

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ  
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΙΧΘΥΟΛΟΓΙΑΣ  
ΚΑΙ ΥΔΑΤΙΝΟΥ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

«Υποκατάσταση ιχθυαλεύρου από άλευρο του εντόμου *Zophobas sp*  
στο σιτηρέσιο της τσιπούρας (*Sparus aurata*): Επίδραση στην  
ιστομορφολογία του ήπατος και του εντέρου των ιχθύων»

Κατούνη Αικατερίνη-Μαρία

Βόλος 2020

**«Υποκατάσταση ιχθυαλεύρου από άλευρο του εντόμου *Zorhobas sp* στο σιτηρέσιο της τσιπούρας (*Sparus aurata*): Επίδραση στην ιστομορφολογία του ήπατος και του εντέρου των ιχθύων»**

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) Παναγιώτης Βερίλλης, Αναπληρωτής καθηγητής, Μικροσκοπία και Ανάλυση Εικόνας στην Ιστολογία και στου Υδρόβιους Οργανισμούς, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Μέλος
- 3) Ελένη Μεντέ, Καθηγήτρια, Φυσιολογία Θρέψης Υδρόβιων Ζωικών Οργανισμών, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Μέλος

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να εκφράσω τις ειλικρινείς μου ευχαριστίες σε όλους όσους συνέβαλαν στο να φέρω σε πέρας την παρούσα Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία. Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Επιβλέποντα της εργασίας αυτής κ. Ιωάννη Καραπαναγιωτίδη για την πολύτιμη βοήθειά του και την διαρκή υποστήριξή του, τόσο κατά την διεξαγωγή του πειράματος όσο και κατά την συγγραφή της παρούσας εργασίας, καθώς και τα υπόλοιπα μέλη της εξεταστικής επιτροπής μου, αποτελούμενη από τους Παναγιώτη Βερίλλη και Ελένη Μεντέ, για τις χρήσιμες συμβουλές τους και την καθοδήγησή τους καθ' όλη την διάρκεια διεκπεραίωσης της εργασίας.

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την Μαντώ Ασημάκη για την άμεση και ανιδιοτελή βοήθειά της για την διεκπεραίωση του εργαστηριακού μέρους του πειράματος.

Τέλος, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στην οικογένειά μου για την αμέριστη συμπαράσταση, βοήθεια και προ πάντων κατανόηση και ανοχή καθ' όλο το χρονικό διάστημα των σπουδών μου.

## Περίληψη

Τα ψάρια που συμμετείχαν στην έρευνα, ήταν μέσου βάρους 40g και είχαν λάβει μέρος σε διατροφικό πείραμα διάρκειας 11 εβδομάδων. Στην διάρκεια του διατροφικού πειράματος χρησιμοποιήθηκαν 3 διατροφικά σιτηρέσια καταρτισμένα με τέτοιο τρόπο ώστε να είναι ισοενεργειακά (22 KJ/g) και ισοπρωτεϊνικά (56% της ξηρής ουσίας). Η πρώτη διατροφική ομάδα αποτέλεσε το σιτηρέσιο μάρτυρα, στο οποίο το ιχθυάλευρο (100%) ήταν η κύρια πηγή πρωτεΐνης. Στις άλλες δύο διατροφικές ομάδες έγινε μερική υποκατάσταση του ιχθυαλεύρου σε ποσοστό 10% με άλευρο από το έντομο *Zophobas sp.* και με διαφορετική συγκέντρωση λίπους (ZLF-*Zophobas* Low Fat, ZFF- *Zophobas* Full Fat). Για τους σκοπούς της ιστολογικής ανάλυσης πραγματοποιήθηκε λήψη δειγμάτων εντέρου και ήπατος από 12 ψάρια ανά διατροφική ομάδα και ακολούθησε η απαραίτητη προετοιμασία αυτών. Αφού έγινε μονιμοποίηση των ιστών σε ουδέτερο ρυθμιστικό διάλυμα φορμόλης 10%, ακολούθησε η αφυδάτωση τους σε μια σειρά διαλυμάτων αιθανόλης, η διαύγαση σε ξυλόλη και ο εμποτισμός τους με παραφίνη, σύμφωνα με την συνήθη ιστολογική τεχνική που ακολουθείται. Έπειτα πραγματοποιήθηκε εξαγωγή τομών στα 5μm, αποπαραφίνωση, ενυδάτωση, χρώση με αιματοξυλίνη-ηωσίνη και στερεοποίηση. Συνολικά 36 τομές εντέρου και 36 τομές ήπατος εξετάστηκαν στο οπτικό μικροσκόπιο.

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την συγκεκριμένη ιστολογική μελέτη, δεν παρουσίασαν αλλοιώσεις στο έντερο των ψαριών, για κάποια από τις διατροφικές ομάδες και συγκριτικά πάντα με το σιτηρέσιο-μάρτυρα. Αντίθετα στο συκώτι βρέθηκε μακροστεάτωση και θρόμβωση και στις 3 διατροφικές ομάδες. Οι πυρήνες ήταν ευδιάκριτοι και ο αριθμός των λιποσταγονιδίων ήταν μεγάλος με ποικίλα μεγέθη.

Φυσικά υπάρχει ανάγκη για παραπάνω έρευνα προκειμένου να προσδιοριστεί η επίδραση των εντομάλευρων σε διαφορετικά ποσοστά υποκατάστασης του ιχθυαλεύρου, καθώς και στην σύσταση του σώματος αλλά και στο προφίλ των αμινοξέων και λιπαρών οξέων για την τσιπούρα (*S. aurata*).

# Περιεχόμενα

## Περιεχόμενα

1. Εισαγωγή.....	1
1.1 Τσιπούρα.....	1
1.2 Ο κλάδος των υδατοκαλλιεργειών .....	2
1.3 Η διατροφή στις υδατοκαλλιέργειες .....	3
1.3.1 Το ιχθυάλευρο ως πηγή πρωτεΐνης και η αναγκαιότητα υποκατάστασής του .....	3
1.3.2 Μεταποιημένες ζωικές πρωτεΐνες από έντομα.....	5
1.3.3 Το είδος <i>Zorhobas sp.</i> ως υποψήφια πηγή πρωτεϊνών .....	11
1.4 Ο ρόλος του ήπατος και του εντέρου στη φυσιολογία θρέψης των ιχθύων .....	13
1.4.1 Έντερο.....	13
1.4.2 Ήπαρ.....	15
1.4.3 Πάγκρεας.....	16
1.5 Στόχοι παρούσας διατριβής.....	17
2. Υλικά και μέθοδοι .....	18
2.1 Δειγματοληψίες .....	18
2.2 Ιστολογική τεχνική .....	19
2.2.1 Μόνιμα παρασκευάσματα.....	19
2.2.2 Εξοπλισμός του εργαστηρίου .....	20
2.3 Παρουσίαση της κλασικής ιστολογικής τεχνικής.....	22
2.3.1 Λήψη υλικού (απομόνωση ιστών) .....	23
2.3.2 Μονιμοποίηση .....	23
2.3.3 Ιστοκινέτα.....	23
2.3.4 Εγκλεισμός ιστών σε παραφίνη .....	24
2.3.5 Τεχνική κοπής ιστολογικών τομών .....	25
2.3.6 Αποπαραφίνωση και χρώση .....	26
2.3.7 Επικάλυψη των τομών .....	27
2.3.8 Παρατήρηση σε μικροσκόπιο .....	28
2.4 Στατιστική ανάλυση .....	28
3. Αποτελέσματα.....	29

4. Συζήτηση .....	38
5. Βιβλιογραφία .....	47
Ξενόγλωσση Βιβλιογραφία.....	47
Ελληνική Βιβλιογραφία.....	56
Ηλεκτρονική βιβλιογραφία .....	57
Abstract .....	58



# 1. Εισαγωγή

## 1.1 Τσιπούρα

Η τσιπούρα *Sparus aurata* (Linnaeus, 1758) είναι Μεσογειακό είδος και ένα από τα κυριότερα είδη εκτροφής των ελληνικών και μεσογειακών θαλάσσιων υδατοκαλλιεργειών. Είναι πελαγικό, ευρύθερμο και ευρύαλο είδος που συναντάται κατά μήκος των ακτών του Ανατολικού Ατλαντικού, από τη Μεγάλη Βρετανία έως τη Σενεγάλη και είναι σπάνιο στη Μαύρη Θάλασσα (FAO 2020). Στο φυσικό περιβάλλον συναντάται σε περιοχές με θαλάσσια λιβάδια Ποσειδωνίας, υφάλους και αμμώδη βενθικά υποστρώματα. Τα νεαρά άτομα παραμένουν σε σχετικά ρηχές περιοχές (έως 30 μέτρα) (FAO 2020) ενώ τα μεγαλύτερα άτομα φτάνουν σε βάθος 150 μέτρων (Morretti et al., 1999). Παρουσιάζει ανθεκτικότητα σε μεγάλο εύρος θερμοκρασιών (4-32°C) και αλατότητας (έως και 40‰) με βέλτιστη την θερμοκρασία μεταξύ 22 έως 24°C (Klaoudatos & Apostolopoulos, 1986) και αλατότητα από 28‰ έως 32‰. Επίσης προσαρμόζεται εύκολα στην αιχμαλωσία, έχει γρήγορη ανάπτυξη και παρέχει καλή ποιότητα κρέατος. Για όλα τα παραπάνω, η τσιπούρα έχει μεγάλο οικονομικό ενδιαφέρον και επιλέγεται για εντατική εκτροφή (Apostolopoulos & Klaoudatos, 1986).

Η τσιπούρα αποτελούσε από αιώνες εκτρεφόμενο είδος στις ελληνικές εκτατικές εκτροφές των λιμνοθαλασσών αλλά και άλλων μεσογειακών περιοχών. Οι εκτροφές στις λιμνοθάλασσες του Μεσολογίου, των ιταλικών <<vallioltura>> και των αιγυπτιακών <<hosha>> απέδιδαν για αιώνες τσιπούρες ανάμεσα στα άλλα εκτρεφόμενα είδη. Η εκτατική εκτροφή της τσιπούρας παραμένει μια παραδοσιακή δραστηριότητα σε ορισμένες περιοχές, αλλά με πολύ χαμηλό αντίκτυπο στην αγορά (Sola et al. 2006). Σήμερα, εκτρέφονται κατά το πλείστον σε εκτατικά συστήματα

εκτροφής σε λιμνοθάλασσες ή εντατικά σε δεξαμενές ή κλωβούς. Προς το παρόν, το μεγαλύτερο μέρος της εκτροφής προέρχεται από την εντατική εκτροφή, με μέση πυκνότητα 20 – 100 kg/m<sup>2</sup> και FCR 1,5 – 2 (FAO 2016).

Η Ελλάδα βρίσκεται στις 2 πρώτες χώρες παραγωγής ψαριών Μεσογειακής υδατοκαλλιέργειας, αντιπροσωπεύοντας το 29% της παραγωγής τους διεθνώς (ΣΕΘ 2018). Συγκεκριμένα, η παραγωγή τσιπούρας Μεσογειακής υδατοκαλλιέργειας το 2017 ανήλθε στους 220.167 τόνους με το 73,6% περίπου να προέρχεται από την Τουρκία, την Ελλάδα και την Αίγυπτο. Αντίστοιχα για το 2018 η παραγωγή ανήλθε στους 246.531 τόνους, με το 64,5% περίπου να προέρχεται την Τουρκία, την Ελλάδα και την Ισπανία (ΣΕΘ 2019). Επίσης, η παραγωγή τσιπούρας για το 2018 στην Ε.Ε έφτασε τους 100.109 τόνους, με την Ελλάδα να αποτελεί μακράν την μεγαλύτερη παραγωγό χώρα με 61.000 τόνους της Ευρωπαϊκής παραγωγής τσιπούρας. Ακολουθούν η Ισπανία, η Ιταλία, η Κροατία, η Κύπρος, η Γαλλία και η Πορτογαλία (ΣΕΘ 2019).

## **1.2 Ο κλάδος των υδατοκαλλιεργειών**

Η υδατοκαλλιέργεια είναι η εκτροφή ζωικών οργανισμών, συμπεριλαμβανομένων των ψαριών, των μαλακίων, των καρκινοειδών και των υδρόβιων φυτών, κυρίως φυκιών. Η αλιεία και ο κλάδος της υδατοκαλλιέργειας έχουν επεκταθεί σημαντικά τις τελευταίες δεκαετίες και η συνολική παραγωγή, το εμπόριο και η κατανάλωση των προϊόντων τους έφτασαν σε νέο επίπεδο το 2018 (FAO 2020). Η παραγωγή της αλιείας έχει μείνει σχετικά στάσιμη με αύξηση που φτάνει το 14% από το 1990 έως το 2018. Από την άλλη, για το ίδιο χρονικό διάστημα, υπήρξε αύξηση της τάξης του 527% της παγκόσμιας παραγωγής υδατοκαλλιέργειας (FAO 2020). Συγκεκριμένα, η παγκόσμια παραγωγή υδατοκαλλιέργειας έφτασε τους 114,5

εκατομμύρια τόνους, με συνολική αξία πώλησης 263,6 δισεκατομμύρια δολάρια ΗΠΑ (FAO 2020).

Η αύξηση της συνολικής κατανάλωσης αλιευμάτων έφτασε το 122% από το 1990 έως το 2018 (FAO 2020). Η υδατοκαλλιέργεια αντιπροσωπεύει επί του παρόντος περίπου το 50% των ψαριών που καταναλώνονται από τον άνθρωπο (Gasco et al. 2018). Σύμφωνα όμως με τις τελευταίες αξιολογήσεις του Οργανισμού Τροφίμων και Γεωργίας των Ηνωμένων Εθνών (FAO) ο παγκόσμιος πληθυσμός θα φθάσει τα 9,5 δισεκατομμύρια το 2050 (FAO 2016). Αυτό συνεπάγεται περεταίρω ζήτηση αλιευτικών προϊόντων για την κάλυψη των επισιτιστικών αναγκών του πληθυσμού. Το μεγαλύτερο μέρος των προϊόντων αυτών θα προέρχονται από την υδατοκαλλιέργεια. Αυτό θα έχει σαν αποτέλεσμα ακόμη μεγαλύτερη ζήτηση βιομηχανικά παρασκευασμένων ιχθυοτροφών (Καραπαναγιωτίδης 2018).

### **1.3 Η διατροφή στις υδατοκαλλιέργειες**

#### **1.3.1 Το ιχθυάλευρο ως πηγή πρωτεΐνης και η αναγκαιότητα υποκατάστασής του**

Κύριο συστατικό των βιομηχανικά παρασκευασμένων ιχθυοτροφών είναι το ιχθυάλευρο και το ιχθυέλαιο. Το ιχθυάλευρο και το ιχθυέλαιο παρασκευάζονται κυρίως από ολόκληρα πελαγικά ψάρια, από παρεμπίπτοντα αλιεύματα ή από υπολείμματα φιλλετοποιημένων ή μεταποιημένων ψαριών (Καραπαναγιωτίδης 2018). Η χρήση τους είναι απαραίτητη καθώς καλύπτουν όλες τις απαιτήσεις των εκτρεφόμενων οργανισμών σε πρωτεΐνες (απαραίτητα αμινοξέα) και λίπη (λιπαρά οξέα). Ωστόσο, τα αλιευτικά αποθέματα που χρησιμοποιούνται για την παρασκευή του ιχθυαλεύρου και του ιχθυελαίου έχουν φτάσει στο όριο της βιωσιμότητας με πολλά από αυτά να είναι

υπεραλιευμένα σε σημείο μη αναστρέψιμο και η παγκόσμια παραγωγή ιχθυαλεύρου και ιχθυελαίου να παραμένει στάσιμη τα τελευταία 20 χρόνια (Pike 2005). Είναι γνωστό ότι τουλάχιστον 51 είδη θαλάσσιων ιχθύων είναι λειτουργικά εξαφανισμένα σε κάποια ή σε ολόκληρη την προηγούμενη γεωγραφική τους περιοχή, κυρίως λόγω της εμπορικής αλιείας (Dulvy et al., 2003) και περισσότεροι από 130 διαφορετικοί πληθυσμοί ψαριών έχουν χάσει πάνω από το 80% της ιστορικής τους βιομάζας (Hutchings and Reynolds, 2004) ενώ οι Worm et al. (2006) προέβλεψαν την πλήρη κατάρρευση όλων των παγκόσμιων ιχθυαποθεμάτων μέχρι το 2048. Σε μέρη όπου η διαχείριση της αλιείας δεν υπάρχει ή είναι αναποτελεσματική, η κατάσταση των αλιευτικών αποθεμάτων είναι κακή και επιδεινώνεται. Αν και το 78,7% όλων των εκφορτώσεων θαλάσσιας αλιείας προέρχονται από βιολογικά βιώσιμα αποθέματα, η άνιση πρόοδος στη διαχείριση της αλιείας υπογραμμίζει την επείγουσα ανάγκη να αναπαραχθούν και να προσαρμοστούν εκ νέου επιτυχημένες πολιτικές. Πρέπει να γίνουν περισσότερα για να διασφαλιστεί η βιώσιμη αλιεία και υδατοκαλλιέργεια σε όλο τον κόσμο (FAO 2016).

Επιπλέον, από ηθολογική άποψη, έχουν υπάρξει αντιδράσεις από την χρήση των ιχθυαλεύρων στις ιχθυοτροφές, καθώς οι πρώτες ύλες παρασκευής τους θα μπορούσαν να σιτίσουν μεγάλο μέρος του παγκόσμιου πληθυσμού που υποσιτίζεται από πρωτεΐνη ζωικής προέλευσης (Καραπαναγιωτίδης 2018). Όλα τα παραπάνω έχουν σαν αποτέλεσμα την περιορισμένη προσφορά τους, συχνά με πολύ υψηλές τιμές και την επιτακτική ανάγκη εύρεσης εναλλακτικών πηγών πρωτεϊνών και λιπών ώστε η μελλοντική ανάπτυξη της υδατοκαλλιέργειας να είναι εφικτή. Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, το ιχθυάλευρο και ιχθυέλαιο καλύπτουν όλες τις απαιτήσεις των εκτρεφόμενων οργανισμών. Πιο συγκεκριμένα, τα σαρκοφάγα ψάρια, που αποτελούν

και το μεγαλύτερο μέρος της παγκόσμιας παραγωγής, δεν έχουν απαίτηση σε ιχθυάλευρο και ιχθυέλαιο αλλά στα αμινοξέα, τα λιπαρά οξέα και στα θρεπτικά που περιέχονται σε αυτά και έχει αποδειχτεί η πιθανότητα υποκατάστασης τους με συστατικά που θα προσφέρουν τα απαραίτητα αυτά συστατικά στα εκτρεφόμενα ψάρια (Welch et al. 2010).

