

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΙΧΘΥΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΥΔΑΤΙΝΟΥ

ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ



ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΠΜΣ ΜΕΣΟΓΕΙΑΚΗ ΥΔΑΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ



**«Η επίδραση της υποκατάστασης του διαιτητικού ιχθυελαίου και
ιχθυαλεύρου από μικροφύκη των ειδών *Nannochloropsis* sp. και
Schizochytrium sp. στην ανάπτυξη της τσιπούρας (*Sparus aurata*)»**

Καραϊσκού Μαρία

ΒΟΛΟΣ 2022

**«Η επίδραση της υποκατάστασης του διαιτητικού ιχθυελαίου και ιχθυαλεύρου
από μικροφύκη των ειδών *Nannochloropsis* sp. και *Schizochytrium* sp. στην
ανάπτυξη της τσιπούρας (*Sparus aurata*)»**

Τριμελής εξεταστική επιτροπή:

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

2) Παναγιώτα Παναγιωτάκη, Καθηγήτρια – Υδατοκαλλιέργειες, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, **Μέλος**.

3) Ελένη Γκολομάζου, Μόνιμη Επίκουρη Καθηγήτρια- Προστασία-Ευζωία Ιχθύων, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, **Μέλος**.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να εκφράσω τις ειλικρινείς μου ευχαριστίες σε όλους όσους με βοήθησαν να εκπονήσω την παρούσα Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία. Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Επιβλέποντα της εργασίας αυτής, κ. Καραπαναγιωτίδη Ιωάννη για τη συνεχή υποστήριξή του κατά τη διεξαγωγή του πειράματος και την πολύτιμη καθοδήγησή του κατά τη συγγραφή της παρούσας εργασίας καθώς και τα μέλη της εξεταστικής επιτροπής αποτελούμενη από τους κα. Παναγιωτάκη Παναγιώτα και κα. Γκολομάζου Ελένη για τις χρήσιμες συμβουλές τους και την καθοδήγησή τους σε όλα τα στάδια διεκπεραίωσης της εργασίας.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον διδάκτορα, κ. Ψωφάκη Πιερ και τις υποψήφιες διδάκτορες κα. Ασημάκη Μαντώ και κα. Γκαλογιάννη Ελίνα για την ανιδιοτελή βοήθειά τους, τόσο σε προσωπικό όσο και σε εργαστηριακό επίπεδο στο χώρο του Πανεπιστημίου καθώς και για την άριστη συνεργασία μας καθ'ολη τη διάρκεια του πειράματος.

Δεν θα μπορούσα να παραλείψω την οικογένειά μου, για την ψυχική υποστήριξη, ενθάρρυνση και κατανόηση σε όλο το χρονικό διάστημα των σπουδών μου.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Μέχρι το 2030 ο κλάδος της υδατοκαλλιέργειας θα έχει αναπτυχθεί με ταχύτατους ρυθμούς λόγω της αυξανόμενης ζήτησης για προϊόντα ιχθυοκαλλιέργειας. Οι ιχθυοτροφές, με τη σειρά τους, χρειάζονται να αυξηθούν για να συμβάλλουν στην εκτροφή των ψαριών. Στο παρελθόν, τα ιχθυάλευρα και τα ιχθυέλαια αποτελούσαν τις κύριες πηγές πρωτεϊνών και λίπους για τα ψάρια. Η έντονη υπεραλίευση και η εξάντληση των ιχθυαποθεμάτων ελαχιστοποιεί την παραγωγή των ιχθυαλεύρων και ιχθυελαίων με αποτέλεσμα να αυξάνεται το κόστος τους. Η αύξηση αυτή, θέτει σε κίνδυνο την βιωσιμότητα πολλών υδατοκαλλιεργειών. Έτσι, πολλές βιομηχανίες παρασκευής ιχθυοτροφών αναζητούν εναλλακτικές και διαθέσιμες πηγές που να καλύπτουν τις θρεπτικές ανάγκες των ιχθύων.

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η διερεύνηση της δυνατότητας χρησιμοποίησης μικροφυκών και συγκεκριμένα *Schizochytrium* και *Nannochloropsis* sp. (επίσης αναφέρεται ως *Microchloropsis*) που είτε ήταν εμπορικά σκευάσματα είτε προήλθαν από πιλοτική καλλιέργεια του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας με τη χρήση οργανικών λυμάτων για την υποκατάσταση του ιχθυελαίου και του ιχθυαλεύρου στο σιτηρέσιο της τσιπούρας (*Sparus aurata*).

Ιχθύδια τσιπούρας με αρχικό βάρος $3,16 \pm 0,03$ g μεταφέρθηκαν σε 9 ενυδρεία κλειστού συστήματος κυκλοφορίας θαλασσινού νερού. Η θερμοκρασία διατηρούνταν σε όλη τη διάρκεια του πειράματος στους 21°C, το pH στο $8,00 \pm 0,04$ και η αλατότητα στο $30 \pm 0,5\%$. Τα ιχθύδια διαχωρίστηκαν σε 3 διατροφικές ομάδες (ControlS , SMOs, SMcS) (18 άτομα/ενυδρείο, 3 επαναλήψεις/διατροφική ομάδα) στις οποίες

χορηγήθηκαν 3 διαφορετικά σιτηρέσια, 2 φορές καθημερινά με το χέρι μέχρι κορεσμού για 49 μέρες. Στην τροφή-μάρτυρα ControlS, οι κύριες πηγές λίπους ήταν το ιχθυέλαιο και το σογιέλαιο και οι κύριες πηγές πρωτεΐνης το ιχθυάλευρο και το συμπύκνωμα σόγιας. Στην τροφή SMOs, πραγματοποιήθηκε ένταξη του μείγματος *Microchloropsis gaditana* και *Schizochytrium sp.* που προήλθε από πιλοτικές καλλιέργειες του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας με χρήση αποβλήτων νερού σε ποσοστό 5,05% και 5,15% της τροφής αντίστοιχα με σκοπό τη μερική υποκατάσταση του ιχθυελαίου της τροφής του μάρτυρα (κατά 15%) και τη μερική υποκατάσταση της πρωτεΐνης του ιχθυαλεύρου της τροφής του μάρτυρα (κατά 15,9%). Στην τροφή SMcS πραγματοποιήθηκε ένταξη του μείγματος *Microchloropsis gaditana* και *Schizochytrium sp.*, τα οποία ήταν εμπορικά σκευάσματα σε ποσοστό 2,5% και 1,05% της τροφής, αντίστοιχα με σκοπό τη μερική υποκατάσταση του ιχθυελαίου της τροφής του μάρτυρα (κατά 15%) και τη μερική υποκατάσταση της πρωτεΐνης του ιχθυαλεύρου της τροφής του μάρτυρα (κατά 7%). Τα σιτηρέσια ήταν ισοενεργειακά (21MJ/kg), ισοπρωτεϊνικά (50% της τροφής) και ισολιπιδικά (15% της τροφής).

Η αντικατάσταση ιχθυαλεύρου και ιχθυελαίου από μικροφύκη με τα διάφορα ποσοστά ένταξης δεν επηρέασε αρνητικά την επιβίωση των ψαριών που σιτίστηκαν με αυτά. Πιο συγκεκριμένα, τα ψάρια που σιτίστηκαν με τις διατροφικές ομάδες SMcS και SMOs εμφάνισαν μη σημαντικά υψηλότερο ρυθμό ανάπτυξης παρόμοιο με εκείνα που διατράφηκαν με το σιτηρέσιο του μάρτυρα (αποκλειστικά ιχθυέλαιο). Ο συντελεστής μετατρεψιμότητας της τροφής (FCR) των σιτηρεσίων που περιείχαν μικροφύκη ήταν παρόμοιος με εκείνον της τροφής-μάρτυρα (ίδια τιμή FCR της ομάδας SMcS με μάρτυρα).

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης έδειξαν ότι το μίγμα μικροφυκών *Microchloropsis gaditana* και *Schizochytrium* είτε ως εμπορικά σκευάσματα είτε ως

προϊόντα πιλοτικής καλλιέργειας του Παν. Θεσσαλίας είναι κατάλληλα για την υποκατάσταση του ιχθυελαίου και ταυτόχρονα του ιχθυαλεύρου στο σιτηρέσιο της τσιπούρας. Προκειμένου για την περαιτέρω διερεύνηση της καταλληλότητας τους ως υποκατάστατα των ιχθυελαίων και ιχθυαλεύρων περαιτέρω έρευνα είναι αναγκαία αναφορικά για παράδειγμα με την επίδραση τους στη θρεπτική σύσταση του σώματος και στο προφίλ των λιπαρών οξέων, στην ιστομορφολογία των ψαριών, καθώς και στην πεπτικότητα των μικροφυκών μεταξύ άλλων.

Λέξεις-κλειδιά: τσιπούρα, *Sparus aurata*, υποκατάσταση ιχθυελαίου, μικροφύκη, *Nannochloropsis*, *Schizochytrium*, DHA, EPA.


ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	v
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
1.1. Θρεπτικές απαιτήσεις και εκτροφή της τσιπούρας (<i>Sparus aurata</i> , L.).	1
1.2. Ιχθυάλευρα & ιχθυέλαια στις ιχθυοτροφές & αντικατάσταση ιχθυαλεύρων & ιχθυελαίων από εναλλακτικές πηγές	5
1.3. Τα μικροφύκη ως υποκατάστατα των ιχθυαλεύρων & ιχθυελαίων στις ιχθυοτροφές	10
1.3.1. Το γένος <i>Schizochytrium</i> sp.	19
1.3.2. Το γένος <i>Nannochloropsis</i> sp.	23
1.4. Σκοπός έρευνας	27
ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ	28
2.1. Πειραματικός σχεδιασμός	28
2.2. Σιτηρέσιο- σίτιση	30
2.3. Δειγματοληψίες	33
2.4. Παράμετροι ανάπτυξης & αξιοποίησης της τροφής	33
2.4.1. Θνησιμότητα	33
2.4.2. Αύξηση ολικού βάρους ψαριών	33
2.4.3. Ποσοστό αύξησης ολικού βάρους	34
2.4.4. Συνολική κατανάλωση τροφής	34
2.4.5. Ειδικός ρυθμός αύξησης	34
2.4.6. Συντελεστής μετατρεψιμότητας της τροφής	34
2.5. Στατιστική ανάλυση	35
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	36
3.1. Θνησιμότητα	36
3.2. Παράμετροι ανάπτυξης και αξιοποίησης της τροφής	37
3.2.1. Κατά την έναρξη του πειράματος	37
3.2.2. Κατά την 32 ^η μέρα του πειράματος	37
3.3.3. Κατά την 49 ^η μέρα του πειράματος	39
ΣΥΖΗΤΗΣΗ	42
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	47
ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	48
ΞΕΝΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	48
ABSTRACT	67

1.1.Θρεπτικές απαιτήσεις και εκτροφή τσιπούρας (*Sparus aurata*)

Πίνακας 1.1:Συστηματική κατάταξη του είδους *Sparus aurata* (Linnaeus, 1758).

Βασίλειο:	Ζώα (<i>Animalia</i>)
Συνομοταξία:	Χορδωτά (<i>Chordate</i>)
Ομοταξία:	Ακτινοπτερύγια (<i>Actinopterygii</i>)
Τάξη:	Περκόμορφα (<i>Perciformes</i>)
Οικογένεια:	Σπαρίδες (<i>Sparidae</i>)
Γένος:	Σπάρος (<i>Sparus</i>)
Είδος	<i>aurata</i>



Η τσιπούρα (*Sparus aurata*) ανήκει στην οικογένεια Sparidae (Πιν.1.1). Μαζί με το λαβράκι εκτείνονται στην περιοχή της Μεσογείου, και από πλευράς διατροφικής αξίας είναι επίσης πλούσια σε ω-3 πολυακόρεστα λιπαρά οξέα και θεωρούνται τα κύρια ψάρια των ιχθυοκαλλιεργειών στην Ελλάδα και στη Μεσόγειο ευρύτερα (Πιν.1.2).

Πίνακας 1.2. Απαραίτητα λιπαρά οξέα ανά 100g φιλέτου τσιπούρας (αρχείο KEFISH)

Λιπαρά οξέα (%)	
Σω-3 LC-PUFA	1,2
DHA/EPA	1,5
EPA	0,7
DHA	1,0

*KEFISH: Kefalonia Fisheries

Παρακάτω παρατίθενται οι πίνακες της θρεπτικής σύστασης καθώς και τα απαραίτητα αμινοξέα που περιέχονται στη διατροφή της τσιπούρας (Πιν.1.3, Πιν.1.4.).

Πίνακας 1.3. Θρεπτική σύσταση της τσιπούρας στο στάδιο προπάχυνσης (αρχείο Biomar).

Θρεπτική σύσταση (%)	
Ολική Πρωτεΐνη	51-55
Ολικά λίπη	15
Υδατάνθρακες	12,3-15,7
Ολική Ενέργεια (MJ/Kg)	20,7-21,1
Ινώδεις ουσίες	2-2,4
Ολικός φώσφορος (g/MJ)	1,6-1,4

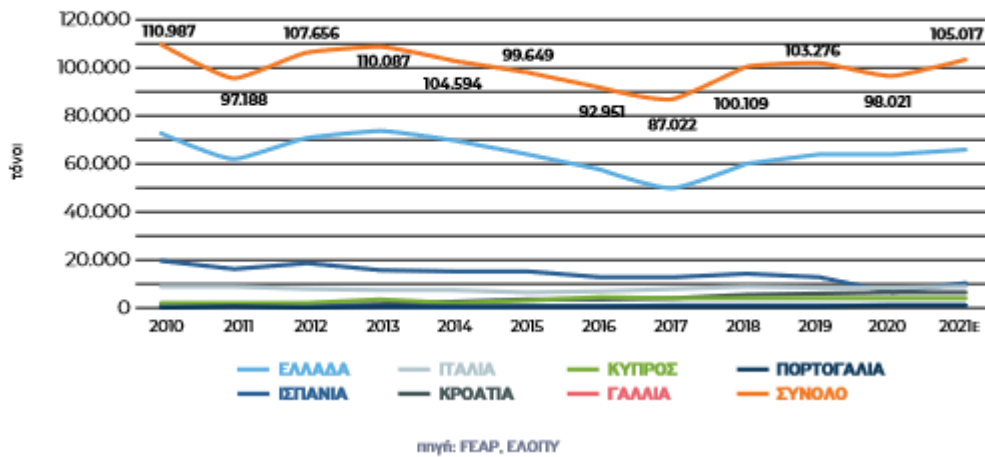
Πίνακας 1.4. Απαραίτητα αμινοξέα στη διατροφή της τσιπούρας (Παπουτσόγλου,2008).

Αμινοξέα (%)	
Αργινίνη	2,5-2,8
Ιστιδίνη	0,9-1
Ισολευκίνη	1,2-1,5
Λευκίνη	2,1-2,7
Λυσίνη	2,3-3,0
Μεθειονίνη	1,2-1,4
Φαινυλαλανίνη	1,3-1,7
Θρεονίνη	1,3-1,6
Τρυπτοφάνη	0,3-0,4
Βαλίνη	1,4-1,8

Η τσιπούρα είναι σαρκοφάγο είδος (Froese and Pauly, 2006) και τρέφεται κυρίως με μαλάκια, συμπεριλαμβανομένων των μυδιών και των στρειδιών, αλλά και με μικρά ψάρια και πολύχαιτους (Reference Summary - Bauchot and Hureau, 1990, 2020).

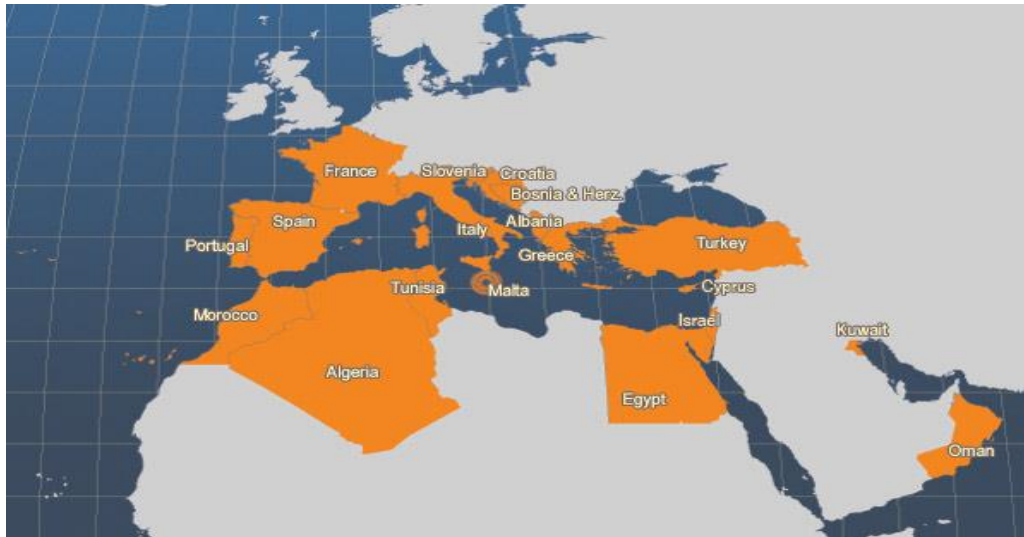
Οι κύριες χώρες εκτροφής της τσιπούρας στη Μεσόγειο αποτελούν η Τουρκία, η Ελλάδα, η Ισπανία, η Ιταλία, η Κροατία, η Κύπρος, η Αίγυπτος, η Γαλλία, η Μάλτα, το Μαρόκο και η Τυνησία (FAO, 2006). Επίσης, εκτρέφεται στην Ερυθρά θάλασσα, στον Περσικό κόλπο και στην Αραβική θάλασσα με κύριες χώρες το Ισραήλ, το Κουβέιτ και το Ομάν (FAO, 2006) (Εικ.1.1). Σχετικά με την παραγωγή, το 2020 παρήχθησαν συνολικά 98.021 τόνοι τσιπούρας, παρουσιάζοντας μείωση -5% σε σχέση με το 2019 (103.276 τόνοι) (Διαγ.1.1). Αν και στις περισσότερες χώρες καταγράφηκε μικρή άνοδος ή στασιμότητα, η πτώση οφείλεται στην κατά 47% πτώση της ισπανικής παραγωγής τσιπούρας στις αρχές του 2020 λόγω του τυφώνα Gloria (από 13.521 τόνους το 2019 σε 7.170 τόνους το 2020). Σύμφωνα με τον ΕΛΟΠΥ, το 2021 η παραγωγή τσιπούρας στην Ε.Ε. εκτιμάται πως θα παρουσιάσει αύξηση 7% και θα κυμανθεί στους 105.000 τόνους. Αναμένεται αύξηση της παραγωγής σε όλες τις χώρες. Η μέση τιμή πώλησης της τσιπούρας ανήλθε στα 4,42€/κίλο, παρουσιάζοντας μείωση 2% σε σχέση με το προηγούμενο έτος (ΕΛΟΠΥ, 2021).

Παραγωγή τσιπούρας ιχθυοκαλλιέργειας στην Ε.Ε.-27 το 2020 (τόνοι)



Διάγραμμα 1.1. Παραγωγή του είδους *Sparus aurata* ιχθυοκαλλιέργειας στην Ε.Ε.-27 το 2020 (Πηγή:FEAP, ΕΛΟΠΥ, 2021).

Η τσιπούρα μπορεί να εκτραφεί με εκτατικό, ημιεντατικό και εντατικό τρόπο εκτροφής. Ωστόσο, το μεγαλύτερο μέρος της παραγωγής προέρχεται από την εντατική εκτροφή με μέση πυκνότητα 20-100 kg m³ και FCR 1,5-2 (FAO, 2013). Η κύρια μέθοδος εκτροφής τσιπούρας στη Μεσόγειο πραγματοποιείται σε πλωτούς ή υποβρύχιους ή ημικαταδυόμενους ιχθυοκλωβούς. Ειδικότερα, ιχθύδια 10 γραμμαρίων εισάγονται στους κλωβούς και φτάνουν στο εμπορεύσιμο βάρος σε περίπου 1 χρόνο. Στην Ελλάδα με τη χρήση πλωτών κλωβών, η τσιπούρα φτάνει στο εμπορικό βάρος των 350-400gr σε περίπου 11-14 μήνες (Κλαουδάτος, 2012). Η γρήγορη ανάπτυξη της παραγωγής στους πλωτούς ιχθυοκλωβούς, έχει επιτρέψει στην ανάπτυξη του τομέα των υδατοκαλλιεργειών και την ελαχιστοποίηση των τιμών, όμως σήμερα τα περιθώρια κέρδους είναι μικρά και η παραγωγή μεγάλη.



Εικόνα 1.1. Κύριες χώρες παραγωγής του είδους *Sparus aurata* (Πηγή:FAO Fishery Statistics, 2006).

