



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE

DIPARTIMENTO DI SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE

Corso di Laurea Magistrale in

Biologia Marina

**Hermetia illucens come ingrediente nei mangimi per zebrafish
(Danio rerio): effetti sulla riproduzione.**

**Dietary inclusion of Hermetia illucens in zebrafish (Danio rerio)
feed: effects on reproduction.**

Tesi di Laurea Magistrale di:

Federica Matilde Di Renzo

Relatore:

Prof. Ike Olivotto

Correlatore:

Matteo Zarantoniello

Anno accademico 2020/2021

INDICE

1. INTRODUZIONE	4
1.1 Acquacoltura e sostenibilità	4
1.2 Farine ed oli di pesce	9
1.3 Farine vegetali	11
1.3.1 Microalghe	17
1.3.2 Scarti della macellazione agricola	22
1.3.3 Insetti	24
1.3 Ciclo ovarico di zebrafish	31
1.4 Dieta e riproduzione	33
2. SCOPO DELLA TESI	37
3. MATERIALI E METODI	39
3.1 Modelli sperimentali	39
3.1.1 Zebrafish	39
3.1.2 <i>Hermetia illucens</i>	41
3.2 Etica	42
3.3 Allevamento degli insetti	43
3.4 Produzione delle diete destinate agli zebrafish	44
3.5 Pesci	46
3.6 Disegno sperimentale	46
3.7 Programma di alimentazione	47
3.8 Biometria	48
3.9 Raccolta degli embrioni e tasso di schiusa	48
3.10 Estrazione dei lipidi e composizione degli acidi grassi	49
3.11 Istologia	51
3.12 Analisi molecolari	53
3.12.1 Estrazione di RNA e sintesi del cDNA	53
3.12.2 Real-time PCR	53
3.13 Analisi statistica	55

4. RISULTATI	56
4.1 Biometrie.....	56
4.2 Performance riproduttive	57
4.3 Contenuto e composizione degli acidi grassi.....	59
4.3.1. Diete.....	59
4.3.2 Femmine adulte di zebrafish.....	59
4.3.3 Uova fecondate	61
4.4 Analisi istologica del fegato e ovario di zebrafish	66
4.5 Analisi molecolari.....	69
5. DISCUSSIONE	71
6. CONCLUSIONE	76
7. BIBLIOGRAFIA.....	77

1. INTRODUZIONE

1.1 Acquacoltura e sostenibilità

L'acquacoltura consiste nell'allevamento di organismi acquatici in ambienti controllati e gestiti dall'uomo, con lo scopo di ottenere maggiori produzioni e, quindi, maggiori profitti. Le prime testimonianze di questo metodo risalgono alle più antiche dinastie cinesi ed egiziane che le tramandarono a loro volta alle nascenti popolazioni etrusche e romane. L'acquacoltura si differenzia in tre diversi metodi di allevamento:

- **Estensivo**, caratterizzato dal fatto che l'uomo non somministra nessun alimento ai pesci: questi ultimi si alimentano naturalmente, sfruttando le risorse fornite dall'ambiente. Viene praticato su grandi estensioni d'acqua e bassa densità di allevamento.
- **Semi Intensivo**, prevede una densità massima di 20 kg/m³, qui si nota l'intervento dell'uomo integrando la dieta naturale degli organismi, e nei controlli, utilizzando misure di difesa dalle patologie e dai predatori.

- **Intensivo**, che consiste in un massiccio intervento da parte dell'uomo per tutte le fasi dell'allevamento, dalla riproduzione allo svezzamento all'ingrasso, attraverso l'utilizzo impianti di depurazione ed ossigenazione, in grado di sopportare anche densità superiori ai 100 kg per metro cubo.

Negli ultimi 50 anni, la ricerca scientifica ha permesso di migliorare la comprensione della funzione degli ecosistemi acquatici e la necessità di saper gestire in maniera sostenibile le risorse che questi ci offrono. Nel 2018, si è stimato che, la produzione globale di pesce ha raggiunto le 179 milioni di tonnellate (Fig.1) delle quali 156 sono state usate per il consumo umano, equivalente ad una fornitura annua stimata di 20,5 Kg pro-capite, mentre le rimanenti 22 sono state destinate alla produzione di farine di pesce (FM) e oli di pesce (FO). Dal 1961 ad oggi l'incremento del consumo di specie ittiche è aumentato in media dell'1,5% annuo.