Σήμερα, έχουν ερευνηθεί εναλλακτικά συστατικά για σχεδόν κάθε εμπορικά σημαντικό ψάρι, όπως είναι ο σολομός του Ατλαντικού (*Salmo salar*) (Olli et al., 1995, Bjerkeng et al., 1997, Bell et al., 2001, 2003, 2004), reddrum (*Sciaenop socellatus*) (Kureshyetal., 2000), το καλκάνι (*Psetta maxima*) (Regostetal., 2003a, Fournieretal., 2004), το λαυράκι (*Dicentrarchu slabrax*) (Gouveia and Davies, 2000, Tibaldi et al., 2006), η τσιπούρα (*Sparus aurata*) (Izquierdo et al., 2005; Venou et al., 2006), η Ιαπωνική γλώσσα (*Paralichthys olivaceus*) (Kikuchi, 1999), το Ιαπωνικό μαγιάτικο (*Seriola quinqueradiata*) (Maita et al., 2006), και την ιριδίζουσα πέστροφα (*Oncorhynchus mykiss*) (Kaushik et al., 1995).

### **1.3.2 Μεταποιημένες ζωικές πρωτεΐνες από έντομα**

Από τα αρχαία χρόνια μέχρι και σήμερα τα έντομα αποτελούν μέρος της ανθρώπινης διατροφής ως φυσικός ανανεώσιμος πόρος (Ramos-Elorduy & Conconi, 1994). Σε πολλές περιπτώσεις λειτουργούσαν ως εναλλακτική πηγή πρωτεΐνης για την αντιστάθμιση της περιοδικής ή εποχιακής έλλειψης άλλων πηγών (Ramos & Elorduy, 1997). Μέχρι και σήμερα, καταναλώνονται από ανθρώπους σε πολλές περιοχές της Ασίας, της Λατινικής Αμερικής και της Αφρικής (Bukkens, 1997). Αυτά θεωρούνται ότι συμπληρώνουν δίαιτες περίπου 2 δισεκατομμυρίων ανθρώπων.

Αν και τα έντομα άρχισαν να αξιολογούνται ως δυνητικά τρόφιμα για ζώα πριν

από 40 χρόνια (Calvert et al., 1969; Hale, 1973; Ichhronani and Malik, 1971; Newton et al., 1977; Phelps et al., 1975; Teotia and Miller, 1974), η ενσωμάτωση εντόμων στις ζωοτροφές δεν έχει λάβει μεγάλη προσοχή μέχρι πρόσφατα (Ogunji et al., 2006). Συγκεκριμένα, η πιθανή χρήση αλεύρου εντόμων στις δίαιτες των ψαριών προσέλκυσε πρόσφατα πολύ μεγάλη προσοχή (Barroso et al., 2014, Henry et al., 2015). Τα έντομα είναι ένα καλά τεκμηριωμένο μέρος της διαίτας ψαριών, ιδιαίτερα στα αρχικά στάδια για σαρκοφάγα και παμφάγα είδη. Περιλαμβάνουν υδρόβια έντομα στο στάδιο των προνυμφών ή των ενηλίκων στις τάξεις των δίπτερα, τριχόπτερα, οδοντόγναθα, ημίπτερα, κολεόπτερα και εφημερόπτερα (Ribeiro et al. 2014; Costa & Soares 2015; Pereira Neves et al. 2015; Severo-Neto et al. 2015; Abilhoa et al. 2016). Ορισμένα έντομα στις τάξεις υμενόπτερα, δίπτερα και κολεόπτερα έχουν επίσης βρεθεί στα έντερα θαλάσσιων ή υφάλμυρων ψαριών (Darnell 1958; Elliot 1967; Dyer et al. 2015). Σε πολλές περιπτώσεις, τα έντομα αποτελούν μέρος της κύριας διατροφής των ψαριών γλυκού νερού. Πολλά είδη ψαριών τρέφονται με καρκινοειδή, τα οποία είναι επίσης αρθρόποδα, επομένως μοιράζονται ορισμένα από τα χαρακτηριστικά τους με έντομα (van Huis και De Prins, 2013). Τα έντομα είναι μια πηγή ζωικών πρωτεϊνών, με ένα «καλό» προφίλ αμινοξέων, και αποτελούν μια πλούσια πηγή ενέργειας και λιπιδίων (Sánchez-Muros et al. 2014). Περιέχουν μια καλή ισορροπία απαραίτητων αμινοξέων με μικρή έλλειψη (van Huis και De Prins, 2013; Xiaoming et al., 2010) που το καθιστούν μια πιθανή βιώσιμη εναλλακτική λύση για τη διατροφή των ψαριών. Η χρήση ενός μείγματος με διάφορες πηγές πρωτεϊνών (διαφορετικά έντομα, έντομα μαζί με πρεβιοτικά, με φυτά ή με άλλες πηγές πρωτεΐνης ζωικής προέλευσης) ή προσθήκη των αμινοξέων που είναι σε ανεπάρκεια θα μπορούσε να μειώσει την πιθανή διατροφική έλλειψη και να ισορροπήσει καλύτερα το προφίλ των αμινοξέων με την

ενσωμάτωση των εντομάλευρων. Η περιεκτικότητά τους σε πρωτεΐνες μπορεί να φτάσει σε τιμές 60-70% ανάλογα με το είδος του εντόμου που θα χρησιμοποιηθεί και το στάδιο ανάπτυξής του. Γενικά τα εντομάλευρα περιέχουν μέταλλα και βιταμίνες παρόμοια με αυτά του ιχθυάλευρου, καθώς και υψηλή περιεκτικότητα σε ενέργεια και φυτικές ίνες (van Huis και De Prins, 2013).

Η χρήση του εντομάλευρου στην διατροφή των ψαριών προσδίδει μια ακόμη προστιθέμενη αξία: την χαμηλή οικολογική τους επίδραση. Γενικά τα έντομα μπορούν να μεγαλώσουν σε μικρά μέρη και με λίγη ανάγκη για γη και νερό (Henry et al., 2015; van Huis & De Prins, 2013). Χαρακτηρίζονται από υψηλό ρυθμό αναπαραγωγής και αποδοτικότητα παραγωγής (Bruni et al., 2018; Makkar et al., 2014) με υψηλό ποσοστό μετατροπής των ζωοτροφών (Bruni et al., 2018; van Huis & De Prins, 2013). Τα έντομα μπορούν επίσης να τρέφονται από οργανικά απόβλητα και απόβλητα τροφίμων, μετατρέποντάς τα σε βιομάζα πλούσια σε πρωτεΐνες και λίπη. Αυτή η διαδικασία συμβάλλει επίσης στη μείωση των περιβαλλοντικών ζητημάτων που σχετίζονται με την ανανέωση των απορριμμάτων τροφίμων (Makkar et al., 2014).

Αξίζει επίσης να αναφερθούν τα οικονομικά του πλεονεκτήματα. Το 2015, η τιμή αγοράς του αλεύρου *Tenebrio molitor* ήταν 6,3 \$/kg (Cortes Ortiz et al., 2016). Το 2016 η τιμή του αλεύρου *Hermetia illucens* βρέθηκε περίπου στα 5,6 \$/kg (προσωπική επικοινωνία του Ferrer Llagostera). Ωστόσο, η τάση είναι να μειωθούν οι τιμές, καθώς το 2018 η τιμή του αλεύρου *H. illucens* μειώθηκε σε περίπου 2,5 \$/kg (προσωπική επικοινωνία του Ferrer Llagostera), δείχνοντας ότι το εντομάλευρο είναι ανταγωνιστικό με το ιχθυάλευρο.

Η καθιέρωση και η χρήση του εντομάλευρου έγινε πρόσφατα αποδεκτή ως τροφή για είδη υδατοκαλλιέργειας (EC, 2017). Σύμφωνα με την Ευρωπαϊκή Ένωση τα μόνα εγκεκριμένα εντομάλευρα είναι αυτά που προέρχονται από τα παρακάτω είδη:

1) *Hermetia illucens* (HI)-ένα είδος μαύρης μύγας γνωστή και ως Black soldier fly και την *Musca domestica* (MD) η οποία είναι η κοινή μύγα.

2) *Tenebrio molitor* (TM)- γνωστό και ως Yellow Mealworm (σκώληκας του αλεύρου) και *Alphitobius diaperinus* (Lesser Mealworm).

3) *Acheta domesticus* (Housecricket), *Grylloides sigillatus* (Banded cricket), *Gryllus assimilis* (Field cricket)-και τα 3 είναι είδη τριζονιών

Ωστόσο, σε άλλες χώρες εκτός της ΕΕ, τα εγκεκριμένα είδη θα μπορούσε να είναι διαφορετικά με άλλα έντομα να θεωρούνται πολύ ενδιαφέροντα για τη διατροφή των ψαριών (Barroso et al., 2014, Henry et al., 2015, Makkar et al., 2014).

Επιπλέον, η αποδοχή του εντομάλευρου ως βιώσιμη εναλλακτική λύση για τη διατροφή των ψαριών δεν σχετίζεται μόνο με τεχνικούς, οικονομικούς και ρυθμιστικούς περιορισμούς. Συνδέεται επίσης με τις προτιμήσεις, την αντίληψη και την αποδοχή των καταναλωτών έναντι της χρήσης των εντόμων ως εναλλακτική πηγή πρωτεϊνών στις ζωοτροφές (Mancuso et al., 2016). Μέχρι στιγμής, έχουν δημοσιευτεί πολύ λίγες μελέτες που αναλύουν τη γνώμη και την προτίμηση των καταναλωτών σχετικά με τη συμπερίληψη των εντόμων στην υδατοκαλλιέργεια (Mancuso et al., 2016; Smith & Rosie, 2013; Verbeke et al., 2015). Η πλειονότητα των αποτελεσμάτων έδειξε ότι η αντίληψη και οι προτιμήσεις των καταναλωτών έναντι αυτής της εναλλακτικής λύσης θα ήταν εκ των προτέρων θετικές. Σε κάθε περίπτωση, τα έντομα θα μπορούσαν να αποτελέσουν μια καλή εναλλακτική λύση για τα ιχθυάλευρα. Η θρεπτική τους αξία



εξαρτάται από παράγοντες όπως το είδος, το στάδιο ανάπτυξης του εντόμου, τη διατροφή του και την επεξεργασία που έχει υποβληθεί (Devic et al., 2018; van Huis & De Prins, 2013; Xiaoming et al. , 2010). Η χημική σύσταση και η θρεπτική αξία των αλεύρων από νύμφες εντόμων εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό από τη μεταχείριση (μεθοδολογίες ξήρανσης, διαδικασίες απολίπανσης) και από το υπόστρωμα που χρησιμοποιείται για την εκτροφή τους (Henry et al. 2015). Αναλυτικότερα, το υπόστρωμα εκτροφής δεν φαίνεται να επηρεάζει την περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη στις νύμφες, ενώ αντίθετα το λιπιδιακό κλάσμα είναι ευαίσθητο σε διακυμάνσεις τόσο από ποσοτική όσο και ποιοτική άποψη λιπαρών οξέων (Henry et al. 2015, Makkar et al., 2014). Η υψηλή περιεκτικότητα σε λίπος εντόμων (15-50%) μπορεί μερικές φορές να προκαλέσει προβλήματα τόσο για τη διαμόρφωση της τροφής όσο και για την αποθήκευση και τη σταθερότητα της πελλέτας. Για τους λόγους αυτούς, οι παραγωγοί εντόμων κάνουν απολίπανση χρησιμοποιώντας διάφορες μεθόδους (φυσικές ή χημικές εκχυλίσεις). Επιπλέον, το λίπος που εξάγεται από έντομα θα μπορούσε να αναβαθμιστεί και να χρησιμοποιηθεί ως πρώτη ύλη για άλλες παραγωγές όπως το βιοκαύσιμο (Henry et al., 2015).

Ακόμη, οι προνύμφες των εντόμων είναι φτωχές σε υψηλώς ακόρεστα λιπαρά οξέα. Η κύρια διαφορά μεταξύ των εντομάλευρων και του ιχθυάλευρου είναι η περιεκτικότητα σε εικοσαπεντανοϊκό οξύ (EPA, C20: 5 n3) και εικοσιδυαεξανοϊκό οξύ (DHA, C22: 6 n3). Συνήθως η μεγάλη προσθήκη εντομάλευρου στο σιτηρέσιο έχει σαν αποτέλεσμα την δραματική αλλαγή του προφίλ των λιπαρών οξέων με μείωση του EPA και DHA και μείωση της αναλογία n3/n6 λιπαρών οξέων (Belforti et al. 2015; Gasco et al. 2016; St-Hilaire et al. 2007a, b). Τα ψάρια καταλήγουν να προσαρμόσουν το προφίλ των λιπαρών τους οξέων με αυτό της παρεχόμενης διατροφής (Renna et al., 2017),

επομένως, αυτή η διαφορά κάνει τη σύνθεση των φιλέτων ψαριών να έχει αναλογία ω-3/ω-6 σημαντικά χαμηλότερη από την επιθυμητή, καθώς και χαμηλά επίπεδα PUFA (Devic et al., 2018; Gasco et al., 2016; Renna et al., 2017; Sealey et al., 2011). Αυτό θα υποτιμούσε την ποιότητα των ψαριών για κατανάλωση από τον άνθρωπο, καθώς είναι γνωστό ότι τα ω-3 και PUFAs είναι πολύ ευεργετικά για την ανθρώπινη υγεία και συνιστώνται ιδιαίτερα κατά την κατανάλωση ψαριών (Devic et al., 2018; Ruxton et al., 2004). Αυτό το πρόβλημα θα μπορούσε να αντιμετωπιστεί με την χορήγηση ενός τελικού σιτηρεσίου με ιχθυάλευρο και ιχθυέλαιο, πριν την διάθεση των ψαριών στο εμπόριο, ώστε να αποκατασταθούν τα ω-3 λιπαρά οξέα στα φιλέτα των ψαριών.

Τέλος, ένα πρόβλημα που αναφέρεται συχνά από την χρήση εντόμων στις ιχθυοτροφές είναι η υψηλή περιεκτικότητά τους σε χιτίνη. Η χιτίνη είναι ένα κύριο συστατικό των εξωσκελετών των εντόμων και θεωρείται δύσκολη στη πέψη από τα ψάρια, λόγω μειωμένης ενζυμικής δραστηριότητας (Gasco et al., 2016, Henry et al., 2015, Rust 2002, Sanchez-Muros et al., 2014). Ωστόσο, αν και θεωρείται ότι πολλά είδη ψαριών δεν μπορούν να το αφομοιώσουν (Hu et al., 2007), η παρουσία χιτινασών έχει παρατηρηθεί στα ψάρια (Fange et al., 1979; Henry et al., 2015; Krogdahl et al., 2005). Οι παραγωγοί εντομάλευρου μπορούν να μειώσουν της περιεκτικότητας σε χιτίνη μέσω εκχύλισης (Belluco et al. 2013; Sanchez-Muros et al. 2014) ή μπορούν να αυξήσουν την πεπτικότητα των ψαριών με προσθήκη ενζύμων (Henry et al. 2015). Ορισμένοι ισχυρίζονται ότι μικρές ποσότητες χιτίνης μπορούν να λειτουργήσουν ως πρεβιοτικά και να βελτιώσουν την εντερική μικροχλωρίδα, καθώς και την πεπτικότητα των πρωτεϊνών, των λιπιδίων και άλλων θρεπτικών ουσιών (Bruni et al., 2018; Gasco et al., 2016; Piccolo et al., 2017). Εντούτοις αυτές οι τεχνολογίες δεν εφαρμόζονται πλήρως και υπάρχει ανάγκη επιπλέον έρευνας στο συγκεκριμένο τομέα.

### 1.3.3 Το είδος *Zorhobas sp.* ως υποψήφια πηγή πρωτεϊνών

Η εντομοφαγία είναι κοινή πρακτική σε πολλά μέρη του κόσμου και υπάρχουν πάνω από 2000 είδη εντόμων που χρησιμοποιούνται ως φαγητό (Van Huis, 2015). Ενώ είναι κοινή πρακτική στην Βραζιλία, το *Zorhobas morio* εκτρέφεται σε αιχμαλωσία και προορίζεται μόνο για τροφές ζώων. Το εντομάλευρο από *Zorhobas morio* είναι γνωστό ως καλή πρωτεϊνική πηγή και χρησιμοποιείται ευρέως ως συμπλήρωμα διατροφής για πουλιά και ψάρια (Ebeling, 1975). Δεδομένου ότι τα έντομα έχουν αναγνωριστεί ως εναλλακτική λύση για το ιχθυάλευρο, το *Z. morio* στο σιτηρέσιο, είναι ένα πολλά υποσχόμενο έργο, καθώς μπορεί να δώσει παρόμοια ανάπτυξη των ψαριών συγκριτικά με μια δίαιτα με βάση το ιχθυάλευρο. Είναι πλούσιο σε πρωτεΐνες και περιέχει επαρκείς ποσότητες απαραίτητων αμινοξέων που απαιτούνται για τη βέλτιστη ανάπτυξη των ψαριών. Από αναλύσεις που έχουν γίνει στο *Z. morio* έχει βρεθεί ότι η πρωτεΐνη του κυμαίνεται από 43,13-68,08% ξηρής ουσίας (Πίνακας 1).

