψάρια επηρεάζεται τόσο από τον ξενιστή όσο και από μικροβιακούς παράγοντες. Ένα βακτήριο που εισέρχεται στο σύστημα υποδοχής μέσω της τροφής αργά ή γρήγορα θα φτάσει στον γαστρεντερικό σωλήνα, όπου κάποιος θα έχουν τη δυνατότητα να αντέχουν το οξύ, τη χολή και το πλούσιο ενζυμικό περιβάλλον και να γίνει μέρος της αυτόχθονης (προσκολλημένης) μικροχλωρίδας (Deney *et al.*, 2009).

Παράγοντες όπως το περιβάλλον (τόπος διαβίωσης, θερμοκρασία), η διατροφή, η κατάσταση της υγείας επηρεάζουν συνεχώς την σύνθεση του αποικισμού από την εκκόλαψη και κατά τη διάρκεια της ζωής του ψαριού. Στον γαστρεντερικό σωλήνα των ψαριών, τα πιο κυρίαρχα είδη και γένη που απομονώνονται έχουν ήδη ταξινομηθεί είτε ως αερόβια ή προαιρετικά αναερόβια (Ringo *et al.*, 1995)

Η γαστρεντερική μικροχλωρίδα των ψαριών χαρακτηρίζεται από υψηλή πυκνότητα πληθυσμού, μεγάλη ποικιλία και πολυπλοκότητα αλληλεπιδράσεων. Οι μικροοργανισμοί στο έντερο των ψαριών έχουν μεγάλη επίδραση όσον αφορά τις θρεπτικές, τις φυσιολογικές και τις ανοσολογικές διεργασίες στον ξενιστή τους. Πρόσφατα, τα ευρήματα που αφορούσαν τους μικροοργανισμούς αυτούς βασίζονταν στις μεθόδους καλλιέργειας. Ωστόσο τα ευρήματα έχουν συμπληρωθεί με τεχνικές μοριακής βιολογίας που βασίζονται στο γονίδιο 16S rRNA. Αυτές οι τεχνικές επιτρέπουν το χαρακτηρισμό και την ποσοτικοποίηση της μικροχλωρίδας, καθώς επίσης παρέχουν ένα σύστημα ταξινόμησης για την πρόβλεψη φυλογενετικών σχέσεων μεταξύ μικροοργανισμών (Huang, 2008).

Η σε βάθος γνώση των μελών της κοινότητας του γαστρεντερικού σωλήνα, καθώς και η δομή και οι σχέσεις μεταξύ των μικροβίων και του ξενιστή τους μπορούν να παρέχουν διορατικότητα τόσο για την λειτουργία και την δυσλειτουργία μεταξύ οργανισμού-ξενιστή. Το πεπτικό σύστημα των ψαριών δέχεται νερό και τρόφιμα που έχουν συμπληρωθεί με μικροοργανισμούς από το γύρω περιβάλλον. Αυτά τα μικρόβια επηρεάζουν αναμφίβολα την υπάρχουσα μικροχλωρίδα. Οι συσχετίσεις μεταξύ των αλλαγών στη σύνθεση και τη δραστηριότητα της μικροχλωρίδας στο έντερο των ψαριών με την φυσιολογία των ψαριών και τις διάφορες ασθένειες έχουν προταθεί, αυξάνοντας το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας σε αυτόν τον τομέα της

έρευνας. Από αυτή την άποψη, μια ολοκληρωμένη και λεπτομερής εικόνα της βακτηριακής ποικιλότητας του εντέρου των ψαριών, συμπεριλαμβανομένης της φυλογενετικής σύνθεσης καθώς επίσης και του γενετικού και μεταβολικού δυναμικού, είναι απαραίτητη ούτως ώστε να κατανοήσουμε τη δυναμική και τους πιθανούς μηχανισμούς των σχέσεων μεταξύ της μικροχλωρίδας του εντέρου και της φυσιολογίας των ψαριών (Ghanbari *et al.*, 2015).

Η διαφορά των εντερικών βακτηρίων μεταξύ των θαλάσσιων και των ψαριών του γλυκού νερού υποστηρίζεται από αρκετές μελέτες που χαρακτήρισαν την εντερική μικροχλωρίδα των ψαριών και στα δύο περιβάλλοντα. Καλλιεργήσιμα βακτήρια του γένους *Aeromonas*, εκπρόσωποι των *Enterobacteriaceae* καθώς και *Flavobacterium* και *Pseudomonas* έχουν αναφερθεί να κυριαρχούν στην ενδογενή μικροχλωρίδα των σολομοειδών του γλυκού νερού, με υψηλό ποσοστό τα *Lactobacillus spp.* έχουν αναφερθεί σε αρκτοσαλβελίνους και σολομούς του Ατλαντικού (Yoshimizu & Kimura, 1976)

Ένα σημαντικό εμπόδιο που παρουσιάζεται στην αντικατάσταση των ιχθυαλεύρων με φυτικής προέλευσης πρωτεΐνες είναι ότι τα σιτηρέσια φυτικής προέλευσης προκαλούν ποικιλία ιστολογικών και λειτουργικών αλλαγών στις γαστρεντερικές οδούς των ψαριών. Οι παρατηρούμενες επιδράσεις περιλαμβάνουν αλλαγή στην εντερική δομή, στην φλεγμονή, μειωμένη ανάπτυξη, μείωση της πέψης και της απορρόφησης των θρεπτικών συστατικών, καθώς επίσης και αυξημένη ευαισθησία σε ασθένειες (Desai *et al.*, 2012).

Παρά την δυνητική σημασία τους, ο ρόλος της γαστρεντερικής μικροχλωρίδας έχει μελετηθεί πολύ λιγότερο στα ψάρια από ό, τι στον άνθρωπο και στα ομοιοθερμικό ζώα. Το ενδιαφέρον του πιθανού ρόλου της εντερικής μικροχλωρίδας στην πέψη των ψαριών προέκυψε από την αύξηση του ποσοστού των πηγών φυτικής πρωτεΐνης που εισήχθησαν στις ιχθυοτροφές ούτως ώστε να αντισταθμιστεί η έλλειψη ιχθυαλεύρων (de Paula Silva *et al.*, 2011).

1.5 Παράγοντες που επηρεάζουν την εντερική μικροχλωρίδα

Είναι πολλοί οι παράγοντες που επηρεάζουν την εντερική χλωρίδα. Κάποιοι από αυτούς είναι οι εξής: η διαίτα, η ηλικία, το στρες, ο γονότυπος του ξενιστή, το

περιβάλλον και η έκθεση σε διάφορα μικρόβια, οι κλινικές παρεμβάσεις, όπως τα αντιβιοτικά και η λήψη προβιοτικών ή πρεβιοτικών (Dethlefsen *et al.*, 2006).

2. ΣΥΜΠΛΗΡΩΜΑΤΑ ΚΑΙ ΑΝΤΙΚΑΤΑΣΤΑΣΕΙΣ ΙΧΘΥΑΛΕΥΡΟΥ ΣΕ ΙΧΘΥΟΤΡΟΦΕΣ

Όσο η εντατική υδατοκαλλιέργεια συνεχίζει να επεκτείνεται, το ίδιο κάνει και η απαίτηση για υψηλής ποιότητας πηγές πρωτεΐνης (Carter & Hauler 2000). Η συνεχής ανάπτυξη των υδατοκαλλιεργειών σε παγκόσμιο επίπεδο οδήγησε σε αύξηση της ζήτησης για τροφές για εμπορικά υδρόβια είδη. Ένα θεμελιώδες μέρος της επεξεργασίας αυτών των τροφών είναι τα ιχθυάλευρα, μια πηγή πρωτεϊνών υψηλής διατροφικής αξίας και γευστικότητας (Allan *et al.* 2000). Ωστόσο, η αβέβαια διαθεσιμότητα και οι διακυμάνσεις στο κόστος και την ποιότητα έχουν οδηγήσει σε μια παγκόσμια αναζήτηση για νέες εναλλακτικές πηγές πρωτεΐνης (Molina-Poveda *et al.* 2013).

2.1 Διατροφικά συμπληρώματα ιχθυοτροφών: προβιοτικά, πρεβιοτικά και αντιβιοτικά

2.1.1 Προβιοτικά

Η γενική ιδέα της προβιοτικής δράσης προέρχεται από το γεγονός ότι η ενεργή διαμόρφωση της γαστρεντερικής οδού θα μπορούσε να παρέχει ανταγωνισμό ενάντια σε παθογόνα, ανάπτυξη του ανοσοποιητικού συστήματος, διατροφικά οφέλη και προστασία του εντερικού βλεννογόνου (Gatesoupe, 1999). Οι πιο κοινοί προβιοτικοί οργανισμοί που χρησιμοποιούνται στους ιχθύες είναι τα βακτήρια του γαλακτικού οξέος (π.χ. λακτοβάκιλλος), οι οποίοι μετατρέπουν τη λακτόζη σε γαλακτικό οξύ μειώνοντας έτσι το pH του γαστρεντερικού σωλήνα. Ακόμη ένα είδος προβιοτικών οργανισμών που χρησιμοποιούνται στους ιχθύες είναι τα βακτήρια του γένους *Bacillus spp.* (π.χ. *Saccharomyces cerevisiae*) τα οποία παράγουν αντιμικροβιακά πεπτίδια και ενισχύουν το ανοσοποιητικό τους σύστημα (Καραπαναγιωτίδης, 2015).

2.1.2 Πρεβιοτικά

Τα πρεβιοτικά ορίζονται ως τα μη εύπεπτα και μη βιώσιμα συστατικά των τροφίμων που κινούνται προς το παχύ έντερο και έχουν μία επιλεκτική ζύμωση. Επηρεάζουν θετικά τον οργανισμό, καθορίζοντας επιλεκτικά την ανάπτυξη και τη δραστηριότητα ενός ή ορισμένων ειδών βακτηρίων του παχέος εντέρου, τα οποία είναι

ανθεκτικά στο παχύ έντερο και έχουν επομένως την τάση να βελτιώνουν την υγεία του οργανισμού. Το μεγαλύτερο ενδιαφέρον για τα πρεβιοτικά έχει επικεντρωθεί στους μη εύπεπτους υδατάνθρακες. Με τη χρησιμοποίηση των πρεβιοτικών μπορεί επιλεκτικά να αυξηθεί ο αριθμός των προβιοτικών στη γαστρεντερική περιοχή. Επομένως, είναι κυρίως άπεπτα σακχαρο-μόρια τα οποία δεν μπορούν να απορροφηθούν από το λεπτό έντερο και άρα παρέχουν θρεπτικά συστατικά στα εντερικά βακτήρια. Τα πιο κοινά πρεβιοτικά που χρησιμοποιούνται σήμερα στις ιχθυοτροφές είναι οι φρουκτο-ολιγοσακχαρίτες (FOS), οι trans-γαλακτο-ολιγοσακχαρίτες (GOS) και η ινουλίνη (Shah, 2007).

2.1.3 Αντιβιοτικά

Η λέξη αντιβιοτικό σημαίνει κυριολεκτικά ουσία «κατά της ζωής» (των βακτηρίων). Τα φαρμακευτικά που χρησιμοποιούνται στην εκτροφή ιχθύων, περιορίζονται σε αντιμολυσματικούς παράγοντες για παράσιτα και μικροβιακές μολύνσεις. Τα φάρμακα στους ιχθύες συνήθως χορηγούνται μαζί με την τροφή, με μορφή ένεσης ή στην περίπτωση περιορισμένης εφαρμογής με τη μορφή λουτρού. Οι βακτηριακές μολύνσεις στους ιχθύες συνήθως αντιμετωπίζονται χρησιμοποιώντας σφαιρίδια τροφής αναμεμειγμένα με αντιβιοτικά (Μπέζα, 2010).

2.2 Χρήση εντομάλευρων στις ιχθυοκαλλιέργειες

Η σταθερή μείωση των αλιευμάτων των άγριων ψαριών και οι αυξημένες απαιτήσεις για τροφές για ζώα υδατοκαλλιέργειας έχουν ως αποτέλεσμα την ταχεία μείωση της διαθεσιμότητας των ιχθυάλευρων (FM) και του ιχθυελαίου (FO) και την ταυτόχρονη αύξηση των τιμών τους. Το κόστος των τροφών υδατοκαλλιέργειας αντιπροσωπεύει το 40-70% του κόστους των ψαριών που παράγονται και είναι ιδιαίτερα υψηλό στην υδατοκαλλιέργεια των σαρκοφάγων ψαριών που απαιτούν μεγάλες ποσότητες ιχθυάλευρων (Henry *et al.*, 2015).