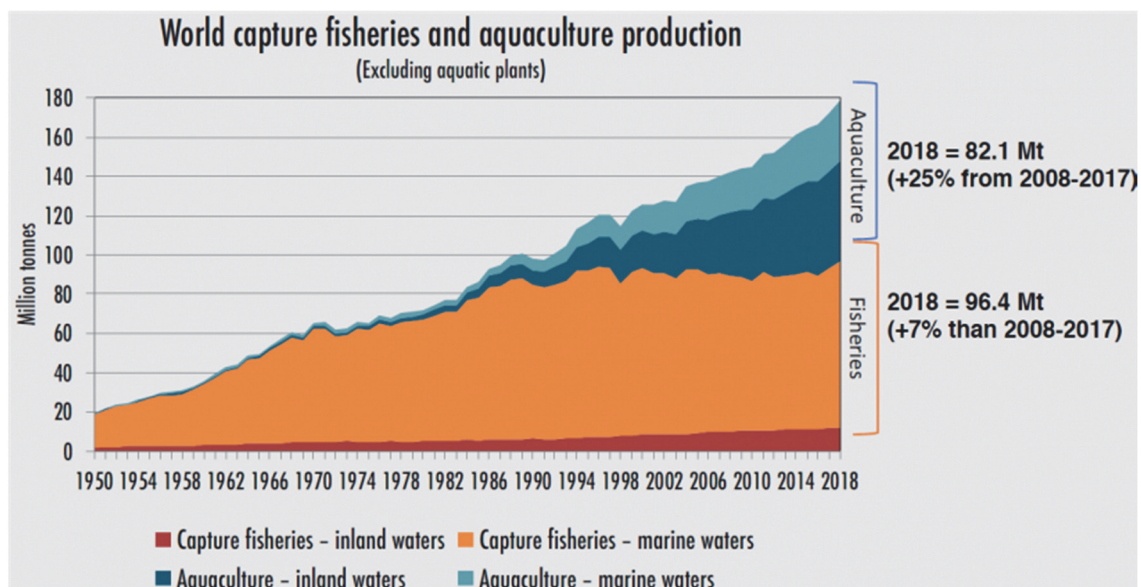


Figura 1. Andamento dei settori di pesca e acquacoltura nel mondo dal 1950 al 2018

Dalla Figura 1 risulta evidente come la quantità di pescato resti pressoché costante dagli anni '90 ad oggi, mentre il settore dell'acquacoltura è in costante crescita. Questo è probabilmente la conseguenza della pesca eccessiva, come dimostrato dalla valutazione FAO di 600 tipi di pesca marina (FAO, 2020), a causa sia della produzione di alimenti per l'uomo, sia delle già grandi richieste di farine di pesce. Mentre la crescita dell'acquacoltura è dipesa sia per il numero di specie allevate (circa 430) sia per la quantità del prodotto. Il principale produttore di pesce è la Cina, con il 35% della produzione mondiale, seguita dall'Asia con il 34%, Americhe 14%, Europa 10%, Africa 7% ed Oceania 1%. Persistono comunque differenze tra i paesi sviluppati, dove il consumo indicativo di pesce è di circa 24,4 Kg pro-capite, e gli altri paesi: ad esempio, in quelli in via di sviluppo, il consumo di pesce pro-capite è di circa

