

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΙΧΘΥΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΥΔΑΤΙΝΟΥ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ



ΠΡΟΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ



**«Επιπτώσεις της διατροφικής χορήγησης πρωτεΐνης εντομάλευρων
για την υποκατάσταση του ιχθυάλευρου στο αιματολογικό προφίλ
εντατικά εκτρεφόμενων ιχθύων»**

Δρακάκη Ευαγγελία

ΒΟΛΟΣ 2022

**«Επιπτώσεις της διατροφικής χορήγησης πρωτεΐνης εντομάλευρων
για την υποκατάσταση του ιχθυάλευρου στο αιματολογικό προφίλ
εντατικά εκτρεφόμενων ιχθύων»**

Τριμελής εξεταστική επιτροπή:

1) Ελένη Γκολομάζου, Επίκουρη Καθηγήτρια, Προστασία Ευζωία Ιχθύων, Τμήμα Γεωπονίας, Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, **Επιβλέπουσα.**

2) Παναγιώτα Παναγιωτάκη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Υδατοκαλλιέργειες, Τμήμα Γεωπονίας, Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, **Μέλος.**

3) Ιωάννης Καραπαναγιωτίδης, Αναπληρωτής Καθηγητής – Διατροφή Υδρόβιων Ζωικών Οργανισμών, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, **Μέλος.**

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Με την ολοκλήρωση της παρούσας Πτυχιακής Διατριβής, θα ήθελα πρώτα απ' όλα να ευχαριστήσω την επιβλέπουσα καθηγήτρια κα Ελένη Γκολομάζου για την πολύτιμη βοήθεια και τη συνεχή καθοδήγηση που μου παρείχε, τόσο κατά τη διενέργεια του πειράματος όσο και κατά τη συγγραφή της διατριβής μου.

Ταυτόχρονα, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη της εξεταστικής επιτροπής κα Παναγιωτάκη και κ. Καραπαναγιωτίδη για την ουσιαστική βοήθεια που μου προσέφεραν αφιερώνοντας χρόνο στην ανάγνωση και στην αξιολόγηση της διατριβής μου.

Θα ήθελα επίσης, να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στις υποψήφιες διδάκτορες κα Παπαδούλη Χριστίνα και κα Αντωνιάδου Ελένη και στο μέλος του εργαστηριακού προσωπικού κα Μυρτώ Μανιάκη για την ανιδιοτελή βοήθειά τους, τόσο σε προσωπικό όσο και σε εργαστηριακό επίπεδο.

Τέλος, δεν θα μπορούσα να παραλείψω όλους όσους στάθηκαν δίπλα μου, καθ' όλη τη διάρκεια αυτής της απαιτητικής περιόδου, αλλά κυρίως θα ήθελα να εκφράσω ένα μεγάλο ευχαριστώ στους γονείς μου γιατί με στηρίζουν και με ενθαρρύνουν αδιάκοπα και ακούραστα σε κάθε βήμα της ζωής μου.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η ταχεία ανάπτυξη των υδατοκαλλιεργειών συνεπάγεται την αυξημένη ζήτηση των ιχθυοτροφών και συγκεκριμένα των ιχθυάλευρων, των κυριότερων πηγών ζωικής πρωτεΐνης. Ωστόσο, λόγω της εξάντλησης των ιχθυαποθεμάτων και της εκτόξευσης της τιμής των ιχθυαλεύρων καθίσταται επιτακτική ανάγκη η εύρεση εναλλακτικών πηγών πρωτεΐνης. Τα εντομάλευρα αποτελούν μια αποτελεσματική πρωτεϊνική πηγή που μπορεί να υποκαταστήσει επιτυχώς τα ιχθυάλευρα. Είναι πηγές υψηλής θρεπτικής αξίας και μικρού οικολογικού αποτυπώματος. Ένα πολλά υποσχόμενο εντομάλευρο προέρχεται από το είδος *Zophobas morio*, ωστόσο δεν υπάρχουν πολλές βιβλιογραφικές πηγές που να εξετάζουν την ενσωμάτωση του στις ιχθυοτροφές. Στην παρούσα εργασία, εξετάζεται η επίδραση του στην υγεία των ψαριών. Επιτυγχάνεται με την αξιολόγηση της επίδρασης του στις αιματολογικές παραμέτρους στις τιμές των τύπων των λευκών αιμοσφαιρίων, των λεμφοκυττάρων, των ουδετερόφιλων των ηωσινόφιλων και των μονοκύτταρων, δεδομένου ότι η αξιολόγηση των τιμών τους μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως διαγνωστικό εργαλείο για την παρακολούθηση της υγείας.

Για το πείραμα, συλλέχθηκαν ιχθύδια *Sparus aurata* που προέρχονταν από πείραμα εκτροφής, κατά το οποίο 6 ομάδες σιτίστηκαν με διαφορετικό σιτηρέσιο η καθεμία. Η πρώτη (FM) διατράφηκε με σιτηρέσιο-μάρτυρα (control) που περιείχε αποκλειστικά ιχθυάλευρο, οι υπόλοιπες διατράφηκαν με σιτηρέσια που το ιχθυάλευρο υποκαταστάθηκε από πλήρες σε λίπος άλευρο του εντόμου *Z. morio* κατά 5% και 10% (ZFF5 και ZFF10) αντίστοιχα και κατά 10%, 20% και 30% από απολιπασμένο εντομάλευρο (ZLF10, ZLF20, ZLF30). Έπειτα, πραγματοποιήθηκε η αιμοληψία των ιχθύων, η παρασκευή επιχρισμάτων αίματος και η χρώση τους. Ακολούθησε η παρατήρηση των δειγμάτων αίματος στο μικροσκόπιο με σκοπό τη διάκριση και την καταμέτρηση των τύπων των λευκών αιμοσφαιρίων. Για τη στατιστική ανάλυση των δεδομένων, χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα SPSS Statistics 25, αξιοποιώντας τη μέθοδο One-way ANOVA.

Η στατιστική ανάλυση έδειξε ότι οι τιμές των λεμφοκυττάρων όλων των διατροφικών ομάδων κυμάνθηκαν από 56,73% - 69,93% , των ουδετερόφιλων από 26,4%- 35%, των ηωσινόφιλων από 2,33- 3,87 και των μονοκύτταρων από 0-1%.

Οι τιμές των λεμφοκυττάρων, των ουδετερόφιλων, των ηωσινόφιλων και των μονοκύτταρων των διατροφικών ομάδων που σιτίστηκαν με πλήρους σε λίπους και απολιπασμένο εντομάλευρο *Z. morio*, δεν παρουσίασαν σημαντικές διαφορές σε σχέση με το φυσιολογικό εύρος των τιμών των λευκών αιμοσφαιρίων της τσιπούρας. Συνεπώς διαπιστώθηκε στην παρούσα εργασία, ότι το συγκεκριμένο έντομο δεν προκαλεί αρνητικές επιπτώσεις στους αιματολογικούς παράγοντες και δεν καθίσταται επιβλαβές για την υγεία της εκτρεφόμενης τσιπούρας.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
1.1 Βιολογία και εκτροφή τσιπούρας (<i>Sparus aurata</i>)	1
1.2 Χρήση ιχθυάλευρων και ιχθυέλαιων στις ιχθυοτροφές	4
1.3 Ανάγκη υποκατάστασης των ιχθυάλευρων και ιχθυέλαιων.....	5
1.4 Εναλλακτικές λύσεις	5
1.5 Χρήση των εντομάλευρων στις ιχθυοτροφές.....	6
1.6 Το έντομο <i>Zorhobas morio</i>	8
1.8 Αίμα και κύτταρα του αίματος.....	10
1.8.1 Ερυθρά αιμοσφαίρια.....	11
1.8.2 Θρομβοκύτταρα.....	11
1.8.3 Λευκά Αιμοσφαίρια.....	12
1.9 Σκοπός της μελέτης.....	13
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ	14
2.1 Δειγματοληψία ιχθύων	14
2.2 Αιμοληψία	15
2.3 Παρασκευή επιχρισμάτων περιφερικού αίματος	16
2.4 Πρωτόκολλο Χρώσεων	17
2.5 Παρατήρηση και καταγραφή δεδομένων	19
2.6. Στατιστική Ανάλυση	21
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	22
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	24
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	30
ABSTRACT	44

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Βιολογία και εκτροφή τσιπούρας (*Sparus aurata*)

Συστηματική κατάταξη του είδους *Sparus aurata* (Linnaeus, 1758):

Βασίλειο: Ζώα (Animalia)

Συνομοταξία: Χορδωτά (Chordota)

Ομοταξία: Ακτινοπτερύγιοι (Actinopterygii)

Τάξη: Περκόμορφα (Perciformes)

Οικογένεια: Σπαρίδες (Sparidae)

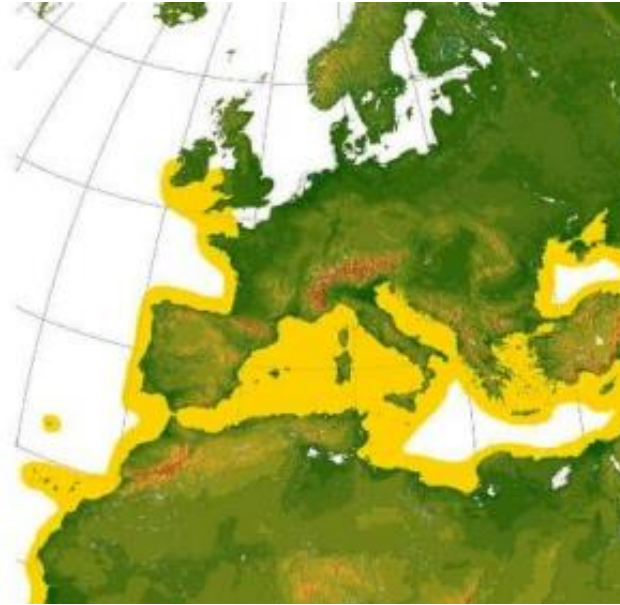
Γένος: *Sparus*

Είδος: *Sparus aurata*



Εικόνα 1.1. *Sparus aurata* (FAO, 2020)

Η τσιπούρα *S. aurata* (Εικ. 1.1) είναι ένα πελαγικό ευρύαλο και ευρύθερμο είδος, που μπορεί να ανταπεξέλθει σε ένα μεγάλο εύρος αλατότητας και θερμοκρασίας. Συνήθως εντοπίζεται σε υφάλμυρα και θαλασσινά νερά, σε περιοχές με λιβάδια Ποσειδωνίας, υφάλους και αμμώδη βενθικά υποστρώματα (Κλαουδάτος και Κλαουδάτος, 2012). Γενικά παρατηρείται σε νερά βάθους έως 30m, αν και τα ενήλικα μπορούν να εντοπιστούν και σε βάθη έως 150m (Crosseti et al., 2014). Πρόκειται για είδος που ζει είτε μοναχικά είτε σχηματίζοντας μικρές συναθροίσεις (Νεοφύτου, 2015). Αποτελεί κοινό είδος της Μεσογείου. Εντοπίζεται κατά μήκος των ακτών του Ανατολικού Ατλαντικού, από τη Μεγάλη Βρετανία έως τη Σενεγάλη και τα Κανάρια Νησιά, ενώ σε πολύ μικρότερο βαθμό εντοπίζεται και στη Μαύρη Θάλασσα (Εικ. 1.2) (FAO, 2009).



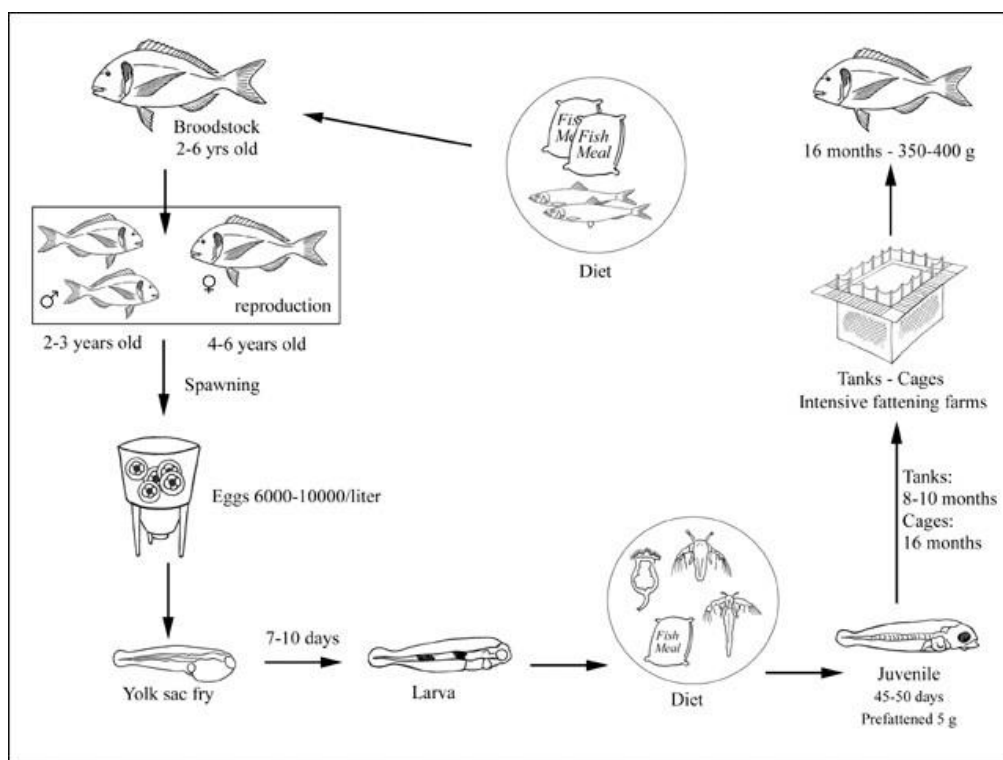
Εικόνα 1.2. Γεωγραφική εξάπλωση του είδους *S. aurata* (Brown, 2003)

Αποτελεί κυρίως ένα σαρκοφάγο είδος. Τα μικρότερα ψάρια τρέφονται κυρίως με μικρά καρκινοειδή ενώ στο διαιτολόγιο των μεγαλύτερων, περιλαμβάνονται μεγαλύτερα καρκινοειδή, γαστερόποδα, πολύχαιτοι, μύδια και άλλα οστρακοειδή καθώς και μικρότερα ψάρια (Sola et al., 2006) .

Εμφανίζει πρώτανδρο ερμαφροδιτισμό, δηλαδή ωριμάζει γεννητικά αρχικά ως αρσενικό και αργότερα μεταπίπτει σε θηλυκό. Η γεννητική ωρίμανση πραγματοποιείται για το αρσενικό σε ηλικία 2 ετών ενώ για το θηλυκό στα 2-3 έτη. Σε συνθήκες αιχμαλωσίας, η αναστροφή του φύλου εξαρτάται από κοινωνικούς και ορμονικούς παράγοντες (FAO, 2009) (Βουλτσιάδου και συν., 2015). Τέλος, η περίοδος ωοτοκίας λαμβάνει χώρα την περίοδο Οκτώβριο-Δεκέμβριο (Χώτος και Ρογδάκης, 2010).

Το είδος *S.aurata* μπορεί να εκτραφεί σε εκτατικά, ημιεντατικά και εντατικά συστήματα εκτροφής. Ωστόσο το μεγαλύτερο μέρος της παραγωγής, προέρχεται από την εντατική εκτροφή (Εικ. 1.3) με μέση ιχθυοπυκνότητα 15-50 kg/ m³ και συντελεστή μετατρεψιμότητας τροφής (FCR) 1.5-2. Η εκτροφή τους πραγματοποιείται κυρίως σε πλωτούς ιχθυοκλωβούς και χερσαίες εγκαταστάσεις (Mozes et al., 2011). Τα ιχθύδια εισάγονται στους ιχθυοκλωβούς όταν αποκτήσουν βάρος 10gr και φτάνουν στο εμπορεύσιμο μέγεθος περίπου σε 1 χρόνο. Στην Ελλάδα, με τη χρήση κυρίως

ιχθυοκλωβών, φτάνει στο εμπορικό βάρος των 350-400gr σε περίπου 16 μήνες (Κλαουδάτος και Κλαουδάτος, 2012).



