



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE

DIPARTIMENTO SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE

Corso di Laurea Magistrale in Biologia Marina

---

**Insetti (*Hermetia illucens*) allevati su scarti della torrefazione e *Schizochytrium* sp. come ingredienti terrestri per la produzione di mangimi destinati all'acquacoltura**

**Black Soldier Fly (*Hermetia illucens*) reared on roasted coffee waste and *Schizochytrium* sp. as a sustainable terrestrial ingredient for aquafeed production**

Tesi di Laurea Magistrale di:  
Martina Delli Compagni

Relatore:

Chiar.mo Prof. Ike Olivotto

Correlatore:

Dott. Basilio Randazzo

Sessione Autunnale

Anno Accademico 2018 / 2019

# Indice

<b>1</b>	<b>INTRODUZIONE .....</b>	<b>3</b>
1.1	ACQUACOLTURA.....	3
1.1.1	<i>Lo stato della pesca e dell'acquacoltura nel mondo.....</i>	3
1.1.2	<i>Crescita, vantaggi e svantaggi dell'acquacoltura.....</i>	4
1.2	FARINA DI PESCE ED OLIO DI PESCE .....	7
1.3	ALTERNATIVE SOSTENIBILI ALLA FARINA DI PESCE E ALL'OLIO DI PESCE .....	9
1.3.1	<i>Composti vegetali.....</i>	12
1.3.2	<i>Sottoprodotti di origine animale (PAPs).....</i>	16
1.3.3	<i>Microalghe .....</i>	17
1.4	INSETTI: POSSIBILE FONTE ALTERNATIVA PER I PESCI D'ALLEVAMENTO .....	19
1.4.1	<i>Problematiche degli insetti.....</i>	22
1.5	EFFETTI FISIOLGICI DELLA FARINA D'INSETTO SUI TELEOSTEI.....	24
1.6	VALUTAZIONE BENESSERE ANIMALE .....	27
1.6.1	<i>Fattori di crescita.....</i>	27
1.6.2	<i>Appetito.....</i>	28
1.6.3	<i>Risposta immunitaria .....</i>	29
1.6.4	<i>Stress .....</i>	29
<b>2</b>	<b>SCOPO DELLA TESI .....</b>	<b>31</b>
<b>3</b>	<b>MATERIALI E METODI .....</b>	<b>32</b>
3.1	MODELLI SPERIMENTALI.....	32
3.1.1	<i>Zebrafish (Danio rerio).....</i>	32
3.1.2	<i>Mosca soldato nera (Hermetia illucens, BSF) .....</i>	33

3.2	ETICA .....	35
3.3	PREPARAZIONE DEL SUBSTRATO DI ALIMENTAZIONE DEGLI INSETTI .....	35
3.4	ALLEVAMENTO DI INSETTI .....	36
3.5	PRODUZIONE DIETE ITTICHE .....	36
3.6	EMBRIONI DI ZEBRAFISH .....	38
3.7	DISEGNO SPERIMENTALE .....	38
3.8	PROTOCOLLO ALIMENTARE .....	39
3.9	BIOMETRIE .....	39
3.10	COMPOSIZIONE ACIDI GRASSI.....	40
3.11	ISTOLOGIA .....	41
3.12	ANALISI FTIR .....	42
3.13	ANALISI MOLECOLARI .....	44
3.13.1	<i>Estrazione di RNA e sintesi di cDNA</i> .....	44
3.13.2	<i>Real time PCR</i> .....	44
3.14	ANALISI STATISTICA.....	45
<b>4</b>	<b>RISULTATI</b> .....	<b>46</b>
4.1	BIOMETRIE .....	46
4.2	COMPOSIZIONE E CONTENUTO DEGLI ACIDI GRASSI .....	46
4.3	ISTOLOGIA.....	50
4.4	FTIR.....	52
4.5	REAL TIME PCR.....	53
<b>5</b>	<b>DISCUSSIONE</b> .....	<b>59</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSIONI</b> .....	<b>65</b>
<b>7</b>	<b>RINGRAZIAMENTI</b> .....	<b>66</b>
<b>8</b>	<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	<b>67</b>

## 1 INTRODUZIONE

### *1.1 Acquacoltura*

Settore di produzione di organismi acquatici, campo in più rapida crescita in tutto il mondo con una domanda in continuo aumento: l'acquacoltura resta un settore in netta espansione, oggi più che mai. Le sue radici hanno origine a partire da piccoli insediamenti, che daranno poi luogo alle più importanti civiltà. Dinastie cinesi ed egiziane hanno lasciato le prime tracce di questa pratica di allevamento, la quale sarà poi tramandata alle popolazioni etrusche e romane sino ad arrivare ai nostri giorni. L'acquacoltura rappresenta una delle principali fonti di risorse alimentari con elevato contenuto lipidico e proteico. Ad esempio, nel 2009, i prodotti alimentari acquatici catturati e allevati rappresentavano il 16,5% dell'apporto totale di proteine animali nella popolazione globale, fornendo ad oltre 3 miliardi di persone circa il 20% della loro assunzione pro capite media del fabbisogno alimentare (Tacon and Metian 2013). Oggi si stima che, entro il 2030, il 62% della risorsa ittica proverrà dall'acquacoltura, confermandosi un settore in costante crescita con un peso sempre maggiore in termini produttivi (FAO 2018). Nel corso degli ultimi 50 anni, l'acquacoltura è andata incontro ad un rapido sviluppo incrementando la sua produzione rispetto al settore della pesca che invece ha mantenuto un trend di produzione costante.

#### *1.1.1 Lo stato della pesca e dell'acquacoltura nel mondo*

La rapida espansione dell'acquacoltura ha portato, tra il 1961 e il 2016, all'aumento medio annuo del consumo globale di pesce (3.2%), come risorsa alimentare, superando quello della carne (2.8%) e la crescita della popolazione (1.6%). La produzione mondiale di

risorse ittiche ha raggiunto il picco di circa 171 milioni di tonnellate nel 2016 (Figura 1), con l'acquacoltura che rappresenta il 47% del totale (FAO 2018).

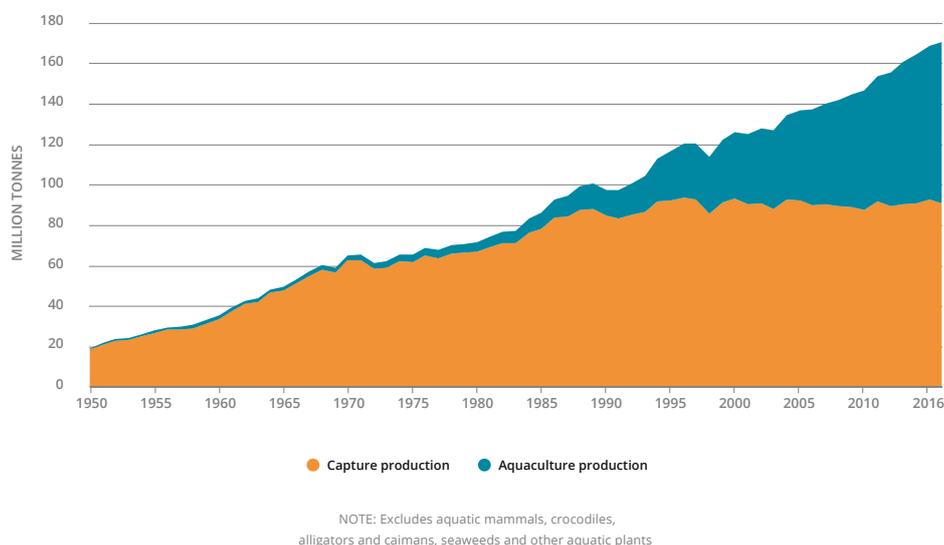


Figura 1. Trend produttivo del settore di pesca e acquacoltura dal 1950 al 2016

In termini pro capite, il consumo di cibo per pesci è aumentato da 9.0 kg nel 1961 a 20.2 kg nel 2015, con un tasso medio annuo di circa l'1.5% (FAO 2016). L'acquacoltura continua a crescere molto più rapidamente a differenza di altri settori di produzione alimentare e ciò soddisfa il continuo aumento di domanda di pesce e crostacei fornendo un maggior quantitativo di prodotto rispetto la pesca in mare aperto (Tacon and Metian 2015). Il primato resta alla Cina con un ammontare di 40 milioni di tonnellate nel 2012, volume di produzione quadruplicato rispetto al 1990. La Cina rappresenta un quarto della domanda mondiale di risorsa ittica (Henriksson and Leadbitter 2015).

### 1.1.2 Crescita, vantaggi e svantaggi dell'acquacoltura

Alla base della continua crescita del settore dell'acquacoltura vi sono molteplici fattori tra i quali è bene ricordare il declino della pesca in cattività, l'accrescimento della domanda

globale di prodotti ittici e l'aumento di popolazione, che stima essere di circa 10 miliardi di persone entro il 2050.

Annualmente si assiste ad un incremento demografico di circa 77 milioni di persone, scenario che mette in luce nuove sfide per cibo, salute e spazio (Cohen 2003). La probabilità che la popolazione mondiale, ora di 7.2 miliardi di persone, aumenterà tra i 9.6 miliardi e i 12.3 miliardi nel 2100 sarà dell'80% (Gerland et al. 2014). L'acquacoltura è ampiamente considerata come un'arma importante nella lotta globale contro la malnutrizione e la povertà, in particolare nei paesi in via di sviluppo in cui attualmente viene realizzato oltre il 93% della produzione globale. Tale settore fornisce una fonte alimentare accessibile e ricca di nutrienti essenziali (Welch et al. 2010).

Sebbene molti prodotti ittici presentano un corretto profilo amminoacidico e acidico, le proiezioni dell'International food policy research institute (IFPRI) suggeriscono che nei paesi in via di sviluppo ben 150 milioni di bambini, 1 su 4 in età prescolare, potrebbero rimanere malnutriti nel 2020 (Pinstrup-Andersen P. et al. 1997). L'acquacoltura, come sistema di produzione alimentare, mostra quindi il potenziale per fornire proteine di qualità ad una popolazione in costante aumento, anche se la differenza tra produzione e domanda di cibo potrebbe essere più che raddoppiata nei paesi in via di sviluppo nei prossimi 25 anni.

Questo settore rappresenta sicuramente un vantaggio per la fornitura di proteine di qualità e di acidi grassi importanti e offre un contributo positivo alla sicurezza alimentare attraverso sistemi di produzione estesi e semi-intensivi. Inoltre, attraverso la dieta, è possibile manipolare il prodotto allevato al fine di indirizzarlo a mercati mirati.

Le proprietà organolettiche di pesci e molluschi allevati in acquacoltura, infatti, possono essere molto diverse dagli stock selvatici. Se la dieta contiene una percentuale

relativamente alta di farina di pesce, il prodotto può avere un sapore più accentuato rispetto ad uno allevato con una dieta contenente una percentuale maggiore di mais e prodotti a base di soia, che conferiscono invece un sapore “più lieve”, desiderato in alcuni mercati (Khan et al. 2011). Inoltre, le proprietà organolettiche possono essere influenzate dall’osmoregolazione delle specie eurialine a causa dei composti chimici utilizzati per regolare l’equilibrio ionico. Ad esempio, il gambero d’acqua dolce se allevato in acqua salata per una o due settimane avrà un sapore più simile ad un gambero marino (Khan et al. 2011).

Infine, l’acquacoltura permette di intervenire a livello del ciclo biologico delle specie e garantisce una produzione continua e indipendente da variabili ambientali ed ecologiche riducendo, inoltre, lo sforzo di pesca.

È bene, però, ricordare che la rapida crescita delle pratiche di acquacoltura solleva al contempo anche molte preoccupazioni, in particolar modo, sulle tematiche di impatto, gestione e mangimistica (Frankic and Hershner 2003).

Finora, i programmi di gestione delle risorse naturali, si sono concentrati principalmente sullo sviluppo di mezzi e modi per sfruttare pienamente o in modo eccessivo le risorse, così da incrementare la produzione, preoccupandosi poco della sostenibilità.

È importante sviluppare e attuare politiche di gestione efficienti per le risorse naturali e per ripristinare l’abbondanza degli stock (FAO 2016).

In particolare, ciò che attualmente rende contrastante l’idea di sostenibilità e di vantaggio del settore dell’acquacoltura è l’utilizzo di mangimi, quali farine e oli di pesce, per fornire alle specie allevate una proporzione sufficiente di acidi grassi polinsaturi (n-3 PUFA) e per garantire un profilo amminoacidico e lipidico ottimali. In tal modo l’acquacoltura è stato il

più grande consumatore di farina ed olio di pesce, raggiungendo valori di circa il 68% nel 2012 (Tacon and Metian 2015).

La domanda sorge quindi spontanea sul come questa pratica possa essere sostenibile nel momento in cui farine e oli di pesce provengono dalla pesca di piccoli pelagici, andando così ad aumentare le pressioni già elevate di pesca e quindi il conseguente sfruttamento degli stock ittici naturali. Sostenibilità, innovazione e responsabilità sono oggi i principali obiettivi che l'acquacoltura si pone, agendo secondo il concetto di economia circolare continuando a fornire alimenti sani nel rispetto dell'ambiente senza far passare in secondo piano il benessere dei pesci tutelandoli costantemente (Merino et al. 2012; Tlusty and Thorsen 2017; R. Newton et al. 2018).

### ***1.2 Farina di pesce ed olio di pesce***

L'acquacoltura per lungo tempo si è basata sull'utilizzo di farine ed oli di pesce, tanto che quasi il 40% di tutta la produzione è tutt'ora saldamente dipendente dai mangimi commerciali. Ciò è particolarmente vero, ad esempio, per le specie carnivore di alto valore commerciale come gamberi, salmoni e trote, il cui mangime contiene grandi porzioni di input marini sotto forma di farina di pesce (Fraga et al. 2007; Hemaiswarya et al. 2011).

La produzione di olio e farina di pesce dipende fortemente dalla disponibilità della pesca in mare aperto ed entro il 2030 si prevede una forte differenza, che raggiungerà i 40 milioni di tonnellate, tra la domanda e l'offerta di tali ingredienti (FAO 2003). A lungo andare, ciò potrebbe comportare il collasso delle popolazioni ittiche di specie coinvolte nella produzione di mangimi.

I problemi che affliggono la maggior parte della pesca sono causati non solo dagli impatti della pesca stessa, ma anche da numerosi fattori ambientali, biologici ed ecologici. Ad

esempio, eventi climatici come El Niño possono ridurre significativamente le popolazioni di pesci e quindi aumentare la pressione sull'olio di pesce e sull'approvvigionamento di farina (Lehodey P. et al. 2006; Bertrand and Bertrand 2007; Karpouzi et al. 2007). Un quarto della fornitura mondiale di olio di pesce e un terzo di farina di pesce, per le diete nell'ambito del settore dell'acquacoltura, provengono dalla pesca della specie *Engraulis ringens* al largo delle coste del Perù (Schwartzlose et al. 1999; Sanchez and Calienes 2000; Lehodey P. et al. 2006). Il solo collasso di questa attività di pesca aumenterebbe la pressione sulla farina di pesce e sul rifornimento di oli minacciando la sicurezza della produzione mondiale di acquacoltura (Miller et al. 2019). Sino a poco fa, l'industria dell'acquacoltura utilizzava il 40 e il 75% della produzione globale di farina di pesce e olio di pesce (Nasopoulou and Zabetakis 2012); oggi recenti dati affermano che, con la produzione di pesci d'allevamento, che eclissa quella dei pesci selvatici, i consumi di farina ed olio di pesce sono più che raddoppiati negli ultimi 10 anni al 68% e all'88% ed i loro costi sono fortemente aumentati (Figura 2) (Tacon and Metian 2008; Rosamond L. et al. 2009).

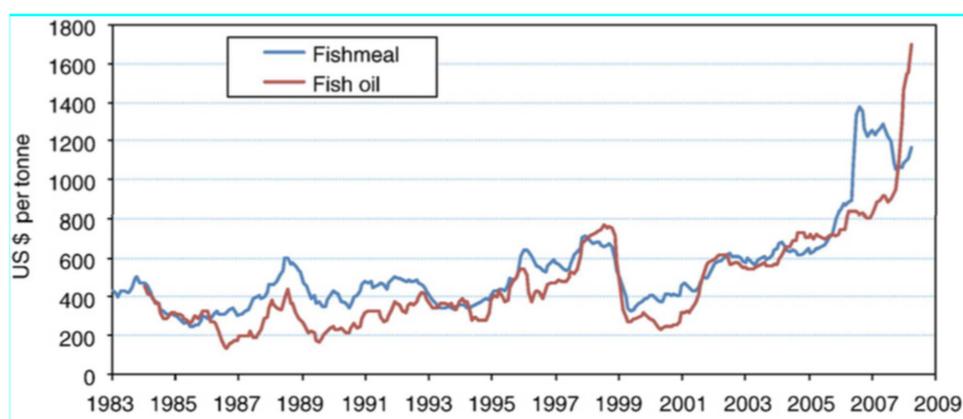
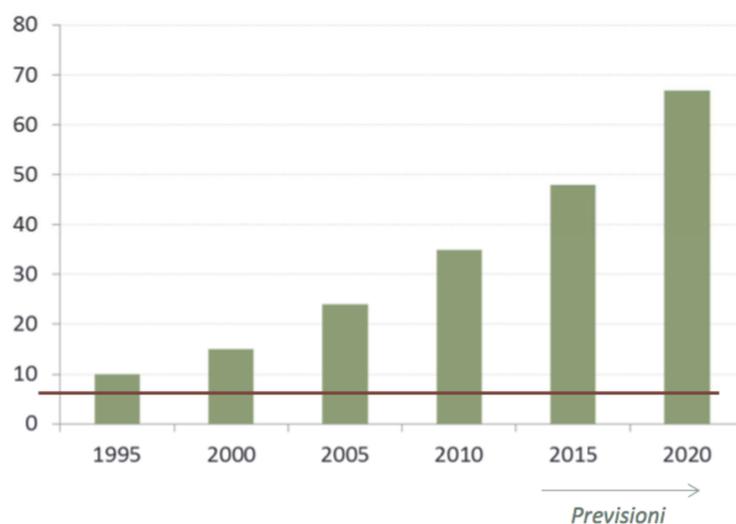


Figura 2 Confronto fra il prezzo medio annuo tra farina ed olio di pesce e aumento economico

### *1.3 Alternative sostenibili alla farina di pesce e all'olio di pesce*

Se da una parte la sfida per il XXI secolo è l'aumento di popolazione, parallelamente, si prevede che la domanda di proteine di alta qualità crescerà del 110%, sottolineando la necessità di pratiche più sostenibili a supporto di ecosistemi sia acquatici che terrestri (Figura 3) (Tilman et al. 2011; Yamold et al. 2019).



*Figura 3. Previsioni d'aumento di popolazione e aumento di domanda di proteine di alta qualità*

Le previsioni implicano l'utilizzo di ingredienti alternativi a sostegno delle diete e dei mangimi di animali. La diminuzione della disponibilità globale di farine e oli di pesce unita al prezzo altamente variabile di queste risorse ha costretto l'industria dell'acquacoltura a studiare fonti alimentari alternative.

La sfida per la produzione ittica consiste nel mantenere, se non migliorare, i benefici riconosciuti del pesce per la salute umana, cercando contemporaneamente di massimizzare la sostenibilità, la salute delle specie allevate e i benefici economici.

Durante le prime fasi di vita, le larve dei pesci assimilano meglio i lipidi piuttosto che le proteine a causa di un tratto digerente non ancora differenziato e sviluppato. In particolare,

gli acidi grassi polinsaturi e alcuni HUFAs (Highly Unsaturated Fatty Acids) della serie n-3 ed n-6 sono fondamentali per il corretto sviluppo larvale e rappresentano macromolecole essenziali al benessere del pesce durante tutto il suo ciclo vitale. Un pesce allevato con una dieta ricca di questi acidi grassi rappresenta un ottimo prodotto commerciale dal momento che la presenza di omega 3 e omega 6 è ricercata anche nell'alimentazione umana per i numerosi effetti, tra i quali la prevenzione di malattie cardiovascolari. Raccomandazioni sull'assunzione dell'acido eicosapentaenoico (EPA) e dell'acido docosaesaenoico (DHA) sono fornite in diversi paesi, ad esempio dal 1994 nel Regno Unito e negli Stati Uniti (Pickova 2007).

Nei pesci oltre che essere costituenti delle membrane cellulari, sotto forma di fosfolipidi, in particolare nel sistema nervoso centrale (SNC) e del sistema visivo, il cui sviluppo è fortemente influenzato dall'assimilazione di HUFAs, la carenza di questi acidi grassi può portare a diversi effetti negativi tra cui riduzione del tasso di crescita, aumento della mortalità, miocardite e maggiore sensibilità del pesce a situazioni stressanti (Glencross et al. 2014).

Inoltre, i lipidi sono un'ottima fonte energetica, hanno un ruolo fondamentale nella metamorfosi dei pesci piatti, sono precursori di eicosanoidi, ormoni e vitamina D e agiscono come co-fattori enzimatici (Bell et al. 2003; Glencross 2009).

L'acido alfa-linolenico (ALA; 18:3 n-3) e l'acido linoleico (LA; 18:2 n-6) sono definiti acidi grassi essenziali (EFA) per i pesci di acqua dolce.

In particolare, attraverso l'azione di enzimi che compiono l'allungamento e che aggiungono i doppi legami (elongasi e desaturasi) è possibile formare HUFA con importanti funzioni nel controllo e nella regolazione del metabolismo cellulare e della

fisiologia animale come, ad esempio, l'acido arachidonico (AA; 20:4 n-6), l'acido eicosapentaenoico (EPA; 20:5 n-3) e l'acido docosaesaenoico (DHA; 22:6 n-3).

Tuttavia, per i pesci marini sono proprio i PUFAs ad essere considerati acidi grassi essenziali.

Il grado in cui un animale può eseguire queste conversioni dipende dalle attività relative di elongasi e desaturasi. I pesci marini non sono in grado di biosintetizzare autonomamente EPA e DHA perché in natura li assimilano attraverso la dieta, al contrario i pesci d'acqua dolce, avendo una dieta per lo più insettivora, hanno mantenuto tale pattern enzimatico (Tocher et al. 2003).

Il ruolo dei lipidi nella nutrizione dei pesci è diventato più importante negli ultimi anni, data la produzione e l'implementazione di diete ad alto contenuto lipidico e ad alta intensità energetica. Livelli lipidici fino al 40% sono attualmente utilizzati nei mangimi commerciali per salmoni. Gli oli di pesce marini sono stati tradizionalmente utilizzati come unica fonte lipidica dietetica negli alimenti per pesci commerciali data la loro pronta disponibilità, il prezzo competitivo e l'abbondanza di acidi grassi essenziali contenuti in questo prodotto (Turchini et al. 2009).

Vista l'importanza di tali costituenti e lo scenario cui ne fanno parte, ad oggi le principali fonti alternative a farine e oli di pesce sono:

1. Fonti vegetali
2. Sottoprodotti di origine animale (PAPs)
3. Microalghe

Attualmente, circa il 57% dell'approvvigionamento proteico globale proviene da fonti vegetali (quasi esclusivamente terrestri), mentre il restante 43% proviene da fonti animali (carne rossa, pollame, frutti di mare, latticini, uova e altri prodotti) (Henchion et al. 2017).