19,4 Kg, mentre nei paesi poco sviluppati l'ammontare risale a circa 12,6 Kg. (FAO, 2020). Il divario mondiale tra domanda e offerta di prodotto ittico può essere utilizzato per misurare il potenziale di crescita dell'acquacoltura in tutto il mondo poiché si prevede che l'acquacoltura sarà la principale, se non l'unica, fonte di crescita dell'offerta di pesce. Per far fronte alle pressioni della domanda e assicurare al tempo stesso uno sviluppo sostenibile del settore, sarà infatti necessario diminuire sempre più la pesca tradizionale a favore dell'acquacoltura. Quest'ultima presenta vantaggi e svantaggi. Uno dei principali vantaggi è la possibilità di ridurre la pesca tradizionale, causa di un forte impatto sull'ecosistema dovuto alla riduzione drastica degli stock ittici naturali. Altro vantaggio è quello di creare lavoro e muovere l'economia, in particolare nei Paesi in via di sviluppo, fornendo così anche un mezzo di auto sostentamento economico, ma soprattutto alimentare, permettendo a molte popolazioni di alimentarsi con proteine di origine animale che, in Paesi come l'Africa, ad esempio, sono carenti. Pur essendo una validissima alternativa allo sfruttamento degli stock ittici naturali, l'acquacoltura ha determinato una serie di impatti ambientali ed ecologici negativi. Risulta responsabile di importanti cambiamenti sulle zone umide costiere, principalmente mangrovieti, laghi costieri e lagune (Veettil et al., 2019) che fungono da aree di nursery per un gran numero di specie di pesci e crostacei nelle prime fasi della vita (Primavera

et al., 2018). Inoltre, è ampiamente dimostrato come a causa del grande quantitativo di mangime somministrato e delle elevate densità di allevamento, l'acquacoltura produca alti livelli di rifiuti organici come feci, residui di cibo, metaboliti. Queste sostanze organiche sono in grado di portare forti squilibri ambientali che possono indurre eutrofizzazione (Rennie et al., 2019) con conseguenze negative per l'ambiente circostante, soprattutto a livello dei fondali. Esistono specifiche procedure in grado di processare ed eliminare deiezioni e scarti, le quali comportano un costo di smaltimento non indifferente, anche dal punto di vista economico. Mentre per gli allevamenti a terra sono previsti impianti di depurazione fognaria, in mare aperto dove si utilizzano le gabbie, l'unico metodo consiste nello spostare l'allevamento periodicamente, oltre che nel tenere sempre in considerazione la direzione delle correnti, così da evitare di far accumulare troppi scarti in un unico punto. Gli effluenti in acquacoltura possono anche contenere una varietà di componenti che potrebbero causare impatti negativi, come l'inquinamento delle acque, in particolare sostanze chimiche (Chemello et al., 2016), soprattutto biocidi utilizzati come disinfettanti o nei trattamenti antivegetativi di reti e impianti subacquei. Questi prodotti provocano effetti tossici, che spesso ricadono su organismi selvatici, quali rallentamento della crescita nei molluschi, danni agli apparati respiratori dei pesci e inibizione della crescita del fitoplancton. Sono

state riscontrate malattie in seguito all'elevata densità di allevamento tipica delle pratiche di acquacoltura. Altro problema legato all'acquacoltura riguarda la salinizzazione di acque dolci e terreni agricoli, in quanto andando ad allevare specie marine, si vanno a modificare ed alterare i terreni limitrofi, portando ad un aumento delle concentrazioni di sale, con conseguente moria di piante e l'inevitabile perdita di terreni coltivabili. Non meno importante, l'impatto strettamente correlato all'industria dell'acquacoltura, come la distruzione di ecosistemi vergini per far spazio agli allevamenti. Infine, la principale problematica che impedisce uno sviluppo sostenibile dell'acquacoltura è legata alla mangimistica che come ingredienti utilizza farina di pesce ed olio di pesce. Questi rappresentano gli ingredienti ottimali grazie al loro profilo amminoacidico e lipidico ma non possono più ritenersi sostenibili in quanto gli stock ittici naturali sono oggi eccessivamente sfruttati.

1.2 Farine ed oli di pesce

Per molto tempo, la farina di pesce (FM) e l'olio di pesce (FO) sono stati gli ingredienti standard nella formulazione dei mangimi, poiché soddisfano i requisiti nutrizionali della maggior parte delle specie ittiche allevate (Tacon & Metian, 2015). Questi mangimi vengono prodotti utilizzando piccoli pelagici,