1.2.Ιχθυάλευρα & ιχθυέλαια στις ιχθυοτροφές & αντικατάσταση ιχθυαλεύρων & ιχθυελαίων από εναλλακτικές πηγές

Η βιομηχανία υδατοκαλλιέργειας είναι ο πιο ταχέως αναπτυσσόμενος κλάδος της τροφικής παραγωγής στον κόσμο, αυξάνοντας στο 8.8% ανά έτος από το 1980 έως το 2010 (Beal et al., 2018). Οι ιχθυοκαλλιέργειες θα παράγουν πάνω από 65% της παγκόσμιας παραγωγής των υδρόβιων οργανισμών μέχρι το 2030 (Welch et al. 2010, Maisashvili et al. 2015, Dineshbabu et al., 2019) και αναμένεται να αυξηθούν, για να παρέχουν τροφή σε περισσότερους από εννέα δισεκατομμύρια ανθρώπους το 2050 (Aragão et al., 2019). Τα ψάρια απαιτούν τροφές που περιέχουν 30% έως 55% ολική πρωτεΐνη και υψηλά επίπεδα απαραίτητων αμινοξέων για να επιτευχθεί η βέλτιστη ανάπτυξη τους (Annamalai et al., 2021).

Το ιχθυάλευρο και το ιχθυέλαιο είναι μοναδικά θρεπτικά συστατικά, που παράγονται, από το ~30% της εξαλίευσης άγριων ψαριών. Η ετήσια παραγωγή τους έχει ελαττωθεί από τη δεκαετία του 80, όταν η παγκόσμια εξαίλευση ιχθύων έφτασε στο μέγιστο βιώσιμο επίπεδο, στους 5-6 εκατομμύρια τόνους για ιχθυάλευρο και 1 εκατομμύριο τόνους για ιχθυέλαιο (Beal et al., 2018). Τα ιχθυάλευρα αποτελούσαν

μέχρι πρότινος την κύρια πρώτη ύλη των ιχθυοτροφών λόγω της υψηλής περιεκτικότητας σε πρωτεΐνες (60-70%) και του καλού επιπέδου λίπους (8,2-11%) (Barroso et al., 2014). Ειδικότερα, το ιχθυέλαιο έχει ένα υψηλό επίπεδο ω-3 πολυακόρεστων λιπαρών οξέων, τα οποία προωθούν τη βέλτιστη ανάπτυξη και υγεία (Beal et al., 2018) και κυρίως είναι πλούσια σε EPA (20:5 n-3 έως 14%) και DHA (22:6 n-3 έως 16%) (Barroso et al., 2014).

Οι τιμές και των δυο προϊόντων έχουν περισσότερο από τριπλασιαστεί τα τελευταία 10 έτη (Beal et al., 2018). Το ποσοστό των ιχθυαλεύρων για τις ιχθυοτροφές αυξήθηκε από 10% το 1988 σε περίπου 45% το 2002 και η τιμή παραγωγής των εκτρεφόμενων ψαριών έχει αυξηθεί από 600 δολάρια ΗΠΑ / μετρικό τόνο το 2005 σε 2000 δολάρια ΗΠΑ / μετρικό τόνο τον Ιούνιο του 2010 και αυτή η τάση συνεχίζεται (Barroso et al., 2014). Η περαιτέρω ανάπτυξη της υδατοκαλλιέργειας παρεμποδίζεται από το αυξανόμενο κόστος των ιχθυαλεύρων και ιχθυελαίων, των κρεατάλευρων και των σογιάλευρων, που αντιπροσωπεύουν το 60-70% του συνολικού κόστους παραγωγής υδατοκαλλιέργειας (Alfiko et al., 2022). Η αλιεία μένει στάσιμη ή φθίνει σε ορισμένες χώρες (Barroso et al., 2014)(Διαγρ.1.2.). Καθημερινά εξαντλούνται άγρια πελαγικά θαλάσσια είδη με τις τιμές των ιχθυάλευρων και του ιχθυελαίων να αυξάνονται (Shields and Lupatsch, 2012) με τα τελευταία έτη να εμφανίζουν μικρή πτώση ή στασιμότητα (Πιν.1.5). Η εφαρμογή του προτύπου IFFO-RS σε ολόκληρο τον τομέα των θαλάσσιων συστατικών/πόρων, συμπεριλαμβανομένης της Ασίας, αν και δύσκολη, συνεχίζεται και αντιπροσωπεύει πραγματική βελτίωση (IFFO 2012, Tocher 2015). Σήμερα, έχουν ενταχθεί τα πιστοποιημένα ιχθυάλευρα-ιχθυέλαια RS (Responsible Supply) που προέρχονται από αειφορικά αλιευόμενα ιχθυαποθέματα, αλλά και υποπροϊόντα φιλετοποίησης ιχθυηρών, παρεμπίπτοντα και απορριπτόμενα αλιεύματα

(Tocher, 2015). Ωστόσο, οι προμήθειες σε FO και FM θα περιορίζονται συνεχώς (Tocher, 2015).

Πίνακας 1.5. Σύγκριση τιμής (ανά κιλό) ετών 2015 (Moutinho et al., 2017) με 2022 κάθε πρώτης ύλης που χρησιμοποιούνται κυρίως στις ιχθυοτροφές (προσωπική έρευνα συγγραφέα).

Πρώτη ύλη	Τιμή σε € ανά kg (2015)	Τιμή σε € ανά kg (2022)
Ιχθυάλευρο	1,51	1,55
Άλευρο σίτου	0,15	0,75
Κρεατάλευρο	0,35	3,1
Ιχθυέλαιο	1,80	1,79
Σογιέλαιο	0,63	1,5
Πρόμιγμα βιταμινών & ανόργανων στοιχείων	2,75	3,47

Ένα επιπλέον μειονέκτημα που εγείρεται από την αλόγιστη χρήση τους είναι ότι τα επίπεδα των επίμονων οργανικών ρύπων (POPs), κυρίως διοξίνες / φουράνια και πολυχλωριωμένα διφαινύλια (PCB), σε ορισμένα ευρωπαϊκά ιχθυέλαια ενδέχεται να παραβιάζουν τα νέα όρια της ΕΕ και να αποτρέπουν τη χρήση των ιχθυοτροφών (Bell & Wagboo, 2008). Μερικοί συγγραφείς έχουν προτείνει εναλλακτικές λύσεις για την απολύμανση του ιχθυελαίου και των ιχθυαλεύρου, όπως η προσρόφιση με ενεργό άνθρακα, η απόσπηση με ατμό, η απόσταξη μικρής διαδρομής, η εκχύλιση με διαλύτη εξανίου, ισοπροπανόλης και αιθανόλης γεγονός το οποίο αυξάνει το λειτουργικό κόστος του ιχθυελαίου (Orozco Colonia, Vinicius de Melo Pereira and Soccol, 2020).

Λόγω των προαναφερθέντων προβλημάτων, υπάρχει αυξανόμενο ενδιαφέρον για μερική ή πλήρη υποκατάσταση των ιχθυάλευρων από εναλλακτικές πηγές πρωτεϊνών ζωικής ή φυτικής προέλευσης. Οι πρώτες ύλες εκτός από τα ιχθυάλευρα επιλέγονται για τη θρεπτική τους αξία, την ισορροπία των αμινοξέων, την πεπτικότητα των πρωτεϊνών και των λιπιδίων, την ποιότητα των λιπαρών οξέων, την απουσία αντιθρεπτικών παραγόντων, την διαθεσιμότητα και το κόστος (Shields and Lupatsch, 2012). Σήμερα, έχουν ερευνηθεί εναλλακτικά συστατικά για ιχθυοτροφές σε ψάρια,

όπως *Salmo salar* (Olli et al. 1995, Bjerkeng et al. 1997, Bell et al. 2001, 2003, 2004, Opstvedt et al. 2003, Mundheim et al. 2004), *Sciaenops ocellatus* (Kureshy et al., 2000), *Rachycentron canadum* (Zhou et al. 2004, Lunger et al. 2006, Fraser and Davies 2009), *Psetta maxima* (Regost et al. 2003a, Fournier et al. 2004), *Dicentrarchus labrax* (Gouveia and Davies 2000, Tibaldi et al. 2006), *Sparus aurata* (Izquierdo et al. 2005, Venou et al. 2006), *Paralichthys olivaceus* (Kikuchi, 1999), *Seriola quinqueradiata* (Maita et al., 2006) και *Oncorhynchus mykiss* (Kaushik et al., 1995) (Welch et al., 2010). Φυτικά προϊόντα (σόγια, ελαιούχοι σπόροι, γλουτένη δημητριακών) χρησιμοποιούνται όλο και περισσότερο (Alfiko et al., 2022). Επίσης, χερσαίες ζωικές πρωτεΐνες, όπως τα άλευρα από υποπροϊόντα πουλερικών (PBM), αιματάλευρα, πτεράλευρα, κρεατάλευρα έχουν επίσης ενταχθεί (Cui et al., 2022). Η χρήση τους όμως απαγορεύτηκε για όλα τα εκτρεφόμενα ζώα, στην Ευρωπαϊκή Ένωση το 2001, για την εξάλειψη της σπογγώδους εγκεφαλοπάθειας ενώ το 2013 επανεισήχθησαν πλέον ως μεταποιημένες ζωικές πρωτεΐνες (PAP) από μη μηρυκαστικά (Aragão et al., 2019). Στην ΕΕ, η χρήση εντόμων ως συστατικού στις ιχθυοτροφές επιτράπηκε τον Ιούλιο του 2017 (Ευρωπαϊκή Επιτροπή, 2017) (Aragão et al., 2019) έχοντας ως εγκεκριμένα είδη τα: *Bombyx mori*, *Hermetia illucens*, *Musca domestica*, *Tenebrio molitor*, *Alphitobius diaperinus*, *Acheta domesticus*, *Gryllodes sigillatus* και *Gryllus assimilis* (Alfiko et al., 2022; ΚΑΝΟΝΙΣΜΟΣ ΕΕ 2017/893).



Διάγραμμα 1.2. Κατηγορίες αλιευτικών αποθεμάτων (Barroso et al., 2014).

1.3. Τα μικροφύκη ως υποκατάστατα των ιχθυαλεύρων & ιχθυελαίων στις ιχθυοτροφές.

Τα φύκη είναι φωτοσυνθετικοί οργανισμοί που μεγαλώνουν σε ένα εύρος υδάτινων οικοσυστημάτων. Κατηγοριοποιούνται σε Rhodophyta, (κόκκινα φύκη), Phacophyta (καφέ φύκη) και Chlorophyta (πράσινα φύκη) και κατατάσσονται από το μέγεθος σε μακροφύκη και μικροφύκη. Τα μακροφύκη (θαλασσινά φύκη) είναι πολυκύτταρα, μεγάλου μεγέθους φύκη, ορατά με γυμνό μάτι, ενώ τα μικροφύκη είναι μικροσκοπικά μονοκύτταρα (Khan et al.,2018). Ο όρος "μικροφύκη"(ή αλλιώς θραυστοχυτρίδια) περιλαμβάνει είτε τα προκαρυωτικά κυανοβακτήρια είτε τα ευκαρυωτικά είδη (Patras et al., 2019). Τα μικροφύκη ανακαλύφθηκαν για πρώτη φορά το 1934 (Fossier Marchan et al.,2018) και αναπτύσσονται σε γλυκά, θαλασσινά και υπεράλυρα περιβάλλοντα, αλλά επίσης σε εδάφη με υγρασία και βραχώδη μέρη (Camacho et al., 2019).

Η καλλιέργεια μικροφυκών μεγάλης κλίμακας ξεκίνησε την δεκαετία του 60 στην Ιαπωνία, όπου τα είδη *Chlorella* sp. χρησιμοποιούνταν ως πρόσθετο τροφής (Araújo et al.,2021). Μεταξύ των δεκαετιών 70 και 80, η βιομηχανική παραγωγή των μικροφυκών επεκτάθηκε σε ΗΠΑ, Κίνα, Ταιβάν, Αυστραλία, Ινδία, Ισραήλ, και Γερμανία με έμφαση στα είδη *Spirulina* sp. και *Chlorella* sp. τα τελευταία χρόνια. Η παρούσα συνδυασμένη παραγωγή τους εκτιμάται στους 5000 και 2500 τόνους ξηρής βιομάζας και έχει συμβάλλει στην κάλυψη της πρωτεϊνικής ζήτησης (Camacho et al., 2019). Τα μικροφύκη είναι σε θέση να αναπτυχθούν είτε ετεροτροφικά, μικτοτροφικά ή καλλιεργούμενα υπό φωτοαυτοτροφικές συνθήκες, όντας σε θέση να συλλάβουν φως, να χρησιμοποιήσουν άζωτο και φώσφορο ως πηγή ενέργειας για τη βέλτιστη ανάπτυξή τους και να μετατρέψουν το CO₂ σε βιομάζα πλούσια σε άνθρακα, συμβάλλοντας εν τω μεταξύ στην

παγκόσμια παραγωγή οξυγόνου. Εκτιμάται ότι περίπου το 50 % του παγκόσμιου οξυγόνου παράγεται από μικροφύκη (Patras et al., 2016).

Τα μικροφύκη είναι ταχέως αναπτυσσόμενοι φωτοσυνθετικοί οργανισμοί που έχουν τη δυνατότητα να μετατρέψουν το 9-10% της ηλιακής ενέργειας (μέση ακτινοβολία ηλιακού φωτός) σε βιομάζα με θεωρητική απόδοση περίπου 77g/βιομάζα/m²/ημέρα που είναι περίπου 280 τόνοι/εκτάριο/έτος (Chen et al. 2021, Khan et al., 2018). Πολλά θαλάσσια μικροφύκη είναι πλούσια σε EPA (C20:5) και DHA (C22:6) και αποτελούν μια υποσχόμενη πηγή των ω-3 λιπαρών οξέων (Stoneham et al. 2018, Maisashvili et al. 2015, Adarme-Vega et al., 2012). Υψηλή βιομάζα και εμπορικά αποδεκτές παραγωγικότητες EPA και DHA επιτυγχάνονται με μικροφύκη που μεγαλώνουν μέσα σε βελτιστοποιημένες συγκεντρώσεις άνθρακα και αζώτου και σε ελεγχόμενες συνθήκες pH και θερμοκρασίας (Adarme-Vega et al., 2012). Η θερμοκρασία θα πρέπει να παραμένει μεταξύ των 20 με 30 °C (Chisti, 2007). Σημαντικά στοιχεία που πρέπει να περιλαμβάνονται είναι το άζωτο (N), ο φώσφορος (P), ο σίδηρος και σε ορισμένες περιπτώσεις το πυρίτιο (Harwood, 2019; Chisti, 2007). Υπάρχουν όμως και θερμόφιλα φύκη που μπορούν να αντέξουν θερμοκρασίες έως και 40 °C καθώς και φύκη που αναπτύσσονται σε θερμές πηγές σε 80 °C (Khan et al., 2018). Πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι 16 ώρες φως/8 ώρες σκότος είναι η πιο κατάλληλη φωτοπερίοδος για την ανάπτυξη φυκών (Khan et al., 2018). Το βέλτιστο εύρος pH κυμαίνεται από 6 σε 8.76 (Khan et al., 2018). Εξαίρεση αποτελεί το *C. vulgaris* όπου ο μέγιστος ρυθμός ανάπτυξης και η μεγάλη παραγωγικότητα βιομάζας εντοπίζεται σε pH 9-10 (Khan et al., 2018) (Πιν.1.6).

Πίνακας 1.6. Γενικές παράμετροι για καλλιέργεια φυκών (Parisi et al., 2016).

Παράμετροι	Εύρος	Βέλτιστες τιμές
Θερμοκρασία (°C)	16-27	18-24
Αλατότητα (g.l ⁻¹)	12-40	20-24
Ένταση φωτός (mmol/m ² /s)	15-135 (εξαρτάται από την ένταση και την πυκνότητα)	40-70
Φωτοπερίοδος (φως:σκοτάδι, ώρες)		16:8 (min) 24:0 (max)
pH	7-9	8,2-8,7

Τα μικροφύκη μεγαλώνουν τακτικά με μικρές ποσότητες νερού και θρεπτικών σε σύγκριση με άλλα φυτά που μεγαλώνουν στη γη. Για να παραχθεί 1 kg βιομάζας φύκους χρειάζονται εκτιμητικά 333 λίτρα νερού (Bhalamurugan, Valerie and Mark, 2018). Ακόμη, είναι ικανά να μεγαλώνουν σε βιομηχανικά ρεύματα υγρών αποβλήτων χρησιμοποιώντας τα επιπλέον θρεπτικά, καθιστώντας τα λύματα αυτά περιβαλλοντικά ασφαλή με ελάχιστη χρήση νερού (Bhalamurugan, Valerie and Mark, 2018, Parisi et al., 2016, Deng et al., 2021, Viegas et al., 2021). Τα μικροφύκη μπορούν να καλλιεργηθούν σε ανοικτά και κλειστά συστήματα καλλιέργειας. Οι τρεις τύποι ανοικτών συστημάτων είναι: (α) Ανοικτές δεξαμενές χωρίς ανάμειξη, (β) δεξαμενές τύπου raceway και (γ) κυκλικές δεξαμενές (Εκθεση επιλογής μικροφυκών για ιχθυοτροφές, 8/1/2019, ΕΣΠΑ 2014-2020). Τα κλειστά συστήματα καλλιέργειας πραγματοποιούνται με τη χρήση φωτοβιοαντιδραστήρων (Εκθεση επιλογής μικροφυκών για ιχθυοτροφές, 8/1/2019, ΕΣΠΑ 2014-2020). Στην περίπτωση των μικροφυκών, οι φωτοβιοαντιδραστήρες είναι η κύρια μέθοδος παραγωγής (71%) ενώ για τη *Spirulina* spp., επικρατούν οι ανοικτές λίμνες (83%) (Araújo et al., 2021). Το κόστος συγκομιδής της βιομάζας, αντιπροσωπεύει το 20-30% του συνολικού κόστους παραγωγής των μικροφυκών (Lu et al., 2021). Έχει διαπιστωθεί ότι το κόστος παραγωγής σε καλλιέργειες μεγάλης κλίμακας θα μπορούσε να μειωθεί από περίπου 5,5 €/kg ξηρής βιομάζας σήμερα σε 0,68 €/kg ξηρής βιομάζας, μέσω της τεχνολογίας (Draaisma et al., 2013).

Η λειτουργική αξία των μικροφυκών που χρησιμοποιείται ως τροφή αυξάνεται λόγω των υψηλών επιπέδων πρωτεϊνών, πολυακόρεστων λιπαρών οξέων, πολυσακχαριτών, ιχνοστοιχείων, μετάλλων, φαινολικών ενώσεων, καροτενοειδών και στερολών. Τα μικροφύκη είναι επίσης πλούσια σε βιταμίνες A, C, E, και K, θειαμίνη, πυριδοξίνη, ριβοφλαβίνη, νικοτινικό οξύ, βιοτίνη και τοκοφερόλη (Camacho et al., 2019) (Πιν.1.7). Τα κόκκινα και πράσινα φύκη εμφανίζουν την υψηλότερη συνολική περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες (Terriente-Palacios and Castellari, 2022) ενώ τα θαλάσσια μικροφύκη έχουν σημαντικά υψηλότερα επίπεδα DHA συγκρινόμενα με εκείνα του γλυκού νερού (Sprague et al., 2017). Η συνολική περιεκτικότητα των μικροφυκών σε λίπος εξαρτάται κυρίως από το είδος και κυμαίνεται από 8% έως 30% του ξηρού βάρους (Ryckebosch et al., 2014). Τα *Phaeodactylum tricornutum* και *Nannochloropsis* sp. εμφανίζουν επίπεδο EPA πάνω από 39% των συνολικών λιπαρών οξέων, ενώ τα *Thraustochytrium* και *Schizochytrium limacinum* περιέχουν ένα ποσοστό DHA μεταξύ 30-40% των συνολικών λιπαρών οξέων όταν αναπτύσσονται ετεροτροφικά (Li-Beisson et al. 2019, Adarme-Vega et al., 2012) (Πιν.1.8).

Πίνακας 1.7. Θρεπτική σύσταση μικροφυκών που χρησιμοποιούνται σε ιχθυοτροφές (Dineshbabu et al. 2019)

% dwt	<i>Spirulina</i>	<i>Chlorella</i>	<i>Scenedesmus</i>	<i>Isochrysis</i>	<i>Nannochloropsis</i>	<i>Schizochytrium</i>
Πρωτεΐνες	53,21	46,53	43,66	41,00	29,70	21,00
Υδατάνθρακες	16,40	15,84	25,39	14,46	22,84	22,50
Λιπίδια	8,86	15,82	16,02	17,72	20,39	43,05
DHA	0,30	2,60	ND	2,49	1,1(TFA)	7,60
EPA	0,25	0,40	0,41	0,22	3,47	0,08

Πίνακας 1.8. Επίπεδο ελαίου ορισμένων μικροφυκών (Chisti, 2007).