Δεδομένου ότι τα έντομα είναι μέρος της φυσικής διατροφής τόσο των ψαριών που διαβιούν σε γλυκά νερά όσο και των ψαριών που διαβιούν σε αλμυρά νερά, καθώς επίσης είναι πλούσια σε αμινοξέα, λιπίδια, βιταμίνες και ανόργανα συστατικά και οικολογικό αποτύπωμα (δηλαδή δεν υπάρχει ανάγκη για καλλιεργήσιμες εκτάσεις,

έχουν χαμηλές ανάγκες για ενέργεια και νερό), έχουν θεωρηθεί ως πιθανές εναλλακτικές λύσεις για αντικατάσταση του FM και του FO (Henry *et al.*, 2015).

Πολλά έντομα (*Lepidoptera*, *Diptera*, *Hymenoptera*, *Coleoptera*, *Trichoptera*) δείχνουν επίσης αντιμυκητιακή δράση και/ή περιέχουν αντιβακτηριακά πεπτίδια που μπορεί να αυξήσουν τη διάρκεια ζωής των τροφών που περιέχουν εντομάλευρο. Για όλους αυτούς τους λόγους, διατροφικές μελέτες σχετικά με τη χρήση των εντόμων στις ζωοτροφές της κτηνοτροφίας και της υδατοκαλλιέργειας (κυρίως για τα ψάρια του γλυκού νερού) έχουν διεξαχθεί κυρίως σε χώρες της Ασίας, της Αφρικής και χώρες της Νότιας Αμερικής (Veldkamp *et al.*, 2012).

Πίνακας 2: Είδη εντόμων που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή ετομάλευρων (Henry *et al.*, 2015).

Τάξη	Κοινή ονομασία	Λατινική ονομασία
Ορθόπτερα	Ποικιλόμορφες ακρίδες	<i>Zonocerus variegatus</i>
Ορθόπτερα	Χρωματιστές ακρίδες	<i>Poekilocerus pictus</i>
Ορθόπτερα	Μεταναστευτικές ακρίδες	<i>Locusta migratoria</i>
Ισόπτερα	Τερμίτες	<i>Macrotermes spp.</i>
Coleoptera	Κίτρινο σκουλήκι του αλευριού	<i>Tenebrio molitor</i>
Coleoptera	Ασιατικό σκαθάρι ρινόκερος	<i>Oryctes rhinoceros</i>
Coleoptera	Superworm	<i>Zophobas Morio</i>
Λεπιδόπτερα	Εξημερωμένοι μεταξοσκώληκες	<i>Bombyx mori</i>
Diptera	Κοινά κουνούπια	<i>Culex pipiens</i>
Diptera	Μύγα μαύρος στρατιώτης	<i>illucens Hermetia</i>
Diptera	Κοινή οικιακή μύγα	<i>Musca domestica</i>

Η χρήση εντομάλευρου από δίπτερα ως πιθανή αντικατάσταση του FM σε δίαιτες ψαριών έχει διερευνηθεί χρησιμοποιώντας τα γεύματα που λαμβάνονται από τις προνύμφες δύο ειδών δίπτερων: της κοινής μύγας και της μύγας μαύρος στρατιώτης. Αμφότερες οι μύγες έχουν περιγραφεί εκτενώς (διανομή, εκτροφή, περιβαλλοντικές επιπτώσεις, διατροφικά χαρακτηριστικά) (Makkar *et al.*, 2014).

2.2.1 Σιτηρέσια από προνύμφες κοινής μύγας (*Musca domestica Linnaeus*)

Επειδή οι προνύμφες της κοινής μύγας (*Musca domestica Linnaeus*) υπάρχουν σε αφθονία σε όλο τον πλανήτη έχουν δοκιμαστεί εκτενώς στη διατροφή των ψαριών, και ως ολόκληρα σκουλήκια ή ως μέρος του σιτηρεσίου. Οι περισσότερες μελέτες σχετικά με τα ψάρια που τράφηκαν με γεύματα που περιείχαν προνύμφες κοινής μύγας, δεν έδειξαν καμία βελτίωση στην ανάπτυξη των ψαριών σε αντίθεση με μελέτες που χρησιμοποίησαν ζωντανά σκουλήκια. Τρεις μελέτες που έγιναν έδειξαν βελτιωμένη ανάπτυξη των ψαριών όταν το γεύμα που περιείχε προνύμφες κοινής μύγας είχε συμπεριληφθεί στη διατροφή των ψαριών: 50% αντικατάσταση FM βελτίωσε την ανάπτυξη της τιλάπια του Νείλου (Ajani *et al.*, 2004). Η συμπλήρωση της βασικής διαίτας του κυρίως σαρκοφάγου μαύρου κυπρίνου, *Mylopharyngodon piceus*, με 2,5% γεύμα που περιείχε προνύμφες κοινής μύγας είχε ως αποτέλεσμα να βελτιωθεί η ανάπτυξη, η κατάσταση ανοσίας και η αντίσταση των ψαριών στις ασθένειες (Ming *et al.*, 2013). Σε υβρίδια γατόψαρων που τράφηκαν με δίαιτα που περιείχε 7,5% γεύμα που περιείχε προνύμφες κοινής μύγας έδειξε επίσης τη βελτίωση της ανάπτυξης σε σύγκριση με μια δίαιτα ελέγχου που περιέχει 30% FM (Sogbesan *et al.*, 2006). Σε μελέτη που έγινε σε αφρικανικά γατόψαρα που τράφηκαν με 12,5 ή 25% γεύμα που περιείχε προνύμφες κοινής μύγας (που αντιστοιχούν σε 50 ή 100% αντικατάσταση FM, αντίστοιχα) για 10 εβδομάδες βρήκαν ότι υπήρξε ικανοποιητική αύξηση του βάρους των ψαριών καθώς επίσης και ικανοποιητικές τιμές απόδοσης πρωτεΐνης (Nsofor *et al.*, 2008). Όταν η δίαιτα που περιείχε άλευρο από προνύμφες κοινής μύγας συμπληρώθηκε με τα απαραίτητα αμινοξέα, ένα επίπεδο συμπερίληψη 81% συγκρίθηκε ευνοϊκά σε σχέση με μια δίαιτα που περιείχε σογιάλευρο. Ωστόσο παρατηρήθηκε μια αυξημένη τάση για κανιβαλισμό μεταξύ των νυμφών των ψαριών τα οποία τράφηκαν με τη δίαιτα αυτή (Ossey *et al.*, 2012). Η υψηλή αυτή μεταβλητότητα μεταξύ των αποτελεσμάτων σε

κάθε είδος υπογραμμίζει την αδυναμία να γενικευτεί ένα θετικό αποτέλεσμα σε άλλο είδος ψαριού με διαφορετικές απαιτήσεις (Henry *et al.*, 2015).

2.2.2 Σιτηρέσια από προνύμφες μύγας μαύρος στρατιώτης (black soldier flies, BSF)

Ένα άλλο είδος διπτέρων που έχει μελετηθεί ευρέως στα ψάρια είναι η προνύμφη μύγας μαύρος στρατιώτης (BSF). Τα αποτελέσματα των πειραμάτων με διατροφή ψαριών δεν ήταν τόσο επιτυχής όσο αναμενόταν (Makkar *et al.*, 2014). Κανένα επίπεδο ένταξη BSF δεν έχει οδηγήσει σε μια καλύτερη απόδοση των ψαριών σε σχέση με τα ψάρια που τράφηκαν με δίαιτες ελέγχου πλούσιες σε FM. Ωστόσο, στο γατόψαρο των καναλιών ορισμένα επίπεδα συμπερίληψης BSF λίγο πριν το στάδιο της πούπας έδειξαν μια παρόμοια αύξηση του βάρους με εκείνη των ψαριών που τράφηκαν με διαιτητική συμπερίληψη 6% FM (Newton *et al.*, 2005), 15% (St-Hilaire *et al.*, 2007) ή 18 -36% ένταξης στην ιριδιζουσα πέστροφα (Sealey *et al.*, 2011), 5-25% ένταξη στο σολομό του Ατλαντικού, *Salmo salar*, όπου οι δίαιτες BSF συμπληρώθηκαν με A.A. (Lys και Met) (Lock *et al.*, 2014).

Σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε νεαρά καλκάνια έδειξε ότι αποδέχτηκαν τις δίαιτες που περιείχαν έως και 33% γεύμα απόπρονύμφες BSF λίγο πριν το στάδιο της πούπας οι οποίες είχαν υποστεί επεξεργασία μείωσης του λίπους τους, χωρίς σημαντικές επιπτώσεις στο FI ή στη μετατρεψιμότητα της τροφής. Ωστόσο, ο ειδικός ρυθμός ανάπτυξης ήταν σημαντικά χαμηλότερος για όλα τα επίπεδα ενσωμάτωσης που ελέγχθηκαν. Σε επίπεδα ένταξης υψηλότερης από 33%, η γευστικότητα της διαίτας και η πέψη της πρωτεΐνης μειώθηκαν, και οδήγησαν σε μειωμένο FI και αναπτυξιακές επιδόσεις της καλκάνι (Kroeckel *et al.*, 2012). Αντίθετα, τα αποτελέσματα πεπτικότητας των πρωτεϊνών και των λιπιδίων ήταν πολύ καλή στο σολομό του Ατλαντικού (Lock *et al.*, 2014)

2.2.3 Χρήση των κολεόπτρων ως αντικατάσταση του ιχθυαλεύρου στη διατροφή των ψαριών

Οι αλευροσκόληκες *Tenebrio molitor* είναι παράσιτα τουσιταριού και του αλευριού και εύκολα στην εκτροφή τους (Ramos-Elorduy *et al.*, 2002). Αν και δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν τα ενήλικα για την παραγωγή τροφών, καθώς περιέχουν

κινόνες, οι προνύμφες τους είναι ένα υψηλής ποιότητας συστατικό για ζωοτροφές. Οι αλευροσκόληκες είναι πλούσιοι σε πρωτεΐνες και λιπίδια και φτωχοί σε τέφρα (Makkar *et al.*, 2014). Οι προνύμφες των κίτρινων αλευροσκόληκων συνήθως τρέφονται ως ζωντανή τροφή, ωστόσο μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν για την παραγωγή αλεύρου. Σήμερα παράγονται σε μεγάλη βιομηχανική κλίμακα στην Κίνα (Veldkamp *et al.*, 2012).

Όταν οι εξαιρετικά εύγευστες για τα ψάρια προνύμφες κίτρινων αλευροσκόληκων αποξεραίνονταν, τα χαμηλά επίπεδα συμπερίληψης 9% των αλεύρων αλευροσκόληκων [(20% της αντικατάστασης ιχθυαλεύρου, (FM)] οδήγησε στην βέλτιστη ανάπτυξη του αφρικανικού γατόψαρου και παρουσίασε σημαντική βελτίωση σε σύγκριση με τα ψάρια που τράφηκαν με διατροφή που βασιζόταν στο FM. Οι προνύμφες κίτρινων αλευροσκόληκων θα μπορούσαν ακόμη και να αντικαταστήσουν μέχρι και 60% το FM (26% της διαιτητικής ένταξης), χωρίς να επηρεάσουν σημαντικά την ανάπτυξη ή τη ναξιοποίηση της τροφής στο Αφρικό γατόψαρο, αλλά υψηλότερα ποσοστά ένταξης (35-43% που αντιστοιχεί σε αντικατάσταση FM 80-100%) έχει αποδειχθεί ότι μειώνουν την απόδοση της ανάπτυξης των ψαριών, καθώς και την αποτελεσματικότητα των ζωοτροφών και των πρωτεϊνών (Ng *et al.*, 2001).