tra cui sgombri, aringhe, sardine e acciughe delle quali Cile e Perù costituiscono i maggiori fornitori mondiali (Giovanni M Turchini et al., 2009). L'importanza nutrizionale delle farine di pesce risiede soprattutto nel loro contenuto proteico, nel profilo amminoacidico e nella loro alta digeribilità (al 95%) e appetibilità. Gli oli di pesce, invece, sono fondamentali per il loro contenuto di acidi grassi polinsaturi. Questi ultimi vengono ottenuti principalmente attraverso la spremitura di piccoli pelagici, mentre le farine di pesce vengono ottenute lasciando essiccare l'intero pesce o una loro parte per poi essere macinata (FAO, 2020). Utilizzando il pesce fresco, si ottiene una resa di lavorazione di circa il 22,5% per la produzione di farina di pesce e del 5% per l'estrazione di olio (Tacon & Metian, 2008). La qualità di queste farine è in stretta correlazione con l'area di pesca e quindi, se nella farina di qualità norvegese saranno presenti soprattutto merluzzi e aringhe, la farina cilena risulterà costituita soprattutto da sardine. In seguito a numerosi studi si è visto che, nel 2018, l'88% delle 179 milioni di tonnellate di pesce erano destinate al consumo umano diretto e le 22 rimanenti venivano utilizzate per altri scopi, tra cui quello di produrre farine ed oli di pesce. Ma confrontandolo con lo studio fatto nel 1994, si è visto che, in quel periodo venivano destinate circa 34 milioni di tonnellate di pesce al consumo indiretto di cibo, determinando un calo di circa il 33% (FAO, 2020). In alternativa, per ridurre lo sfruttamento degli stock ittici, studi condotti

sull'alimentazione dei pesci hanno dimostrato che la farina di Krill risultava ottima nella dieta dei pesci marini poiché ricca di fosfolipidi (Salze et al., 2005). Questo crostaceo, largamente disponibile in natura, ha il potenziale di fornire un elevato quantitativo di proteine, lipidi e altri nutrienti di alta qualità. Nonostante la sua enorme disponibilità, la Commissione per la conservazione delle risorse marine antartiche ha imposto un limite di cattura per il settore atlantico (Hooper et al., 2005) a causa del suo sovrasfruttamento che potrebbe causare un'alterazione della rete trofica. È stato inoltre dimostrato che inclusioni del 30% di krill antartico, migliorano l'ingestione alimentare e la crescita dei salmonidi, del merluzzo e dell'halibut (Ayadi et al., 2012).

1.3 Farine vegetali

Uno dei principali obiettivi dell'acquacoltura, è quello di sostituire farine ed oli di pesce con ingredienti alternativi e più sostenibili. I primi candidati proposti sono state le farine di origine vegetale. Queste includono cereali (ad es. grano e mais), legumi (ad esempio fagioli, lupini e piselli) e semi oleosi (ad esempio soia, girasole, colza, semi di cotone) (Bandara, 2018). Tuttavia, il loro valore nutrizionale varia in seguito a diversi fattori tra cui la stagione e i metodi di lavorazione, implicando problemi nel loro utilizzo. L'ingrediente vegetale

usato come primo candidato è la soia, per il suo alto contenuto proteico (proteina grezza che va da 44% al 48%), alta digeribilità e il miglior profilo di aminoacidi (Pueyo et al., 2016). Sono stati fatti diversi studi per valutare i nuovi ingredienti di origine vegetale. Prove di sostituzione della farina di pesce in diete di orata (*Sparus aurata*) e branzini (*Dicentrarchus labrax*), ha confermato che una sostituzione del 25-30% con farina di soia non provoca effetti negativi sulla crescita, la conversione del cibo, l'efficienza e la ritenzione proteica di queste specie. Si è visto, inoltre, che si può sostituire fino al 50% di farina di pesce con farina di soia bilanciata con l'aggiunta di un integratore aminoacidico sintetico a lento rilascio, senza che vengano ridotte le prestazioni dei pesci (Kotzamanis et al., 2008). Una progressiva sostituzione della farina di pesce della dieta nella tilapia (*Oreochromis niloticus*) utilizzando la soia ha mostrato una riduzione dell'accrescimento all'aumentare della percentuale dell'inclusione. Inoltre, sempre nella tilapia una sostituzione della farina di pesce con farina di soia superiore al 50%, ha effetti negativi anche su fegato e sistema immunitario (Lin & Luo, 2011). Nel Salmone (*Salmo salar*) si è osservato che una sostituzione parziale del mangime commerciale con un mix di farine di soia e glutine di mais porta ad una significativa diminuzione della digeribilità delle proteine, ma non di quella dei lipidi (Opstvedt et al., 2003). Tuttavia, l'utilizzo di ingredienti vegetali, soprattutto nelle specie carnivore più