**Πίνακας 1** Ποσοστό πρωτεΐνης και λίπους στο *Z. morio* σε διάφορες μελέτες

Πρωτεΐνη (% ξηρής ουσίας)	Λίπη (% ξηρής ουσίας)	Συγγραφέας
46,8	43,64	Araujo et al.(2019)
43,13	40,8	Rumpold and Schlüter (2013)
68,05	14,25	Oonincx and Dierenfeld (2012)
46	35	Adámková et al. (2017)
49,3	33,6	Benzestiha et al 2020
47,43	40,01	Jabir et al.(2011)

**Πίνακας 2** Περιεκτικότητα του *Z. morio* σε απαραίτητα αμινοξέα (Benzestihha et al 2020)

<b>Απαραίτητα αμινοξέα</b>	<b>Περιεκτικότητα (% ξηρής ουσίας)</b>
<b>Αργινίνη</b>	2,52
<b>Ιστιδίνη</b>	1,41
<b>Ισολευκίνη</b>	2,18
<b>Λευκίνη</b>	3,56
<b>Λυσίνη</b>	2,71
<b>Μεθειονίνη</b>	0,67
<b>Φαινυλαλανίνη</b>	1,82
<b>Θρεονίνη</b>	1,97
<b>Βαλίνη</b>	2,97
<b>Τρυπτοφάνη</b>	0,57

Ωστόσο η μεθειονίνη φαίνεται να μην είναι επαρκής (Yi et al., 2013; Barroso et al., 2014) (Πίνακας 2). Επίσης είναι φτωχό σε μέταλλα, όπως το ασβέστιο και ο φώσφορος (Ghaly and Alkokaik, 2009). Ακόμη, ενώ γνωρίζουμε ότι η περιεκτικότητά του σε λίπος μπορεί να κυμαίνεται από 14,25-43,64 (% ξηρής ουσίας) σύμφωνα με τις ελάχιστες μελέτες που έχουν γίνει (Πίνακας 1), λίγα είναι γνωστά για την περιεκτικότητά του σε λιπαρά οξέα (Πίνακας 3). Οι διαφορές στο περιεχόμενο λιπιδίων μπορούν να εξηγηθούν από το στάδιο ανάπτυξης (Xiaoming et al., 2010).

Πίνακας 3 Περιεκτικότητας του *Z. morio* σε λιπαρά οξέα (Benzestihā et al 2020)

Λιπαρά οξέα	Περιεκτικότητα (% ξηρής ουσίας)
Μυριστικό (:14:0)	0,3
Παλμιτικό (C16:0)	10,5
Παλμιτελαϊκό (C16:1)	0,2
Στεατικό (C18:0)	3,1
Ολεϊκό (C18:1)	10,3
Λινολεϊκό (C18:2)	8,2
Λινολενικό (C18:3)	0,3

Τέλος, το *Zorhobas atratus* είναι υποψήφιο για καλλιέργεια μεγάλης κλίμακας λόγω πολλών πλεονεκτημάτων καθώς έχει ταχύτερη ανάπτυξη όταν εκτρέφεται σε υψηλή πυκνότητα πληθυσμού (Quennedey et al., 1995; Weaver and McFarlane, 1990) ενώ προσαρμόζεται καλά σε περιβάλλον ξηρασίας.

## 1.4 Ο ρόλος του ύπατος και του εντέρου στη φυσιολογία θρέψης των ιχθύων

### 1.4.1 Έντερο

Το έντερο είναι το τμήμα του πεπτικού σωλήνα που ακολουθεί τον στόμαχο. Το εντερικό μήκος αλλάζει ανάλογα με το είδος και τις διατροφικές συνήθειες και δεν υπάρχει αξιοσημείωτη διαφορά μεταξύ του λεπτού και του παχέος εντέρου. Ορισμένα είδη ιχθύων διαθέτουν έντερο με λεία επιφάνεια ενώ σε άλλα είδη παρουσιάζονται διάφορες πτυχώσεις (Halver J.E. & Hardy R.W 2002) . Σε πολλά είδη το έντερο

διαθέτει εντερικές λάχνες, οι οποίες είναι ένας σχηματισμός του βλεννογόνου που αποτελείται από ένα επιθήλιο και έναν χιτώνα συνδετικού ιστού. Σε αυτό περιέχονται τριχωειδή αγγεία αίματος και λέμφου. Το εντερικό επιθήλιο αποτελείται από εντεροκύτταρα, που διαθέτουν ψυκτροειδή παρυφή (μικρολάχνες) και βλεννογόνα κύτταρα (καλυκοειδή κύτταρα). Τα βλεννοπαραγωγά κύτταρα εκκρίνουν βλέννα και ορισμένα πεπτικά ένζυμα (Halver J.E. & Hardy R.W 2002). Τα ένζυμα αυτά εκκρίνονται στον αυλό και βρίσκονται συνδεδεμένα στις μεμβράνες ή περιέχονται σε μεγάλα κενοτόπια εντός του εντεροκυττάρου. Τα ένζυμα δρουν με σκοπό την αποικοδόμηση των θρεπτικών συστατικών των τροφών σε ενώσεις που μπορούν να απορροφηθούν δια μέσου της ψυκτροειδούς παρυφής των εντεροκυττάρων. Η ψυκτροειδής παρυφή βρίσκεται στο πάνω μέρος των εντεροκυττάρων και η μεγάλη αναδίπλωσή της συμβάλλει στην αύξηση της εντερικής επιφάνειας. Η πρακτική σημασία της αναδίπλωσης αυτής είναι η αύξηση της απορροφητικής ικανότητας (Halver J.E. & Hardy R.W 2002). Στις κυτταρικές μεμβράνες των μικρολαχνών βρίσκονται συνδεδεμένα πολλά ένζυμα που σχετίζονται με την πέψη και την απορρόφηση (Kuzmina&Gleman 1997). Τα ένζυμα ανάλογα με το υπόστρωμα τους, χωρίζονται σε

α) πρωτεάσες, που υδρολύουν τις πρωτεΐνες σε μικρότερα πεπτίδια και ελεύθερα αμινοξέα,

β) καρβοϋδράσες που υδρολύουν υδατάνθρακες σε μονοσακχαρίτες και

γ) λιπάσες που υδρολύουν τριακυλογλυκερόλες σε γλυκερόλη και λιπαρά οξέα (Bakke et al., 2011).

Στον πίνακα παρουσιάζονται τα σημαντικότερα ένζυμα που συμμετέχουν στην πέψη.

**Πίνακας 4Τα** κυριότερα πεπτικά ένζυμα των ψαριών.

Ένζυμο	Περιοχή Σύνθεσης	Περιοχή Δράσης	Υπόστρωμα	Βιβλιογραφική Αναφορά
Θρυψίνη	Πάγκρεας	Αυλός Εντέρου	Πρωτεΐνες, πεπτίδια	Kuz'mina & Gelman(1997)
Χυμοθρυψίνη	Πάγκρεας	Αυλός Εντέρου	Πεπτίδια	Kuz'mina & Gelman(1997)
Αμινοπεπτιδάση	Στομάχι Πάγκρεας Έντερο	Στομάχι, Έντερο	Πρωτεΐνες, πεπτίδια	Kuz'mina & Gelman(1997)
Λυπάση	Πάγκρεας	Ψυκτροειδής παρυφή εντέρου	Τριακυλογλυκερόλη	Kuz'mina & Gelman(1997)
Αμυλάση	Πάγκρεας	Έντερο	Άμυλο	Kuz'mina & Gelman(1997)

Επιπλέον ο μυϊκός χιτώνας του εντέρου έχει αναπτυχθεί κατάλληλα ώστε να διασφαλίζεται η περισταλτική κίνηση. Ιστολογικά, το παχύ έντερο διαθέτει λιγότερα βλεννογόνα και ο μυϊκός χιτώνας είναι πιο λεπτός.

#### 1.4.2 Ήπαρ

Το ήπαρ είναι το μεγαλύτερο εσωτερικό όργανο στους ιχθύς και αποτελείται από ένα ιδιαίτερο διακλαδισμένο λαβύρινθο από διάσπαρτους παγκρεατικούς και χοληφόρους πόρους, φλέβες, αρτηρίες και τριχοειδή αγγεία (κολποειδή) που περιβάλλονται από ηπατοκύτταρα (Halver J.E., Hardy R.W 2002). Διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη φυσιολογία των ιχθύων, τόσο στον αναβολικό όσο και στον καταβολικό μεταβολισμό. Τα διάφορα θρεπτικά συστατικά και μεταβολίτες του σώματος μεταφέρονται από τον πεπτικό σωλήνα στο ήπαρ μέσω της ηπατικής πυλαίας φλέβας, καθώς και το οξυγόνο μέσω της ηπατικής αρτηρίας. Στο ήπαρ τα διάφορα θρεπτικά υποβάλλονται σε

περαιτέρω επεξεργασία και διοχετεύονται σε άλλους ιστούς του σώματος. Το ήπαρ συμβάλει στη σύνθεση πρωτεϊνών του πλάσματος όπως η αλβουμίνη και το ινωδογόνο ενώ μπορεί να αποθηκεύσει λιπίδια, υδατάνθρακες, βιταμίνη Α και σίδηρο (Βερίλλης Π., Μεντέ Ε. 2017). Τα ηπατοκύτταρα καταλαμβάνουν τον μεγαλύτερο όγκο του ήπατος και περιέχουν μεταβλητές ποσότητες γλυκογόνου και λίπους. Το αποθηκευμένο λίπος στο σώμα των ιχθύων σχηματίζεται από το πλεόνασμα θερμίδων στην τροφή, αν και οι αλλαγές στη φυσιολογική δραστηριότητα παίζουν και αυτές ρόλο (π.χ. ωρίμανση γονάδων) (Βερίλλης Π., Μεντέ Ε. 2017).

### **1.4.3 Πάγκρεας**

Το πάγκρεας των ιχθύων εντοπίζεται στις περισσότερες περιπτώσεις διάχυτο, με την μορφή παγκρεατικών νησιδίων στο λιπώδη ιστό, στο μεσεντέριο και στο ήπαρ, γύρω από την χοληδόχο κύστη ή τον χοληδόχο πόρο, το έντερο και τα πυλωρικά τυφλά (Yasutake & Wales, 1983· Smith, 1989). Ο παγκρεατικός ιστός είναι δύο τύπων: εξωκρινής και ενδοκρινής. Ο εξωκρινής παγκρεατικός ιστός αποτελείται από κυψελοειδή κύτταρα, τα οποία εκκρίνουν πεπτικά ένζυμα και όξινα ανθρακικά άλατα. Μέσω των πόρων αυτές οι εκκρίσεις εισέρχονται στον αυλό του εντέρου ή των πυλωρικών τυφλών. Τα διττανθρακικά άλατα προστατεύουν την ψυκτροειδή παρυφή των εντεροκυττάρων από το υδροχλωρικό οξύ του στομάχου. Σε αντίθεση με τον εξωκρινή παγκρεατικό ιστό, οι εκκρίσεις του ενδοκρινούς παγκρεατικού ιστού δεν μεταφέρονται μέσω πόρων. Ο ενδοκρινής παγκρεατικός ιστός συχνά βρίσκεται σε συναθροίσεις γνωστές και ως νησίδια του Langerhans (Βερίλλης Π., Μεντέ Ε. 2017). Από εκεί εκκρίνονται κατευθείαν ορμόνες στην κυκλοφορία του αίματος, που ρυθμίζουν τον μεταβολισμό και την πέψη (WendelaarBonga, 1993).



## 1.5 Στόχοι παρούσας διατριβής

Η παρούσα έρευνα επικεντρώθηκε στην ιστολογική εξέταση του εντέρου και του ήπατος από τσιπούρες (*S. aurata*), οι οποίες στα πλαίσια πειραματικής εκτροφής διατράφηκαν με σιτηρέσια όπου πραγματοποιήθηκε υποκατάσταση ιχθυαλεύρου, με άλευρο προερχόμενο από το έντομο *Zophobas sp.* Το έντερο και το ήπαρ εξετάστηκε για τυχόν ιστολογικές αλλοιώσεις και για την σημαντικότητα αυτών, λόγω διατροφικού παράγοντα. Σκοπός της μελέτης ήταν να εξακριβωθεί εάν και κατά πόσο η συγκεκριμένη εναλλακτική πηγή πρωτεΐνης είναι κατάλληλη να συμπεριληφθεί ως συστατικό στις ιχθυοτροφές. Οποιαδήποτε σοβαρή ιστολογική βλάβη στο έντερο ή το ήπαρ και κατ' επέκταση, δυσλειτουργία αυτών, μπορεί να είναι η αρχή για περεταίρω επιπτώσεις στην υγεία και ανάπτυξη των εκτρεφόμενων ιχθύων.

## 2. Υλικά και μέθοδοι

### 2.1 Δειγματοληψίες

Για την διεξαγωγή της συγκεκριμένης έρευνας χρησιμοποιήθηκαν 36 ιχθύες του είδους *S. aurata* μέσου βάρους 40g οι οποίοι προήλθαν από διατροφικό πείραμα, διάρκειας 11 εβδομάδων. Τα ψάρια ήταν χωρισμένα σε 3 διαφορετικές διατροφικές ομάδες και σε κάθε μια από αυτές χορηγήθηκε σιτηρέσιο όπου η σύσταση διέφερε ως προς το ποσοστό υποκατάστασης του ιχθυαλεύρου (FM) με άλευρο από έντομο *Zophobas sp.* αλλά και την περιεκτικότητα λίπους του εντομάλευρου. Συγκεκριμένα, το σιτηρέσιο που αντιστοιχούσε στην ομάδα FM αποτέλεσε το σιτηρέσιο-μάρτυρα, στο οποίο η αποκλειστική πηγή ζωικής πρωτεΐνης ήταν το ιχθυάλευρο. Στις άλλες 2 ομάδες έγινε υποκατάσταση του ιχθυαλεύρου σε ποσοστό 10% με την μόνη διαφορά να είναι η περιεκτικότητα σε λίπος. (ZLF10- *Zophobas* Low fat 10%, ZFF10- *Zophobas* full fat 10%). Όλα τα σιτηρέσια ήταν καταρτισμένα με τέτοιο τρόπο ώστε να είναι ισοενεργειακά (22 KJ/g) και ισοπρωτεϊνικά (56 % της ξηρής ουσίας). Μετά την λήξη της περιόδου εκτροφής ακολούθησε τυχαία επιλογή 36 ψαριών, 12 ανά διατροφική ομάδα για τις ανάγκες της ιστολογικής μελέτης. Τα ψάρια αφού απομακρύνθηκαν από τις δεξαμενές εκτροφής με απόχη, θανατώθηκαν παρατείνοντας την παραμονή τους στο αναισθητικό αυξανόμενης δοσολογίας (φαινοξυαιθανόλη συγκέντρωσης 0,10 ml/L) και τοποθετήθηκαν άμεσα σε πάγο. Την διαδικασία ευθανασίας των ψαριών ακολούθησαν, αρχικά η μέτρηση του βάρους τους σε ζυγό ακριβείας 2 δεκαδικών ψηφίων (0,01 g) και έπειτα η μέτρηση του μήκους τους σε ιχθυόμετρο (ακρίβεια 0,1 cm). Τέλος πραγματοποιήθηκε τομή στην κοιλιακή χώρα με σκοπό την απομόνωση και ζύγιση του εντέρου και του ήπατος.

## 2.2 Ιστολογική τεχνική

### 2.2.1 Μόνιμα παρασκευάσματα

Με τον όρο μονιμοποίηση αναφερόμαστε στα διάφορα στάδια και την χρήση χημικών μέσων, ώστε να διατηρηθεί αναλλοίωτη η υφή των ιστών. Μετά την λήψη, την καταγραφή και την ταξινόμηση του υλικού προς μελέτη, ο ιστός τοποθετείται σε μια μονιμοποιητική ουσία (fixative). Οι μονιμοποιητικές ουσίες (οργανικοί διαλύτες και δραστικές ανόργανες ουσίες) επιλέγονται με βάση τον τύπο ιστού και τα υπό μελέτη χαρακτηριστικά. Η πιο γνωστή είναι η φορμόλη και η Davinson την οποία και χρησιμοποιήσαμε στην έρευνά μας.

Το επόμενο στάδιο περιλαμβάνει την έγκληση (εμποτισμός) του ιστού σε παραφίνη ή άλλες ουσίες (ζελατίνη, κυτταρίνη και ρητίνες) για τη δημιουργία τομών με τη χρήση μικροτόμου. Για την επεξεργασία του υγρού μονιμοποιημένου ιστού πρέπει πρώτα να γίνει αφαίρεση του νερού (αφυδάτωση). Η αφυδάτωση πραγματοποιείται με διαδοχικά βαπτίσματα σε βαθμιαίες σειρές από υδατικά διαλύματα αιθανόλης με αύξουσα συγκέντρωση (συνήθως από 70% μέχρι 100%). Εν συνεχεία, η αιθανόλη αντικαθίσταται από ουσίες που διαλύουν το λίπος (διάλυση). Στη έγκλειση με παραφίνη χρησιμοποιείται συνήθως ως διαλυτικό η ξυλόλη. Μετά τον εμποτισμό του ιστού με διαλυτικό γίνεται η τοποθέτησή του σε λιωμένη παραφίνη. Η θερμότητα έχει ως αποτέλεσμα να εξατμίζεται το διαλυτικό και οι χώροι που αδειάζουν να γεμίζουν με παραφίνη. Οι εμποτισμένοι στην παραφίνη ιστοί κόβονται σε μικροτόμο σε πάχος 5μm. Έπειτα, ακολουθεί η χρώση των ιστών. Για τη μικροσκοπική τους παρατήρηση έχουν αναπτυχθεί τεχνικές χρώσης των παρασκευασμάτων (staining), αφού οι περισσότεροι ιστοί είναι άχρωμοι. Με την χρώση, επιτρέπεται η επιμέρους παρατήρηση των

συστατικών του ιστού αλλά και η διάκριση ανάμεσά τους. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιούνται διάφορα μίγματα χρωστικών που επιτρέπουν την αύξηση της αντίθεσης, ώστε να εντοπιστούν κύτταρα και ιστοί και να παρατηρηθεί η μορφολογία τους. Η χρώση επιτρέπει την ανίχνευση συγκεκριμένων χημικών ομάδων και ενώσεων σε κύτταρα και ιστούς. Η πιο γνωστή χρωστική είναι η αιματοξυλίνη. Η αιματοξυλίνη είναι μια φυσική χρωστική που περιέχεται στο ξύλο του φυτού *Haematoxylon campechianum* και χρησιμοποιείται ως γενική χρωστική σε μόνιμα ανατομικά παρασκευάσματα. Το χρωματικό αποτέλεσμα εξαρτάται από το υλικό και το pH του διαλυτικού μέσου. Πιο αναλυτικά, σε όξινο περιβάλλον εμφανίζεται χρώμα ερυθρό ενώ σε αλκαλικό περιβάλλον εμφανίζεται χρώμα μπλε. Συγκεκριμένα οι περιοχές που χρωματίζονται κυανές είναι ο πυρήνας, το τραχύ ενδοπλασματικό δίκτυο και οι όξινες περιοχές του κυτταροπλάσματος. Μια ακόμη γνωστή χρωστική ουσία είναι και η ηωσίνη. Η ηωσίνη είναι μια όξινη κυτταροπλασματική χρωστική που χρησιμοποιείται περισσότερο συχνά καθώς αντιδρά με τις κυτταρικές πρωτεΐνες που είναι πλούσιες σε βασικά αμινοξέα. Από την αντίδραση αυτή σχηματίζεται ένα σύμπλοκο χρωστικής-πρωτεΐνης, που χαρακτηρίζεται από έντονη ροζ κυτταροπλασματική χρώση. Επίσης, χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με τις βασικές μπλε χρωστικές. Όταν χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με την αιματοξυλίνη, επικρατεί η ονομασία «χρωστικές H & E» (Χατζηιωάννου Μ., Βαφείδης Δ. 2015)