Σε μελέτη προ-πάχυνσης που πραγματοποιήθηκε στο κοινό γατόψαρο, *Ameiurus melas*, η ολική αντικατάσταση του FM με γεύμα αποξηραμένων προνυμφών κίτρινων αλευροσκόληκων μείωσε σημαντικά τις επιδόσεις ανάπτυξης των ψαριών σε σχέση με την δίαιτα ελέγχου οποία περιείχε 50% FM, αλλά η αύξηση εξακολουθούσε να θεωρείται ικανοποιητική για το είδος αυτό (Roncarati *et al.*, 2014). Οι προνύμφες κίτρινων αλευροσκόληκων έχουν επίσης χρησιμοποιηθεί με επιτυχία στην ιριδίζουσα πέστροφα, όπου θα μπορούσαν να συμπεριληφθούν σε διαιτητικά επίπεδα έως και 50% (Gasco *et al.*, 2014a) και στα θαλάσσια σαρκοφάγα ψάρια, τσιπούρα, *Sparus aurata*, και το λαβράκι, *Dicentrarchus labrax*, όπου η αντικατάσταση 25% του FM δεν επηρέασε σημαντικά την ανάπτυξη των ψαριών. Η ανάπτυξη των δύο αυτών θαλασσιών ιχθύων επηρεάστηκε σημαντικά σε ένα επίπεδο αντικατάστασης FM κατά 50%, και το λαβράκι έδειξε μια μειωμένη συγκέντρωση n-3 HUFA στα φιλέτα του (Gasco *et al.*, 2014b)

2.2.4 Ποιότητα των ψαριών που τράφηκαν με εντομάλευρο

Δεδομένου ότι η αφθονία των ψαριών σε n-3 HUFA συνδέεται με το όφελος για την υγεία των καταναλωτών, τροποποιώντας τη σύστασή τους σε λιπαρά οξέα (FA) θα μπορούσε να επηρεάσει την αντίληψη των καταναλωτών και στη συνέχεια την αγοραία αξία των ψαριών που καλλιεργούνται για ανθρώπινη κατανάλωση (Amberg & Hall, 2008). Επιπλέον, η τροποποίηση των λιπιδίων του φιλέτου των ψαριών και της σύνθεσης των FA επηρεάζει άμεσα το σύνολο των πτητικών ενώσεων, και έτσι επηρεάζει το άρωμα και τη γεύση του ψαριού (Turchini *et al.*, 2003). Η αντικατάσταση των FM με το εντομάλευρο μπορεί να αυξήσει την ποσότητα του λίπους ή να αλλάξει τη φύση των λιπιδίων στα ψάρια και, συνεπώς, θα μπορούσε να αλλάξει τη γεύση των φιλέτων ψαριών. Έτσι, μειωμένη προτίμηση έχει παρατηρηθεί για γατόψαρα και τιλάπιες που τράφηκαν αποκλειστικά με ολόκληρες προνύμφες BSF λόγω της διαφορετικότητας στο άρωμα και στην υφή σε σχέση με εκείνη των ιχθύων που είχαν τραφεί με μια εμπορική δίαιτα ή τράφηκαν εν μέρει με προνύμφες BSF (25 ή 50%) (Bondari & Sheppard, 1981). Ωστόσο, παρά τις διαφορές στα προφίλ του FA, καμία σημαντική διαφορά δεν διαπιστώθηκε σε μια τυφλή σύγκριση της ιριδίζουσας πέστροφας που ταΐστηκε με δίαιτα ελέγχου που περιείχε FM σε σχέση με τα ψάρια που τράφηκαν με δίαιτα που περιείχε άλευρο από προνύμφες BSF (Sealey *et al.*, 2011). Ομοίως, καμία διαφορά στην οργανοληπτικές ιδιότητες δεν βρέθηκε στο αφρικανικό γατόψαρο που τράφηκε με γεύμα που περιείχε εντομάλευρο (Aniebo *et al.*, 2011), επίσης καμία διαφορά δεν παρατηρήθηκε στο σολομό του Ατλαντικού που τράφηκε με δίαιτα BSF η οποία είχε υποστεί επεξεργασία μείωσης του λίπους (Lock *et al.*, 2014). Αυτά τα αποτελέσματα πρότειναν ότι η μερική ενσωμάτωση του γεύματος εντόμων (10-50%) στη διατροφή των ψαριών δεν επηρεάζει το προφίλ FA, το άρωμα ή τη γεύση των ψαριών αρκετά ούτως ώστε να ανιχνεύεται από τους καταναλωτές (Henry *et al.*, 2015).

2.3 Σκοπός της παρούσας μεταπτυχιακής εργασίας

Η παρούσα μεταπτυχιακή εργασία γίνεται με σκοπό να διαπιστωθεί κατά πόσο η συμπερίληψη εντομάλευρου στην διατροφή του λαυρακιού (*Dicentrarchus labrax*) μπορεί να επηρεάσει την βακτηριακή ποικιλότητα του εντέρου του. Άτομα λαβρακιού

αρχικού μέσου βάρους περίπου 5 γρ σιτίστηκαν για 70 ημέρες με ισοπρωτεϊνικά και ισολιπιδικά σιτηρέσια στα οποία είχε γίνει μερική υποκατάσταση (50%) των ιχθυαλεύρων με εντομοάλευρα, προερχόμενα από νύμφες του *Tenebrio molitor*. Για τις εργαστηριακές αναλύσεις χρησιμοποιήθηκαν 6 ψάρια τα οποία πάρθηκαν από 6 διαφορετικές δεξαμενές εκ των οποίων οι 3 ταΐστηκαν με δίαιτα που περιείχε 50% εντομάλευρο και οι άλλες 3 με μια δίαιτα έλεγχου η οποία περιείχε 0% εντομάλευρο (100% ιχθυάλευρο). Το ολικό DNA από τα περιεχόμενα της κάθε ομάδας ομαδοποιήθηκε για να δημιουργήσει εκμαγείο για PCR και κατασκευή βιβλιοθηκών κοινοποιημένων *crp60* αλληλουχιών καθολικού στόχου. Ακολούθως γίνεται σύγκριση των αποτελεσμάτων με την υπάρχουσα βιβλιογραφία.

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 Εργαστηριακές αναλύσεις

Η πειραματική μελέτη διεξήχθη στο Ινστιτούτο Θαλάσσιας Βιολογίας, Βιοτεχνολογίας και Υδατοκαλλιέργειας (IMBBC) του Ελληνικού Κέντρου Θαλασσίων Ερευνών (Κρήτη, Ελλάδα). Τα λαβράκια (*Dicentrarchus labrax*) αναισθητοποιήθηκαν, ζυγίστηκαν (αρχικά βάρη $5,23 \pm 0,82$ g) και διανεμήθηκαν τυχαία σε έξι δεξαμενές 500L με θαλασσινό νερό. Η θερμοκρασία διατηρήθηκε σταθερή στους $19,5 \pm 0,5$ °C, η αλατότητα στο 36 ‰, και το διαλυμένο οξυγόνο στα -6 ppm. Παρασκευάστηκαν δύο ισοαζωτούχα και ισοενεργειακά πειραματικά σιτηρέσια. Η διαίτα ελέγχου με 100% ιχθυάλευρο και η διαίτα με αντικατάσταση του 50% του ιχθυαλεύρου με εντομάλευρο από το είδος *Tenebrio molitor* (50% TM). Κάθε διαίτα κατανεμήθηκε σε τριπλές ομάδες 50 ιχθύων και το πείραμα διήρκεσε 70 ημέρες μετά από μια περίοδο εγκλιματισμού 2 εβδομάδων στις δεξαμενές και στις δίαιτες. Μετά το πέρας των 70 ημερών συλλέχθηκαν άτομα, στα οποία ύστερα από αναισθησία αφαιρέθηκε ο εντερικός ιστός. Αφού αφαιρέθηκαν τα κόπρανα, οι ιστοί, ξεπλύθηκαν με αποστειρωμένο απαλλαγμένο από σωματίδια θαλασσινό νερό, καθώς στόχος της μελέτης ήταν οι εγκατεστημένοι μικροοργανισμοί του εντέρου. Στη συνέχεια, τα δείγματα στάλθηκαν σε ειδική συσκευασία με ξηρό πάγο στο Τμήμα Γεωπονίας, Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας στο Βόλο, για να πραγματοποιηθεί η απομόνωση του μικροβιακού DNA από τους ιστούς.

Το DNA εκχυλίστηκε απευθείας από περίπου 0,25 g ιστού εντέρου από 3 άτομα λαβρακιού για την κάθε διαίτα, χρησιμοποιώντας το Power Max Soil DNA Isolation kit (MoBio, CA, USA) σύμφωνα με το πρωτόκολλο του κατασκευαστή. Συγκεκριμένα, σε ειδικά διαμορφωμένους σωλήνες χωρητικότητας 750μl (Bead tubes) προστέθηκαν 0.25 γραμμάρια δείγματος και 60μl μείγματος C1 που υπήρχε έτοιμο από τον εργαστηριακό εξοπλισμό του Power Soil DNA Isolation Kit. Μετά την ανάδευση του μείγματος έγινε μετακίνηση αυτού σε καινούργιο σωλήνα (Eppendorf tube) χωρητικότητας 2ml. Έπειτα έγινε προσθήκη μείγματος C2 250μl και επώαση στους 4°C για 5 λεπτά, φυγοκέντρηση του δείγματος για ένα λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου και μετακίνηση του περιεχομένου σε καθαρό σωλήνα των 2ml. Ακολούθησε ξανά ίδια διαδικασία

προσθέτοντας αυτή τη φορά 200μl μείγματος C3. Μετά την επώαση και φυγοκέντρηση προστέθηκαν 1200μl μείγματος C4. Σε σωλήνες τύπου spin filter έγινε προσθήκη 675μl από το παραπάνω μείγμα και ακολούθησε φυγοκέντρηση για περίπου ένα λεπτό. Απορρίπτοντας το διηθημένο ρευστό ακολούθηθηκε ακριβώς η ίδια διαδικασία για τρεις φορές για κάθε δείγμα βάση του πρωτοκόλλου. Έπειτα, προστέθηκαν 500μl μείγματος C5 και επαναλήφθηκε η φυγοκέντρηση απορρίπτοντας ξανά το διηθημένο. Εφόσον έγινε μετακίνηση του spin filter κάθε δείγματος σε καθαρό σωλήνα των 2ml προστέθηκαν 50μl μείγματος C6 και μετά από φυγοκέντρηση το DNA που είχε δεσμευθεί στο spin filter ελευθερώθηκε με τη βοήθεια του C6 κατά τη φυγοκέντρηση στον καθαρό σωλήνα και ήταν έτοιμο για περαιτέρω ανάλυση. Η ανάλυση της ποικιλότητας του γονιδίου 16S rRNA των βακτηρίων του εντέρου έγινε με πυροαλληλούχιση με τη χρήση ειδικών για τα Bacteria εκκινητών (Klindworth *et al.* 2012).

3.2 Στατιστική Επεξεργασία

Τα αποτελέσματα της 454 πυροαλληλούχισης επεξεργάστηκαν με την πλατφόρμα MOTHUR (Schloss *et al.* 2009). Η ταξινομική κατάταξη έγινε στην πιο πρόσφατη βάση δεδομένων SILVA (Release 123). Με τη βοήθεια του στατιστικού πακέτου SPSS πραγματοποιήθηκε ανάλυση παραλλακτικότητας ενός παράγοντα (μη παραμετρικό t-test, Mann-Whitney). Οι αναλύσεις αυτές χρησιμοποιήθηκαν για να συγκριθούν οι μετρούμενοι παράμετροι μεταξύ των μέσων όρων των OTUstων εντερικών περιεχομένων των δυο ομάδων (ομάδα που τράφηκε με 0% εντομάλευρο και ομάδα που τράφηκε με 50% εντομάλευρο) και των επαναλήψεών τους.

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Τα τελικά βάρη των λαβρακιών που τράφηκαν με δίαιτα ελέγχου ήταν $22,08 \pm 0,1$ g και εκείνων που τράφηκαν με την δίαιτα που περιείχε 50% εντομάλευρο TM ήταν $17,36 \pm 0,1$ g. Τα ψάρια που τράφηκαν με την τροφή που είχε αντικατάσταση με 50% εντομάλευρο TM είχαν στατιστικά σημαντική απώλεια βάρους σε σχέση με τα άτομα της ομάδας ελέγχου.

Τα αποτελέσματα από τις αναλύσεις της μικροβιακής ποικιλότητας για τα δείγματα εντέρου των ιχθύων που τράφηκαν με την τροφή ελέγχου που περιείχε 0% εντομάλευρο (100% ιχθυάλευρο) έδειξαν την εμφάνιση συνολικά 28 λειτουργικών ταξινομικών μονάδων (Operational Taxonomic Units, OTUs) (Πίνακας 3) οι οποίες ανήκουν σε 6 διαφορετικά φύλα βακτηρίων. Το κυρίαρχο φύλο ήταν τα Proteobacteria (72,05%) ακολούθως βρέθηκαν Actinobacteria (13,13%), Firmicutes (6,08%), Parcubacteria (5,44%), Bacteroidetes, (2,84%) και Cyanobacteria (0,46%).