Εικόνα 1.3. Παραγωγικός κύκλος της τσιπούρας στο εντατικό σύστημα εκτροφής (FAO, 2020)

Η τσιπούρα (*Sparus aurata*) όπως και το λαβράκι (*Dicentrarchus labrax*) αποτελούν τα σημαντικότερα είδη της Μεσογείου και τα κυριότερα εκτρεφόμενα είδη στόχους των υδατοκαλλιεργειών στην Ελλάδα με συνολική παραγωγή περίπου 117.000 τόνους, από τους οποίους περίπου το 80% εξάγεται. Ειδικά γι' αυτά τα δύο είδη, η Ελλάδα χαρακτηρίζεται ένας από τους κυριότερους προμηθευτές καθώς παρέχει το 58% των συνολικών πωλήσεων στην ΕΕ και το 24% των πωλήσεων παγκοσμίως (ΣΕΘ, 2020).

Η παγκόσμια παραγωγή της τσιπούρας εκτιμήθηκε το 1996 στους 33.213 τόνοι (FAO, 1998), ενώ το 2016 ανήλθε στους 185.980 τόνους (FAO, 2018) Αποδεικνύεται, ότι η παραγωγή του είδους, παρουσιάζει αυξητική πορεία σε αντίθεση με την αλιευτική δραστηριότητα που σημειώνει κάμψη (FAO, 2015). Στα πλαίσια των Μεσογειακών υδατοκαλλιεργειών, η παραγωγή της το 2018 ανήλθε στους 246.531 τόνους, με το 64,5% περίπου να προέρχεται την Τουρκία, την Ελλάδα και την Ισπανία (ΣΕΘ 2019).

Επίσης, το 2018 έφτασε τους 100.109 τόνους στην Ε.Ε, με την Ελλάδα να αποτελεί μακράν την μεγαλύτερη παραγωγό χώρα με 61.000 τόνους της Ευρωπαϊκής παραγωγής τσιπούρας. Εξίσου σημαντικές χώρες εκτροφής αποτελούν η Ισπανία, η Ιταλία, η Κροατία, η Κύπρος, η Γαλλία και η Πορτογαλία (ΣΕΘ 2019). Το 2019 στα πλαίσια της ελληνικής υδατοκαλλιέργειας, η παραγωγή τσιπούρας άγγιξε τους 55.531 τόνους αξίας 253.108 ενώ το 2020 αυξήθηκε στους 62.269 τόνους αξίας 289.810 (ΕΛΣΤΑΤ, 2020).

1.2 Χρήση ιχθυάλευρων και ιχθυελαίων στις ιχθυοτροφές

Είναι γεγονός ότι η ανάπτυξη των υδατοκαλλιεργειών του ταχύτερα αναπτυσσόμενου τομέα παραγωγής τροφίμων παγκοσμίως (FAO, 2018) συνεπάγεται με την ολοένα και αυξημένη ζήτηση των ιχθυοτροφών και συγκεκριμένα των ιχθυαλεύρων και των ιχθυελαίων (Hua et al, 2019). Πρόκειται για τα κυριότερα συστατικά που περιλαμβάνονται στην τροφή των περισσότερων εκτρεφόμενων ειδών.

Τα ιχθυάλευρα ορίζονται ως τα άλευρα που προέρχονται από την επεξεργασία διαφόρων ειδών ιχθύων, ιδίως πελαγικών. Συγκεκριμένα παράγονται είτε από ολόκληρα ψάρια, γαύρο, καπελάνο, φρίσσα, είτε από υπολείμματα της μεταποίησης των ψαριών. (Καραπαναγιωτίδης, 2020) Τα ιχθυάλευρα θεωρούνται πηγές υψηλής θρεπτικής αξίας. Καταρχάς, αποτελούν τη σημαντικότερη πρωτεϊνική πηγή που περιλαμβάνεται στις ιχθυοτροφές με την πρωτεΐνη να κυμαίνεται από 56-76% (Μεντέ και Νέγκας, 2011). Ταυτόχρονα, χαρακτηρίζονται από ένα ισορροπημένο προφίλ απαραίτητων αμινοξέων και από απουσία αντιδιατροφικών παραγόντων ενώ συγχρόνως είναι ιδιαίτερα εύγεστα και εύπεπτα (Karapanagiotidis, 2014).

Αντίστοιχα, τα ιχθυέλαια αποτελούν τα έλαια που προέρχονται από την επεξεργασία ιχθύων ύστερα από συμπύεση, χημική επεξεργασία και δύλιση (Καραπαναγιωτίδης, 2020). Πρόκειται για εξίσου σημαντικά συστατικά που πρέπει να προστίθενται στην τροφή των εκτρεφόμενων ιχθύων, καθώς αποτελούν πλούσιες πηγές πολυακόρεστων λιπαρών οξέων, κυρίως ω-3, EPA, DHA, αυξάνοντας ταυτόχρονα το ενεργειακό περιεχόμενο της ιχθυοτροφής (Καραπαναγιωτίδης, 2020).

1.3 Ανάγκη υποκατάστασης των ιχθυαλεύρων και ιχθυελαίων

Η παγκόσμια παραγωγή ιχθυαλεύρων και ιχθυελαίων παρουσιάζει στασιμότητα τα τελευταία 20-25 χρόνια, καθώς προέρχονται από αλιευμένα ιχθυαποθέματα που κινδυνεύουν να εξαντληθούν. Συνεπώς, η τιμή τους αυξάνεται από το 2000 εκτινάζοντας το συνολικό κόστος παραγωγής της υδατοκαλλιέργειας (Tacon and Metian, 2007; Shepherd and Jackson, 2013).

Εκτός από την περιορισμένη διαθεσιμότητα των ιχθυαλεύρων και των ιχθυέλαιων, έχουν διεγερθεί ηθολογικές αντιδράσεις καθώς τα αλιευμένα ιχθυαποθέματα χρησιμοποιούνται ως πρώτες ύλες για την παραγωγή ιχθυοτροφών, αντί να προορίζονται για ανθρώπινη κατανάλωση, ειδικά όταν ένα μεγάλο μέρος του παγκόσμιου πληθυσμού υποσιτίζεται από πρωτεΐνη ζωικής προέλευσης (Καραπαναγιωτίδης, 2020).

Επιπλέον, μια άλλη ανησυχία που εγείρεται από τη χρήση των ιχθυελαίων, αφορά την παρουσία έμμονων οργανικών ρύπων (POPs), ιδίως διοξινών/φουρανίων και πολυχλωριωμένων διφαινυλίων (PCB), που σε υψηλά επίπεδα καθίστανται τοξικοί τόσο για τους εκτρεφόμενους ιχθύες όσο και για τον καταναλωτή (Bell and Wagbo, 2008; Hong et al., 2015).

Σοβαροί ωστόσο είναι και οι προβληματισμοί για την αειφορική διαχείριση των ιχθυαποθεμάτων και τις πιθανές επιπτώσεις στα θαλάσσια υδάτινα οικοσυστήματα, κυρίως όσον αφορά την υποβάθμιση της τροφικής αλυσίδας των θαλάσσιων θηλαστικών και πουλιών (Huntington et al., 2004).

Η πρόκληση που αντιμετωπίζει ο κλάδος των υδατοκαλλιεργειών και η βιομηχανία των ιχθυοτροφών είναι να προβούν στην εύρεση βιώσιμων και εναλλακτικών λύσεων με σκοπό την αντικατάσταση των ιχθυαλεύρων και των ιχθυελαίων (Gasco et al, 2018; Glencross et al., 2020).

1.4 Εναλλακτικές λύσεις

Τις τελευταίες δεκαετίες, η προσοχή της επιστημονικής κοινότητας έχει στραφεί στην εφαρμογή νέων διατροφικών μοντέλων που στοχεύουν στην αντικατάσταση των ιχθυαλεύρων και των ιχθυελαίων με άλευρα φυτικής προέλευσης

ή και ζωικής χερσαίων ζώων (Rumbos et al., 2021). Βέβαια η πλήρης αντικατάσταση τους καθίσταται δύσκολη και απαιτείται περαιτέρω μελέτη για να επιτευχθεί (Hardy, 2010).

Πλέον παράγονται ιχθυοτροφές χρησιμοποιώντας πρώτες ύλες φυτικής προέλευσης όπως άλευρα και έλαια ελαιούχων δημητριακών καρπών, οσπρίων και σιτηρών (Καραπαναγιωτίδης, 2020). Γενικά είναι φθηνότερες πηγές από τις πηγές ζωικής προέλευσης και πλούσιες σε ενέργεια αλλά διαθέτουν χαμηλότερα επίπεδα πρωτεϊνών, είναι ανεπαρκή σε απαραίτητα αμινοξέα και η υψηλή περιεκτικότητα υδατανθράκων και ιωδών ουσιών τα καθιστά δύσπεπτα. Επίσης, η παρουσία αντιδιατροφικών παραγόντων παρεμποδίζει την πέψη και το μεταβολισμό των θρεπτικών ουσιών. Το σογιάλευρο είναι το πιο κοινό συστατικό φυτικής προέλευσης στις ιχθυοτροφές και θεωρείται μια αξιόλογη πηγή πρωτεΐνης. Ωστόσο σύμφωνα με τους Fuentes et al. (2010) ενδέχεται να οδηγήσει σε απώλεια της εντερικής ακεραιότητας στα ψάρια, έχοντας ως αποτέλεσμα τη μειωμένη απορρόφηση των θρεπτικών ουσιών και την επιβράδυνση της ανάπτυξης των ψαριών.

Μια πολλά υποσχόμενη λύση είναι η χρήση εντόμων ως συστατικό στις ιχθυοτροφές, καθώς μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως μια βιώσιμη εναλλακτική για την αντικατάσταση των ιχθυαλεύρων και των φυτικών υλών (Makkar *et al.*, 2014, Henry *et al.*, 2015).

1.5 Χρήση των εντομάλευρων στις ιχθυοτροφές

Τα έντομα αποτελούν μια από τις πιο υποσχόμενες πηγές πρωτεΐνης στη βιομηχανία τροφίμων. Η χρήση των εντόμων στη διατροφή των εκτρεφόμενων ιχθύων αναγνωρίζεται από τη νομοθεσία της Ευρωπαϊκής Ένωσης στις 24 Μαΐου 2017 (Ευρωπαϊκός Κανονισμός 893/2017). Σύμφωνα με τη νομοθεσία, επιτρέπεται η χρήση πρωτεϊνών που προέρχονται από επτά είδη εντόμων. Σε αυτά περιλαμβάνονται τα είδη *Hermetia illucens*, *Musca domestica*, *Tenebrio molitor*, *Alphitobius diaperinus*, *Acheta domesticus*, *Grylloides sigillatus* και *Gryllus assimilis* (Gasco et al., 2020).

Τα έντομα μπορούν αναμφισβήτητα να αποτελέσουν μια εναλλακτική για την κάλυψη ενός μέρους των διατροφικών αναγκών των εκτρεφόμενων ψαριών, καθώς η χρήση τους χαρακτηρίζεται από πολλαπλά πλεονεκτήματα. Πρώτα απ' όλα, αρκετά

είδη εντόμων αποτελούν φυσική τροφή για σαρκοφάγα και παμφάγα είδη ψαριών (Hardy, 2015). Επίσης, τα εντομάλευρα χαρακτηρίζονται από υψηλή θρεπτική αξία, καθώς περιέχουν σημαντικά επίπεδα πρωτεϊνών που εκτιμώνται από 50 έως 80% επί της ξηρής ουσίας (Rumpold and Schluter., 2013). Παράλληλα, χαρακτηρίζονται ως μια καλή πηγή λιπιδίων που κυμαίνεται περίπου 10-30% (Gasco, 2020). Όσον αφορά στα πολυακόρεστα ω -3, EPA και DHA, εντοπίζονται σε πολύ χαμηλότερες τιμές συγκριτικά με το ιχθυέλαιο αλλά σε υψηλότερες σε σχέση με το σογιέλαιο. Αντίθετα, τα επίπεδα των ω -6 πολυακόρεστων είναι υψηλότερα απ' ό τι στο ιχθυέλαιο και χαμηλότερα από το σογιέλαιο (Nogales- Merida, 2018).

Ακόμα, διαθέτουν ένα ικανοποιητικό προφίλ απαραίτητων αμινοξέων και με εξαίρεση την ανεπάρκεια σε λυσίνη, ιστιδίνη και θρεονίνη, είναι παρόμοιο με εκείνο των ιχθυάλεωρων (Barroso et al., 2014). Επίσης αξίζει να σημειωθεί ότι τα επίπεδα των απαραίτητων αμινοξέων είναι μεγαλύτερα από το σογιάλευρο (Makkar et al., 2014).

Επίσης, περιέχουν σημαντικές ποσότητες, βιταμινών και μετάλλων κυρίως σιδήρου και ψευδαργύρου (Van Huis, 2013). Ωστόσο, οι ποσότητες των συγκεκριμένων θρεπτικών μεταβάλλονται και ποικίλλουν ανάλογα με τη διατροφή και το στάδιο ανάπτυξης των εντόμων (Nogales- Merida, 2018).

Οι πρωτεΐνες των εντόμων περιέχουν πεπτίδια με αντιμικροβιακές, αντιμυκητιακές και αντικές ιδιότητες που δρουν ενάντια στους παθογόνους μικροοργανισμούς και ενισχύουν το ανοσοποιητικό σύστημα, βελτιώνοντας την υγεία των εκτρεφόμενων οργανισμών (Jozefiak and Engberg, 2017; Stenberg et al., 2019). Χαρακτηριστική είναι η ένταξη του είδους *Musca domestica* στο σιτηρέσιο του είδους *Ragrus major* με άμεσο αποτέλεσμα την ενίσχυση του ανοσοποιητικού και την ανοσία στις ασθένειες (Ido et al., 2015). Παράλληλα, τα πεπτίδια αυτά μπορούν να αυξήσουν τη διάρκεια των τροφών που περιέχουν τα συγκεκριμένα έντομα (Zhao et al., 2010).

Επίσης η χιτίνη, ο πολυσακχαρίτης που αποτελεί το κύριο συστατικό του εξωσκελετού των αρθροπόδων, συμβάλλει στην ενίσχυση της ανοσίας του οργανισμού (Lee et al, 2008), προάγει την ανάπτυξη ωφέλιμων βακτηρίων και αναστέλλει τη δραστηριότητα παθογόνων μικροοργανισμών (Van Huis, 2013). Ωστόσο, η ποσότητα της χιτίνης πρέπει να ελέγχεται καθώς σε μεγάλες ποσότητες μπορούν να προκαλέσει αύξηση βάρους (Sanchez-Muros et al., 2016).

Εκτός από τη θρεπτική τους σύσταση, η εκτροφή των εντόμων φαίνεται να έχει μικρό οικολογικό αποτύπωμα. Πρώτα απ' όλα, δεν απαιτεί αρόσιμες εκτάσεις γης και αυξημένη κατανάλωση νερού (Oonincx and de Boer, 2012). Επιπλέον, συγκριτικά με άλλου είδους εκτροφές, χαμηλότερες φαίνεται να είναι και οι εκπομπές αερίων του θερμοκηπίου (Van Huis and Oonincx, 2017). Ταυτόχρονα, ορισμένα έντομα έχουν τη δυνατότητα μετατροπής οργανικών υπολειμμάτων χαμηλής αξίας, προερχόμενα από υποπροϊόντα της βιομηχανίας ή της γεωργίας, σε προϊόντα υψηλής αξίας συμβάλλοντας στην ενίσχυση της βιώσιμης κυκλικής οικονομίας (Meneguz et al., 2018; Pinotti et al., 2019).