Le alternative proposte, potendo influenzare la crescita e in generale la salute dei pesci e dell'uomo, devono essere valutate correttamente ed è indispensabile lo studio sugli effetti che tali sostituti a farine e oli di pesce hanno sullo stock, sulla qualità finale del prodotto, sulla sicurezza alimentare e sul benessere degli animali (Sarker et al. 2018) ricordando che la composizione lipidica dei pesci è modulabile con la dieta.

### *1.3.1 Composti vegetali*

Gli oli vegetali rappresentano una buona alternativa energetica agli oli di pesce. Molti studi hanno dimostrato il loro elevato contenuto proteico, l'alta digeribilità e la riduzione dei costi che potrebbero offrire. Colture come la soia, la colza, il mais, il lupino, il grano e l'orzo sono ampiamente utilizzate nei mangimi per pesci d'allevamento (Yarnold et al. 2019), ma non sono in grado di fornire livelli sufficienti di EPA, DHA (Fry et al. 2016), lisina e metionina; inoltre, possono contenere composti anti-nutrizionali come, ad esempio, saponine, tannini e polisaccaridi non solubili (Francis et al. 2001). Pertanto, solo una determinata parte della dieta può essere sostituita prima che gli impatti negativi sulla crescita e sulla salute superino i benefici. Inoltre, piante come la soia non dovrebbero essere usate come fonte proteica alternativa alle farine di pesce a causa dell'eccessivo impatto ambientale causato dalle loro coltivazioni sugli ecosistemi terrestri (Arru et al. 2019).

La soia (*Glycine max*) è una pianta erbacea della famiglia delle Leguminose, che è stata ampiamente studiata come alternativa alle diete con farina di pesce (Nordrum S. et al. 2000; Gatlin III et al. 2007).

Tuttavia, l'utilizzo di proteine vegetali ha mostrato una serie di svantaggi che non le rendono le migliori alternative all'olio e alla farina di pesce. Diversi sono i livelli di fibre, amido e fattori anti-nutrizionali, ma è, in particolar modo, la mancanza di acidi grassi

altamente insaturi (HUFAs) che limiterebbe bruscamente l'uso alternativo di questi ingredienti. L'assenza di EPA e di DHA può avere un effetto significativo sul valore nutrizionale (Turchini et al. 2009). Tra le materie prime maggiormente utilizzate in campo mangimistico ricordiamo: soia, cotone, mais e colza.

**Soia.** La soia è uno dei prodotti alimentari più coltivati e attualmente si attesta una produzione mondiale di circa 353 milioni di tonnellate (FAO 2017). I prodotti a base di soia rappresentano una delle principali alternative alla farina di pesce nelle diete per l'acquacoltura grazie al suo contenuto proteico, al profilo amminoacidico equilibrato e al prezzo non elevato (Nordrum S. et al. 2000). Ad esempio, una volta bio-processata in farina di soia ha sostituito prima il 60% e poi l'80% della farina di pesce nella dieta dell'adulto della trota iridea *Oncorhynchus mykiss*. Al termine dello studio non sono state rinvenute differenze significative in guadagno, tasso di crescita o differenze nella morfologia intestinale. Su tali basi si è arrivati alla conclusione che la farina di soia può sostituire almeno l'80% della farina di pesce nelle diete adulte di trota iridea (Voorhees et al. 2019).

Tuttavia, i semi di soia presentano fattori anti-nutrizionali, che hanno implicazioni negative nella digestione dei pesci, i livelli di carboidrati risultano essere elevati, si possono verificare infiammazioni e tali diete sono responsabili della riduzione della quota di acidi grassi polinsaturi. Il rischio è la riduzione degli effetti benefici riguardanti circolazione e funzionalità cardiaca (Vielma 2000). Ad esempio, le agglutinine (fattori anti-nutrizionali) causano, alla mucosa dell'intestino distale nel salmone dell'Atlantico, un aumento della densità delle cellule caliciformi e una marcata riduzione o assenza di vacuoli assorbenti. Altri di questi fattori possono, invece, essere tossici e causare danni all'epitelio respiratorio delle branchie e mucosa intestinale (Francis et al. 2001).

**Cotone.** Valutata in base ai suoi fattori anti-nutrizionali, impatto sulla crescita, sopravvivenza e istopatologia nei pesci, la farina di semi di cotone è utilizzata in tutto il mondo ed è disponibile ad un costo relativamente basso. Contiene alti livelli di proteine ed è molto appetibile per i pesci (Kumar et al. 2014). Generalmente, la quantità che può essere inclusa nei mangimi dipende dalle specie di animali, dalle fasi di sviluppo, dalle proteine alimentari e dai livelli di fattori anti-nutrizionali. Ad esempio, il gossipolo è un fattore anti-nutrizionale con azione tossica che mostra un forte impatto sulla crescita e sui cambiamenti patologici nei pesci. Si consiglia, dunque, di utilizzare bassi livelli di farina di semi di cotone (Gatlin III et al. 2007). Il gossipolo sembra avere effetti dannosi sulla crescita e sui parametri di efficienza dei mangimi. Le diete alimentari contenenti gossipolo causano conseguentemente effetti negativi come diminuzione della crescita, anomalie intestinali e di altri organi interni. È stato dimostrato che il gossipolo influenza la crescita, l'assunzione di mangime, l'efficienza riproduttiva, il numero di eritrociti e l'attività di trasporto dell'ossigeno, l'efficienza respiratoria e la funzionalità epatica. L'acido fitico è un altro fattore anti-nutrizionale che limita l'utilizzo di farina di semi di cotone nelle diete di acquacoltura. Ad esempio, i fitati, agiscono come forti chelanti formando complessi, che possono ridurre la biodisponibilità di proteine e minerali, come zinco, manganese, rame, molibdeno, calcio, magnesio e ferro. Inoltre, è stato dimostrato come gli acidi grassi ciclopropanoici (CFA), presenti in tutte le varietà di farina e di semi di cotone, causano lesioni ed elevata concentrazione di acidi grassi saturi nel fegato nella trota iridea. I CFA sono potenti agenti cancerogeni se somministrati in combinazione con aflatossine per la trota iridea e il salmone rosso (Kumar et al. 2014).

**Mais.** Il mais per la sua alta produttività, l'elevato valore nutritivo e la possibilità di raccolta in diverse forme, costituisce una base alimentare di fondamentale importanza. In

alcuni pesci carnivori, come la cobia, la spigola giapponese e l'orata, è stato dimostrato che la farina di mais sostituisce con successo più della metà delle proteine della farina di pesce utilizzate nella dieta senza alcun effetto negativo sulle prestazioni della crescita (Yiwen et al. 2013; Men et al. 2014). Tuttavia, tale ingrediente non può essere efficacemente utilizzato dal rombo (*Scophthalmus maximus*), che è considerato il più importante pesce piatto allevato in Europa e Asia con una produzione globale di circa 70.000 tonnellate all'anno. Pare che sia la bassa digeribilità il fattore chiave che limita l'utilizzo della farina di mais da parte del rombo, ma le sue cause non sono ancora ben chiare. Inoltre, ha influenzato negativamente la salute intestinale del rombo inducendo enterite e diminuendo l'immunità intestinale e la capacità antiossidante, che potrebbe essere uno dei motivi per cui l'utilizzo di tale prodotto è limitato. Infiammazione, alterazioni della struttura dei microvilli ed una crescente espressione dei geni infiammatori delle citochinine sono state altre cause.

Un ulteriore svantaggio lo si riscontra nel contenuto squilibrato di amminoacidi da parte delle farine di mais, come fonte proteica rispetto le farine di pesce (Bai et al. 2019).

**Colza.** La farina di colza, ottenuta dopo l'estrazione dell'olio, è un'ottima fonte proteica (con un contenuto variabile tra il 32 e il 45%), amminoacidica ed è ricca di minerali, vitamine e microelementi. Tuttavia, la farina di colza presenta fattori anti-nutrizionali, fibre, tannini e acido fitico che ne limitano l'utilizzo. La digeribilità della sostanza secca di questo ingrediente risulta essere bassa (56,2-60,4%), probabilmente a causa dell'elevato contenuto di fibre del prodotto e del suo livello relativamente alto di carboidrati complessi. Ad esempio, uno studio sulla specie *Oreochromis aureus* ha indicato che fino al 19.02% di farina di colza può essere utilizzato per la sostituzione del 30% di farina di soia senza

causare danni significativi a livello di crescita, conversione di mangimi e utilizzo di proteine (Huang et al. 2007; Cheng et al. 2010; Zhou and Yue 2010).

Se da una parte gli oli vegetali sembrano fornire alternative valide a farine e oli di pesce, dall'altra l'assenza di LC-PUFA può compromettere la fisiologia dei pesci e le prestazioni di crescita creando una diminuzione del contenuto di LC-PUFA n-3.

### *1.3.2 Sottoprodotti di origine animale (PAPs)*

Dopo 12 anni di divieti, con il regolamento (UE) N.56/2013 è stata reintrodotta la possibilità di utilizzo di farine animali (pollo, maiale) in acquacoltura. Tale impiego era stato vietato a seguito della crisi dell'encefalopatia spongiforme bovina (Bse), che vide oltre 180 mila casi accertati. L'utilizzo di proteine animali trasformate è limitato a maiali, pollame e pesci d'allevamento. In un'ottica di economia circolare, l'utilizzo di farina di carne, ottenuta da scarti di macellazione, fornisce un ulteriore aiuto nel loro smaltimento. Le PAP (Processed Animal Protein) di origine terrestre derivate da farina di carne e ossa, farina di piume o sottoprodotti di lavorazione del pollame, hanno un elevato tenore sia proteico che lipidico. Inoltre, presentano un buon profilo amminoacidico (lisina, arginina, istidina), hanno bilanciati valori di micronutrienti e non presentano fattori anti-nutrizionali. Ad esempio, nel 2016 è stato condotto uno studio per valutare la sostituzione di farina di pesce con farina di carne e farina di ossa nelle diete somministrate ai giovanili di orata (*Sparus aurata*). Una dieta di controllo (100% farina di pesce) e due diete con diversa inclusione (50% e 75%) di farina di ossa e farina di carne sono state utilizzate. Durante l'esperimento le performance di crescita sono diminuite nei pesci alimentati con l'inclusione di farina di carne e farina di ossa del 75%, mentre simili risultati sono stati ottenuti tra dieta di controllo e dieta con inclusione del 50%. Differenze nella composizione amminoacidica non sono state osservate ad eccezione di una minore

biodisponibilità di metionina nei pesci alimentati con inclusione maggiore. I risultati indicano che la farina di pesce può essere sostituita sino al 50% da farina di ossa e farina di carne nelle diete per i giovanili di *Sparus aurata* senza effetti negativi sulle prestazioni di crescita e sull'utilizzo dei mangimi (Moutinho et al. 2017).

Precedenti studi, avevano mostrato che le farine di pesce potevano essere sostituite da farine di carne o di ossa fino al 40-50% senza influenzare negativamente sulle prestazioni dei pesci. Esempi ne sono *Seriola quinqueradiata* (Sato and Kikuchi 1997) e *Bidyanus bidyanus* (Hunter et al. 2000). C'è, però, da sottolineare la mancanza di alcuni amminoacidi essenziali come la metionina, la qualità nutrizionale che dipende dai processi di lavorazione e di conservazione e la ridotta digeribilità.

### 1.3.3 Microalghe

Diverse sono le specie microalgali utilizzate in allevamento, indispensabili per le sostanze nutritive che possiedono come lipidi, proteine e prodotti bioattivi. Ognuna presenta un differente profilo nutrizionale, oltre che diversi pigmenti e dimensioni, offrendo soluzioni innovative per lo sviluppo economico ed ecologico in linea con gli obiettivi di sostenibilità (Benemann 1992; Dineshbabu et al. 2019).

Dal punto di vista ambientale, la produzione microalgale può supportare una significativa espansione globale, dal momento che possono essere coltivate utilizzando sistemi aperti, come ad esempio stagni, o sistemi chiusi quali i fotobioreattori. Le principali microalghe utilizzate, in toto o come additivo alimentare o per colorare la carne dei salmoni, sono *Nannochloropsis oculata* (2-4  $\mu\text{m}$ ), *Chlorella* (10  $\mu\text{m}$ ), *Isochrysis* (8-10  $\mu\text{m}$ ) e *Rhodomonas parthica* (20  $\mu\text{m}$ ). Possono crescere in una vasta gamma di habitat, dividersi rapidamente con poche esigenze nutritive, produrre pigmenti, sostanze fondamentali per la crescita e metaboliti secondari come antiossidanti, antinfiammatori, antimicrobici e

resistere meglio alle malattie. La combinazione di diverse specie di alghe fornisce agli animali un'alimentazione più equilibrata e ne migliora la crescita. Di fondamentale importanza è il contenuto di acidi grassi polinsaturi come l'acido arachidonico (AA), l'acido docosaesaenoico (DHA) o l'acido eicosapentaenoico (EPA). Microalghe ricche di PUFA come *Pavlova* sp. e *Isochrysis* sp. possono essere somministrate allo zooplancton per arricchirlo in DHA (Hemaiswarya et al. 2011; Yaakob et al. 2014; Yamold et al. 2019). Le microalghe sono state utilizzate in prodotti come AlgaMac 2000 e Docosa Gold che contengono il 5-15% del loro peso a secco come DHA, hanno prodotto livelli simili di arricchimento del DHA nello zooplancton rispetto agli oli commerciali e producono anche rapporti DHA-EPA compresi tra 1 e 2, considerati favorevoli per l'alimentazione delle larve di pesce (Hemaiswarya et al. 2011). L'utilizzo della biomassa di *Arthrospira* sp., *Chlorella* sp., *Scenedesmus* sp. e *Nanofrustulum* sp. sono state testate come importanti fonti proteiche supplementari o sostituti parziali per la farina di pesce. Ad esempio, la trota iridea *Oncorhynchus mykiss* ha registrato il massimo aumento di peso nel momento in cui la farina di pesce è stata sostituita con il 7,5% di *Arthrospira*, invece, *Oplegnathus fasciatus* con una sola inclusione del 5% nella dieta a base di farina di pesce ha registrato un significativo aumento di peso ed una miglior efficienza proteica. Le microalghe, essendo ricche di vitamine, minerali, bioattivi e acidi grassi, risultano quindi eccellenti additivi nutritivi e integratori ad alto valore. Ad esempio, molte specie d'allevamento di acqua dolce come la tilapia del Nilo, la carpa Rohu e le principali specie di gamberi si nutrono principalmente di alghe e crescono in acqua detta "acqua verde" (Neori 2014). Inoltre, uno studio condotto in Egitto, ha dimostrato come l'utilizzo di *Chlorella* spp. e *Scenedesmus* spp. possono sostituire la farina di pesce fino al 50% nella dieta della tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*) (Badwy et al. 2008). Sino ad ora gli svantaggi segnalati

hanno incluso: sedimentazione, degradazione batterica, disgregazione delle alghe secche e bassa digeribilità della parete cellulare, ma soprattutto l'elevato costo di produzione.

#### ***1.4 Insetti: possibile fonte alternativa per i pesci d'allevamento***

È ormai noto come gli insetti siano considerati una fonte proteica alternativa, promettenti per il settore mangimistico. Sono le proprietà nutritive, la ridotta competitività con l'alimentazione umana e il basso impatto ambientale che fanno assumere loro un elevato potenziale su cui contare. Inoltre il successo e la diversità degli insetti sono dovuti al breve ciclo vitale, alla capacità di colonizzare nuove nicchie e di nutrirsi di quasi tutte le specie di piante e animali e alla capacità di innescare una risposta immunitaria dannosa (Kelemu et al. 2015). Ad oggi non è ancora presente uno standard industriale, ma i ricercatori hanno ormai focalizzato i loro studi su alcuni insetti dal ciclo di vita breve e che possono trasformare scarti organici in biomassa di ottima qualità con elevati tassi di efficienza. Inoltre, sono organismi facili da allevare in grado di abbattere i costi dei mangimi, ma questi non devono, ovviamente, appartenere a specie patogene o essere vettori di patogeni per uomini e animali. Il regolamento (UE) 2017/893 della Commissione del 24 maggio 2017 ha sancito la possibilità di utilizzare farine di insetti come mangimi per pesci d'allevamento. Diversi stati membri hanno iniziato l'allevamento di insetti per produrre proteine animali come soluzione alternativa alle fonti convenzionali, per cercare di ridurre il sovra-sfruttamento di mari e oceani. La presente autorizzazione è limitata ad un elenco di sette specie, che devono essere alimentate con substrati contenenti "mangimi di qualità" (Muller et al. 2017). Questi sono: *Hermetia illucens* (HI), *Musca domestica* (MD), *Tenebrio molitor* (TM), *Alphitobius diaperinus*, *Acheta domesticus*, *Grylloides sigillatus*, *Gryllus assimilis*.

La sicurezza microbiologica, i cambiamenti delle proprietà organolettiche delle specie allevate e la possibile introduzione di nuovi allergeni rappresentano alcuni dei possibili ostacoli che potrebbero verificarsi, ma i vantaggi sembrano essere di gran lunga maggiori. L'allevamento di insetti genererebbe miglioramenti e benefici da non sottovalutare riguardanti lo sfruttamento del suolo, il consumo di acqua e l'emissione di bassi livelli di gas serra rappresentando solo l'1% delle emissioni dei ruminanti (Smetana et al. 2019). Gli insetti, inoltre, presentano un'alta efficienza di conversione nutrizionale: essendo animali ectotermi, necessitando di 2 Kg di mangime per produrre un incremento di peso corporeo pari ad 1 Kg; al contrario, un bovino necessiterebbe di 8 Kg di cibo per aumentare di 1 Kg di peso corporeo. Essendo delle specie che si riproducono velocemente in uno spazio relativamente piccolo, senza necessitare di grandi distese di terreno, possono vivere ovunque ed essere allevati anche su scarti alimentari (van Huis et al. 2013). Alcune specie sono allevate su sottoprodotti di terra come verdure, fanghi fecali e rifiuti urbani. Queste alternative d'allevamento richiedono, però, lo sviluppo di strutture di coltura di massa automatizzate e convenienti che forniscano un prodotto affidabile, stabile e sicuro (van Huis et al. 2013; Helena et al. 2015). Infatti, secondo il regolamento (UE) 1069/2009, solo alcuni substrati possono essere utilizzati per allevare insetti, tra cui quelli di origine vegetale e di origine animale come latte, uova e alcuni dei loro prodotti derivati. I sottoprodotti biologici terrestri vengono così convertiti in modo efficiente in biomassa nutriente, che, a sua volta, può fornire ingredienti innovativi e sostenibili per l'alimentazione di specie ittiche. Anche se il profilo nutrizionale degli insetti è fortemente dipendente dalla composizione del loro mangime, generalmente mostrano un contenuto proteico che varia dal 40 al 75% a seconda della specie e dello stadio del loro ciclo vitale. Presentano un buon profilo amminoacidico con alti contenuti di fenilalanina, tirosina e

metionina ed un contenuto di grassi variabile (Arru et al. 2019). I carboidrati sono presenti sotto forma di chitina nell'esoscheletro e la loro percentuale varia dall'1 al 29%. Per quanto riguarda il profilo degli acidi grassi è da verificare se gli insetti hanno il potenziale di sostituire o almeno ridurre la quantità di farina di pesce ed olio di pesce nei mangimi destinati agli allevamenti, considerando la mancanza di acidi grassi omega-3 altamente insaturi, acido eicosapentaenoico (EPA) e acido docosaesaenoico (DHA) (De Marco et al. 2015; Mazurkiewicz et al. 2018; Cardinaletti et al. 2019).

Tuttavia, nonostante questa mancanza, è noto che è possibile manipolare il contenuto lipidico e di acidi grassi delle larve di insetti attraverso l'esposizione a mangimi contenenti PUFAs, così da ottenere un arricchimento di acidi grassi omega-3 (Barroso et al. 2017).

Tra i tanti insetti studiati una delle specie di maggior interesse è la mosca soldato nera, *Hermetia illucens*, specie estremamente resistente in grado di affrontare condizioni ambientali difficili come siccità, carenza di cibo o carenza di ossigeno. Si nutre di scarti, in particolare rifiuti organici. Le larve possono essere coltivate su numerosi substrati, molti dei quali sono considerati prodotti agricoli o di scarto agricolo (G. L. Newton et al. 2007; St-Hilaire et al. 2007; Spranghers et al. 2017). Nonostante l'incorporazione di tali substrati potrebbe migliorare gli aspetti di sostenibilità della coltivazione di *Hermetia illucens* e rafforzare il concetto di economia circolare (Smetana et al. 2016), è improbabile che attualmente i rifiuti o il letame agroalimentare siano ammessi come substrato nell'UE. Tuttavia, è bene ricordare che ogni anno l'industria del caffè produce come sottoprodotto oltre 200.000 tonnellate di pelle di caffè che può rappresentare un substrato adeguato per la produzione di insetti (Mussatto et al. 2011). Le larve di *Hermetia illucens* (HI) presentano circa il 42% di proteine, la composizione di amminoacidi è paragonabile a quella della farina di soia (Barroso et al. 2014) ed è simile a quella della farina di pesce (Muller et al.

2017), mentre il profilo degli acidi grassi (FA) è estremamente diverso: HI è ricca di acidi grassi saturi (SFAs), ma carente di acidi grassi polinsaturi (PUFAs) (Barroso et al. 2014). La quantità di grasso è estremamente variabile e dipende dal tipo di dieta: per le larve nutrite con scarti di pollame sono stati riportati valori del 15-25%, valori del 28% con scarti di suino e 42-49% per larve nutrite su rifiuti organici (Makkar et al. 2014).

#### *1.4.1 Problematiche degli insetti*

Le caratteristiche nutrizionali degli insetti dipende dal loro stadio vitale, dal loro habitat e dalla dieta. Le problematiche associate agli insetti, che ad oggi limitano l'inclusione di farina di HI nei mangimi destinati all'acquacoltura, sono la composizione di acidi grassi e la chitina.

**Acidi Grassi.** L'acido alfa-linolenico (ALA; 18:3 n-3) e l'acido linoleico (LA; 18:2 n-6) sono definiti acidi grassi essenziali (EFA) nelle diete dei vertebrati per la loro incapacità di produrli. Questi EFA possono essere desaturati e allungati per formare gli HUFA C20, C22, acido arachidonico (AA; 20:4 n-6), acido eicosapentaenoico (EPA; 20:5 n-3) e acido docosaesaenoico (DHA; 22:6 n-3). Tali conversioni dipendono, però, dalla presenza e dall'attività di due enzimi: elongasi e desaturasi, che anche i pesci marini hanno, ma mancano dell'isoforma capace di sintetizzare i PUFAs. Gli acidi grassi essenziali per il loro sviluppo e la loro crescita, quali EPA e DHA, provengono dall'ambiente marino e sono, infatti, trasmessi dal fitoplancton ai pesci tramite lo zooplancton. Invece, i pesci d'acqua dolce si nutrono di prede ricche di LA (18:2 n-6) e ALA (18:3 n-3) e successivamente li convertono in HUFA.

Il profilo lipidico degli insetti risulta ricco di acidi grassi saturi, ma povero di polinsaturi e rappresenta dunque una grande limitazione nell'inclusione nei mangimi destinati soprattutto ai pesci d'allevamento marini.