Πίνακας 3: Λειτουργικές ταξινομικές μονάδες (OTUs) και οι αφθονίες τους που βρέθηκαν από τα δείγματα εντέρου των ιχθύων που τράφηκαν με την τροφή ελέγχου που περιείχε 0% εντομάλευρο

Group	0DLA1	0DLA2	0DLC3	Μέσος όρος	Φύλο (Phylum)	Οικογένεια (Family)
Otu0002	80	613	42	245	Proteobacteria	Comamonadaceae
Otu0003	28	267	279	191,3	Proteobacteria	Pseudomonadaceae
Otu0008	60	271	22	117,7	Proteobacteria	Comamonadaceae
Otu0011	73	218	62	117,7	Actinobacteria	Micrococcaceae
Otu0021	0	317	0	105,7	Proteobacteria	Bradyrhizobiaceae
Otu0075	0	232	0	77,3	Proteobacteria	Comamonadaceae
Otu0076	0	0	223	74,3	Parcubacteria	
Otu0004	0	191	0	63,7	Firmicutes	Bacillaceae
Otu0034	0	176	0	58,7	Proteobacteria	Moraxellaceae
Otu0010	0	16	145	53,7	Actinobacteria	Propionibacteriaceae
Otu0024	83	0	55	46	Proteobacteria	Comamonadaceae
Otu0097	135	0	0	45	Proteobacteria	Oxalobacteraceae
Otu0009	76	0	41	39	Bacteroidetes	Flavobacteriaceae
Otu0006	0	20	90	36,7	Proteobacteria	Comamonadaceae
Otu0041	0	0	74	24,7	Proteobacteria	Sphingomonadaceae

Otu0017	44	0	14	19,3	Firmicutes	<i>Carnobacteriaceae</i>
Otu0005	56	0	0	18,7	Proteobacteria	<i>Pseudomonadaceae</i>
Otu0035	0	0	53	17,7	Proteobacteria	<i>Comamonadaceae</i>
Otu0234	0	0	19	6,3	Actinobacteria	<i>Dermacoccaceae</i>
Otu0259	0	0	13	4,3	Cyanobacteria	<i>FamilyI</i>
Otu0289	8	0	0	2,7	Proteobacteria	<i>Comamonadaceae</i>
Otu0080	0	6	0	2	Actinobacteria	<i>Propionibacteriaceae</i>
Otu0305	0	0	6	2	Cyanobacteria	
Otu0410	0	0	2	0,7	Proteobacteria	<i>Sphingomonadaceae</i>
Otu0027	0	1	0	0,3	Proteobacteria	<i>Pseudomonadaceae</i>
Otu0244	0	0	1	0,3	Actinobacteria	<i>Corynebacteriaceae</i>
Otu0356	0	1	0	0,3	Firmicutes	<i>Bacillaceae</i>
Otu0475	0	0	1	0,3	Parcubacteria	

Τα αποτελέσματα από τις αναλύσεις της μικροβιακής ποικιλότητας για τα δείγματα εντέρου των ιχθύων που τράφηκαν με την τροφή ελέγχου που περιείχε 50% εντομάλευρο έδειξαν την εμφάνιση συνολικά 54 λειτουργικών ταξινομικών μονάδων (OTUs) (Πίνακας 4) ανήκαν σε 9 διαφορετικά φύλα βακτηρίων. Το κυρίαρχο φύλο ήταν τα Proteobacteria (61,77%) ακολούθως βρέθηκαν Bacteroidetes (13,75%), Actinobacteria (10,11%), αδιευκρίνιστης ταυτότητας (Unclassified) (4,63%), Firmicutes (3,11%), Gemmatimonadetes (2,88%), Acidobacteria (2,6%), Planctomycetes (1,08%), Chloroflexi (0,06%).

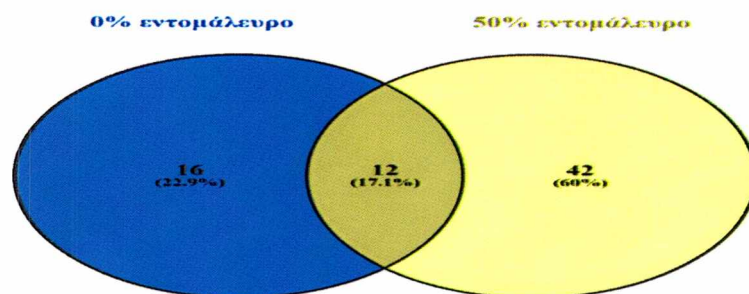
Μεταξύ των δύο διαφορετικών διαιτών βρέθηκαν να υπάρχουν 12 κοινές ταξινομικές μονάδες (Εικόνα 3, Πίνακας 5) εκ των οποίων οι 10 ανήκαν στο φύλο Proteobacteria ενώ οι άλλες 2 ανήκαν στα Bacteroidetes και στα Actinobacteria.

Πίνακας 4: Λειτουργικές ταξινομικές μονάδες (OTUs) και οι αφθονίες τους που βρέθηκαν από τα δείγματα εντέρου των ιχθύων που τράφηκαν με την τροφή ελέγχου που περιείχε 50% εντομάλευρο

Group	50DLA2	50DLB2	50DLC3	Μέσος όρος	Φύλο (Phylum)	Οικογένεια (Family)
Otu0009	584	0	84	222,7	Bacteroidetes	<i>Flavobacteriaceae</i>
Otu0005	489	31	36	185,3	Proteobacteria	<i>Pseudomonadaceae</i>
Otu0006	0	61	367	142,7	Proteobacteria	<i>Comamonadaceae</i>

Otu0011	360	0	38	132,7	Actinobacteria	<i>Micrococcaceae</i>
Otu0003	357	0	0	119	Proteobacteria	<i>Pseudomonadaceae</i>
Otu0054	352	0	0	117,3	Proteobacteria	<i>Xanthomonadaceae</i>
Otu0027	334	0	0	111,3	Proteobacteria	<i>Pseudomonadaceae</i>
Otu0079	217	0	0	72,3		
Otu0082	202	0	0	67,3	Proteobacteria	<i>Moraxellaceae</i>
Otu0002	0	0	176	58,7	Proteobacteria	<i>Comamonadaceae</i>
Otu0015	0	0	173	57,7	Proteobacteria	<i>Xanthomonadaceae</i>
Otu0102	128	0	0	42,7	Acidobacteria	
Otu0072	0	0	117	39	Proteobacteria	
Otu0112	105	0	0	35	Proteobacteria	<i>Rhizobiaceae</i>
Otu0127	91	0	0	30,3	Gemmatimonadetes	
Otu0020	0	0	86	28,7	Proteobacteria	<i>Burkholderiaceae</i>
Otu0010	0	28	51	26,3	Actinobacteria	<i>Propionibacteriaceae</i>
Otu0159	53	0	0	17,7	Planctomycetes	
Otu0017	0	0	52	17,3	Firmicutes	<i>Carnobacteriaceae</i>
Otu0171	48	0	0	16	Gemmatimonadetes	
Otu0013	0	0	39	13	Firmicutes	<i>Staphylococcaceae</i>
Otu0093	0	0	33	11	Firmicutes	<i>Carnobacteriaceae</i>
Otu0044	0	0	30	10	Proteobacteria	<i>Comamonadaceae</i>
Otu0029	0	28	0	9,3	Firmicutes	<i>Streptococcaceae</i>
Otu0035	24	0	0	8	Proteobacteria	<i>Comamonadaceae</i>
Otu0033	0	21	0	7	Proteobacteria	<i>Pseudomonadaceae</i>
Otu0110	20	0	0	6,7	Proteobacteria	<i>Burkholderiaceae</i>
Otu0008	0	10	2	4	Proteobacteria	<i>Comamonadaceae</i>
Otu0109	10	0	0	3,3	Proteobacteria	<i>Caulobacteraceae</i>
Otu0271	10	0	0	3,3	Actinobacteria	<i>Geodermatophilaceae</i>
Otu0060	0	0	8	2,7	Bacteroidetes	<i>Flavobacteriaceae</i>
Otu0287	8	0	0	2,7	Proteobacteria	
Otu0288	8	0	0	2,7	Actinobacteria	<i>Gaiellaceae</i>
Otu0295	7	0	0	2,3	Proteobacteria	<i>Burkholderiaceae</i>
Otu0052	4	0	2	2	Proteobacteria	<i>Moraxellaceae</i>
Otu0194	0	6	0	2	Proteobacteria	<i>Moraxellaceae</i>
Otu0323	5	0	0	1,7		
Otu0041	3	0	0	1	Proteobacteria	<i>Sphingomonadaceae</i>
Otu0315	0	0	3	1	Proteobacteria	<i>Comamonadaceae</i>
Otu0372	0	0	3	1	Chloroflexi	
Otu0376	0	0	3	1	Actinobacteria	<i>Microbacteriaceae</i>
Otu0088	0	0	2	0,7	Proteobacteria	<i>Enterobacteriaceae</i>
Otu0386	2	0	0	0,7		
Otu0409	2	0	0	0,7		
Otu0425	1	0	0	0,3		
Otu0428	0	1	0	0,3	Proteobacteria	<i>Pseudomonadaceae</i>
Otu0431	1	0	0	0,3	Proteobacteria	<i>Rhizobiaceae</i>
Otu0442	1	0	0	0,3	Gemmatimonadetes	
Otu0458	1	0	0	0,3	Gemmatimonadetes	

Otu0489	1	0	0	0,3	Gemmatimonadetes	
Otu0500	0	0	1	0,3		
Otu0510	0	0	1	0,3	Proteobacteria	Comamonadaceae
Otu0521	0	0	1	0,3	Firmicutes	Veillonellaceae
Otu0568	0	0	1	0,3	Bacteroidetes	Flavobacteriaceae



Εικόνα 3: Κοινά OTUs μεταξύ των 2 τροφών

Πίνακας 5: Κοινά OTUS που βρέθηκαν μεταξύ των 2 τροφών

	Φύλο (Phylum)	Κλάση (Class)	Οικογένεια (Family)	Average/ Total average (%)	
				ODLA	50DLA
Otu0002	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Comamonadaceae	17.866	3.575
Otu0003	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadaceae	13.952	7.575
Otu0005	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadaceae	1.361	11.294
Otu0006	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Comamonadaceae	2.674	8.694
Otu0008	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Comamonadaceae	8.58	0.244
Otu0009	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriaceae	2.844	13.569
Otu0010	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Comamonadaceae	3.913	1.065
Otu0011	Bacteroidetes	Flavobacteriia	Flavobacteriaceae	8.58	8.085
Otu0017	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Xanthomonadaceae	1.41	1.056
Otu0027	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadaceae	0.024	6.784
Otu0035	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadaceae	1.288	0.488
Otu0041	Actinobacteria	Actinobacteria	Intrasporangiaceae	1.799	0.061
				64.291	62.49

Η στατιστική ανάλυση Mann-Whitney που έγινε μεταξύ των μέσων όρων των OTUs των δυο διαιτητικών ομάδων (ομάδα ελέγχου 0% εντομάλευρο και ομάδα με 50% εντομάλευρο TM) έδειξε ότι υπάρχει στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ τους ($P=0,004$) (Πίνακας 6).

Πίνακας 6: Αποτελέσματα στατιστικής ανάλυσης Mann-Whitney μεταξύ των δύο ομάδων (0% εντομάλευρο και 50% εντομάλευρο).

Τιμές	Μέσοι όροι
Mann-Whitney U	171212,5
Wilcoxon W	350313,5
Τιμή Z	-2,901
Τιμή P	0,004

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Πολυάριθμες μελέτες έχουν εξετάσει τη δομή και τη λειτουργία του εντέρου των ιχθύων σε σχέση με την δίαιτά τους. Μέχρι τη δεκαετία του 1970, υπήρχε διαμάχη σχετικά με το ρόλο, ακόμη και την ύπαρξη γηγενούς βακτηριακής ποικιλότητας στο έντερο των ιχθύων. Ωστόσο, σήμερα είναι κοινώς αποδεκτό ότι οι ιχθύες και άλλα υδρόβια ζώα έχουν γηγενή βακτηριακή ποικιλότητα στο γαστρεντερικό τους σωλήνα (Ringø *et al.*, 2015).