Μικροφύκη	Επίπεδο ελαίου (% ξηρού βάρους)
<i>Botryococcus braunii</i>	25-75
<i>Chlorella</i> sp.	28-32
<i>Cryptocodinium cohnii</i>	20
<i>Cylindrotheca</i> sp.	16-37
<i>Dunaliella primolecta</i>	23
<i>Isochrysis</i> sp.	25-33
<i>Monallanthus salina</i>	>20
<i>Nannochloris</i> sp.	20-35
<i>Nannochloropsis</i> sp.	31-68
<i>Neochloris oleoabundans</i>	35-54
<i>Nitzschia</i> sp.	45-47
<i>Phaeodactylum tricorutum</i>	20-30
<i>Schizochytrium</i> sp.	50-77
<i>Tetraselmis sueica</i>	15-23

Τα μικροφύκη είναι ικανά να παράγουν έλαιο 58.700 λίτρα/εκτάριο (Khan et al.,2018). Πρόσφατα, τα μικροφύκη έχουν χρησιμοποιηθεί στην παραγωγή ελαίων πλούσια σε DHA και EPA και τώρα χρησιμοποιούνται με ταχείς ρυθμούς στη βιομηχανία τροφίμων. Τα πιο κοινά φύκη που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή ελαίου πλούσια σε DHA περιλαμβάνουν τα είδη *Schizochytrium*, *Ulkenia*, *Isochrysis galbana*, *Chlorella pyrenoidosa*, *Chlorella ellipsoidea* και *Cryptocodinium* (Lang et al. 2020, Bhalamurugan, Valerie and Mark 2018, Xue et al. 2018, Finco et al. 2016, Zvi Cohen, Ph. D and Ratledge, 2005).

Η μέση συγκέντρωση καροτενοειδών των φυκών είναι 0,1–2 % του ξηρού βάρους, αν και υπάρχουν εξαιρέσεις (Roy and Pal, 2014). Μέχρι σήμερα, η ασταξανθίνη χρησιμοποιείται κυρίως στον κλάδο της ιχθυοκαλλιέργειας ως πρόσθετο συστατικό, για να βελτιώσει το χρώμα των εκτρεφόμενων ιχθύων και γαριδών, πέραν της παραγωγής καλής ποιότητας θαλασσινών. Η προσθήκη της ασταξανθίνης βελτιώνει το επίπεδο ανάπτυξης και επιβίωσης των προνυμφών στην υδατοκαλλιέργεια, καθώς επίσης την

αναπαραγωγική απόδοση και την ποιότητα του αυγού των υδρόβιων ζώων εξαιτίας της ισχυρής αντιοξειδωτικής του δράσης. Έχει επίσης αποδειχθεί αποτελεσματική ανθεκτικότητα και ανοσοποιητική απόκριση ενάντια σε μολυσματικές ασθένειες στα εκτρεφόμενα ψάρια (Camacho et al., 2019). Τα πρώτα που είχαν εγκριθεί για την άμεση χρήση τροφής στον άνθρωπο, καθώς και για ζωοτροφές ήταν τα *Spirulina* sp. και *Chlorella* sp. (Patras et al, 2019). Το *Dunaliella* sp. έχει επίσης εγκριθεί για την παραγωγή β-καροτενίου και ο *Haematococcus* sp. για ασταξανθίνη, και συνιστώνται ως πρόσθετα τροφίμων (Patras et al, 2019). Για παράδειγμα, η ποσότητα β-καροτένης που παρήχθη από τη *Dunaliella bardawil* ήταν 1.65 µg/κύτταρο με μία αγορά αξίας περίπου 0.6 US\$ ανά 1,000 mg β-καροτένης (Bhalamurugan et al., 2018). Το *Haematococcus pluvialis* παρήγαγε 35 mg/g ασταξανθίνης με αξία αγοράς που φθάνει περίπου τα 1.8 US\$ για 1,000 mg ασταξανθίνης (Bhalamurugan, Valerie and Mark, 2018). Η ποσότητα ζεαξανθίνης που παράγεται από το είδος *Scenedesmus almeriensis* ήταν 0.34 mg/ g με μία αγορά αξίας περίπου 10 US\$ ανά 1,000 mg (Bhalamurugan, et al, 2018). Τέλος, η ποσότητα λουτεΐνης που παράγεται από το μικροφύκος *Scenedesmus almeriensis* ήταν 4.77 mg/L/d, με 1,000 mg λουτεΐνης από πηγή μικροφυκών που κόστιζε περίπου 2.5 US\$ (Bhalamurugan, et al, 2018)(Πιν.1.9).

Πίνακας 1.9. Λίστα των καροτενοειδών που είναι πιθανό να περιέχουν επιλεγμένα μικροφύκη (Parisi et al., 2016).

Πηγή μικροφύκους	Ενεργό συμπλήρωμα
<i>Dunaliella salina</i>	Β-καροτένη
<i>Haematococcus pluvialis</i>	Ασταξανθίνη,κανθαξανθίνη, λουτεΐνη
<i>Chlorella vulgaris</i>	Κανθαξανθίνη,ασταξανθίνη
<i>Coelastrella var. multistriata</i>	Κανθαξανθίνη,ασταξανθίνη,β-καροτένη
<i>Scenedesmus almeriensis</i>	Λουτεΐνη, β-καροτένη

Η βιομάζα μικροφυκών όχι μόνο ενισχύει την ανάπτυξη αλλά και την γαστρεντερική μορφολογία σε διάφορα θαλάσσια ψάρια (Perera et al.,2020;Camacho-Rodríguez et al.,

2017). Ευρήματα μελέτης υποδηλώνουν ότι τα συμπληρώματα διαιτητικών μικροφυκών σε ποσοστό 5% άλλαξαν τα επίπεδα της μικροβιακής εντερικής χλωρίδας, αλλά όχι τη συνολική δομή της εντός του εντέρου της ιριδίζουσας πέστροφας (Sarker et al., 2020, Lyons et al., 2016). Το κυτταρικό τοίχωμα, το οποίο αντιπροσωπεύει περίπου το 10% ξηράς ουσίας στα μικροφύκη, θέτει ένα σοβαρό πρόβλημα στην πέψη/χρήση της βιομάζας των μικροφυκών, μιας και δεν είναι εύπεπτο για ανθρώπους και άλλα μη μηρυκαστικά ζώα συμπεριλαμβανομένων των ιχθύων (Becker, 2007). Η διάσπαση του κυτταρικού τοιχώματος του *Chlorella vulgaris* και του *Nannochloropsis gaditana* έχει αναφερθεί ότι βελτιώνει την πεπτικότητα των θρεπτικών συστατικών στον σολομό του Ατλαντικού (*Salmo salar* L.) και την πεπτικότητα πρωτεϊνών και λιπών στην τιλάπια του Νείλου (*Oreochromis niloticus*) αλλά μπορεί να προκαλέσει την απελευθέρωση αντιθρεπτικών ενώσεων. Για την αποφυγή τους εφαρμόζεται μηχανική, θερμική, χημική, ενζυματική, μικροκυματική ή υπερηχογραφική επεξεργασία (Yarnold et al., 2019).

Οι τροφές μικροφυκών χρησιμοποιούνται σήμερα κυρίως για την καλλιέργεια προνυμφών και νεαρών κοραλλιών και ψαριών, καθώς και για την εκτροφή του ζωοπλαγκτόν που απαιτείται για τη διατροφή των νεαρών ζώων (τεχνική του πράσινου νερού) (Enzing et al., 2014). Τα μικροφύκη που χρησιμοποιούνται συνήθως στην υδατοκαλλιέργεια είναι τα *Chlorella* sp., *Tetraselmis* sp., *Isochrysis* sp., *Pavlova* sp., *Phaeodactylum* sp., *Chaetoceros* sp., *Nannochloropsis* sp., *Skeletonema* sp. και *Thalassiosira* sp (Patras et al 2019, Parisi et al. 2016). Στην υδατοκαλλιέργεια, τα μικροφύκη χρησιμοποιούνται ως νωπό προϊόν ή ως ξηρή βιομάζα και πελλέτα. Με αυτή την περίπτωση, η βιομάζα μικροφυκών πρώτα αποστραγγίζεται είτε από διήθηση, είτε διαλυμένη ικανότητα επίπλευσης αέρα, σβόλιασμα ή ιζηματογένεση και έπειτα

αποξηραίνεται για να σχηματιστούν πελλέτες ή να χορηγηθούν απευθείας στα ζώα (Orozco Colonia, Vinícius de Melo Pereira and Soccol 2020, Adarme-Vega et al. 2012).

Τα μικροφύκη θα μπορούσαν να υποκαταστήσουν επιτυχώς τα ιχθυέλαια και ιχθυάλευρα των ιχθυοτροφών στοχεύοντας στην ενίσχυση της βιωσιμότητας και της περιβαλλοντικής αειφορίας καθώς και την αύξηση της επάρκειας πρώτων υλών που προορίζονται για παρασκευή ιχθυοτροφών (Έκθεση επιλογής μικροφυκών για ιχθυοτροφές, 8/1/2019, ΕΣΠΑ 2014-2020, Zhu et al., 2020, Reis et al., 2021). Εάν τα μικροφύκη χρησιμοποιούνταν για να αντικαταστήσουν το ιχθυάλευρο και ιχθυέλαιο παγκοσμίως, η επίδραση θα ήταν να ελαχιστοποιηθεί η αλιευτική πίεση κατά 30% και θα συνέβαλε σε μία επανάκτηση των θαλάσσιων οικοσυστημάτων (Beal et al., 2018). Συγκεκριμένες μελέτες απέδειξαν ότι η ολική αντικατάσταση του ιχθυελαίου από ένα μείγμα ελαίων μικροφυκών, πλούσιο σε ω-3 LC-PUFA, δεν επηρέασε αρνητικά την ανάπτυξη και τον ηπατικό μεταβολισμό των λιπιδίων της τσιπούρας σε στάδια juvenile και fingerling (Alcaraz et al. 2021, Carvalho et al. 2021, Carvalho et al. 2020). Σε παγκόσμια κλίμακα, η αντικατάσταση ιχθυαλεύρου από άλευρο μικροφυκών θα χρειαστεί σχεδόν 10 φορές περισσότερο χρηματικό κεφάλαιο και γη, για ένα σύνολο των \$30 δισεκατομμυρίων και 111.000 εκταρίων (Beal et al., 2018).

Η αγοραστική αξία της βιομάζας φυκών ποικίλλει και έχουν αναφερθεί εύρη τιμών 100€/kg για ανθρώπινη κατανάλωση, 5–20€/kg για ζωοτροφές και ιχθυοτροφές, 1–5€/kg για χημικές ουσίες και 0,40€/kg για βιοκαύσιμα (Sathasivam et al.,2019). Για παράδειγμα, οι τιμές του *Cryptocodinium cohnii* και του *Chlorella* sp., οι οποίες μπορούν να αξιοποιηθούν ως πρώτη ύλη για την παραγωγή ελαίου πλούσιων σε PUFAs, θα μπορούσαν να ανέλθουν σε 36 ευρώ/Kg και 43 ευρώ/Kg, αντίστοιχα (Lu et al.,2021).

Το 1999, η παραγωγή μικροφυκών για την υδατοκαλλιέργεια ανήλθε σε 1000 τόνους (62% για τα μαλάκια, 21% για τις γαρίδες και 16% για τα ψάρια) για μια παγκόσμια παραγωγή υδατοκαλλιέργειας 43×10^6 τόνων φυτών και ζώων (Enzing et al., 2014). Υπολογίζεται ότι περίπου το 30% της παρούσας παγκόσμιας παραγωγής μικροφυκών πωλείται για χρήση ζωοτροφής (Enzing et al. 2014, Becker 2007). Σήμερα καλλιεργούνται σε βιομηχανική κλίμακα, ιδιαίτερα τα είδη *Dunaliella salina* p., *Spirulina platensis*, *Haematococcus pluvialis* ή *Chlorella vulgaris* (Remize et al.,2021, Pulcini et al.,2020, Patras et al., 2019; Shah et al.,2017). Υπάρχουν περίπου 110 εμπορικοί παραγωγοί μικροφυκών στην περιοχή Ασίας-Ειρηνικού, με παραγωγή περίπου 5.000 τόνων/έτος ξηρής βιομάζας. Η αγορά προϊόντων φυκών αναμένεται να αυξηθεί με σύνθετο ετήσιο ρυθμό ανάπτυξης (CAGR) 5% έως το 2023 (Nethravathy, et al.,2019). Στην Ευρώπη υπάρχουν 225 εταιρείες παραγωγής με μακροφύκη (67%) και μικροφύκη (33%)(Araújo et al.,2021). Η Ισπανία, η Γαλλία και η Ιρλανδία στηρίζουν τον μεγαλύτερο αριθμό μακροφυκών και μικροφυκών εταιρειών ακολουθούν η Νορβηγία, το Ηνωμένο Βασίλειο, η Γερμανία και η Πορτογαλία. Οι μεγαλύτεροι όγκοι βιομάζας φυκών στην Ευρώπη παράγονται από τη Νορβηγία, τη Γαλλία και την Ιρλανδία (Araújo et al.,2021). Η Γερμανία, η Γαλλία και η Ισπανία φιλοξενούν τον μεγαλύτερο αριθμό παραγωγών μικροφυκών στην Ευρώπη (Araújo et al.,2021).

Η παραγωγή PUFA από τη βιοτεχνολογία μικροφυκών είναι μια εναλλακτική προσέγγιση και σήμερα το μικροφυκικό DHA από το *Cryptocodinium* και το *Ulkenia* είναι εμπορικά διαθέσιμο από τις εταιρείες Martek (ΗΠΑ) και Nutrinova (Γερμανία) (αντίστοιχα), για εφαρμογή σε παρασκευάσματα για βρέφη, συμπληρώματα διατροφής και λειτουργικά τρόφιμα (Ratlidge, 2013, Enzing et al., 2014). Η OmegaTech (ΗΠΑ), που ανήκει στη Martek, εκμεταλλεύεται το *Schizochytrium* για την παραγωγή ενός ελαίου

χαμηλού κόστους που περιέχει περίπου 18% DHA (κατά βάρος) και το προϊόν αυτό ήταν γνωστό ως DHA Gold ευρέως χρησιμοποιούμενο στην υδατοκαλλιέργεια (Bartek et al. 2021, Tocher 2015, Spolaore et al. 2006). Η DSM (Ολλανδία) και η Evonik Industries (Γερμανία) ξεκίνησαν το 2018 το εγχείρημα του προϊόντος-ελαίου Veramaris® που χρησιμοποιεί ένα στέλεχος *Schizochytrium* και παράγει EPA και DHA (Dineshbabu et al. 2019, Tocher et al., 2019). Οι Santigosa et al., 2021 απέδειξαν ότι η τσιπούρα που τρεφόταν με ιχθυοτροφές που παρασκευάζονταν χωρίς ιχθυέλαιο και η χρήση 3,5% ελαίου μικροφυκών Veramaris® ως πηγή EPA και DHA απέδωσε την ίδια ανάπτυξη με τις ιχθυοτροφές και παρασκευάζονται με 13,79% ιχθυελαίου. Τέλος, το AlgaPrime, ένα προϊόν από την Corbion (Ολλανδία) ισχυρίζεται ότι ένας μετρικός τόνος του εμπορικού DHA ισοδυναμεί με την εξοικονόμηση 40 μετρικών τόνων ψαριών (Dineshbabu et al., 2019).

1.3.1. Το γένος *Schizochytrium* sp.



Εικόνα 1.2. Άποψη ελαίου και αλεύρου που προέρχεται από το γένος *Schizochytrium* (αρχείο συγγραφέα)

Το γένος *Schizochytrium* ανήκει στην οικογένεια Thraustochytriaceae του φύλου Heterokonta (Yokoyama & Honda 2007) (Εικ.1.2.). Πρόκειται για μονοκύτταρα

ετερότροφα δινωμαστιγωτά πρώτιστα του θαλάσσιου περιβάλλοντος. Η βιομάζα *Schizochytrium* sp. περιέχει συνήθως υψηλά επίπεδα λιπιδίων (55-75% σε ξηρή ουσία), έως και 49% DHA (Ren et al. 2012, Kousoulaki et al. 2015) και φαίνεται να είναι μια καλή πηγή DHA για τα εκτρεφόμενα είδη ψαριών (Πιν.1.10). Αρκετά προϊόντα πλούσια σε DHA (lifesDHA, DHAgold, Algamac, PureOne) είναι πλέον εμπορικά διαθέσιμα σε έλαια, σκόνες ή κάψουλες για φαρμακευτικά προϊόντα και συμπληρώματα και για ιχθυοτροφές και ζωοτροφές (Kousoulaki et al.,2016).Επίσης, το *Schizochytrium* sp. είναι πλούσιο σε μεθειονίνη και λυσίνη (Kousoulaki et al.,2016).

Πίνακας 1.10. Βιοχημική και θρεπτική σύσταση της βιομάζας *Schizochytrium* sp.(% της βιομάζας) (Hart et al.,2020).

Θρεπτική σύσταση	% της βιομάζας
Ξηρά ουσία	97,8
Τέφρα	8,6
Πρωτεΐνη	11,9
Λίπος	63,6
Υδατάνθρακες	13,7
Ινώδεις ουσίες	3,8
DHA	33,2
EPA	0,70

Το *Schizochytrium* sp. συνθέτει DHA μέσω "αναερόβιων" συνθεσάσεων πολυκετιδίων (PKSs). Κατά συνέπεια, διαλυμένο οξυγόνο (DO) προτιμάται για την παραγωγή DHA, στην αρχή σε υψηλό επίπεδο για πολλαπλασιασμό των κυττάρων και στη συνέχεια σε χαμηλό επίπεδο για συσσώρευση λίπους (Ganuza et al. 2007, Chang et al. 2013). Τα στελέχη του *Schizochytrium* μπορούν να καλλιεργηθούν με διαφορετικά σάκχαρα όπως γλυκόζη, φρουκτόζη, μαννόζη και γαλακτόζη ως πηγές άνθρακα (Sahin et al.,2018). Είναι από καιρό γνωστό ότι το *Schizochytrium* μπορεί να αναπτυχθεί πολύ καλά στη γλυκερόλη(Ganuza et al.,2008, Barclay et al.,2010, Ling et al.,2015). Υπό συνθήκες καλλιέργειας με γλυκόζη και άζωτο και με έλεγχο των επιπέδων γλυκόζης, pH και οξυγόνου, ορισμένα στελέχη έχει αποδειχθεί ότι αναπτύσσονται σε πυκνότητα

βιομάζας 200 g / L σε σύντομους κύκλους ζύμωσης 90-100 h, συσσωρεύοντας 40-45 g / L DHA (Chi et al.,2009). Η μέγιστη απόδοση DHA και βιομάζα του *S. limacinum* έχει επιτευχθεί σε pH 7 (Sahin et al.,2018). Σύμφωνα με μια μελέτη, στην οποία χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικές συγκεντρώσεις θαλασσινού νερού, η μείωση της αλατότητας από 28 σε 18% οδήγησε σε υψηλότερη συσσώρευση DHA (Samuelsen et al.,2018).

Το *Schizochytrium* έχει υποκαταστήσει με επιτυχία το ιχθυέλαιο και το ιχθυάλευρο και συγκεκριμένα το είδος *Schizochytrium limacinum* στη διατροφή της *Sparus aurata* και πολλών άλλων εκτρεφόμενων ιχθύων (Kissinger et al., 2016, Seong et al., 2019, Hart et al. 2020) (Πιν.1.11.).

Πίνακας 1.11. Επίπεδα υποκατάστασης ιχθυαλεύρου και ιχθυελαίου από *Schizochytrium* sp. στη διατροφή εκτρεφόμενων ιχθύων.