Una pronta soluzione è stata identificata con l'arricchimento del substrato di crescita degli insetti. Inoltre, se nella dieta sono incluse fonti ricche di frattaglie di pesce o altre fonti di acidi grassi polinsaturi omega-3 (PUFA), il contenuto di omega-3 PUFA larvale aumenterà, rendendolo più adatto a formulazioni di diete per pesci marini (St-Hilaire et al. 2007; Barroso et al. 2017).

**Chitina.** La chitina è uno dei principali componenti dell'esoscheletro di insetti e crostacei. Dopo la cellulosa è il più abbondante biopolimero presente in natura. È un polisaccaride costituito da più unità di N-acetilglucosamina unite con legami  $\beta$ -(1,4). A causa del forte legame delle proteine nelle fibre di chitina (stabilizzate da legami idrogeno tra gruppi ammina e carbonile) e dei cambiamenti della chitina in base allo stadio di vita, le stime delle quantità di chitina e di proteine non digeribili nelle colture di insetti sono variabili.

La digeribilità dipende da quanto gli amminoacidi sono legati alla chitina o alla scleroproteina che è presente principalmente nelle cuticole degli insetti adulti.

Tuttavia, tali proteine possono essere disponibili grazie all'attività enzimatica della chitinasi e della  $\beta$ -N-acetilglucosaminidasi, che catalizzano l'idrolisi del legame glicosidico  $\beta$ -(1,4) (Mazurkiewicz et al. 2018). Nonostante tali attività enzimatiche tendono ad essere associate alle specie che consumano prede con esoscheletro chitinoso, l'attività della chitinasi è stata rilevata nel sangue, nel plasma e nel tratto intestinale di alcuni pesci, indipendentemente dalle abitudini alimentari. Ad esempio, è stato documentato come il cobia, *Rachycentron canadum*, sia in grado di digerire la chitina da gamberi o farina di granchio. Anche nel merluzzo bianco (*Gadus morhua*), la chitinasi è stata trovata nello stomaco e nel tratto intestinale, ma non è stata segnalata attività batterica chitinolitica. Vi sono anche prove della capacità che alcuni pesci hanno di produrre chitinasi intestinali endogene (Danulat 1986). Tuttavia, uno studio condotto sui giovanili di

rombo, *Psetta maxima* non è riuscito a rilevare alcuna attività delle chitinasi ed è stato sottolineato un peggioramento degli indici di performance e dell'assunzione di cibo a livelli di inclusione superiori al 33% di HI. La presenza della chitina potrebbe aver influenzato la disponibilità e la digeribilità dei nutrienti.

Varie ricerche scientifiche condotte sulle specie di pesci carnivori più allevati come salmone, trota, spigola e orata concordano dicendo che, sostituendo fino a circa il 25% della farina di pesce con farina di insetti, le performance di crescita del pesce non vengono ridotte (Renna et al. 2017; Magalhães et al. 2017). Come dimostrato da ricerche condotte su topi, si ritiene che la chitina abbia proprietà anti-virali, anti-tumorali ed effetti positivi sul sistema immunitario degli animali. Studi condotti su trota e carpa alimentate con diete a base di insetti hanno evidenziato effetti immunostimolanti della chitina, se somministrata a basse concentrazioni. Al contrario, alte concentrazioni di chitina, provocavano infiammazione del tratto intestinale. La sua scarsa digeribilità è associata ad una serie di proteine, lipidi e altre molecole che compongono la cuticola degli insetti. Tale matrice rende difficile l'accesso delle chitinasi ed altri enzimi andando a ridurre l'azione di catalisi del legame glicosidico  $\beta$ -(1,4). Ciò potrebbe spiegare la riduzione della crescita dei pesci ottenuta da numerosi esperimenti sull'inclusione di insetti in varie diete (M. Henry et al. 2015). Il maggior problema della chitina, oltre alla digeribilità, è il suo effetto negativo sul tratto digerente.

### ***1.5 Effetti fisiologici della farina d'insetto sui teleostei***

È stato accertato che gli insetti forniscono proteine di alta qualità, sono ricchi in fibre e micronutrienti come rame, ferro, magnesio, fosforo e zinco (FAO 2014). Molti nutrienti sono paragonabili a quelli provenienti da carne e pesce, inoltre, il rischio di trasmissione di

zoonosi all'uomo è basso (van Huis et al. 2013). Rispetto ad altri insetti, il vantaggio di *Hermetia illucens* è la capacità di convertire i rifiuti in cibo, riducendo l'inquinamento e i costi, inoltre sotto un punto di vista nutrizionale, rappresenta una valida alternativa alle farine di pesce nella formulazione di mangimi. Molteplici gli esperimenti che hanno mostrato come le larve di questo insetto possono totalmente o parzialmente sostituire la farina di pesce nelle diete ittiche. Come visto in letteratura, uno dei primi studi risale al 1981 e questo ha messo in evidenza come la somministrazione di larve, insieme ad una dieta commerciale, mostrava simili performance a livello di peso corporeo e lunghezza rispetto alla dieta di controllo su pesce gatto maculato (*Ictalurus punctatus*) e tilapia (*Oreochromis aureus*) (Bondari and Sheppard 1981). Invece, diete di larve tritate di HI100% su pesce gatto e tilapia non hanno permesso una buona crescita, forse a causa del basso apporto proteico nella dieta. Nel 2005, Newton et al. hanno dimostrato che una percentuale di inclusione di HI del 30% in sostituzione alla farina di pesce nel pesce gatto maculato, non ha mostrato differenze statisticamente significative sulla crescita. Altri studi sono stati condotti da Sealey et al. sulla specie *Oncorhynchus mykiss* per testare gli effetti di diete a base di HI fatte crescere in condizioni diverse. La trota iridea alimentata con farina di HI allevata su di un substrato arricchito di frattaglie di pesce era cresciuta molto più velocemente rispetto all'altro gruppo alimentato con HI allevato senza arricchimento. In particolare, la prima dieta conteneva una maggiore quantità di acido laurico che è in grado di aumentare l'ossidazione degli acidi grassi, utilizzandoli come substrati energetici e questo potrebbe aver permesso di migliorare le prestazioni dei pesci. Le maggiori percentuali di acido laurico in *Hermetia illucens* sono state evidenziate, nel 2016, da Ushakova et al.; lo studio mette in evidenza la composizione lipidica delle larve di HI sottolineando l'elevata percentuale di acido laurico e dei suoi esteri. Sia negli animali che

nell'uomo, l'acido laurico viene convertito in monolaurina, monogliceride dalle proprietà antivirali, antibatteriche e antifungine. Inoltre, elevate concentrazioni di acido laurico hanno effetti positivi sul tratto digerente mitigando le eventuali infiammazioni dovute ad un aumento di chitina (Zarantoniello et al. 2019).

È stato osservato che alti livelli di inclusione di HI riducono le performance di crescita, come nel caso studio di *Psetta maxima* in cui inclusioni superiori al 33% hanno influenzato negativamente le prestazioni di crescita ed evidenziato una diminuzione di lipidi (Kroeckel et al. 2012). Nel pesce gatto dalla testa gialla (*Pelteobagrus fulvidraco*) la sostituzione del 25% della farina di pesce con farina di *Hermetia illucens* non ha prodotto differenze significative nell'indice di crescita e nell'indice di immunità rispetto al gruppo di controllo.

Sebbene la maggior parte degli studi sia stata fatta su specie d'acqua dolce, negli ultimi anni le ricerche si sono concentrate anche su pesci marini. Ad esempio, risultati di Magalhães et al. (2017) hanno indicato che *Hermetia illucens* può essere inclusa nelle diete per giovanili di spigola europea (*Dicentrarchus labrax*) fino al 19,5% senza effetti negativi sulla crescita, sull'utilizzo dei mangimi o sulla digeribilità, nonostante sia stata evidenziata una piccola carenza di lisina e metionina.

Visti gli esempi sopra riportati è stato dimostrato che gli insetti possono essere inclusi con successo nelle diete dei pesci come sostituto della farina di pesce. Ad oggi è possibile includere una percentuale di *Hermetia illucens* fino al 30-40% senza provocare effetti negativi sulla salute dei pesci (Kroeckel et al. 2012; Magalhães et al. 2017; Stadtlander et al. 2017; Barragan-Fonseca et al. 2018; Secci et al. 2019).

## 1.6 Valutazione benessere animale

Una serie di marker molecolari coinvolti nella crescita, nella risposta allo stress, nell'appetito e nella risposta immunitaria sono stati proposti come validi strumenti per rilevare risposte fisiologiche nei pesci alimentati con nuove diete.

### 1.6.1 Fattori di crescita

A partire dall'ipotalamo è prodotto l'ormone di rilascio della somatotropina o GHRH, che stimola la ghiandola pituitaria a produrre l'ormone della crescita (GH). I recettori GH sono principalmente presenti nel fegato. Una volta che il GH si lega ai propri recettori, gli epatociti producono il fattore di crescita insulino-simile (IGF-I), coinvolto nella crescita somatica ed in diversi processi cellulari. Nei pesci ossei sono presenti due tipologie di fattori di crescita: IGF-I e IGF-II

L'IGF-II, a differenza dell'IGF-I, è maggiormente attiva in stadi larvali e giovanili. Ad ogni modo entrambi sono coinvolti sia nella crescita somatica che in diversi schemi metabolici tanto che il loro mRNA è stato rilevato anche nello stomaco e nell'intestino. Le diverse diete cui gli organismi sono sottoposti possono far variare le performance di crescita, andando ad influenzare il sistema IGF. Ad esempio, studi fatti su giovani orate (*Sparus aurata*) nutrite con diete aventi sostituzione parziale o totale di farina di pesce, con fonti alternative di origine vegetale, hanno evidenziato una diminuzione del peso corporeo ed una minore assunzione di mangime. Allo stesso tempo, è stata osservata una diminuzione dei livelli di mRNA di IGF-I che conferma, a livello molecolare, la riduzione di crescita evidenziata dalla misura del peso corporeo (Mingarro and Caldich-giner 2004). Un'altra molecola coinvolta nella regolazione della crescita è la miostatina, una proteina composta da due subunità identiche. La miostatina appartiene alla superfamiglia delle

proteine dette fattori di crescita trasformanti  $\beta$  (TGF-  $\beta$ ) ed è un fattore che limita la crescita muscolare negli esseri viventi.

### *1.6.2 Appetito*

La leptina e la grelina sono due importanti molecole definite come sensori di livello energetico che controllano parte del metabolismo. Nei mammiferi la leptina, o obestatina, è prodotta dal tessuto adiposo, mentre nei teleostei la produzione è da attribuire al tessuto adiposo o al tratto digerente. La leptina è un ormone proteico che agisce nella regolazione del bilancio delle riserve energetiche stimolando il senso di sazietà. Al contrario, la grelina è una molecola che promuove l'appetito. Grelina e leptina sono dunque segnali che servono a comunicare rispettivamente appetito o sazietà. Ulteriori molecole coinvolte nel controllo dell'assunzione di cibo possono essere distinte in oressizzanti ed anoressizzanti. Tra le prime è possibile annoverare gli endocannabinoidi ed il neuropeptide Y (NPY), al contrario MC4R ha un'azione anoressizzante.

Gli endocannabinoidi sono molecole che possono essere prodotte in modo endogeno ed i recettori di membrana più importanti sono CB1, CB2, GPR55 e TRPV1. In particolare, il recettore CB1 quando stimolato induce l'appetito. NPY è un neuropeptide di 36 amminoacidi appartenente alla famiglia dei polipeptidi pancreatici attualmente considerato il più potente stimolatore dell'appetito. L'mRNA di NPY è maggiormente espresso nel cervello dei pesci, ma può essere anche rilevato nei reni. Infine MC4R è un recettore associato alla proteina G, implicato nel percorso del segnale ipotalamico leptina-melanocortina. L'attivazione di MC4R contribuisce a mantenere l'omeostasi energetica e si associa alla soppressione della fame.

### 1.6.3 Risposta immunitaria

Il TNF- $\alpha$  (Tumor Necrosis Factor) è una citochina coinvolta nell'infiammazione sistemica, apoptosi e proliferazione cellulare. Il suo principale ruolo è nella regolazione delle cellule del sistema immunitario. Attraverso endotossine, molecole patogene o vaccinazioni, il TNF- $\alpha$  viene attivato e per tale motivo è stato proposto come marker per monitorare, quanto più correttamente possibile, la salute dei pesci e l'efficacia di vaccinazioni. Ulteriori citochine secrete da vari tipi di cellule del sistema immunitario sono le interleuchine, in particolare IL-1 e IL-10 (con funzione anti-infiammatoria).

### 1.6.4 Stress

Con il termine HSP70 si indica una famiglia di proteine, ben conservate evolutivamente, le quali sono indotte a rispondere in condizioni di stress o proteggere la cellula in caso di presenza di metaboliti. Scoperte negli anni '60 in modo del tutto casuale, quello che si mise in evidenza fu un'elevata attività trascrizionale scatenata dal calore, di qualche proteina sconosciuta, osservata su *Drosophila*, che era stata incubata ad alte temperature; per tale motivo vennero chiamate "Heat Shock Protein".

La maggior parte degli studi ha dimostrato una correlazione tra l'aumento dei livelli di proteine da shock termico e l'esposizione a fattori di stress, come improvvisi cambiamenti ambientali. Molto probabilmente la risposta allo stress ha un ruolo di miglioramento della salute dei pesci e della loro sopravvivenza, svolgendo un ruolo centrale nell'omeostasi cellulare (Yamashita et al. 2010).

Inoltre, nel momento in cui si ha un elevato valore di stress, si osserva anche un alto livello di cortisolo. Nell'organismo sono presenti ormoni che collegano la presenza di un agente stressante esterno e la risposta che deve essere attivata. Lo stress è percepito attraverso delle molecole ed il punto di partenza è l'ipotalamo. Qui è prodotto il CRH (ormone che

promuove il rilascio di corticotropina), che attiva l'ipofisi, zona dove sono presenti sia le cellule gonadotrope che quelle coinvolte nella risposta dello stress. A questo punto c'è produzione di ACTH, che colpisce l'interreene producendo cortisolo. L'organismo risponderà allo stress. Il cortisolo, dunque, svolge un ruolo chiave nell'adattamento allo stress ed esercita la sua azione a livello cellulare legando il recettore dei glucocorticoidi (GR).

## 2 Scopo della tesi

Il profilo lipidico degli insetti rappresenta il maggiore limite riguardo la loro inclusione nella formulazione di diete destinate al settore dell'acquacoltura. A fronte di ciò lo scopo del presente studio è quello di arricchire il substrato di crescita di *Hermetia illucens* con una fonte di PUFAs al fine di migliorare il profilo lipidico degli insetti. Nello specifico, i mangimi oggetto di studio sono a base di farina di insetto (*Hermetia illucens*) la cui produzione ha sfruttato sottoprodotti organici industriali basandosi sul concetto di sostenibilità e di economia circolare.

Le larve di *Hermetia illucens* sono state allevate su scarti della torrefazione del caffè arricchiti con un 10% di *Schizochytrium sp.* al fine di migliorarne il profilo lipidico. La farina di insetti così ottenuta è stata utilizzata per la formulazione di 5 diete isolipidiche, isoproteiche ed isoenergetiche contenenti rispettivamente 0, 25, 50, 75 e 100% di HI rispetto alla farina di pesce. I mangimi sono stati somministrati a larve di zebrafish (*Danio rerio*) per un periodo di 21 giorni durante lo sviluppo larvale di zebrafish e sono state studiate le risposte dei pesci alle nuove diete attraverso un approccio multidisciplinare che integra dati biometrici, istologici, spettroscopici e studi di biologia molecolare.

### 3 Materiali e metodi

#### 3.1 Modelli sperimentali

##### 3.1.1 Zebrafish (*Danio rerio*)

Il *Danio rerio* è un piccolo pesce d'acqua dolce appartenente alla famiglia dei Ciprinidi e alla sottofamiglia dei Danionini. Proviene dal Medio Oriente, dove è diffuso dal Pakistan al Nepal. Abita laghetti, corsi d'acqua con poca corrente, risaie, canali e ruscelli. È un pesce dal corpo affusolato, compresso lateralmente con la bocca rivolta verso l'alto. Un paio di barbigli scende dal labbro superiore e la livrea ha una colorazione olivastria sul dorso, mentre, il ventre è bianco argenteo. Il corpo presenta (almeno) quattro strisce orizzontali color blu metallizzato, intervallate da strisce bianche. Sono striate come il resto del corpo anche la pinna anale e la pinna caudale; al contrario, quella dorsale è blu con l'orlo bianco. La sua dimensione può arrivare ad un massimo di 6 cm, ma raramente ne raggiunge 4. Le femmine sono più grandi dei maschi con una forma più arrotondata e colori meno vivaci. Generalmente, tale dimorfismo sessuale non fa che accentuarsi, ancor di più, durante il periodo riproduttivo dove la femmina risulta essere decisamente appesantita dalle 300/400 uova che, dopo un vivace corteggiamento del maschio, andrà a deporre. È una specie ovipara, che non attua cure parentali e la fecondazione è esterna. In genere il maschio nuota rapidamente intorno alla femmina per condurla nei pressi del sito di deposizione, fa in modo di allineare i pori genitali e nel momento in cui la femmina espelle le uova, il maschio rilascia lo sperma con cui avverrà la fecondazione. Tale sequenza verrà ripetuta più volte. Dopo un paio di giorni dalla deposizione, le uova schiuderanno. Lo zebrafish è un pesce gregario, vivace, estremamente diffuso negli acquari ed è grazie alla loro capacità di adattamento e l'elevata fecondità che è stato possibile

avere una grande varietà di specie. Per quanto riguarda l'alimentazione, il *Danio rerio* si ciba di larve di gamberetto, crostacei cladoceri e ostracodi, larve di insetto o micro-invertebrati. Accetta mangime secco e congelato.

Ad oggi, tale esemplare è l'animale più adoperato per la sperimentazione perché la sua compatibilità genetica con l'uomo è alta, il suo DNA è stato completamente mappato ed è un pesce molto resistente e rende più semplice le operazioni di manipolazione. Gli embrioni si sviluppano nel giro di pochi giorni; questi essendo trasparenti facilitano, inoltre, l'osservazione di numerosi processi e aspetti biologici inerenti allo studio della biologia dello sviluppo. Allo stadio larvale è in grado di rigenerare tutti i tessuti e conseguentemente, oltre che essere impiegato negli studi di sviluppo, in ambito tossicologico e oncologico, fondamentali sono le ricerche a livello di rigenerazione che vengono fatte su *Danio rerio*.

### 3.1.2 Mosca soldato nera (*Hermetia illucens*, BSF)

La mosca soldato nera (*Hermetia illucens*) è un insetto appartenente all'ordine dei Ditteri e della famiglia Stratiomyidae. Nonostante sia una specie originaria dell'America del Nord, attualmente la sua distribuzione risulta essere in tutte le regioni del mondo comprese tra il 45° parallelo Nord e il 40° parallelo Sud (Makkar et al. 2014). Le larve si rinvencono principalmente negli impianti di compostaggio, smaltimenti di rifiuti o su reflui zootecnici che utilizzano come substrato di crescita. Gli adulti, al contrario, non necessitano di alimentarsi dal momento che non presentano un apparato buccale funzionante e si affidano alle riserve nutritive immagazzinate durante lo stadio larvale. La probabilità di veicolare patologie è dunque minore e ciò rende tale organismo vantaggioso nel campo zootecnico (Sheppard et al. 1994; Kalová and Borkovcová 2013). Lo sviluppo post-embrionale passa attraverso sei differenti stadi (Figura 4) e nel momento in cui sono presenti condizioni

ideali di temperatura e umidità, il ciclo della mosca soldato è sostanzialmente veloce. La durata media dello stadio larvale è di circa 2 mesi, 2 settimane quello pupale e dopo 48 ore l'adulto si accoppia ovodeponendo in pochi giorni. Nel momento in cui avviene il passaggio da pre-pupe ad adulti, questi si allontanano dal substrato di crescita per trovare un luogo asciutto e completare la metamorfosi.

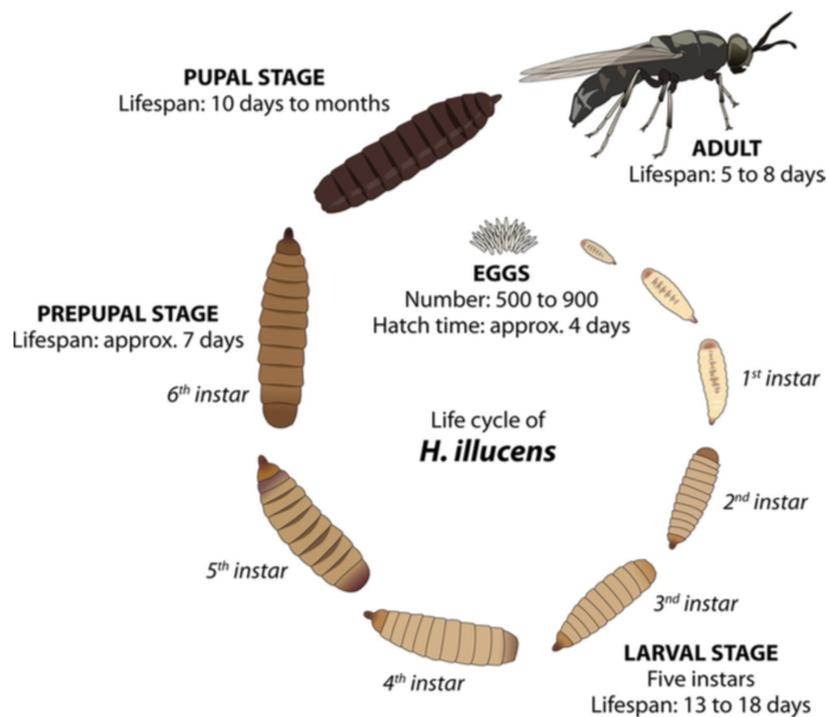


Figura 4. Ciclo vitale di *Hermetia illucens*

*Hermetia illucens* è un insetto, come la maggior parte di quelli appartenenti alla famiglia Stratiomyidae, che interviene nelle prime fasi della decomposizione della materia organica. La scienza forense, le biotecnologie, l'ecologia e la medicina sono solo alcuni dei campi dove le larve di HI possono essere impiegate. Dal punto di vista nutrizionale, la mosca soldato mostra un contenuto proteico e un profilo amminoacidico che rispecchiano quelli della farina e dell'olio di pesce, presentandosi come un ottimo candidato tra le alternative sostenibili. Il suo profilo lipidico, però, mostra una frazione maggiore di acidi grassi saturi

a discapito di un minore contenuto di polinsaturi e rimane una delle principali limitazioni all'inclusione ad alte percentuali nelle diete utilizzabili in acquacoltura. Tuttavia, il profilo degli acidi grassi può essere modificato andando ad alimentare le larve su substrati arricchiti con fonti di HUFA n-3 (Barroso et al. 2017).

### **3.2 Etica**

Le procedure relative agli animali sono state condotte in linea con la legislazione italiana sugli animali da esperimento. Queste sono state approvate dal Comitato Etico dell'Università Politecnica delle Marche (Ancona, Italia) e dal Ministero della Salute italiano (626/2018-PR). Le condizioni di allevamento, applicate durante tutto il periodo dello studio, sono state ottimali (per dettagli vedere la sezione successiva) ed è stata ridotta al minimo la sofferenza degli animali utilizzando un anestetico al momento del campionamento (MS222; Sigma Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA).