allevate, porta spesso alla formazione di enteriti e riduzione della salute intestinale. Questo avviene perchè la farina di soia presenta un alto contenuto di carboidrati non digeribili e fattori anti-nutrizionali (ANF). Questi effetti collaterali negativi sono particolarmente noti nei salmonidi. Anche se nell'orata solo pochi studi hanno analizzato l'effetto della farina di soia, in quelle alimentate da un'alta percentuale di farina di soia, sono state descritte infiltrazioni leucocitarie e vacuolizzazione anormale degli enterociti. Inoltre, è ben noto che i fattori anti-nutrizionali causano infiammazione intestinale aumentando i livelli di mRNA di citochine pro-infiammatorie in diverse specie di pesci. Questi fattori includono inibitori della proteasi, fitati, glucosinolati, saponine, tannini, lectine, oligosaccaridi e polisaccaridi non amidacei, fitoestrogeni, alcaloidi, composti antigenici, gossipoli, cianogeni, mimosina, acidi grassi ciclopropenoidi, canavanina e antivitaminici (Krogdahl & Bakke, 2015). Una delle famiglie di molecole responsabili di questi problemi è quella delle saponine, glicosidi termostabili resistenti alla lavorazione a cui i mangimi vengono sottoposti. Queste hanno l'effetto di alterare la struttura intestinale, andando progressivamente a diminuire la capacità di assorbimento dei nutrienti, minando così la performance di crescita dei pesci allevati (Chen et al., 2011). Un'altra molecola dagli effetti avversi è l'acido fitico, maggior componente degli alimenti di origine vegetale. L'acido fitico (mio-inositolo

esafosfato, IP6) è un antiossidante termostabile costituito da un anello di inositolo con sei gruppi fosfato. Circa il 75% del fosforo totale nei cereali e legumi è presente sotto forma di fitato, non prontamente disponibile da parte di animali monogastrici come pollame, maiali e uomo (Wodzinski & Ullah, 1996). L'acido fitico ha il vantaggio di fungere da antiossidante ma, una volta assunto dal pesce, riduce significativamente il tasso di crescita e va ad alterare le caratteristiche organolettiche. Durante i processi di trasformazione e digestione degli alimenti, l'acido fitico può essere parzialmente defosforilato per produrre prodotti di degradazione, come penta, tetra e trifosfati, attraverso l'azione di fitasi endogene, che si ritrovano nella maggior parte dei semi delle piante superiori (Sandberg et al., 1987).

Un'altra problematica collegata all'uso di mangimi a base vegetale riguarda la composizione lipidica, che è totalmente differente rispetto all'olio di pesce.

Gli oli vegetali sono ampiamente utilizzati in acquacoltura a causa del loro costo inferiore e maggiore disponibilità rispetto all'olio di pesce (Giovanni M Turchini et al., 2009). Questi sono ricchi di acido oleico (18:1n-9), acido linoleico (18:2n-6) ed acido α -linolenico (18:3n-3). La ricerca ha riportato che gli oli vegetali possono sostituire quantità sostanziali di olio di pesce nelle diete di molte specie ittiche senza influire sulla crescita o l'efficienza dei mangimi, a condizione che quantità adeguate di acidi grassi essenziali specifici (EFA)

vengano forniti nella dieta (Gatlin III et al., 2007). Dopo notevoli studi, l'interesse verso tali nutrienti si è concentrato sull'aspetto energetico dal momento che i lipidi, se forniti in quantità idonee, consentono di evitare il consumo di proteine per fini energetici, di ridurre il rilascio di azoto nell'ambiente e di migliorare l'indice di conversione alimentare.

Oltre alla soia, sono stati considerati legumi, grazie al loro elevato contenuto di proteine. Come parziali sostitutivi nei mangimi per l'orata sono stati testati diversi legumi quali i piselli, i ceci e i fagioli. L'accrescimento e l'utilizzazione dei diversi mangimi a base di legumi sono stati soddisfacenti, e solo i piselli sembrano influenzare negativamente il fattore di conversione: i legumi possano essere inclusi nella dieta senza problemi fino ad una percentuale del 35%, come già è stato verificato in studi precedenti per il branzino alimentato con la farina di semi di pisello (Adamidou, 2008). La sostituzione della farina di pesce nella dieta di branzino (*D. labrax*) e orata (*S. aurata*) risulta particolarmente interessante per l'acquacoltura data la loro diffusione e importanza commerciale.