Είδος ιχθύος	Είδος μικροφύκους	Αντικατάσταση	Αναφορές
<i>Paralichthys olivaceus</i>	Μείγμα <i>Nannochloropsis</i> (50%)+ <i>Schizochytrium limacinum</i> (50%)	100% ιχθυελαίου (μικρή αλλαγή στα λιπαρά οξέα μωών, αύξηση ω-3/ω-6)	(Qiao et al., 2014)
<i>Salmo salar</i>	<i>Schizochytrium</i> sp.	Ένταξη 50g/kg (αύξηση ανάπτυξης μωών, καμία εναπόθεση λίπους στα σπλάχνα, έντονη ερυθρότητα στο φιλέτο)	(Kousoulaki et al.,2016; Kousoulaki et al., 2020)
<i>Ictalurus punctatus</i>	<i>Schizochytrium</i> sp.	Προσθήκη 2% (αύξηση ω-3 λιπαρών οξέων, βελτίωση γεύσης φιλέτου)	(Li et al.,2009)
<i>Epinephelus lanceolatus</i>	Μείγμα σογιάλεου+SPC(συμπύκνωμα πρωτεΐνης σόγιας)+ <i>Schizochytrium limacinum</i>	40% αντικατάσταση ιχθυαλεύρου (δεν επηρεάστηκε η ανάπτυξη)	(Jorge,2016)
<i>Seriola rivoliana</i>	Μείγμα SPC (συμπύκνωμα πρωτεΐνης σόγιας) + <i>Schizochytrium limacinum</i> + <i>Haematococcus pluvialis</i>	80% αντικατάσταση ιχθυαλεύρου (επιτυχής)	(Perez-Velazquez et al.,2018)
<i>Oreochromis niloticus</i>	<i>Schizochytrium</i> sp.	Ένταξη 40g/kg τροφής υποκαθιστώντας το ιχθυέλαιο (καλύτερη ανάπτυξη, αύξηση ω-3 λιπαρών οξέων και DHA)	(Sarker et al., 2016; dos Santos et al., 2019)
<i>Pagrus major</i>	<i>Schizochytrium</i> sp.	Βέλτιστο επίπεδο ένταξης: 50g/kg-100g/kg τροφής Ολική αντικατάσταση ιχθυαλεύρου και ιχθυελαίου από 11% <i>Schizochytrium limacinum</i> (δεν επηρέασε την ανάπτυξη)	(Seong et al., 2020)
<i>Onchorhynchus mykiss</i>	<i>Schizochytrium limacinum</i>	5% αντικατάσταση ιχθυελαίου (επηρέασε θετικά την ανάπτυξη και άλλαξε το εντερικό μικροβίωμα)	(Jorge,2016)

1.3.2. Το γένος *Nannochloropsis* sp.



Εικόνα 1.3. Άποψη ελαίου και αλεύρου που προέρχεται από το γένος *Nannochloropsis* (αρχείο συγγραφέα)

Τα *Nannochloropsis* sp., ανήκουν στην τάξη Eustigmatophyceae, και είναι ευκαρυωτικά μονοκύτταρα φύκη παγκοσμίως κατανομημένα (Εικ.1.3.). Το γένος σχηματίζεται από έξι είδη μορφολογικά παρόμοια, γεγονός που καθιστά δύσκολη την ταυτοποίησή τους (Jorge,2016). Κάθε είδος διαθέτει πολλά στελέχη. Μετρούν μεταξύ 2 και 5 μm (Sevgili et al.,2019) και απαντώνται συχνά στην ανοικτή θάλασσα. Πέντε από αυτά (*Nannochloropsis oculata*, *Nannochloropsis salina*, *Nannochloropsis granulate*, *Nannochloropsis oceanica*, και *Nannochloropsis gaditana*) βρίσκονται σε θαλάσσια οικοσυστήματα και μόνο ένα (*Nannochloropsis limnetica*) κατοικεί στα γλυκά νερά. Το φύκος είναι πικοπλαγκτονικό (Jorge,2016). Τα κύτταρα *Nannochloropsis* αναπαράγονται ασεξουαλικά, διαιρώντας για να αποδώσουν δύο θυγατρικά κύτταρα που στη συνέχεια ρίχνουν το μητρικό τους κυτταρικό τοίχωμα (Scholz et al.,2014). Η βιομάζα κυτταρικού τοιχώματος *N. gaditana* είναι κυρίως κυτταρίνη (Scholz et al.,2014).

Το *Nannochloropsis* είναι γνωστό ως πηγή διαφόρων πολύτιμων χρωστικών ουσιών, όπως η χλωροφύλλη α, η ζεαξανθίνη, η κανθαξανθίνη και η ασταξανθίνη που παράγονται σε υψηλά επίπεδα, και αναγνωρίζεται επίσης ως καλή πηγή EPA (20:5x3). (Cerezuela et al.,2012). Συγκεκριμένα, το μικροφύκος *Nannochloropsis* sp. είναι γνωστό ότι περιέχει κυρίως EPA και σχεδόν καθόλου DHA (Haas et al.,2015). Το *Nannochloropsis* σχηματίζεται από πολύτιμες θρεπτικές ενώσεις όπως το 38% υδατάνθρακες, 29% ακατέργαστες πρωτεΐνες, 18% λιπίδια, 3% μικροστοιχεία, 17,4% λιπαρά οξέα, 0,29% χλωροφύλλες και 0,06% καροτενοειδή (Jorge,2016; Jorge et al.,2019; Batista et al.,2020)(Πιν.1.12). Η ανόργανη ύλη (τέφρα) ήταν υψηλότερη (> 30%) στη *N. oceanica* (Batista et al., 2020) . Η αργινίνη ήταν το πιο άφθονο απαραίτητο αμινοξύ (ΟΛΓ) στη *N. salina* (13,35%) με βάση τα ολικά αμινοξέα (AAs) (Chen et al.,2019). Από τα 6 γνωστά είδη, τα *N. oculata*, *N. gaditana* και *N. salina* περιέχουν κυρίως C16 λιπαρά οξέα ενώ το *N. limnetica* περιέχει κυρίως C18 λιπαρά οξέα. Το *N. limnetica* σε σύγκριση με άλλα στελέχη μπορεί να οφείλεται στις διαφορετικές συνθήκες καλλιέργειας ως *N. limnetica* καλλιεργήθηκε σε γλυκό αντί για θαλασσινό νερό (Ma et al.,2016).

Πίνακας 1.12. Θρεπτική σύσταση του μικροφύκου *Nannochloropsis* sp. (Jorge, 2016).

Θρεπτική σύσταση	(% ξηράς ουσίας)
Ξηρά ουσία	87,51
Ολική πρωτεΐνη	53,07
Ολικό λίπος	2,17
Τέφρα	18,46

Ένας από τους κύριους περιορισμούς στη μεγάλης κλίμακας παραγωγή αυτών των μικροφυκών είναι το υψηλό κόστος του μέσου καλλιέργειας που υποστηρίζει την ανάπτυξη του *Nannochloropsis* sp., το οποίο χρειάζεται εντατική εργασία (Jorge,2016). Τα στελέχη *Nannochloropsis* έχουν καλλιεργηθεί με επιτυχία χρησιμοποιώντας αέρια σε κλειστό ανοιχτό διάδρομο 8000 L λίμνες (Ma et al.,2016; Riveros et al.,2017). Το *N. gaditana* μπορεί να καλλιεργηθεί σε εξωτερικούς χώρους με ρυθμούς αραίωσης έως και 0,4 ανά ημέρα κάτω από διαφορετικές περιβαλλοντικές συνθήκες καθ' όλη τη διάρκεια του έτους, με αυτό το είδος να είναι ανεκτικό σε χαμηλές θερμοκρασίες (17°C) και ακτινοβολία άνω των 500 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$ σε θερμοκήπιο για μεγιστοποίηση της παραγωγικότητας σε EPA (Ma et al.,2016; Marudhupandi et al.,2016). Έχει αποδειχθεί ότι η υψηλότερη παραγωγικότητα EPA (7,66 mg/L ημέρα) επιτεύχθηκε κάτω από καλλιέργεια γεμάτη άζωτο, καθώς η EPA υπάρχει κυρίως σε γλυκολιπίδια και φωσφολιπίδια (Ma et al.,2016). Το κατάλληλο εύρος αλατότητας του *N. oculata* έχει τεκμηριωθεί μεταξύ 10 ωρών και 35 ωρών και το βέλτιστο για ανάπτυξη ήταν 25 ώρες υπό συνθήκες γεμάτες θρεπτικά συστατικά, ενώ αυξήθηκε καλύτερα στις 35 ώρες μετά από έλλειψη αζώτου (Ma et al.,2016). Ο φωτισμός με τη χρήση ενός δυαδικού συνδυασμού LED-Blue και LED-Red θα μπορούσε να ενισχύσει την παραγωγικότητα EPA του *N. oceanica* CY2 σε 13,24 mg/L*d και να μειώσει σημαντικά την απόδοση κατανάλωσης ηλεκτρικής ενέργειας του EPA (ECY) σε σύγκριση με τη χρήση μονόχρωμων λαμπτήρων LED ή συμβατικών λαμπτήρων TL5(Chen et al.,2015; Borges et al.,2016; Matsui et al.,2020).

Η απολιπασθείσα βιομάζα που προέρχεται από μικροφύκη έχει τη δυνατότητα να χρησιμοποιηθεί ως συστατικό ιχθυοτροφών (Gong et al.,2017). Αρκετές μελέτες

επικεντρώθηκαν σχετικά με τη θρεπτική αξία του *Nannochloropsis* για διαφορετικά υδρόβια ζώα και ψάρια (Πίν.1.13) (Zanella and Vianello, 2020).

Πίνακας 1.13. Επίπεδα υποκατάστασης ιχθυαλεύρου και ιχθυελαίου από *Nannochloropsis* sp. στη διατροφή υδρόβιου οργανισμού.

Είδος υδρόβιου οργανισμού	Είδος μικροφύκου	Αντικατάσταση	Αναφορές
<i>Marsupenaus japonicus</i> Προνυμφικό και μεταπρονυμφικό στάδιο	<i>Nannochloropsis</i> sp.	Ένταξη 40g/kg τροφής, υποκατάσταση 14% ιχθυελαίου (βέλτιστη ανάπτυξη)	(Adissin et al.,2019)
<i>Marsupenaus japonicus</i> Στάδιο juvenile	<i>Nannochloropsis</i> sp.	Υποκατάσταση 26,33% ιχθυελαίου, βέλτιστο επίπεδο 1,58g λίπους φυκών (δεν επηρέασε την ανάπτυξη και τα λιπαρά οξέα)	(Oswald et al.,2019)
<i>Scophthalmus maximus</i>	<i>Nannochloropsis</i> sp.	Ένταξη έως και 10% (δεν επηρέασε αρνητικά η ανάπτυξη και το προφίλ αμινοξέων στο μυϊκό ιστό)	(Qiao et al.,2019)
<i>Dicentrarchus labrax</i> Στάδιο juvenile	<i>Nannochloropsis</i> sp. (8,4%)	50% υποκατάσταση ιχθυελαίου (δεν επηρέασε αρνητικά την ανάπτυξη και την μορφολογία και λειτουργία ήπατος και εντέρου)	(Haas et al.,2015; Jorge,2016)
<i>Dicentrarchus labrax</i>	<i>Nannochloropsis</i> sp.	Υποκατάσταση έως 15% ιχθυαλεύρου (δεν επηρέασε την ανάπτυξη)	(Eryalçin et al., 2015; Castro et al.,2022)
<i>Sciaenops ocellatus</i>	<i>Nannochloropsis</i> sp.	Υποκατάσταση έως 10% ιχθυαλεύρου+SPC (συμπύκνωμα πρωτεΐνης σόγια) (δεν επηρέασε την ανάπτυξη)	(Batista et al.,2020)
<i>Salmo salar</i>	<i>Nannochloropsis oceanica</i>	Ένταξη έως και 10% χωρίς αρνητικές επιπτώσεις στην ανάπτυξη	(Batista et al.,2020)
<i>Salmo salar</i> Στάδιο smolt	<i>Nannochloropsis oceanica</i>	Ένταξη έως και 30% (υψηλή πεπτικότητα τροφής)	(Sørensen et al.,2017)
<i>Gadus morhua</i>	Μείγμα <i>Nannochloropsis</i> (14%) + <i>Isochrysis</i> sp. (28%)	Παρατηρήθηκε μειωμένη πρόσληψη τροφής	(Batista et al.,2020)
<i>Anarhichas minor</i>	<i>Nannochloropsis oceanica</i>	Υποκατάσταση έως και 15% χωρίς επίδραση στην ανάπτυξη	(Knutsen et al.,2019)
<i>Morone</i> sp.	Μείγμα <i>Phaeodactylum tricornutum</i> + <i>Nannochloropsis salina</i>	Αντικατάσταση έως και 15% (δεν επηρέασε την ανάπτυξη)	(de Cruz et al.,2018)

1.4. Σκοπός έρευνας

Ο κλάδος της υδατοκαλλιέργειας αναπτύσσεται την τελευταία δεκαετία με ταχύτατους ρυθμούς. Οι ιχθυοτροφές αποτελούν ένα αναπόσπαστο κομμάτι του κλάδου αυτού. Εξαιτίας της έντονης υπεραλίευσης, τα ιχθυαποθέματα, οι βασικές πρώτες ύλες των ιχθυοτροφών πλούσιες σε πρωτεΐνη και λίπος, ολοένα και μειώνονται. Η βιομηχανία παρασκευής ιχθυοτροφών προχωράει σε μία άλλη τακτική όπου το ιχθυέλαιο μπορεί να αντικατασταθεί από άλλες πηγές λίπους φιλικές προς το περιβάλλον και όσο το δυνατόν πιο οικονομικές για την ιχθυοκαλλιέργεια.

Η συγκεκριμένη μελέτη επικεντρώνεται στα μικροφύκη, ως υποκατάστατα του ιχθυελαίου, διότι περιέχουν επαρκείς ποσότητες EPA και DHA, απαραίτητες για την ανάπτυξη των εκτρεφόμενων ιχθύων. Σκοπός της παρούσας έρευνας είναι να διερευνηθεί η επίδραση της αντικατάστασης του διαιτητικού ιχθυελαίου από μείγμα ελαίου μικροφυκών *Schizochytrium* και *Microchloropsis*, τα οποία είτε προέρχονται από το εμπόριο ή από καλλιέργεια με χρήση οργανικών λυμάτων, στην ανάπτυξη της τσιπούρας. Επομένως, πραγματοποιήθηκε καταρτισμός των σιτηρεσίων που να καλύπτουν τις διατροφικές απαιτήσεις της τσιπούρας.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Πειραματικός σχεδιασμός

Με σκοπό την διεξαγωγή του πειράματος, μεταφέρθηκαν ιχθύδια του είδους *Sparus aurata* με αρχικό μέσο βάρος $3,16 \pm 0,03$ g, με την βοήθεια ειδικών δεξαμενών με παροχή οξυγόνου, από τον ιχθυογεννητικό σταθμό «Philosofish ΙΧΘΥΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ Α.Ε.» στη Πελασγία Φθιώτιδος, με τελικό προορισμό τις εγκαταστάσεις του Τμήματος Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος της Σχολής Γεωπονικών Επιστημών στο Βόλο. Κατόπιν, τα ιχθύδια τοποθετήθηκαν σε πειραματικές δεξαμενές με περίοδο εγκλιματισμού 15 ημέρες, και η σίτισή τους γινόταν μία φορά την ημέρα και κάποια θανατώθηκαν για την πραγματοποίηση χημικών αναλύσεων σώματος και μυϊκού ιστού (αρχικό δείγμα). Το πείραμα διήρκησε συνολικά 49 ημέρες, (21 Οκτωβρίου-9 Δεκεμβρίου 2021).

Τα ιχθύδια, μετά τον εγκλιματισμό τους, τοποθετήθηκαν σε δεξαμενές κλειστού κυκλώματος κυκλοφορίας θαλασσινού νερού (Εικ.2.1). Συγκεκριμένα, οι πειραματικές εγκαταστάσεις αποτελούνταν από 9 ενυδρεία χωρητικότητας 120L σε σύστημα μηχανικής – βιολογικής διήθησης του νερού, για την απομάκρυνση της αμμωνίας, των περιττωμάτων και υπολειμμάτων τροφής. Καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος χρησιμοποιήθηκε νερό βρύσης στο οποίο προσθέτονταν συνθετικό αλάτι ώστε η αλατότητα του νερού να είναι 30‰. Σε καθημερινή βάση πραγματοποιούνταν σιφωνισμός του πυθμένα και αντικατάσταση του νερού έως και 10% του συνολικού όγκου του ενυδρείου. Επίσης, για την νιτροποίηση των αζωτούχων οργανικών ενώσεων, τοποθετούνταν τόσο στο νερό του ενυδρείου όσο και μέσα στα φίλτρα, διάλυμα βακτηρίων, ανά τακτά χρονικά διαστήματα.



Εικόνα 2.1. Άποψη δεξαμενών κλειστού κυκλώματος κυκλοφορίας θαλασσινού νερού Πανεπιστημίου Θεσσαλίας (προσωπικό αρχείο συγγραφέα).

Σε όλη τη διάρκεια του πειράματος πραγματοποιούνταν έλεγχος για τις φυσικοχημικές παραμέτρους του νερού. Γινόταν εβδομαδιαία καταγραφή των μετρήσεων για τη θερμοκρασία του νερού ($21\text{ }^{\circ}\text{C}$), το pH ($8,00 \pm 0,4$), την αλατότητα ($30 \pm 0,5\%$) και το διαλυμένο οξυγόνο ($>6,5\text{ mg/l}$) με τη χρήση φορητών ηλεκτρονικών οργάνων. Επιπρόσθετα, ανά τακτά χρονικά διαστήματα προσδιορίζονταν η συγκέντρωση της ολικής αμμωνίας ($<0,5\text{ mg/l}$), των νιτρικών και νιτρικών, με τη χρήση εμπορικών test-kits. Η τεχνητή φωτοπερίοδος που εφαρμόστηκε ήταν 12 ώρες φως – 12 ώρες σκότους με την εναλλαγή να πραγματοποιείται στις 08:00 και 20:00, αντίστοιχα.

Τα ιχθύδια διαχωρίστηκαν σε 3 διατροφικές ομάδες, όπου η κάθε μία λάμβανε και διαφορετικό σιτηρέσιο. Η κάθε διατροφική ομάδα αποτελούνταν από 54 ιχθύδια, τα οποία διαμοιράστηκαν σε 18 άτομα σε καθένα από τα 3 ενυδρεία (18 ιχθύδια ανά δεξαμενή, 3 ενυδρεία – επαναλήψεις ανά μεταχείριση, 3 διατροφικές ομάδες).

2.2 Σιτηρέσια – Σίτιση

Τα σιτηρέσια που χρησιμοποιήθηκαν παρασκευάστηκαν στις εγκαταστάσεις του τμήματος Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου περιβάλλοντος με την μέθοδο της κοινής πελλετοποίησης. Το σιτηρέσιο ήταν στην μορφή βυθιζόμενου σύμπηκτου με διάμετρο 1,5 mm. Η πελλετομηχανή που χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή του σιτηρεσίου ήταν τύπου California Pellet Mill (Εικ. 2.2.).



Εικόνα 2.2. Πελλετομηχανή τύπου California Pellet Mill.

Τα τρία σιτηρέσια καταρτίστηκαν με τέτοιο τρόπο ώστε να είναι ισοενεργειακά (21 MJ/Kg), ισοπρωτεϊνικά (50% της τροφής) και ισολιπιδικά (15% της τροφής) (Πιν. 2.1) και (Πιν. 2.2). Ως βασική πρωτεϊνική πηγή ζωικής προέλευσης και για τα τρία σιτηρέσια χρησιμοποιήθηκε υψηλής ποιότητας ιχθυάλευρο. Η τροφή μάρτυρας (FM) περιείχε 7% ιχθυέλαιο ως πηγή EPA και DHA. Για την υποκατάσταση του ιχθυελαίου στις λοιπές πειραματικές τροφές SMoS και SMcS χρησιμοποιήθηκε μείγμα από άλευρα μικροφυκών των ειδών *Microchloropsis gaditana* και *Schizochytrium* sp.. Στην πρώτη, το μίγμα μικροφυκών είχε καλλιεργηθεί στις εγκαταστάσεις του Τμήματος Φυτικής Παραγωγής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και συμπεριλήφθηκαν σε ποσοστά 5,05% και 5,15% της

τροφής αντίστοιχα. Στη δεύτερη τροφή το μίγμα προερχόταν από το εμπόριο και τα *Microchloropsis gaditana* και *Schizochytrium* συμπεριλήφθηκαν σε ποσοστά 2,50% και 1,05% της τροφής, αντίστοιχα. Στα σιτηρέσια, επίσης χρησιμοποιήθηκε γλουτένη σίτου, σογιάλευρο και ηλιάλευρο ως πρωτεϊνικές πηγές χερσαίας φυτικής προέλευσης και πηγές υδατανθράκων, σύμφωνα με τα μέσα επίπεδα χορήγησης φυτικών πρωτεϊνών σε εμπορικές τροφές της τσιπούρας. Επιπλέον, χρησιμοποιήθηκε άλευρο σίτου ως ενεργειακή πηγή και ως ενεργειακό αντιστάθμισμα των τριών ισοενεργειακών σιτηρεσίων.

Για τον εμπλουτισμό των τροφών χρησιμοποιήθηκαν μικροσυστατικά τα οποία διατηρήθηκαν σε σταθερές ποσότητες και στα τρία διαφορετικά σιτηρέσια και ήταν ένα εμπορικό πρόμιγμα βιταμινών και ανόργανων στοιχείων (για τσιπούρα και λαβράκι) με συμμετοχή 0,40%, MCP σε ποσοστό 1,4%, μεθειονίνη και λυσίνη σε κρυσταλλική μορφή (0,30% και 0,70% αντίστοιχα) καθώς και βιταμίνες E και C σε ποσοστό 0,05%.