### **3.3 Preparazione del substrato di alimentazione degli insetti**

Le larve di *Hermetia illucens* sono state allevate in un substrato formato per la maggior parte da scarti provenienti dalla torrefazione del caffè, composti da coffee silverskin, forniti dall'industria Saccaria Caffè S.R.L. (Marina di Montemarciano, Ancona, Italia). Il sottoprodotto del caffè, con umidità pari al 44%, è stato raccolto e macinato in un robot da cucina Ariete 1769 (De Longhi Appliances Srl, Italia) fino ad ottenere una dimensione delle particelle pari a  $0,4 \pm 2$  mm. Il substrato di crescita degli insetti è stato formulato includendo una percentuale del 10% di *Schizochytrium* sp al sottoprodotto del caffè. La microalga liofilizzata è stata fornita da AlghItaly: Società Agricola S.R.L. (Sommacampagna, VR, Italia).

Per il raggiungimento di un'umidità finale pari a circa il 70% è stata aggiunta una quantità di acqua distillata al substrato di alimentazione degli insetti (Makkar et al. 2014).

### **3.4 Allevamento di insetti**

Gli insetti sono stati allevati all'interno di una camera climatica con temperatura pari a  $27 \pm 1^\circ\text{C}$ , umidità relativa del  $65 \pm 5\%$  (Spranghers et al. 2017) in continua oscurità. Larve di sei giorni, acquistate da Smart Bugs s.s. Ponzano Veneto (TV), Italia, sono state contate a mano e divise in gruppi di 640 larve per replicato ( $n=65$ ) per un totale di 41.600 esemplari. Ogni replicato consisteva di una scatola di plastica (57x38x16 cm) protetta con una garza di cotone a maglia fine e chiusa da un coperchio dotato di fori per la ventilazione di 0,5 cm di diametro (Spranghers et al. 2017). La densità di allevamento era pari a  $0,3 /\text{cm}^2$  (Barragan-Fonseca and Dicke 2018). Ogni larva è stata alimentata con un quantitativo di 100mg/giorno, preparato e aggiunto una volta a settimana (circa 448g per scatola). Le larve di *Hermetia illucens* venivano quotidianamente ispezionate e all'identificazione dello stadio di prepupa, riconosciuto tramite il cambio di colore del tegumento (da bianco a nero), venivano raccolte, lavate, asciugate e conservate a  $-80^\circ\text{C}$ .

### **3.5 Produzione diete ittiche**

Le prepupe di HI sono state liofilizzate, macinate con il mulino ultracentrifugo ZM 1000 (Retsch GmbH, Haan, Germania) e utilizzate per la preparazione delle diete sperimentali. Una dieta di controllo (Hi0) contenente farina di pesce, glutine di grano, concentrati di proteine di piselli e olio di pesce come principali ingredienti, è stata preparata seguendo la formulazione di una dieta standard disponibile in commercio per il modello sperimentale zebrafish (*Danio rerio*) (Zebrafeed, Sparos Ltd, Portogallo). Le diete sperimentali sono state formulate per essere isoproteiche (50%) e isolipidiche (13%). Le diete a base di

insetti sono state preparate includendo livelli graduali di farina di *Hermetia illucens* (25%, 50%, 75% e 100%, indicati rispettivamente come Hi25, Hi50, Hi75 e Hi100) nella formulazione Hi0. Gli ingredienti vegetali convenzionali (concentrato di proteine di piselli e glutine di grano) usati per formulare le diete sperimentali sono stati approssimativamente mantenuti ad un rapporto costante (0,7:1 w:w) in tutte le alimentazioni. In conclusione, tutti gli ingredienti macinati (0,5 mm) e l'olio di pesce sono stati miscelati (Kenwood kMix KMX53 stand Mixer; Kenwood, De Longhi Spa, Treviso, Italia) per 20 minuti e, successivamente, è stata aggiunta acqua alla miscela per ottenere una consistenza adeguata a pellettizzare. I pellet sono stati ottenuti utilizzando un tritacarne da 1 mm ed essiccati a 40°C per 48-72 ore. Le diete ottenute sono state quindi macinate e conservate in sacchetti sottovuoto a -20°C fino al loro utilizzo. I campioni di mangime sono stati analizzati per umidità (AOAC #950.46), proteine grezze, CP (AOAC #920.153) ed estratto di etere (EE; AOAC #991.36) secondo AOAC 2006.

La frazione lipidica totale delle diete di prova è stata estratta usando la miscela di cloroformio-metanolo (2:1 v:v) (Merck KGaA, Darmstadt, Germania) secondo quanto riportato in uno studio fatto nel 1957 (Folch et al. 1957). La formulazione dietetica e la composizione sono mostrate nella Tabella 1.

	Hi0 (CTRL)	Hi25	Hi50	Hi75	Hi100
<b>Ingredienti (g/kg)</b>					
Farina di pesce	470	400	250	110	-
Mix vegetale	220	230	298	385	440
Farina di insetto (HI)	-	150	275	350	460
Farina di frumento	198	172	120	110	72
Olio di pesce	80	51	25	10	-
Lecitina di soia	8	8	8	11	4
Integratori minerali e vitaminici	14	14	14	14	14
Collante	10	10	10	10	10

### **Composizione (%)**

Sostanza secca	97.08 ± 0.06	95.78 ± 0.13	94.93 ± 0.05	93.63 ± 0.05	92.70 ± 0.04
Proteine grezze, CP	51.57 ± 0.13	50.75 ± 2.57	50.39 ± 0.28	51.23 ± 1.49	50.50 ± 3.15
Estratto di etere, EE	14.38 ± 0.64	13.10 ± 0.42	12.93 ± 0.38	13.24 ± 0.46	12.99 ± 0.51
NFE	21.32 ± 0.34	20.82 ± 1.00	20.64 ± 0.55	19.03 ± 0.67	18.47 ± 1.26
Ceneri	9.81 ± 0.25	11.11 ± 0.01	10.97 ± 0.00	10.13 ± 0.06	10.74 ± 0.13

*Tabella 1. Ingredienti (g/kg) e composizione espressa in percentuale delle diete sperimentali utilizzate in questo studio*

### **3.6 Embrioni di zebrafish**

Gli embrioni di zebrafish sono stati mantenuti per 48 ore in un sistema Tecnicplast (Varese, Italia), soggetti a: temperatura di 28°C, pH 7,0, concentrazioni di NO<sub>2</sub> e NH<sub>3</sub> < 0,01 mg/L, concentrazione di NO<sub>3</sub> < 10 mg/L e fotoperiodo di 12L/ 12D. Dopo questo primo periodo gli embrioni, sono stati raccolti, contati allo stereo microscopio (Leica Wild M3B, Leica Microsystems, Nussloch, Germania) e divisi casualmente in cinque gruppi sperimentali (ognuno in triplicato) secondo le cinque diete di prova.

### **3.7 Disegno sperimentale**

Le larve di zebrafish, *Danio rerio*, sono state mantenute in quindici vasche (3 vasche per gruppo sperimentale) da 20L ciascuna. Ogni gruppo sperimentale era composto da 1500 larve (500 larve per vasca). L'acqua delle vasche aveva le stesse caratteristiche fisico-chimiche di quelle dei riproduttori ed era completamente ricambiata 10 volte al giorno da un sistema di gocciolamento (Olivotto et al. 2004). I lati di ciascuna vasca erano coperti da pannelli neri per ridurre il riflesso della luce. Tutte le vasche venivano sifonate due volte al giorno, 30 minuti dopo aver alimentato le larve, per rimuovere l'eccesso di cibo ed eventuali esemplari morti.

Le larve sono state campionate a 20 giorni dopo la deposizione delle uova (day post spawning, dps), eutanizzate con una dose letale di MS222 (1g/L) e correttamente conservate per ulteriori analisi.

### **3.8 Protocollo alimentare**

A partire da 5 dps a 20 dps, le larve di zebrafish sono state alimentate come segue:

- Controllo - Gruppo di controllo alimentato con la dieta Hi0, priva di farina di *Hermetia illucens*
- Hi25: le larve sono state alimentate con una dieta che includeva il 25% di farina di prepupe di HI
- Hi50: le larve sono state alimentate con una dieta che includeva il 50% di farina di prepupe di HI
- Hi75: le larve sono state alimentate con una dieta che includeva il 75% di farina di prepupe di HI
- Hi100: le larve sono state alimentate con una dieta che includeva il 100% di farina di prepupe di HI

Le larve di zebrafish sono state alimentate due volte al giorno con una quantità di mangime pari al 2% del loro peso corporeo. La granulometria del mangime era in relazione alla dimensione dell'apertura boccale delle larve (circa 100-250  $\mu\text{m}$ ). Inoltre, da 5 dps a 10 dps, a tutti i gruppi sperimentali venivano forniti, un'unica volta al mattino, rotiferi della specie *Brachionus plicatilis* (5ind/mL) in accordo con Lawrence et al. 2012.

### **3.9 Biometrie**

Da ogni vasca sono state pescate, in modo del tutto casuale, 5 larve (15 per gruppo sperimentale) all'inizio e alla fine della sperimentazione: alla schiusa (3 dps) e alla fine

dell'esperimento (20 dps). La lunghezza è stata misurata con un calibro (Measy 2000 tipo 5921, Svizzera; precisione: 0,1 mm) ed il peso umido attraverso l'utilizzo di una bilancia analitica OHAUS Explorer (OHAUS Europe GmbH, Greifensee, Svizzera; precisione: 0,1 mg).

A 3 giorni dopo lo spawning, il peso umido è stato misurato su un pool di 5 larve (in triplicato). Per ciascun gruppo sperimentale, il tasso di crescita specifico, Specific Growth Rate (SGR), è stato così calcolato:

$$SGR\% = \left[ \left( \frac{\ln W_f - \ln W_i}{t} \right) \times 100 \right]$$

$W_f$  = peso umido finale,  $W_i$  = peso umido iniziale,  $t$  = numero dei giorni (17).

Il tasso di sopravvivenza delle larve in tutti i gruppi sperimentali è stato dell'85% circa.

### ***3.10 Composizione acidi grassi***

Le diete sperimentali e i campioni di larve sono stati analizzati per valutare la composizione degli acidi grassi. Le diete sono state tritate ed omogeneizzate (omogeneizzatore MZ 4110, DCG Eltronic, Monza, Italia), anche le larve sono state liofilizzate (Edwards EF4, Crawley, Sussex, Inghilterra). Aliquote di 200 mg di ciascun campione sono state aggiunte a 100 µl di standard interno (estere metilico di acido nonadecanoico, 99,6%, Dr. Ehrenstorfer GmbH, Germania), e sono state estratte overnight con il metodo di Folch (Folch, Lees, and Sloane Stanley 1957). Sono state analizzate 3 aliquote per campione.

Tutti gli estratti lipidici sono stati fatti evaporare sotto gas inerte a flusso laminare (N<sub>2</sub>) fino a peso costante e risospesi in 0,5 ml di n-eptano. Gli esteri metilici di acidi grassi (FAME) sono stati preparati secondo (Canonico et al. 2016) utilizzando estere metilico dell'acido nonadecanoico (19:0; Dr. Ehrenstorfer GmbH, Augsburg, Germania) come

standard interno. I FAMES (esteri metilici degli acidi grassi) sono stati determinati da un sistema GC Agilent-6890 (Milano, Italia) accoppiato ad un rivelatore selettivo di massa quadrupolo Agilent-5973N (MSD) (Milano, Italia). Una colonna capillare CPS ANALITICA CC-wax-MS (30m x 0,25mm ID, spessore film 0,25  $\mu$ m) è stata utilizzata per separare FAME. Le condizioni sperimentali e degli strumenti sono state settate per le matrici analizzate secondo (Truzzi et al. 2017; Truzzi et al. 2018). Per ciascuna aliquota di campione analizzata sono state eseguite almeno tre prove su GCMS.

### ***3.11 Istologia***

Per le analisi istologiche sono state prelevate casualmente, a 20 dps, 3 larve per ogni vasca (9 per gruppo sperimentale). Queste sono state mantenute in una soluzione di Bouin (Sigma-Aldrich, Milano, Italia) per 24 ore e conservate ad una temperatura di 4°C.

Successivamente sono stati fatti 3 lavaggi con etanolo al 70%. Ogni lavaggio aveva durata di 10 minuti e le larve sono state conservate nella soluzione di etanolo dell'ultimo passaggio. Il processo di inclusione in paraffina è iniziato con la disidratazione delle larve attraverso soluzioni a concentrazioni crescenti di etanolo (80, 95 e 100%) e due passaggi in Xilene (Bio-Optica, Milano, Italia). Infine le larve sono state incluse in paraffina (Bio-Optica). Le sezioni, di spessore pari a 5  $\mu$ m, ottenute tagliando i blocchi di paraffina con un microtomo (Leica RM2125 RTS, Nussloch, Germania) e colorate con ematossilina-eosina (Sigma-Aldrich, Milano, Italia), sono state osservate al microscopio Zeiss Axio Imager.A2 (Oberkochen, Germania) per studiare il parenchima epatico e la morfologia dell'intestino. Le immagini sono state acquisite per mezzo di una fotocamera digitale a colori combinata AxioCam 503 (Zeiss, Oberkochen, Germania). Inoltre, per accertare l'accumulo di grasso nel fegato, è stata eseguita un'analisi quantitativa su un numero

significativo di sezioni istologiche, prese in triplicato, da ciascun gruppo sperimentale (n=9). Dall'analisi sono stati esclusi i vasi sanguigni. La percentuale di frazione grassa (PFF) riscontrata sulle aree totali dei tessuti è stata calcolata mediante il software ImageJ che imposta un valore soglia omogeneo.

### ***3.12 Analisi FTIR***

A 20 giorni post spawning, quindici larve di zebrafish per gruppo sperimentale (5 per vasca) sono state prelevate casualmente.

I campioni sono stati tritati, omogeneizzati (omogeneizzatore MZ 4110, DCG Eltronic, Monza, Italia) e liofilizzati (Edwards EF4, Crawley, Sussex, Inghilterra) per l'analisi FTIR. Per ciascun gruppo sono state analizzate cinque aliquote da 5 mg ciascuna. L'analisi FTIR è stata eseguita da uno spettrometro GX1 Spectrum dotato di un accessorio U-ATR e di un diamante / cristallo SeZn (Perkin Elmer, Waltham, Massachusetts, USA). Gli spettri IR sono stati acquisiti nella regione spettrale del medio infrarosso (MIR) da 4000 a 800  $\text{cm}^{-1}$  (risoluzione spettrale 4  $\text{cm}^{-1}$ ). Ogni spettro era il risultato di 64 scansioni. Prima di ogni acquisizione del campione, uno spettro di background veniva raccolto sulla superficie pulita del cristallo. Gli spettri IR grezzi sono stati convertiti in assorbanza, sottoposti a correzione della linea di base nel range spettrale 4000-800  $\text{cm}^{-1}$  e normalizzati nello stesso intervallo (pacchetto software OPUS 7.1).

Per tutti i gruppi sperimentali, gli spettri di assorbanza media sono stati calcolati insieme ai loro spettri di deviazione standard (spettro di assorbanza medio  $\pm$  spettri di deviazione standard) e analizzati per identificare i picchi IR più caratteristici (in termini di posizione/numeri d'onda). Quindi, gli spettri di assorbanza media e i loro spettri di deviazione standard sono stati interpolati nelle regioni 3050-2800  $\text{cm}^{-1}$  e 1790-900  $\text{cm}^{-1}$  e

adattati in queste regioni dopo correzione della linea di base e normalizzazione. È stato adottato un algoritmo gaussiano e il numero e la posizione dei picchi sottostanti sono stati definiti dall'analisi della derivata seconda degli spettri (GRAMS / AI 9.1, Galactic Industries, Inc., Salem, NH). Nella regione 3050-2800  $\text{cm}^{-1}$ , sono stati identificati i seguenti picchi sottostanti:  $\sim 3010 \text{ cm}^{-1}$  (frazioni =CH in catene alchiliche lipidiche insature);  $\sim 2959 \text{ cm}^{-1}$  e  $\sim 2872 \text{ cm}^{-1}$  (gruppi  $\text{CH}_3$  in catene alchiliche lipidiche);  $\sim 2925 \text{ cm}^{-1}$  e  $\sim 2854 \text{ cm}^{-1}$  (gruppi  $\text{CH}_2$  in catene alchiliche lipidiche). Nella regione 1790-900  $\text{cm}^{-1}$ , sono stati identificati i seguenti picchi sottostanti:  $\sim 1744 \text{ cm}^{-1}$  (frazione C = O in lipidi e acidi grassi);  $\sim 1639$  e  $\sim 1536 \text{ cm}^{-1}$  (rispettivamente bande di proteine di Amido I e II);  $\sim 1457 \text{ cm}^{-1}$  (catene laterali di proteine);  $\sim 1390 \text{ cm}^{-1}$  (gruppi  $\text{COO}^-$  in aspartato e glutammato);  $\sim 1234 \text{ cm}^{-1}$  (collagene);  $\sim 1157 \text{ cm}^{-1}$  (composti glicosilati);  $\sim 1080 \text{ cm}^{-1}$  (gruppi fosfato) e  $\sim 1055 \text{ cm}^{-1}$  (mucina). Le aree integrate dei picchi più rilevanti sono state calcolate e utilizzate per valutare i seguenti rapporti dell'area della banda: LIP/TBM (che rappresenta la quantità complessiva di lipidi), 1744/LIP (che rappresenta la quantità di acidi grassi rispetto ai lipidi), 2928/LIP (che rappresenta la quantità di acidi grassi saturi rispetto ai lipidi) e 3010/LIP (che rappresenta la quantità di acidi grassi insaturi rispetto a lipidi); PRT/TBM (che rappresenta la quantità complessiva di proteine), 1234/PRT (che rappresenta la quantità di collagene rispetto alle proteine) e 1055/PRT (che rappresenta la quantità di mucina rispetto alle proteine). TBM era la somma delle aree integrate di tutti i picchi nelle regioni 3050-2800  $\text{cm}^{-1}$  e 1790-900  $\text{cm}^{-1}$ ; LIP era la somma delle aree integrate di tutti i picchi nella regione 3050-2800  $\text{cm}^{-1}$ , mentre PRT era la somma delle aree integrate delle bande a 1639 e 1536  $\text{cm}^{-1}$ .

### ***3.13 Analisi molecolari***

#### *3.13.1 Estrazione di RNA e sintesi di cDNA*

L'estrazione di RNA è stata condotta su un pool di 5 larve di zebrafish per ogni vasca (15 per gruppo sperimentale). L'analisi, in particolare, è stata ottimizzata utilizzando il reagente RNazol RT (Sigma-Aldrich, R4533). L'RNA totale estratto è stato eluito in 40µl di acqua priva di RNasi (Qiagen). La concentrazione finale di RNA è stata ricavata da lettura allo spettrofotometro NanoPhotometer P-Class (Implen, München, Germania). L'integrità dell'RNA è stata verificata mediante colorazione GelRed™ di bande di RNA ribosomiale 28S e 18S su gel di agarosio all'1%. L'RNA è stato conservato a -80 ° C fino al momento dell'uso.

Infine, 2 µg di RNA sono stati utilizzati per la sintesi di cDNA, utilizzando il kit di retrotrascrizione (Bio-Rad, Milano, Italia) seguendo le istruzioni del produttore.

#### *3.13.2 Real time PCR*

Le PCR sono state eseguite con SYBER Green in un termociclatore iCQer iQ5 (Bio-Rad Laboratories). Le reazioni (10 µl ognuna) sono state impostate su di una piastra da 96 pozzetti e per ognuna è stata fatta la seguente mix:

- 1 µl di cDNA diluito 1:10
- 5 µl di SYBER Green concentrato come agente intercalante fluorescente
- 3,8 µl di acqua deionizzata, autoclavata e filtrata
- 0,2 µl di primer (F+R) diluiti 1:10

Le quantificazioni relative dell'espressione dei geni coinvolti nella crescita dei pesci (*igf1*, *igf2a* e *mstnb*), risposta allo stress (*nr3c1* e *hsp70.1*), biosintesi degli acidi grassi polinsaturi a lunga catena (*elovl2*, *elovl5* e *fads2*), risposta all'appetito (*ghrl*, *npy*, *cnrl*e

lepa), risposta immunitaria (il1b, il10 e tnfa) e idrolisi enzimatica della chitina (chia.2 e chia.3) sono state eseguite utilizzando arp e rpl13 come geni housekeeping. I dati ottenuti sono stati analizzati utilizzando il software iQ5 versione 2.0 (Bio-Rad) inclusi i file GeneEx Macro iQ5 Conversion e Genex Macro iQ5. Le sequenze di Primer sono state progettate usando Primer3 (210 v. 0.4.0) a partire dalle sequenze di zebrafish disponibili in ZFIN. Le sequenze di Primer utilizzate sono state riportate nella Tabella 2.

<i>Gene</i>	<i>Forward primer (5'- 3')</i>	<i>Reverse primer (5'- 3')</i>	<i>ZFIN ID</i>
<i>igf1</i>	5'-GGCAAATCTCCACGATCTCTAC-3'	5'-CGGTTTCTCTTGTCTCTCTCAG-3'	ZDB-GENE-010607-2
<i>igf2a</i>	5'-GAGTCCCATTCTGTTG-3'	5'-GTGGATTGGGGTTTGATGTG-3'	ZDB-GENE-991111-3
<i>mstnb</i>	5'-GGACTGGACTGCGATGAG-3'	5'-GATGGGTGTGGGATACTTC-3'	ZDB-GENE-990415-165
<i>nr3c1</i>	5'-AGACCTTGGTCCCCTTCACT-3'	5'-CGCCTTTAATCATGGGAGAA-3'	ZDB-GENE-050522-503
<i>hsp70.1</i>	5'-TGTTTCAGTTCTCTGCCGTTG-3'	5'-AAAGCACTGAGGGACGCTAA-3'	ZDB-GENE-990415-91
<i>elovl2</i>	5'-CACTGGACGAAGTTGGTGAA-3'	5'-GTTGAGGACACACCACCAGA-3'	ZDB-GENE-060421-5612
<i>elovl5</i>	5'-TGGATGGGACCGAAATACAT-3'	5'-GTCTCCTCCACTGTGGGTGT-3'	ZDB-GENE-040407-2
<i>fads2</i>	5'-CATCACGCTAAACCCAACA-3'	5'-GGGAGGACCAATGAAGAAGA-3'	ZDB-GENE-011212-1
<i>ghrl</i>	5'-CAGCATGTTTCTGCTCCTGTG-3'	5'TCTTCTGCCACTCTTGGTG-3'	ZDB-GENE-070622-2
<i>npy</i>	5'-GTCTGCTTGGGGACTCTCAC-3'	5'CGGGACTCTGTTTCACCAAT-3'	ZDB-GENE-980526-438
<i>cnr1</i>	5'-AGCAAAAGGAGCAACAGGCA-3'	5'GTTGGTCTGGTACTTTCCTTGAC-3'	ZDB-GENE-040312-3
<i>lepa</i>	5'-CTCCAGTGACGAAGGCAACTT-3'	5'GGGAAGGAGCCGAAATGT-3'	ZDB-GENE-081001-1
<i>il1b</i>	5'-GCTGGGGATGTGGACTTC-3'	5'-GTGGATTGGGGTTTGATGTG-3'	ZDB-GENE-040702-2
<i>il10</i>	5'-ATTTGTGGAGGGCTTTCCTT-3'	5'AGAGCTGTTGGCAGAATGGT-3'	ZDB-GENE-051111-1
<i>tnfa</i>	5'-TTGTGGTGGGGTTTGATG-3'	5'-TTGGGGCATTATTTTGTAAAG-3'	ZDB-GENE-050317-1
<i>chia.2</i>	5'-GGTGCTTGCCACCTTGCCCTT-3'	5'-GGCATGGTTGATCATGGCGAAAGC-3'	ZDB-GENE-040426-2014
<i>chia.3</i>	5'-TCGACCCTTACCTTTCACACACCT-3'	5'-ACACCATGATGGAGAAGTGTGCCGA-3'	ZDB-GENE-040426-2891
<i>arpc1a</i>	5'-CTGAACATCTCGCCCTTCTC-3'	5'-TAGCCGATCTGCAGACACAC-3'	ZDB-GENE-040116-1
<i>rpl13</i>	5'-TCTGGAGGACTGTAAGAGGTATGC-3'	5'-AGACGCACAATCTTGAGAGCAG-3'	ZDB-GENE-031007-1

Tabella 2. Sequenze dei primer utilizzate in questo studio

### 3.14 Analisi statistica

Tutti i dati sono stati analizzati tramite one-way ANOVA utilizzando la dieta come variabile esplicativa. Tutti i test ANOVA sono stati eseguiti dal Tukey post-hoc test. È stato utilizzato il pacchetto software statistico Prism5 (GraphPad Software). Il livello di significatività è stato impostato al 5% ( $p < 0,05$ ) e tutti i risultati sono stati presentati come media  $\pm$  deviazione standard.