Επιπλέον, ορισμένα είδη εντόμων διαθέτουν μικρότερο συντελεστή μετατρεψιμότητας τροφής (FCR) από άλλα ζώα, γεγονός που υποδηλώνει ότι είναι πολύ πιο αποτελεσματικά στη μετατροπή της τροφής σε σωματική μάζα, καθώς πρόκειται για ποικιλόθερμους οργανισμούς που δεν χρειάζεται να ξοδέψουν μεταβολική ενέργεια για να διατηρήσουν τη θερμοκρασία του σώματος τους (Van Huis, 2013).

Τέλος, ο γρήγορος ρυθμός ανάπτυξης και η υψηλή γονιμότητα, όπως αποδεικνύεται για τα περισσότερα, αποτελούν σημαντικό κριτήριο για τη διερεύνηση των δυνατοτήτων του εντομάλευρου (Mousavi, 2020).

Την τελευταία δεκαετία, αρκετές έρευνες έχουν αποδείξει ότι η μερική υποκατάσταση του ιχθυάλευρου με εντομάλευρου κατέστη επιτυχής για πολλά είδη όπως το λαβράκι (Gasco et al, 2016), την πέστροφα (Cardinalletti et al., 2019; Renna et al., 2017), την τιλάπια (Sánchez et al., 2016) και την τσιπούρα (Piccolo et al., 2017).

1.6 Το έντομο *Zophobas morio*

Το έντομο *Zophobas morio* είναι ένα σκουρόχρωμο σκαθάρι που ανήκει στην τάξη των Κολεόπτερον και στην οικογένεια Tenebrionidae (Roumbos and Athanassiou, 2021). Εντοπίζεται σε αφθονία στις τροπικές περιοχές της Κεντρικής και Νότιας Αμερικής (Hagstrum and Subramanyam, 2009), ωστόσο πλέον έχει εισαχθεί και σε άλλες περιοχές της Ευρώπης και της Ασίας (Yuan et al., 2012; Fursov and Cherney 2018).

Οι προνύμφες του εντόμου οι οποίες διαθέτουν μήκος περίπου 55mm (Friederich and Volland, 2004), εκκολάπτονται μετά από 8 ημέρες και σε θερμοκρασία 25°C (Kim et al, 2015). Οι προνύμφες μετά από μια σειρά ενδιάμεσων σταδίων, μεταμορφώνονται σε νύμφες που στην πορεία μεταμορφώνονται στα ενήλικα άτομα. Η διάρκεια του νυμφικού σταδίου κυμαίνεται από 13-15 ημέρες στους 25°C και εξαρτάται από το βάρος των νυμφών και τη θερμοκρασία (Quenedey et al., 1995).



Εικόνα 1.4. Προνύμφες του είδους *Z.morio* (entomologytoday, 2021)

Για την εκτροφή του είδους, απαιτούνται θερμοκρασίες μεταξύ 25°C και 28°C και μέση σχετική υγρασία 60-70%. Ωστόσο, τα αυξημένα επίπεδα συνωστισμού επιδρούν αρνητικά στα υψηλά επίπεδα ανάπτυξης του είδους ενώ οι κανιβαλιστικές τάσεις που ενδέχεται να υιοθετηθούν, συμβάλλουν στη μείωση της βιομάζας παραγωγής (Zaelor and Kitthawee, 2018) και ενισχύουν τη μετάδοση παθογόνων μεταξύ των εκτρεφόμενων εντόμων (Maciel-Vergara et al., 2018).

Οι πρώτες έρευνες που αφορούν το είδος *Z. morio* χρονολογούνται από τις δεκαετίες 1970s -1980s (Tschinkel and van Belle 1976; Tschinkel, 1981). Ωστόσο, από τότε έχει διεξαχθεί σημαντικός αριθμός ερευνών για το συγκεκριμένο είδος (Kim et al. 2015; Van Broekhoven et al., 2015; Harsányi et al., 2020). Ο αριθμός των ερευνών που αφορούν το είδος έχει αυξηθεί εκθετικά την τελευταία δεκαετία, εστιάζοντας στη θρεπτική αξία του και στη χρήση του στις ζωοτροφές και στις ιχθυοτροφές στα πλαίσια των υδατοκαλλιεργειών (Rumbos and Athanasiou, 2021).

Ποικίλες έρευνες αποδεικνύουν ότι οι προνύμφες του είδους χαρακτηρίζονται από υψηλή θρεπτική αξία (Finke, 2015; Adámková et al., 2016; Araujo et al., 2019) Η θρεπτική σύσταση των προνυμφών απεικονίζεται στον πίνακα 1.1.

Πίνακας. 1.1. Θρεπτική σύσταση των προνυμφών του είδους *Z.morio* (Rumbos and Athanasiou, 2021).

Zophobas morio	
Larvae	
Ξηρά ουσία (% ως τροφή)	35,2-42,1
Ολικό άζωτο (% ξηράς ουσίας)	6,2-8,6
Ολικό λίπος (% ξηράς ουσίας)	35-43,6
Τέφρα (% ξηράς ουσίας)	2,4-8,2
Ενέργεια (kcal/100g ξηράς ουσίας)	559-576

Οι προνύμφες θεωρούνται πλούσια πηγή πρωτεϊνών (46,8% ξηρής ουσίας) (Araujo et al., 2019) και διαθέτουν ένα ικανοποιητικό προφίλ απαραίτητων αμινοξέων με εξαίρεση τη μεθειονίνη το ποσοστό της οποίας είναι ελαφρώς χαμηλότερο από τα απαιτούμενα επίπεδα (Rumbos and Athanasiou., 2021). Επίσης, χαρακτηρίζονται από υψηλή περιεκτικότητα σε λιπίδια που εκτιμάται από 35 μέχρι 43,6%, ποσοστά που υπερβαίνουν άλλα έντομα που θεωρούνται εξίσου θρεπτικές πηγές (Barroso et al., 2014). Μεταξύ των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων, το ω-6 λινολεϊκό οξύ εντοπίζεται σε αφθονία. Ωστόσο, χαρακτηρίζονται από υψηλή περιεκτικότητα κορεσμένων λιπαρών οξέων ενώ από τα μονοακόρεστα το παλμιτικό και το ελαϊκό είναι τα πιο άφθονα. Επιπλέον, έχει αναφερθεί ότι η μη ισορροπημένη αναλογία ω-3/ ω6 θα μπορούσε να οδηγήσει σε εναπόθεση λίπους. Παρόλα αυτά καθίσταται δυνατή η τροποποίηση του προφίλ των λιπαρών οξέων των εντόμων με το χειρισμό του υποστρώματος εκτροφής (Belforti et al., 2016; Gasco et al., 2018). Επιπλέον, αποτελούνται από υψηλά επίπεδα αζώτου που κυμαίνονται από 6,2-8,6. Τέλος, περιέχουν πολλά μέταλλα με εξαίρεση το ιώδιο και βιταμίνες (Finke, 2015).

1.8 Αίμα και κύτταρα του αίματος

Το αίμα είναι το υγρό που κυκλοφορεί στο αγγειακό σύστημα. Με την κυκλοφορία του μέσω της καρδιάς, των αρτηριών, των φλεβών και των τριχοειδών αγγείων εξασφαλίζεται η μεταφορά των θρεπτικών ουσιών, ορμονών βιταμινών

θερμότητας και οξυγόνου στους ιστούς. Επιπλέον, επιτυγχάνεται η απομάκρυνση του διοξειδίου του άνθρακα καθώς και άχρηστων ουσιών που παράγονται κατά το μεταβολισμό. Άλλη μια λειτουργία που επιτελείται μέσω του αίματος είναι η παροχή άμυνας ενάντια στις λοιμώξεις μέσω της δράσης των λευκών αιμοσφαιρίων και των αντισωμάτων (Βερίλης και Μεντέ, 2017). Αποτελεί έναν εξειδικευμένο τύπο κυτταρικού ιστού που διακρίνεται από διάφορους τύπους έμμορφων κυττάρων που συγκατατούνται μέσα σε ένα υγρό μέσο το οποίο ονομάζεται πλάσμα (Rigos et al., 2010).

1.8.1 Ερυθρά αιμοσφαίρια

Τα ερυθρά αιμοσφαίρια αποτελούν την πλειονότητα των κυττάρων του αίματος. Ο αριθμός τους διαφοροποιείται από είδος σε είδος. Ενδεικτικά στην τσιπούρα και το λαβράκι εντοπίζονται σε ποσοστό 96.5% του συνόλου των κυττάρων του αίματος. Ταυτόχρονα, το μέγεθος τους ποικίλει και αυτό ανάλογα με το είδος. Τα ερυθροκύτταρα σχηματίζονται από εμβρυικά κύτταρα, τους ερυθροβλάστες, στο περιφερικό αίμα. Οι ερυθροβλάστες υφίστανται διαδοχικές μιτώσεις και αναπτύσσουν αυξανόμενες ποσότητες αιμοσφαιρίνης δημιουργώντας τελικά πλήρως διαφοροποιημένα ερυθροκύτταρα. Σε ορισμένες περιπτώσεις στα ερυθροκύτταρα ενδέχεται να εντοπιστεί και ένας δεύτερος μικρότερος πυρήνας, ο μικροπυρηνίσκος (Βερίλης και Μεντέ, 2017).

1.8.2 Θρομβοκύτταρα

Τα θρομβοκύτταρα είναι υπεύθυνα για τη θρόμβωση του αίματος και συμβάλλουν στην προστασία από απώλεια υγρών από τους ιστούς κατά τους επιφανειακούς τραυματισμούς. Συμμετέχουν στην άμυνα του οργανισμού των ιχθύων, αντιπροσωπεύοντας έναν σύνδεσμο μεταξύ της φυσικής και της επίκτητης ανοσίας (Bozzo et al, 2007). Λόγω της ταχείας πήξης τους είναι σημαντικό να γίνεται γρήγορη μονιμοποίηση κατά τη δημιουργία επιχρίσματος, διαφορετικά χάνουν το μεγαλύτερο μέρος του κυτταροπλάσματος τους και εμφανίζονται ως μικροί έντονα χρωματισμένοι

πυρήνες με λίγο κυτταρόπλασμα να τους περιβάλλει οδηγώντας έτσι στη σύγχυση τους με τα λεμφοκύτταρα (Βερίλης και Μεντέ, 2017).

1.8.3 Λευκά Αιμοσφαίρια

Ο αριθμός των λευκών αιμοσφαιρίων είναι μια σημαντική παράμετρος για την αξιολόγηση του ανοσοποιητικού συστήματος των ιχθύων και μπορεί να ποικίλλει ανάλογα με το είδος τους, την ηλικία, το φύλο, τη διατροφή και την εποχή (Fazio, 2019). Τα λευκά αιμοσφαίρια διακρίνονται σε κοκκιοκύτταρα και στα μη κοκκιώδη. Στα κοκκιοκύτταρα ανήκουν τα ουδετερόφιλα ή πολυμορφυπήρηνα, τα ηωσινόφιλα και τα βασεόφιλα. Στα μη κοκκιώδη περιλαμβάνονται τα λεμφοκύτταρα και τα μονοκύτταρα (Βερίλης και Μεντέ, 2017).

Τα ουδετερόφιλα, είναι μια κατηγορία πολυμορφυπύρηνων λευκών κυττάρων η προέλευση των οποίων είναι ο αιμοποιητικός ιστός των νεφρών. Μορφολογικά μοιάζουν με αυτά των θηλαστικών αν και ο βαθμός της πυρηνικής πολυμορφίας ποικίλλει σημαντικά καθώς διακρίνονται από 2-5 λοβούς (Βερίλης και Μεντέ, 2017). Τα ουδετερόφιλα ανήκουν στην κατηγορία των φαγοκυττάρων και είναι ικανά να εξαλείψουν παθογόνους μέσω πολλαπλών μηχανισμών. (Witeska, 2022) Γενικά πρόκειται για αμυντικά κύτταρα, σημαντικά για τη διατήρηση της ομοιόστασης. Οι τιμές τους ενδέχεται να ποικίλλουν ανάλογα με τη σύνθεση της διατροφής των ψαριών (Flajnik & Du Pasquier, 2004).

Τα ηωσινόφιλα είναι μια κατηγορία πολυμορφυπύρηνων λευκών αιμοσφαιρίων τα οποία αναπτύσσονται κατά την αιμοποίηση στο μυελό των οστών, πριν μετοικήσουν στο αίμα. Είναι συστατικά του ανοσοποιητικού συστήματος συμβάλλουν στην καταπολέμηση πολυκύτταρων παρασίτων και λοιμώξεων (Witeska, 2022). Είναι πολύ πιθανό να εμπλέκονται σε φλεγμονές και να συμβάλλουν στην φαγοκυτταρική δράση. Μετά από τη χρώση τους με ηωσίνη, η χρώση συγκεντρώνεται σε μικρά κοκκία εντός του κυτταροπλάσματος (Βερίλης και Μεντέ, 2017).

Όσον αφορά τα βασεόφιλα, θεωρούνται σπάνια στα ψάρια και χωρίς καθορισμένη λειτουργία και εμπλοκή σε κάποιο αμυντικό μηχανισμό. Καταλαμβάνουν ένα μικρό πληθυσμό των λευκών αιμοσφαιρίων. Το όνομα τους οφείλεται στο γεγονός

ότι είναι βασεοφιλικά, δηλαδή είναι ευαίσθητα στη χρώση από τις βασικές χρωστικές ουσίες (Βερίλης και Μεντέ, 2017).

Τα λεμφοκύτταρα είναι υπεύθυνα για την ανοσολογική απόκριση και αποτελούν μια σημαντική παράμετρο που συμβάλλει στην παρακολούθηση του ανοσοποιητικού συστήματος του ψαριού (Witeska, 2022). Ο πυρήνας τους καταλαμβάνει το μεγαλύτερο μέρος του κυττάρου αφήνοντας μικρό χώρο για το κυτταρόπλασμα στο οποίο εντοπίζονται λίγα μιτοχόνδρια και απομονωμένα ριβοσώματα. Μορφολογικά, τα περισσότερα μικρά κυκλοφορούντα λεμφοκύτταρα εμφανίζονται ως ανενεργά αδιαφοροποίητα κύτταρα και κυκλοφορούν σε αυτή τη μορφή μέχρι να διεγερθούν για δράση από τα ειδικά αντιγόνα τους (Βερίλης και Μεντέ, 2017).

Τέλος, τα μονοκύτταρα είναι οι πρόδρομες μορφές των μακροφάγων και εντοπίζονται στους ιστούς και στα λεμφικά όργανα. Διακρίνονται από ένα μεγάλο έκκεντρα τοποθετημένο πυρήνα το σχήμα του οποίου ποικίλλει, αν και συνήθως παρατηρείται μια βαθιά εντομή που του προσδίδει σχήμα πεταλοειδές, νεφροειδές ή και δίλοβο (Βερίλης και Μεντέ, 2017).