Σε ολόκληρη την πειραματική περίοδο των 48 ημερών, η χορήγηση της τροφής γινόταν με το χέρι. Δεν χορηγούνταν τροφή όμως τις ημέρες Τετάρτη και Κυριακή μέχρι την 32^η μέρα του πειράματος που πραγματοποιήθηκε η 1^η ζύγιση (συνολικά 25 ημέρες ταισματος) και μέχρι την 49^η μέρα του πειράματος που διεξήχθη και η τελική ζύγιση (συνολικά 11 μέρες ταισματος). Η σίτιση γινόταν μέχρι κορεσμού (*ad libitum*) και λάμβανε χώρα δύο φορές την ημέρα, στις 10:00 π.μ. και στις 17:00 μ.μ.

Πίνακας 2.1. Θρεπτική σύσταση (% επί της νωπής ουσίας) των πειραματικών σιτηρεσίων

Θρεπτική σύσταση (%)	Control S	SMoS	SMcS
Υγρασία	9,70	9,67	9,59
Ξηρά ουσία	90,30	90,33	90,41
Ολικές αζωτούχες ενώσεις	49,32	49,60	49,21
Ολικές λιπαρές ουσίες	14,98	14,75	15,07
Υδατάνθρακες ¹	29,52	28,83	28,96
Τέφρα	6,18	6,81	6,76
Ενέργεια (KJ/g)	20,75	20,78	20,79

¹Το ποσοστό των υδατανθράκων εκτιμήθηκε με αφαίρεση από το 100 του συνόλου των ποσοστών πρωτεΐνης, λιπιδίων και τέφρας.

Πίνακας 2.2. Συστατικά και ποσοστά συμμετοχής στα πειραματικά σιτηρέσια

Συστατικά [g kg ⁻¹ DM]	ControlS	SMoS	SMcS
Ιχθυάλευρο	25.00	21.02	23.26
Σιτάρι, άλευρο	10.00	4.66	8.94
Ηλιάλευρο	5.55	4.40	5.85
Γλουτένη σίτου	18.35	19.89	18.35
Συμπύκνωμα σόγιας	25.20	24.86	25.20
Ιχθυέλαιο	7.00	5.95	5.95
Σογιέλαιο	6.00	6.00	6.00
<i>Schizochytrium</i> (Own culture)	0	5.15	0
<i>Microchloropsis</i> (Own culture)	0	5.05	0
Πρόμιγμα βιταμινών & ιχνοστοιχείων	0.40	0.40	0.40
MCP	1.40	1.40	1.40
Vit C	0.05	0.05	0.05
Vit E	0.05	0.05	0.05
Lys	0.30	0.30	0.30
Met	0.70	0.70	0.70
<i>Microchloropsis</i> (εμπορική)	0	0	2.50
<i>Schizochytrium</i> (εμπορική)	0	0	1.05

2.3. Δειγματοληψίες

Η εκτροφή των ιχθυδίων διήρκησε 7 εβδομάδες. Κατά τη διάρκεια αυτής της περιόδου πραγματοποιήθηκαν 3 δειγματοληψίες για μετρήσεις βάρους: στην έναρξη του πειράματος, την 32^η και μία τελική την 49^η ημέρα. Πριν την έναρξη κάθε δειγματοληψίας πραγματοποιούνταν ασιτία διάρκειας 24 ωρών. Για την αναισθητοποίηση των ψαριών χρησιμοποιήθηκε φαινοξυαιθανόλη σε συγκέντρωση 0,10 ml/l. Στη συνέχεια, ζυγίζονταν ατομικά κάθε ιχθύδιο σε ζυγό ακριβείας 2 δεκαδικών ψηφίων (0,01 g) και μετρούνταν το μήκος με ιχθυόμετρο (ακρίβεια 0,1 cm). Στην τελική μέτρηση (49^η ημέρα) τα ψάρια θανατώθηκαν παρατείνοντας την παραμονή τους στο αναισθητικό αυξανόμενης δοσολογίας και στη συνέχεια τοποθετήθηκαν σε πάγο.

2.4 Παράμετροι ανάπτυξης και αξιοποίησης της τροφής

2.4.1 Θνησιμότητα

Η καταγραφή της θνησιμότητας πραγματοποιούνταν σε καθημερινή βάση για κάθε δεξαμενή ξεχωριστά. Ο τύπος υπολογισμού της είναι:

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

2.4.2. Αύξηση ολικού βάρους ψαριών

Η αύξηση του ολικού βάρους είναι το καθαρό βάρος του σώματος των ψαριών που αποκτήθηκε κατά τη διάρκεια του πειράματος και υπολογίζεται από την παρακάτω σχέση:

$$\text{Αύξηση ολικού βάρους (g)} = W_t (\text{τελικό βάρος}) - W_a (\text{αρχικό βάρος})$$

2.4.3. Ποσοστό αύξησης του ολικού βάρους

Το ποσοστό αύξησης του ολικού βάρους αντιπροσωπεύει την εκατοστιαία (%) αύξηση του βάρους σώματος και υπολογίζεται ως εξής:

$$\text{Ποσοστό αύξησης βάρους (\%)} = [(W_{\text{τελικό}} - W_{\text{αρχικό}}) / W_{\text{αρχικό}}] \times 100$$

2.4.4. Συνολική κατανάλωση τροφής

Η συνολική κατανάλωση τροφής εκφράζει τη μέση κατανάλωση της τροφής ανά ψάρι κάθε διατροφικής ομάδας και υπολογίζεται ως εξής:

$$\text{Συν. Κατανάλωση} = \text{ολική κατανάλωση τροφής} / \text{αριθμός ψαριών (κάθε μεταχείρισης)}$$

2.4.5 Ειδικός ρυθμός αύξησης

Ο ειδικός ρυθμός ανάπτυξης (specific growth rate, SGR) εκφράζει την ημερήσια ποσοστιαία αύξηση του ολικού βάρους του ψαριού στο χρονικό διάστημα που σιτίστηκε και δίνεται από τη σχέση:

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

Όπου,

$\text{Ln}(W_2)$ = ο φυσικός λογάριθμος του τελικού ολικού βάρους

$\text{Ln}(W_1)$ = ο φυσικός λογάριθμος του αρχικού ολικού βάρους

2.4.6 Συντελεστής μετατρεψιμότητας της τροφής

Ο συντελεστής μετατρεψιμότητας της τροφής (food conversion ratio, FCR) εκφράζει το βαθμό αξιοποίησης της τροφής από τα ψάρια και δίνεται από τον λόγο της ποσότητας

της τροφής που χορηγήθηκε προς την αύξηση του ολικού βάρους τους. Ο συντελεστής μετατρεψιμότητας τροφής υπολογίζεται από τη σχέση:

$$FCR = \text{τροφή που χορηγήθηκε (g)} / \text{αύξηση βιομάζας των ζωντανών ιχθύων (g)}.$$

2.5. Στατιστική ανάλυση

Το στατιστικό πακέτο SPSS 17 χρησιμοποιήθηκε για την στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων. Τα δεδομένα των παραμέτρων όσον αφορά την ανάπτυξη και αξιοποίηση της τροφής των ιχθύων τσιπούρας (*Sparus aurata*) ελέγχθηκαν ως προς την κανονικότητα των κατανομών τους μέσω του Shapiro-Wilk test και για την ομοιομορφία των παραλλακτικότητων των μέσων όρων τους μέσω του Levene's test. Κατόπιν, πραγματοποιήθηκε η σύγκριση των μέσων όρων των διαφόρων παραμέτρων με τη μέθοδο της Ανάλυσης της Διακύμανσης Μονής Κατεύθυνσης (one-way ANOVA) και οι διαφορές κρίθηκαν στατιστικά σημαντικές για τιμές $p < 0,05$. Στις περιπτώσεις όπου η ANOVA έδειξε στατιστικά σημαντικές διαφορές, τα δεδομένα υποβλήθηκαν στο Tukey's test για τον εντοπισμό των διαφορών μεταξύ των διαφορετικών μεταχειρίσεων (Zar, 1999).

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1. Θνησιμότητα

Σε όλη τη διάρκεια του πειράματος σημειώθηκαν θνησιμότητες των ιχθυδίων όλων των διατροφικών ομάδων σε ποσοστό 5,00% (9 άτομα στο σύνολο των 162). Πιο αναλυτικά (Πιν. 3.1), στις 32 ημέρες για την CONTROL S διατροφική ομάδα καταγράφηκε ποσοστό θνησιμοτήτων $11,11 \pm 11,11\%$, για την SMoS διατροφική ομάδα $5,55 \pm 0,00\%$ και τέλος για την SMcS διατροφική ομάδα δεν υπήρξαν θνησιμότητες. Στις 49 ημέρες δηλαδή στο τέλος του πειράματος, για την CONTROL S διατροφική ομάδα καταγράφηκε ποσοστό θνησιμοτήτων $11,11 \pm 11,11\%$, για την SMoS διατροφική ομάδα $5,55 \pm 0,00\%$ και τέλος για την SMcS διατροφική ομάδα δεν υπήρξαν θνησιμότητες. Εν ολίγοις, το ποσοστό των θνησιμοτήτων δεν διαφοροποιήθηκε την 32^η μέρα του πειράματος σε σύγκριση με την 49^η και τελική μέρα διεξαγωγής του πειράματος. Η στατιστική επεξεργασία των δεδομένων έδειξε πως οι θνησιμότητες και των 3 ομάδων δεν διέφεραν σημαντικά μεταξύ τους ($P>0,05$) και ειδικά στην διατροφική ομάδα SMcS δεν παρατηρήθηκε καμία θνησιμότητα καθόλη τη διάρκεια του πειράματος.

Πίνακας 3.1. Ποσοστά επιβίωσης (% του συνολικού αρχικού πληθυσμού). Οι τιμές αντιπροσωπεύουν μέσους όρους \pm τυπική απόκλιση.

	Σιτηρέσια		
	CONTROL S	SMoS	SMcS
Επιβίωση % (32 ημέρες)	$88,89 \pm 9,07$	$94,45 \pm 0$	100,00
Επιβίωση % (49 ημέρες)	$88,89 \pm 9,07$	$94,45 \pm 0$	100,00

Σημ.: Δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των διαφορετικών διατροφικών ομάδων, στις θνησιμότητες των ψαριών ($P>0,05$).

3.2. Παράμετροι ανάπτυξης και αξιοποίησης της τροφής

3.2.1. Κατά την έναρξη του πειράματος

Το αρχικό μέσο βάρος των ιχθυδίων της διατροφικής ομάδας CONTROL S ήταν $3,17 \pm 0,02$, της διατροφικής ομάδας SMOs ήταν $3,19 \pm 0,07$ και τέλος της διατροφικής ομάδας SMcS ήταν $3,12 \pm 0,08$ κατά την έναρξη του διατροφικού πειράματος (Πιν. 3.2). Η στατιστική επεξεργασία των δεδομένων έδειξε πως τα αρχικά βάρη των ψαριών και από τις 3 ομάδες δεν διέφεραν σημαντικά μεταξύ τους ($P > 0,05$) με ελαφρώς χαμηλότερη τιμή στην ομάδα SMcS.

Πίνακας 3.2. Αρχικό μέσο βάρος (g) των ιχθύων κατά την έναρξη του πειράματος. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν μέσους όρους \pm τυπική απόκλιση.

Σιτηρέσια			
	CONTROL S	SMoS	SMcS
Αρχικό Βάρος (g)	$3,17 \pm 0,02$	$3,19 \pm 0,07$	$3,12 \pm 0,08$

Σημ.: Δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των διαφορετικών διατροφικών ομάδων, στα αρχικά βάρη των ψαριών ($P > 0,05$).

3.2.2. Αύξηση σωματικού βάρους την 32^η ημέρα πειράματος

Το μέσο βάρος των ψαριών κατά την 32^η ημέρα του διατροφικού πειράματος (Πιν. 3.3) ήταν $9,47 \pm 0,63g$ για τα άτομα που διατράφηκαν με το σιτηρέσιο CONTROL S, $8,73 \pm 0,29g$ για τα άτομα που διατράφηκαν με το σιτηρέσιο SMOs, ενώ για αυτά που διατράφηκαν με το σιτηρέσιο SMcS το μέσο βάρος τους ήταν $8,96 \pm 0,29g$. Η στατιστική επεξεργασία των δεδομένων έδειξε, ότι το βάρος των ψαριών και στα τρία σιτηρέσια δεν εμφάνισε στατιστικά σημαντικές διαφορές ($P > 0,05$) με την υψηλότερη τιμή να εντοπίζεται στην διατροφική ομάδα ControlS.

Η μέση αύξηση του σωματικού βάρους για την 32^η ημέρα του πειράματος ήταν $6,30 \pm 0,66\text{g}$ για τα άτομα της CONTROL S μεταχείρισης, $5,53 \pm 0,35\text{g}$ για τα άτομα της SMoS μεταχείρισης, ενώ για τα άτομα της SMcS μεταχείρισης η μέση αύξηση βάρους ήταν $5,84 \pm 0,22\text{g}$. Τα αποτελέσματα της στατιστικής επεξεργασίας δεν έδειξαν την ύπαρξη στατιστικά σημαντικών διαφορών μεταξύ των μεταχειρίσεων, όσον αφορά την αύξηση βάρους των ψαριών ($P>0,05$) με την υψηλότερη τιμή να παρατηρείται στην διατροφική ομάδα Controls.

Η συνολική πρόσληψη τροφής της κάθε διατροφικής ομάδας και η πρόσληψη τροφής ανά ψάρι υπολογίστηκαν ως $404,08 \pm 5,33\text{g}$ και $7,93 \pm 0,38\text{g}$, αντίστοιχα για τα άτομα της CONTROL S διατροφικής ομάδας, $416,57 \pm 5,67\text{g}$ και $7,93 \pm 0,32\text{g}$ για τα άτομα της SMoS διατροφικής ομάδας και τέλος $391,31 \pm 4,00\text{g}$ και $7,25 \pm 0,21\text{g}$ για την διατροφική ομάδα με το σιτηρέσιο SMcS. Η στατιστική επεξεργασία έδειξε ότι δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές και στις 3 διατροφικές ομάδες τόσο στη συνολική πρόσληψη τροφής όσο και στη πρόσληψη τροφής ανά ψάρι και να εμφανίζει την χαμηλότερη τιμή στην ομάδα SMcS και στις δύο περιπτώσεις ($P>0,05$).

Οι δείκτες SGR και FCR υπολογίστηκαν σε $3,52 \pm 0,24\%/ημέρα$ και $1,27 \pm 0,10$, αντίστοιχα για την ομάδα CONTROL S, $3,24 \pm 0,17\%/ημέρα$ και $1,44 \pm 0,11$ για την ομάδα SMoS και τέλος $3,40 \pm 0,05\%/ημέρα$ και $1,24 \pm 0,01$ για την ομάδα SMcS. Όσον αφορά τον δείκτη SGR και τον δείκτη FCR, η στατιστική ανάλυση έδειξε ότι δεν βρέθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των σιτηρεσίων με την SGR παράμετρο να εμφανίζει την χαμηλότερη τιμή στην μεταχείριση SMoS και την FCR παράμετρο την υψηλότερη τιμή στην μεταχείριση SMcS ($P>0,05$).

Πίνακας 3.3. Σωματικό βάρος (g) και αύξηση βάρους (g) των ιχθύων, κατανάλωση/ψάρι (g) και συνολική κατανάλωση (g), SGR (%/ημ) και FCR κατά την 32^η ημέρα του πειράματος. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν μέσους όρους \pm τυπική απόκλιση.

	CONTROL S	SMoS	SMcS
Σωματικό βάρος (g)	9,47 \pm 0,63	8,73 \pm 0,29	8,96 \pm 0,29
Αύξηση βάρους (g)	6,30 \pm 0,66	5,53 \pm 0,35	5,84 \pm 0,22
Κατανάλωση/ψάρι (g)	7,93 \pm 0,38	7,93 \pm 0,32	7,25 \pm 0,21
Συνολική κατανάλωση (g)	404,08 \pm 5,33	416,57 \pm 5,67	391,31 \pm 4,00
SGR (%/ημ)	3,52 \pm 0,24	3,24 \pm 0,17	3,40 \pm 0,05
FCR	1,27 \pm 0,10	1,44 \pm 0,11	1,24 \pm 0,01

Σημ.: Δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των διαφορετικών διατροφικών ομάδων, στις προαναφερθείσες παραμέτρους των ψαριών ($P > 0,05$).

3.2.3. Αύξηση σωματικού βάρους την 49^η ημέρα του πειράματος (τελική ζύγιση)

Κατά την 49^η και τελική ημέρα του πειράματος, το μέσο βάρος των ατόμων που διατράφηκαν με το σιτηρέσιο CONTROL S ήταν $12,71 \pm 1,02$ g, με το σιτηρέσιο SMoS ήταν $11,68 \pm 0,49$ g και τέλος με το SMcS $12,00 \pm 0,52$ g (Πιν. 3.4). Τα αποτελέσματα της στατιστικής επεξεργασίας έδειξαν ότι δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στο βάρος των ψαριών σε όλες τις μεταχειρίσεις ($P > 0,05$) με ελαφρώς χαμηλότερη τιμή να φαίνεται στην μεταχείριση SMoS .

Η μέση αύξηση του σωματικού βάρους ήταν $9,53 \pm 1,04$ g για τα άτομα της μεταχείρισης CONTROL S, $8,49 \pm 0,55$ g για τα άτομα της μεταχείρισης SMoS και $8,88 \pm 0,46$ g για τα άτομα της μεταχείρισης SMcS. Η στατιστική επεξεργασία των δεδομένων έδειξε ότι δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στην αύξηση του

σωματικού βάρους των ψαριών ($P>0,05$) με ελαφρώς υψηλότερη τιμή στην ομάδα ControlS.

Η πρόσληψη τροφής ανά ψάρι στο τέλος του πειράματος ήταν $10,27 \pm 0,37g$ για τα άτομα της CONTROL S διατροφικής ομάδας, $10,17 \pm 0,32g$ για αυτά της SMOs διατροφικής ομάδας και τέλος $9,61 \pm 0,28g$ για τα άτομα της SMcS διατροφικής ομάδας. Η στατιστική επεξεργασία έδειξε ότι η πρόσληψη τροφής ανά ψάρι δεν εμφάνισε στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων ($P>0,05$) με ελαφρώς χαμηλότερη τιμή στην ομάδα SMcS .

Η συνολική πρόσληψη τροφής των ψαριών στο τέλος του πειράματος ήταν $523,43 \pm 6,82g$ για τα άτομα της CONTROL S διατροφικής ομάδας, $534,16 \pm 5,55g$ για αυτά της SMOs διατροφικής ομάδας και τέλος $519,13 \pm 5,00g$ για αυτά της SMcS διατροφικής ομάδας. Η στατιστική ανάλυση έδειξε ότι δεν υπήρξαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων στην κατανάλωση τροφής των ψαριών ($P>0,05$) παρόλο που εντοπίστηκε υψηλότερη τιμή στην μεταχείριση SMOs.

Η μέση τιμή του ειδικού ρυθμού ανάπτυξης (SGR) ήταν $2,95 \pm 0,18\%/ημέρα$ για τα ψάρια της CONTROL S διατροφικής ομάδας, $2,76 \pm 0,13\%/ημέρα$ για τα ψάρια της SMOs διατροφικής ομάδας, και τέλος για τα ψάρια της SMcS διατροφικής ομάδας η μέση τιμή ήταν $2,86 \pm 0,05\%/ημέρα$. Τα αποτελέσματα της στατιστικής επεξεργασίας έδειξαν ότι η τιμή του ειδικού ρυθμού ανάπτυξης δεν διέφερε σημαντικά και στις 3 μεταχειρίσεις με ελαφρώς χαμηλότερη τιμή να παρατηρείται στην ομάδα SMOs ($P>0,05$).

Η μέση τιμή για τον συντελεστή μετατρεψιμότητας της τροφής (FCR) εκτιμήθηκε στο $1,08 \pm 0,09$ για τα άτομα της διατροφικής ομάδας CONTROL S, $1,20 \pm 0,09$ για τα άτομα της διατροφικής ομάδας SMOs και $1,08 \pm 0,03$ για τα άτομα της SMcS διατροφικής ομάδας. Η στατιστική ανάλυση έδειξε ότι δεν υπήρχαν σημαντικές διαφορές των τιμών

του συντελεστή μετατρεψιμότητας της τροφής (FCR) για τα ψάρια όλων των διατροφικών ομάδων ($P>0,05$) με ελαφρώς υψηλότερη τιμή να εντοπίζεται στην ομάδα SMOs .