## 4 Risultati

### 4.1 Biometrie

I crescenti livelli di inclusione di farina di HI nelle diete, fornite alle larve di zebrafish, hanno determinato in alcuni casi un aumento significativo ( $p < 0.05$ ) del loro tasso di crescita specifico (SGR). In particolare, tra il gruppo di Controllo ( $25.4 \pm 0.7\%$ ) e il gruppo Hi25 ( $25.7 \pm 1.0\%$ ) non sono state rilevate differenze significative ( $p > 0.05$ ). Al contrario, i gruppi Hi50, Hi75 e Hi100 ( $27.6 \pm 0.5$ ,  $27.8 \pm 0.4$ ,  $28.4 \pm 0.3\%$ ) hanno mostrato valori significativamente più alti ( $p < 0.05$ ) rispetto al Controllo e al gruppo Hi25 (Figura 5).

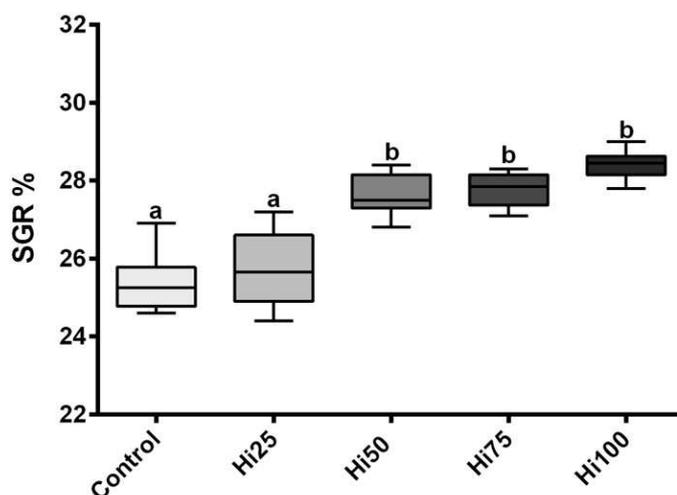


Figura 5. Tasso di crescita specifico (SGR%) delle larve di zebrafish alimentate con le 5 diete: Controllo, Hi25, Hi50, Hi75, Hi100. Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative tra i gruppi sperimentali ( $p < 0.05$ ). I boxplot mostrano valore minimo e valore massimo (whiskers), primo quartile, mediana e terzo quartile (box).

### 4.2 Composizione e contenuto degli acidi grassi

*Diete.* La figura 6a illustra le percentuali degli acidi grassi presenti nelle cinque diete sperimentali. Dal grafico è possibile osservare un aumento significativo ( $p < 0.05$ ) degli acidi grassi saturi (SFA) all'aumentare dell'inclusione della farina di HI nelle diete ( $40.9 \pm 0.7$ ,  $40.0 \pm 2.0$ ,  $35.9 \pm 0.7$  e  $37.6 \pm 2.8\%$  per Hi25, Hi50, Hi75 e Hi100) rispetto al

Controllo Hi0 ( $27.8 \pm 1.3\%$ ). Al contrario, le percentuali degli acidi grassi monoinsaturi (MUFA) e polinsaturi (PUFA) hanno evidenziato un valore significativamente più basso ( $p < 0.05$ ) nelle diete con inclusione di HI rispetto al Controllo (MUFA:  $24.7 \pm 0.6$ ,  $19.8 \pm 0.3$ ,  $19.0 \pm 0.9$ ,  $21.5 \pm 0.2$  e  $20.0 \pm 1.0\%$ ; PUFA:  $47.4 \pm 1.4$ ,  $39.3 \pm 1.0$ ,  $41.0 \pm 1.0$ ,  $42.6 \pm 0.3$  e  $42.2 \pm 3.2\%$  rispettivamente per Hi0, Hi25, Hi50, Hi75, Hi100). Tuttavia, si osserva un progressivo aumento di PUFA dalla dieta Hi25 alla dieta Hi100 nonostante tali valori risultino comunque essere inferiori rispetto al controllo.

Per quanto riguarda gli n3 i valori diminuiscono significativamente ( $p < 0.05$ ) con l'aumentare dell'inclusione di HI, mentre, in parallelo, si nota un aumento significativo ( $p < 0.05$ ) di n6 nelle diete a base di insetto rispetto a Hi0. In particolare, nel primo caso si ha una riduzione dal  $38.8 \pm 1.4\%$  (Hi0) all' $11.1 \pm 3.1\%$  (Hi100), nel secondo un aumento dall' $8.6 \pm 0.1\%$  (Hi0) al  $31.3 \pm 0.9\%$  (Hi100).

Infine, il rapporto n6/n3 (Figura 6b) aumenta significativamente ( $p < 0.05$ ) dalla dieta di Controllo ( $0.22 \pm 0.01$ ) alla dieta Hi100 ( $2.8 \pm 0.2$ ).

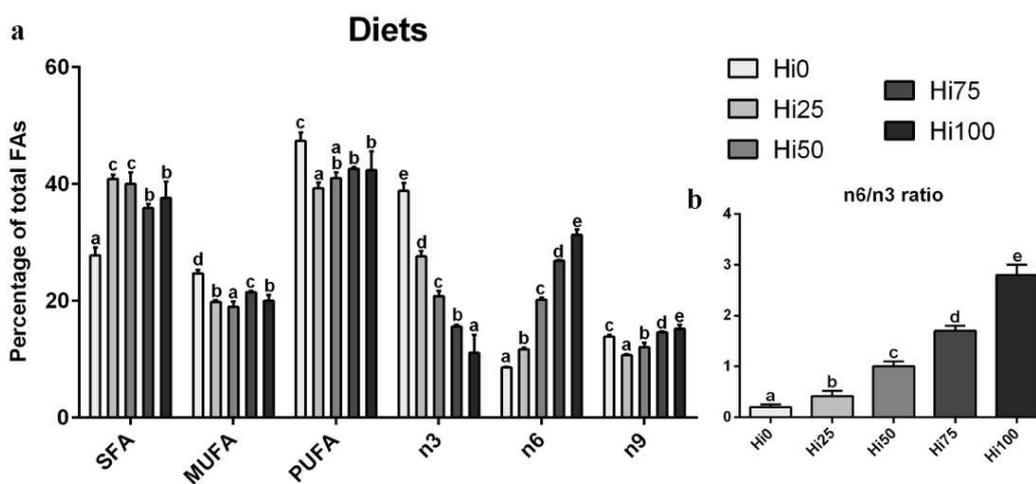


Figura 6. (a) Valori di SFA, MUFA e PUFA (come percentuali degli acidi grassi totali) e contributo degli acidi grassi omega-3 (n3), omega-6 (n6) e omega-9 (n9) e (b) rapporto n6/n3 nelle 5 diete Hi0, Hi25, Hi75 e Hi100. Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative tra i gruppi sperimentali comparati all'interno della stessa classe di acidi grassi ( $p < 0.05$ ). I valori sono presentati come media  $\pm$  deviazione standard ( $n=12$ ).

*Larve di zebrafish.* La Figura 7 mostra le percentuali delle varie classi di acidi grassi delle larve di zebrafish alimentate con le diete sperimentali. La composizione in acidi grassi delle larve è stata profondamente influenzata dall'inclusione di HI nella dieta. In particolare, è possibile osservare un aumento significativo ( $p < 0.05$ ) delle percentuali di acidi grassi saturi (SFA) e una parallela diminuzione significativa ( $p < 0.05$ ) degli acidi grassi monoinsaturi (MUFAs) e polinsaturi (PUFAs) all'aumentare dell'inclusione di HI nelle diete. Inoltre, si evidenzia come l'aumento di inclusione di HI nelle diete abbia portato ad una diminuzione significativa ( $p < 0.05$ ) delle percentuali di n3 ed un aumento significativo ( $p < 0.05$ ) degli n6. Analizzando il loro rapporto (n6/n3, Figura 7b) non si osservano differenze significative ( $p > 0.05$ ) tra Hi0, Hi25 e Hi50 (rispettivamente  $0.5 \pm 0.1$ ,  $0.5 \pm 0.1$  e  $0.6 \pm 0.1\%$ ), mentre Hi75 ( $0.8 \pm 0.1\%$ ) e Hi100 ( $1.0 \pm 0.1\%$ ) mostrano valori significativamente più alti ( $p < 0.05$ ) rispetto agli altri gruppi sperimentali. Infine, considerando gli n9, solo i gruppi Hi25 e Hi50 hanno mostrato valori significativamente ( $p < 0.05$ ) più alti rispetto agli altri gruppi sperimentali i quali, invece, non presentano differenze significative ( $p > 0.05$ ) tra loro.

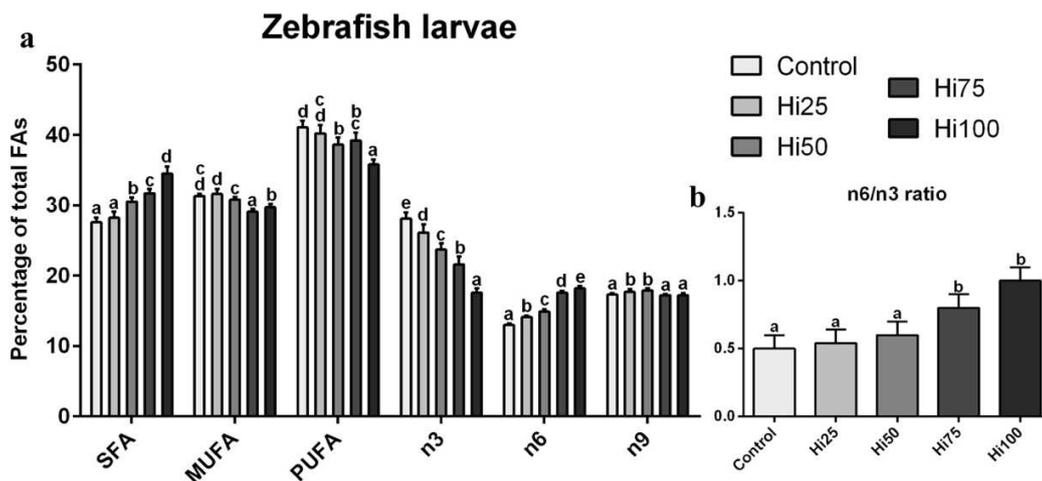


Figura 7. (a) Valori di SFA, MUFA e PUFA (come percentuali degli acidi grassi totali) e contributo degli acidi grassi omega-3 (n3), omega-6 (n6) e omega-9 (n9) e (b) rapporto n6/n3 nelle larve di zebrafish. Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative tra i gruppi sperimentali comparati all'interno della stessa classe di acidi grassi ( $p < 0.05$ ). I valori sono presentati come media  $\pm$  deviazione standard ( $n=12$ ).

La tabella 3 mostra la composizione totale degli acidi grassi delle larve di zebrafish. Il profilo lipidico delle larve alimentate con la dieta di Controllo è caratterizzato da un'elevata percentuale di acidi grassi 16:0, 18:1 n9, 22:6 n3 (acido docosaesaenoico, DHA) e 20:5 n3 (acido eicosapentaenoico, EPA), seguiti da 18:2 n6, 16:1 n7 e 18:0.

Le principali variazioni riguardano aumenti (fino a circa 30 volte) di acido laurico (12:0) e riduzioni significative ( $p<0.05$ ) della percentuale di EPA (20:5 n-3) nelle diete contenenti crescenti inclusioni di farina di *Hermetia illucens*. L'andamento osservato per il DHA è risultato essere analogo all'EPA e, di conseguenza, il rapporto DHA/EPA è aumentato in modo significativo ( $p<0.05$ ) all'aumentare delle percentuali di inclusione di HI nelle diete.

<b>Larve di zebrafish</b>					
	CTRL	Hi25	Hi50	Hi75	Hi100
10:0	0.02±0.01	0.05±0.01	0.10±0.01	0.08±0.01	0.09±0.02
12:0	0.20±0.03 <sup>a</sup>	2.6±0.1 <sup>b</sup>	4.5±0.1 <sup>c</sup>	4.7±0.4 <sup>c</sup>	5.7±0.4 <sup>d</sup>
13:0	0.06±0.01	0.06±0.01	0.07±0.01	0.06±0.01	0.07±0.01
14:0	4.0±0.1 <sup>a,b</sup>	4.0±0.1 <sup>a</sup>	4.2±0.1 <sup>b</sup>	3.9±0.2 <sup>a</sup>	4.3±0.2 <sup>b</sup>
15:0	0.86±0.04	0.80±0.03	0.82±0.01	0.79±0.02	0.84±0.04
16:0	14.7±1.0 <sup>c</sup>	14.0±0.7 <sup>a,b</sup>	13.8±0.5 <sup>a</sup>	14.6±0.1 <sup>b,c</sup>	15.5±0.9 <sup>d</sup>
16:1n9	1.2±0.1 <sup>a</sup>	1.3±0.1 <sup>b</sup>	1.3±0.1 <sup>c</sup>	1.5±0.1 <sup>d</sup>	1.5±0.1 <sup>d</sup>
16:1n7	8.7±0.6 <sup>c</sup>	9.0±0.3 <sup>c</sup>	8.3±0.1 <sup>b</sup>	7.6±0.4 <sup>a</sup>	7.9±0.1 <sup>a</sup>
17:0	1.2±0.1 <sup>b</sup>	1.1±0.1 <sup>a</sup>	1.1±0.1 <sup>a</sup>	1.1±0.1 <sup>a</sup>	1.2±0.1 <sup>b</sup>
18:0	6.3±0.2 <sup>c</sup>	5.5±0.1 <sup>a</sup>	5.8±0.2 <sup>b</sup>	6.3±0.4 <sup>c</sup>	6.7±0.4 <sup>d</sup>
18:1n9	14.7±0.1 <sup>a</sup>	15.3±0.3 <sup>b</sup>	15.7±0.7 <sup>c</sup>	15.1±0.3 <sup>b</sup>	15.3±0.1 <sup>b</sup>
18:1n7	5.2±0.1 <sup>d</sup>	4.9±0.2 <sup>c</sup>	4.6±0.2 <sup>b</sup>	4.3±0.1 <sup>a</sup>	4.5±0.2 <sup>b</sup>
18:2n6	9.6±0.1 <sup>a</sup>	10.6±0.2 <sup>b</sup>	11.0±0.2 <sup>c</sup>	12.6±0.3 <sup>d</sup>	12.7±0.7 <sup>d</sup>
18:3n6	0.43±0.01	0.41±0.02	0.50±0.01	0.47±0.03	0.53±0.03
18:3n3	3.7±0.1 <sup>c</sup>	3.3±0.2 <sup>b</sup>	3.5±0.2 <sup>c</sup>	2.7±0.2 <sup>a</sup>	2.8±0.3 <sup>a</sup>
20:0	0.22±0.01	0.18±0.01	0.19±0.01	0.23±0.02	0.21±0.01
20:1n9	0.90±0.05	0.75±0.01	0.63±0.02	0.48±0.02	0.39±0.02
20:2n6	0.29±0.02	0.29±0.01	0.31±0.01	0.35±0.02	0.38±0.02
20:3n6	0.46±0.04 <sup>a</sup>	0.52±0.02 <sup>b</sup>	0.70±0.04 <sup>c</sup>	0.98±0.06 <sup>d</sup>	1.1±0.1 <sup>e</sup>
20:4n6	2.3±0.2 <sup>a</sup>	2.3±0.1 <sup>a</sup>	2.4±0.1 <sup>b</sup>	3.2±0.3 <sup>c</sup>	3.5±0.1 <sup>d</sup>

20:3n3	0.21±0.03	0.19±0.01	0.21±0.01	0.17±0.01	0.17±0.02
20:5n3	10.2±0.2 <sup>c</sup>	8.7±0.7 <sup>d</sup>	7.2±0.3 <sup>c</sup>	4.6±0.1 <sup>b</sup>	3.5±0.2 <sup>a</sup>
22:1n9	0.31±0.02	0.28±0.01	0.18±0.02	0.12±0.01	0.04±0.01
22:6n3	14.0±1.3 <sup>c</sup>	13.9±1.2 <sup>c</sup>	12.9±0.8 <sup>b</sup>	14.0±1.3 <sup>c</sup>	11.2±1.0 <sup>a</sup>
24:1n9	0.18±0.02	0.09±0.01	0.08±0.01	0.05±0.01	0.03±0.01
DHA/EPA	1.4±0.1 <sup>a</sup>	1.6±0.2 <sup>b</sup>	1.8±0.1 <sup>b</sup>	3.0±0.3 <sup>c</sup>	3.2±0.2 <sup>c</sup>

Tabella 3. Composizione totale di acidi grassi (riportata come percentuale sul totale di acidi grassi presenti) delle larve di zebrafish alimentate con le 5 diete sperimentali (CTRL, Hi25, Hi50, Hi75, Hi100).

L'analisi statistica è stata effettuata solo per gli acidi grassi con percentuali maggiori all'1%. Quelli con percentuali inferiori sono stati esclusi in quanto le loro concentrazioni erano vicine al limite di rilevazione. Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative tra i diversi gruppi considerando ogni singolo acido grasso ( $p < 0.05$ ).

### 4.3 Istologia

Le analisi istologiche sono state eseguite per rilevare possibili infiammazioni intestinali e valutare la presenza di accumulo lipidico o steatosi nel fegato.

La mucosa intestinale è parsa inalterata e caratterizzata da assenza di infiammazione in tutti i gruppi sperimentali. Inoltre, larve alimentate con diete a base di HI hanno mostrato una morfologia intestinale nella norma, paragonabile al controllo (Figura 8a-j). Al contrario, per quanto riguarda il fegato, i risultati hanno evidenziato un diverso grado di accumulo lipidico nei diversi gruppi sperimentali (Figura 8k-o). Le maggiori differenze sono emerse nei gruppi Hi75 e Hi100. Infatti, mentre il parenchima epatico nei gruppi Hi0, Hi25 e Hi50 presentava una modesta quantità di grasso, Hi75 e Hi100 hanno mostrato un severo grado di steatosi con epatociti rigonfi e abbondante accumulo lipidico intracitoplasmatico (Figura 8n,o).

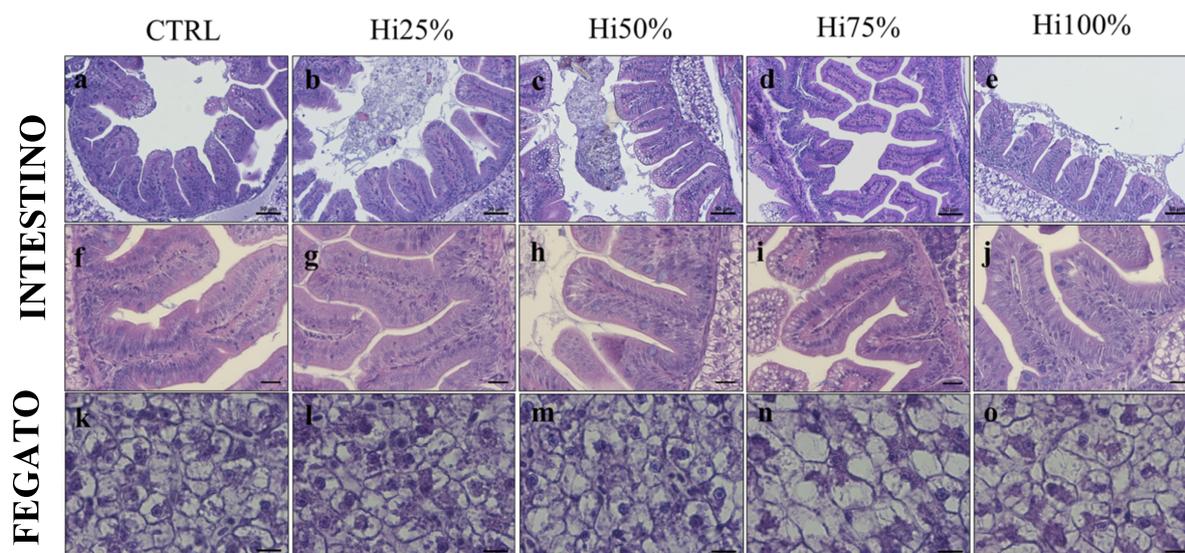


Figura 8. Sezioni istologiche del tratto intestinale e del fegato di larve di zebrafish alimentate con diete aventi inclusioni pari a 0, 25, 50, 75 e 100% di HI (Control, Hi25, Hi50, Hi75 e Hi100). (a-j) intestino; (k-o) fegato. Scala: (a-e) 50  $\mu$ m; (f-j) 20  $\mu$ m; (k-o) 10  $\mu$ m.

Questi risultati sono stati confermati dalla quantificazione statistica delle percentuali di frazione di grasso (PFF) analizzate da sezioni di fegato, le quali hanno mostrato un significativo ( $p < 0.05$ ) aumento in risposta alla dieta utilizzata (Figura 9). In particolare Hi50 ha mostrato un aumento significativo ( $p < 0.05$ ) di PFF ( $48.7 \pm 2.4\%$ ) rispetto al Controllo ( $41.7 \pm 2.1\%$ ) e al gruppo Hi25 ( $42.5 \pm 1.2\%$ ). I valori maggiori sono stati riscontrati nei gruppi Hi75 ( $58.7 \pm 0.9\%$ ) e Hi100 ( $60.6 \pm 1.5\%$ ) con una differenza significativa ( $p < 0.05$ ) rispetto agli altri.