1.9 Σκοπός της μελέτης

Τα εντομάλευρα αποτελούν μια πολλά υποσχόμενη πρωτεϊνική πηγή που μπορεί να υποκαταστήσει τα ιχθυάλευρα. Οι βιβλιογραφικές πηγές γύρω από τη χρήση τους έχουν αρχίσει και αυξάνονται, ωστόσο αφορούν συγκεκριμένα είδη. Η παρούσα μελέτη αποσκοπεί να ελέγξει την επίδραση που είχε η υποκατάσταση του ιχθυάλευρου με το άλευρο του εντόμου *Z. morio* στους τύπους των λευκών αιμοσφαιρίων της τσιπούρας με σκοπό την αξιολόγηση της επίδρασης του εντομάλευρου στην υγεία των ιχθύων. Συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκε η καταμέτρηση των λευκών αιμοσφαιρίων, λεμφοκυττάρων, ουδετερόφιλων, ηωσινόφιλων και μονοκυττάρων από άτομα που διατράφηκαν με σιτηρέσια όπου το ιχθυάλευρο υποκαταστάθηκε σταδιακά από απολιπασμένο άλευρο κατά 10% (ZLF10), 20% (ZLF20) και 30% (ZLF30) και από πλήρες σε λίπος άλευρο κατά 5% (ZFF5) και 10% (ZFF10) αντίστοιχα.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

2.1 Δειγματοληψία ιχθύων

Για τους σκοπούς της συγκεκριμένης πειραματικής διεργασίας, πραγματοποιήθηκε η συλλογή ιχθυδίων τσιπούρας, *Sparus aurata* που διέθεταν μέσο τελικό βάρος ίσο με 43-45gr. Τα συγκεκριμένα ιχθύδια προήλθαν από διατροφικό πείραμα εκτροφής που διήρκεσε 100 ημέρες και έλαβε χώρα στο τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογία και Υδάτινου Περιβάλλοντος του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Τα ιχθύδια διακρίθηκαν σε έξι διατροφικές ομάδες με την κάθε μια να διατρέφεται με ένα διαφορετικό σιτηρέσιο. Ειδικότερα, καταρτίστηκαν 6 ισοαζωτούχα (56,5% ξηράς ουσίας) και ισοενεργειακά (22MJ/Kg ξηρής ουσίας) σιτηρέσια, σύμφωνα με τις θρεπτικές απαιτήσεις των ιχθυδίων τσιπούρας, για τη μελέτη της σταδιακής αντικατάστασης του ιχθυαλεύρου από το είδος *Zophobas morio*. Η πρώτη ομάδα, σιτίστηκε με την ιχθυοτροφή ελέγχου (Control) που δεν είχε ενσωματωμένη πρωτεΐνη προερχόμενη από το *Z. morio*, αλλά μόνο ιχθυάλευρο ως μοναδική πηγή ζωικής πρωτεΐνης και ιχθυέλαιο ως αποκλειστική πηγή ω-3 πολυακόρεστων λιπαρών οξέων. Στο σιτηρέσιο ελέγχου, το ιχθυάλευρο εκτιμήθηκε 61,86% ενώ το επίπεδο του ιχθυέλαιου 7,47% επί της τροφής. Οι άλλες διατροφικές ομάδες σιτίστηκαν με ιχθυοτροφές, που η πρωτεΐνη του ιχθυαλεύρου της τροφής ελέγχου, αντικαταστάθηκε από πλήρες σε λίπος εντομάλευρο του *Z. morio* κατά 5% και 10% (ZFF5 και ZFF10) αντίστοιχα και από απολιπασμένο άλευρο του εντόμου κατά 10%, 20% και 30% (ZLF10, ZLF20, ZLF30).

Στην παρούσα πειραματική μελέτη, αφού παρέμειναν σε ασιτία για 24 ώρες, συλλέχθηκαν 54 ιχθύδια συνολικά, 9 από την κάθε διατροφική ομάδα (3 από την κάθε δεξαμενή) και κατόπιν θανατώθηκαν με ισχυρή δόση αναισθητικού (>4 mg/l φαινοξυαιθανόλη) ακολουθώντας τις κοινοτικές οδηγίες (2010/63/EU) που αφορούν την προστασία ζώων που χρησιμοποιούνται για πειραματικές διαδικασίες.

2.2 Αιμοληψία

Για τη λήψη αίματος (Εικ. 2.1) πραγματοποιήθηκε παρακέντηση στην ουραία φλέβα με κοιλιακή προσέγγιση. Τα ιχθύδια είχαν ήδη αναισθητοποιηθεί με φαινολοξαιθανόλη 0,2ml/lit. Οι σύριγγες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν των 2,5ml. Σε κάθε αιμοληψία λαμβάνονταν 2ml αίμα από κάθε ιχθύ με μέσο βάρος 43-45gr.

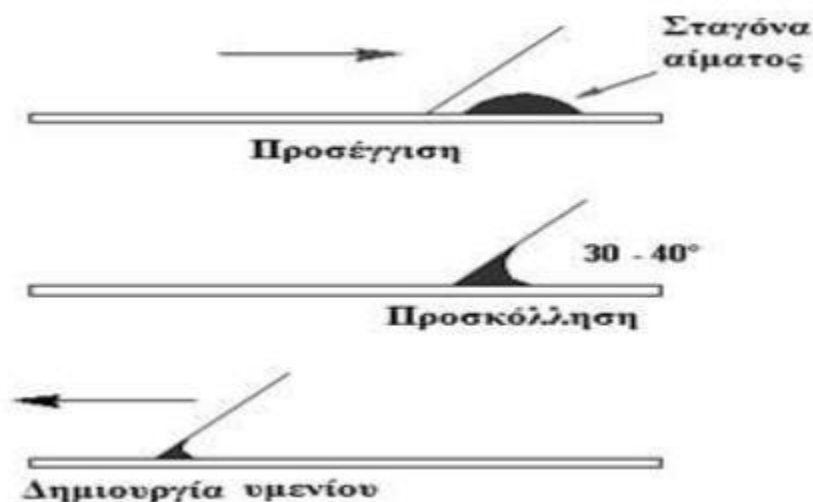
Για τη διαδικασία της αιμοληψίας, οι ιχθύες τοποθετήθηκαν με την κοιλιακή πλευρά προς τα πάνω σε μια σταθερή επιφάνεια. Κρίθηκε σημαντικό, να εισέλθει η βελόνα με γωνία 45° κάτω από την περιοχή των λεπιών τα οποία ανασηκώθηκαν ελαφρά. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε η προώθηση της βελόνας διαμέσου της σπονδυλικής στήλης μέχρι να προκληθεί η αίσθηση αντίστασης εξαιτίας της επαφής με το σπόνδυλο. Τέλος, επετεύχθη η αναρρόφηση της απαιτούμενης ποσότητας αίματος μέσω της σύριγγας. Το έμβολο της βελόνας σύρθηκε με αργές και σταθερές κινήσεις προς τα έξω, προκειμένου να επιτρέψει την είσοδο του αίματος και όχι να προκαλέσει αρνητική πίεση. Είναι σημαντικό να αναφερθεί, ότι η αναρρόφηση έπρεπε να γίνει αργά αποσκοπώντας στην αποφυγή ρήξης των αγγείων, καθώς τα ψάρια διαθέτουν αίμα χαμηλής πίεσης (Black, 2000). Στις βελόνες αιμοληψίας, προστέθηκε η αντιπηκτική ουσία, ηπαρίνη με σκοπό να αποτρέψει την πήξη του αίματος των ψαριών, καθώς ήταν πιθανό να πήξει σε χρόνο ίσο με 20-30sec.



Εικόνα 2.1. Λήψη αίματος από τσιπούρα

2.3 Παρασκευή επιχρισμάτων περιφερικού αίματος

Για την παρασκευή επιχρισμάτων αίματος (Εικ. 2.2), πραγματοποιήθηκε η επίστρωση μιας μικρής σταγόνας αίματος σε μια αντικειμενοφόρο πλάκα, αφού προηγήθηκε ο καθαρισμός της με απορρυπαντικό και οινόπνευμα. Ήταν σημαντικό να δοθεί προσοχή στο μέγεθος της σταγόνας αίματος καθώς όσο πιο μικρή είναι τόσο μικρότερο και λεπτότερο προέκυψε το επίχρισμα. Αντιθέτως, από τις μεγάλες σταγόνες προέκυπτε ένα μακρύ ή παχύ επίχρισμα. Για την επίστρωση, το πλακίδιο με το οποίο επετεύχθη η επίστρωση διατηρήθηκε σταθερά στη σταγόνα αίματος σε μια γωνία 30-45° μοιρών προς το πλακίδιο επίστρωσης. Το πλακίδιο με το οποίο έγινε η επίστρωση ώθησε τη σταγόνα προς τα πίσω, μέσα στην ίδια σταγόνα και διατηρήθηκε στη συγκεκριμένη θέση μέχρι να γίνει η διασπορά του αίματος κατά μήκος του πλακιδίου. Έτσι, ωθήθηκε απαλά και γρήγορα προς το πέρασ του πλακιδίου επίστρωσης και δημιουργήθηκε το επίχρισμα. Δόθηκε προσοχή ώστε να επιστρώνεται ολόκληρη η σταγόνα του αίματος (Βερίλης και Μεντέ, 2017).



Εικόνα 2.2. Επίστρωση αίματος σε αντικειμενοφόρο πλάκα (Βερίλης και Μεντέ, 2017)

Στη συνέχεια, τα επιχρίσματα αφέθηκαν να στεγνώσουν σε θερμοκρασία δωματίου και ακολούθησε η μονιμοποίηση τους με μεθανόλη για 5 περίπου λεπτά. Τέλος, τα επιχρίσματα βάφθηκαν με τις κατάλληλες χρωστικές. Για τη συγκεκριμένη ερευνητική διαδικασία, δημιουργήθηκαν συνολικά 54 πλάκες επιχρισματος αίματος,

μια για την κάθε τσιπούρα. Βέβαια, για κάποια ψάρια, δημιουργήθηκαν 2 επιχρίσματα αίματος.

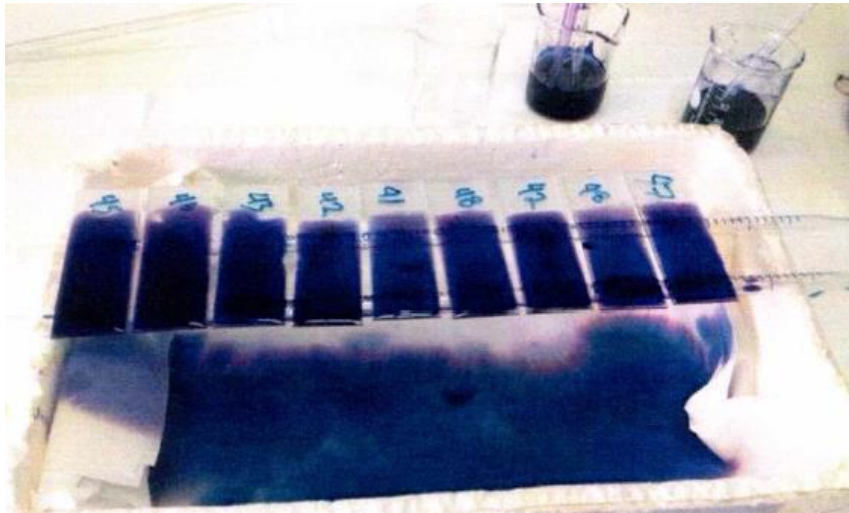
2.4 Πρωτόκολλο Χρώσεων

Μετά την παρασκευή επιχρισμάτων αίματος ακολούθησε η χρώση τους. Για τη χρώση και κατ' επέκταση την αναγνώριση των κυττάρων του αίματος χρησιμοποιήθηκε ο συνδυασμός δύο χρώσεων, της χρώσης May-Grünwald και της χρώσης Giemsa.

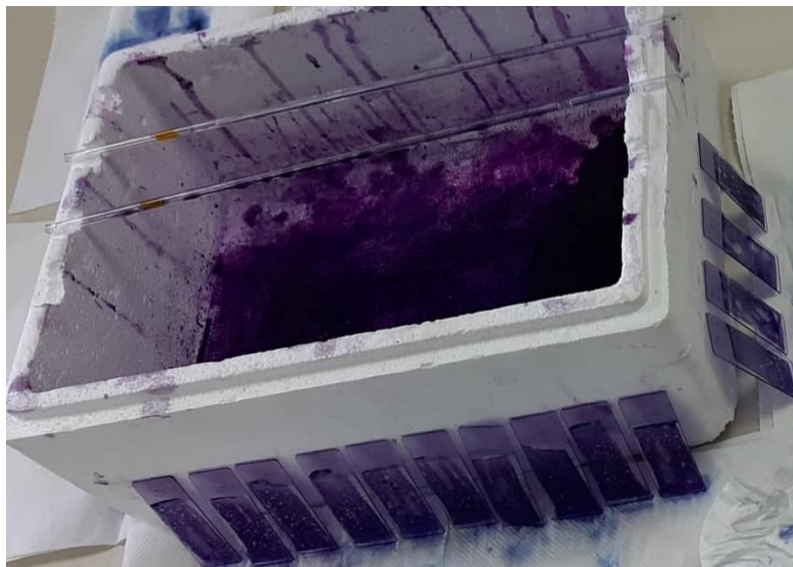
Το πρωτόκολλο των συγκεκριμένων χρώσεων, αφορά συνήθως στα επιχρίσματα αίματος και μυελού των οστών όπως και στα στείρα βιολογικά υλικά (συμπεριλαμβανομένων του περικαρδιακού υγρού, του πλευριτικού υγρού και του αρθρικού υγρού) με σκοπό τη διευκόλυνση διάκρισης των τύπων των λευκών αιμοσφαιρίων. Πρόκειται για μια πανοπτική χρώση αφού βάφει όλα τα συστατικά των κυττάρων. Συνεπώς, το κυτταρόπλασμα και οι πυρινίσκοι βάφονται κόκκινο, το RNA μπλε, το DNA και τα πρωτογενή κοκκία μωβ ενώ η αιμογλοβίνη και τα ηωσινοφιλικά κοκκία βάφονται με πορτοκαλί και κόκκινο χρώμα (Χατζηιωάννου και Γκολομάζου, 2014).

Για την προετοιμασία του διαλύματος May-Grünwald, πραγματοποιήθηκε αραιώση σε δοχείο 25ml χρώσης May-Grünwald, με 25ml απιονισμένο νερό. Αντίστοιχα, για την προετοιμασία του διαλύματος Giemsa, έγινε αραιώση με 45ml απιονισμένο νερό σε δοχείο 5 ml χρώσης Giemsa (αναλογία 1/9).

Στη συνέχεια, προκειμένου να εφαρμοστούν οι χρώσεις, τοποθετήθηκαν οι αντικειμενοφόρες πλάκες με το επίχρισμα αίματος σε στατώ αραιά τοποθετημένα μεταξύ τους και ακολούθησε η κάλυψη των παρασκευασμάτων πρώτα με το διάλυμα της May-Grünwald, με τη βοήθεια πιπέτας των 5ml. Μετά από 30min αναμονής, ακολούθησε η ίδια ακριβώς διαδικασία με το διάλυμα της Giemsa (Eik. 2.3). Αφού ολοκληρώθηκαν τα 30 min, ακολούθησε το πλύσιμο των πλακών με απιονισμένο νερό και η τοποθέτηση τους σε όρθια θέση προκειμένου να στεγνώσουν (Eικ. 2.4). Μετά από 24 ώρες περίπου αφού οι πλάκες στέγνωσαν, τοποθετήθηκαν οι καλυπτρίδες με τη χρήση ειδικής κόλλας.