Πίνακας 3.4. Τελικό βάρος (g) και αύξηση βάρους (g) των ιχθύων, κατανάλωση/ψάρι (g) και συνολική κατανάλωση (g), SGR (%/ημ) και FCR κατά την ολοκλήρωση του πειράματος. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν μέσους όρους \pm τυπική απόκλιση.

	CONTROL S	SMoS	SMcS
Τελικό βάρος (g)	12,71 \pm 1,02	11,68 \pm 0,49	12,00 \pm 0,52
Αύξηση βάρους (g)	9,53 \pm 1,04	8,49 \pm 0,55	8,88 \pm 0,46
Κατανάλωση/ψάρι (g)	10,27 \pm 0,37	10,17 \pm 0,32	9,61 \pm 0,28
Συνολική κατανάλωση (g)	523,43 \pm 6,82	534,16 \pm 5,55	519,13 \pm 5,00
SGR (%/ημ)	2,95 \pm 0,18	2,76 \pm 0,13	2,86 \pm 0,05
FCR	1,08 \pm 0,09	1,20 \pm 0,09	1,08 \pm 0,03

Σημ.: Δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των διαφορετικών διατροφικών ομάδων, στις προαναφερθείσες παραμέτρους των ψαριών ($P>0,05$)

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Από τα αποτελέσματα του πειράματος αποδείχθηκε ότι η μερική υποκατάσταση του ιχθυελαίου και ιχθυαλεύρου από το μείγμα μικροφυκών *Schizochytrium* sp. και *N. gaditana* και των δύο πειραματικών σιτηρεσίων επηρέασε θετικά την επιβίωση των ιχθύων που σιτίστηκαν με αυτά. Αυτό δείχνει ότι τα μικροφύκη κρίνονται κατάλληλα ως πρώτες ύλες για τις ιχθυοτροφές που προορίζονται στην τσιπούρα. Γενικά τα μικροφύκη, εκτός από τα πολύτιμα ω-3, είναι πλούσια σε βιοδραστικές ουσίες και δευτερογενείς μεταβολίτες που προάγουν την καλή υγεία των ιχθύων, όπως χρωστικές ουσίες, πολυσακχαρίτες και στερόλες οι οποίες μπορεί να έχουν αντιοξειδωτική, αντιφλεγμονώδη και ανοσοδιεγερτική δράση (Michalak & Chojnacka 2015). Για παράδειγμα, η χορήγηση των *N. gaditana*, *Tetraselmis chuii* και *Phaeodactylum tricornutum* στο σιτηρέσιο της τσιπούρας δεν επηρέασε την επιβίωση των ατόμων του είδους (Cerezuela et al. 2012). Άλλα είδη μικροφυκών που μπόρεσαν να αντικαταστήσουν με επιτυχία τα ιχθυάλευρα σε ποσοστό από 6 έως 20% σε τσιπούρα (*Sparus aurata*), είναι το *Scenedesmus almeriensis*, το *Tetraselmis suecica* και το *Tisochrysis lutea* (Ayala et al.,2020). Συνολικά, έχουν δοκιμαστεί ως συστατικά ιχθυοτροφών για τσιπούρα - *Scenedesmus* sp., *Tetraselmis* sp. , *Isochrysis* sp., *Schizochytrium* sp., *Cryptocodinium cohnii*, *Chlorella* sp., *Haematococcus* sp., *Phaeodactylum* sp. και *Nannochloropsis* sp. ως υποκατάστατα ιχθυαλεύρων ή ιχθυελαίων (Sales et al.,2021).

Από ελάχιστες μελέτες αποδεικνύεται ότι τα μικροφύκη επηρεάζουν το ανοσοποιητικό και πεπτικό σύστημα των ιχθύων. Βελτιωμένη ανοσολογική απόκριση στην τσιπούρα παρατηρήθηκε όταν τρέφονταν με εμπορικό σιτηρέσιο συμπληρωμένο με 10 g/kg *Tetraselmis chuii*, *Phaeodactylum tricornutum* ή *N. gaditana* (Jorge et

al.,2019). Τα μικροφύκη *N. gaditana*, *T. chuii* και *P. tricornutum* μπορούν να διεγείρουν ορισμένες δραστηριότητες του ανοσοποιητικού συστήματος της τσιπούρας και να επηρεάσουν ελαφρώς τη γονιδιακή έκφραση που σχετίζεται με το ανοσοποιητικό, με το *P. tricornutum* να παρουσιάζει τη μεγαλύτερη επίδραση (Cerezuela et al.,2012). Όσον αφορά το πεπτικό σύστημα της τσιπούρας, στις προνύμφες η χρήση αποξηραμένων φυκών (*Nannochloropsis* sp.) δεν οδήγησαν σε ιστοπαθολογικές επιδράσεις (Haas et al.,2015). Διεξήχθη επίσης μελέτη που εξέτασε την επίδραση των μικροφυκών στη δραστηριότητα των πεπτικών ενζύμων της τσιπούρας από τους Vizcaíno et al. (2014) και δεν παρατηρήθηκε επίδραση κατά της θρυψίνης κατά την αντικατάσταση των 390 g/kg διατροφικού FM από το *Scenedesmus* sp. Αντίθετα, στην τσιπούρα που τράφηκε με εμπορική διατροφή συμπληρωμένη με 100 gr kg *Tetraselmis chui* ή *Phaeodactylum tricornutum*, παρατηρήθηκε μεγάλη ποσότητα και ποικιλομορφία των εντερικών μικροβιακών ειδών και η επίδραση αυτή συσχετίστηκε έντονα με τις ιστομορφολογικές αλλοιώσεις που παρατηρήθηκαν στο έντερο των ψαριών (Jorge et al.,2019). Επιπλέον, ένταξη 10 g/kg *T. chuii* και έως 15g/kg *N.gaditana* σε δίαιτες τσιπούρας έχει εμφανίσει εντερικές αλλοιώσεις όπως ήπια φλεγμονή και πληθώρα μικροβίων (Jorge et al.,2019).

Έπειτα από 49 ημέρες διατροφικού πειράματος, η αύξηση του σωματικού βάρους και ο ειδικός ρυθμός ανάπτυξης (SGR) των ατόμων που διατράφηκαν με τα σιτηρέσια Control και SMcS ήταν ελαφρώς καλύτεροι από αυτούς των ατόμων που σιτίστηκαν με την τροφή SMoS. Ωστόσο, μεταξύ των τριών ομάδων δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές. Στο παρόν πείραμα, ο συντελεστής μετατρεψιμότητας της τροφής (FCR) και των τριών σιτηρεσίων διατηρήθηκε σε αρκετά χαμηλά επίπεδα με την τιμή του FCR από το σιτηρέσιο SMcS να είναι ίδια με εκείνη του μάρτυρα (1,08 – 1,20). Παρά το γεγονός ότι τα ψάρια σιτίζονταν μέχρι κορεσμού, δεν εμφάνισαν υψηλότερες τιμές

του συντελεστή πράγμα το οποίο υποδηλώνει ότι η ολική αντικατάσταση του ιχθυελαίου και ιχθυαλεύρου από τα μικροφύκη *Schizochytrium* sp. και *N. gaditana* στη διατροφή των ιχθυδίων τσιπούρας είναι εφικτή για την καλύτερη αξιοποίηση της τροφής και τον βέλτιστο ρυθμό ανάπτυξής τους. Οι ελάχιστες διαφοροποιήσεις των τιμών της αύξησης του βάρους και του συντελεστή μετατρεψιμότητας της τροφής για τα ψάρια που διατράφηκαν με τα μικροφύκη, σε σχέση με αυτά που διατράφηκαν αποκλειστικά με την τροφή μάρτυρα, είχαν παρατηρηθεί ήδη από τις πρώτες 32 ημέρες του πειράματος. Παρατηρήθηκε επίσης διαφορά στην κατανάλωση τροφής, καθώς τα άτομα των μεταχειρίσεων Controls και SMOs φάνηκε να καταναλώνουν περισσότερη τροφή σε σχέση με αυτά της SMCs. Πιθανόν αυτό υποδεικνύει ότι η τροφή SMOs ήταν περισσότερο εύγεστη από εκείνη της SMCs η οποία αν και λιγότερο αποδεκτή από τα ψάρια, εντούτοις με την σύσταση της κατάφερε να εμφανίσει μεγαλύτερο ρυθμό ανάπτυξης στα ψάρια παρόμοια με εκείνη της τροφής μάρτυρα.

Μέχρι σήμερα έχουν πραγματοποιηθεί λίγες έρευνες που να διερευνούν την καταλληλότητα της εξ ολοκλήρου αντικατάστασης του ιχθυελαίου και ιχθυαλεύρου από μείγμα μικροφυκών *N. gaditana* και *Schizochytrium* sp. στο σιτηρέσιο της τσιπούρας. Τα αποτελέσματα της παρούσας έρευνας έχουν δείξει ότι, ακόμα και το μεγαλύτερο ποσοστό ένταξης του συνδυασμού των συγκεκριμένων μικροφυκών που ερευνήθηκε οδήγησε σε καλύτερη ανάπτυξη των ψαριών παρόμοια με την τροφή μάρτυρα. Αυτά τα αποτελέσματα συμπίπτουν με εκείνα των προηγούμενων πειραμάτων στο ίδιο είδος ψαριού. Οι (Metsoviti et al., 2018) απέδειξαν ότι η συνολική αντικατάσταση του ιχθυελαίου από το μείγμα *N. gaditana* και *Schizochytrium* sp. ήταν επιτυχής. Άλλες μελέτες με *S. aurata* έδειξαν ότι η αντικατάσταση ιχθυελαίου από ένα μείγμα 5 ειδών μικροφυκών και από *Schizochytrium* sp. ή *Cryptocodinium cohnii* επέδρασε θετικά στην

ανάπτυξη των ψαριών (Eryalçin et al., 2015). Μια άλλη μελέτη αντικρούει τις προηγούμενες διαπιστώνοντας ότι η συμπερίληψη ακατέργαστου *N. gaditana* σε ποσοστό 2,5% είναι επαρκές για την βέλτιστη ανάπτυξη της τσιπούρας (Ayala et al.,2020). Αρκετές μελέτες με τα μικροφύκη του παρόντος πειράματος έχουν πραγματοποιηθεί και σε άλλα είδη ιχθύων με θετικά αποτελέσματα και έχουν αναλυθεί εκτενώς στην ενότητα των μικροφυκών της παρούσας εργασίας.

Τέλος, από τη χορήγηση των μικροφυκών *N. gaditana* και *Schizochytrium* sp. στην παρούσα μελέτη, παρατηρήθηκε επίσης μια εναπόθεση χρωστικών στο δέρμα των εκτρεφόμενων ιχθύων (Εικ.4.1). Μέχρι το τέλος του πειράματος, τα ιχθύδια είχαν αποκτήσει μια έντονη λαδοκίτρινη απόχρωση, παρόμοια με εκείνη που παρατηρήθηκε στο πείραμα των Tulli et al. (2012) με την χορήγηση του *T. suecica*. Μια πιο πρόσφατη μελέτη που πραγματοποιήθηκε στο λαβράκι με την προσθήκη του μικροφύκους *Isochrysis* sp. έδειξε μια σημαντική αύξηση της έντασης του πράσινου χρωματισμού και ιδιαίτερα στο ραχιαίο τμήμα του δέρματος (Tibaldi et al. 2015). Διαφοροποίηση χρώματος παρατηρήθηκε και στην τσιπούρα όπου με την συμπερίληψη 2% των μικροφυκών με το σαπωνοποιήσιμο εκχύλισμα λιπιδίων, οι μύες των ψαριών παρουσίασαν χαμηλότερο ποσοστό εικοσιδωαεξαενοϊκού οξέος (DHA) και υψηλό εικοσιπεντανοϊκού οξέος (EPA) ενώ η συμπερίληψη του 2% των μικροφυκών το μη σαπωνοποιήσιμο εκχύλισμα λιπιδίων ενίσχυσε την περιεκτικότητα σε καροτενοειδή στους μύες των ψαριών και διαμόρφωσε τη χρώση του δέρματος μια ένα κιτρινοπράσινη απόχρωση στο δέρμα τους (Sales et al.,2021). Το χρώμα είναι το σημαντικότερο οργανοληπτικό χαρακτηριστικό που χρησιμοποιούν οι καταναλωτές για την οπτική εκτίμηση της φρεσκότητας των ιχθύων, με σκοπό την αγορά τους (Spence et al. 2010). Η ενσωμάτωση φυσικών χρωστικών από τα μικροφύκη στις ιχθυοτροφές μπορεί να δώσει

τον ζητούμενο χρωματισμό στα ψάρια χωρίς να χρειάζεται η προσθήκη συνθετικών χρωστικών, τις οποίες οι καταναλωτές συχνά σχετίζουν με μεγαλύτερους κινδύνους για την υγεία.



Εικόνα Α. Control



Εικόνα Β. SMoS



Εικόνα Γ. SMcS

Εικόνα 4.1. Επίδραση της χορήγησης των πειραματικών σιτηρεσιών για 49 ημέρες στο χρώμα των ιχθυδίων τσιπούρας.

Τέλος, σε πολλές μελέτες παρατηρείται ότι η χρήση μικροφυκών ανάλογα με το ποσοστό ένταξης τους στη διατροφή της τσιπούρας μπορεί να επιταχύνει την διαμόρφωση δισκοειδούς σχήματος στο σώμα των ιχθύων και να επηρεάσει την μυϊκή πλαστικότητα του (Ayala et al.,2020). Για όλα τα προαναφερθέντα η ένταξη μικροφυκών

χρήζει προσοχής και περαιτέρω διερεύνησης για να επιτευχθεί το βέλτιστο αποτέλεσμα προς όφελος των υδατοκαλλιεργειών.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Εν κατακλείδι, τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την εκτροφή της τσιπούρας με μείγμα βιομάζας των μικροφυκών *Nannochloropsis gaditana* και *Schizochytrium* sp. συνοψίζονται στα εξής:

- Η επιβίωση των ιχθύων που διατράφηκαν με αυτά δεν επηρεάστηκε αρνητικά
- Η μερική υποκατάσταση του ιχθυαλεύρου και ιχθυελαίου δεν επηρέασε αρνητικά την ανάπτυξη της τσιπούρας.
- Τα ψάρια που διατράφηκαν με τα σιτηρέσια που περιείχαν μικροφύκη του εμπορίου, παρουσίασαν ελαφρώς μεγαλύτερο ρυθμό ανάπτυξης σε σχέση με αυτά που διατράφηκαν με σιτηρέσιο μικροφυκών που καλλιεργήθηκε με χρήση υγρών αποβλήτων και με την δίαιτα μάρτυρα χωρίς ωστόσο να παρουσιάζονται στατιστικά σημαντικές διαφορές.
- Ο συντελεστής μετατρεψιμότητας της τροφής (FCR) των σιτηρεσίων που περιείχαν μικροφύκη, ήταν παρόμοιος με εκείνον των ψαριών που διατράφηκαν με την δίαιτα μάρτυρα. Επομένως, τα μικροφύκη *N. gaditana* και *Schizochytrium* sp. κρίνονται ως πλήρως αξιοποιήσιμα από την τσιπούρα.

Απαραίτητη όμως κρίνεται η περαιτέρω έρευνα στο είδος όσον αφορά τη θρεπτική αξία, την εναπόθεση λιπαρών οξέων στο μυϊκό ιστό και την ιστολογική αξιολόγηση των ψαριών καθώς και την πεπτικότητα των μικροφυκών.

ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Αξιοποίηση υγρών αποβλήτων για καλλιέργεια μικροφυκών και χρησιμοποίηση αυτών προς παραγωγή βιοντίζελ και συμπληρωμάτων ιχθυοτροφών, Παραδοτέο 8: Έκθεση επιλογής μικροφυκών για ιχθυοτροφές, 8/1/2019, ΕπανεΚ, ΕΣΠΑ 2014-2020.

ΕΛΟΠΥ (2021), Ετήσια Έκθεση Ελληνικής Οργάνωσης Παραγωγών Υδατοκαλλιέργειας 2021, σελ. 80-81.

ΚΑΝΟΝΙΣΜΟΣ (ΕΕ) 2017/893 ΤΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ 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 (2011) <<Στοιχεία φυσιολογίας θρέψεως και εφαρμοσμένη διατροφή ιχθύων και καρκινοειδών>> Εκδόσεις Παπαζήση.

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

Παπουτσόγλου Σ., 2008, Διατροφή Ιχθύων

ΞΕΝΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Adarme-Vega, T., Lim, D., Timmins, M., Vernen, F., Li, Y. and Schenk, P., 2012.

Microalgal biofactories: a promising approach towards sustainable omega-3 fatty acid production. *Microbial Cell Factories*, 11(1).

Adissin, T. O. Oswald, et al. "Effects of Dietary *Nannochloropsis* Sp. Powder and Lipids on the Growth Performance and Fatty Acid Composition of Larval and Postlarval Kuruma Shrimp, *Marsupenaeus Japonicus*." *Aquaculture Nutrition*, vol. 26, no. 1, 20 Sept. 2019, pp. 186–200, 10.1111/anu.12980. Accessed 23 Aug. 2022.

- Alcaraz, R., et al. “Effect of the Inclusion of Microalgae on the Physical Properties of Extruded Feed for Gilthead Seabream (*Sparus Aurata* L.)” *Algal Research*, vol. 53, Mar. 2021, p. 102167, 10.1016/j.algal.2020.102167. Accessed 22 Aug. 2022.
- Alfiko, Y., Xie, D., Astuti, R., Wong, J. and Wang, L., 2022. Insects as a feed ingredient for fish culture: Status and trends. *Aquaculture and Fisheries*, 7(2), pp.166-178.
- Annamalai, S., Das, P., Thaher, M., Abdul Quadir, M., Khan, S., Mahata, C. and Al Jabri, H., 2021. Nutrients and Energy Digestibility of Microalgal Biomass for Fish Feed Applications. *Sustainability*, 13(23), p.13211.
- Aragão, C., Cabano, M., Colen, R., Fuentes, J. and Dias, J., 2019. Alternative formulations for gilthead seabream diets: Towards a more sustainable production. *Aquaculture Nutrition*, 26(2), pp.444-455.
- Araújo, Rita, et al. “Current Status of the Algae Production Industry in Europe: An Emerging Sector of the Blue Bioeconomy.” *Frontiers in Marine Science*, vol. 7, 27 Jan. 2021, 10.3389/fmars.2020.626389.
- Barclay William, Craig Weaver, James Metz, and John Hansen, Development of a Docosaheptaenoic Acid Production Technology Using Schizochytrium: Historical Perspective and Update, 2010.
- Barroso, F., de Haro, C., Sánchez-Muros, M., Venegas, E., Martínez-Sánchez, A. and Pérez-Bañón, C., 2014. The potential of various insect species for use as food for fish. *Aquaculture*, 422-423, pp.193-201.
- Bartek, L., et al. “Life Cycle Assessment of Fish Oil Substitute Produced by Microalgae Using Food Waste.” *Sustainable Production and Consumption*, vol. 27, July 2021, pp. 2002–2021, 10.1016/j.spc.2021.04.033. Accessed 17 Apr. 2022.
- Batista, Sónia, et al. “Exploring the Potential of Seaweed *Gracilaria Gracilis* and Microalga *Nannochloropsis Oceanica*, Single or Blended, as Natural Dietary Ingredients for European Seabass *Dicentrarchus Labrax*.” *Journal of Applied Phycology*, vol. 32, no. 3, 9 May 2020, pp. 2041–2059, 10.1007/s10811-020-02118-z. Accessed 15 Oct. 2021.
- Batista et al., “Use of Technological Processing of Seaweed and Microalgae as Strategy to Improve Their Apparent Digestibility Coefficients in European Seabass (*Dicentrarchus Labrax*) Juveniles.” *Journal of Applied Phycology*, vol. 32, no.

- 5, 21 July 2020, pp. 3429–3446, 10.1007/s10811-020-02185-2. Accessed 23 Aug. 2022.
- Beal, C., Gerber, L., Thongrod, S., Phromkunthong, W., Kiron, V., Granados, J., Archibald, I., Greene, C. and Huntley, M., 2018. Marine microalgae commercial production improves sustainability of global fisheries and aquaculture. *Scientific Reports*, 8(1).
- Becker, E., 2007. Micro-algae as a source of protein. *Biotechnology Advances*, 25(2), pp.207-210.
- 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.
- Chen, F., Leng, Y., Lu, Q. and Zhou, W., 2021. The application of microalgae biomass and bio-products as aquafeed for aquaculture. *Algal Research*, 60, p.102541.
- Bell, J. G., J. McEvoy, D. R. Tocher, F. McGhee, P. J. Campbell, and J. R. Sargent. Replacement of fish oil with rapeseed oil in diets of Atlantic salmon (*Salmo salar*) affects tissue lipid compositions and hepatocyte fatty acid metabolism. *J. Nutr.*, 131: 1535–1543 (2001).
- Bell, J. G., D. R. Tocher, J. Henderson, J. Dick, and V. Crampton. Altered fatty acid compositions in Atlantic salmon (*Salmo salar*) fed diets containing linseed and rapeseed oils can be partially restored by a subsequent fish oil finishing diet. *J. Nutr.*, 133: 2793–2801 (2003).
- Bell, J. G., R. J. Henderson, D. R. Tocher, and J. R. Sargent. Replacement of dietary fish oil with increasing levels of linseed oil: Modification of flesh fatty acid compositions in Atlantic salmon (*Salmo salar*) using a fish oil finishing diet. *Lipids*, 39: 223–232 (2004).
- Bhalamurugan, G., Valerie, O. and Mark, L., 2018. Valuable bioproducts obtained from microalgal biomass and their commercial applications: A review. *Environmental Engineering Research*, 23(3), pp.229-241.
- Bjerkeng, B., S. Refstie, K. T. Fjalestad, T. Storebakken, M. Rodbotten, and A. J. Roem. Quality parameters of the flesh of Atlantic salmon (*Salmo salar*) as affected by dietary fat content and full-fat soybean meal as a partial substitute for fish meal in the diet. *Aquaculture*, 157: 297–309 (1997).