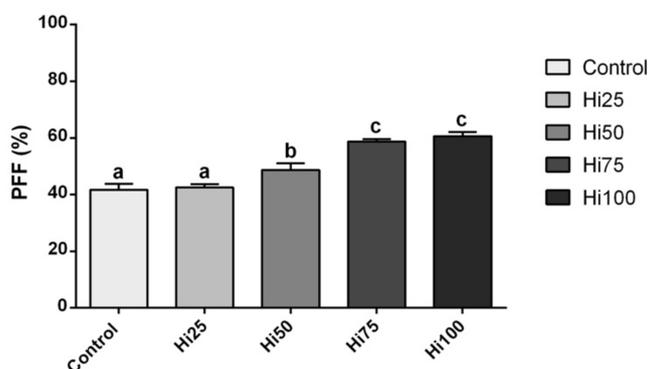


Figura 9. Percentuali di frazione di grasso nel fegato calcolate su sezioni istologiche. Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative ( $p < 0.05$ ). I valori sono presentati come media  $\pm$  deviazione standard ( $n=9$ ).

#### 4.4 FTIR

La media degli spettri di assorbanza dei diversi gruppi sperimentali (Controllo, Hi25, Hi50, Hi75 e Hi100) è riportata nella Figura 10. L'analisi degli spettri IR permette di distinguere i modi vibrazionali di lipidi, proteine, carboidrati e fosfati (guarda sezione Materiali e Metodi) (Vargas-Abúndez et al. 2019). Per quanto riguarda la composizione biochimica dei campioni di larve di zebrafish appartenenti ai diversi gruppi sperimentali, possono essere fatte le seguenti considerazioni: (i) è stata rilevata una quantità significativamente maggiore ( $p < 0.05$ ) di lipidi totali (LIP/TBM, Figura 11a) nei gruppi Hi50, Hi75 e Hi100 rispetto al Controllo e Hi25; (ii) in tutte le larve di zebrafish alimentate con diete aventi diversi livelli di inclusione di HI è stato osservato un aumento significativo ( $p < 0.05$ ) di acidi grassi saturi (1744/LIP e 2925/LIP, Figura 11b,c) ed una diminuzione significativa ( $p < 0.05$ ) di acidi grassi insaturi (3010/LIP, Figura 11d); (iii) non sono emersi cambiamenti significativi riguardo la quantità complessiva di proteine (PRT/TBM, Figura 12a); (iv) una leggera, ma significativa ( $p < 0.05$ ), riduzione di collagene (1234/PRT, Figura 12b) è stata osservata in tutte le larve alimentate con diete a base di HI ed (v) una maggiore quantità di mucina (1055/PRT, Figura 12c) è stata trovata nelle larve alimentate con le diete Hi50, Hi75 e Hi100.

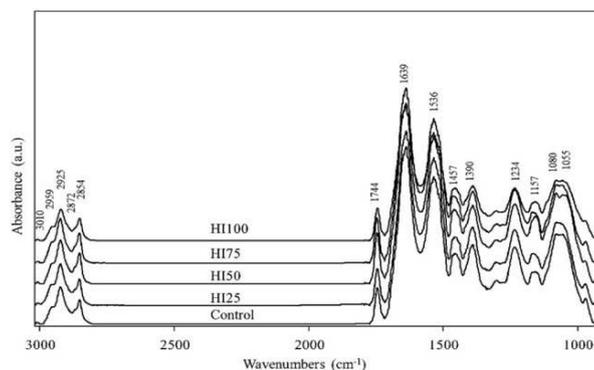


Figura 10. Spettri IR delle larve di zebrafish. Media degli spettri di assorbanza delle larve di zebrafish alimentate con diete contenenti 0, 25, 50, 75 e 100% di farina di HI. Per una maggiore chiarezza, gli spettri sono stati shiftati lungo l'asse delle y. È stata riportata la posizione, in termini di numero d'onda, dei picchi IR più rappresentativi.

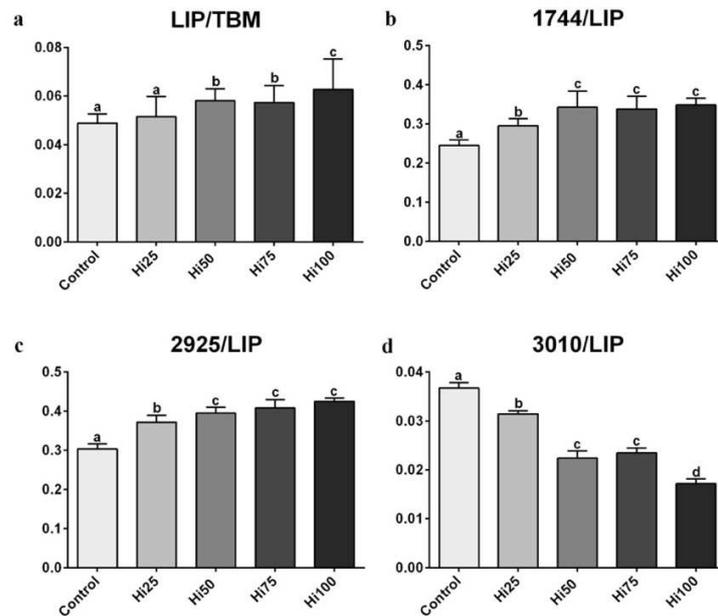


Figura 11. Analisi statistica della composizione lipidica- (a) LIP/TBM (quantità complessiva di lipidi); (b) 1744/LIP (quantità complessiva di acidi grassi rispetto ai lipidi); (c) 2925/LIP (quantità di acidi grassi saturi rispetto ai lipidi); (d) 3010/LIP (quantità di acidi grassi insaturi rispetto ai lipidi). Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative tra i diversi gruppi sperimentali ( $p < 0.05$ ).

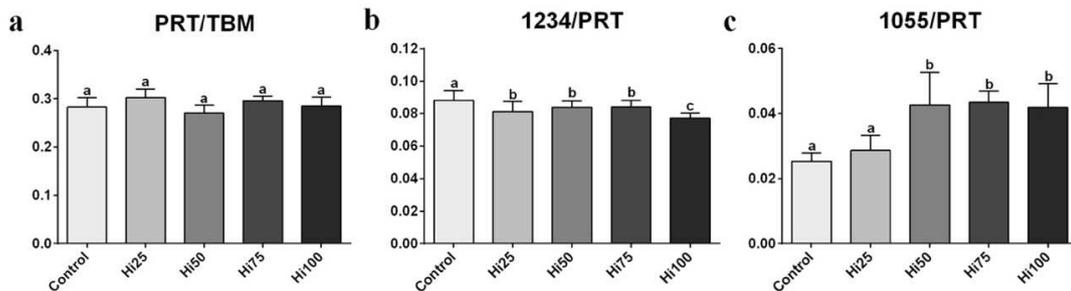


Figura 12. Analisi statistica della composizione delle proteine- (a) PRT/TBM (quantità complessiva di proteine); (b) 1234/PRT (quantità di collagene rispetto le proteine); (c) 1055/PRT (quantità di mucina rispetto le proteine). Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative tra i diversi gruppi sperimentali ( $p < 0.05$ ).

#### 4.5 Real time PCR

Le analisi Real-time PCR sono state eseguite su geni coinvolti nella crescita delle larve (*igf1*, *igf2* e *mstnb*), risposta allo stress (*hsp70.1* e *nr3c1*), biosintesi degli acidi grassi

polinsaturi a lunga catena (*elovl2*, *elovl5* e *fads2*), appetito (*ghrl*, *npy*, *cnr1* e *lepa*), risposta immunitaria (*il1b*, *il10* e *tnfa*) e idrolisi enzimatica della chitina (*chia.2* e *chia.3*).

**Fattori di crescita.** Per quanto riguarda l'espressione genica di *igf1* e *igf2* (Figura 13a,b), aumenti significativi ( $p < 0.05$ ) sono stati osservati in tutti i gruppi sperimentali alimentati con HI rispetto al Controllo (con l'eccezione dell'espressione genica di *igf1* nel gruppo Hi25). Considerando l'espressione genica di *mstn* (Figura 13c), valori significativamente maggiori ( $p < 0.05$ ) rispetto al Controllo sono stati evidenziati solo nei gruppi Hi50 e Hi100.

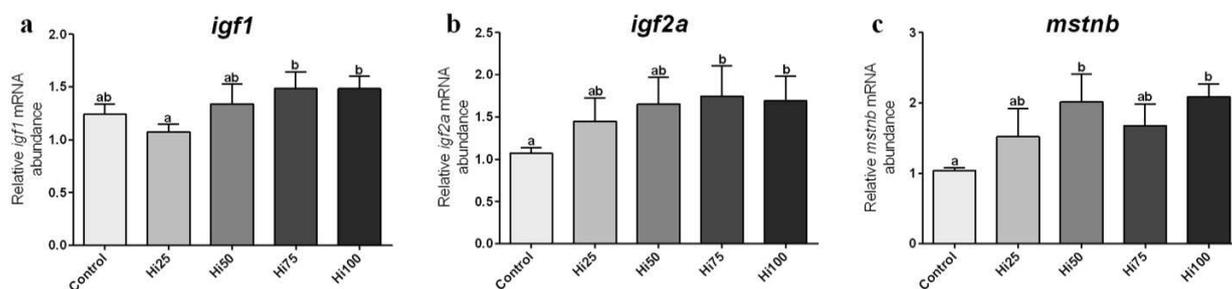


Figura 13. Livelli di mRNA di geni coinvolti nella crescita analizzati su larve di zebrafish. (a) *igf1*, (b) *igf2a*, (c) *mstnb*. Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative tra i diversi gruppi sperimentali ( $p < 0.05$ ). I valori sono presentati come media  $\pm$  deviazione standard ( $n=5$ ).

**Risposta allo stress.** Considerando i markers dello stress (*nr3c1* e *hsp70.1*; Figura 14) tutti i gruppi sperimentali con inclusione di HI hanno mostrato un'espressione genica significativamente maggiore ( $p < 0.05$ ) rispetto al Controllo, con l'eccezione di *nr3c1* nel gruppo Hi25. Per di più, non sono state evidenziate differenze significative ( $p > 0.05$ ) tra i gruppi Hi50, Hi75 e Hi100 mentre il gruppo Hi25 ha mostrato valori significativamente ( $p < 0.05$ ) minori rispetto a quelli con le maggiori percentuali di HI (con l'eccezione dell'espressione genica di *nr3c1* nel gruppo Hi50).

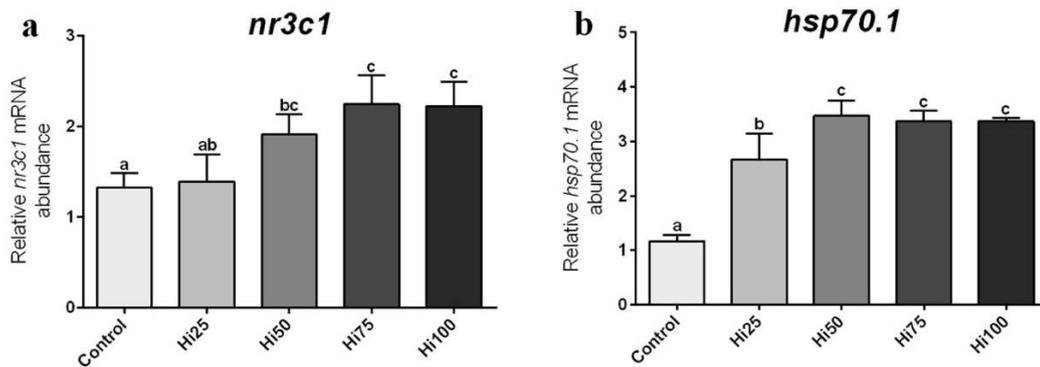


Figura 14. Livelli di mRNA di geni coinvolti nella risposta allo stress analizzati su larve di zebrafish. (a) *nr3c1*, (b) *hsp70.1*. Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative tra i diversi gruppi sperimentali ( $p < 0.05$ ). I valori sono presentati come media  $\pm$  deviazione standard ( $n=5$ ).

**Metabolismo lipidico.** Considerando i geni coinvolti nell'allungamento (*elovl2* e *elovl5*) e desaturazione (*fads2*) degli acidi grassi a lunga catena, il più alto valore di espressione genica è stato riscontrato nella dieta con la massima percentuale di HI (Hi100). Come si può osservare dalla Figura 15a-c, Hi100 presenta valori di espressione genica significativamente più alti ( $p < 0.05$ ) rispetto a tutti gli altri gruppi sperimentali. In particolare, l'espressione genica di *elovl2* (Figura 15a) non mostra differenze significative ( $p > 0.05$ ) tra il Controllo e Hi25, mentre sia l'espressione di Hi50 che Hi75 è risultata significativamente ( $p < 0.05$ ) più alta rispetto al Controllo. Infine, considerando l'espressione genica di *elovl5* e *fads* (Figura 15b,c) non sono state osservate differenze significative ( $p > 0.05$ ) tra i gruppi di Controllo, Hi25, hi50 e Hi75.

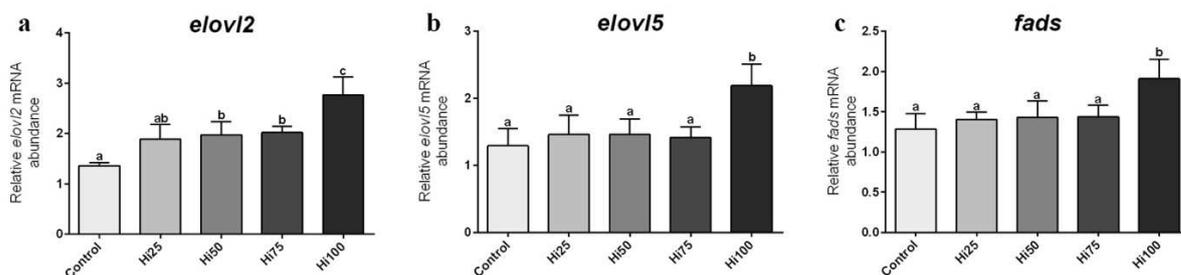


Figura 15. Livelli di mRNA di geni coinvolti nella biosintesi di PUFAs a lunga catena analizzati su larve di zebrafish. (a) *elov12*, (b) *elov15*, (c) *fads*. Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative tra i diversi gruppi sperimentali ( $p < 0.05$ ). I valori sono presentati come media  $\pm$  deviazione standard ( $n=5$ ).

*Appetito*. Come riporta la Figura 16a,b con l'aumento delle percentuali di HI nelle diete sperimentali si osserva un corrispettivo aumento dell'espressione genica di *ghrl* e *npv*. Tuttavia, non sono state rilevate differenze significative ( $p > 0.05$ ) tra il Controllo e Hi25 (considerando l'espressione genica di *ghrl*) e tra i gruppi di Controllo, Hi25 e Hi50 (considerando l'espressione genica di *npv*). Nella Figura 16c è riportata l'espressione genica di *cnrl*. Qui non è evidente alcuna dipendenza dalla dieta a base di HI dato che solo i gruppi Hi25 e Hi50 hanno evidenziato valori significativamente maggiori ( $p < 0.05$ ) rispetto al Controllo. Infine, per quanto riguarda l'espressione genica di *lepa* (Figura 16d) i gruppi con le maggiori percentuali di HI, quali Hi75 e Hi100, hanno mostrato valori significativamente più alti ( $p < 0.05$ ) rispetto a tutti gli altri, mentre non sono state rilevate differenze significative ( $p > 0.05$ ) tra il Controllo, Hi25 e Hi50.

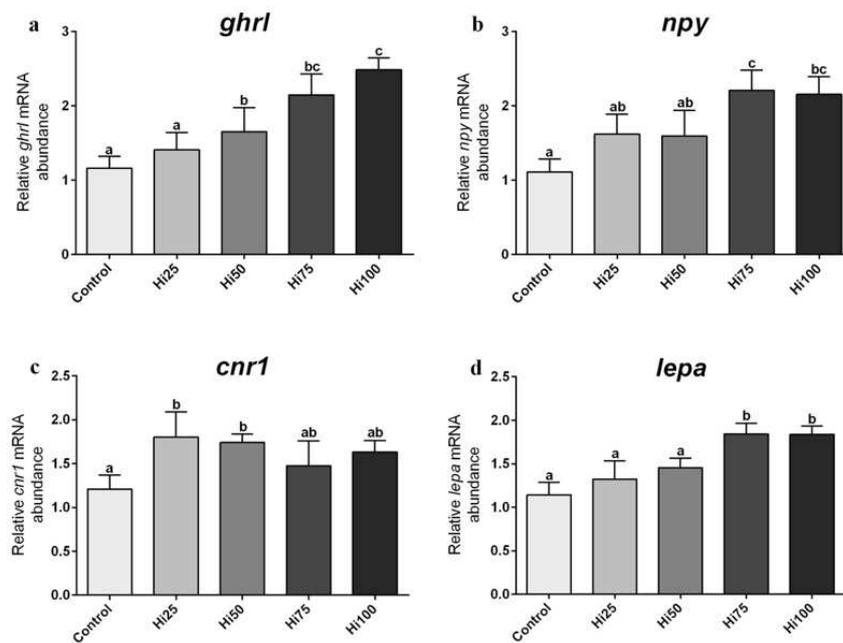


Figura 16. Livelli di mRNA di geni coinvolti nell'appetito analizzati su larve di zebrafish. (a) *ghrl*, (b) *npy*, (c) *cnr1*, (d) *lepa*. Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative tra i diversi gruppi sperimentali ( $p < 0.05$ ). I valori sono presentati come media  $\pm$  deviazione standard ( $n=5$ ).

**Risposta immunitaria.** Considerando i geni coinvolti nella risposta immunitaria, inclusioni crescenti di HI nella dieta riflettono un'espressione genica significativamente ( $p < 0.05$ ) più alta rispetto al Controllo. In particolare, per quanto riguarda l'espressione genica di *illb* (Figura 17a) tra il gruppo di Controllo, Hi25 e Hi50 non sono state rilevate differenze significative ( $p > 0.05$ ). Solo i gruppi Hi75 e Hi100 mostrano valori significativamente più alti ( $p < 0.05$ ) rispetto agli altri. Una condizione analoga si riscontra osservando l'espressione genica di *ill0* (Figura 17b): Hi50, Hi75 e Hi100 mostrano valori significativamente più alti ( $p < 0.05$ ) rispetto ai Hi25 e il Controllo, che tra di loro non mostrano differenze significative ( $p > 0.05$ ). Infine, come riportato dalla Figura 17c, i crescenti livelli di inclusione di HI nelle diete hanno determinato un aumento significativo ( $p < 0.05$ ) dell'espressione genica di *tnfa*, evidenziando un trend dose dipendente.

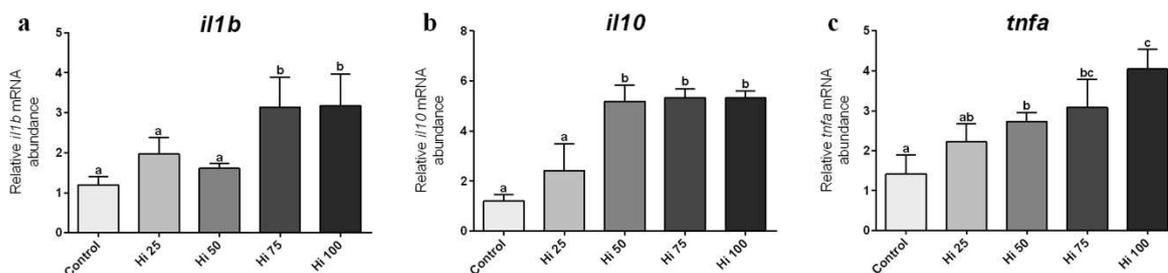


Figura 17. Livelli di mRNA di geni coinvolti nella risposta immunitaria analizzati su larve di zebrafish. (a) *il1b*, (b) *il10*, (c) *tnfa*. Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative tra i diversi gruppi sperimentali ( $p < 0.05$ ). I valori sono presentati come media  $\pm$  deviazione standard ( $n=5$ ).

*Chitinasi*. Tutti i gruppi sperimentali alimentati con diete contenenti HI mostrano un aumento dell'espressione genica delle chitinasi (Figura 18). Considerando l'espressione genica di *chia.2* e *chia.3*, infatti, non si osservano differenze significative ( $p > 0.05$ ) tra tutti i gruppi sperimentali, ad eccezione del gruppo Hi100 per il gene *chia.2* e per i gruppi Hi75 e Hi100 per il gene *chia.3*, che mostrano valori di espressione genica significativamente maggiori ( $p < 0.05$ ) rispetto al Controllo.

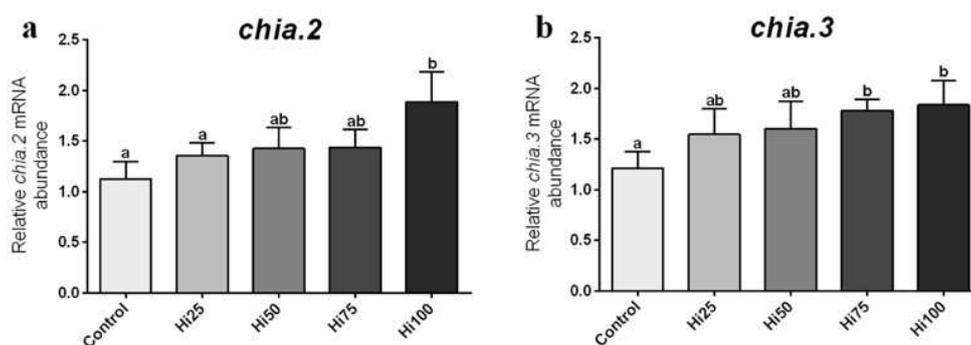


Figura 18. Livelli di mRNA di geni coinvolti nell'idrolisi enzimatica della chitina analizzati su larve di zebrafish. (a) *chia.2*, (b) *chia.3*. Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative tra i diversi gruppi sperimentali ( $p < 0.05$ ). I valori sono presentati come media  $\pm$  deviazione standard ( $n=5$ ).

## 5 DISCUSSIONE

Gli insetti rappresentano ingredienti economicamente ed ecologicamente validi per i mangimi destinati all'acquacoltura, ma le principali problematiche ad essi associate, quali carenza di acidi grassi polinsaturi (PUFAs) (Barroso et al. 2017) e presenza di chitina (Kroeckel et al. 2012; Xiao et al. 2018), limitano ancora il loro impiego.

Gli insetti sono generalmente allevati su scarti alimentari o sottoprodotti organici e precedenti studi hanno evidenziato che la loro biomassa finale risultava essere povera di PUFAs ma ricca di acidi grassi saturi SFA (Vargas-Abúndez et al. 2018).

Tuttavia, diversi studi hanno dimostrato che il profilo lipidico degli insetti riflette quello del substrato di crescita (Barroso et al. 2014; Spranghers et al. 2017).

In particolare, nel presente studio è stato dimostrato come l'aggiunta del 10% (w/w) di *Schizochytrium sp.* al substrato di crescita di *Hermetia illucens* sia un metodo efficace per aumentare il contenuto di PUFAs nella biomassa finale degli insetti. La procedura di arricchimento, infatti, ha portato ad un incremento progressivo del contenuto di acidi grassi polinsaturi nelle diete Hi25, Hi50, Hi75 e Hi100. Questa tecnica ha rappresentato un approccio innovativo su come sottoprodotti alimentari derivanti da industrie terrestri come, ad esempio, gli scarti della torrefazione del caffè, possano essere arricchiti e bio-convertiti in una preziosa biomassa per la produzione di mangimi destinati all'acquacoltura (Meneguz et al. 2018).