Εικόνα 2.3. Εισαγωγή χρώσεων σε επιχρίσματα (προσωπικό αρχείο συγγραφέα)

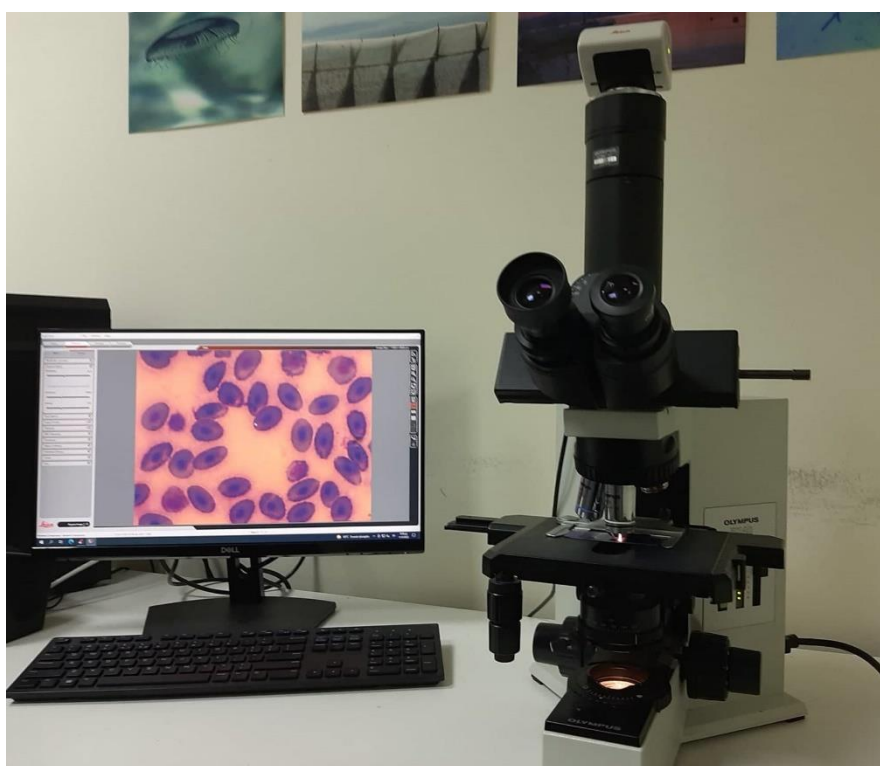


Εικόνα 2.4. Δείγματα που αφήνονται να στεγνώσουν (Προσωπικό αρχείο συγγραφέα)

2.5 Παρατήρηση και καταγραφή δεδομένων

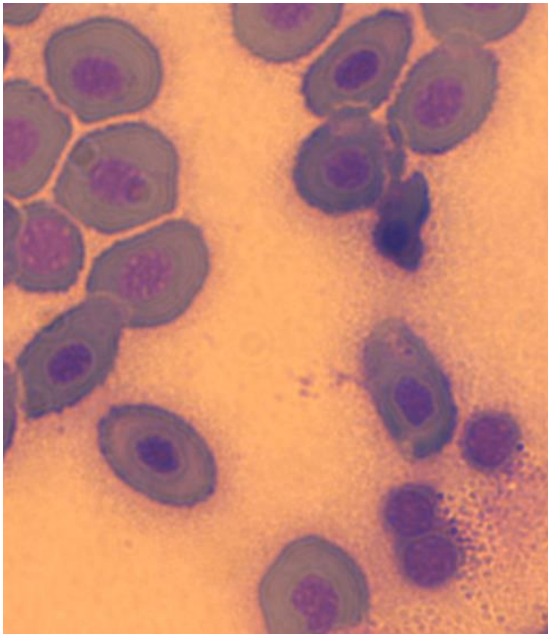
Στη συνέχεια, τα ιστολογικά παρασκευάσματα του αίματος, παρατηρήθηκαν στο οπτικό μικροσκόπιο ώστε να επιτευχθεί η καταμέτρηση των κυττάρων του αίματος και η διάκριση των τύπων των λευκών αιμοσφαιρίων. Αφού τοποθετήθηκε μια σταγόνα ελαίου πάνω στα παρασκευάσματα ακολούθησε η παρατήρησή τους.

Για τη συγκεκριμένη πειραματική διαδικασία, χρησιμοποιήθηκαν το μικροσκόπιο ZEISS HBO 50/AC και το πρόγραμμα κάμερας ProGres Capture Pro 2.1 με σκοπό να ληφθούν στιγμιότυπα των δειγμάτων (Εικ. 2.5).

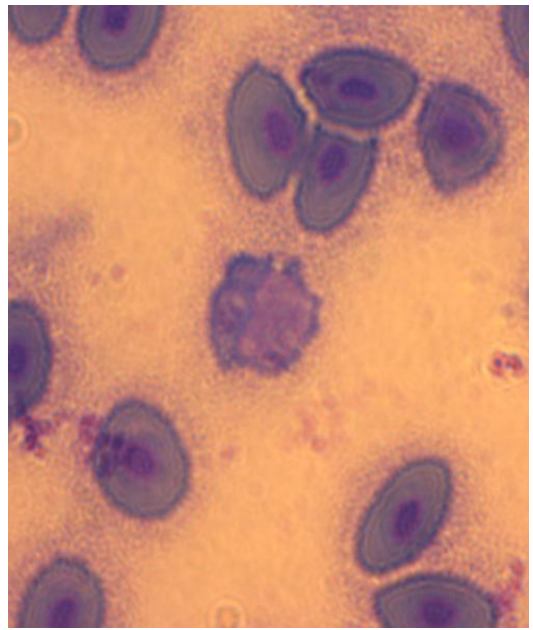


Εικόνα 2.5. Απεικόνιση δειγμάτων σε οπτικό μικροσκόπιο(προσωπικό αρχείο συγγραφέα)

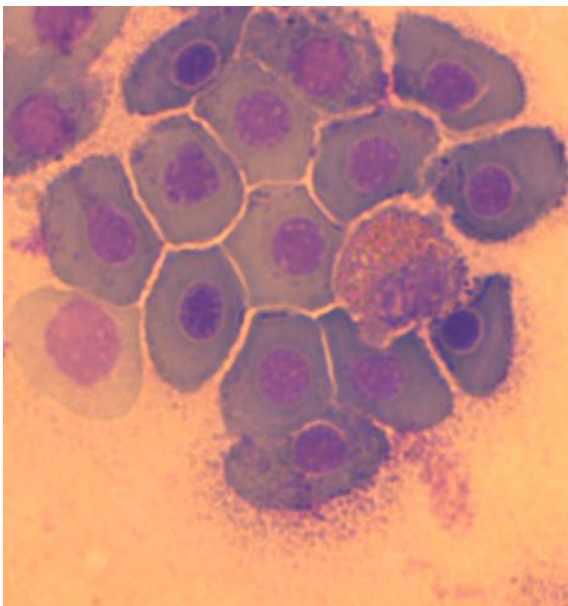
Για την παρατήρηση των κυττάρων χρησιμοποιήθηκε ο καταδυτικός φακός 100x/1,25 επειδή διευκόλυνε τη διάκριση των λευκών αιμοσφαιρίων. Στη συνέχεια, έγινε η επιλογή τυχαίων περιοχών των δειγμάτων για να ληφθούν στιγμιότυπα, με σκοπό την καταμέτρηση των κυττάρων. Για κάθε δείγμα, πραγματοποιήθηκε η αναγνώριση και η καταμέτρηση των 100 πρώτων λευκών κυττάρων που παρατηρήθηκαν, τα οποία και εντάχθηκαν στις κατηγορίες των λεμφοκυττάρων (Εικ. 2.6), των ουδετερόφιλων (Εικ. 2.7), των ηωσινόφιλων (Εικ. 2.8) και των μονοκυττάρων (Εικ. 2.9).



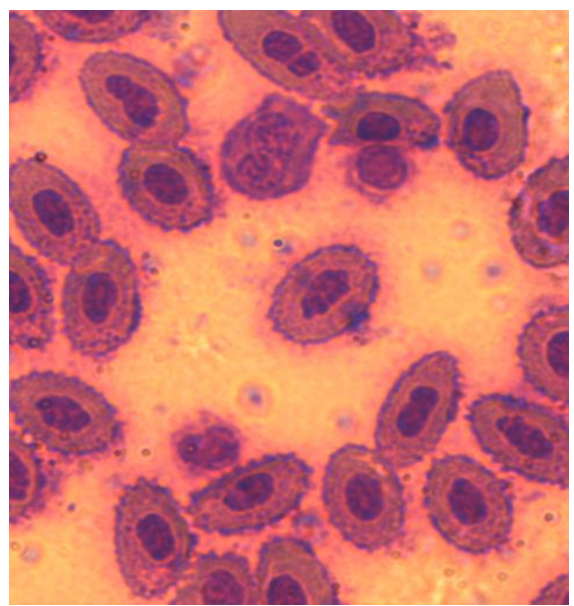
Εικόνα 2.6. Λεμφοκύτταρα



Εικόνα 2.7. Ουδετερόφιλο



Εικόνα 2.8. Ηωσινόφιλο



Εικόνα 2.9. Μονοκύτταρο

2.6. Στατιστική Ανάλυση

Για την παρουσίαση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε το υπολογιστικό πρόγραμμα Microsoft Excel, στο οποίο δημιουργήθηκαν πίνακες με τον αριθμό των κυττάρων από τον κάθε τύπο λευκών αιμοσφαιρίων, για την κάθε διατροφική ομάδα. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων μέσω του προγράμματος IBM SPSS Statistics 25. Η επεξεργασία των δεδομένων ως προς την κανονικότητα της κατανομής επετεύχθη μέσω του Shapiro- Wilk test ενώ για τον έλεγχο της ομοιομορφίας της παραλλακτικότητας των τιμών μέσου όρου των λευκοκυττάρων χρησιμοποιήθηκε το Levene's test. Στη συνέχεια, ακολούθησε η σύγκριση των τιμών μέσου όρου των λευκοκυττάρων του κάθε τύπου, μέσω της μεθόδου της Ανάλυσης της Διασποράς μίας Κατεύθυνσης (one-way ANOVA) και όπου $p < 0,05$ απεδείχθη ότι υπήρχε σημαντικά στατιστική διαφορά. Στις περιπτώσεις που προέκυψαν στατιστικά σημαντικές διαφορές, τα δεδομένα ελέγχθηκαν με το Tukey's test με σκοπό την εύρεση των διαφορών ανάμεσα στις διαφορετικές διατροφικές ομάδες.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Στο παρόν κεφάλαιο, παρατίθενται τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τις αιματολογικές αναλύσεις των διαφορετικών ομάδων των ιχθύων που διατράφηκαν με τα πειραματικά σιτηρέσια.

Η μικροσκοπική εξέταση των επιχρισμάτων αίματος απέδειξε την παρουσία λεμφοκυττάρων, μονοκυττάρων ουδετερόφιλων και ηωσινόφιλων στο αίμα της τσιπούρας.

Όπως απεικονίζεται στον πίνακα 3.1, το ποσοστό των λεμφοκυττάρων υπερτερεί σε αριθμό σε όλους τους ιχθύες συγκριτικά με τους υπόλοιπους τύπους λευκών αιμοσφαιρίων. Ο αμέσως επόμενος τύπος κυττάρων ως προς την αφθονία είναι τα ουδετερόφιλα, ακολουθούν τα ηωσινόφιλα και τέλος τα μονοκύτταρα.

Όπως παρατηρείται, ελαφρώς μεγαλύτερο είναι το ποσοστό των λεμφοκυττάρων που εντοπίστηκε στα άτομα που διατράφηκαν αποκλειστικά με ιχθυάλευρο (FM). Με την υποκατάσταση του ιχθυάλευρου με άλευρο του εντόμου *Z. morio*, είτε πλήρους λίπους είτε απολιπασμένου, μειώθηκε το ποσοστό των λεμφοκυττάρων χωρίς ωστόσο να παρατηρούνται μεγάλες διαφορές. Συγκεκριμένα, ο μέσος όρος των λεμφοκυττάρων των ατόμων που διατράφηκαν με FM προκύπτει ίσο με 69.93%. Στις ομάδες που σιτίστηκαν με ZLF10, ZLF20 και ZLF30 προκύπτει μέσος όρος ίσο με 61.07%, 56.73% και 58.85% αντίστοιχα. Στα άτομα που σιτίστηκαν με πλήρους λίπους εντομάλευρο, τα λεμφοκύτταρα κυμαίνονται σε παρόμοιο επίπεδο.

Τα ουδετερόφιλα των ατόμων που διατράφηκαν με το σιτηρέσιο-ελέγχου, έχουν μέσο όρο ίσο με 26.4%. Στα σιτηρέσια που πραγματοποιήθηκε υποκατάσταση του ιχθυάλευρου με το άλευρο του είδους *Zophobas morio* ο μέσος όρος των ουδετερόφιλων παρατηρείται ελαφρώς αυξημένος κυρίως στην ομάδα που διατράφηκε με ZLF20.

Οι τιμές του μέσου όρου των ηωσινόφιλων, δεν παρουσιάζουν ουσιαστικές αποκλίσεις μεταξύ των ατόμων που διατράφηκαν με τα διαφορετικά πειραματικά σιτηρέσια. Μικρή αύξηση παρουσιάζεται στους ιχθύες που σιτίστηκαν με ZFF5 με μέσο όρο 3.87%.

Τέλος, ο μέσος όρος των μονοκύτταρων κυμαίνεται σε ανάλογα επίπεδα και δεν υπερβαίνει το 1% σε καμία από τις ομάδες ιχθύων που διατράφηκαν με τα πειραματικά σιτηρέσια. Μάλιστα στους ιχθύες που σιτίστηκαν με ZLF20 δεν εντοπίστηκαν μονοκύτταρα.

Πίνακας 3.1. Τύποι λευκών αιμοσφαιρίων σε τσιπούρες που διατράφηκαν με τα πειραματικά σιτηρέσια.

	ZLF10	ZLF20	ZLF30	ZFF5	ZFF10	FM
Λεμφοκύτταρα(%)	61.07±5.54	56.73±4.93	58.86±2.34	62.47±2.89	61.87±5.48	69.93±2.94
Ουδετερόφιλα (%)	35±5.72 ^{ab}	41.47±6.62 ^b	38.27±2.81 ^{ab}	33.3±2.11 ^{ab}	34.87±5.34 ^{ab}	26.4±2.5 ^a
Ηωσινόφιλα(%)	3.3±0.35	2.47±0.18	2.33±0.53	3.87±1.07	2.4±0.2	2.93±0.55
Μονοκύτταρα (%)	0.6±0.2 ^{ab}	0 ^a	0.53±0.13 ^{ab}	0.33±0.07 ^{ab}	1±0.12 ^b	0.73±0.24 ^{ab}

Σημείωση: Οι τιμές που δεν αντιπροσωπεύονται από τον ίδιο εκθέτη εμφανίζουν στατιστικά σημαντική διαφορά ($P < 0,05$) ανάμεσα στις διατροφικές ομάδες.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Οι αιματολογικές παράμετροι είναι ιδιαίτερα σημαντικές για την παρακολούθηση της κατάστασης της υγείας και των φυσιολογικών αντιδράσεων των οργανισμών στις περιβαλλοντικές αλλαγές (Mousavi et al., 2020).

Η αιματολογική ανάλυση αποτελεί ένα φθινό και ιδιαίτερα χρήσιμο εργαλείο που αξιοποιείται ολοένα και περισσότερο λόγω της ραγδαίας ανάπτυξης του κλάδου των υδατοκαλλιεργειών. Στην αιματολογική ανάλυση περιλαμβάνονται η αξιολόγηση του αριθμού των κυττάρων του αίματος, καθώς και οι μετρήσεις των βιοχημικών δεικτών. Στις αιματολογικές παραμέτρους περιλαμβάνεται ο αριθμός των ερυθροκυττάρων (RBC), η συγκέντρωση της αιμοσφαιρίνης (Hb), η τιμή του αιματοκρίτη, ο μέσος όγκος ερυθρών (MCV), η μέση σωματιδιακή αιμοσφαιρίνη (MCH) και μέση σωματιδιακή συγκέντρωση αιμοσφαιρίνης (MCHC). Επίσης περιλαμβάνεται ο αριθμός των λευκοκυττάρων (WBC) και η αξιολόγηση του αριθμού των τύπων των λευκών αιμοσφαιρίων. Ο αριθμός των θρομβοκυττάρων (TC) και η μορφολογία των κυττάρων του αίματος αξιολογούνται σπάνια. Η ανάλυση αίματος περιλαμβάνει μετρήσεις βιοχημικών παραμέτρων στο αίμα, το πλάσμα ή τον ορό: όπως το επίπεδο γλυκόζης και πρωτεΐνης, το προφίλ χοληστερόλης, τις συγκεντρώσεις ιόντων, μεταβολιτών ή ορμονών, τις δραστηριότητες ενζύμων και άλλες παραμέτρους. Είναι σημαντικό το γεγονός ότι οι αιματολογικοί και βιοχημικοί δείκτες παρέχουν εκτενείς πληροφορίες σχετικά με την ικανότητα μεταφοράς οξυγόνου των ψαριών, το ανοσοποιητικό δυναμικό, το επίπεδο στρες, τις ασθένειες, τη διατροφική κατάσταση κ.λπ. (Witeska, 2022).