Negli ultimi anni è stata presa in considerazione la farina di semi di cotone come sostituto della farina di soia.

Questa farina è un residuo della produzione del cotone, ottenuto dopo che le fibre sono state prelevate e i semi macinati per estrarne l'olio. In Iran è stato testato come sostituto parziale o totale della soia nella dieta della trota iridea (*O. mykiss*): le prove hanno indicato che questa varietà di farina di cotone non influenza negativamente l'accrescimento, anche quando sostituisce la soia al 100%, garantendo performance di crescita simili. Ha inoltre un prezzo inferiore a quello della soia (*Universiti Putra Malaysia Iranian Cottonseed Meal Varieties as Substitute for Soybean Meal in Rainbow Trout (O, 2009)*).

Un'altra fonte proteica vegetale sperimentata nella dieta della trota iridea è rappresentata dal lupino bianco, caratterizzato da un elevato tenore proteico e bassi fattori anti-nutrizionali. In questo caso, i risultati conseguenti a una sostituzione del 30-50% del lupino bianco, hanno dimostrato che tutti i parametri riproduttivi e produttivi non subivano variazioni (Borquez et al., 2011). Pertanto, la scelta delle proteine vegetali in sostituzione della farina di pesce nella dieta delle specie ittiche deve dipendere strettamente dal suo prezzo di mercato, disponibilità, appetibilità e digeribilità, caratteristiche che possono variare da specie a specie.

1.3.1 Microalghe

Le microalghe sono un gruppo di microrganismi fototrofi (usano la luce come fonte di energia) ed autotrofi (usando la CO₂ come fonte di carbonio). Insieme ai cianobatteri, sono i componenti principali del regno vegetale e svolgono un ruolo importante nella formazione e nel mantenimento dell'atmosfera terrestre, nella produzione di ossigeno e nel consumo di anidride carbonica. Costituiscono il fitoplancton, base della catena alimentare, fornendo cibo direttamente o indirettamente a tutti gli animali acquatici. Le microalghe vengono utilizzate anche per la produzione di biomassa come fonte di proteine destinate all'alimentazione umana (health foods) ed animale, come biofertilizzanti e combustibili, come mangimi per l'acquacoltura e nella depurazione di acque di scarico (Pulz & Gross, 2004; Spolaore et al., 2006). Le microalghe, grazie alle loro semplicità strutturale, hanno un'efficienza fotosintetica che, a seconda delle condizioni di crescita, può spingersi fino al 7-8% della radiazione visibile in condizioni di coltura massiva e salire ad un 20% in condizioni di laboratorio ed è nettamente maggiore a quella delle piante superiori (ca 2%). In particolare, le microalghe vengono utilizzate in acquacoltura per creare la "green water" e la "pseudo green water", ma soprattutto perché sono un'importante fonte alimentare nell'allevamento di molti animali acquatici, nelle varie fasi di sviluppo di molluschi bivalvi, fase

larvale di gamberi e in organismi come rotiferi, i quali vengono utilizzati per allevare le larve di pesci e crostacei marini (Borowitzka, 1997). La tecnica “green water” consiste nell’ottenere fioriture naturali di fitoplancton mediante fertilizzazione dell’acqua di mare naturale ed utilizzare tale fioritura per l’allevamento delle larve insieme allo zooplancton. Invece la “pseudo-green water” consiste nell’integrazione giornaliera di opportune quantità di fitoplancton controllato, in modo da mantenere la concentrazione a valori costanti ed ottimali. Questa tecnica presenta dei vantaggi rispetto alla tecnica “green water”: ad esempio il fitoplancton introdotto è controllato, l’ombreggiatura è costante e non c’è una dipendenza dalla stagione (Tredici et al., 2009). Le microalghe sono costituite circa dal 50% di carbonio, dal 10% di azoto e dal 1% di fosforo e la composizione biochimica delle microalghe utilizzate in acquacoltura è costituita mediamente dal 30-52% di proteine, dal 10-23% di lipidi e dal 5-23% dei carboidrati (Tabella 1) (Brown et al., 1997; Catarina & Xavier, 2012; Muller-Feuga et al., 2007). La composizione biochimica delle microalghe può variare da specie a specie, ciò dipende molto dalle condizioni di coltura (temperatura, salinità, intensità luminosa, nutrienti etc) e dalla fase di crescita in cui si trova l’alga (Catarina & Xavier, 2012).