### **2.2.2 Εξοπλισμός του εργαστηρίου**

Η δημιουργία των μόνιμων παρασκευασμάτων έγινε στις εγκαταστάσεις του τμήματος Γεωπονίας, Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Ο εξοπλισμός του εργαστηρίου Ιστολογίας περιλαμβάνει την ιστοκινέτα, τη συσκευή σκλήνωσης, την παλινδρομική μικροτόμο, το υδατόλουτρο, τη θερμαντική

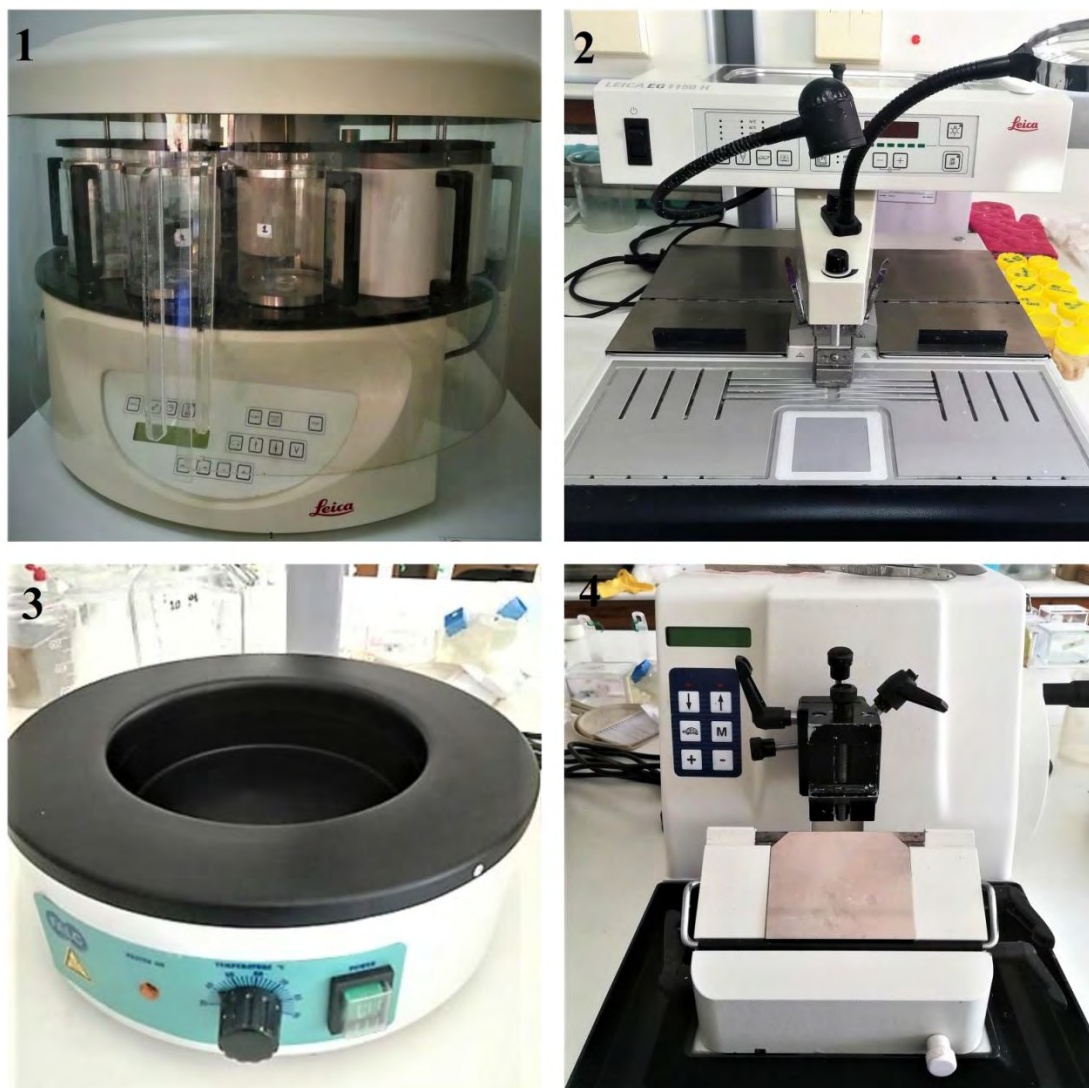
πλάκα

και

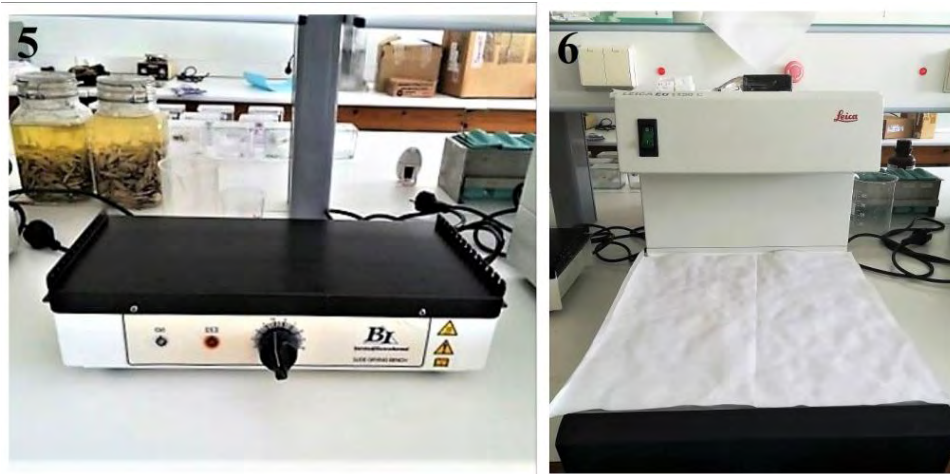
την

ψυχρή

πλάκα.



**Εικόνα 2.1** Εξοπλισμός του εργαστηρίου Ιστολογίας του Τμήματος: 1: ιστοκινέτα 2: συσκευή σκλήνωσης 3:υδατόλουτρο 4:παλινδρομική μικροτόμος



Εικόνα 2.2 5: θερμαντική πλάκα 6: ψυχρή πλάκα

### 2.3 Παρουσίαση της κλασικής ιστολογικής τεχνικής

Η κλασική Ιστολογική τεχνική για την παραγωγή μόνιμων ιστολογικών παρασκευασμάτων ζωικών ιστών περιλαμβάνει τα παρακάτω στάδια:

- 1) Λήψη βιολογικού υλικού
- 2) Μονιμοποίηση
- 3) Αφυδάτωση, καθαρισμός και εμποτισμός με παραφίνη
- 4) Εγκλεισμός σε παραφίνη
- 5) Κοπή των τομών
- 6) Αποπαραφίνωση και ενυδάτωση των τομών
- 7) Χρώση των τομών
- 8) Αφυδάτωση και καθαρισμός των τομών
- 9) Στερέωση των τομών

### **2.3.1 Λήψη υλικού (απομόνωση ιστών)**

Για την λήψη δειγμάτων ζωικών οργανισμών χρησιμοποιούνται όργανα ανατομίας και καταγράφονται όλα τα απαραίτητα στοιχεία για την κωδικοποίηση του δείγματος. Ολόκληρη η διαδικασία λήψης δειγμάτων απαιτεί την κατάλληλη προετοιμασία. Κατά την διάρκεια της λήψης ιστών και της μονιμοποίησης αυτών αλλά και σε όλα τα επόμενα στάδια, η μεταφορά της κωδικοποίησης και την αρίθμησης των δειγμάτων έγινε με μεγάλη προσοχή.

### **2.3.2 Μονιμοποίηση**

Αφού έγινε η λήψη και η καταγραφή των δειγμάτων τοποθετήθηκαν σε ειδικές κασετίνες και έπειτα σε δοχείο το οποίο περιείχε το υγρό μονιμοποίησης. Το διάλυμα μονιμοποίησης πρέπει να υπερκαλύπτει τα δείγματα ιστών. Συγκεκριμένα, έγινε τοποθέτηση των ιστών σε διάλυμα Davinson και παραμονή τους σε αυτό για 24 ώρες. Έπειτα έγινε αντικατάσταση του διαλύματος Davinson με διάλυμα φορμόλης και αποθήκευση των δειγμάτων.

### **2.3.3 Ιστοκινέτα**

Με το πέρας της μονιμοποίησης, οι κασετίνες με τους ιστούς τοποθετήθηκαν σε ειδικό εξάρτημα της ιστοκινέτας όπου πραγματοποιήθηκαν διαδοχικά τα παρακάτω στάδια:

Αφυδάτωση: Για την απομάκρυνση του νερού που υπάρχει στον ιστό γίνονται διαδοχικές εμβαπτίσεις με αλκοόλες αυξανόμενου βαθμού, ώστε να αποφευχθεί η συρρίκνωση του ιστού.

Καθαρισμός: Η απομάκρυνση της αλκοόλης γίνεται με διαδοχικές πλύσεις με ξυλόλη.

Εμποτισμός με παραφίνη: Τόσο η αφυδάτωση όσο και ο καθαρισμός πραγματοποιούνται σε συνθήκες δωματίου. Μετά την προετοιμασία των υλικών και των διαλυμάτων εργασίας ρυθμίζεται το πρόγραμμα στην ιστοκινέτα.

**Πίνακας 5** Πρωτόκολλο ιστοκινέτας.

ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΙΣΤΟΚΙΝΕΤΑΣ		
Αριθμός δοχείου	Ουσία	Διάρκεια
1	Κενό	
2	Αιθανόλη 70%	1h
3	Αιθανόλη 80%	1h
4	Αιθανόλη 95%	1h
5	Αιθανόλη 95%	2h
6	Αιθανόλη 100%	1h
7	Αιθανόλη 100%	1h
8	Αιθανόλη 100%	2h
9	Ξυλόλη	2h
10	Ξυλόλη	2h
11	Παραφίνη	2h
12	Παραφίνη	4h

#### **2.3.4 Εγκλεισμός ιστών σε παραφίνη**

Οι κασετίνες με τους αφυδατωμένους ιστούς τοποθετούνται σε ειδικό δοχείο με υγρή παραφίνη προς αποφυγή πήξης της υπάρχουσας παραφίνης που έχει παραμείνει από την προηγούμενη διαδικασία του εμποτισμού. Η διαδικασία της εγκλεισης έγινε σε μηχανήμα σκλήνωσης. Ο ιστός τοποθετήθηκε σε ειδικό καλούπι, το οποίο γεμίζει με υγρή παραφίνη και μεταφέρθηκε στην ψυχρή πλάκα για στερεοποίηση της παραφίνης. Σε περιπτώσεις όπου, λόγω πήξης, δημιουργήθηκαν κενά, αυτά συμπληρώθηκαν με



υγρή παραφίνη. Έπειτα αφαιρέθηκε το καλούπι και απομακρύνθηκε η στερεοποιημένη παραφίνη από τις άκρες του κύβου (block). Η διαδικασία της έγκλεισης μπορεί να γίνει και χειροκίνητα. Η έγκλειση πραγματοποιείται σε θερμοκρασία 60 °C, ενώ οι κύβοι παραφίνης με τον εγκλεισμένο ιστό παραμένουν σε θερμοκρασία δωματίου (ή στο ψυγείο). Οι στερεοποιημένοι ιστοί είναι έτοιμοι για να εισαχθούν στη διαδικασία κοπής ιστολογικών τομών.

### **2.3.5 Τεχνική κοπής ιστολογικών τομών**

Ο κύβος παραφίνης με τον εγκλεισμένο πλέον ιστό, τοποθετήθηκε και στερεώθηκε στον ειδικό υποδοχέα της μικροτόμου. Η λεπίδα της μικροτόμου που χρησιμοποιήθηκε καθώς και ο εργαστηριακός πάγκος, καθαρίστηκαν προσεκτικά με ξυλόλη. Η θέση του υποδοχέα ρυθμίστηκε έτσι ώστε ο κύβος της παραφίνης μόλις να έρχεται σε επαφή με τη λεπίδα. Στη συνέχεια, η μικροτόμος ρυθμίστηκε στο επιθυμητό πάχος της τομής (5μm) και κατόπιν, ξεκίνησε το κόψιμο. Συνήθως οι πρώτες τομές απορρίπτονταν. Μόλις άρχισε να σχηματίζεται η αλυσίδα από τομές, αυτές απομακρύνθηκαν από το μαχαίρι με την βοήθεια λαβίδας. Οι τομές παραφίνης αφού εκπτώχθηκαν σε υδατόλουτρο, σε θερμοκρασία 40°C, επικολλήθηκαν σε αντικειμενοφόρο πλάκα για να επακολουθήσει χρώση. Η επιπεδοποίηση των τομών έγινε με την τοποθέτηση της αντικειμενοφόρου πλάκας με τις τομές, πάνω στη θερμαινόμενη πλάκα ώστε να εξατμιστεί όλο το νερό.

### 2.3.6 Αποπαραφίνωση και χρώση

Η μεταφορά των αντικειμενοφόρων έγινε με ειδικό δοχείο που είχε ειδικούς υποδοχείς 20 θέσεων.



**Εικόνα 2.3** Δοχεία με διαλύματα χρώσης.

Οι χρόνοι του πρωτοκόλλου τηρήθηκαν επακριβώς (Πίνακας 6). Στα διαλύματα αφυδάτωσης και χρώσης που χρησιμοποιήθηκαν κατ' επανάληψη έγινε διήθηση για την απομάκρυνση υπολειμμάτων που μπορεί να υπήρχαν λόγω των προηγούμενων χρήσεων τους.

**Πίνακας 6** Πρωτόκολλο αφυδάτωσης και χρώσης Αιματοξυλίνης & Ηωσίνης

α/α	Διάλυμα	Διάρκεια σταδίου
1	Ξυλόλη Ι	15min
2	Ξυλόλη ΙΙ	15min
3	Αλκοόλη 100%	5min
4	Αλκοόλη 100%	5min
5	Αλκοόλη 95%	5min
6	Αλκοόλη 95%	5min
7	Αλκοόλη 70%	5min
8	H <sub>2</sub> O(βρύσης)	2min
9	Αιματοξυλίνη	7min
10	H <sub>2</sub> O (Τρεχούμενο βρύσης)	2min
11	Διάλυμα διαφοροποίησης	2 εμβαπτίσεις
12	H <sub>2</sub> O (Τρεχούμενο βρύσης)	2min
13	Ηωσίνη	5min
14	H <sub>2</sub> O (βρύσης)	30'' εμβαπτίσεις
15	Αλκοόλη 70%	1min
16	Αλκοόλη 95%	1min
17	Αλκοόλη 95%	1min
18	Αλκοόλη 100%	1min
19	Αλκοόλη 100%	1min
20	Ξυλόλη	15min

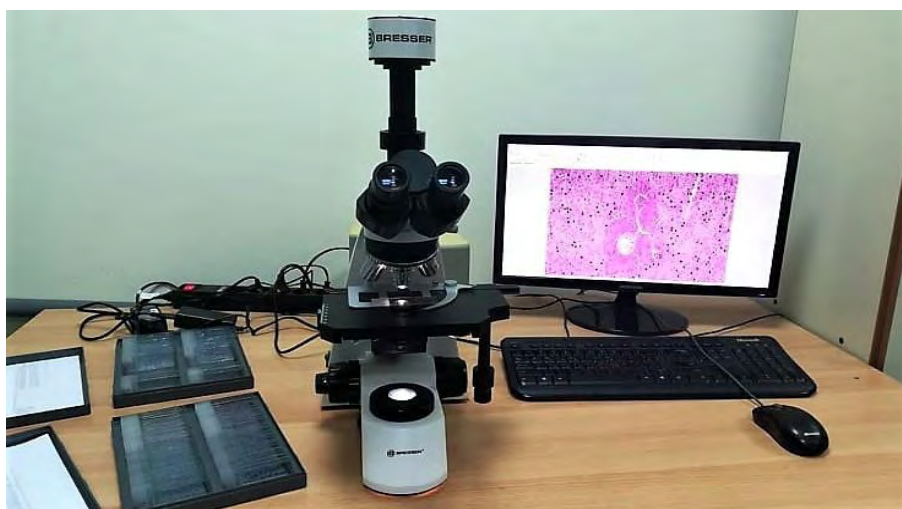
### 2.3.7 Επικάλυψη των τομών

Η επικάλυψη των ιστολογικών τομών πραγματοποιήθηκε με κατάλληλο διάφανο υλικό γνωστό ως DPX. Αμέσως μετά τη χρώση απλώθηκε το DPX με γυάλινη ράβδο πάνω στις τομές των ιστών και έγινε η προσκόλληση της καλυπτρίδας. Η επικάλυψη είναι απαραίτητη για να προστατευθεί το παρασκεύασμα και να διατηρηθεί, χωρίς να χάσει την ποιότητά του με την πάροδο του χρόνου. Τέλος, κατά την τοποθέτηση της

καλυπτρίδας είναι σημαντικό να μην παγιδευτούν φυσαλίδες αέρα στο παρασκεύασμα για να είναι εφικτή η παρατήρησή του στο μικροσκόπιο.

### 2.3.8 Παρατήρηση σε μικροσκόπιο

Η παρατήρηση των παρασκευασμάτων έγινε στο οπτικό μικροσκόπιο του τμήματος μάρκας Bresser Science TRM-301 και η κάμερα που χρησιμοποιήθηκε για την λήψη εικόνων ήταν η Bresser MikroCam.