Ωστόσο, η βακτηριακή ποικιλότητα του εντέρου διαμορφώνεται από παράγοντες που αφορούν τους ιχθύες και τον τρόπο εκτροφής. Παράγοντες όπως η καταπόνηση του οργανισμού (στρες) λόγω πρακτικών ή ακόμη και διαιτητικών χειρισμών, οι ατομικές διαφορές και οι διαφορετικές περιοχές της γαστρεντερικής οδού, το φύλο των ιχθύων, τα αναπτυξιακά στάδια του ψαριού / ο κύκλος ζωής τους, το αν αναπτύσσονται γρήγορα σε σχέση με το αν αναπτύσσονται αργά, η ιεραρχία και η πείνα επηρεάζουν τη βακτηριακή ποικιλότητα του εντέρου των ιχθύων. Άλλοι παράγοντες από τους οποίους επηρεάζεται η βακτηριακή ποικιλότητα είναι η ποιότητα του νερού, περιβαλλοντικοί και οικολογικοί παράγοντες και η βιολογία του ξενιστή (Ringø *et al.*, 2015).

Σε βιβλιογραφική εργασία το 2015 οι Ringø *et al.* έκαναν αναφορά σε μια πρώιμη μελέτη (1988) και αναφέρουν ότι δυο είδη βακτηρίων (*Aeromonas hydrophila*, *Bacteroides type A*) επικρατούσαν σε όλα τα χρυσόψαρα είτε αυτά σιτιζόνταν με νεαρά σκουλήκια ή με σφαιρίδια ξηράς τροφής. Τα παραπάνω αποτέλεσμα της μελέτης οδήγησαν τους συγγραφείς στο συμπέρασμα ότι το εντερικό μικροβίωμα δεν επηρεάζεται από τις διατροφικές συνήθειες. Λόγω της μικρής διάρκειας του πειράματος υπήρξε συνέχεια το 1990 το οποίο ήρθε σε αντιπαράθεση με τον Μπακαλιάρου του Ατλαντικού που τα δείγματα σιτιστήκαν για περίπου έναν χρόνο με συμβατική τροφή απέδειξαν ότι η τροφή η οποία χορηγήθηκε στα δείγματα επηρέασε την μικροβιακή κοινότητα του εντέρου σε σχέση με άγρια άτομα τα οποία δεν σιτιζόνταν τακτικά με συμβατική τροφή.

Όσον αφορά τα αποτελέσματα της παρούσας μεταπτυχιακής εργασίας τα λαβράκια που τράφηκαν με την τροφή που είχε υποκατασταθεί με 50% εντομοάλευρο

TM είχαν απώλεια βάρους σε σχέση με τη δίαιτα ελέγχου, ενώ δεν παρουσίασαν στατιστικώς σημαντική διαφορά με αυτά τα οποία σιτίστηκαν με 25% εντομοάλευρα (Gasco *et al.*, 2016). Παρόμοια αποτελέσματα έχουν βρεθεί και σε μελέτη που διενήργησαν οι Ng *et al.* (2001) (Πίνακας 7) στο αφρικανικό γατόψαρο (*Clarias gariepinus*) στο οποίο αντικατάσταση με εντομάλευρο TM μεγαλύτερη από 40% οδηγούσε σε στατιστικά σημαντική απώλεια βάρους. Η μειωμένη αυτή ανάπτυξη καθώς επίσης και η μειωμένη εκμετάλλευση της τροφής και της πρωτεΐνης ίσως να οφείλεται στην παρουσία της χιτίνης που υπάρχει στον εξωσκελετό των ατόμων του είδους *Tenebrio molitor*.

Σε εργασία που διενήργησαν οι Sanchez-Muros *et al.* το 2016 (Πίνακας 7) διερεύνησαν τη θρεπτική αξία των του σιτηρεσίου από *Tenebrio molitor* (TM) και το αποτέλεσμα της ολοκληρωτικής αντικατάστασης του SM από TM ή της μερικής αντικατάστασης του FM από TM σε σχέση με μια διατροφή βασισμένη σε SM και FM στην τιλάπια (*Oreochromis niloticus*). Μελετήθηκε ακόμη το περιεχόμενο του TM σε χιτίνη, η *in vitro* πεπτικότητα των πρωτεϊνών, η απόδοση της ανάπτυξης και η χρησιμοποίηση των θρεπτικών συστατικών. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η προσθήκη έως 500 g στο κιλό του TM στη διατροφή δεν επηρέασε την πρόσληψη της τροφής, την *in vitro* πεπτικότητα της πρωτεΐνης, τη σύνθεση των αμινοξέων των μυών ή τους βιομετρικούς δείκτες. Ωστόσο, η συμπερίληψή τους είχε ως αποτέλεσμα την μειωμένη ανάπτυξη όπως και στην παρούσα μελέτη και ακόμη είχε ως αποτέλεσμα τον επηρεασμό του προφίλ των λιπαρών οξέων των μυών.

Σε διπλωματική εργασία που διενήργησε ο Βογιατζής το 2015 (Πίνακας 7) διερεύνησε κατά πόσο η αντικατάσταση του ιχθυαλεύρου με άλευρο απο νύμφες του είδους *Hermetia illucens* σε ποσοστά 10% και 20% θα επηρεάσει την ανάπτυξη της τσιπούρας (*Sparus aurata*) σε σχέση με μια δίαιτα ελέγχου που περιείχε αποκλειστικά ιχθυάλευρο. Τα αποτελέσματα της εργασίας αυτής έδειξαν ότι οι τσιπούρες που διατράφηκαν με σιτηρέσια με μυγάλευρο είχαν σημαντικά μικρότερο σωματικό βάρος σε σχέση με την δίαιτα ελέγχου. Αυτό πιστεύετε ότι οφειλόταν κυρίως στη χαμηλότερη κατανάλωση τροφής που έδειξαν τα ψάρια. Αυτό εμμέσως έδειξε μια χαμηλότερη γευστικότητα-αποδεκτικότητα του μυγάλευρου συγκριτικά με το ιχθυάλευρο. Ωστόσο το επίπεδο αντικατάστασης του ιχθυαλεύρου της τάξης του 10% στο σιτηρέσιο της

τσιπούρας δεν επηρέασε το ρυθμό ανάπτυξης των ψαριών. Αντίθετα, το υψηλότερο ποσοστό αντικατάστασης (20%) μείωσε σημαντικά τον ρυθμό ανάπτυξης της τσιπούρας.

Στην παρούσα εργασία αναλύθηκαν οι κοινότητες των βακτηρίων του εντέρου ιχθύων οι οποίοι τράφηκαν με σιτηρέσια ελέγχου που περιείχε 0% εντομοάλευρο και με σιτηρέσιο που περιείχε 50% εντομάλευρο, προκειμένου να διερευνηθούν οι διαφορές στις μικροβιακές κοινότητες του εντέρου και να εντοπιστούν συνυπάρχοντες μικροοργανισμοί στο μεσέντερο του ξενιστή. Η στατιστική ανάλυση επί των αποτελεσμάτων των βακτηριακών κοινοτήτων, έδειξαν τη σημαντική διαφοροποίηση μεταξύ των 2 σιτηρεσιών. Η στατιστική αυτή διαφορά επιβεβαιώνει την επίδραση της τροφής στη βακτηριακή ποικιλότητα του εντέρου των οργανισμών.

Το κυρίαρχο φύλο, σε όλα τα άτομα, ήταν τα Proteobacteria, τα οποία εμφανίζονταν σε συχνότητες υψηλότερες από 50% σε κάθε δείγμα. Στα έντερα των ατόμων που σιτίστηκαν με 0% εντομάλευρο βρέθηκαν να κυριαρχούν τα *β-Proteobacteria* τα οποία κυριαρχούν συνήθως σε ψάρια γλυκών υδάτων, ενώ σε αυτά της ομάδας που σιτίστηκε με 50% εντομάλευρο βρέθηκαν να κυριαρχούν τα *γ-Proteobacteria* τα οποία κυριαρχούν συνήθως σε ψάρια αλμυρών υδάτων. Τα *β-Proteobacteria* στην ομάδα ελέγχου κυριαρχούσαν με ποσοστό περίπου 42,9% ενώ στην ομάδα που σιτίστηκε με 50% εντομάλευρου υπήρχαν σε ποσοστό μόλις 16,1%. Αντίθετα τα *γ-Proteobacteria* στην ομάδα ελέγχου υπήρχαν σε ποσοστό 19,6% ενώ στην ομάδα που σιτίστηκε με 50% εντομάλευρο κυριαρχούσαν με ποσοστό 40,8%. Αυτό συνέβη κυρίως λόγω της μείωσης του βακτηρίου του γένους *Delftia* και του βακτηρίου της οικογένειας *Comamonadaceae*. Η κυριαρχία των *γ-Proteobacteria* οφείλετε κυρίως στην αύξηση των βακτηρίων των γενών *Pseudomonas* και *Enterobacter*.

Στην ομάδα ελέγχου το κυρίαρχο βακτήριο ανήκει στο γένος *Delftia* (φύλο Proteobacteria, οικογένεια *Comamonadaceae*). Σύμφωνα με τους Li & Wei (2015) (Πίνακας 7) τα βακτήρια της οικογένειας *Comamonadaceae* είναι υπεύθυνα για την απορυθμισμένη εντερική ανοσοαπόκριση μέσω της επίδρασης της γονιδιακής έκφρασης των κυττάρων APC του εντέρου. Αντίθετα, στην ομάδα που σιτίστηκε με τροφή που περιείχε 50% εντομάλευρο κυριαρχούσε το βακτήριο του γένους *Cloacibacterium*

(φύλο *Bacteroidetes*, οικογένεια *Flavobacteriaceae*) το οποίο εμφανίζεται συνήθως στα γλυκά νερά (Hyun *et al.* 2014). Παρόμοια αποτελέσματα όσον αφορά την αφθονία του συγκεκριμένου φύλου στην αυτόχθονη βακτηριακή ποικιλότητα βρέθηκαν επίσης σε μελέτη που πραγματοποίησαν οι Kormas *et al.* (2014) στο είδος *Sparus aurata*.

Σε μελέτη που πραγματοποίησαν οι Carda-Dieguez *et al.* (2014) (Πίνακας 7) χρησιμοποιώντας λειτουργικές τροφές στα σιτηρέσια βρήκαν ότι η αυτόχθονη εντερική βακτηριακή ποικιλότητα του λαβρακιού αποτελούταν από δύο κυρίαρχα βακτηριακά γένη, τον *Dysgonomonas* (*Bacteroidetes*) και την *Ralstonia* (*Betaproteobacteria*), ωστόσο παρατηρήθηκαν επιδράσεις της διατροφής σε αυτή την κυριαρχία. Πιο συγκεκριμένα παρατηρήθηκε σημαντική μείωση του γένους *Dysgonomonas* και σημαντική αύξηση του γένους *Ralstonia* στα δείγματα από τα ψάρια που τράφηκαν με τα σιτηρέσια που περιείχαν λειτουργικές τροφές.

Σε μελέτη που διενεργήσαν οι Gatesoupe *et al.* (2014) (Πίνακας 7), όσον αφορά τις επιδράσεις των διαιτητικών πηγών υδατανθράκων στην εντερική βακτηριακή ποικιλότητα σε ιχθύδια λαβρακιού, βρήκαν 4 φύλα βακτηρίων με την κυρίαρχη βακτηριακή ομάδα να είναι τα *γ-Proteobacteria* (*Vibrio sp.*, *Enterobacteriaceae*) ακολούθως ήταν τα Firmicutes (*Clostridium sp.*), *α-Proteobacteria* (*Methylocella sp.*), *Actinobacteria* (*Saccharopolyspora sp.*) και τα Spirochaetes (*Brevinema sp.*)

Μια ακόμη έρευνα με παρόμοια επικράτηση των *Proteobacteria* στην βακτηριακή ποικιλότητα του εντέρου των ψαριών στη θάλασσα διαφάνηκε επίσης από τους Sullam *et al.* (2012). Αυτά τα είδη βακτηρίων ανήκαν κυρίως στα γένη *Pseudomonas*, *Acinetobacter* και *Aeromonas*, τα οποία είχαν επίσης προηγουμένως περιγραφεί ως κυρίαρχο ταχά στα θαλάσσια ψάρια, Nayak (2010). Έχει προταθεί από τους Desai *et al.* (2012) ότι η κυριαρχία των *γ-Proteobacteria* σχετίζεται με τη συμπερίληψη φυτικών συστατικών σε σχέση με τις δίαιτες που βασίζονται στα ιχθυάλευρα.