Ο υπολογισμός των λευκών αιμοσφαιρίων αποτελεί ένα δείκτη για την εκτίμηση της ανοσολογικής κατάστασης των ιχθύων (Lugowska et al., 2017). Μάλιστα, οι μεγάλες διαφοροποιήσεις στις τιμές τους εξασφαλίζουν πληροφορίες για την κατάσταση της υγείας των ψαριών και μπορούν να καταστούν χρήσιμα για την αξιολόγηση του ανοσοποιητικού συστήματος. Επιπλέον, η αναλογία των ουδετερόφιλων προς τα λεμφοκύτταρα μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως δείκτης μιας δευτερογενούς απόκρισης στρες (Shahjahan et al., 2020), καθώς οι τιμές των ουδετερόφιλων και των λεμφοκυττάρων μπορούν να επηρεαστούν σημαντικά από τα επίπεδα στρες. Ο αριθμός των λευκοκυττάρων ενδέχεται να μεταβληθεί και να

εξαρτηθεί από πιθανές μολύνσεις, από την ηλικία των ψαριών, τα χαρακτηριστικά του είδους ή τις διατροφικές διαφορές. (Romano et al., 2017)

Οι αιματολογικές τιμές, επηρεάζονται από πολλούς ενδογενείς και εξωγενείς παράγοντες. Εξαρτώνται από το επίπεδο στρες στα ψάρια (Carbajal et al., 2019), τη μέθοδο δειγματοληψίας αίματος (Bojarski et al., 2018a), τις εργαστηριακές τεχνικές (Sharma et al., 2017) τη χρήση αντιπηκτικών (Walencik and Witeska, 2007), τη θερμοκρασία και το χρόνο αποθήκευσης του αίματος (Faggio et al., 2013; Witeska et al., 2017a). Επίσης, μεταβολές στις αιματολογικές τιμές μπορεί να οφείλονται στην ποιότητα του νερού (Fazio et al., 2012a), το pH, την αλατότητα, το διαλυμένο οξυγόνο, την ηλικία, το φύλο, το μήκος, το βάρος και τις εποχιακές διακυμάνσεις (Corrêa et al., 2017). Επιπλέον, εξαρτώνται από την αναπαραγωγική ωριμότητα (Fazio et al. 2016). Τέλος ενδέχεται να επηρεαστούν από τη διατροφική κατάσταση. Είναι σημαντικό το γεγονός ότι, μερικοί αιματολογικοί παράμετροι όντας πολύ ευαίσθητοι στις περιβαλλοντικές αλλαγές, παρέχουν πληροφορίες για τις φυσιολογικές διαταραχές, πριν την ανάπτυξη των εξωτερικών συμπτωμάτων τους (Witeska, 2022).

Λαμβάνοντας υπόψιν ότι η διατροφή μπορεί να επηρεάσει την υγεία των ψαριών, είναι σημαντικό το γεγονός ότι, οι αιματολογικοί δείκτες θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για την αναγνώριση πιθανών διατροφικών επιπτώσεων στην υγεία των υδρόβιων ζώων. (Dawood et al., 2019) Επίσης οι μεταβολές στις αιματολογικές παραμέτρους που στηρίζονται στη σίτιση παρέχουν μια αξιόπιστη ένδειξη της κατάστασης της υγείας των ψαριών. (Acar, 2020) Σε περίπτωση ύπαρξης διατροφικών ελλείψεων, οι αιματολογικές παράμετροι θα επηρεαστούν αρνητικά προκαλώντας αναιμία και ανοσοκαταστολή (Kondera et al., 2016).

Σήμερα, λόγω της εξάντλησης των ιχθυαποθεμάτων και της εκτόξευσης των τιμών των ιχθυαλεύρων, κρίνεται επιτακτική ανάγκη η αντικατάστασή τους με πιο οικονομικές και βιώσιμες λύσεις. Έτσι, η επιστημονική κοινότητα έχει στραφεί σε εναλλακτικές διατροφικές πηγές, ζωικής ή φυτικής προέλευσης. Μάλιστα, καθώς πρόκειται για νέες πηγές, έχει εστιάσει την προσοχή όχι μόνο στη θρεπτική τους αξία αλλά και στην επίδραση τους στην ανάπτυξη και στην υγεία των ψαριών. Καθίσταται ιδιαίτερα σημαντική η αξιολόγηση της κατάστασης υγείας, προκειμένου να αποδειχθεί αν είναι κατάλληλες ή αν επιβαρύνουν τον οργανισμό των εκτρεφόμενων ειδών. Η εκτίμηση των τιμών των κυττάρων του αίματος αποτελεί ένα αξιόπιστο διαγνωστικό

εργαλείο που μπορεί να αξιοποιηθεί με σκοπό την παρακολούθηση της υγείας των ιχθύων ως απόκριση στις αλλαγές που σχετίζονται με τη διατροφή (Witeska, 2022).

Στην παρούσα μελέτη, εκτιμάται η επίδραση της προσθήκης του άλευρου *Z. morio* στους τύπους των λευκών κυττάρων της τσιπούρας. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της έρευνας, δεν παρατηρούνται ιδιαίτερα σημαντικές διαφορές στον αριθμό των διάφορων κυτταρικών τύπων των λευκών αιμοσφαιρίων ανάμεσα στα σιτηρέσια. Οι τιμές των λεμφοκυττάρων, των ατόμων που διατράφηκαν με άλευρο του είδους *Z. morio*, δεν έχουν μεγάλη απόκλιση από τις φυσιολογικές τιμές των λεμφοκυττάρων της τσιπούρας. Οι φυσιολογικές τιμές κυμαίνονται συνήθως από 40-65% (Ashri et al., 2021; Khosravi et al., 2021; Karapanagiotidis et al., 2018; Psoufakis et al., 2020) και οι τιμές των λεμφοκυττάρων των ατόμων που διατράφηκαν με τα πειραματικά σιτηρέσια εντοπίζονται σε αυτό το εύρος. Όσον αφορά τον τύπο των ουδετερόφιλων, συνήθως οι τιμές τους κυμαίνονται 30-35% (Khosravi et al., 2021). Στην παρούσα έρευνα, μονάχα το ποσοστό των ουδετερόφιλων στα άτομα που διατράφηκαν με ZLF20 και ZLF30, παρατηρείται ελαφρώς αυξημένο αλλά χωρίς να υπάρχει μεγάλη απόκλιση. Όσον αφορά στα ηωσινόφιλα κύτταρα, το εύρος των φυσιολογικών τιμών τους, σύμφωνα με τους Ashri et al. (2021) και τους Khosravi et al. (2021) κυμαίνεται από 0.80%- 3%. Στην προκειμένη περίπτωση, οι τιμές ανταποκρίνονται στο συγκεκριμένο εύρος με εξαίρεση το ποσοστό των ηωσινόφιλων της ομάδας που διατράφηκε με ZFF5 που είναι ελαφρώς αυξημένο, χωρίς όμως να αποκλίνει ιδιαίτερα. Τέλος, οι φυσιολογικές τιμές των μονοκυττάρων του είδους *Sparus aurata* έχουν βρεθεί να κυμαίνονται από 0.8% έως και 5% (Ashri et al., 2021; Karapanagiotidis et al., 2018; Psoufakis et al., 2020). Στην παρούσα έρευνα, οι τιμές των μονοκύτταρων είναι ελαφρώς χαμηλότερες από το εύρος των φυσιολογικών τιμών. Μάλιστα, στην ομάδα που διατράφηκε με ZFL20 δεν βρέθηκαν μονοκύτταρα. Ο αριθμός των μονοκυττάρων, δικαιολογείται καθώς πρόκειται για τον μικρότερο σε αφθονία τύπο των λευκών αιμοσφαιρίων. Σε γενικές γραμμές μάλιστα, στα ψάρια αποτελούν περίπου το 0,1% του κυκλοφορόντος αριθμού λευκοκυττάρων (Βερίλης και Μεντέ, 2017).

Γενικά, δεν υπάρχει βιβλιογραφία που να θίγει την επίδραση του είδους *Zorhobas morio* στα αιματολογικά κύτταρα της τσιπούρας, ωστόσο έχουν διεξαχθεί μελέτες που θίγουν τις επιδράσεις των εντομάλευρων σε άλλα είδη ιχθύων.

Την τελευταία δεκαετία πρόσφατες έρευνες που έχουν πραγματοποιηθεί, υποδηλώνουν ότι η υποκατάσταση του ιχθυάλευρου με άλευρα προερχόμενα από διαφορετικά είδη εντόμων δεν προκαλεί αρνητικές επιδράσεις στις αιματολογικές παραμέτρους των εκτρεφόμενων ιχθύων.

Αρχικά, με την προσθήκη του άλευρου *Zophobas morio* στο σιτηρέσιο τιλάπιας, αυξήθηκε ο αριθμός των λευκών αιμοσφαιρίων. Γενικά, η αύξηση του αριθμού των λευκοκυττάρων οφείλεται σε λοιμώξεις και πρόκειται για μία από τις κύριες γραμμές άμυνας του οργανισμού. Έτσι, αποδεικνύεται ότι το *Z. morio* προσδίδει ανοσολογικές ιδιότητες. Στην ίδια έρευνα, παρατηρήθηκαν υψηλότερες τιμές ουδετερόφιλων στους ιχθύες που διατρέφονταν με το σιτηρέσιο που το ιχθυάλευρο αντικαταστάθηκε κατά 30% από το άλευρο *Z. morio*. Το αποτέλεσμα αυτό ενδέχεται να σχετίζεται με την αυξημένη ικανότητα των ψαριών που διατράφηκαν με το συγκεκριμένο σιτηρέσιο, να κινητοποιήσουν τα κυκλοφορούντα λευκά αιμοσφαίρια πιο γρήγορα από τα ψάρια που διατρέφονται με το σιτηρέσιο ελέγχου, για την καταπολέμηση μολύνσεων (Priscila, 2019). Στην έρευνα μας, επιβεβαιώνεται το συγκεκριμένο αποτέλεσμα καθώς, στα σιτηρέσια ZFLM20 και ZFLM30 οι τιμές των ουδετερόφιλων παρατηρήθηκαν λίγο πιο αυξημένες σε σχέση με τα υπόλοιπα πειραματικά σιτηρέσια, αν και δεν επιβεβαιώθηκε στατιστικά.

Παράλληλα, υπήρξαν και άλλες μελέτες στις οποίες παρατηρήθηκε αύξηση του αριθμού των λευκών αιμοσφαιρίων στο αφρικανικό γατόψαρο (*Clarias gariepinus*) που διατρεφόταν με άλευρο του είδους *Gryllus bimaculatus* και του είδους *Drosophila melanogaster* αντίστοιχα (Taufek et al., 2018; Okore et al., 2018).

Σε έρευνα που αφορούσε το εκτρεφόμενο λαβράκι (*Dicentrarchus labrax*), οι Abdel-Tawwab et al. (2020) διαπίστωσαν ότι δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορετικές στον αριθμό των λεμφοκυττάρων, των μονοκυττάρων και των ουδετερόφιλων σε ψάρια που διατρέφονταν με σιτηρέσια που είχε υποκατασταθεί το ιχθυάλευρο με εντομάλευρο *Hermetia illucens* κατά 25%, 35% και 50%, σε σύγκριση με τους ιχθύες που τρέφονταν αποκλειστικά με ιχθυάλευρο (Abdel-Tawwab et al., 2020). Ταυτόχρονα, στην έρευνα των Tirpayadara et al. (2021) απεδείχθη ότι η μερική υποκατάσταση του ιχθυάλευρου με άλευρο του είδους *Hermetia illucens* σε ποσοστά 10%, 20%, 40%, 60%, 80%, και 100% δεν επηρέασε τα ερυθρά αιμοσφαίρια, τα λεμφοκύτταρα, τα ουδετερόφιλα και τα μονοκύτταρα.

Επιπλέον, οι Amer et al. (2021) απέδειξαν ότι οι αιματολογικές παράμετροι και οι βιοχημικοί δείκτες δεν μεταβλήθηκαν με τη συμπερίληψη του *Spodoptera littoralis* σε δίαιτες τιλάπιας. Τα ερυθρά κύτταρα, τα λεμφοκύτταρα, τα ουδετερόφιλα, τα μονοκύτταρα, τα ηωσινόφιλα και τα βασεόφιλα δεν εμφάνισαν σημαντικές αλλαγές ως προς τις τιμές τους, μεταξύ των ψαριών που διατρέφονταν με διαφορετικά επίπεδα SLM και εντοπίστηκαν στο εύρος των φυσιολογικών τιμών κυττάρων.

Επίσης, αποδείχθηκε ότι η συμπερίληψη του εντομάλευρου *Musca domestica* σε υψηλό επίπεδο (30 – 45%) ενίσχυσε τον συνολικό αριθμό των λευκών αιμοσφαιρίων στο είδος *Clarias gariepinus*. Η αύξηση των λευκών αιμοσφαιρίων θα οδηγήσει σε ενίσχυση της ανοσίας και αντοχή σε ασθένειες σε ψάρια και ζώα (Okpara et al., 2016).

Σύμφωνα με τους Nurin et al. (2018), η διατροφική συμπερίληψη εκχυλίσματος του είδους *Hermetia illusens*, θα μπορούσε να ενεργοποιήσει τις αιματολογικές παραμέτρους ανοσολογικής αντίδρασης σε άτομα κυπρίνου (*C. carpio*) που μολύνθηκαν από το είδος *A. hydrophila*. Σε ποσοστό 8% θα μπορούσε να συμβάλλει στην αύξηση του συνολικού αριθμού αίματος ($1,95 \times 10^5$ κύτταρα/ml) και των τιμών των λευκοκυττάρων (81,55%, 16,42% και 0,33% για τα λεμφοκύτταρα, τα μονοκύτταρα και τα ουδετερόφιλα αντίστοιχα) σε σύγκριση με τις ομάδες ελέγχου. Αποδεικνύεται ότι το συγκεκριμένο είδος ενισχύει το ανοσοποιητικό σύστημα του κυπρίνου συμβάλλοντας στην πρόληψη ασθενειών.

Επίσης, δεδομένου της ύπαρξης χιτίνης στα έντομα, διαπιστώθηκε ότι η ενσωμάτωση 1% χιτίνης και χιτοζάνης σε διατροφικό σιτηρέσιο ενίσχυσε σημαντικά τις αιματολογικές παραμέτρους, τα ερυθρά αιμοσφαίρια, τα λεμφοκύτταρα, μονοκύτταρα και τα ουδετερόφιλα στο είδος *Epinephelus bruneus* και αύξησε την ανθεκτικότητα στη νόσο κατά του πρωτόζωου παράσιτου, *Philasterides dicentrarchi* (Harikrishnan et al., 2012). Έτσι, αποδεικνύονται οι ευεργετικές ιδιότητες της χιτίνης στις αιματολογικές παραμέτρους.