- Borges, Lucelia, et al. "Effect of Harvesting Processes on the Lipid Yield and Fatty Acid Profile of the Marine Microalga *Nannochloropsis oculata*." *Aquaculture Reports*, vol. 4, Nov. 2016, pp. 164–168, 10.1016/j.aqrep.2016.10.004. Accessed 23 Aug. 2022.
- Camacho-Rodríguez, J., Macías-Sánchez, M., Cerón-García, M., Alarcón, F. and Molina-Grima, E., 2017. Microalgae as a potential ingredient for partial fish meal replacement in aquafeeds: nutrient stability under different storage conditions. *Journal of Applied Phycology*, 30(2), pp.1049-1059.
- Camacho, F., Macedo, A. and Malcata, F., 2019. Potential Industrial Applications and Commercialization of Microalgae in the Functional Food and Feed Industries: A Short Review. *Marine Drugs*, 17(6), p.312.
- Carvalho, Marta, et al. "Effective Complete Replacement of Fish Oil by Combining Poultry and Microalgae Oils in Practical Diets for Gilthead Sea Bream (*Sparus aurata*) Fingerlings." *Aquaculture*, vol. 529, Dec. 2020, p. 735696, 10.1016/j.aquaculture.2020.735696. Accessed 20 Aug. 2022.
- Carvalho, Marta, et al. "Hepatic Biochemical, Morphological and Molecular Effects of Feeding Microalgae and Poultry Oils to Gilthead Sea Bream (*Sparus aurata*)." *Aquaculture*, vol. 532, Feb. 2021, p. 736073, 10.1016/j.aquaculture.2020.736073. Accessed 20 Aug. 2022.
- Castro, Carolina, et al. "*Chlorella* Sp. And *Nannochloropsis* Sp. Inclusion in Plant-Based Diets Modulate the Intestine and Liver Antioxidant Mechanisms of European Sea Bass Juveniles." *Frontiers in Veterinary Science*, vol. 7, 17 Dec. 2020, 10.3389/fvets.2020.607575. Accessed 9 Aug. 2022.
- Cerezuela, Rebeca, et al. "Enrichment of Gilthead Seabream (*Sparus aurata* L.) Diet with Microalgae: Effects on the Immune System." *Fish Physiology and Biochemistry*, vol. 38, no. 6, Dec. 2012, pp. 1729–1739, 10.1007/s10695-012-9670-9.
- Chang, Guifang, et al. "Fatty Acid Shifts and Metabolic Activity Changes of *Schizochytrium* Sp. S31 Cultured on Glycerol." *Bioresource Technology*, vol. 142, 1 Aug. 2013, pp. 255–260, www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23743430/, 10.1016/j.biortech.2013.05.030. Accessed 14 May 2020.

- Chen, Yimin, et al. “Nutritional Evaluation of Two Marine Microalgae as Feedstock for Aquafeed.” *Aquaculture Research*, vol. 51, no. 3, 19 Dec. 2019, pp. 946–956, 10.1111/are.14439. Accessed 23 Aug. 2022.
- Chen, Chun-Yen, et al. “Enhancing the Production of Eicosapentaenoic Acid (EPA) from *Nannochloropsis oceanica* CY2 Using Innovative Photobioreactors with Optimal Light Source Arrangements.” *Bioresource Technology*, vol. 191, Sept. 2015, pp. 407–413, 10.1016/j.biortech.2015.03.001. Accessed 22 Apr. 2020.
- Chen, Zuyin, et al. “Hormesis-like Growth and Photosynthetic Physiology of Marine Diatom *Phaeodactylum tricornutum* Bohlin Exposed to Polystyrene Microplastics.” *Frontiers of Environmental Science & Engineering*, vol. 16, no. 1, 11 June 2021, 10.1007/s11783-021-1436-0. Accessed 19 Nov. 2021.
- Chi, Zhanyou, et al. “Study of a Two-Stage Growth of DHA-Producing Marine Algae *Schizochytrium limacinum* SR21 with Shifting Dissolved Oxygen Level.” *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 81, no. 6, Jan. 2009, pp. 1141–1148, 10.1007/s00253-008-1740-7.
- Chisti, Y., 2007. Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances*, 25(3), pp.294-306.
- Cui, X., Liang, M., Wei, Y., Li, P., Meng, X., Duan, M. and Xu, H., 2022. Application of poultry by-product meal in diets of obscure pufferfish (*Takifugu obscurus*). *Aquaculture Research*,.
- de Cruz, Clement R., et al. “Evaluation of Microalgae Concentrates as Partial Fishmeal Replacements for Hybrid Striped Bass *Morone* Sp.” *Aquaculture*, vol. 493, Aug. 2018, pp. 130–136, 10.1016/j.aquaculture.2018.04.060. Accessed 23 Aug. 2022.
- Deng, Yi, et al. “Microalgae for Nutrient Recycling from Food Waste to Aquaculture as Feed Substitute: A Promising Pathway to Eco-Friendly Development.” *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, vol. 96, no. 9, 24 May 2021, pp. 2496–2508, 10.1002/jctb.6786. Accessed 20 Aug. 2022.
- Dineshbabu, G., Goswami, G., Kumar, R., Sinha, A. and Das, D., 2019. Microalgae–nutritious, sustainable aqua- and animal feed source. *Journal of Functional Foods*, 62, p.103545.
- dos Santos, Sâmela Keila Almeida, et al. “Evaluation of Growth and Fatty Acid Profile of Nile Tilapia (*Oreochromis Niloticus*) Fed with *Schizochytrium* Sp.”

- Aquaculture Research*, vol. 50, no. 4, 15 Feb. 2019, pp. 1068–1074, 10.1111/are.13979.
 Accessed 23 Aug. 2022.
- Draaisma, R., Wijffels, R., (Ellen) Slegers, P., Brentner, L., Roy, A. and Barbosa, M.,
 2013. Food commodities from microalgae. *Current Opinion in Biotechnology*,
 24(2), pp.169-177.
- Enzing Christien, Matthias Ploeg, Maria Barbosa, Lolke Sijtsma, Microalgae in novel
 food products, JRC SCIENTIFIC AND POLICY REPORTS,2014.
- Eryalçın, K., Roo, J., Saleh, R., Atalah, E., Benítez, T., Betancor, M., del Carmen
 Hernandez-Cruz, M. and Izquierdo, M., 2012. Fish oil replacement by
 different microalgal products in microdiets for early weaning of gilthead sea
 bream (*Sparus aurata*, L.). *Aquaculture Research*, 44(5), pp.819-828.
- Eryalçın Kamil Mert, Eneko Ganuza, Eyad Atalah and Maria Carmen Hernández Cruz,
Nannochloropsis gaditana and *Cryptocodinium cohnii*, two microalgae as
 alternative sources of essential fatty acids in early weaning for gilthead
 seabream,2015.
- Estévez, A., Blanco, B., Fernández, L., Ferreira, M. and Soula, M., 2022. Effects of
 alternative and sustainable ingredients, insect meal, microalgae and protein
 and lipid from tuna cooking water, on meagre (*Argyrosomus regius*) growth,
 food conversion and muscle and liver composition. *Aquaculture*, 548,
 p.737549.
- FAO,2019. The EAF-Nansen Programme. Retrieved from. [http://www.fao.org/in-
 action/eaf-nansen/en/](http://www.fao.org/in-action/eaf-nansen/en/).
- Finco, Ana Maria de Oliveira, et al. “Technological Trends and Market Perspectives for
 Production of Microbial Oils Rich in Omega-3.” *Critical Reviews in
 Biotechnology*, vol. 37, no. 5, 10 Aug. 2016, pp. 656–671,
 10.1080/07388551.2016.1213221. Accessed 15 Sept. 2021.
- Fishbase.se. 2020. *Reference Summary - Bauchot, M.-L. And J.-C. Hureau, 1990.* [online]
 Available at:
 <<https://www.fishbase.se/references/FBRefSummary.php?ID=3688>> [Accessed 12
 November 2020].
- Froese R. & D.Pauly (eds) 2006. Fishbase. www.fishbase.org

- Fossier Marchan, Loris, et al. "Taxonomy, Ecology and Biotechnological Applications of Thraustochytrids: A Review." *Biotechnology Advances*, vol. 36, no. 1, Jan. 2018, pp. 26–46, www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0734975017301143, 10.1016/j.biotechadv.2017.09.003. Accessed 22 Mar. 2019.
- Fournier, V., C. Huelvan, and E. Desbruyeres. Incorporation of a mixture of plant feedstuffs as a substitute for fish meal in diets of juvenile turbot (*Psetta maxima*). *Aquaculture*, 236: 451–465 (2004).
- Fraser, T. W. K., and S. J. Davies. Nutritional requirements of cobia, *Rachycentron canadum* (Linnaeus): A review. *Aquacult. Res.*, 40: 1219–1234 (2009).
- Ganuza E., Izquierdo M.S., Lipid accumulation in *Schizochytrium* G13/2S produced in continuous culture, 2007.
- Ganuza, E., Benítez-Santana, T., Atalah, E., Vega-Orellana, O., Ganga, R. and Izquierdo, M., 2008. *Cryptocodinium cohnii* and *Schizochytrium* sp. as potential substitutes to fisheries-derived oils from seabream (*Sparus aurata*) microdiets. *Aquaculture*, 277(1-2), pp.109-116.
- Gong, Y., et al. "Digestibility of the Defatted Microalgae *Nannochloropsis* Sp. And *Desmodesmus* Sp. When Fed to Atlantic Salmon, *Salmo Salar*." *Aquaculture Nutrition*, vol. 24, no. 1, 13 Feb. 2017, pp. 56–64, 10.1111/anu.12533. Accessed 31 Oct. 2020.
- González-Rodríguez, Á., Celada, J., Carral, J., Sáez-Royuela, M., García, V. and Fuertes, J., 2014. Evaluation of poultry by-product meal as partial replacement of fish meal in practical diets for juvenile tench (*Tinca tinca* L.). *Aquaculture Research*, 47(5), pp.1612-1621.
- Gouveia, A., and S. J. Davies. Inclusion of an extruded dehulled pea seed meal in diets for juvenile European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture*, 182: 183–193 (2000).
- Haas, S., et al. "Marine Microalgae *Pavlova Viridis* and *Nannochloropsis* Sp. As N-3 PUFA Source in Diets for Juvenile European Sea Bass (*Dicentrarchus Labrax* L.)." *Journal of Applied Phycology*, vol. 28, no. 2, 2 June 2015, pp. 1011–1021, 10.1007/s10811-015-0622-5. Accessed 19 Mar. 2022.

- Hart, B., et al. “Digestibility of *Schizochytrium* Sp. Whole Cell Biomass by Atlantic Salmon (*Salmo Salar*).” *Aquaculture*, Nov. 2020, p. 736156, 10.1016/j.aquaculture.2020.736156. Accessed 11 Dec. 2020.
- Harwood, J., 2019. Algae: Critical Sources of Very Long-Chain Polyunsaturated Fatty Acids. *Biomolecules*, 9(11), p.708.
- Hussein, M., Pillai, V., Goddard, J., Park, H., Kothapalli, K., Ross, D., Ketterings, Q., Brenna, J., Milstein, M., Marquis, H., Johnson, P., Nyrop, J. and Selvaraj, V., 2017. Sustainable production of housefly (*Musca domestica*) larvae as a protein-rich feed ingredient by utilizing cattle manure. *PLOS ONE*, 12(2), p.e0171708.
- Izquierdo, M. S., D. Montero, L. Robaina, M. J. Caballero, G. Rosenlund, and R. Gines. Alterations in fillet fatty acid profile and flesh quality in gilthead seabream (*Sparus aurata*) fed vegetable oils for a long term period. Recovery of fatty acid profiles by fish oil feeding. *Aquaculture*, 250: 431–444 (2005).
- Jorge Sara Silva, Effect of microalgae in gilthead seabream (*Sparus aurata*) diets, Porto, 2016.
- Jorge, Sara S., et al. “Short-Term Supplementation of Gilthead Seabream (*Sparus Aurata*) Diets with *Nannochloropsis Gaditana* Modulates Intestinal Microbiota without Affecting Intestinal Morphology and Function.” *Aquaculture Nutrition*, vol. 25, no. 6, 14 Aug. 2019, pp. 1388–1398, 10.1111/anu.12959. Accessed 23 Aug. 2022.
- Karapanagiotidis, I., Psafakis, P., Mente, E., Malandrakis, E. and Golomazou, E., 2018. 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), pp.3-14.
- Kaushik, S. J., J. P. Cravedi, J. P. Lalles, J. Sumpter, B. Fauconneau, and M. Laroche. Partial or total replacement of fishmeal by soy bean protein on growth protein utilization, potential estrogenic or antigenic effects, cholesterolemia and flesh quality in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture*, 133: 257–274 (1995).

- Khan, Muhammad Imran, et al. "The Promising Future of Microalgae: Current Status, Challenges, and Optimization of a Sustainable and Renewable Industry for Biofuels, Feed, and Other Products." *Microbial Cell Factories*, vol. 17, no. 1, 5 Mar. 2018, www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5836383/, 10.1186/s12934-018-0879-x.
- Kikuchi, K. Partial replacement of fish meal with corn gluten meal in diets for Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *J. World Aquacult. Soc.*, 30: 357–363 (1999).
- Kissinger, Karma R., et al. "Partial Fish Meal Replacement by Soy Protein Concentrate, Squid and Algal Meals in Low Fish-Oil Diets Containing *Schizochytrium limacinum* for Longfin Yellowtail *Seriola rivoliana*." *Aquaculture*, vol. 452, Feb. 2016, pp. 37–44, 10.1016/j.aquaculture.2015.10.022. Accessed 2 Apr. 2021.
- Knutsen, H.R., et al. "Fish Welfare, Fast Muscle Cellularity, Fatty Acid and Body-Composition of Juvenile Spotted Wolffish (*Anarhichas minor*) Fed a Combination of Plant Proteins and Microalgae (*Nannochloropsis oceanica*)." *Aquaculture*, vol. 506, May 2019, pp. 212–223, 10.1016/j.aquaculture.2019.03.043. Accessed 23 Aug. 2022.
- Kousoulaki, Katerina, et al. "Metabolism, Health and Fillet Nutritional Quality in Atlantic Salmon (*Salmo Salar*) Fed Diets Containing N-3-Rich Microalgae." *Journal of Nutritional Science*, vol. 4, 11 June 2015, www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4611082/, 10.1017/jns.2015.14. Accessed 27 July 2021.
- Kousoulaki, K., et al. "Microalgae and Organic Minerals Enhance Lipid Retention Efficiency and Fillet Quality in Atlantic Salmon (*Salmo Salar* L.)." *Aquaculture*, vol. 451, Jan. 2016, pp. 47–57, 10.1016/j.aquaculture.2015.08.027. Accessed 18 Apr. 2022.
- Kousoulaki, K., et al. "Microalgal *Schizochytrium limacinum* Biomass Improves Growth and Filet Quality When Used Long-Term as a Replacement for Fish Oil, in Modern Salmon Diets." *Frontiers in Marine Science*, vol. 7, 14 Feb. 2020, 10.3389/fmars.2020.00057. Accessed 15 May 2022.

- Kureshy, N., D. A. Davis, and C. R. Arnold. Partial replacement of fish meal with meat-and-bone meal, flash-dried poultry by-product meal, and enzyme-digested poultry by-product meal in practical diets for juvenile red drum. *North Am. J. Aquacult.*, 62: 266–272 (2000).
- Lang, Imke, et al. “Fatty Acid Profiles and Their Distribution Patterns in Microalgae: A Comprehensive Analysis of More than 2000 Strains from the SAG Culture Collection.” *BMC Plant Biology*, vol. 11, no. 1, 2011, p. 124, 10.1186/1471-2229-11-124. Accessed 14 Nov. 2020.
- Li-Beisson, Yonghua, et al. “The Lipid Biochemistry of Eukaryotic Algae.” *Progress in Lipid Research*, vol. 74, 1 Apr. 2019, pp. 31–68, www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0163782717300541, 10.1016/j.plipres.2019.01.003. Accessed 14 Nov. 2020.
- Li, Menghe H., et al. “Effects of Dried Algae *Schizochytrium* Sp., a Rich Source of Docosahexaenoic Acid, on Growth, Fatty Acid Composition, and Sensory Quality of Channel Catfish *Ictalurus Punctatus*.” *Aquaculture*, vol. 292, no. 3-4, July 2009, pp. 232–236, 10.1016/j.aquaculture.2009.04.033. Accessed 16 Dec. 2019.
- Ling, Xueping, et al. “Impact of Carbon and Nitrogen Feeding Strategy on High Production of Biomass and Docosahexaenoic Acid (DHA) by *Schizochytrium* Sp. LU310.” *Bioresource Technology*, vol. 184, May 2015, pp. 139–147, 10.1016/j.biortech.2014.09.130. Accessed 7 Apr. 2022.
- Lu, Qian, et al. “A State-of-The-Art Review on the Synthetic Mechanisms, Production Technologies, and Practical Application of Polyunsaturated Fatty Acids from Microalgae.” *Algal Research*, vol. 55, May 2021, p. 102281, 10.1016/j.algal.2021.102281. Accessed 20 Aug. 2022.
- Lunger, A., S. R. Craig, and E. McLean. Replacement of fish meal in coho (*Rachycentron canadum*) using an organically certified protein. *Aquaculture*, 257: 393–399 (2006).
- Lyons, Philip P, et al. “Effects of Low-Level Dietary Microalgae Supplementation on the Distal Intestinal Microbiome of Farmed Rainbow Trout *Oncorhynchus*

- mykiss* (Walbaum).” *Aquaculture Research*, vol. 48, no. 5, 26 Apr. 2016, pp. 2438–2452, 10.1111/are.13080. Accessed 9 Mar. 2021.
- Ma, Xiao-Nian, et al. “Lipid Production from *Nannochloropsis*.” *Marine Drugs*, vol. 14, no. 4, 25 Mar. 2016, p. 61, 10.3390/md14040061. Accessed 10 June 2019.
- Maita, M., J. Maekawa, K. Satoh, K. Futami, and S. Satoh. Disease resistance and hypocholestermia in yellowtail *Seriola quinqueradiata* fed a non-fishmeal diet. *Fish. Sci.*, 72: 513–519 (2006).
- Maisashvili, Aleksandre, et al. “The Values of Whole Algae and Lipid Extracted Algae Meal for Aquaculture.” *Algal Research*, vol. 9, May 2015, pp. 133–142, 10.1016/j.algal.2015.03.006. Accessed 20 Aug. 2022.
- Makkar, H., Tran, G., Heuzé, V. and Ankers, P., 2014. State-of-the-art on use of insects as animal feed. *Animal Feed Science and Technology*, 197, pp.1-33.
- Marudhupandi, Thangapandi, et al. “Heterotrophic Cultivation of *Nannochloropsis salina* for Enhancing Biomass and Lipid Production.” *Biotechnology Reports*, vol. 10, June 2016, pp. 8–16, 10.1016/j.btre.2016.02.001. Accessed 4 Sept. 2019.
- Matsui, Hideaki, et al. “Effects of Phosphorous Deficiency of a Microalga *Nannochloropsis oculata* on Its Fatty Acid Profiles and Intracellular Structure and the Effectiveness in Rotifer Nutrition.” *Algal Research*, vol. 49, Aug. 2020, p. 101905, 10.1016/j.algal.2020.101905. Accessed 26 June 2022.
- Michalak, I., & Chojnacka, K. (2015). Algae as production systems of bioactive compounds. *Engineering in Life Sciences*, 15(2), 160-176.
- M.N.Metsoviti, E.Z.Gkalogianni, A.M.Katouni, G.Rougkas, E.Savvaki, P.Psofakis, N.Katsoulas, G.Papapolymerou, I.T.Karapanagiotidis, Effects of replacing fishmeal by *Chlorella vulgaris* and fish oil by *Nannochloropsis gaditana* and *Schizochytrium* sp. Blend on growth and feed efficiency of gilthead seabream (*Sparus aurata*).,AQUA 2018, Montpellier, France, 25-29 August 2018.
- Moutinho, S., Martínez-Llorens, S., Tomás-Vidal, A., Jover-Cerdá, M., Oliva-Teles, A. and Peres, H., 2017. Meat and bone meal as partial replacement for fish meal in diets for gilthead seabream (*Sparus aurata*) juveniles: Growth, feed

- efficiency, amino acid utilization, and economic efficiency. *Aquaculture*, 468, pp.271-277.
- M. U., Nethravathy, et al. “Recent Advances in Microalgal Bioactives for Food, Feed, and Healthcare Products: Commercial Potential, Market Space, and Sustainability.” *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, vol. 18, no. 6, 15 Oct. 2019, pp. 1882–1897, 10.1111/1541-4337.12500.
- Mundheim, H., A. Aksnes, and B. Hope. Growth, feed efficiency and digestibility in salmon (*Salmo salar* L.) fed different dietary proportions of vegetable protein sources in combination with two fish meal qualities. *Aquaculture*, 237: 315–331 (2004).
- Olli, J., A. Krogh, and A. Vabeno. Dehulled solvent-extracted soybean meal as a protein source in diets for Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Aquacult. Res.*, 26: 167–174 (1995).
- Opstvedt, J., A. Aksnes, B. Hope, and I. Pike. Efficiency of feed utilization in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) fed diets with increasing substitution of fish meal with vegetable proteins. *Aquaculture*, 221: 365–379 (2003).
- Orozco Colonia, B., Vinícius de Melo Pereira, G. and Soccol, C., 2020. Omega-3 microbial oils from marine thraustochytrids as a sustainable and technological solution: A review and patent landscape. *Trends in Food Science & Technology*, 99, pp.244-256.
- Oswald, Adissin T.O., et al. “Nutritional Evaluation of *Nannochloropsis* Powder and Lipid as Alternative to Fish Oil for Kuruma Shrimp, *Marsupenaeus japonicus*.” *Aquaculture*, vol. 504, Apr. 2019, pp. 427–436, 10.1016/j.aquaculture.2019.02.028. Accessed 23 Aug. 2022.
- Parisi, C., Rodríguez Cerezo, E., Vigani, M., Sijtsma, L., Barbosa, M., Ploeg, M. and Enzing, C., 2016. *Microalgae-based products for the food and feed sector*. Luxembourg: Publications Office.
- PATRAS, D., MORARU, C. and SOCACIU, C., 2019. Bioactive Ingredients from Microalgae: Food and Feed Applications. *Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca. Food Science and Technology*, 76(1), p.1.