Σε πείραμα που διενήργησαν οι Desai *et al.* το 2006 (Πίνακας 7) χρησιμοποίησαν 108 δείγματα ιριδίζουσας πέστροφας τα οποία ταΐστηκαν με δυο είδη τροφών. Η μία τροφή ήταν βασισμένη σε φυτικά προϊόντα ενώ η δεύτερη ήταν με βάση το ιχθυάλευρο. Οι μικροοργανισμοί ανιχνεύτηκαν μέσω της πυροαλληλούχισης

(Αλληλουχία 16S rRNA γονιδίων, Χρήση PCR και κλωνοποίησης). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το μικροβιακό προφίλ των δειγμάτων που τράφηκαν με την συμβατική τροφή άλλαξε κατά την διάρκεια του πειράματος και παρατηρήθηκε μείωση των ειδών και της ποικιλομορφίας. Τα δείγματα που τράφηκαν με τροφή βασισμένη σε φυτικά προϊόντα είχαν υψηλότερο ποσοστό βακτηρίων του γένους Firmicutes στο έντερο σε σχέση με τα δείγματα ελέγχου. Παρόμοια αποτελέσματα είχαμε και στην παρούσα μεταπτυχιακή εργασία καθώς τα ποσοστά των Firmicutes μεταβάλλθηκαν από 6,08% που ήταν η παρουσία τους στην τροφή ελέγχου σε 3,11% στο σιτηρέσιο που περιείχε 50% ΤΜ. Αντίθετα με τα αποτελέσματα της παραπάνω μελέτης στην παρούσα εργασία φάνηκε να υπάρχει αύξηση της ποικιλομορφίας των ειδών που βρέθηκαν στον γαστρεντερικό σωλήνα. Συγκεκριμένα 28 OTUs και 6 φύλα βρέθηκαν να υπάρχουν στην ομάδα ελέγχου ενώ στην ομάδα που σιτήστηκε με σιτηρέσιο που περιείχε 50% ΤΜ εμφανίστηκε η ύπαρξη 58 OTUs τα οποία αντιπροσώπευαν 9 διαφορετικά φύλα.

Με το αυξανόμενο κόστος των συμβατικών πηγών πρωτεϊνών, όπως τα ιχθυάλευρα και το σογιάλευρο, είναι μόνο θέμα χρόνου πριν η Ε.Ε. δώσει το πράσινο φως στους υδατοκαλλιεργητές και στους παραγωγούς ζωοτροφών για να χρησιμοποιήσουν τα εντομάλευρα στις ιχθυοτροφές. Εν κατακλείδι, τα εντομάλευρα από ΤΜ μπορεί να αποδειχθούν μια πιθανή εναλλακτική πηγή πρωτεϊνών στις ιχθυοτροφές για λαβράκι. Περαιτέρω έρευνα είναι σαφώς επιβεβλημένη προκειμένου να εξασφαλισθεί ότι οι πρωτεΐνες από εντομάλευρο ΤΜ είναι ασφαλή για κατανάλωση από τα ψάρια.

Αν και σε έρευνα που πραγματοποίησαν οι Gasco *et al.* (2016) (Πίνακας 7) βρέθηκε να μην υπάρχει στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ της σύνθεσης του σώματος των λαβρακιών που σιτίστηκαν με σιτηρέσιο που περιείχε 25% εντομάλευρο και των λαβρακιών που σιτίστηκαν με την δίαιτα ελέγχου (με εξαίρεση την στάχτη) πρέπει να συνεχιστούν οι έρευνες όσον αφορά την υποκατάσταση του ιχθυαλεύρου με εντομοάλευρο. Περαιτέρω έρευνα είναι επιβεβλημένη, ούτως ώστε να επιβεβαιωθούν τα προαναφερθέντα αποτελέσματα καθώς επίσης και να διερευνηθούν οι επιπτώσεις στην πεπτικότητα και στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των ψαριών. Ακόμη η επίδραση της διατροφής με εντομάλευρο ΤΜ στην σάρκα και τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των εκτρεφόμενων ψαριών θα χρειαστεί περαιτέρω αξιολόγηση.

Πίνακας 7: Μελέτες που έγιναν σε διάφορα ψάρια όσον αφορά την βακτηριακή ποικιλότητα του εντέρου τους

Είδος	Μέθοδος	Αποτελέσματα	Πηγή
<i>Sparus aurata</i>	Άτομα τσιπούρας συλλέχθηκαν και σιτιστήκαν με δυο είδη συμβατικών τροφών για 12 μήνες. Η μία τροφή ήταν συμβατική ενώ η δεύτερη ήταν βιολογική. Η Ταξινόμηση των βακτηρίων έγινε με την υπομονάδα 16S ριβοσωματικού RNA. Συγκρίσεις έγιναν και με δείγματα εντέρου τσιπούρας από άγριους πληθυσμούς.	Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα περισσότερα βακτήρια ανήκανε στα γένη Proteobacteria, Firmicutes, Actinobacteria, & Bacteroidetes. Ο αριθμός των OTUs ήταν σημαντικά μειωμένος στα άτομα τσιπούρας που τράφηκαν με βιολογική τροφή σε σχέση με αυτά που τράφηκαν με την συμβατική. Το κυρίαρχο είδος βακτηρίου σε όλα τα άτομα που εξετάστηκαν ήταν του γένους <i>Diaphorobacter</i> . Ακόμα περισσότερο μειωμένη ήταν η ποικιλομορφία στα άγρια άτομα. Πιο συγκεκριμένα 17 OTUs ήταν κοινά σε όλα τα δείγματα. 12 OTUs ήταν κοινά ανάμεσα στα άτομα τα οποία σιτίστηκαν με τις δύο διαφορετικές τροφές και μόνο 5 ήταν κοινά ανάμεσα στα άγρια άτομα τσιπούρας και στα άτομα που τράφηκαν με συμβατική τροφή.	Kormas K., Meziti A., Mente E., Frentzos A. (2014)
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	108 δείγματα ταΐστηκαν με δυο είδη τροφών. Η μία τροφή ήταν βασισμένη σε φυτικά προϊόντα ενώ η δεύτερη ήταν με βάση το ιχθυάλευρο. Οι μικροοργανισμοί	Το μικροβιακό προφίλ των δειγμάτων που τράφηκαν με την συμβατική τροφή άλλαξε κατά την διάρκεια του πειράματος και παρατηρήθηκε μείωση των ειδών καθώς και την ποικιλομορφίας. Τα δείγματα που τράφηκαν με τροφή	Desai A., Links M., Collins S., Mansfield G.,

	<p>ανιχνεύτηκαν μέσω της πυροαλληλούχισης (Αλληλουχία 16S rRNA γονιδίων Χρήση PCR και κλωνοποίησης)</p>	<p>βασισμένη σε φυτικά προϊόντα είχαν υψηλότερο ποσοστό βακτηρίων του γένους Firmicutes στο έντερο σε σχέση με τα δείγματα ελέγχου.</p>	<p>Drew M., Van Kessel A., Hill J. (2006)</p>
<p><i>Dicentrarchus labrax L.</i></p>	<p>Δύο δοκιμές διεξήχθησαν σε ιχθύδια ευρωπαϊκού λαβρακιού για να αξιολογηθούν οι επιπτώσεις της ένταξης στο σιτηρέσιου άλευρο με πλήρη λιπαρά από προνύμφες <i>Tenebrio molitor</i> (TM). Το πρώτο κομμάτι του πειράματος διεξείχθει σε 450 λαβράκια χρησιμοποιώντας τρεις ισοαζωτούχες και ισολιπιδικές πειραματικές δίαιτες (3 δεξαμενές / διατροφή, 50 ψάρια / δεξαμενή) ώστε να περιέχουν 3 επίπεδα ένταξης TM και πιο συγκεκριμένα: 0% (TM0), 25% (TM25) και 50% (TM50) ως βάση του σιτιρεσίου. Ακολούθως αξιολογήθηκαν η σύνθεση του</p>	<p>Τα αποτελέσματα της μελέτης ανάπτυξης έδειξαν ότι το υψηλότερο επίπεδο ένταξης (TM50) οδήγησε στην μείωση του τελικού σωματικού βάρους, μείωση της αύξησης του σωματικού βάρους καθώς επίσης και του ειδικού ρυθμού ανάπτυξης σε σύγκριση με τη δίαιτα ελέγχου (TM0). Όσον αφορά το σύνολο της σύνθεσης του σώματος, η ακατέργαστη πρωτεΐνη και το αιθερικό εκχύλισμα δεν επηρεάστηκαν σημαντικά από τη χρήση των TM, ενώ παρατηρήθηκαν αλλαγές στο προφίλ των FA.</p>	<p>Gasco L., Henry M., Piccolo G., Marono S., Gai F., Renna M., Lussiana C., Antonopoulou E., Mola P., Chatzifotis S. (2016)</p>

	σώματος των ιχθύων καθώς επίσης και το προφίλ των λιπαρών τους οξέων		
<i>Clarias gariepinus</i>	Έγινε μελέτη σίτισης 7 εβδομάδων για την αξιολόγηση της χρήσης των αλεύρων από TM, <i>Tenebrio molitor</i> , ως εναλλακτική πηγή πρωτεΐνης για το αφρικανικό γατόψαρο, <i>Clarias gariepinus</i> . Έξι ισοαζωτούχες (40% ακατέργαστη πρωτεΐνη) και ισοενεργειακές (14,64 kJ g ⁻¹) δίαιτες διατυπώθηκαν. Το συστατικό ιχθυάλευρα από τις δίαιτες σταδιακά υποκαταστήτω από 0, 20, 40, 60, 80 και 100% άλευρο TM. Οι πειραματικές δίαιτες σιτήστηκαν εις τριπλούν στις ομάδες των γατόψαρων (μέσο αρχικό βάρος 5,1 ± 0,2 g). Ακολούθως εξετάστηκαν οι αναπτυξιακές επιδόσεις και η αποτελεσματικότητα χρήσεως της τροφής από τα γατόψαρα.	Οι αναπτυξιακές επιδόσεις και η αποτελεσματικότητα χρήσεως της τροφής των γατόψαρων που σιτήστηκαν με δίαιτες έως και 40% αντικατάσταση με άλευρο από TM δεν εμφάνισαν στατιστικές σημαντικές διαφορές (P > 0,05) σε σύγκριση με τα ψάρια που σιτήστηκαν με τη δίαιτα ελέγχου. Τα γατόψαρα που σιτήστηκαν με δίαιτες με έως και 80% αντικατάσταση του ιχθυαλεύρου εμφάνισαν ακόμα καλή ανάπτυξη και αποδοτικότητα χρήσεως της τροφής.	Ng W., Liew F.L., Ang L.P., Wong K.W. (2001).
	Τα ψάρια ζυγίστηκαν, μετρήθηκαν και τοποθετήθηκαν σε εννέα πειραματικές	Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η προσθήκη έως 500 g στο κιλό του TM στη διατροφή δεν επηρέασε την πρόσληψη της	

<p><i>Oreochromis niloticus</i></p>	<p>δεξαμενές (3 δεξαμενές / δίαιτα και 11 ψάρια / δεξαμενή) με όγκο 250 L. Τα ψάρια διατηρήθηκαν στους 27 ° C με μια φυσική φωτοπερίοδο (12L: 12D). Τα ζώα ταΐστηκαν με την κατάλληλη πειραματική δίαιτα, κατά βούληση δύο φορές την ημέρα, στις 09:30 και στις 13:30 για 42 ημέρες. Ακολούθως διερευνήθηκαν η θρεπτική αξία των του σιτηρεσίου από <i>Tenebrio molitor</i> (TM) και το αποτέλεσμα της ολοκληρωτικής αντικατάστασης του SM από TM ή της μερικής αντικατάστασης του FM από TM σε σχέση με μια διατροφή βασισμένη σε SM και FM.</p>	<p>τροφής, την in vitro πεπτικότητα της πρωτεΐνης, τη σύνθεση των αμινοξέων των μυών ή τους βιομετρικούς δείκτες. Ωστόσο, η συμπερίληψή τους είχε ως αποτέλεσμα την μειωμένη ανάπτυξη</p>	<p>Sanchez-Muros M., De Haro C., Sanz A., Trenzado C., Villareces S., Barroso F. (2016)</p>
	<p>Αυτή η μελέτη είχε ως στόχο να αναλύσει την εντερική μικροχλωρίδα των εκκρεφόμενων λαβρακιών (<i>Dicentrarchus labrax</i>) τα οποία σιτήστικαν με δύο λειτουργικά διαίτες.</p>	<p>Η αυτόχθονη εντερική μικροχλωρίδα του λαβρακιού βρέθηκε να αποτελείται από δύο κυρίαρχα βακτηριακά γένη: <i>Dysgonomonas</i> (Bacteroidetes) και <i>Ralstonia</i> (Betaproteobacteria), αλλά παρατηρήθηκαν επιδράσεις της</p>	<p>Carda-Diéguez M., Mira A., Fouz B. (2014)</p>