Ωστόσο, με την υποκατάσταση ιχθυάλευρου με εντομάλευρο που προέρχεται από τον μεταξοσκώληκα *Bombyx mori*, στα σιτηρέσια πέστροφας (*Onchorhynchus mykiss*), παρατηρήθηκε ότι οι τιμές των ερυθρών αιμοσφαιρίων και της αιμοσφαιρίνης μειώθηκαν σημαντικά με την αύξηση του ποσοστού του εντομάλευρου στη διατροφή, ενώ οι τιμές των λευκών αιμοσφαιρίων αυξήθηκαν. Τα αποτελέσματά της έρευνας,

έδειξαν ότι η ενσωμάτωση του συγκεκριμένου είδους στη διατροφή μπορεί να επηρεάσει την κατάσταση της υγείας της ιριδιζουσας πέστροφας (Shakoori, 2014).

Γενικότερα, από τις περισσότερες έρευνες που προηγήθηκαν και εστίασαν σε εκτρεφόμενα είδη, διαπιστώθηκε ότι η χρήση αλεύρου που προέρχεται είτε από το *Z. morio* είτε από άλλα έντομα δεν επιφέρει αρνητικές επιπτώσεις στο αιματολογικό προφίλ των ψαριών (Tippayadara et al., 2021; Amer et al., 2021; Abdel-Tawwab et al., 2020). Μάλιστα, είναι αξιοσημείωτο το γεγονός ότι σε αρκετές περιπτώσεις, η χρήση του αλεύρου εντόμων οδηγεί σε αύξηση των λευκών αιμοσφαιρίων, γεγονός που υποδεικνύει την ενίσχυση της ανοσίας και της ανθεκτικότητας σε ασθένειες (Okore et al., 2016; Harikrishnan et al., 2012). Συνεπώς η ενσωμάτωση αρκετών εντόμων στη διατροφή των ιχθύων, επιφέρει ευεργετικές ιδιότητες στο αιματολογικό προφίλ τους και δεν επιβαρύνει το ανοσοποιητικό τους σύστημα. Για άλλη μια φορά αποδεικνύεται ότι τα εντομάλευρα μπορούν να καταστούν οι νέες βιώσιμες λύσεις που θα συμβάλλουν στον αποτελεσματικό περιορισμό των ιχθυαλεύρων.

Σύμφωνα με την παρούσα έρευνα, αποδεικνύεται ότι η μερική υποκατάσταση του ιχθυαλεύρου με απολιπασμένο ή πλήρους λίπους άλευρο του είδους *Zophobas morio* δεν προκαλεί σημαντικές μεταβολές στις τιμές των τύπων των λευκών αιμοσφαιρίων συγκριτικά με τα άτομα που διατράφηκαν αποκλειστικά με ιχθυάλευρο. Συνεπώς, δεν επηρεάζει αρνητικά τις αιματολογικές παραμέτρους, δεν καθίσταται επιβλαβές για το ανοσοποιητικό σύστημα και την υγεία των εκτρεφόμενων ατόμων τσιπούρας. Το εντομάλευρο *Z. morio* αποτελεί μια πολλά υποσχόμενη πηγή υποκατάστασης των ιχθυαλεύρων τόσο της θρεπτικής αξίας του όσο και του μικρού οικολογικού αποτυπώματος του. Έχει αποδειχτεί για την τσιπούρα ότι είτε πλήρες σε λίπος είτε απολιπασμένο, μπορεί να αντικαταστήσει το ιχθυάλευρο έως και 30% χωρίς να επιβραδύνει την ανάπτυξη των ψαριών (Asimaki et al., 2020). Ωστόσο, επειδή οι μελέτες για την επίδραση του συγκεκριμένου είδους στην υγεία των εκτρεφόμενων ψαριών είναι περιορισμένες, το αντικείμενο χρήζει περαιτέρω μελέτης και μακροχρόνιας έρευνας. Δεδομένου της αποτελεσματικότητας των εντομάλευρων ως διατροφική πηγή, καθίσταται επιτακτική ανάγκη να επικεντρωθεί η προσοχή της επιστημονικής κοινότητας στην αξιολόγηση της επίδρασης τους στην κατάσταση της υγείας των εκτρεφόμενων ειδών.

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Βερίλης Π., Μεντέ Ε. (2017) Ιστοφυσιολογία ιχθύων και καρκινοειδών. Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Θεσσαλίας, Βόλος, σελ:173-183

Βουλτσιάδου Ε., Αμπατζόπουλος Θ.Ι., Αντωνοπούλου Ε., Γκάνιας Κ., Γκέλης Σ., Στάικου Α., Τριανταφυλλίδης Α. (2015) Υδατοκαλλιέργειες. Οργανισμοί, συστήματα παραγωγής, προοπτικές. ΑΠΘ Τμήμα Βιολογίας.

Κανονισμός (ΕΕ) 2017/893 της επιτροπής της 24ης Μαΐου 2017 για την τροποποίηση των παραρτημάτων I και IV του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 999/2001 του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου και των παραρτημάτων X, XIV και XV του κανονισμού (ΕΕ) αριθ. 142/2011 της Επιτροπής όσον αφορά τις διατάξεις για τη μεταποιημένη ζωική πρωτεΐνη.

Καραπαναγιωτίδης, Ι. (2018). Τεχνολογία Ιχθυοτροφών. Παραδόσεις του μαθήματος. Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας & Υδάτινου Περιβάλλοντος, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, σελ. 50.

Κλαουδάτος, Σ., Κλαουδάτος, Δ. (2012). Καλλιέργειες φυτικών και εκτροφές υδρόβιων ζωικών οργανισμών. Εκδόσεις Προπομπός, Αθήνα, σελ. 478.

Μεντέ, Ε., Νέγκας, Ι. (2014) Στοιχεία Φυσιολογίας Θρέψης και Εφαρμοσμένη Διατροφή Ιχθύων και Καρκινοειδών. Εκδόσεις Παπαζήση, σελ. 384.

Νεοφύτου Χ.Ν, (2015). ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΙΧΘΥΩΝ & ΘΑΛΑΣΣΙΩΝ ΘΗΛΑΣΤΙΚΩΝ, UNIVERSITY STUDIO PRESS, Θεσσαλονίκη.

ΣΕΘ,(2020).Ετήσια έκθεση ελληνική υδατοκαλλιέργεια 2020, σελ.6.

Χατζιωάννου Μ., Γκολομάζου., Ε.(2013) Ιστολογική μελέτη περιφερικού αίματος υδρόβιων σπονδυλόζωων. Εργαστηριακές Ασκήσεις Ιστολογίας. Κεφάλαιο 4, σελ. 44.

Χώτος Γ., Ρογδάκης Ι. (2010) Λαβράκι και Τσιπούρα. Τεχνικές αναπαραγωγής και πάχυνσης. σελ. 39-50, 95-107, 255-331.

ΞΕΝΟΓΛΩΣΣΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Acar, Ü., Giannetto, A., Giannetto, D., Kesbiç, O. S., Yılmaz, S., Romano, A., Tezel, R., Türker, A., Güllü, K., & Fazio, F. (2021). Evaluation of an innovative and sustainable pre-commercial compound as replacement of fish meal in diets for rainbow trout during pre-fattening phase: Effects on growth performances, haematological parameters and fillet quality traits. *Animals*, 11(12).

Abdel-Tawwab, M., Khalil, R. H., Metwally, A. A., Shakweer, M. S., Khallaf, M. A., & Abdel-Latif, H. M. R. (2020). Effects of black soldier fly (*Hermetia illucens* L.) larvae meal on growth performance, organs-somatic indices, body composition, and hemato-biochemical variables of European sea bass, *Dicentrarchus labrax*. *Aquaculture*, 522.

Adámková, A., J. Mlček, L. Kouřimská, M. Borkovcová, T. Bušina, M. Adámek, and J. Krajsa. (2017). Nutritional potential of selected insect species reared on the island of Sumatra. *Journal Environment Research Public Health*, 14: 521.

Amer, A. A., El-Nabawy, E. S. M., Gouda, A. H., & Dawood, M. A. O. (2021). The addition of insect meal from *Spodoptera littoralis* in the diets of Nile tilapia and its effect on growth rates, digestive enzyme activity and health status. *Aquaculture Research*, 52: 5585–5594.

Ashry, A. M., Hassan, A. M., Habiba, M. M., El-Zayat, A., El-Sharnouby, M. E., Sewilam, H., & Dawood, M. A. O. (2021). The impact of dietary curcumin on the growth performance, intestinal antibacterial capacity, and haemato-biochemical parameters of gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Animals*, 11(6).

Asimaki, A., P. Psoufakis, G. Ekonomou, E. Mente, C. I. Rumbos, C. G. Athanassiou, E. Fountoulaki, M. Henry, and I. T. Karapanagiotidis. (2020). Evaluation of *Zophobas morio* larvae meal as fishmeal replacer for gilthead seabream diet. *In* *Insects to Feed the World 2020 Virtual Conference*, 23–26 November 2020.

Araújo, dos Santos Benfica, V. P. Ferraz, and E. M. Santos. (2019). Nutritional composition of insects *Gryllus assimilis* and *Zophobas morio*: potential foods harvested in Brazil. *Journal of Food Composition and Analysis*, 76: 22–26.

Barroso, F. G., de Haro, C., Sánchez-Muros, M. J., Venegas, E., Martínez-Sánchez, A., & Pérez-Bañón, C. (2014). The potential of various insect species for use as food for fish. *Aquaculture*, 422–423, 193–201.

Bell & Wagboo. (2008). CHAPTER 6. Safe and nutritious aquaculture produce: benefits and risks of Alternative sustainable aquafeeds. In: “Aquaculture in the Ecosystem” (Holmer et al., eds), Springer Netherlands, pp. 185-225.

Belforti, M., Gai, F., Lussiana, C., Renna, M., Malfatto, V., Rotolo, L., & Gasco, L. (2016). *Tenebrio molitor* Meal in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) diets: effects on animal performance, nutrient digestibility and chemical composition of fillets. *Italian Journal of Animal Science*, 14(4).

Black M. (2000). Blood collection. In: Ostrander G. (eds) *The laboratory fish*. Academic Press, London, p:513-516

Bojarski, B., Lutnicka, H., Swad'zba-Karbowy, M., Makulska, J., Jakubiak, M., Pawlak, K., Witeska, M.(2018b). Effects of herbicides pendimethalin and ethofumesate on common carp (*Cyprinus carpio*) erythrocyte morphology. *Folia Biol.* 66: 143–149.

Brown, R. (2004). Genetic Management And Selective Breeding In Farmed Populations Of Gilthead Seabream (*Sparus Aurata*). Ph.D. Thesis, University of Stirling.

Carbajal, A., Soler, P., Tallo-Parra, O., Isasa, M., Echevarria, C., Lopez-Bejar, M., Vinyoles, D. (2019). Towards non-invasive methods in measuring fish welfare: the measurement of cortisol concentrations in fish skin mucus as a biomarker of habitat quality. *Animals* 9: 939.

Cardinaletti, G., Randazzo, B., Messina, M., Zarantoniello, M., Giorgini, E., Zimbelli, A., Bruni, L., Parisi, G., Olivotto, I., Tulli, F. (2019). Effects of graded dietary inclusion level of full-fat *Hermetia illucens* prepupae meal in practical diets for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Animals*, 9, 251.

Corrêa S.A., Abessa D.M., Santos L.G., Silva E.B., Seriani R. (2017). Differential blood counting in fish as a non-destructive biomarker of water contamination exposure. *Toxicological and Environmental Chemistry*, 99:482-491.

Dawood, A. Eweedah, N. (2019). Evaluation of fermented date palm seed meal with *Aspergillus oryzae* on the growth, digestion capacity and immune response of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture Nutrition*.

FAO (1998). *Fishery statistics: Capture production*, Vol. 82. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome.

FAO (2015). *Cultured Aquatic Species Information Programme. Sparus aurata*. In: Colloca, F., Cerasi, S. (Eds.), *Fisheries and Aquaculture Department*, Rome.

FAO (2018). *The State of World Fisheries and Aquaculture 2018 - Meeting the Sustainable Development Goals*. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome.

Fazio F., Marafioti S., Arfuso F., Piccione G., Faggio C. (2013) Influence of different salinity on haematological and biochemical parameters of the widely cultured mullet, *Mugil cephalus*. *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology*, 46:211-218.

Fazio, F., Marafioti, S., Filiciotto, F., Buscaino, G., Panzera, M., & Faggio, C. (2013). Blood hemogram profiles of farmed onshore and offshore gilthead sea bream (*Sparus aurata*) from Sicily, Italy. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 13: 415–422.

Fazio, F. (2019). Fish hematology analysis as an important tool of aquaculture: A review. In *Aquaculture*, 500: 237–242.

Finke, M. D. (2015). Complete nutrient content of four species of commercially available feeder insects fed enhanced diets during growth. *Zoo Biology*, 34:554–564.

Flajnik, Martin., Pasquier L. (2004). Evolution of innate and adaptive immunity: can we draw a line. *Trends Immunology*, 12 :640-4.

Friederich, U., and W. Volland. (2004). *Breeding food animals: live food for vivarium animals*. Krieger publishing company, Malabar, FL, 178 p.

Fuentes-Quesada, J. P., Cornejo-Granados, F., Mata-Sotres, J. A., Ochoa-Romo, J. P., Rombenso, A. N., Guerrero-Rentería, Y., Lazo, J. P., Pohlenz, C., Ochoa-Leyva, A., & Viana, M. T. (2020). Prebiotic agavin in juvenile totoaba, *Totoaba macdonaldi* diets, to relieve soybean meal-induced enteritis: Growth performance, gut histology and microbiota. *Aquaculture Nutrition*, 26: 2115–2134.

Fursov, V. N., and L. S. Cherney. (2018). *Zophobas atratus* (Fabricius, 1775)— New genus and species of darkling beetles (Coleoptera, Tenebrionidae) for the fauna of Ukraine. *Ukrainian Entomological Journal*. 1: 10–24.

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 Technology* 220, 34–45.

Gasco, L., Acuti, G., Bani, P., Dalle Zotte, A., Danieli, P. P., de Angelis, A., Fortina, R., Marino, R., Parisi, G., Piccolo, G., Pinotti, L., Prandini, A., Schiavone, A., Terova, G., Tulli, F., & Roncarati, A. (2020). Insect and fish by-products as sustainable alternatives to conventional animal proteins in animal nutrition. In *Italian Journal of Animal Science*, 19: 360–372.

Gasco, L.; Gai, F.; Maricchiolo, G.; Genovese, L.; Ragonese, S.; Bottari, T.; Caruso, G. (2018). Fishmeal alternative protein sources for aquaculture feeds. In *Feeds for the Aquaculture Sector*, pp. 1–28.

Glencross, B.D.; Baily, J.; Berntssen, M.H.G.; Hardy, R.; MacKenzie, S.; Tocher, D.R. (2020) Risk assessment of the use of alternative animal and plant raw material resources in aquaculture feeds. *Reviews in Aquaculture*, 12: 703–758.

Hagstrum, D. W., and B. Subramanyam. (2009). *Stored-product insect resource*. AACC International Inc., St. Paul, MN.

Hardy R.W. (2010). REVIEW ARTICLE: Utilization of plant proteins in fish diets: effects of global demand and supplies of fishmeal. *Aquaculture Research* ,41: 770-776.

Harikrishnan, R., Kim, J. S., Balasundaram, C., & Heo, M. S. (2012). Dietary supplementation with chitin and chitosan on haematology and innate immune response in *Epinephelus bruneus* against *Philasterides dicentrarchi*. *Experimental Parasitology*, 131: 116–124.

Harsányi, E., C. Juhász, E. Kovács, L. Huzsvai, R. Pintur, G. Fekete, Z. I. Varga, L. Aleksza, and C. Gyuricza. 2020. Evaluation of organic wastes as substrates for rearing *Zophobas morio*, *Tenebrio molitor*, and *Acheta domesticus* larvae as alternative feed supplements. *Insects*, 11: 604.