Εικόνα 2.4 Οπτικό μικροσκόπιο με κάμερα υψηλής ανάλυσης από την αίθουσα μικροσκοπία του Τμήματος Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος του Π.Θ

## 2.4 Στατιστική ανάλυση

Αφού ολοκληρώθηκαν οι παρατηρήσεις και η συλλογή δεδομένων, τα αποτελέσματα επεξεργάστηκαν με το στατιστικό πακέτο SPSS 17. Η σύγκριση των μέσων όρων των διαφόρων παραμέτρων έγινε με τη μέθοδο ανάλυσης των διακυμάνσεων μονής κατεύθυνσης (one-way ANOVA). Στις περιπτώσεις που δεν ικανοποιούσαν την προϋπόθεση ομοιογένειας των παραλλακτικότητων, τα δεδομένα τροποποιήθηκαν. Τα δεδομένα υποβλήθηκαν στο Tukey's test για τον εντοπισμό των διαφορών μεταξύ των διαφορετικών διατροφικών ομάδων.

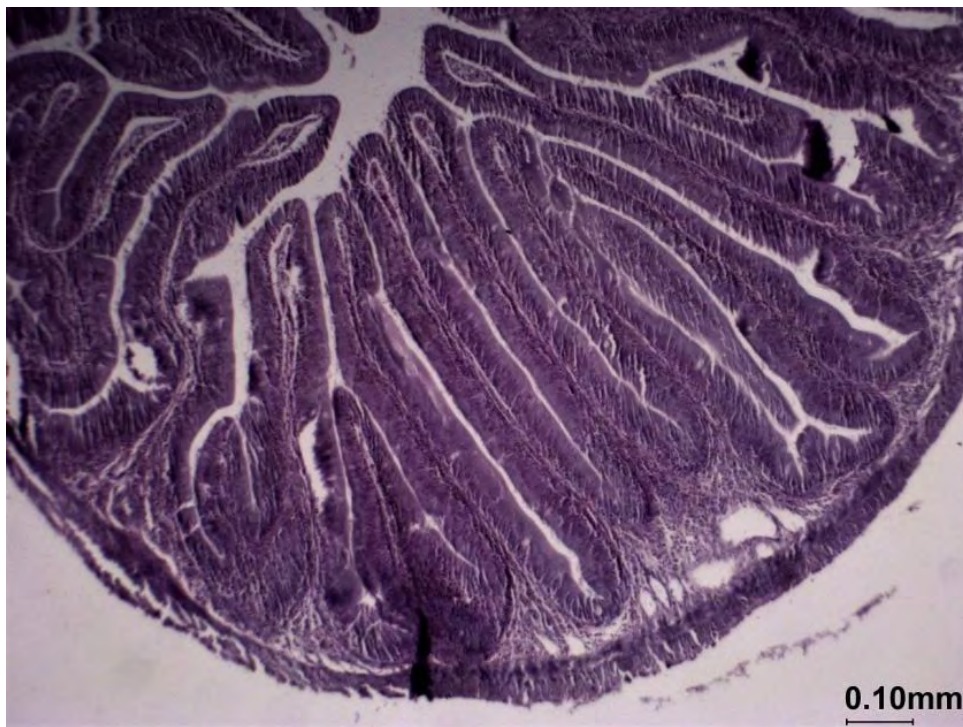
### 3. Αποτελέσματα

Σε γενικές γραμμές δεν παρατηρήθηκαν έντονες αλλοιώσεις στο έντερο των ψαριών που εξετάστηκαν, ενώ οι ιστολογικές αλλαγές που παρατηρήθηκαν αφορούσαν κυρίως το ήπαρ των ατόμων τσιπούρας που τράφηκαν με τα πειραματικά σιτηρέσια σε σύγκριση πάντα με το ήπαρ των ατόμων του σιτηρεσίου μάρτυρα. Πιο αναλυτικά, για τις ιστολογικές μετρήσεις και παρατηρήσεις που έγιναν στο έντερο ελήφθησαν υπόψη παράμετροι όπως ο μυϊκός χιτώνας, το μήκος και το πάχος των λαχνών λαμβάνοντας ως αναφορά 5 λάχνες από κάθε έντερο ώστε να λάβουμε τον μέσο όρο και τέλος ο αριθμός των βλεννοπαραγωγών που υπήρχαν σε κάθε λάχνα.

Πίνακας 7 Μέσος όρος και τυπική απόκλιση μετρήσεων που πραγματοποιήθηκαν στο έντερο

	FM	ZLF10	ZFF10
Μήκος λάχνας (mm)	0,41±0,02	0,49±0,02	0,50±0,08
Πλάτος λάχνας(mm)	0,13±0,01	0,16±0,02	0,14±0,01
Αριθμός goblet cells(GC)	13,73±2,70	14,72±2,78	9,85±5,52
GC/Μήκος λάχνας(μm)	0,03±0,01	0,03±0,01	0,02±0,01
Πάχος διαμήκους μυϊκής στοιβάδας(mm)	0,02 ± 0,0 <sup>a</sup>	0,03 ± 0,01 <sup>ab</sup>	0,04 ± 0,01 <sup>b</sup>
Πάχος κυκλοτερούς μυϊκής στοιβάδας(mm)	0,04±0,01	0,05±0,00	0,04±0,02

Είναι εμφανές ότι με την αντικατάσταση του ιχθυαλεύρου από άλευρο *Zorhobas sp* υπάρχει μία αυξητική τάση στο μήκος των λαχνών με την ομάδα ZFF10 να έχει τις λάχνες με το μεγαλύτερο μέσο μήκος  $0,50\pm 0,8\text{mm}$ , ακολουθούμενη από την ομάδα ZLF10 με μέσο μήκος λαχνών  $0,49\pm 0,2\text{mm}$  και τη ομάδα FM με μέσο μήκος λαχνών  $0,41\pm 0,2\text{mm}$ .

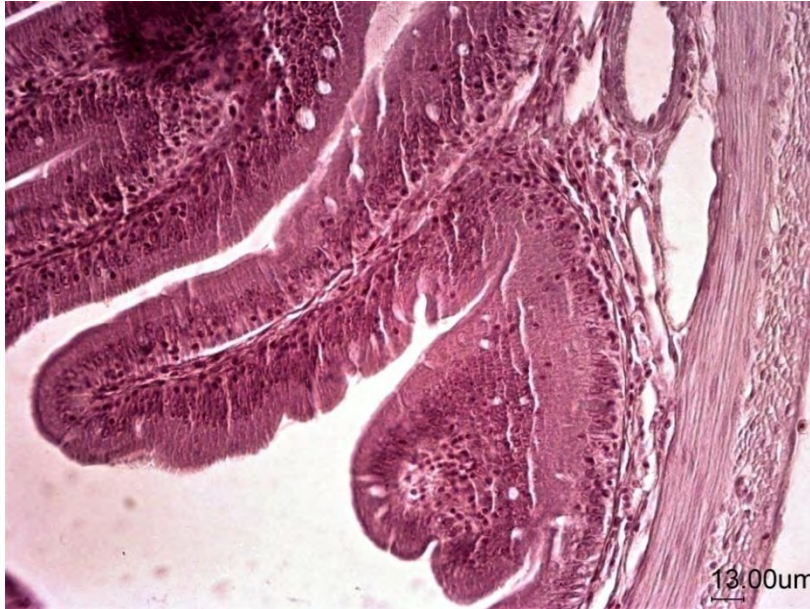


**Εικόνα 3.4** Τομή εντέρου της ομάδας ZFF10

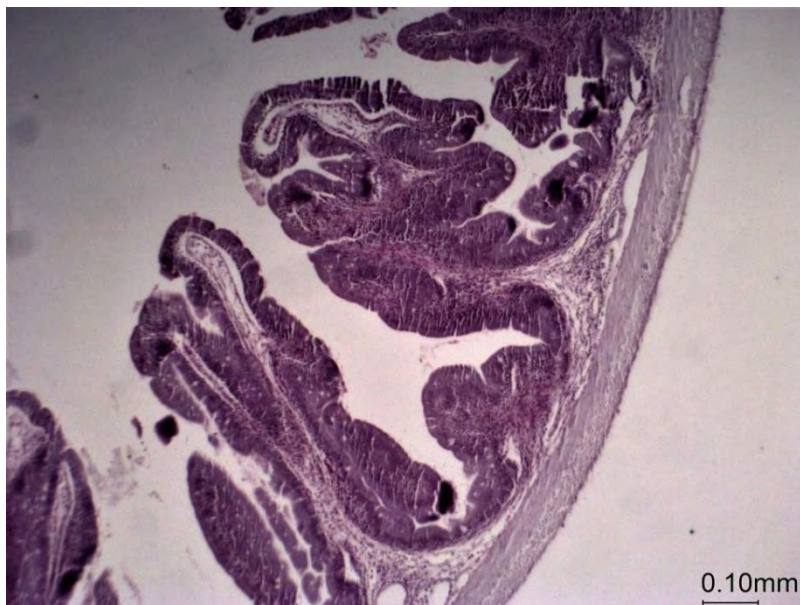
Από την άλλη, η ομάδα ZLF10 φαίνεται να έχει τις λάχνες με το μεγαλύτερο πλάτος  $0,16\pm 0,2\text{mm}$ , τον μεγαλύτερο αριθμό βλεννοπαραγωγών κυττάρων  $14,72\pm 2,78$  (goblet cells) και το μεγαλύτερο πλάτος του κυκλοτερή μυϊκού χιτώνα  $0,05\pm 0,00\text{mm}$ . Η ομάδα ZFF10 έχει μέσο πλάτος λαχνών  $0,14\pm 0,1\text{mm}$ , αριθμό βλεννοπαραγωγών κυττάρων  $9,85\pm 5,52$  και μέσο πλάτος του κυκλοτερή μυϊκού  $0,04\pm 0,02\text{mm}$ , ενώ η ομάδα FM έχει μέσο πλάτος λαχνών  $0,13\pm 0,1\text{mm}$ , αριθμό βλεννοπαραγωγών κυττάρων  $13,73\pm 2,70$  και μέσο πλάτος του κυκλοτερή μυϊκού  $0,04\pm 0,01\text{mm}$ . Ωστόσο, δεν υπήρξαν στατιστικές διαφορές μεταξύ των 3 διατροφικών ομάδων όσον αφορά τις παραπάνω



παραμέτρους. Τέλος, στατιστικώς σημαντική διαφορά φαίνεται να υπάρχει μεταξύ της ομάδας ZFF10 με την ομάδα μάρτυρα FM όσον αφορά το πλάτος του διαμήκη μυϊκού χιτώνα.

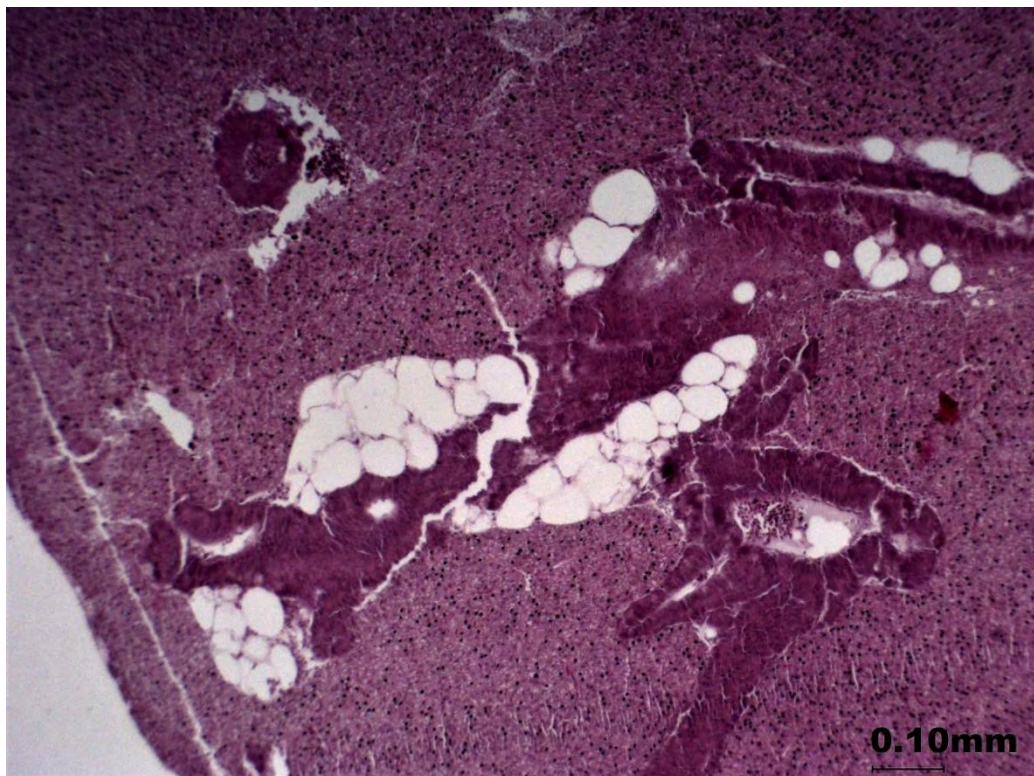


**Εικόνα 3.5** Τομή εντέρου της ομάδας FM όπου απεικονίζεται ο μυϊκός χιτώνας (κυκλοτερής και διαμήκης), ο βλεννογόνος χιτώνας και οι λάχνες του εντέρου με τα βλενοπαραγωγά κύτταρα.



**Εικόνα 3.6** Τομή εντέρου της ομάδας ZFF10 όπου απεικονίζεται ο μυϊκός χιτώνας, ο βλεννογόνος χιτώνας και οι λάχνες του εντέρου με τα βλενοπαραγωγά κύτταρα.

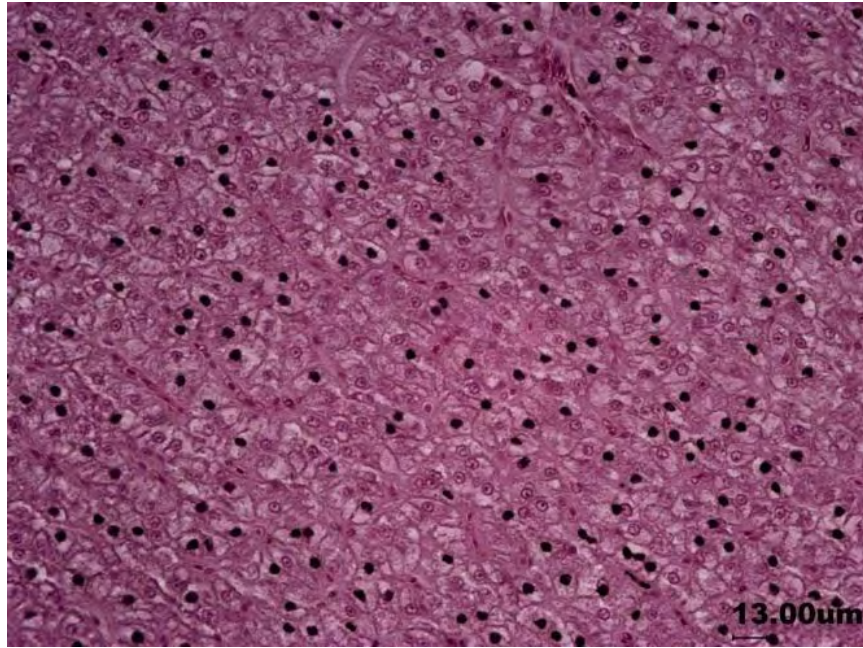
Η κατάσταση του ήπατος αξιολογήθηκε με βάση την εμφάνιση λιποσταγονιδίων στα ηπατοκύτταρα, την περιπαγκρεατική εναπόθεση λίπους, την πυρηνική μετατόπιση ή οποιαδήποτε αλλοίωση παρατηρήθηκε. Τα αποτελέσματα των ιστών ήπατος από τα ψάρια που ανήκαν στην πρώτη διατροφική ομάδα όπου χρησιμοποιήθηκε το σιτηρέσιο-μάρτυρας (FM), έδειξαν σχεδόν σε όλα τα δείγματα μακροστεάτωση.



**Εικόνα 3.7** Τομή ήπατος τσιπούρας της διατροφικής ομάδας FM όπου φαίνεται μακροστεάτωση.

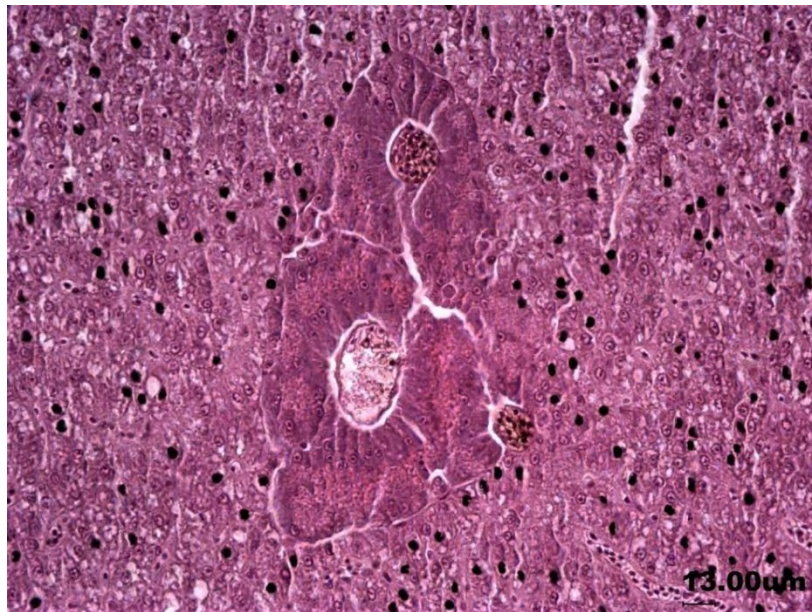
Το ηπατικό παρέγχυμα που μελετήθηκε στο οπτικό μικροσκόπιο, για τα δείγματα αυτής της ομάδας-μάρτυρα παρουσίασε άφθονα λιποσταγονίδια ποικίλων μεγεθών διάσπαρτα στο ηπατικό παρέγχυμα.