- Perez-Velazquez, Martin, et al. "Partial Replacement of Fishmeal and Fish Oil by Algal Meals in Diets of Red Drum *Sciaenops ocellatus*." *Aquaculture*, vol. 487, Feb. 2018, pp. 41–50, 10.1016/j.aquaculture.2018.01.001. Accessed 31 Aug. 2019.
- Pieterse, E. and Pretorius, Q., 2014. Nutritional evaluation of dried larvae and pupae meal of the housefly (*Musca domestica*) using chemical- and broiler-based biological assays. *Animal Production Science*, 54(3), p.347.
- Pulcini, Domitilla, et al. "Skin Pigmentation in Gilthead Seabream (*Sparus aurata* L.) Fed Conventional and Novel Protein Sources in Diets Deprived of Fish Meal." *Animals*, vol. 10, no. 11, 17 Nov. 2020, p. 2138, 10.3390/ani10112138. Accessed 20 Aug. 2022.
- Qiao, H., et al. "Effects of Dietary Fish Oil Replacement by Microalgae Raw Materials on Growth Performance, Body Composition and Fatty Acid Profile of Juvenile Olive Flounder, *Paralichthys olivaceus*." *Aquaculture Nutrition*, vol. 20, no. 6, 26 June 2014, pp. 646–653, 10.1111/anu.12127. Accessed 18 Mar. 2022.
- Qiao, Hongjin, et al. "Feeding Effects of the Microalga *Nannochloropsis* Sp. On Juvenile Turbot (*Scophthalmus maximus* L.)." *Algal Research*, vol. 41, Aug. 2019, p. 101540, 10.1016/j.algal.2019.101540. Accessed 23 Aug. 2022.
- Ratledge, Colin. "Microbial Oils: An Introductory Overview of Current Status and Future Prospects." *OCL*, vol. 20, no. 6, Nov. 2013, p. D602, 10.1051/ocl/2013029. Accessed 14 May 2020.
- Regost, C., J. Arzel, J. Robin, G. Rosenlund, and S. J Kaushik. Total replacement of fish oil by soybean or linseed oil with a return to fish oil in Turbot (*Psetta maxima*): 1. Growth performance, flesh fatty acid profile, and lipid metabolism. *Aquaculture*, 217: 465–482 (2003a).
- Regost, C., J. Arzel, M. Cardinal, G. Rosenlund, and S. J. Kaushik. Total replacement of fish oil by soybean or linseed oil with a return to fish oil in Turbot (*Psetta maxima*): 2. Flesh quality properties. *Aquaculture*, 220: 737–747 (2003b).
- Reis, B., et al. "Health Status in Gilthead Seabream (*Sparus aurata*) Juveniles Fed Diets Devoid of Fishmeal and Supplemented with *Phaeodactylum tricornutum*." *Journal of Applied Phycology*, vol. 33, no. 2, 2 Feb. 2021, pp. 979–996, 10.1007/s10811-021-02377-4. Accessed 20 Aug. 2022.

- Remize, Marine, et al. "Microalgae N-3 PUFAs Production and Use in Food and Feed Industries." *Marine Drugs*, vol. 19, no. 2, 18 Feb. 2021, p. 113, 10.3390/md19020113. Accessed 5 May 2021.
- Ren, Lu-Jing, et al. "Impact of Phosphate Concentration on Docosahexaenoic Acid Production and Related Enzyme Activities in Fermentation of *Schizochytrium* Sp." *Bioprocess and Biosystems Engineering*, vol. 36, no. 9, 30 Oct. 2012, pp. 1177–1183, 10.1007/s00449-012-0844-8. Accessed 7 Apr. 2022.
- Riveros, Karina, et al. "Overall Development of a Bioprocess for the Outdoor Production of *Nannochloropsis Gaditana* for Aquaculture." *Aquaculture Research*, vol. 49, no. 1, 17 Aug. 2017, pp. 165–176, 10.1111/are.13445. Accessed 23 Aug. 2022.
- Roy, Sudeshna Sen, and Ruma Pal. "Microalgae in Aquaculture: A Review with Special References to Nutritional Value and Fish Dietetics." *Proceedings of the Zoological Society*, vol. 68, no. 1, 4 Mar. 2014, pp. 1–8, 10.1007/s12595-013-0089-9. Accessed 10 May 2020.
- Rumbos, C. and Athanassiou, C., 2021. The Superworm, *Zophobas morio* (Coleoptera:Tenebrionidae): A 'Sleeping Giant' in Nutrient Sources. *Journal of Insect Science*, 21(2).
- Ryckebosch, Eline, et al. "Nutritional Evaluation of Microalgae Oils Rich in Omega-3 Long Chain Polyunsaturated Fatty Acids as an Alternative for Fish Oil." *Food Chemistry*, vol. 160, Oct. 2014, pp. 393–400, 10.1016/j.foodchem.2014.03.087. Accessed 3 Jan. 2021.
- Sahin, Deniz, et al. "Enhancement of Docosahexaenoic Acid (DHA) Production from *Schizochytrium* Sp. S31 Using Different Growth Medium Conditions." *AMB Express*, vol. 8, no. 1, 24 Jan. 2018, 10.1186/s13568-018-0540-4. Accessed 8 Nov. 2019.
- Sales, R., et al. "Effects of Dietary Use of Two Lipid Extracts from the Microalga *Nannochloropsis Gaditana* (Lubián, 1982) Alone and in Combination on Growth and Muscle Composition in Juvenile Gilthead Seabream, *Sparus Aurata*." *Algal Research*, vol. 53, Mar. 2021, p. 102162, 10.1016/j.algal.2020.102162. Accessed 20 Aug. 2022.

- Samuelsen, T.A., et al. “High Lipid Microalgae (*Schizochytrium* sp.) Inclusion as a Sustainable Source of N-3 Long-Chain PUFA in Fish Feed—Effects on the Extrusion Process and Physical Pellet Quality.” *Animal Feed Science and Technology*, vol. 236, Feb. 2018, pp. 14–28, 10.1016/j.anifeedsci.2017.11.020. Accessed 7 June 2021.
- Santigosa, Ester, et al. “Microalgae Oil as an Effective Alternative Source of EPA and DHA for Gilthead Seabream (*Sparus aurata*) Aquaculture.” *Animals*, vol. 11, no. 4, 31 Mar. 2021, p. 971, 10.3390/ani11040971. Accessed 8 June 2021.
- Sarker, Pallab K., et al. “Towards Sustainable and Ocean-Friendly Aquafeeds: Evaluating a Fish-Free Feed for Rainbow Trout (*Oncorhynchus Mykiss*) Using Three Marine Microalgae Species.” *Elementa: Science of the Anthropocene*, vol. 8, 1 Jan. 2020, 10.1525/elementa.404. Accessed 9 Aug. 2022.
- Sathasivam, Ramaraj, et al. “Microalgae Metabolites: A Rich Source for Food and Medicine.” *Saudi Journal of Biological Sciences*, vol. 26, no. 4, May 2019, pp. 709–722, 10.1016/j.sjbs.2017.11.003.
- Scholz, Matthew J., et al. “Ultrastructure and Composition of the *Nannochloropsis gaditana* Cell Wall.” *Eukaryotic Cell*, vol. 13, no. 11, 19 Sept. 2014, pp. 1450–1464, 10.1128/ec.00183-14. Accessed 4 Nov. 2021.
- Seong, Taekyoung, et al. “First Step of Non-Fish Meal, Non-Fish Oil Diet Development for Red Seabream, (*Pagrus major*), with Plant Protein Sources and Microalgae *Schizochytrium* Sp.” *Aquaculture Research*, vol. 50, no. 9, 12 June 2019, pp. 2460–2468, 10.1111/are.14199. Accessed 16 Dec. 2020.
- Seong et al., Non-Fish Meal, Non-Fish Oil Diet Development for Red Sea Bream, *Pagrus Major* , with Plant Protein and Graded Levels of *Schizochytrium* Sp.: Effect on Growth and Fatty Acid Composition.” *Aquaculture Nutrition*, vol. 26, no. 4, 17 Apr. 2020, pp. 1173–1185, 10.1111/anu.13074. Accessed 22 Nov. 2020.
- Sevgili, Hüseyin, et al. “Apparent Nutrient and Fatty Acid Digestibilities of Microbial Raw Materials for Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) with Comparison to Conventional Ingredients.” *Algal Research*, vol. 42, Sept. 2019, p. 101592, 10.1016/j.algal.2019.101592. Accessed 23 Aug. 2022.

- Shah, Mahfuzur Rahman, et al. "Microalgae in Aquafeeds for a Sustainable Aquaculture Industry." *Journal of Applied Phycology*, vol. 30, no. 1, 5 Sept. 2017, pp. 197–213, 10.1007/s10811-017-1234-z.
- Shields, R. and Lupatsch, I., 2012. Algae for Aquaculture and Animal Feeds. *TATuP - Zeitschrift für Technikfolgenabschätzung in Theorie und Praxis*, 21(1), pp.23-37.
- Skotnicka, M., Karwowska, K., Kłobukowski, F., Borkowska, A. and Pieszko, M., 2021. Possibilities of the Development of Edible Insect-Based Foods in Europe. *Foods*, 10(4), p.766.
- Soares Araujo, R. R. et al. Nutritional composition of insects *Gryllus assimilis* and *Zophobas morio*: Potential foods harvested in Brazil. *Journal of Food Composition and Analysis*, v. 76, p. 22–26, 1 mar. 2019.
- Sørensen, Mette, et al. "Nannochloropsis oceanica-Derived Defatted Meal as an Alternative to Fishmeal in Atlantic Salmon Feeds." *PLOS ONE*, vol. 12, no. 7, 13 July 2017, p. e0179907, 10.1371/journal.pone.0179907. Accessed 31 Oct. 2020.
- Spence, C., Levitan, C. A., Shankar, M. U., & Zampini, M. (2010). Does food color influence taste and flavor perception in humans? *Chemosensory Perception*, 3(1), 68-84.
- Spolaore, Pauline, et al. "Commercial Applications of Microalgae." *Journal of Bioscience and Bioengineering*, vol. 101, no. 2, Feb. 2006, pp. 87–96, www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1389172306705497, 10.1263/jbb.101.87.
- Sprague, M., et al. "Microbial and Genetically Engineered Oils as Replacements for Fish Oil in Aquaculture Feeds." *Biotechnology Letters*, vol. 39, no. 11, 18 July 2017, pp. 1599–1609, 10.1007/s10529-017-2402-6.
- Stoneham, Tyler R., et al. "Production of Omega-3 Enriched Tilapia through the Dietary Use of Algae Meal or Fish Oil: Improved Nutrient Value of Fillet and Offal." *PLOS ONE*, vol. 13, no. 4, 11 Apr. 2018, p. e0194241, 10.1371/journal.pone.0194241.
- Terriente-Palacios, Carlos, and Massimo Castellari. "Levels of Taurine, Hypotaurine and Homotaurine, and Amino Acids Profiles in Selected Commercial Seaweeds,

- Microalgae, and Algae-Enriched Food Products.” *Food Chemistry*, vol. 368, Jan. 2022, p. 130770, 10.1016/j.foodchem.2021.130770. Accessed 15 Oct. 2021.
- Tibaldi, E., Y. Hakim, Z. Uni, F. Tulli, M. de Francesco, U. Luzzana, and S. Harpaz. Effects of the partial substitution of dietary fish-meal by differently processed soybean meals on growth performance, nutrient digestibility and activity of intestinal brush border enzymes in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture*, 261: 182–193 (2006).
- Tibaldi, E., Zittelli, G. C., Parisi, G., Bruno, M., Giorgi, G., Tulli, F., & Poli, B. M. (2015). Growth performance and quality traits of European sea bass (*D. labrax*) fed diets including increasing levels of freeze-dried *Isochrysis* sp.(T-ISO) biomass as a source of protein and n-3 long chain PUFA in partial substitution of fish derivatives. *Aquaculture*, 440, 60-68.
- Tocher, Douglas R. “Omega-3 Long-Chain Polyunsaturated Fatty Acids and Aquaculture in Perspective.” *Aquaculture*, vol. 449, Dec. 2015, pp. 94–107, 10.1016/j.aquaculture.2015.01.010. Accessed 18 Aug. 2019.
- Tocher, Douglas R, et al. “Omega-3 Long-Chain Polyunsaturated Fatty Acids, EPA and DHA: Bridging the Gap between Supply and Demand.” *Nutrients*, vol. 11, no. 1, 4 Jan. 2019, p. 89, www.mdpi.com/2072-6643/11/1/89, 10.3390/nu11010089.
- Tulli, F., Chini Zittelli, G., Giorgi, G., Poli, B. M., Tibaldi, E., & Tredici, M. R. (2012). Effect of the inclusion of dried *Tetraselmis suecica* on growth, feed utilization, and fillet composition of European sea bass juveniles fed organic diets. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 21(3), 188-197.
- Venou, B., M. N. Alexis, E. Fountoulaki, and J. Haralabous. Effects of extrusion and inclusion level of soybean meal on diet digestibility, performance and nutrient utilization of gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Aquaculture*, 261: 343–356 (2006).
- Viegas, Catarina, et al. “Aquaculture Wastewater Treatment through Microalgal Biomass Potential Applications on Animal Feed, Agriculture, and Energy.” *Journal of Environmental Management*, vol. 286, May 2021, p. 112187, 10.1016/j.jenvman.2021.112187. Accessed 24 June 2022.

- Welch, A., Hoenig, R., Stieglitz, J., Benetti, D., Tacon, A., Sims, N. and O'Hanlon, B., 2010. From Fishing to the Sustainable Farming of Carnivorous Marine Finfish. *Reviews in Fisheries Science*, 18(3), pp.235-247.
- Xue, Zhaohui, et al. "Edible Oil Production from Microalgae: A Review." *European Journal of Lipid Science and Technology*, vol. 120, no. 6, 25 Apr. 2018, p. 1700428, 10.1002/ejlt.201700428. Accessed 2 Apr. 2022.
- Yarnold, Jennifer, et al. "Microalgal Aquafeeds as Part of a Circular Bioeconomy." *Trends in Plant Science*, July 2019, 10.1016/j.tplants.2019.06.005. Accessed 2 Sept. 2019.
- Yokoyama, R., & Honda, D. (2007). Taxonomic rearrangement of the genus *Schizochytrium* sensu lato based on morphology, chemotaxonomic characteristics, and 18S rRNA gene phylogeny (Thraustochytriaceae, Labyrinthulomycetes): emendation for *Schizochytrium* and erection of *Aurantiochytrium* and *Oblongichytrium* gen. nov. *Mycoscience*, 48(4), 199-211.
- Zanella, Lorenzo, and Fabio Vianello. "Microalgae of the Genus *Nannochloropsis*: Chemical Composition and Functional Implications for Human Nutrition." *Journal of Functional Foods*, vol. 68, May 2020, p. 103919, 10.1016/j.jff.2020.103919. Accessed 8 Oct. 2020.
- Zhou, A., B. Tan, K. Sen Mai, and Y. Liu. Apparent digestibility of selected feed ingredients for juvenile cobia *Rachycentron canadum*. *Aquaculture*, 241: 441–451 (2004).
- Zhu, Shanli, et al. "Replacing Fish Oil and Astaxanthin by Microalgal Sources Produced Different Metabolic Responses in Juvenile Rainbow Trout Fed 2 Types of Practical Diets." *Journal of Animal Science*, vol. 99, no. 1, 21 Dec. 2020, 10.1093/jas/skaa403. Accessed 19 Mar. 2022.
- Zulkifli, N., Seok-Kian, A., Seng, L., Mustafa, S., Kim, Y. and Shapawi, R., 2022. Nutritional value of black soldier fly (*Hermetia illucens*) larvae processed by different methods. *PLOS ONE*, 17(2), p.e0263924.
- Zvi Cohen, Ph. D, and Colin Ratledge. *Single Cell Oils*. Champaign, Ill., Aocs Press, 2005.

ΙΣΤΟΣΕΛΙΔΕΣ

<https://www.feedipedia.org/node/16>

<https://www.kefish.gr/el/kefalonia-taste-and-nutritional-excellence>

<https://www.biomar.com/globalassets/.global/pdf-files/datasheets/greece/seabream/gr-intro-plus-mt-15-19-mm-sea-bream.pdf>

ABSTRACT

The aim of this study was to investigate the potential use of microalgal biomass and specifically of *Nannochloropsis gaditana* and *Schizochytrium* sp. (commercial and own culture by using wastewater) as a fish oil and fishmeal substitution in the diet of gilthead seabream (*Sparus aurata*).

Juvenile seabream, initial average weight of $3,16 \pm 0,03$ g, were transferred in 9 glass 120 L capacity aquariums in a closed seawater circulation system. The temperature was maintained at 21°C , $\text{pH } 8,00 \pm 0,4$ and salinity was kept at $30 \pm 0,5$ ‰. The juvenile fish were divided into three dietary groups (18 individuals/tank, 3 reps/food group), which were offered three different diets, by hand at saturation, twice daily for 49 days. For the first diet, the primary sources of lipids was fish oil, with the inclusion of soybean oil. For the other two test-diets, there was inclusion by a blend of *N. gaditana* and *Schizochytrium* sp. biomass (by own culture using waste water) at 5,05% and 5,15% of the diet and a blend of *N. gaditana* and *Schizochytrium* sp. biomass (commercial) at 2,5% και 1,05% of the diet respectively. All three diets were isoenergetic (21 MJ/kg of diet), iso-nitrogenous (50% of diet) and isolipidic (15% of the diet).

The partial replacement of fish oil and fish meal with microalgal biomass didn't affect negatively the survival of the fish in the gilthead seabream. Specifically, the fish were fed with both two experimental diets had similar growth rate and FCR with the fish that fed with control diet.

The results of the present study showed that a blend of *N. gaditana* and *Schizochytrium* sp. biomass is suitable for partial dietary fish oil and fish meal substitution for gilthead seabream. Further investigation is needed for various species and also in terms of body

proximate composition, fatty acids profile and histomorphology of fish and microalgae digestibility as well.

Keywords: gilthead seabream, *Sparus aurata*, fish oil and fish meal substitution, microalgae, *Nannochloropsis*, *Schizochytrium*, DHA, EPA