Tabella 1. Composizione di alcune specie di microalghe (mg g⁻¹ peso secco)

specie	Carboidrati	Lipidi	Proteine
<i>Chaetoceros muelleri</i>	37.4 (± 3.5) ^b	121.4 (± 7.4) ^a	455.6 (±0.5) ^a
<i>Chaetoceros sp</i>	13.1 (± 1.9) ^a	193.9 (± 2.4) ^b	430.0 (±2.6) ^a
<i>Isochrysis sp. (TISO)</i>	33.3 (± 3.7) ^b	299.9 (± 2.7) ^d	477.7 (±1.5) ^{ab}
<i>Pavlova salina</i>	52.3 (± 2.3) ^c	305.5 (± 17.2) ^d	529.1 (±4.3) ^{bc}
<i>Pavlova sp</i>	31.3 (± 0.2) ^b	271.6 (± 9.4) ^{cd}	637.2 (±0.7) ^d
<i>Micromonas pusilla</i>	38.5 (± 0.7) ^b	241.6 (± 7.7) ^c	568.4 (±1.7) ^c
<i>CS-126</i>	12.6 (± 0.2) ^a	101.4 (± 2.3) ^a	437.8 (±3.1) ^a

Il contenuto proteico delle microalghe è 25 volte superiore a quello del latte e ha una grande quantità di acidi grassi essenziali come acido docosaesaenoico (DHA) e acido eicosapentaenoico (EPA), che sono fondamentali per l'ottimale sviluppo delle larve dei pesci marini. Contengono anche molte vitamine tra cui A, B, C, D, E, K e B12. Queste caratteristiche le rendono un materiale prezioso come integratore alimentare nelle diete umane e animali. L'impiego di microalghe in acquacoltura è principalmente adottato come alimento dei rotiferi (*Brachionus sp.*) e piccoli crostacei (*Artemia salina*). I rotiferi sono i primi organismi zooplanctonici utilizzati per l'allevamento larvale. Sono

microscopici, pseudocelomati, di varie dimensioni, forma e colorazione. Possono misurare da 0,1 a 2 mm. Dal punto di vista nutrizionale, presentano un profilo lipidico facilmente plasmabile, infatti, modificano il loro valore nutrizionale mantenendo circa le caratteristiche dell'alimento di cui si nutrono (Brown et al., 1998). I rotiferi vengono alimentati con microalghe appartenenti ai generi *Isochrysis*, *Pavlova* e *Nannochloropsis*. Queste, insieme a molte altre microalghe marine, sono di rilevante interesse per la loro capacità di sintetizzare: DHA, EPA e acido arachidonico (ARA). Questi tre acidi, ad alto valore nutritivo, vengono accumulati soprattutto nelle membrane cellulari e svolgono una funzione fondamentale per lo sviluppo del sistema nervoso (Delaporte et al., 2003). Molte specie di microalghe hanno moderata percentuale di EPA come, ad esempio, *Isochrysis galbana* che risulta però ricca di DHA, mentre per altre accade esattamente l'opposto. Per questo motivo, una combinazione di diverse specie algali fornisce un'alimentazione più equilibrata e migliora la crescita degli animali meglio di una dieta composta da solo una specie algale (Spolaore et al., 2006). Ad oggi, si è andato ad intensificare l'utilizzo di microalghe come fonte proteica alternativa in sostituzione alla farina di pesce. Autori come Tibaldi et al. (2015), Walker e Berlinsky (2011) e Vizcaíno et al. (2014) hanno eseguito diversi studi utilizzando *Isochrysis sp.*, *Nannochloropsis sp.* e *Scenedesmus almeriensis* come ingredienti per