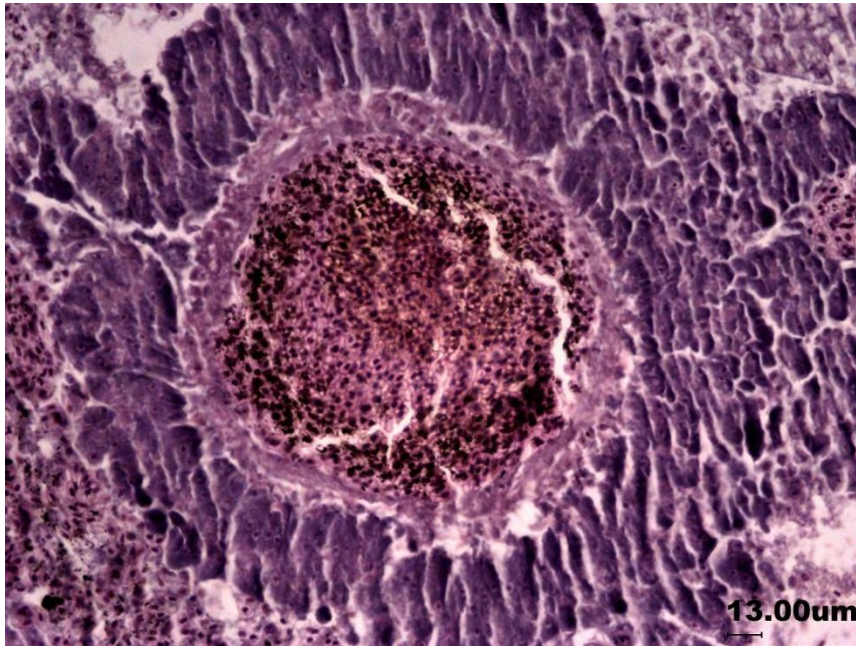
**Εικόνα 3.8** Τομή ήπατος τσιπούρας της διατροφικής ομάδας FM όπου φαίνονται οι πυρήνες και τα λιποσταγονίδια.

Επιπλέον, τα παγκρεατικά νησίδια στο ηπατικό παρέγχυμα εμφάνισαν διακριτά εκκριτικά προενζυμικά κοκκία, μια αναμενόμενη παρατήρηση αφού τα ψάρια ήταν σε ασιτία για μια ημέρα, πριν την ευθανασία τους.



**Εικόνα 3.9** Παγκρεατικό νησίδιο με εκκριτικά προενζυμικά κοκκία.

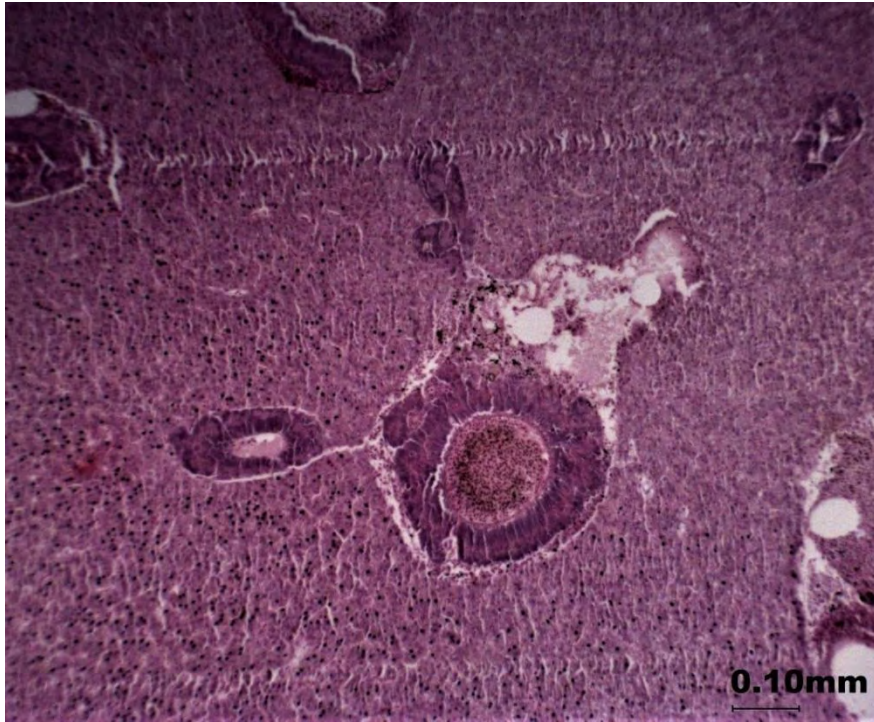
Τέλος, σχεδόν στα μισά άτομα της ομάδας FM βρέθηκαν θρομβώσεις. Επειδή τα δείγματα της συγκεκριμένης ομάδας αποτέλεσαν το μέτρο σύγκρισης για τα δείγματα των ομάδων ZLF10 και ZFF10, πρέπει να αναφερθεί πως όλες οι παρατηρήσεις που έχουν αναφερθεί έως τώρα εμφανίστηκαν και στις 2 ομάδες σε μεγαλύτερο βαθμό.



Εικόνα 3.10 Θρόμβωση σε παγκρεατικό νησίδιο της ομάδας FM

Στην δεύτερη διατροφική ομάδα όπου χρησιμοποιήθηκε σιτηρέσιο με το χαμηλότερο ποσοστό λίπους και υποκατάσταση 10% (ZLF10-Zophobas low fat) οι ιστολογικές τομές που λήφθηκαν και μελετήθηκαν στο οπτικό μικροσκόπιο εμφάνισαν αποτελέσματα, όμοια με αυτά που αντιστοιχούσαν στην πρώτη διατροφική ομάδα. Πιο αναλυτικά, στο σύνολο των δειγμάτων που εξετάστηκαν εμφανίστηκε θρόμβωση σε όλα σχεδόν τα άτομα της ομάδας.





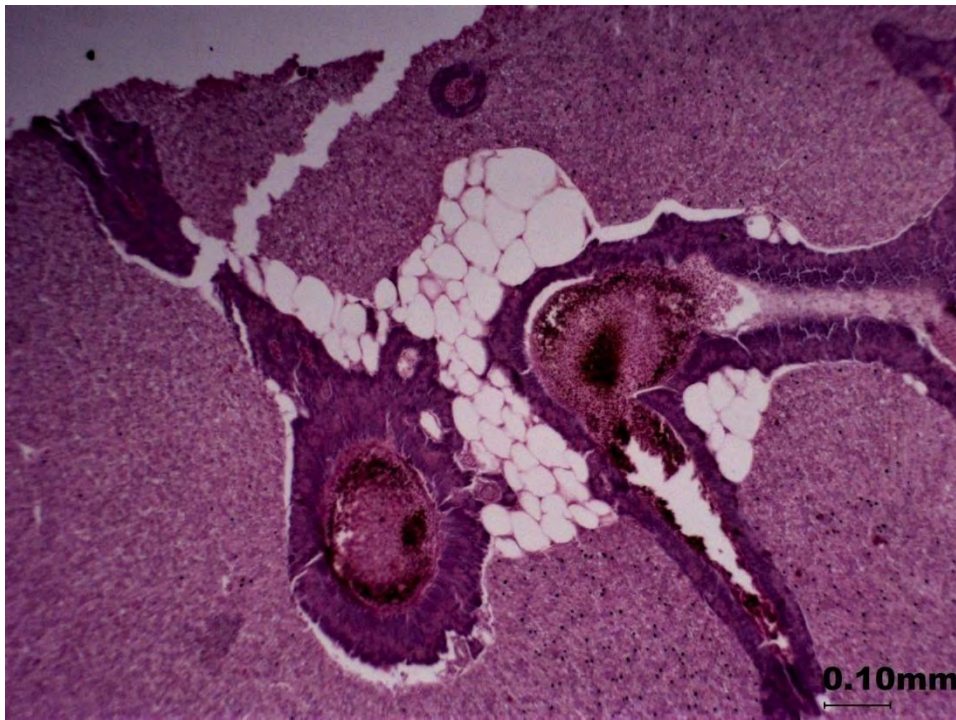
**Εικόνα 3.11** Θρόμβωση σε παγκρεατικό νησίδιο της ομάδας

Οι πυρήνες ήταν ευδιάκριτοι, με ύπαρξη πυρηνίσκου, ενώ τα λιποσταγονίδια που παρατηρήθηκαν ήταν ποικίλων μεγεθών και η παρουσία τους ήταν ευδιάκριτη σε όλο το ηπατικό παρέγχυμα.



**Εικόνα 3.12** Αλεικόνιση παγκρεατικού νησιδίου με εμφανή προενζυμικά κοκκία, ύπαρξη λιποσταγονιδίων στο ηπατικό παρέγχυμα και ευδιάκριτοι πυρήνες των ηπατοκυττάρων.

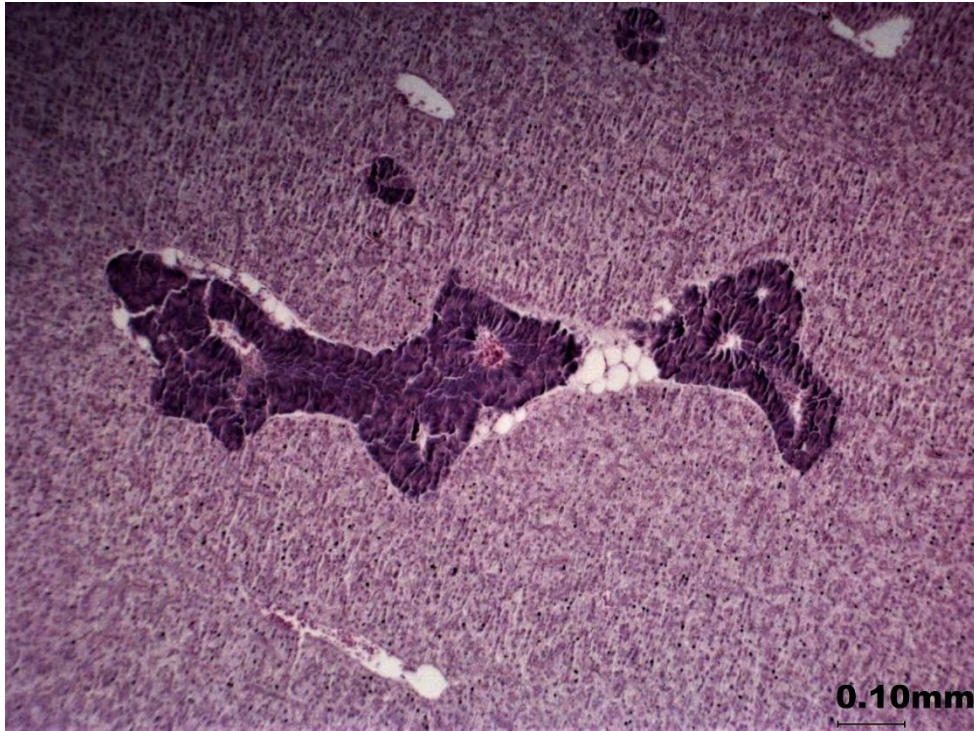
Τέλος, λίγα άτομα της ομάδας εμφάνισαν μακροστεάτωση σε σύγκριση με τα άτομα της ομάδας μάρτυρα.



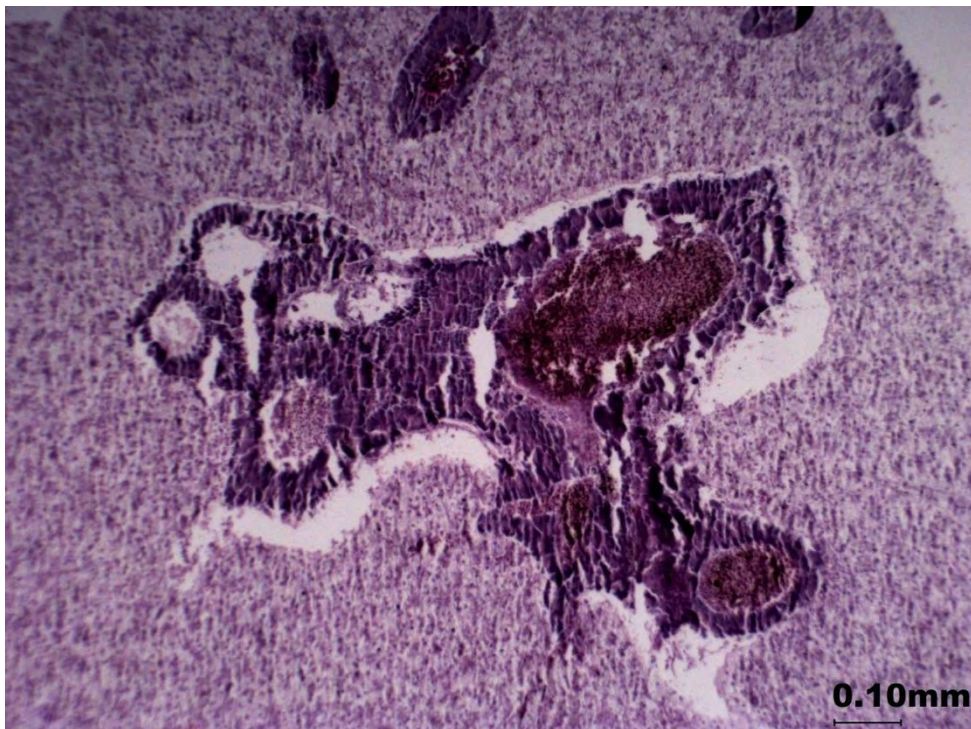
**Εικόνα 3.13** Μακροστεάτωση και θρόμβωση σε ψάρι της ομάδας ZLF10.

Στην τρίτη διατροφική ομάδα όπου χρησιμοποιήθηκε σιτηρέσιο με το υψηλότερο ποσοστό λίπους και υποκατάσταση 10% (ZFF10-Zophobas full fat) οι ιστολογικές τομές που λήφθηκαν και μελετήθηκαν στο οπτικό μικροσκόπιο εμφάνισαν αποτελέσματα, όμοια με αυτά που αντιστοιχούσαν στις προηγούμενες διατροφικές ομάδες. Τα λιποσταγονίδια ήταν ποικίλων μεγεθών και βρισκόταν διάσπαρτα στο ηπατικό παρέγχυμα. Στα περισσότερα άτομα εμφανίστηκαν και θρόμβοι αλλά και μακροστεάτωση. Και στις 3 ομάδες η οποιαδήποτε αποκόλληση κάποιου παγκρεατικού νησιδίου ή χοληφόρου πόρου οφείλεται πιθανότατα σε κακή μεταχείριση του ιστού κατά την μονιμοποίηση.





**Εικόνα 3.14** Μακροστεατώση σε ήπαρ τσιπούρας της ομάδας ZFF10.



**Εικόνα 3.15** Θρόμβωση σε παγκρεατικό νησίδιο της ομάδας ZFF10 και αποκόλληση του παγκρεατικού νησιδίου πιθανότατα λόγω κακής μεταχείρισης

#### 4. Συζήτηση

Η εύρεση εναλλακτικών πηγών πρωτεϊνών για την αντικατάσταση του ιχθυαλεύρου αποτελεί ένα από τα μεγαλύτερα ζητήματα που έχει απασχολήσει την επιστημονική κοινότητα και τον κλάδο των υδατοκαλλιεργειών τις τελευταίες δεκαετίες. Ένα από τα θέματα που έχουν απασχολήσει περισσότερο τους ερευνητές σχετικά με την αντικατάσταση του ιχθυαλεύρου έχουν να κάνουν με τον ρυθμό ανάπτυξης των ψαριών καθώς επίσης και το βαθμό που προκαλούν μορφολογικές και ιστολογικές αλλοιώσεις. Η χρήση αλεύρου εντόμων στις δίαιτες των ψαριών προσέελκυσε πρόσφατα το ενδιαφέρον των επιστημών καθώς τα έντομα σε πολλές περιπτώσεις αποτελούν μέρος της διατροφής των σαρκοφάγων και παμφάγων ψαριών, ιδιαίτερα στα αρχικά στάδια. Από τα πειράματα που έχουν γίνει μέχρι στιγμής, λίγα είναι αυτά που εστιάζουν στην αντικατάσταση του ιχθυαλεύρου από άλευρο εντόμων, ενώ ο μεγαλύτερος αριθμός ερευνών επικεντρώνεται στην αντικατάσταση ιχθυαλεύρου από φυτικά άλευρα και τις όποιες επιπτώσεις αυτών στην ανάπτυξη και τις ιστολογικές επιπτώσεις στους εκτρεφόμενους οργανισμούς.

Πιο αναλυτικά, σε διατροφικό πείραμα από τους Baeza- Arinoetal.(2016) που πραγματοποιήθηκε στην τσιπούρα, με χρήση ενός μείγματος φυτικών πρωτεϊνών η δομική ακεραιότητα του εντέρου δεν επηρεάστηκε σημαντικά από μια διατροφή έως και 60% υποκατάσταση. Ο ορογόνος χιτώνας αυξήθηκε σε πάχος σε όλες τις ομάδες εκτός από την ομάδα αντικατάστασης 90%, η οποία έχει τον λεπτότερο ορογόνο χιτώννα. Διαφορές διαπιστώθηκαν και στον μυϊκό χιτώννα μεταξύ των διαφορετικών τμημάτων του εντέρου που εξετάστηκαν και τις διατροφικές ομάδες. Ο υποβλεννογόνος χιτώννας δεν έδειξε σημαντικές διαφορές σε κανένα τμήμα του

εντέρου. Ανεξάρτητα της διατροφής το πάχος του υποβλεννογόνου αυξανόταν στο οπίσθιο τμήμα του εντέρου ενώ με την υψηλότερη υποκατάσταση, 90%, το μήκος των λαχνών αυξήθηκε συγκριτικά με τις άλλες δίαιτες. Αυτή η επιμήκυνση θα μπορούσε επίσης να αποδοθεί σε αύξηση της περιεκτικότητας σε ακατέργαστες ίνες σε αυτή τη διατροφή και ανεπαρκή πέψη των θρεπτικών ουσιών και θα μπορούσε να είχε συμβεί για την αύξηση της απορρόφησης της επιφάνειας (Aslaksen et al. 2007).

Η Kokou et al.(2015), σε πείραμα αντικατάστασης του ιχθυαλεύρου με άλευρο σόγιας (BS) βρήκε ότι ένα ποσοστό έως και 40%, μπορεί να συμπεριληφθεί στις δίαιτες χωρίς να επηρεάσει σημαντικά τις παραμέτρους ανάπτυξης της τσιπούρας. Γενικά, δεν παρατηρήθηκε σοβαρή ιστοπαθολογική βλάβη στο ήπαρ και στο έντερο των ψαριών και οι μεταβολές περιορίστηκαν σε έναν μικρό αριθμό ατόμων. Η ιστολογική αξιολόγηση αποκάλυψε τη συσσώρευση λιπιδίων στα ψάρια της ομάδας όπου έγινε αντικατάσταση σε ποσοστό 60% και τη διαστολή του υποβλεννογόνου με κάποια διείσδυση ηωσινοφύλων που βρέθηκαν στο έντερο των ψαριών από την ομάδα BS60, κάτι που παρατηρήθηκαν επίσης από άλλους συγγραφείς (Sitjà-Bobadilla et al. 2005; Bonaldo et al. 2008).