Henry, M., Gasco, L., Piccolo, G. and 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.

Huntington T., Frid C., Banks R., Scott C. and Paramor O. (2004). Assessment of the sustainability of industrial fisheries producing fishmeal and fish oil. *Poseidon Aquatic Resource Management Ltd.*, pp. 62.

Hong, M. Y., Lumibao, J., Mistry, P., Saleh, R., & Hoh, E. (2015). Fish oil contaminated with persistent organic pollutants reduces antioxidant capacity and induces oxidative stress without affecting its capacity to lower lipid concentrations and systemic inflammation in rats. *Journal of Nutrition*, 145: 939–944.

Hua, K.; Cobcroft, J.M.; Cole, A.; Condon, K.; Jerry, D.R.; Mangott, A.; Praeger, C.; Vucko, M.J.; Zeng, C.; Zenger, K.; et al. (2019). The future of aquatic protein: Implications for protein sources in aquaculture diets. *One Earth* 1, 316–329.

Ido, A., Iwai, T., Ito, K., Ohta, T., Mizushige, T., Kishida, T., Miura, C., & Miura, T. (2015). Dietary effects of housefly (*Musca domestica*) (Diptera: Muscidae) pupae on the growth performance and the resistance against bacterial pathogen in red sea bream (*Pagrus major*) (Perciformes: Sparidae). *Applied Entomology and Zoology*, 50: 213–221.

Jabir MDAR, Razak SA, Vikineswary S. (2011). Effects of amino acid supplementation in super worm based diets on growth performance and feed utilization of juvenile Nile tilapia. *Int Fish Symposium 2011*: 72-75.

Jabir MDAR, Razak SA, Vikineswary S. (2012b). Nutritive potential and utilization of super worm (*Zophobas morio*) meal in the diet of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) juvenile. *African Journal of Biotechnology*, 11: 6592-6598.

Jozefiak A, Engberg RM .(2017). Insect proteins as a potential source of antimicrobial peptides in livestock production. A review. *Journal of Animal and Feed Sciences*, 26: 1–12.

Karapanagiotidis, I. T., Psfakis, P., Mente, E., Malandrakis, E., & Golomazou, E. (2019). Effect of fishmeal replacement by poultry by-product meal on growth performance, proximate composition, digestive enzyme activity, haematological parameters and gene expression of gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Aquaculture Nutrition*, 25(1), 3–14.

Karapanagiotidis, I. (2014). The Re-Authorization of Non-Ruminant Processed Animal Proteins in European Aqua feeds. *Fisheries and Aquaculture Journal*, 5:4.

Kim, S. Y., H. G. Kim, S. H. Song, and N. J. Kim. (2015). Developmental characteristics of *Zophobas atratus* (Coleoptera: Tenebrionidae) larvae in different instars. *International Journal of Industrial. Entomology*, 30: 45–49.

Khosravi - Katuli, K., Mohammadi, Y., Ranjbaran, M., Ghanaatian, H., Khazaali, A., Paknejad, H., & Santander, J. (2021). Effects of mannan oligosaccharide and synbiotic supplementation on growth performance and immune response of Gilthead Sea Bream (*Sparus aurata*) before and after thermal stress. *Aquaculture Research*, 52(8).

Kondera, E., Kościuszko, A., Dmowska, A., & Witeska, M. (2017). Haematological and haematopoietic effects of feeding different diets and starvation in common carp *Cyprinus carpio* L. *Journal of Applied Animal Research*, 45: 623–628.

Lee CG, Silva CAD, Lee J-Y, Hartl D, Elias JA. (2008). Chitin regulation of immune responses: an old molecule with new roles. *Curr. Opin. Immunology*, 20:684–89.

Lugowska, K., Kondera, E., Witeska, M. (2017). Leukocyte count in fish – possible sources of discrepancy. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathology* 37: 94–99.

Lulijwa R., Alfara A., Merien F., Meyer J., Young T. (2019). Advances in salmonid fish immunology: A review of methods and techniques for lymphoid tissue and peripheral blood leucocyte isolation and application. *Fish and Shellfish Immunology*, 95:44-80.

Maciel-Vergara, G., A. B. Jensen, and J. Eilenberg. (2018). Cannibalism as a possible entry route for opportunistic pathogenic bacteria to insect hosts, exemplified by *Pseudomonas aeruginosa*, a pathogen of the giant mealworm *Zophobas morio*. *Insects*, 9: 88.

Makkar, H. P. S., Tran, G., Heuzé, V., & Ankers, P. (2014). State-of-the-art on use of insects as animal feed. In *Animal Feed Science and Technology*, 197: 1–33.

Mauel M., Miller D., Merrill A. (2007). Hematologic and plasma biochemical values of healthy hybrid Tilapia (*Oreochromis aureus* x *Oreochromis nilotica*) maintained in a recirculating system. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 38:420-424

Meneguz, M., Schiavone, A., Gai, F., Dama, A., Lussiana, C., Renna, M., & Gasco, L. (2018). Effect of rearing substrate on growth performance, waste reduction efficiency

and chemical composition of black soldier fly (*Hermetia illucens*) larvae. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 98: 5776–5784.

Mousavi, S., Zahedinezhad, S., & Loh, J. Y. (2020). A review on insect meals in aquaculture: The immunomodulatory and physiological effects. In *International Aquatic Research*, 12: 100–115.

Mousavi, S., Zahedinezhad, S., & Loh, J. Y. (2020). A review on insect meals in aquaculture: The immunomodulatory and physiological effects. In *International Aquatic Research*, 12: 100–115.

Mozes N., Papadroulakis N., Vergara J.M. et al. (2011). Production systems. In: Pavlidis M. & C. Mylonas (eds). *Sparidae: biology and aquaculture of gilthead sea bream and other species*. Blackwell Publishing Ltd, Oxford, UK, 170-198.

Nogales-Mérida, S., Gobbi, P., Józefiak, D., Mazurkiewicz, J., Dudek, K., Rawski, M., Kierończyk, B., & Józefiak, A. (2019). Insect meals in fish nutrition. In *Reviews in Aquaculture*, 11: 1080–1103.

Nurin FN, Maftuch, Yanuhar U. (2018). Larvae of *Hermetia illucens* promotes the immunocompetence of haematology and muscle histopathology of common carp (*Cyprinus carpio*) challenged with *Aeromonas hydrophila*. *International Journal of Scientific and Technology Research* Volume, 7: 126-131.

Oonincx, D.G.A.B., de Boer, I.J.M. (2012). Environmental Impact of the Production of Mealworms as a Protein Source for Humans - A Life Cycle Assessment. *PloS One* 7.

Okore OO, Ekedo CM, Ubiaru PC, Uzodinma K. (2016) Growth and haematological studies of African catfish (*Clarias gariepinus*) juveniles fed with housefly larva (*Musca domestica*) as feed supplement. *International Journal of Agriculture and Earth Science*, 2(3): 21-30

Psafakis, P., Karapanagiotidis, I. T., Malandrakis, E. E., Golomazou, E., Exadactylos, A., & Mente, E. (2020). Effect of fishmeal replacement by hydrolyzed feather meal on

growth performance, proximate composition, digestive enzyme activity, haematological parameters and growth-related gene expression of gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Aquaculture*, 521.

Priscila., A. (2019). Effects of dietary *Zophobas morio* larvae meal on the growth performance and innate immune response of Nile Tilapia juveniles (*Oreochromis Niloticus*).

Quenedey, A., N. Aribi, C. Everaerts, and J. -P. Delbecque. (1995). Postembryonic development of *Zophobas atratus* Fab. (Coleoptera: Tenebrionidae) under crowded or isolated conditions and effects of juvenile hormone analogue applications. *Journal Insect Physiology*, 41: 143–152.

Ravi, C., Jeyashree, A., Renuka Devi, K. (2011). Antimicrobial Peptides from Insects: An Overview. *Research Biotechnology*, 2: 1-7.

Renna, M., Schiavone, A., Gai, F., Dabbou, S., Lussiana, C., Malfatto, V., Prearo, M., Capucchio, M.T., Biasato, I., Biasibetti, E. (2017) Evaluation of the suitability of a partially defatted black soldier fly (*Hermetia illucens* L.) larvae meal as ingredient for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) diets. *Journal Animal Science Biotechnology*, 8, 57.

Rigos, G., & Katharios, P. (2010). Pathological obstacles of newly-introduced fish species in Mediterranean mariculture: A review. In *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 20: 47–70.

Romano, N., Scapigliati, G., Abelli, L. (2017). Water oxygen content affects distribution of T and B lymphocytes in lymphoid tissues of farmed sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Fishes* 2: 16.

Rumbos, C. I., & Athanassiou, C. G. (2021). The superworm, *zophobas morio* (Coleoptera:Tenebrionidae): A ‘sleeping giant’ in nutrient sources. *Journal of Insect Science*, 21(2).

Rumbos, C. I., Mente, E., Karapanagiotidis, I. T., Vlontzos, G., & Athanassiou, C. G. (2021). Insect-based feed ingredients for aquaculture: A case study for their acceptance in Greece. *Insects*, 12.

Rumpold, B. A., & Schlüter, O. K. (2013). Potential and challenges of insects as an innovative source for food and feed production. In *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 17: 1–11.

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

Shahjahan, M., Sabia Khatun, M., Mostarin Mun, M., Majharul Islam, S.M., Uddin, M.H., Badruzzaman, M., Khan, S. (2020). Nuclear and cellular abnormalities of erythrocytes in response to thermal stress in common carp *Cyprinus carpio*. *Front. Physiol.* 543.

Shepherd, C.J.; Jackson, A.J. (2013). Global fish meal and fish-oil supply: Inputs, outputs and markets. *J. Fish Biol.*, 83, 1046–1066.

Soares Araújo, R. R., dos Santos Benfica, T. A. R., Ferraz, V. P., & Moreira Santos, E. (2019). Nutritional composition of insects *Gryllus assimilis* and *Zophobas morio*: Potential foods harvested in Brazil. *Journal of Food Composition and Analysis*, 76: 22–26.

Sola L. (2006). Gilthead seabream-*Sparus aurata*. Biology, ecology and genetics. Genimpact final scientific report, pp. 46-51.

Stenberg, O. K., Holen, E., Piemontese, L., Liland, N. S., Lock, E. J., Espe, M., & Belghit, I. (2019). Effect of dietary replacement of fish meal with insect meal on in vitro bacterial and viral induced gene response in Atlantic salmon (*Salmo salar*) head kidney leukocytes. *Fish and Shellfish Immunology*, 91, 223–232.

Van Broekhoven, S., D. G. Oonincx, A. van Huis, and J. J. van Loon. (2015). Growth performance and feed conversion efficiency of three edible mealworm species

(Coleoptera: Tenebrionidae) on diets composed of organic by-products. *Journal Insect Physiology* 73: 1–10.

Van Huis, A., Oonincx, D. (2017). The environmental sustainability of insects as food and feed. A review. *Agronomy for Sustainable Development*, 37, 43.

Van Huis, A. (2013). Potential of insects as food and feed in assuring food security. In *Annual Review of Entomology*, 58:563–583.

Payne, C. L. R., Scarborough, P., Rayner, M., & Nonaka, K. (2016). A systematic review of nutrient composition data available for twelve commercially available edible insects, and comparison with reference values. *Trends in Food Science and Technology*, 47:69–77.

Piccolo, G.; Iaconisi, V.; Marono, S.; Gasco, L.; Loponte, R.; Nizza, S.; Bovera, F.; Parisi, G. (2017). Effect of *Tenebrio molitor* larvae meal on growth performance, in vivo nutrients digestibility, somatic and marketable indexes of gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Animal Feed Science Technology*: 226, 12–20.

Pinotti, L., Giromini, C., Ottoboni, M., Tretola, M., & Marchis, D. (2019). Review: Insects and former foodstuffs for upgrading food waste biomasses/streams to feed ingredients for farm animals. *Animal*, 13: 1365–1375.

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

Tschinkel, W.R., and G. van Belle. (1976). Dispersal of larvae of the tenebrionid beetle, *Zophobas rugipes*, in relation to weight and crowding. *Ecology*, 57: 161–168.

Tschinkel, W. R. (1981). Larval dispersal and cannibalism in a natural population of *Zophobus atratus* (Coleoptera: Tenebrionidae). *Animal Behaviour*, 29: 990–996.

Walencik, J., Witeska, M. (2007). The effects of anticoagulants on hematological indices and blood cell morphology of common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, 146: 3.

Witeska, M., Biardzka, J., Kniaz, J. (2017a). The effects of heparin concentration, storage time, and temperature on the values of hematological parameters in *Cyprinus carpio*. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 41: 351–356.

Witeska, M., Kondera, E., Ługowska, K., & Bojarski, B. (2022). Hematological methods in fish – Not only for beginners. In *Aquaculture* (Vol. 547).

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.

Zhao, W., Lu, L., Tang, Y. (2010). Research and application progress of 1700 insect antimicrobial peptides on food industry. *International Journal of Food Engineering* 6, 1701 Article 10.

Zaelor, J., and S. Kitthawee. (2018). Growth response to population density in larval stage of darkling beetles (Coleoptera; Tenebrionidae) *Tenebrio molitor* and *Zophobas atratus*. *Agriculture Natural Resource* ,52: 603–606.

ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

FAO.org. (2020). *FAO Fisheries & Aquaculture - Aquatic Species*. [online] Available at: <http://www.fao.org/fishery/species/2384/en>

FAO.org. (2020). *FAO: Gilthead Seabream Home*. [online] Available at: <http://www.fao.org/fishery/affris/species-profiles/gilthead-seabream/gilthead-seabream-home/en/>

FAO Fisheries and Aquaculture Department; FAO: Rome, Italy, 2021. Available online: <http://www.fao.org/fishery/countrysector/>

ABSTRACT

The rapid growth of aquaculture implies the increased demand for fish feed and in particular fishmeal, the main source of animal protein. However, due to the depletion of fish stocks and the skyrocketing price of fishmeal, it is imperative to find alternative sources. Insect meal is an effective source of protein that can successfully replace fishmeal. This is a source of high nutritional value and has a small ecological footprint. A promising insect meal comes from the *Zophobas morio*; however, there are not many literature sources that examine its incorporation into fish feed. At present study, its effect on fish health is examined. It is achieved by evaluating its effect on hematological parameters, on the values of white blood cell types, lymphocytes, neutrophils, eosinophils and monocytes given that the number of white blood cells can be used as a powerful diagnostic tool for the evaluation of health.

For the experimental process, 54 juveniles of *Sparus aurata* were collected from a 100-day nutrition experiment where 6 groups were fed with a different diet. The first group was fed with a control diet containing exclusively fishmeal (FM) while the rest were fed with a diet in which the fishmeal had been replaced by a 5% and 10% full-fat insect *Z. morio* meal (ZFF5 and ZFF10) respectively and by 10%, 20% and 30% from defatted insect meal (ZLF10, ZLF20, ZLF30). This was followed by stunning of the fish, blood smears and staining of the fish. Blood samples were then placed under an optical microscope to distinguish and count white blood cell types. Samples were analyzed by the statistical program SPSS (v.20) with one-way ANOVA method. Statistical analysis showed that the values of lymphocytes of all food groups ranged from 56.73% - 69.93%, neutrophils from 26.4% - 35%, eosinophils from 2.33-3.87 and monocytes from 0-1%.

In general, the values of lymphocytes, neutrophils, eosinophils and monocytes of the dietary groups fed with full-fat and defatted *Z. morio* insect meal did not differ significantly from the normal range of white blood cell values. Hence, the present work proves, that the specific insect meal of *Z. morio* does not have a negative impact on the hematological parameters and consequently it is not rendered harmful to the health of farmed sea bream.