Rispetto alle diete a base di *Hermetia illucens* precedentemente testate su zebrafish (Vargas et al. 2018; Zarantoniello et al. 2019), quelle sperimentate in questo studio hanno portato a buone performance di crescita dei pesci dato che le maggiori percentuali del tasso

di crescita specifico (SGR%) sono state riscontrate proprio nei gruppi alimentati con le inclusioni di HI maggiori.

Le analisi molecolari sui geni implicati nella crescita (*igf1-igf2*) hanno supportato questi risultati anche se risultano in contrasto con quanto evidenziato da studi precedenti che riportano effetti negativi sulla crescita e sul benessere dei pesci con inclusioni di HI nella dieta superiori al 40% (Sánchez-Muros et al. 2014; Barragan-Fonseca et al. 2018; Secci et al. 2019).

Generalmente, il ritardo nella crescita dei pesci è correlato o ad una condizione di malnutrizione (ad esempio carenza a lungo termine di nutrienti essenziali o presenza di fattori anti-nutrizionali) o ad uno scarso apporto di cibo. Come riportato nello studio di Zarantoniello et al. (2019) il ritardo nella crescita osservato nelle diete a base di insetto probabilmente è stato causato da una composizione sbilanciata di acidi grassi nell'alimentazione, caratterizzata da una minore quantità di HUFA in diete contenenti livelli maggiori di HI.

Inoltre, ulteriori studi hanno evidenziato come queste elevate inclusioni possano avere effetti negativi sull'integrità del fegato e dell'intestino e, di conseguenza, sull'assorbimento dei nutrienti forniti dalla dieta (Henry et al. 2015; Cardinaletti et al. 2019).

Le diete fornite nel presente studio sono state in grado di modificare la composizione degli acidi grassi portando ad un aumento di SFA e ad una diminuzione di PUFA all'aumentare delle inclusioni di *Hermetia illucens*.

Tuttavia, in termini di acidi grassi polinsaturi (PUFAs) si osserva come le differenze tra il gruppo di Controllo e i gruppi aventi inclusioni di HI siano state meno evidenti nelle larve di zebrafish rispetto a quelle rilevate nelle sole diete.

Il motivo risiederebbe nel fatto che le specie d'acqua dolce (tra cui gli zebrafish) sono in grado di convertire gli acidi grassi a catena corta in acidi grassi altamente insaturi attraverso i pathways di allungamento e desaturazione degli acidi grassi (Tocher 2010).

I maggiori livelli di espressione genica di *elovl2*, *elovl5* e *fads* osservati nei gruppi sperimentali alimentati con diete a base di HI (in particolare nel gruppo Hi100) permettono di confermare la relazione tra attività di allungamento e desaturazione degli acidi grassi a corta e media catena e la carenza di PUFAs nella dieta.

I risultati della gas cromatografia sono stati confermati ed integrati dalle analisi di FTIR che hanno fornito dati riguardo la composizione macromolecolare dei campioni biologici analizzati (Giorgini et al. 2018).

In particolare, le analisi FTIR non hanno evidenziato differenze tra i gruppi sperimentali riguardo la quantità totale di proteine (PRT/TBM) (l'unica eccezione riscontrata è avvenuta con il collagene (1234/PRT) il quale tende leggermente a diminuire), sottolineando come le diete a base di HI possano essere preziose fonti proteiche per i mangimi destinati all'acquacoltura (Al-Qazzaz and Ismail 2016; Nogales-Merida et al. 2018).

Per quanto riguarda i lipidi, le stesse analisi hanno rivelato che l'aumento di percentuale di HI nelle diete era associato ad un generale aumento del contenuto lipidico totale nelle larve di zebrafish. In particolare, analizzando specifiche lunghezze d'onda, l'FTIR ha confermato i risultati della gas cromatografia evidenziando un aumento complessivo di acidi grassi saturi (1744/LIP e 2925/LIP) e una diminuzione di acidi grassi insaturi (3010/LIP).

I marker molecolari dell'appetito analizzati nel presente studio sono stati pienamente supportati da quanto ottenuto dalle biometrie. Nei pesci l'assunzione di cibo è regolata da

regioni specifiche del cervello che interpretano ed integrano segnali positivi (oressizzanti) e negativi (anoressizzanti) che derivano dall'area ipotalamica e dalla periferia del corpo (Copeland et al. 2011; Sobrino Crespo et al. 2014). I segnali oressizzanti (*ghrl* e *npv*) analizzati nel presente studio hanno mostrato un aumento della loro espressione genica in correlazione con l'aumento delle percentuali di inclusione di HI nelle diete, mentre l'espressione genica di *cnrl* è risultata essere elevata in tutti i gruppi sperimentali alimentati con diete a base di HI. Al contrario, i risultati ottenuti dal segnale anoressizzante *lepa* non sono di ovvia interpretazione.

In genere la leptina è coinvolta nell'inibizione del pathway dei segnali oressizzanti e nella stimolazione di quelli anoressizzanti (Volkoff 2006; Piccinetti et al. 2010), ma qui è stato osservato un risultato opposto che potrebbe essere spiegato dalle analisi FTIR le quali hanno rivelato un aumento del contenuto lipidico totale (LIP/TBM) nelle larve alimentate con percentuali elevate di HI. Infatti, precedenti studi fatti sia su mammiferi che su diverse specie di pesci, hanno dimostrato una correlazione positiva tra i livelli di leptina e la quantità di tessuto adiposo (Chisada et al. 2014; Li et al. 2016). Il tessuto adiposo è il principale produttore di leptina, per cui l'aumento della massa grassa causerebbe l'aumento della produzione di tale ormone, comunicando al cervello che i depositi di grasso sono sufficienti, stimolando il senso di sazietà.

In alternativa, è risaputa l'esistenza di un'interconnessione tra leptina e geni coinvolti nella risposta immunitaria (citochine pro-infiammatorie) (Lafrance et al. 2010).

È noto, infatti, che la leptina incrementa la produzione di citochine pro-infiammatorie così come le citochine pro-infiammatorie sono in grado di innescare il rilascio di leptina (Carlton et al. 2012).

Nel presente studio, l'aumento dell'espressione genica di *lepa* osservata nelle larve alimentate con diete a base di HI, potrebbe aver supportato la risposta immunitaria osservata negli stessi gruppi sperimentali.

Tutte le diete a base di HI contengono chitina (Gasco et al. 2018) molecola che tutt'ora ha un ruolo controverso nei mangimi a base di insetto per l'acquacoltura. Se da una parte alcuni studi evidenziano un ruolo benefico della chitina sul sistema immunitario e sul microbiota dei pesci (Ringø et al. 2012; Zhou et al. 2013; Henry et al. 2018), dall'altra sono presenti molteplici aspetti negativi. In particolare è stato osservato che la chitina, soprattutto a concentrazioni elevate, può indurre infiammazioni del tratto intestinale riducendo l'assimilazione dei nutrienti (Kroeckel et al. 2012; Magalhães et al. 2017). Ad esempio, l'inclusione di alte percentuali di HI nei mangimi di trota iridea (*Oncorhynchus mykiss*) e carpe (*Cyprinus carpio*) ha indotto cambiamenti morfologici intestinali e conseguenti effetti sulla crescita (Dumas et al. 2018).

A questo proposito, le larve alimentate con le diete Hi50, Hi75 e Hi100 hanno mostrato un aumento significativo di mucina (1055/PRT), probabilmente associato ad una lubrificazione dell'intestino superiore necessaria per un corretto transito intestinale di queste diete. La mucina difatti è una glicoproteina che, grazie alla sua viscosità, diviene un elemento protettivo del tratto gastro-intestinale.

Tuttavia, dalle analisi istologiche non sono state rilevate specifiche infiammazioni del tratto intestinale suggerendo: una possibile digestione della chitina da parte delle larve di zebrafish attraverso specifiche chitinasi (*chia.2* e *chia.3*) o un possibile ruolo antinfiammatorio dell'acido laurico (C12).

Nel presente studio, l'incremento di acido laurico nella dieta è relazionato all'aumento di inclusione di HI; questo acido grasso è noto fornire un effetto positivo al benessere del

tratto digerente dei pesci mitigando le condizioni infiammatorie e svolgendo funzioni antibatteriche e antivirali (Ushakova et al. 2016; Gasco et al. 2018; Zarantoniello et al. 2019).

Per quanto riguarda l'analisi istologica del fegato, tutti i campioni analizzati, indipendentemente dal tipo di dieta, hanno mostrato un accumulo lipidico nel parenchima epatico.

In particolare, i gruppi Hi75 e Hi100 hanno rivelato un'evidente steatosi epatica, condizione patologica precedentemente correlata con un aumento del rapporto n6/n3 (Di Minno et al. 2012; Scorletti and Byrne 2018). Questo disturbo epatico è probabilmente la causa della maggiore espressione genica dei marker di stress analizzati (*hsp70.1* e *nr3c1*).

## 6 CONCLUSIONI

Affinché *Hermetia illucens* possa essere utilizzata nei mangimi destinati all'acquacoltura il suo profilo lipidico deve essere migliorato. Nel presente studio l'aggiunta del 10% (w/w) di *Schizochytrium sp.* al substrato di crescita dell'insetto si è rivelato un ottimo metodo per il raggiungimento dell'obiettivo prefissato. I risultati mostrano come il 50% di inclusione di HI nella dieta sostenga una miglior crescita delle larve di zebrafish senza causare effetti negativi. Maggiori livelli di inclusione, al contrario, evidenziano un generale aumento di accumulo lipidico e risposta allo stress. Questo nuovo approccio, che si basa sul concetto di sostenibilità e di economia circolare, rappresenta un valido esempio di come sia possibile sostenere il benessere degli animali e incoraggiare la sostenibilità di tale settore.

## 7 RINGRAZIAMENTI

Il presente lavoro di tesi è parte del progetto NUTRIFISH, cofinanziato da Fondazione Cariverona, progetto N°2017.0571.

Desidero ringraziare il mio relatore, il professor Ike Olivotto, che mi ha dato l'opportunità di prendere parte a questo progetto. Grazie per la sua professionalità, accortezza e cortesia dimostrate durante tutto questo percorso, oltre che per la passione che sa trasmettere attraverso i suoi insegnamenti.

Ringrazio la professoressa Cristina Truzzi e Matteo Antonucci per le analisi gas cromatografiche e la professoressa Elisabetta Giorgini per le analisi di FTIR.

Ringrazio Matteo per essere stato un'ottima guida e punto di riferimento. Grazie per i consigli, per il supporto, per la sua comprensione e per la sua empatia che nonostante cercasse di nascondere faceva comunque trapelare. Sa benissimo che non basteranno queste poche righe per ringraziarlo di tutto quello che c'è stato in tutto questo tempo.

Ringrazio Giorgia, compagna di avventure e disavventure. Insieme ci siamo fatte forza nei momenti dove tutto sembrava remarci contro.

Ringrazio Basilio, per i suoi ripassi di anatomia, per i divertenti campionamenti e i rimproveri costruttivi che ci hanno portato ad ottimi risultati.

Un grazie speciale va a tutti i ragazzi del laboratorio per la loro compagnia e simpatia senza la quale tutto sarebbe stato meno colorato.

Grazie per il vostro affetto.

Martina Delli Compagni

## 8 BIBLIOGRAFIA

- Al-Qazzaz, MF, and DB Ismail. 2016. "Insect Meal as a Source of Protein in Animal Diet," 527–47. <https://doi.org/10.5958/0974-181X.2016.00038.X>.
- Arru, Brunella, Roberto Furesi, Laura Gasco, Fabio A Madau, and Pietro Pulina. 2019. "The Introduction of Insect Meal into Fish Diet: The First Economic Analysis on European Sea Bass Farming," 1–16. <https://doi.org/10.3390/su11061697>.
- Badwy, Tartiel M, E M Ibrahim, and M M Zeinhom. 2008. "PARTIAL REPLACEMENT OF FISH MEAL WITH DRIED MICROALGA ( CHLORELLA SPP AND SCENEDESMUS SPP ) IN NILE TILAPIA ( OREOCHROMIS NILOTICUS ) DIETS," no. 2004: 801–11.
- Bai, Nan, Min Gu Id, Mingjie Liu, Qian Jia, Shihui Pan, and Zhiyu Zhang. 2019. "Corn Gluten Meal Induces Enteritis and Decreases Intestinal Immunity and Antioxidant Capacity in Turbot ( *Scophthalmus Maximus* ) at High Supplementation Levels," 1–18.
- Barragan-Fonseca, Karol B, and Marcel Dicke. 2018. "Influence of Larval Density and Dietary Nutrient Concentration on Performance, Body Protein, and Fat Contents of Black Soldier Fly Larvae (*Hermetia Illucens* )," no. 2013: 761–70. <https://doi.org/10.1111/eea.12716>.
- Barroso, Fernando G, Carolina De Haro, María-josé Sánchez-muros, Elena Venegas, Anabel Martínez-sánchez, and Celeste Pérez-bañón. 2014. "The Potential of Various Insect Species for Use as Food for Fish." *Aquaculture* 422–423: 193–201. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.12.024>.
- Barroso, Fernando G, María-josé Sánchez-muros, Macarena Segura, Elvira Morote,

- Alejandro Torres, Rebeca Ramos, and José-luis Guil. 2017. “Insects as Food : Enrichment of Larvae of *Hermetia Illucens* with Omega 3 Fatty Acids by Means of Dietary Modifications.” *Journal of Food Composition and Analysis* 62 (January): 8–13. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2017.04.008>.
- Bell, J G, L A Mcevoy, A Estevez, R J Shields, and J R Sargent. 2003. “Optimising Lipid Nutrition in First-Feeding Flatfish Larvae” 227: 211–20. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(03\)00504-0](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(03)00504-0).
- Benemann, John R. 1992. “Microalgae Aquaculture Feeds,” 233–34.
- Bertrand, Arnaud, and Sophie Bertrand. 2007. “Anchovy ( *Engraulis Ringens* ) and Sardine ( *Sardinops Sagax* ) Spatial Dynamics and Aggregation Patterns in the Humboldt Current Ecosystem , Peru , from 1983 – 2003” 99: 155–68. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2419.2006.00422.x>.
- Bondari, K, and D C Sheppard. 1981. “Soldier Fly Larvae as Feed in Commercial Fish Production.” *Aquaculture* 24: 103–9. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0044-8486\(81\)90047-8](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0044-8486(81)90047-8).
- Canonico, L, S Ashoor, M Taccari, F Comitini, M Antonucci, and C Truzzi. 2016. “Conversion of Raw Glycerol to Microbial Lipids by New *Metschnikowia* and *Yarrowia Lipolytica* Strains.” *Annals of Microbiology*, 1409–18. <https://doi.org/10.1007/s13213-016-1228-0>.
- Cardinaletti, Gloriana, Basilio Randazzo, Maria Messina, Matteo Zarantoniello, Elisabetta Giorgini, Andrea Zimbelli, Leonardo Bruni, Giuliana Parisi, Ike Olivotto, and Francesca Tulli. 2019. “Effects of Graded Dietary Inclusion Level of Full-Fat *Hermetia Illucens* Prepupae Meal in Practical Diets,” 1–21.
- Carlton, Elizabeth D, Gregory E Demas, and Susannah S French. 2012. “Hormones and

- Behavior Leptin, a Neuroendocrine Mediator of Immune Responses, Inflammation, and Sickness Behaviors.” *Hormones and Behavior* 62 (3): 272–79. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2012.04.010>.
- Cheng, Zhenyan, Qinghui Ai, Kangsen Mai, Wei Xu, Hongming Ma, Yan Li, and Jiaming Zhang. 2010. “Effects of Dietary Canola Meal on Growth Performance , Digestion and Metabolism of Japanese Seabass , *Lateolabrax Japonicus*.” *Aquaculture* 305 (1–4): 102–8. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.03.031>.
- Chisada, Shin-ichi, Tadahide Kurokawa, Koji Murashita, Ivar Rønnestad, Yoshihito Taniguchi, Atsushi Toyoda, Yoshiyuki Sakaki, Shunichi Takeda, and Yasutoshi Yoshiura. 2014. “General and Comparative Endocrinology Chronical Up-Regulated Levels of Orexigenic Neuropeptides, Elevated Food Intake and Stage Specific Effects on Growth and Fat Allocation.” *General and Comparative Endocrinology* 195: 9–20. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2013.10.008>.
- Cohen, Joel E. 2003. “Human Population : The Next Half Century” 302 (November): 1172–76.
- Copeland, Donald L, Robert Joel Duff, Qin Liu, Jeremy Prokop, and Richard Lyle Londraville. 2011. “Leptin in Teleost Fishes: An Argument for Comparative Study” 2 (June): 1–11. <https://doi.org/10.3389/fphys.2011.00026>.
- Danulat, E. 1986. “The Effects of Various Diets on Chitinase and SS-Glucosidase Activities and the Condition of Cod, *Gadus Morhua* (L).” *Journal of Fish Biology* 28 (2): 191–97. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1986.tb05157.x>.
- Dineshbabu, Gnanasekaran, Gargi Goswami, Ratan Kumar, Ankan Sinha, and Debasish Das. 2019. “Microalgae – Nutritious, Sustainable Aqua-and Animal Feed Source.” *Journal of Functional Foods* 62 (June): 103545.

<https://doi.org/10.1016/j.jff.2019.103545>.

- Dumas, André, Thiago Raggi, Justin Barkhouse, Elizabeth Lewis, and Erika Weltzien. 2018. "The Oil Fraction and Partially Defatted Meal of Black Soldier Fly Larvae (*Hermetia Illucens*) Affect Differently Growth Performance, Feed Efficiency, Nutrient Deposition, Blood Glucose and Lipid Digestibility of Rainbow Trout (*Oncorhynchus Mykiss*)."  
*Aquaculture* 492 (January): 24–34.  
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.03.038>.
- FAO, 2003. "Review of the State of World Aquaculture," no. 886.
- FAO 2013. "Fish Matters: Importance of Aquatic Foods in Human Nutrition and Global Food Supply."  
*Reviews in Fisheries Science* 21 (1): 22–38.  
<https://doi.org/10.1080/10641262.2012.753405>.
- FAO. 2014. "Il Contributo Degli Insetti per La Sicurezza Alimentare, l'economia e l'ambiente."
- FAO 2015. "Feed Matters: Satisfying the Feed Demand of Aquaculture."  
*Reviews in Fisheries Science & Aquaculture* 23 (1): 1–10.  
<https://doi.org/10.1080/23308249.2014.987209>.
- FAO 2016. *The State of World Fisheries and Aquaculture- Contributing to Food Security and Nutrition for All*.
- FAO 2017. *The State of Food Security and Nutrition in the World*.
- FAO 2018. *The State of World Fisheries and Aquaculture 2018*.
- Folch, J, M Lees, and G H Sloane Stanley. 1957. "A Simple Method for the Isolation and Purification of Total Lipides from Animal Tissues."
- Fraga, Iliana, Tsai Garc, Josefa Susana Alvarez, and Alfredo Herna. 2007. "Substitution of Fishmeal with Soybean Meal in Practical Diets for Juvenile White Shrimp

- Litopenaeus Schmitti,” 689–95. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2007.01654.x>.
- Francis, George, Harinder P S Makkar, and Klaus Becker. 2001. *Antinutritional Factors Present in Plant-Derived Alternate Fish Feed Ingredients and Their Effects in Fish*.
- Frankic, Anamarija, and Carl Hershner. 2003. “Sustainable Aquaculture: Developing the Promise of Aquaculture,” no. Fao 2002: 517–30.
- Fry, Jillian P, David C Love, Graham K Macdonald, Paul C West, Peder M Engstrom, Keeve E Nachman, and Robert S Lawrence. 2016. “Environmental Health Impacts of Feeding Crops to Farmed Fish.” *Environment International* 91: 201–14. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2016.02.022>.
- Gasco, L, M Finke, and A Van Huis. 2018. “Can Diets Containing Insects Promote Animal Health?” 4 (1): 1–4. <https://doi.org/10.3920/JIFF2018.x001>.
- Gatlin III, Delbert M, Frederic T Barrows, Paul Brown, Konrad Dabrowski, T Gibson Gaylord, Ronald W Hardy, Eliot Herman, et al. 2007. “Expanding the Utilization of Sustainable Plant Products in Aquafeeds: A Review,” 551–79. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2007.01704.x>.
- Gerland, Patrick, Nan Li, Danan Gu, Thomas Spoorenberg, Leontine Alkema, Bailey K Fosdick, Jennifer Chunn, Nevena Lalic, Guiomar Bay, and Thomas Buettner. 2014. “World Population Stabilization Unlikely This Century” 346 (6206).
- Giorgini, Elisabetta, Basilio Randazzo, Giorgia Gioacchini, Gloriana Cardinaletti, Lisa Vaccari, Emilio Tibaldi, and Ike Olivotto. 2018. “New Insights on the Macromolecular Building of Rainbow Trout (*O. Mykiss*) Intestine: FTIR Imaging and Histological Correlative Study.” *Aquaculture* 497 (March): 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.07.032>.
- Glencross, Brett D., Douglas R. Tocher, Matthew Chessor, and J. Gordon Bell. 2014.

- “Interactions between Dietary Docosahexaenoic Acid and Other Long-Chain Polyunsaturated Fatty Acids on Performance and Fatty Acid Retention in Post-Smolt Atlantic Salmon ( *Salmo Salar* ),” 1213–27. <https://doi.org/10.1007/s10695-014-9917-8>.
- Glencross, Brett D. 2009. “Exploring the Nutritional Demand for Essential Fatty Acids by Aquaculture Species,” 71–124. <https://doi.org/10.1111/j.1753-5131.2009.01006.x>.
- Helena, C, G Larry Newton, R Curt Lacy, and Milan Kozánek. 2015. “The Use of Fly Larvae for Organic Waste Treatment” 35: 68–80. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2014.09.026>.
- Hemaiswarya, S., R. Raja, R. Ravi Kumar, V. Ganesan, and C. Anbazhagan. 2011. “Microalgae: A Sustainable Feed Source for Aquaculture.” *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. <https://doi.org/10.1007/s11274-010-0632-z>.
- Henchion, Maeve, Maria Hayes, Anne Maria Mullen, Mark Fenelon, and Brijesh Tiwari. 2017. “Future Protein Supply and Demand: Strategies and Factors Influencing a Sustainable Equilibrium,” 1–21. <https://doi.org/10.3390/foods6070053>.
- Henriksson, Patrik, and Duncan Leadbitter. 2015. “China’s Aquaculture and the World’s Wild Fisheries” 347 (6218): 133–36.
- Henry, M A, L Gasco, S Chatzifotis, and G Piccolo. 2018. “Does Dietary Insect Meal Affect the Fish Immune System? The Case of Mealworm, *Tenebrio Molitor* on European Sea Bass, *Dicentrarchus Labrax*.” *Developmental and Comparative Immunology* 81: 204–9. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2017.12.002>.
- Henry, M, L Gasco, G Piccolo, and E Fountoulaki. 2015. “Review on the Use of Insects in the Diet of Farmed Fish: Past and Future.” *Animal Feed Science and Technology* 203: 1–22. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2015.03.001>.