Ο Robaina et al.(1994), σε πείραμα μερικής αντικατάστασης του ιχθυαλεύρου από σογιάλευρο και λουπινάλευρο βρήκε αυξημένη απόθεση λίπους με μειωμένα αποθέματα γλυκογόνου στο ήπαρ όσο αυξανόταν τα επίπεδα του σογιαλεύρου. Παρατηρήθηκε ένας μεγάλος αριθμός λιποσταγονιδίων γύρω από τον παγκρεατικό ιστό στο συκώτι των ψαριών από τις ομάδες με το σογιάλευρο. Ακόμη, σε διαφορετικό πείραμα που διεξήγαγε με αντικατάσταση του ιχθυαλεύρου από γλουτένη καλαμποκιού και άλευρο κρέατος και οστών δεν βρέθηκαν ιστολογικές αλλοιώσεις στα ψάρια που διατράφηκαν με γλουτένη ακόμα και στις υψηλότερες συγκεντρώσεις. Το μέγεθος των

ηπατοκυττάρων αυξήθηκε όσο αυξανόταν η συγκέντρωση της γλουτένης αλλά δεν παρατηρήθηκε απόθεση λίπους. Σε αντίθεση με τα σιτηρέσια με άλευρο κρέατος και οστών όπου η συγκέντρωση ξεπερνούσε το 30% βρέθηκε απόθεση λίπους. Η μετατόπιση των πυρήνων προς την περιφέρεια των κυττάρων και η τοπική νέκρωση παρατηρήθηκε στα ηπατοκύτταρα της αντικατάστασης 40% καθώς επίσης παρατηρήθηκε και απόθεση λίπους στο ηπατοπάγκρεας. Αυτά τα αποτελέσματα συμφωνούν με τον Shimeno et al. (1993), ο οποίος βρήκες υψηλότερο περιεχόμενο λίπους στα ψάρια των ομάδων με άλευρο κρέατος και οστών σε σύγκριση με αυτά των ομάδων της γλουτένης. Επιπλέον στην παρούσα εργασία βρέθηκε νέκρωση στα ηπατοκύτταρα που δείχνει πιθανά μη αναστρέψιμα αποτελέσματα στην υγεία των ψαριών λόγω διατροφικών ανισορροπιών (Mosconi-Bat, 1987, 1990).

Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, ελάχιστες είναι οι έρευνες που έχουν πραγματοποιηθεί στο ιστολογικό κομμάτι αντικατάστασης του ιχθυαλεύρου από άλευρο εντόμων. Ο Lock et al (2016) σύγκρινε δύο διαφορετικά εντομάλευρα ως συστατικά τροφών για τον σολομό του Ατλαντικού *Salmo salar*. Αυτή φαίνεται να είναι η πρώτη αναφορά αντικατάστασης ιχθυαλεύρου από εντομάλευρο στην διατροφή του σολομού του Ατλαντικού. Η αντικατάσταση του ιχθυαλεύρου έγινε σε ποσοστό 25, 50 και 100% και για τα δύο εντομάλευρα (Insect meal A και Insect meal B). Το ήπαρ από τις ομάδες Fish meal 100 και Insect meal έδειξε γενικά φυσιολογική ιστολογία. Στα εντεροκύτταρα ο πυρήνας έδειξε καθορισμένη πυρηνική μεμβράνη με κάποια διάχυτη χρωματίνη. Οι κυτταρικές μεμβράνες ήταν ακέραιες και δεν υπήρχαν ενδείξεις αιμορραγίας. Τα δείγματα εξετάστηκαν για απώλεια στην δομή των λαχνών ή νέκρωση στις άκρες τους. Το επιθήλιο του μεσέντερου έδειξε φυσιολογική ιστολογία με άθικτο επιθήλιο, υποβλεννογόνο και χωρίς απώλεια της δομής ή φλεγμονή στο μυϊκό σώμα



στα ψάρια όλων των διαιτητικών ομάδων. Το ίδιο ισχύει και στο οπίσθιο τμήμα του εντέρου.

Επιπρόσθετα, στην τιλάπια της Μοζαμβίκης *Oreochromis mossambicus* έγινε αντικατάσταση του ιχθυαλεύρου από άλευρο του εντόμου *Imbrasia belina* σε ποσοστά 10, 20, 40 , 60% (Mmaditshaba et al 2017). Δεν υπήρχε σημαντική διαφοροποίηση του εντέρου με αυξανόμενα επίπεδα χρήσης του συγκεκριμένου εντομάλευρου. Το χόριο του βλεννογόνου ήταν το ίδιο σε όλες τις μεταχειρίσεις. Ο αριθμός των βλεννοπαραγωγών κυττάρων δεν αυξήθηκε όσο αυξανόταν η αντικατάσταση. Το ήπαρ που είναι συνήθως ένας καλός δείκτης της διατροφικής κατάστασης των ψαριών δεν παρουσίασε ιστολογικές μεταβολές. Τόσο η ιστολογία του ήπατος όσο και του εντέρου δείχνουν ότι αυτό το εντομάλευρο δεν έχει δυσμενείς επιπτώσεις στην υγεία στο *O. mossambicus* ακόμη και σε υψηλά επίπεδα ένταξης (Mmaditshaba et al 2017).

Στο είδος *Danio rerio* έγινε αντικατάσταση του ιχθυαλεύρου σε ποσοστά 25, 50, 75 και 100% (Hi25, Hi50, Hi75 και Hi100) από άλευρο εντόμου του είδους *Hermetia illucens* (Hi) (Zarantoniello et al. 2020). Οι ιστολογικές αναλύσεις που πραγματοποιήθηκαν στο έντερο δεν έδειξαν κάποια μορφολογική διαφοροποίηση ή φλεγμονή σε καμία από τις ομάδες. Αντίθετα στο ήπαρ, βρέθηκε διαφορετικός βαθμός λιπιδικής συσσώρευσης σε όλες τις ομάδες. Η ομάδα μάρτυρας, Hi25 και Hi50 χαρακτηρίστηκαν αυξημένο αριθμό λιποσταγονιδίων διάσπαρτα στο ηπατικό παρέγχυμα. Αντίθετα στις ομάδες Hi75 και Hi100 βρέθηκε σοβαρός βαθμός στεάτωσης με διογκωμένα ηπατοκύτταρα και άφθονη ενδοκυτταροπλασματική συσσώρευση λιποσταγονιδίων. Έχει αποδειχθεί ότι οι δομικές αλλοιώσεις του ήπατος μπορούν να παρέχουν πληροφορίες σχετικά με την ποιότητα της διατροφής, τον μεταβολισμό της διατροφής και τη διατροφική κατάσταση των ψαριών (Storch et al., 1983; Escaffre and

Bergot, 1986; Segner και Braunbeck, 1988). Δεν υπήρχε στατιστικώς σημαντική διαφορά ανάμεσα στις ομάδες Hi25 και Hi50 και την ομάδα μάρτυρα, ενώ οι ομάδες Hi75 και Hi100 έδειξαν σημαντικά υψηλότερες τιμές συγκριτικά με τις άλλες ομάδες (Zarantoniello et al. 2020).

Οι Mikolajczak et al. (2020) διεξήγαγαν πείραμα με χρήση υδρολυμένου αλεύρου από *Tenebrio molitor* και *Zophobas morio* ως μερική αντικατάσταση του ιχθυαλεύρου στην διατροφή της πέστροφας και το πώς επηρεάζει την μορφολογία του εντέρου. Το πρόσθιο τμήμα του εντέρου δεν παρουσίασε κάποια σημαντική διαφορά όσον αφορά το μήκος και πλάτος των λαχνών μεταξύ των διαφορετικών ομάδων. Το πάχος του μυϊκού χιτώνα επίσης δεν επηρεάστηκε από την προσθήκη των εντομάλευρων στην διατροφή. Η συγκεκριμένη εργασία αποτελεί την πρώτη είσοδο του *Zophobas morio* στην διατροφή της πέστροφας. Τα αποτελέσματα χαρακτηρίζονται από υψηλό ποσοστό επιβίωσης καλή ανάπτυξη και καλή μετατρεψιμότητα της τροφής. Σύμφωνα με τον Huang et al. (2016) η υψηλή περιεκτικότητα λίπους στην τροφή οδηγεί σε απόθεση λίπους στην σπλαχνική κοιλότητα και στο ήπαρ των ψαριών, ωστόσο αυτό μπορεί να διαφέρει ανάλογα με την περιεκτικότητα σε λιπαρά οξέα στην τροφή. Το υδρολημένο άλευρο εντόμων δεν επηρέασε την ιστομορφολογία του εντέρου (το μήκος και πλάτος των λαχνών και το πάχος του μυϊκού χιτώνα) τα οποία παίζουν σημαντικό ρόλο στην απορρόφηση συστατικών και στην υγεία του εντέρου.

Ο Józefiak et al. (2019) σύγκρινε 4 διαφορετικά άλευρα εντόμων τα οποία αντικατέστησαν το ιχθυάλευρο σε ποσοστό 20%. Τα είδη εντόμων που χρησιμοποίησε ήταν το *Hermetia illucens* (HI), *Tenebrio molitor* (TM), *Grylloides sigillatus* (GS) και *Blatta lateralis* (BL). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το μήκος των λαχνών μειώθηκε

στις ομάδες TM και GS αλλά αυξήθηκε στην ομάδα BL. Το πάχος του βλεννογόνου μειώθηκε στην ομάδα διατροφής GS, ενώ αυξήθηκε στην ομάδα BL. Αυτή η αύξηση μπορεί να προάγει την καλύτερη χρήση τροφών που προκαλείται από την αύξηση της περιοχής απορρόφησης θρεπτικών ουσιών. Αυτό μπορεί να οδηγήσει σε αύξηση της εντερικής διαπερατότητας και αυξημένη αποτελεσματικότητα απορρόφησης και χρήσης θρεπτικών ουσιών (Xiao et al., 2015). Επιπλέον, αποδείχθηκε ότι στην περίπτωση του zebrafish (*Danio rerio*) και του clownfish (*Amphiprion ocellaris*) δεν παρατηρήθηκαν αρνητικές επιδράσεις της διατροφής με βάση το έντομο *Hermetia illucens* όσον αφορά την ιστομορφολογία του εντέρου και του ήπατος (Vargas-Abundez et al., 2019; Zarantoniello et al., 2018).

Τέλος, οι Caimi et al. (2020) αξιολόγησε τις επιδράσεις μιας διατροφής που περιελάμβανε το έντομο *Hermetia illucens* (H) με υψηλή περιεκτικότητα σε λιπαρές ουσίες και μια διατροφή βασισμένη σε φυτικές πρωτεΐνες (VEG) στα ιστολογικά χαρακτηριστικά του ήπατος και του οπίσθιου εντέρου σε νεαρά άτομα οξύρρυγχου της Σιβηρίας *Acipenser baerii*. Στην παρούσα μελέτη, δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές μεταξύ του μήκους των λαχνών και του αριθμού των βλεννοπαραγωγών μεταξύ και των 3 ομάδων. Κατέληξε στο συμπέρασμα πως το συγκεκριμένο εντομάλευρο μπορεί να αντικαταστήσει το ιχθυάλευρο σε ποσοστό 18,5% ή 37,5% αφού έχει πραγματοποιηθεί απολίπανση χωρίς να επηρεάζει την υγεία του συγκεκριμένου είδους. Οι συγγραφείς ανέφεραν ότι τα αποτελέσματά του φαίνεται να συμφωνούν με αυτά που παρατηρούνται στο ιαπωνικό λαβράκι, τον σολομό του Ατλαντικού, το zebrafish (*Danio rerio*) και την ιριδίζουσα πέστροφα που διατράφηκαν με το συγκεκριμένο εντομάλευρο. Μια άλλη μελέτη που πραγματοποιήθηκε στον οξύρρυγχο της Σιβηρίας που διατράφηκε με δίαιτα με βάση το *Hermetia illucens*

(Józefiak et al 2019) έδειξε ότι στο εγγύς έντερο, η συμπερίληψη του 15% του πλήρους λιπαρού *Hermetia illucens* δεν επηρέασε το μήκος των λαχνών, αλλά οι συγγραφείς ανέφεραν μείωση του πάχους του βλεννογόνου και αύξηση του πάχους του στρώματος των μυών - αλλαγές που έχουν συσχετιστεί με την ενίσχυση της διαδικασίας πέψης και απορρόφησης. Αντιθέτως, οι Li et al. (2017) παρατήρησαν σημαντικές μεταβολές στο ήπαρ (αύξηση της ήπιας νέκρωσης και της απόπτωσης των ηπατοκυττάρων) στον κυπρίνο Jian (*Cirrinus carpio* var. Jian) όταν η διατροφή τους περιελάμβανε 7,9% *Hermetia illucens*.

Δυστυχώς οι έρευνες που εστιάζουν στο κομμάτι των ιστολογικών αναλύσεων είναι ελάχιστες, πόσο μάλλον αυτές που συνδυάζουν και την χρήση των εντόμων. Η συγκεκριμένη ιστολογική μελέτη στο έντερο και το ήπαρ της τσιπούρας (*S. aurata*) αποτελεί ένα μικρό βήμα για την περαιτέρω ανάλυση και χρήση των εντόμων ως εναλλακτικές πηγές πρωτεϊνών, καθώς και πως μπορούν να επηρεάσουν την υγεία των εκτρεφόμενων ιχθύων.

Το εντερικό επιθήλιο είναι η πρώτη γραμμή άμυνας ενάντια σε εισβάλλοντα παθογόνα (Baeza-Arino et al 2016). Οποιαδήποτε διατάραξη ή βλάβη του μπορεί να οδηγήσει σε εκτεταμένη ενεργοποίηση του επιθηλιακού ανοσοποιητικού συστήματος, φλεγμονώδεις αποκρίσεις και μορφολογικές αλλαγές στο έντερο. Όσον αφορά τις ζωοτροφές και την επίδραση διαφορετικών συστατικών της τροφής στον οργανισμό, το έντερο ως ο πρώτος ιστός που εκτίθεται σε κατάποση τροφής, είναι ιδιαίτερα ευάλωτο σε επιβλαβείς παράγοντες. Επομένως, κάθε ουσία που πιθανώς θα βλάψει οποιαδήποτε βασική εντερική λειτουργία, είναι απειλή για την υγεία των ψαριών. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσας ιστολογικής ανάλυσης, το έντερο των ψαριών και των 3 διατροφικών ομάδων δεν παρουσίασε αλλοιώσεις. Η παρατήρηση του εντέρου εστίασε

σε συγκεκριμένες παραμέτρους όπως ο μυϊκός χιτώνας, το μήκος και το πάχος των λαχνών και ο αριθμός των βλεννοπαραγωγών που υπήρχαν σε κάθε λάχνα. Η ομάδα ZFF10 παρουσίασε τις λάχνες με το μεγαλύτερο μέσο μήκος  $0,50\pm 0,8\text{mm}$  ακολουθούμενη από την ομάδα ZLF10 με μέσο μήκος λαχνών  $0,49\pm 0,2\text{mm}$  και τη ομάδα FM με μέσο μήκος λαχνών  $0,41\pm 0,2\text{mm}$ . Αυτή η επιμήκυνση μπορεί να οφείλεται στην ανάγκη για δημιουργία μεγαλύτερης απορροφητικής επιφάνειας καθώς και στην αύξηση της περιεκτικότητας σε λίπος όπως και σε αντιδιατροφικούς παράγοντες (χιτίνη) της συγκεκριμένης διατροφής και ανεπαρκή πέψη των θρεπτικών ουσιών. Ωστόσο, η ομάδα ZLF10 φαίνεται να έχει τις λάχνες με το μεγαλύτερο πλάτος  $0,16\pm 0,2\text{mm}$ , τον μεγαλύτερο αριθμό βλεννοπαραγωγών κυττάρων  $14,72\pm 2,78$  και το μεγαλύτερο πλάτος του κυκλοτερή μυϊκού χιτώνα  $0,05\pm 0,00\text{mm}$ . Η ομάδα ZFF10 έχει μέσο πλάτος λαχνών  $0,14\pm 0,1\text{mm}$ , αριθμός βλεννοπαραγωγών κυττάρων  $9,85\pm 5,52$  και μέσο πλάτος του κυκλοτερή μυϊκού  $0,04\pm 0,02\text{mm}$ , ενώ η ομάδα FM έχει μέσο πλάτος λαχνών  $0,13\pm 0,1\text{mm}$ , αριθμό βλεννοπαραγωγών κυττάρων  $13,73\pm 2,70$  και μέσο πλάτος του κυκλοτερή μυϊκού  $0,04\pm 0,01\text{mm}$ . Παρόλα αυτά δεν υπήρχε στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των ομάδων για τις συγκεκριμένες παραμέτρους. Αντίθετα, στατιστικώς σημαντική διαφορά φαίνεται να υπάρχει μεταξύ της ομάδας ZFF10 με την ομάδα μάρτυρα FM όσον αφορά το πλάτος του διαμήκη μυϊκού χιτώνα.

Όσον αφορά την ιστολογία του ήπατος, σχεδόν σε όλα τα δείγματα και των 3 διατροφικών ομάδων παρατηρήθηκε μακροστεάτωση. Εάν οι ποσότητες διαιτητικών λιπιδίων ή ενέργειας υπερβαίνουν την ικανότητα των ηπατικών κυττάρων να οξειδώσουν τα λιπαρά οξέα ή εάν η σύνθεση των πρωτεϊνών είναι μειωμένη, το αποτέλεσμα είναι μια μαζική σύνθεση και εναπόθεση τριγλυκεριδίων (Martínez-Llorens et al 2012). Αυτή η κατάσταση ονομάζεται στεάτωση. Στην τσιπούρα, η στεάτωση

μπορεί να προκύψει από την αύξηση της περιεκτικότητας των λιπιδίων στη διατροφή (Caballero et al., 1999), από μια ουσιαστική ανεπάρκεια λιπαρών οξέων (Montero et al., 2001) και από τη χρήση φυτικών ελαίων σε δίαιτες (Alexis 1997, Caballero et al., 2004; Wassef et al., 2007).