<p><i>Dicentrarchus labrax</i></p>	<p>Ακολούθως έγινε ανάλυση Pyrosequencing της PCR ενισχυμένου γονιδίου 16S rRNA. Ακολούθως έγινε αναγνώριση της οικογένειας και του γένους με τη χρήση του Ribosomal Database Project classifier.</p>	<p>διατροφής σε αυτή την κυριαρχία.</p>	
<p><i>Dicentrarchus labrax</i></p>	<p>Ο σκοπός αυτής της εργασίας ήταν να διερευνηθεί η καταβολική διαδικασία τριών ειδών διατροφικών υδατανθράκων στο έντερο γόνου λαβρακιού, με την πιθανή συμβολή της εντερικής μικροχλωρίδας στο μεταβολισμό του ξενιστή. Η πρώτη διαίτα περιείχε κηρώδες καλαμπόκι (99% αμυλοπηκτίνη), μια ιδιαίτερα εύπεπτη μορφή αμύλου. Η δεύτερη διαίτα ήταν λιγότερο εύπεπτη λόγω της υψηλής περιεκτικότητας σε αμυλόζη του ανθεκτικού. Ακόμη δύο άλλες δίαιτες χρησιμοποιήθηκαν που περιείχαν φυτικές ίνες αντί του αμύλου, είτε μόνο κυτταρίνης ή και άλλους μη αμυλούχους πολυσακχαρίτες.</p>	<p>Η επίδραση των δίαιτες στον ξενιστή επιβεβαίωσε τα προηγούμενα αποτελέσματα, με την διέγερση της αποθήκευσης της γλυκόζης στο ήπαρ στα λαβράκια που σιτίστηκαν με τα αμυλούχα σιτηρέσια, τα οποία προκάλεσαν σημαντική αύξηση στο βάρος του ήπατος, ενώ το σιτηρέσιο από λούπινο προκάλεσε αύξηση της σπλαχνικής μάζας. Η ταχεία πέψη του κηρώδες καλαμποκιού οδήγησε σε υπερτριγλυκεριδαιμία. Ταυτόχρονα η δειγματοληψία έδειξε ότι η δραστηριότητα της ελεύθερης αμυλάσης μειώθηκε στο έντερο των λαβρακιών που σιτίστηκαν με ανθεκτικό άμυλο. Η διαίτα επηρέασε τόσο την βακτηριακή ποικιλότητα των κοπράνων όσο και του βλεννογόνου, αν και με διαφορετικό τρόπο, πιθανώς λόγω της αλληλεπίδρασης με τον ξενιστή.</p>	<p>Gatesoupe F., Huelvan C., Le Bayon N., Sèvère A., Aasenc I., Degnes K., Mazurais D., Panserat S., Zambonino-Infante J., Kaushik S. (2014)</p>

<p><i>Sparus aurata</i></p>	<p>Ο σκοπός της εργασίας αυτής ήταν να διερευνηθεί η δυνατότητα χρησιμοποίησης νυμφών μύγας <i>Hermetia illucens</i> ως κύριο συστατικό των ιχθυοτροφών για τσιπούρες (<i>Sparus aurata</i>). Για την εργασία αυτή χρησιμοποιήθηκαν 3 δίαιτες. Η πρώτη δίαιτα ήταν η δίαιτα ελέγχου η οποία περιείχε αποκλειστικά υχθυάλευρο ενώ οι άλλες δυο αντικατάσταση 10% και 20% του ιχθυαλεύρου με άλευρο απο νύμφες <i>Hermetia illucens</i> αντίστοιχα</p>	<p>Η μερική αντικατάσταση του ιχθυαλεύρου με μυγάλευρο απο 10% έως 20% δεν επηρέασε την επιβίωση των ψαριών που σιτίστηκαν με αυτά. Η αύξηση βάρους των ψαριών και ο SGR ήταν σημαντικά μικρότεροι στα σιτηρέσια που υπήρχε αντικατάσταση του ιχθυαλεύρου με μυγάλευρο σε ποσοστό 10% και 20% ενώ ο συντελεστής FCR, ο PER καθώς και ο PR δεν σημείωσαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των διατροφικών ομάδων. Τα επίπεδα της υγρασίας, του λίπους και των αζωτούχων ενώσεων παρέμειναν τα ίδια. Το είδιο και οι σωματομετρικοί δείκτες σε αντίθεση με τον ενδοπλαχνικό που παρουσιάζει σημαντική αύξηση καθώς μεγαλώνει το ποσοστό του μυγάλευρου.</p>	<p>Βογιατζής Ι. (2015)</p>
-----------------------------	--	---	--------------------------------

6. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η παρούσα μεταπτυχιακή εργασία έγινε με σκοπό να διαπιστωθεί κατά πόσο η συμπερίληψη εντομάλευρου στην διατροφή του λαυρακιού (*Dicentrarchus labrax*) μπορεί να επηρεάσει την βακτηριακή ποικιλότητα του εντέρου του καθώς επίσης και την ανάπτυξή του.

Τα μέσα τελικά βάρη τα οποία βρέθηκαν μετά το πέρας του πειράματος αποδεικνύουν ότι οι ιχθείς που σιτίστηκαν με τροφή που περιείχε 50% εντομάλευρο είχαν στατιστικώς σημαντική απώλεια βάρους σε σχέση με την τροφή ελέγχου, γεγονός το οποίο μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι δεν είναι προτεινόμενη η 50% αντικατάσταση του ιχθυαλεύρου με εντομάλευρο TM. Ως εκ τούτου περαιτέρω έρευνα πρέπει να διεξαχθεί ούτως ώστε να διαπιστωθεί η σωστή αναλογία FM και εντομάλευρου TM η οποία μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να αποφευχθεί η απώλεια του σωματικού βάρους.

Όσον αφορά την βακτηριακή ποικιλότητα του εντέρου από τις αναλύσεις που διενεργήθηκαν διαφάνηκε ότι η συμπερίληψη του εντομάλευρου TM είχε ως αποτέλεσμα να επηρεαστεί η βακτηριακή ποικιλότητα του εντέρου των ιχθύων. Ποιά συγκεκριμένα φάνηκε να υπάρχει αύξηση των λειτουργικών ταξινομικών μονάδων (OTUs) από 28 στην ομάδα ελέγχου (0% εντομάλευρο) σε 54 στην ομάδα που σιτίστηκε με την τροφή που περιείχε 50% εντομάλευρο και 50% ιχθυάλευρο. Εκ των οποίων μόνο τα 12 OTUs βρέθηκαν και στις δύο ομάδες.

Το κυρίαρχο φύλο, σε όλα τα άτομα, ήταν τα Proteobacteria, τα οποία εμφανίζονταν σε συχνότητες υψηλότερες από 50% σε κάθε δείγμα. Στα έντερα των ατόμων που σιτίστηκαν με 0% εντομάλευρο βρέθηκαν να κυριαρχούν τα β -Proteobacteria τα οποία κυριαρχούν συνήθως σε ψάρια γλυκών υδάτων ενώ σε αυτά της ομάδας που σιτίστηκαν με 50% εντομάλευρο βρέθηκαν να κυριαρχούν τα γ -Proteobacteria τα οποία κυριαρχούν συνήθως σε ψάρια αλμυρών υδάτων.

Εν κατακλείδι, τα εντομάλευρα από TM μπορεί να αποδειχθούν μια πιθανή εναλλακτική πηγή πρωτεϊνών στις ιχθυοτροφές για λαβράκι. Περαιτέρω έρευνα είναι σαφώς επιβεβλημένη προκειμένου να εξασφαλισθεί ότι η χρήση των πρωτεϊνών από εντομάλευρο TM σε ιχθυοτροφές είναι ασφαλής για κατανάλωση από τα ψάρια.

Ακόμη, η επίδραση της διατροφής με εντομάλευρο ΤΜ στην σάρκα και τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των εκτρεφόμενων ψαριών θα χρειαστεί περαιτέρω αξιολόγηση.

7. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Ajani E., Nwanna L., Musa B. (2004). Replacement of fishmeal with maggot meal in the diets of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, *World Aquaculture*, 35: 52–54.

Alexis M., Nengas I. (2001). Current state of knowledge concerning the use of soy products in diets for feeding sea bass and sea bream, Needs for future research, Publ. American Soybean Assn., Brussels, Belgium. No. 5, pp: 32.

Allan G., Parkinson S., Booth M., Stone D., Rowland S., Frances J., Warner-Smith R. (2000). Replacement of fish meal in diets for Australian silver perch, *Bidyanus bidyanus*: I. Digestibility of alternative ingredients, *Aquaculture*, 186(3-4): 293-310

Amberg S., Hall T. (2008). Communicating risks and benefits of aquaculture: a content analysis of US newsprint representations of farmed salmon, *Journal of the World Aquaculture Society*, 39: 143–157

Aniebo A., Odukwe C., Ebenebe C., Ajuogu P., Owen O., Onu P. (2011). Effect of housefly larvae (*Musca domestica*) Meal on the carcass and sensory qualities of the mud catfish (*Clarias gariepinus*), *Adv. Food Ener. Sec.*, 1: 24–28

Bondari K., Sheppard D. (1981). Soldier fly larvae as feed in commercial fish production, *Aquaculture*, 24: 103–109

Buentello A., Jirsa D., Barrows F., Drawbridge M. (2015). Minimizing fishmeal use in juvenile California yellowtail, *Seriola lalandi*, diets using non-GM soybeans selectively bred for aquafeeds, *Aquaculture*, 435: 403-411

Caceci T, El-Haback H., Smith S., Smith B. (1997). The stomach of *Oreochromis niloticus* has three regions, *Journal of Fish Biology*, 50(5): 939-952

Carda-Diéguez M., Mira A., Fouz B. (2014). Pyrosequencing survey of intestinal microbiota diversity in cultured sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fed functional diets, *FEMS Microbiology Ecology*, 87: 451-459

Carter C. & Hauler R. (2000). Fish meal replacement by plant meals in extruded feeds for Atlantic salmon, *Salmo salar L.*, *Aquaculture*, 185(3-4): 299-311

de Paula Silva F., Nicoli J., Zambonino-Infante J., Kaushik S., Gatesoupe F. (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 Microbiology Ecology*, 78(2): 285–296.

Denev S., Staykov Y., Moutafchieva R., Beev G. (2009). Microbial ecology of the gastrointestinal tract of fish and the potential application of probiotics and prebiotics in finfish aquaculture, *International Aquaculture Research*, 1: 1 - 29

Desai A., Links M., Collins S., Mansfield G., Drew M., Van Kessel A., Hill J. (2012). Effects of plantbased diets on the distal gut microbiome of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), *Aquaculture*, 350–353: 134–142.

Dethlefsen L., Eckburg P., Bik E., Relman D. (2006). Assembly of the Human intestinal microbiota, *Trends in Ecology & Evolution*, 21(9):517-23.

Ding Z., Zhang Y., Ye J., Du Z., Kong Y. (2015). An evaluation of replacing fish meal with fermented soybean meal in the diet of *Macrobrachium nipponense*: Growth, nonspecific immunity, and resistance to *Aeromonas hydrophila*, *Fish & Shellfish Immunology*, 44(1): 295-301

FAO (2014). FAO Fisheries and Aquaculture Department. FAO Global Aquaculture Production Volume and Value Statistics Database Updated to 2012.

Ferguson W. (2006). *Systemic Pathology of Fish: a text and atlas of normal tissues in teleosts and their responses in disease*, Scotian Press, 2nd Edition, Dalton House, London, UK.

Gatesoupe F., Huelvan C., Le Bayon N., Sévère A., Aasenc I., Degnes K., Mazurais D., Panserat S., Zambonino-Infante J., Kaushik S. (2014). The effects of dietary carbohydrate sources and forms on metabolic response and intestinal microbiota in sea bass juveniles, *Dicentrarchus labrax*, *Aquaculture*, 422-423: 4753

Gatesoupe F. (1999). Review: The use of probiotics in aquaculture, *Aquaculture*, 180: 147-165

Gasco L., Belforti M., Rotolo L., Lussiana C., Parisi G., Terova G., Roncarati A., Gai F. (2014a). Mealworm (*Tenebrio molitor*) as a potential ingredient in practical diets

for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). In: Vantomme, P., Munke, C., van Huis, A. (Eds.), 1st International Conference “Insects to Feed the World”. Wageningen University, Ede-Wageningen, The Netherlands, p. 69.