- Huang, S S Y, A N Oo, D A Higgs, C J Brauner, and S Satoh. 2007. “Effect of Dietary Canola Oil Level on the Growth Performance and Fatty Acid Composition of Juvenile Red Sea Bream , Pagrus Major” 271: 420–31. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.06.004>.
- Huis, Arnold van, Joost van Itterbeeck, Harmke Klunder, Esther Mertens, Afton Halloran, Giulia Muir, and Paul Vantomme. 2013. *Future Prospects for Food and Feed Security. Food and Agriculture Organization of the United Nations*. Vol. 171. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>.
- Hunter, Belinda J, Geoff L Allan, and David C K Roberts. 2000. “Meat Meal Replacement in Diets for Silver Perch, Bidyanus Bidyanus.” *Journal of Applied Aquaculture* 10 (3): 51–67. [https://doi.org/10.1300/J028v10n03\\_05](https://doi.org/10.1300/J028v10n03_05).
- Kalová, Markéta, and Marie Borkovcová. 2013. “Voracious Larvae Hermetia Illucens and Treatment of Selected Types of Biodegradable Waste” LXI (1).
- Karpouzi, Vasiliki S, Reg Watson, and Daniel Pauly. 2007. “Modelling and Mapping Resource Overlap between Seabirds and Fisheries on a Global Scale : A Preliminary Assessment” 343: 87–99. <https://doi.org/10.3354/meps06860>.
- Kelemu, S, S Niassy, B Torto, K Fiaboe, H Affognon, H Tonnang, N.K Maniania, and S Ekesi. 2015. “African Edible Insects for Food and Feed: Inventory, Diversity, Commonalities and Contribution to Food Security” 1 (2): 103–19. <https://doi.org/10.3920/JIFF2014.0016>.
- Khan, MA, S Khan, and K Miyan. 2011. “Aquaculture as a Food Production System : A Review” 3: 291–302.
- Kroeckel, S, A E Harjes, I Roth, H Katz, S Wuertz, A Susenbeth, and C Schulz. 2012. “When a Turbot Catches a Fly : Evaluation of a Pre-Pupae Meal of the Black Soldier

- Fly ( *Hermetia Illucens*) as Fi Sh Meal Substitute Growth Performance and Chitin Degradation in Juvenile Turbot (*Psetta Maxima*)” 365: 345–52.
- Kumar, B Pavan, Kurva Raghu Ramudu, and B Chamundeswari Devi. 2014. “Mini Review on Incorporation of Cotton Seed Meal , an Alternative to Fish Meal in Aquaculture Feeds” 2 (2): 99–105. <https://doi.org/10.14419/ijbr.v2i2.3274>.
- Lafrance, Véronique, Wataru Inoue, Bernard Kan, and Giamal N Luheshi. 2010. “Brain, Behavior, and Immunity Leptin Modulates Cell Morphology and Cytokine Release in Microglia.” *Brain Behavior and Immunity* 24 (3): 358–65. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2009.11.003>.
- Lawrence, Christian, Isaac Adatto, Jason Best, Althea James, and Kara Maloney. 2012. “Generation Time of Zebrafish (*Danio Rerio*) and Medakas (*Oryzias Latipes*) Housed in the Same Aquaculture Facility.” *Lab Animal* 41 (June): 158. <https://doi.org/10.1038/lab0612-158>.
- Li, Aixuan, Xiaochen Yuan, Xu-fang Liang, Liwei Liu, Jie Li, Bin Li, Jinguang Fang, et al. 2016. “Adaptations of Lipid Metabolism and Food Intake in Response to Low and High Fat Diets in Juvenile Grass Carp (*Ctenopharyngodon Idellus*).” *Aquaculture* 457: 43–49. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.01.014>.
- Magalhães, Rui, Antonio Sánchez-lópez, Renato Silva, Silvia Martínez-llorens, Aires Oliva-teles, and Helena Peres. 2017. “Black Soldier Fly (*Hermetia Illucens* ) Pre-Pupae Meal as a Fish Meal Replacement in Diets for European Seabass (*Dicentrarchus Labrax*).” *Aquaculture* 476 (April): 79–85. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.04.021>.
- Makkar, Harinder P S, Gilles Tran, Valérie Heuzé, and Philippe Ankers. 2014. “State-of-the-Art on Use of Insects as Animal Feed.” *Animal Feed Science and Technology*

- 197: 1–33. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2014.07.008>.
- Marco, M De, S Martínez, F Hernandez, J Madrid, F Gai, L Rotolo, M Belforti, et al. 2015. “Nutritional Value of Two Insect Larval Meals (Tenebrio Molitor and Hermetia Illucens) for Broiler Chickens: Apparent Nutrient Digestibility, Apparent Ileal Aminoacid Digestibility and Apparent Metabolizable Energy.” *Animal Feed Science and Technology* 209: 211–18. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2015.08.006>.
- Mazurkiewicz, Jan, Krzysztof Dudek, Paola Gobbi, J Damian, and Silvia Nogales-m. 2018. “Insect Meals in Fish Nutrition,” 1–24. <https://doi.org/10.1111/raq.12281>.
- Men, Keke, Qinghui Ai, Kangsen Mai, Wei Xu, Yanjiao Zhang, and Huihui Zhou. 2014. “Effects of Dietary Corn Gluten Meal on Growth , Digestion and Protein Metabolism in Relation to IGF-I Gene Expression of Japanese Seabass , Lateolabrax Japonicus.” *Aquaculture* 428–429: 303–9. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.03.028>.
- Meneguz, Marco, Achille Schiavone, Francesco Gai, Andrea Dama, Carola Lussiana, and Laura Gasco. 2018. “Effect of Rearing Substrate on Growth Performance, Waste Reduction Efficiency and Chemical Composition of Black Soldier Fly (Hermetia Illucens) Larvae,” no. May. <https://doi.org/10.1002/jsfa.9127>.
- Merino, Gorke, Manuel Barange, Julia L Blanchard, James Harle, Robert Holmes, Icarus Allen, Edward H Allison, et al. 2012. “Can Marine Fisheries and Aquaculture Meet Fish Demand from a Growing Human Population in a Changing Climate ?” *Global Environmental Change* 22 (4): 795–806. <https://doi.org/10.1016/j.gloenvcha.2012.03.003>.
- Miller, Matthew R, Peter D Nichols, and Chris G Carter. 2019. “N -3 Oil Sources for Use in Aquaculture – Alternatives to the Unsustainable Harvest of Wild Fish” 2006 (2008): 85–96. <https://doi.org/10.1017/S0954422408102414>.

- Mingarro, M, and J A Calduch-giner. 2004. “Protein Growth Performance , Amino Acid Utilisation and Somatotropic Axis Responsiveness to Fish Meal Replacement by Plant Protein Sources in Gilthead Sea Bream ( Sparus Aurata )” 232: 493–510. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(03\)00532-5](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(03)00532-5).
- Minno, Matteo Nicola Dario Di, Anna Russolillo, Roberta Lupoli, Pasquale Ambrosino, Alessandro Di Minno, and Giovanni Tarantino. 2012. “Omega-3 Fatty Acids for the Treatment of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease” 18 (41): 5839–47. <https://doi.org/10.3748/wjg.v18.i41.5839>.
- Moutinho, Sara, Silvia Martínez-llorens, Ana Tomás-vidal, Miguel Jover-cerdá, Aires Oliva-teles, and Helena Peres. 2017. “Meat and Bone Meal as Partial Replacement for Fi Sh Meal in Diets for Gilthead Seabream (Sparus Aurata) Juveniles: Growth , Feed Efficiency, Aminoacid Utilization, and Economic Efficiency.” *Aquaculture* 468 (999): 271–77. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.10.024>.
- Muller, Arianne, Diana Wolf, and Herwig O Gutzeit. 2017. “The Black Soldier Fly , Hermetia Illucens – a Promising Source for Sustainable Production of Proteins , Lipids and Bioactive Substances” 72: 351–63. <https://doi.org/10.1515/znc-2017-0030>.
- Mussatto, Solange I., Ercilia M.S. Machado, Silvia Martins, and Josè A. Teixeira. 2011. “Production , Composition , and Application of Coffee and Its Industrial Residues,” 661–72. <https://doi.org/10.1007/s11947-011-0565-z>.
- Nasopoulou, C, and I Zabetakis. 2012. “Benefits of Fish Oil Replacement by Plant Originated Oils in Compounded Fish Feeds.” *LWT - Food Science and Technology* 47 (2): 217–24. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2012.01.018>.
- Neori, Amir. 2014. ““ Green Water ’ Microalgae : The Leading Sector in World Aquaculture,” no. February 2011. <https://doi.org/10.1007/s10811-010-9531-9>.

- Newton, G L, D C Sheppard, and G J Burtle. 2007. “Research Briefs: Black Soldier Fly Prepupae -A Compelling Alternative to Fish Meal and Fish Oil.”
- Newton, Richard, Julien R Stevens, Richard W Newton, Michael Tlusty, and David C Little. 2018. “The Rise of Aquaculture By-Products : Increasing Food Production , Value , and Sustainability through Strategic Utilisation The Rise of Aquaculture by-Products : Increasing Food Production , Value , and Sustainability through Strategic Utilisation.” *Marine Policy*, no. January: 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.marpol.2017.12.027>.
- Nogales-Merida, Silvia, Paola Gobbi, Damian Jozefiak, Jan Mazurkiewicz, Krzysztof Dudek, Mateusz Rawski, Bartosz Kieronczyk, and Agata Josefiak. 2018. “Insect Meals in Fish Nutrition,” 1–24. <https://doi.org/10.1111/raq.12281>.
- Nordrum S., Bakke-McKellep, Krogdahl A., Buddington R. K. 2000. “Effects of Soybean Meal and Salinity on Intestinal Transport of Nutrients in Atlantic Salmon ( *Salmo Salar* L .) and Rainbow Trout ( *Oncorhynchus Mykiss* )” 125: 317–35.
- Olivotto, I, S Yasumasu, G Gioacchini, F Maradonna, C Cionna, and O Carnevali. 2004. “Cloning and Expression of High Choriolytic Enzyme, a Component of the Hatching Enzyme System, during Embryonic Development of the Marine Ornamental Fish *Chrysiptera Parasema*,” 1235–41. <https://doi.org/10.1007/s00227-004-1404-9>.
- P. Lehodey, J. Alheit, M. Barange, T. Baumgartner, G. Beaugrand, K. Drinkwater, J.-M. Fromentin, S. R. Hare, G. Ottersen, R. I. Perry, C. Roy, C. D. Van der lingen, and F. Wernerl. 2006. “Climate Variability, Fish, and Fisheries,” 8–10.
- Piccinetti, Chiara Carla, Beatrice Migliarini, Ike Olivotto, Giuliana Coletti, Adolfo Amici, and Oliana Carnevali. 2010. “Hormones and Behavior Appetite Regulation: The Central Role of Melatonin in *Danio Rerio*.” *Hormones and Behavior* 58 (5): 780–85.

<https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2010.07.013>.

Pickova, Jana. 2007. "Alternate Oils in Fish Feeds," 256–63.

<https://doi.org/10.1002/ejlt.200600222>.

Pinstrup-Andersen P, Pandya-Lorch R, Rosegrant MW, 1997. 1997. *The World Focus Situation: Recent Developments, Emerging Issues, and Long-Term Prospects*.

Renna, M, A Schiavone, F Gai, S Dabbou, C Lussiana, V Malfatto, M Prearo, M T Capucchio, and I Biasato. 2017. "Evaluation of the Suitability of a Partially Defatted

Black Soldier Fly ( *Hermetia Illucens L .* ) Larvae Meal as Ingredient for Rainbow Trout ( *Oncorhynchus Mykiss Walbaum* ) Diets," 1–13.

<https://doi.org/10.1186/s40104-017-0191-3>.

Ringø, E, Z Zhou, RE Olsen, and SK Song. 2012. "Use of Chitin and Krill in Aquaculture- the Effect on Gut Microbiota and the Immune System: A Review," no. Jeuniaux

1961. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2011.00919.x>.

Rosamond L. Naylor, Ronald W. Hardy, Dominique P. Bureau, Alice Chiu, Matthew Elliott, Anthony P. Farrell, Ian Forster, Delbert M. Gatlin, Rebecca J. Goldberg,

Katheline Hua, and Peter D. Nichols. 2009. "Feeding Aquaculture in an Era of Finite Resources" 106 (42). <https://doi.org/10.1073/pnas.0910577106>.

Sánchez-Muros, María-josé, Fernando G Barroso, and Francisco Manzano-agugliaro.

2014. "Insect Meal as Renewable Source of Food for Animal Feeding: A Review" 65: 16–27.

Sanchez, Guadalupe, and Ruth Calienes. 2000. "The 1997-98 El Nino and It's Effects on the Costal Marine Ecosystem of Peru" 41.

Sarker, Pallab K, Anne R Kapuscinski, Ashley Y Bae, Emily Donaldson, Alexander J Sitek, Devin S Fitzgerald, and Oliver F Edelson. 2018. "Towards Sustainable

- Aquafeeds: Evaluating Substitution of Fishmeal with Lipid-Extracted Microalgal Co-Product (*Nannochloropsis Oculata*) in Diets of Juvenile Nile Tilapia (*Oreochromis Niloticus*)." *PLOS ONE* 13 (7): e0201315. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0201315>.
- Sato, Tomonori, and Kotaro Kikuchi. 1997. "Meat Meal as a Protein Source in the Diet of Juvenile Japanese Flounde." *Fisheries Science* 63 (6): 877–80. <https://doi.org/10.2331/fishsci.63.877>.
- Schwartzlose, R A, J Alheit, A Bakun, T R Baumgartner, R Cloete, R J M Crawford, W J Fletcher, et al. 1999. "Worldwide Large-Scale Fluctuations of Sardine and Anchovy Populations," no. October 1998: 289–347.
- Scorletti, Eleonora, and Christopher D Byrne. 2018. "Molecular Aspects of Medicine Omega-3 Fatty Acids and Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: Evidence of Efficacy and Mechanism of Action," no. January.
- Secci, Giulia, Simone Mancini, Valeria Iaconisi, Laura Gasco, Ana Basto, and Giuliana Parisi. 2019. "Can the Inclusion of Black Soldier Fly (*Hermetia Illucens*) in Diet Affect the Flesh Quality/Nutritional Traits of Rainbow Trout (*Oncorhynchus Mykiss*) after Freezing and Cooking?" *International Journal of Food Sciences and Nutrition* 70 (2): 161–71. <https://doi.org/10.1080/09637486.2018.1489529>.
- Sheppard, D Craig, G Larry Newton, Sidney A Thompson, and Stan Savage. 1994. "A Value Added Manure Management System Using the Black Soldier Fly." *Bioresource Technology* 50 (3): 275–79. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0960-8524\(94\)90102-3](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0960-8524(94)90102-3).
- Smetana, Sergiy, Megala Palanisamy, Alexander Mathys, and Volker Heinz. 2016. "Sustainability of Insect Use for Feed and Food: Life Cycle Assessment Perspective."

*Journal of Cleaner Production* 137: 741–51.  
<https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2016.07.148>.

Smetana, Sergiy, Eric Schmitt, and Alexander Mathys. 2019. “Resources , Conservation & Recycling Sustainable Use of *Hermetia Illucens* Insect Biomass for Feed and Food : Attributional and Consequential Life Cycle Assessment.” *Resources, Conservation & Recycling* 144 (January): 285–96. <https://doi.org/10.1016/j.resconrec.2019.01.042>.

Sobrinho Crespo, Carmen, Aránzazu Perianes Cachero, Lilian Puebla Jiménez, Vicente Barrios, and Eduardo Arilla Ferreiro. 2014. “Peptides and Food Intake” 5 (April): 1–13. <https://doi.org/10.3389/fendo.2014.00058>.

Spranghers, Thomas, Matteo Ottoboni, Cindy Klootwijk, Anneke Owyn, Stefaan Deboosere, Bruno De Meulenaer, Joris Michiels, Mia Eeckhout, Patrick De Clercq, and Stefaan De Smet. 2017. “Nutritional Composition of Black Soldier Fly (*Hermetia Illucens*) Prepupae Reared on Different Organic Waste Substrates.” *Journal of the Science of Food and Agriculture* 97 (8): 2594–2600. <https://doi.org/10.1002/jsfa.8081>.

St-Hilaire, S., Cranfill, K., McGuire, M. A., Mosley, E. E., Tomberlin, J. K., Newton, L., Irving, S. 2007. “Fish Offal Recycling by the Black Soldier Fly Produces a Foodstuff High in Omega-3 Fatty Acids” 38 (2): 309–13.

Stadtlander, T, A Stamer, A Buser, J Wohlfahrt, F Leiber, and C Sandrock. 2017. “*Hermetia Illucens* Meal as Fish Meal Replacement for Rainbow Trout on Farm” 3 (3): 165–75. <https://doi.org/10.3920/JIFF2016.0056>.

Tacon, Albert G J, and Marc Metian. 2008. “Global Overview on the Use of Fish Meal and Fish Oil in Industrially Compounded Aquafeeds: Trends and Future Prospects.” *AQC* 285 (1–4): 146–58. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.08.015>.

- Tilman, David, Christian Balzer, Jason Hill, and Belinda L Befort. 2011. "Global Food Demand and the Sustainable Intensification of Agriculture" 108 (50). <https://doi.org/10.1073/pnas.1116437108>.
- Trusty, Michael F, and Øistein Thorsen. 2017. "Claiming Seafood Is ' Sustainable ' Risks Limiting Improvements," no. May 2016: 340–46. <https://doi.org/10.1111/faf.12170>.
- Tocher, Douglas R. 2010. "Fatty Acid Requirements in Ontogeny of Marine and Freshwater Fish," 717–32. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2008.02150.x>.
- Tocher, Douglas R, Morris Agaba, Nicola Hastings, and Alan J Teale. 2003. "Biochemical and Molecular Studies of the Polyunsaturated Fatty Acid Desaturation Pathway in Fish," 1–30.
- Truzzi, C, S Illuminati, A Annibaldi, M Antonucci, and G Scarponi. 2017. "Chemosphere Quantification of Fatty Acids in the Muscle of Antarctic Fish *Trematomus Bernacchii* by Gas Chromatography-Mass Spectrometry: Optimization of the Analytical Methodology." *Chemosphere* 173: 116–23. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.12.140>.
- Truzzi, C, S Illuminati, M Antonucci, G Scarponi, and A Annibaldi. 2018. "Heat Shock Influences the Fatty Acid Composition of the Muscle of the Antarctic Fish *Trematomus Bernacchii*." *Marine Environmental Research* 139 (January): 122–28. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2018.03.017>.
- Turchini, Giovanni M, Bente E Torstensen, and Wing-keong Ng. 2009. "Fish Oil Replacement in Finfish Nutrition," 10–57. <https://doi.org/10.1111/j.1753-5131.2008.01001.x>.
- Ushakova, N A, E S Brodskii, A A Kovalenko, A I Bastrakov, A A Kozlova, and Academician D S Pavlov. 2016. "Characteristics of Lipid Fractions of Larvae of the

- Black Soldier Fly *Hermetia Illucens*” 468 (4): 462–65.  
<https://doi.org/10.1134/S1607672916030145>.
- Vargas-Abúndez, Arturo Jorge, Basilio Randazzo, Marco Foddai, Lorenzo Sanchini, Cristina Truzzi, Elisabetta Giorgini, Laura Gasco, and Ike Olivotto. 2019. “Insect Meal Based Diets for Clown Fish: Biometric, Histological, Spectroscopic, Biochemical and Molecular Implications.” *Aquaculture* 498 (August 2018): 1–11.  
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.08.018>.
- Vargas, Arturo, Basilio Randazzo, Paola Riolo, Cristina Truzzi, Giorgia Gioacchini, Elisabetta Giorgini, Nino Loreto, et al. 2018. “Rearing Zebrafish on Black Soldier Fly (*Hermetia Illucens*): Biometric, Histological, Spectroscopic, Biochemical, and Molecular Implications.” *Zebrafish* 15 (4): 404–19.  
<https://doi.org/10.1089/zeb.2017.1559>.
- Vielma, Jouni. 2000. “Influence of Dietary Soy and Phytase Levels on Performance and Body Composition of Large Rainbow Trout ž *Oncorhynchus Mykiss* / and Algal Availability of Phosphorus Load.”
- Volkoff, Hélène. 2006. “The Role of Neuropeptide Y, Orexins, Cocaine and Amphetamine-Related Transcript , Cholecystokinin , Amylin and Leptin in the Regulation of Feeding in Fish” 144: 325–31.  
<https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2005.10.026>.
- Voorhees, Jill M., Michael E. Barnes, Steven R. Chipps, and Michael L. Brown. 2019. “Bioprocessed Soybean Meal Replacement of Fish Meal in Rainbow Trout (*Oncorhynchus Mykiss*) Diets.” *Cogent Food & Agriculture* 5 (1).  
<https://doi.org/10.1080/23311932.2019.1579482>.
- Welch, A, R Hoenig, J Stieglitz, D Benetti, A Tacon, N Sims, and B O’Hanlon. 2010.

- “From Fishing to the Sustainable Farming of Carnivorous Marine Finfish.” *Reviews in Fisheries Science* 18 (3): 235–47. <https://doi.org/10.1080/10641262.2010.504865>.
- Xiao, Xiaopeng, Peng Jin, Longyu Zheng, Minmin Cai, Ziniu Yu, Jeffrey Yu, and Jibin Zhang. 2018. “Effects of Black Soldier Fly (*Hermetia Illucens*) Larvae Meal Protein as a Fishmeal Replacement on the Growth and Immune Index of Yellow Catfish (*Pelteobagrus Fulvidraco*).” <https://doi.org/10.1111/are.13611>.
- Yaakob, Zahira, Ehsan Ali, Afifi Zainal, Masita Mohamad, and Mohd Sobri Takriff. 2014. “An Overview: Biomolecules from Microalgae for Animal Feed and Aquaculture,” 1–10.
- Yamashita, Michiaki, Takeshi Yabu, and Nobuhiko Ojima. 2010. “Stress Protein HSP70 in Fish” 3 (4): 111–41. <https://doi.org/10.5047/absm.2010.00304.0111>.
- Yarnold, Jennifer, Hakan Karan, Melanie Oey, and Ben Hankamer. 2019. “Microalgal Aquafeeds As Part of a Circular Bioeconomy.” *Trends in Plant Science*. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2018.11.010>.
- Yiwen, L U O, A I Qinghui, M A I Kangsen, Zhang Wenbing, X U Wei, and Zhang Yanjiao. 2013. “Effects of Dietary Corn Gluten Meal on Growth Performance and Protein Metabolism in Relation to IGF-I and TOR Gene Expression of Juvenile Cobia ( *Rachycentron Canadum* )” 12 (3): 418–19. <https://doi.org/10.1007/s11802-013-2021-3>.
- Zarantoniello, Matteo, Basilio Randazzo, Cristina Truzzi, Elisabetta Giorgini, Claudia Marcellucci, Jorge Arturo Vargas-abúndez, Andrea Zimbelli, et al. 2019. “A Six-Months Study on Black Soldier Fly (*Hermetia Illucens*) Based Diets in Zebrafish,” no. December 2018: 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-45172-5>.
- Zhou, Qi-cun, and Yi-rong Yue. 2010. “Effect of Replacing Soybean Meal with Canola

Meal on Growth , Feed Utilization and Haematological Indices of Juvenile Hybrid Tilapia , Oreochromis Niloticus × Oreochromis Aureus,” 982–90. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2009.02381.x>.

Zhou, Zhigang, Ørjan Karlsen, Suxu He, Rolf Erik Olsen, Bin Yao, and Einar Ringø. 2013. “The Effect of Dietary Chitin on the Autochthonous Gut Bacteria of Atlantic Cod (Gadus Morhua L.),” 1889–1900. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2012.03194.x>.