Ακόμα, το ηπατικό παρέγχυμα που μελετήθηκε στο οπτικό μικροσκόπιο και για τις 3 ομάδες παρουσίασε ηπατοκύτταρα με σφαιρικούς πυρήνες τοποθετημένους κεντρικά, χωρίς καμία αλλοίωση του σχήματος τους και ευδιάκριτο πυρηνίσκο. Επίσης υπήρχαν άφθονα λιποσταγονίδια ποικίλων μεγεθών διάσπαρτα στο ηπατικό παρέγχυμα. Τέλος, σε πολλά άτομα και από τις 3 ομάδες έγινε παρατήρηση θρομβώσεων στο ήπαρ. Οι θρόμβοι που σχηματίζονται σε ζωτικά όργανα έχουν φυσικά, μεγαλύτερη πιθανότητα να οδηγήσουν σε πιο σοβαρές συνέπειες (Smith et al 1980).

Οι ενδείξεις αυτής της έρευνας αποτελούν μια καλή αρχή ώστε να κατανοήσουμε σε βάθος τις πιθανές επιπτώσεις που μπορεί να υπάρξουν από την προσθήκη εντόμων και ιδιαίτερα του *Zophobas sp.* στην διατροφή της τσιπούρας. Φυσικά περαιτέρω έρευνα κρίνεται αναγκαία, όσον αφορά την δυνατότητα συμμετοχής του συγκεκριμένου εντόμου και σε άλλα ποσοστά αντικατάστασης του ιθχυαλεύρου και εν συνεχεία το αντίκτυπο της εκάστοτε υποκατάστασης στην ιστολογία του οργανισμού όπως και στην σύσταση του σώματος, στο προφίλ των αμινοξέων και των λιπαρών οξέων για την τσιπούρα (*S. aurata*).

## 5. Βιβλιογραφία

### Ξερόγλωσση Βιβλιογραφία

Abarra, S. T., Velasquez, S. F., Guzman, K. D. D., Felipe, J. L. F., Tayamen, M. M., & Ragaza, J. A. (2017). Replacement of fishmeal with processed meal from knife fish *Chitala ornata* in diets of juvenile Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture Reports*, 5, 76-83.

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

Baeza-Ariño, R., Martínez-Llorens, S., Nogales-Mérida, S., Jover-Cerda, M., & Tomás-Vidal, A. (2016). Study of liver and gut alterations in sea bream, *S parus aurata* L., fed a mixture of vegetable protein concentrates. *Aquaculture research*, 47(2), 460-471.

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

Bell JG, Henderson RJ, Tocher DR, Sargent JR (2004a) 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.

Bell JG, MacKinlay EE, Dick JR, MacDonald DJ, Boyle RM, Glen ACA (2004b) Essential fatty acids and phospholipase  $A_2$  in autistic spectrum disorders. Prostaglandins, Leukotrienes and  $A_2$  Essent. Fatty Acids 71: 201–204.

Bell JG, McEvoy J, Tocher DR, McGhee F, Campbell PJ, Sargent JR (2001) Replacement of fish oil with rapeseed oil in diets of Atlantic salmon (*Salmo salar*) affects tissue lipid compositions and hepatocyte fatty acid metabolism. *Journal of Nutrition* 131: 1535–1543.

Bell JG, McGhee F, Campbell PJ, Sargent JR (2003b) Rapeseed oil as an alternative to marine fish oil in diets of post-smolt Atlantic salmon (*Salmo salar*): changes in flesh fatty acid composition and effectiveness of subsequent fish oil “wash out”. *Aquaculture* 218: 515–528.

Bell JG, Tocher DR, Henderson RJ, Dick JR, Crampton VO (2003a) 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. *Journal of Nutrition* 133: 2793–2801.

Bell MV, Dick JR, Porter AEA (2001b) Biosynthesis and tissue deposition of docosahexaenoic acid (22:6n-3) in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Lipids* 36: 1153–1159.

Bell MV, Dick JR, Porter AEA (2003c) Pyloric ceca are a major site of 22:6n-3 synthesis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Lipids* 39: 39–44.

Benzertiha, A., Kierończyk, B., Rawski, M., Józefiak, A., Kozłowski, K., Jankowski, J., & Józefiak, D. (2019). *Tenebrio molitor* and *Zophobas morio* full-fat meals in broiler chicken diets: Effects on nutrients digestibility, digestive enzyme activities, and cecal microbiome. *Animals*, 9(12), 1128.



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).

Bonaldo, A., Roem, A. J., Fagioli, P., Pecchini, A., Cipollini, I., & Gatta, P. P. (2008). Influence of dietary levels of soybean meal on the performance and gut histology of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) and European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Aquaculture Research*, 39(9), 970-978.

Bonvini, E., Bonaldo, A., Mandrioli, L., Sirri, R., Dondi, F., Bianco, C., ... & Parma, L. (2018). Effects of feeding low fishmeal diets with increasing soybean meal levels on growth, gut histology and plasma biochemistry of sea bass. *animal*, 12(5), 923-930.

Caballero, M. J., López-Calero, G., Socorro, J., Roo, F. J., Izquierdo, M. S., & Fernández, A. J. (1999). Combined effect of lipid level and fish meal quality on liver histology of gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Aquaculture*, 179(1-4), 277-290.

Caballero, M. J., López-Calero, G., Socorro, J., Roo, F. J., Izquierdo, M. S., & Fernández, A. J. (1999). Combined effect of lipid level and fish meal quality on liver histology of gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Aquaculture*, 179(1-4), 277-290.

Caballero, M. J., Obach, A., Rosenlund, G., Montero, D., Gisvold, M., & Izquierdo, M. S. (2002). Impact of different dietary lipid sources on growth, lipid digestibility, tissue fatty acid composition and histology of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture*, 214(1-4), 253-271.

Caimi, C., Gasco, L., Biasato, I., Malfatto, V., Varello, K., Prearo, M., ... & Elia, A. C. (2020). Could Dietary Black Soldier Fly Meal Inclusion Affect the Liver and Intestinal Histological Traits and the Oxidative Stress Biomarkers of Siberian Sturgeon (*Acipenser baerii*) Juveniles?. *Animals*, *10*(1), 155.

collapses: Consequences for recovery and extinction risk. *BioScience*, *54*: 297–309 (2004).

Dulvy, N. K., Y. Sadovy, and J. D. Reynolds. Extinction vulnerability in marine populations. *Fish Fish.*, *4*: 25–64 (2003).

Eryalçin, K. M., Torrecillas, S., Caballero, M. J., Hernandez-Cruz, C. M., Sweetman, J., & Izquierdo, M. (2017). Effects of dietary mannan oligosaccharides in early weaning diets on growth, survival, fatty acid composition and gut morphology of gilthead sea bream (*Sparus aurata*, L.) larvae. *Aquaculture Research*, *48*(9), 5041-5052.

Finke, M. D. (2002). Complete nutrient composition of commercially raised invertebrates used as food for insectivores. *Zoo Biology: Published in Affiliation with the American Zoo and Aquarium Association*, *21*(3), 269-285.

Fontes, T. V., de Oliveira, K. R. B., Gomes Almeida, I. L., Maria Orlando, T., Rodrigues, P. B., & Costa, D. V. D. (2019). Digestibility of insect meals for Nile tilapia fingerlings. *Animals*, *9*(4), 181.

Gasco, L., Gai, F., Maricchiolo, G., Genovese, L., Ragonese, S., Bottari, T., & Caruso, G. (2018). Fishmeal alternative protein sources for aquaculture feeds. In *Feeds for the aquaculture sector* (pp. 1-28). Springer, Cham.

Gouveia, A., and S. J. Davies. Inclusion of an extruded dehulled peaseed meal in diets for juvenile European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture*, 182: 183–193 (2000).

Henry, M., Gasco, L., Piccolo, G., & Fountoulaki, E. (2015). Review on the use of insects in the diet of farmed fish: past and future. *Animal Feed Science and Technology*, 203, 1-22.

Hu, L., Yun, B., Xue, M., Wang, J., Wu, X., Zheng, Y., & Han, F. (2013). Effects of fish meal quality and fish meal substitution by animal protein blend on growth performance, flesh quality and liver histology of Japanese seabass (*Lateolabrax japonicus*). *Aquaculture*, 372, 52-61.

Hutchings, J. A., and J. D. Reynolds. Marine fish population

Izquierdo MS, Montero D, Robaina L, Caballero MJ, Rosenlund G, Gines R (2005) Alterations in fillet fatty acid profile and flesh quality in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) fed vegetable oils for a long term period. Recovery of fatty acid profiles by fish oil feeding. *Aquaculture* 250: 431–444.

Jabir, M. A. R., Jabir, S. A. R., & Vikineswary, S. (2012). Nutritive potential and utilization of super worm (*Zophobas morio*) meal in the diet of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) juvenile. *African Journal of Biotechnology*, 11(24), 6592-6598.

Józefiak, A., Nogales-Mérida, S., Mikołajczak, Z., Rawski, M., Kierończyk, B., & Mazurkiewicz, J. (2019). The utilization of full-fat insect meal in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) nutrition: The effects on growth performance, intestinal

microbiota and gastrointestinal tract histomorphology. *Annals of Animal Science*, 19(3), 747-765.

Józefiak, D., Józefiak, A., Kierończyk, B., Rawski, M., Świątkiewicz, S., Długosz, J., & Engberg, R. M. (2016). 1. Insects—a natural nutrient source for poultry—a review. *Annals of Animal Science*, 16(2), 297-313.

Karapanagiotidis, I. T. (2014). The re-authorization of non-ruminant processed animal proteins in European aqua feeds.

Karapanagiotidis, I. T., Daskalopoulou, E., Vogiatzis, I., Rumbos, C., Mente, E., & Athanassiou, C. G. (2014). Substitution of fishmeal by fly *Hermetia illucens* prepupae meal in the diet of gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Proceedings of the HydroMedit*, 110-114.

Kaushik SJ, Cravedi JP, Lalles JP, Sumpter J, Fauconneau B, Laroche M (1995) Partial or total replacement of fishmeal by soybean protein on growth, protein utilisation, potential estrogenic or antigenic effects, cholesterolemia and flesh quality in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture* 133: 257–274.

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).

Kokou, F., Sarropoulou, E., Cotou, E., Rigos, G., Henry, M., Alexis, M., & Kentouri, M. (2015). Effects of fish meal replacement by a soybean protein on growth, histology, selected immune and oxidative status markers of gilthead sea bream, *Sparus aurata*. *Journal of the World Aquaculture Society*, 46(2), 115-128.

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).

Li, S., Ji, H., Zhang, B., Zhou, J., & Yu, H. (2017). Defatted black soldier fly (*Hermetia illucens*) larvae meal in diets for juvenile Jian carp (*Cyprinus carpio* var. Jian): Growth performance, antioxidant enzyme activities, digestive enzyme activities, intestine and hepatopancreas histological structure. *Aquaculture*, 477, 62-70.

Llagostera, P. F., Kallas, Z., Reig, L., & de Gea, D. A. (2019). The use of insect meal as a sustainable feeding alternative in aquaculture: current situation, Spanish consumers' perceptions and willingness to pay. *Journal of Cleaner Production*, 229, 10-21.

Lock, E. R., Arsiwalla, T., & Waagbø, R. (2016). Insect larvae meal as an alternative source of nutrients in the diet of Atlantic salmon (*Salmo salar*) postsmolt. *Aquaculture Nutrition*, 22(6), 1202-1213.

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).

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

Martínez-Llorens, S., Baeza-Ariño, R., Nogales-Mérida, S., Jover-Cerdá, M., & Tomás-Vidal, A. (2012). Carob seed germ meal as a partial substitute in gilthead sea bream

(*Sparus aurata*) diets: Amino acid retention, digestibility, gut and liver histology. *Aquaculture*, 338, 124-133.

Mikołajczak, Z., Rawski, M., Mazurkiewicz, J., Kierończyk, B., & Józefiak, D. (2020). The Effect of Hydrolyzed Insect Meals in Sea Trout Fingerling (*Salmo trutta m. trutta*) Diets on Growth Performance, Microbiota and Biochemical Blood Parameters. *Animals*, 10(6), 1031.

Pike IH (2005) Eco-efficiency in aquaculture: global catch of wild fish used in aquaculture. *International Aquafeed* 8 (1): 38–40.

Rapatsa, M. M., & Moyo, N. A. (2017). Evaluation of *Imbrasia belina* meal as a fishmeal substitute in *Oreochromis mossambicus* diets: Growth performance, histological analysis and enzyme activity. *Aquaculture Reports*, 5, 18-26.

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).

Robaina, L., Moyano, F. J., Izquierdo, M. S., Socorro, J., Vergara, J. M., & Montero, D. (1997). Corn gluten and meat and bone meals as protein sources in diets for gilthead seabream (*Sparus aurata*): nutritional and histological implications. *Aquaculture*, 157(3-4), 347-359.

Sánchez-Muros, M. J., Barroso, F. G., & Manzano-Agugliaro, F. (2014). Insect meal as renewable source of food for animal feeding: a review. *Journal of Cleaner Production*, 65, 16-27.

Santigosa, E., García-Meilán, I., Valentín, J. M., Navarro, I., Pérez-Sánchez, J., & Gallardo, M. Á. (2011). Plant oils' inclusion in high fish meal-substituted diets: effect on digestion and nutrient absorption in gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.). *Aquaculture Research*, 42(7), 962-974.

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).

Tschinkel, W. R. (1981). Larval dispersal and cannibalism in a natural population of *Zophobas atratus* (Coleoptera: Tenebrionidae). *Animal Behaviour*, 29(4), 990-996.

Van Huis, A. (2020). Insects as food and feed, a new emerging agricultural sector: a review. *Journal of Insects as Food and Feed*, 6(1), 27-44.

van Huis, A., & Oonincx, D. G. (2017). The environmental sustainability of insects as food and feed. A review. *Agronomy for Sustainable Development*, 37(5), 43.

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).

Welch, A., Hoenig, R., Stieglitz, J., Benetti, D., Tacon, A., Sims, N., & O'Hanlon, B. (2010). From fishing to the sustainable farming of carnivorous marine finfish. *Reviews in Fisheries Science*, 18(3), 235-247.

Worm, B., E. B. Barbier, N. Beaumont, J. E. Duffy, C. Folke, B. S. Halpern, J. B. C. Jackson, H. K. Lotze, F. Michell, S. R. Palumbi, E. Sala, K. A. Selkoe, J. J. Stachowicz, and R. Watson. Impacts of biodiversity loss on ocean ecosystem services. *Science*, 314: 787–790 (2006).

Zaelor, J., & Kitthawee, S. (2018). Growth response to population density in larval stage of darkling beetles (Coleoptera; Tenebrionidae) *Tenebrio molitor* and *Zophobas atratus*. *Agriculture and Natural Resources*, 52(6), 603-606.

Zarantoniello, M., Randazzo, B., Gioacchini, G., Truzzi, C., Giorgini, E., Riolo, P., ... & Lucon-Xiccato, T. (2020). Zebrafish (*Danio rerio*) physiological and behavioural responses to insect-based diets: A multidisciplinary approach. *Scientific reports*, 10(1), 1-16.

### **Ελληνική Βιβλιογραφία**

Κόκου, Φ. (2013). *Επίδραση της διατροφής στη φυσιολογία του εντέρου και την ανοσολογική κατάσταση της τσιπούρας *Sparus aurata*: παράγωγα σόγιας και αντιδιατροφικοί παράγοντες* (Doctoral dissertation, University of Crete (UOC); Πανεπιστήμιο Κρήτης).

Βερίλλης Π. (2015) Κύτταρα και ιστοί στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διελεύσεως. Στο:

Βερίλλης Π. (συγ.) *Οπτική και ηλεκτρονική μικροσκοπία*. Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Θεσσαλίας, Βόλος, σελ. 170.

Βερίλλης Π., Μεντέ Ε. (2017) Ήπαρ, πάγκρεας και χολή. Στο: Βερίλλης Π., Μεντέ Ε. (επιμ.) *Ιστοφυσιολογία ιχθύων και καρκινοειδών*. Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Θεσσαλίας, Βόλος, σελ. 201-202.



Χατζιωάννου Μ., Βαφειδης Δ. (2015) Εργαστηριακές ασκήσεις ιστολογίας. Στο: Χατζιωάννου Μ., Αποστολογάμβρου Χ., Βαφειδης Δ. (επιμ.) Μέθοδοι και τεχνικές ιστολογίας. Εκδόσεις Κάλλιπος, σελ 22-33.

Καραπαναγιωτίδης Ι.Θ. (2015) Τεχνολογία ιχθυοτροφών: Παραδόσεις του μαθήματος.

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

### **Ηλεκτρονική βιβλιογραφία**

[http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Sparus\\_aurata/en](http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Sparus_aurata/en)

<http://www.fao.org/state-of-fisheries-aquaculture>

<http://www.fishbase.org/summary/Sparus-aurata.html>

<https://www.fgm.com.gr/article.php?id=76>

## Abstract

The present study was conducted in order to evaluate the gut and liver alterations of gilthead sea bream, *Sparus aurata* L., fed with diets in which fishmeal protein was substituted by *Zophobas sp.* meal.

*S. aurata* juveniles of 40g final mean weight were fed for 11 weeks with 3 experimental isoenergetic (22 MJ/Kg) and isonitrogenous (56% CP) diets. The first diet was the control one, in which fishmeal (100%) was used as the main protein source. For the other two diets, the partial replacement of this ingredient with *Zophobas sp* meal was at 10% with different fat content (ZLF-Zophobas Low fat & ZFF- Zophobas Full fat). For the purposes of histological analysis, gut and liver samples were removed from 12 fish per treatment and were followed the necessary preparation of them. The tissues were first fixed in 10% buffered formalin and then routinely dehydrated in ethanol, immersed in xyloland embedded in paraffin according to the standard histological techniques. Sections of 5µm were mounted and after deparaffinization were rehydrated, stained with haematoxylin-eosin and mounted with Cristal/Mount. A total number of 72 sections were studied by light microscopy.

The results obtained in the present histological study, showed no significant alterations in the gut of fish from the two dietary groups, comparatively with those of the control group. On the contrary, histological examination of the liver showed steatosis and thrombosis in all 3 dietary groups. The majority of the nuclei appeared in the center of hepatocytes and the number of lipid droplets considered normal with various sizes.

Further research is needed in order to determine the effect of the dietary insect meal at different fish meal replacement rates as well as on other nutritional parameters such as body proximate composition and fatty acid profiles of *S. aurata*.