Gasco L., Gai F., Piccolo G., Rotolo L., Lussiana C., Molla P., Chatzifotis S. (2014b). Substitution of fishmeal by *Tenebrio molitor* meal in the diet of *Dicentrarchus labrax* juveniles. In: Vantomme, P., Munke, C., van Huis, A. (Eds.), 1st International Conference “Insects to Feed the World”. Wageningen University, Ede-Wageningen, The Netherlands, p. 70

Gasco L., Henry M., Piccolo G., Marono S., Gai F., Renna M., Lussiana C., Antonopoulou E., Mola P., Chatzifotis S. (2016). *Tenebrio molitor* meal in diets for European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) juveniles: Growth performance, whole body composition and in vivo apparent digestibility, *Animal Feed Science and Technology*, 220: 34–45

Ghanbari M., Kneifel W., Domig K. (2015). A new view of the fish gut microbiome: Advances from next-generation sequencing, *Aquaculture*, 448: 464-475

Giffard-Mena I., Charmantier G., Grousset E., Aujoulat F., Castille R. (2006). Digestive tract ontogeny of *Dicentrarchus labrax*: Implication in osmoregulation. *Develop. Growth & Differentiation*, 48 (3): 139-151.

Hansen G. & Olafsen J. (1999). Bacterial interactions in early life stages of marine cold water fish, *Microbial Ecology*, 38(1): 1-26.

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

Hien T., Be T., Lee C., Bengtson D. (2015). Development of formulated diets for snakehead (*Channa striata* and *Channa micropeltes*): Can phytase and taurine supplementation increase use of soybean meal to replace fish meal ?, *Aquaculture*, 448: 334-340

Huang, G. (2008) The study of intestinal bacterial molecular ecology of cultured fishes. Master thesis, Huazhong Agricultural University.

- Hyun D., Shin N., Kim M., Kim J., Kim P., Oh S., Whon T., Bae J. (2014). *Cloacibacterium haliotis* sp. nov., isolated from the gut of an abalone, *Haliotis discus hannai*, International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 64: 72-77
- Kroeckel S., Harjes A., Roth I., Katz H., Wuertz S., Susenbeth A., Schulz C. (2012). When a turbot catches a fly: evaluation of a pre-pupae meal of the Black Soldier Fly (*Hermetia illucens*) as fish meal substitute – growth performance and chitin degradation in juvenile turbot (*Psetta maxima*), Aquaculture, 364-365: 345–352.
- Li H., Wei C. (2015). Diet, Gut Microbiota and Obesity, Journal of Nutritional Health & Food Science 3, 1-6.
- Li X., Yan Q., Xie S., Hu W., Yu Y., Hu Z. (2013). Gut microbiota contributes to the growth of fast-growing transgenic common carp (*Cyprinus carpio* L.), PLoS One, 8, e64577.
- Lock E., Arsiwalla T., Waagbo R.(2014). Insect meal: a promising source of nutrients in the diet of Atlantic salmon (*Salmon salar*). In: Vantomme, P., Munke, C., van Huis, A. (Eds.), 1st International Conference “Insects to Feed the World”. Wageningen University, Ede-Wageningen, Netherlands, p.67.
- Makkar H., Tran G., Heuze V., Ankers P.(2014). State-of-the-art on use of insects as animal feed, Animal Feed Science Technology, 197(0): 1–33, In: <http://dx.doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2014.07.008>
- Ming J., Ye J., Zhang Y., Yang X., Wu C., Shao X., Liu P. (2013). The influence of maggot meal and l-carnitine on growth, immunity, antioxidant indices and disease resistance of black carp (*Mylopharyngodon piceus*), Journal of the Chinese Cereals and Oils Association, 28: 80–86
- Molina-Poveda C., Lucas M., Jover M. (2013). Evaluation of the potential of Andean lupin meal (*Lupinus mutabilis* Sweet) as an alternative to fish meal in juvenile *Litopenaeus vannamei* diets, Aquaculture, 410-411: 148-156
- Newton G., Sheppard D., Watson D., Burtle G., Dove C., Tomberlin J., Thelen E. (2005). The black soldier fly, *Hermetia illucens* as a manure management/resource

recovery tool. In: Symposium on the State of the Science of Animal Manure and Waste Management, San Antonio, TX, USA

Ng W., Liew F., Ang L., Wong K. (2001). Potential of mealworm (*Tenebrio molitor*) as an alternative protein source in practical diets for African catfish, *Clarias gariepinus*, *Aquaculture Research*, 32: 273–280.

Nsofor C., Osayamwen E., Ewuim S., Etaga H., (2008). Effects of varying levels of maggot and fishmeal on food utilization and growth of *Clarias gariepinus* fingerlings reared in net hopas in concrete ponds, *Journal of Applied & Natural Science*, 9: 79–84

Ossey Y., Koumi A., Koffi K., Atse B., Kouame L., (2012). Use of soybean, bovine brain and maggot as sources of dietary protein in larval *Heterobranchus longifilis* (Valenciennes, 1840), *Journal of Animal and Plant Sciences*, 15: 2099–2108.

Ramos-Elorduy J., Avila Gonzalez E., Rocha Hernandez A., Pino J. (2002). Use of *Tenebrio molitor* (Coleoptera: *Tenebrionidae*) to recycle organic wastes and as feed for broiler chickens, *Journal of Economic Entomology*, 95: 214–22

Rana K., Siriwardena S., Hasan M. (2009). Impact of rising feed ingredient prices on aquafeeds and aquaculture production, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy in: <http://www.fao.org/docrep/012/i1143e/i1143e.pdf> (Accessed 5/8/2015)

Ringø E., Zhou Z., Vecino J., Wadsworth S., Romero J., Krogdahl Å., Olsen R., Dimitroglou A., Foey A., Davies S., Owen M., Lauzon H., Martinsen L., De Schryver P., Bossier P., Sperstad S., Merrifield D. (2015). Effect of dietary components on the gut microbiota of aquatic animals. A never-ending story?, *Aquaculture Nutrition*, 22(2): 219–282.

Ringø E. & Olsen R. (1999). The effect of diet on aerobic bacterial flora associated with intestine of Arctic charr (*Salvelinus alpinus* L.), *Journal of Applied Microbiology*, 86(1): 22–28.

Ringø E., Strøm E., Tabachek J. (1995) Intestinal microflora of salmonids: a review, *Aquaculture Research*, 26: 773-789

Ringø E., Bendiksen H., Gausen S., Sundsfjord A., Olsen, R. (1998). The effect of dietary fatty acids on lactic acid bacteria associated with the epithelial mucosa and from faecalia of Arctic charr, *Salvelinus alpinus* (L.), *Journal of Applied Microbiology*, 85(5): 855– 864.

Roncarati A., Gasco L., Parisi G., Terova G.(2014). Growth performance of common catfish (*Ameiurus melas Raf.*) fingerlings fed insect meal diets, In: Vantomme, P., Munke, C., van Huis, A. (Eds.), 1st International Conference “Insects to Feed the World”, Ede-Wageningen, The Netherlands, p. 162.

Sanchez-Muros M., De Haro C., Sanz A., Trenzado C., Villareces S., Barroso F. (2016). Nutritional evaluation of *Tenebrio molitor* meal as fishmeal substitute for tilapia (*Oreochromis niloticus*) diet, *Aquaculture Nutrition*, 22: 943–955

Sealey W., Gaylord T., Barrows F., Tomberlin J., McGuire M., 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

Shah P. (2007). Functional cultures and health benefits, *International Dairy Journal*, 17(11): 1262-1277

Sogbesan A., Ajuonu N., Musa B., Adewole A. (2006). Harvesting techniques and evaluation of maggot meal as animal dietary protein source for *Hetero clarias* in outdoor concrete tanks, *World Journal of Agricultural Sciences*, 2: 394–402.

St-Hilaire S., Sheppard C., Tomberlin J., Irving S., Newton L., McGuire M., Mosley E., Hardy R., Sealey W., (2007). Fly prepupae as a feed stuff for rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, *Journal of the World Aquaculture Society*, 38: 59–67

Suárez J., G., Mendoza R., S., Garcia G., Alanis G., Suárez A., J., Cuzon G. (2009). Substitution of fish meal with plant protein sources and energy budget for white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931), *Aquaculture*, 289(1-2): 118-123

Tacon A., Metian M. (2008). Global overview on the use of fishmeal and fish oil in industrially compounded aquafeeds: Trends and future prospects, *Aquaculture*, 285: 146-158.

Turchini G., Mentati T., Caprino F., Panseri S., Moretti V., Valre F.(2003). Effects of dietary lipid sources on flavour volatile compounds of brown trout (*Salmo trutta L.*) fillet, *Journal of Applied Ichthyology*, 20: 71–75

Veldkamp T., van Duinkerken G., van Huis A., Lakemond C., Ottevanger E., Bosch G., van Boekel M., (2012). Insects as a sustainable feed ingredient in pig and poultry diets – a feasibility study. Wageningen UR Livestock Production, report 638, pp. 1–48.

Yoshimizu M. & Kimura T. (1976) Study on the intestinal microflora of salmonids, *Fish Pathology*, 10: 243-259

Αντωνοπούλου, Ε. (2015). Fish culture: Feeding and nutrition. [Book Chapter]. In Voultsiadou, Ε., Ampatzopoulos, Τ., Antonopoulou, Ε., Gkanias, Κ., Gkelis, Σ., Staikou, Α., Triantafyllidis, Α. 2015. AQUACULTURE. [ebook] Athens:Hellenic Academic Libraries Link. chapter 3. Available Online at: <http://hdl.handle.net/11419/5086>

Βογιατζής Ι. (2015). Μερική υποκατάσταση του ιχθυαλεύρου με άλευρο απο νύμφες μύγας του είδους *Hermetia illucens* στο σιτηρέσιο της τσιπούρας (*Sparus aurata*): χαμηλή υποκατάσταση, προπτυχιακή μελέτη του φοιτητή Ιωάννη Βογιατζή στο Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Βουλτσιάδου Ε., Αμπατζόπουλος Θ., Αντωνοπούλου Ε., Γκάνιας Κ., Γκέλης Σ., Στάικου Α., Τριανταφυλλίδης Α. (2015). ΥΔΑΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ, Οργανισμοί, συστήματα παραγωγής, προοπτικές, In:

https://repository.kallipos.gr/bitstream/11419/5083/1/00_master_document.pdf

(Accessed 22/10/2016)

Λουκά Χ. (2010). Διερεύνηση της επίδρασης του χρώματος των δεξαμενών εκτροφής στα πεπτικά ένζυμα της τσιπούρας, *Sparus aurata* και του λαβρακιού, *Dicentrarchus labrax*, Μεταπτυχιακή μελέτη της φοιτήτριας Λουκά Χριστίνας στο Τμήμα Επιστήμης Ζωικής Παραγωγής και Υδατοκαλλιεργιών του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών

Μεντέ Ε., Νέγκας Ι. (2011). Στοιχεία φυσιολογίας θρέψεως και εφαρμοσμένη διατροφή ιχθύων και καρκινοειδών, Εκδόσεις Παπαζήση, Αθήνα, Ελλάδα

Μπέζα Π. (2010). Ταυτόχρονος προσδιορισμός και μελέτη της αποδήμησης των αντιβιοτικών οξυτετρακυκλίνη, οξολινικό οξύ, τριμεθοπρίμη και σουλφαδιαζίνη σε επιφανειακά νερά. Διδακτορική Διατριβή. Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

ABSTRACT

The present study was carried out to verify whether the inclusion of insect meal from *Tenebrio molitor* (TM) in the diet of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) can affect the bacterial diversity in its gut. Seabass individuals, initial average weight 5 g. were fed for 70 days with two isonitrogenous and isoenergetic diets. The diets contained 100% fishmeal and 50% partial substitution of fishmeal with insect meal (TM), derived from larvae of the species *Tenebrio molitor*. For the laboratory tests we used 6 fish which were taken from 6 different tanks, 3 of which were fed a diet containing 50% TM insect meal and the other 3 with a control diet containing 0% TM insect meal (100% fish meal). Total DNA from the gut contents of each group were grouped to create a template for PCR and library construction notified cpn60 universal target sequences. Analysis results showed that in the control diet the dominant phylum was Proteobacteria as well as in the group fed with the diet containing 50% TM insect meal. However a reduction was observed in Proteobacteria's abundance. Furthermore in the diet containing 50% TM insect meal various phyla were identified which were not in the control diet. Phyla such as *Gemmatimonadetes*, *Acidobacteria*, *Planctomycetes* and *Chloroflexi*. Between the two groups 12 common operational taxonomic units (OTUs) were found.

Key words: *insect meal, bacterial diversity, Tenebrio molitor, sea bass*



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ



004000134353