l'alimentazione delle specie ittiche di acquacoltura. Questi studi hanno concluso che la biomassa microalgale migliora la crescita, l'utilizzo dei nutrienti e la morfologia gastrointestinale in diverse specie di pesci marini (Vizcaíno et al., 2014). Uno studio effettuato sulla Tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*), ha trovato risultati migliori nella crescita con un maggiore aumento di peso e un migliore rapporto di efficienza proteica quando l'olio di pesce veniva completamente sostituito con la microalga *Schizochytrium sp.* (Sarker et al., 2016). Inoltre, è stato dimostrato che la parziale sostituzione della farina di pesce con *Isocrhysis galbana* nell'alimentazione dell'orata non determina cambiamenti né nella composizione del filetto di pesce né nella crescita (Palmegiano et al., 2009). La microalga si è mostrata altamente digeribile e le orate alimentate con diete a base di microalghe hanno presentato una migliore crescita rispetto a quelle alimentate con la normale dieta di controllo (Palmegiano et al., 2009).

Purtroppo, però, uno dei principali svantaggi dell'utilizzo delle microalghe risiede nei costi di gestione e produzione, non ancora economicamente sostenibili, in quanto responsabili di un 30-40% dei costi a cui le avannotterie devono far fronte (Borowitzka, 1997). Tuttavia, l'utilizzo delle microalghe come fonti proteiche nella produzione dei mangimi è invece ancora in fase sperimentale e necessita ulteriori studi.

1.3.2 Scarti della macellazione agricola

La farina dei sottoprodotti di pollame (PBM) è una fonte proteica di origine animale utilizzata nel formulare dei mangimi per acquacoltura per sostituire la farina di pesce. Questo tipo di farina si ottiene essenzialmente da scarti di pollame come testa, collo, zampe e uova non sviluppate, escluse le piume e le viscere. È uno degli ingredienti alternativi più promettenti grazie al suo alto contenuto di proteine, acidi grassi essenziali, vitamine, minerali, appetibilità e qualità delle proteine (Gunben et al., 2014). Inoltre, la PBM è stata identificata come una fonte di proteine relativamente economica rispetto alla FM e prontamente disponibile in grandi quantità durante l'anno, specialmente nelle regioni produttrici di pollame come l'Asia (Abdul-Halim et al., 2014). Da un punto di vista nutrizionale, questa materia prima contiene circa il 50% di proteina grezza, il 7-10% di lipidi e il 30-40% di ceneri e sono naturalmente privi di fattori anti-nutrizionali. A causa della diffusione dell'encefalopatia spongiforme, le PBM sono state ampiamente utilizzate nei mangimi per pesci in Europa per decenni prima di essere vietati nel 2001 (EC No 999/2001) (Naylor et al., 2009). Poi nel 2013 ne è stato riammesso l'uso, offrendo nuove opportunità per sviluppare un settore più sostenibile. Alcuni studi hanno dimostrato che la farina di sottoprodotti di pollame non può sostituire più del 50% della farina di pesce nelle diete, ma altri studi hanno dimostrato che, con

il recente miglioramento della sua qualità, la farina di sottoprodotti di pollame potrebbe sostituire il 75 o il 100% di farina di pesce senza una significativa diminuzione della crescita dei pesci. Difatti, i risultati ottenuti da uno studio effettuato sui giovanili di Tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*) suggeriscono la potenziale sostituzione del 100% della farina di pesce con la farina di sottoprodotti di pollame senza compromettere le prestazioni di crescita e l'utilizzo dei nutrienti (Towers, 2016). Inoltre, può essere utilizzato con successo per sostituire gli ingredienti vegetali in una dieta per l'orata senza influenzare negativamente sulle prestazioni di crescita e sul benessere dei pesci. PBM può avere effetti benefici sull'assorbimento dei nutrienti intestinali, suggerendo che questo ingrediente possa essere utilizzato per contrastare effetti collaterali negativi dovuti all'elevata quantità di ingredienti vegetali contenuti nelle diete per l'orata (Randazzo, Zarantoniello, Gioacchini, et al., 2021). Un altro studio effettuato sulla trota iridea (*Oncorhynchus mykiss*) suggerisce che una sostituzione del 30 e 60% di ingredienti ricchi di proteine vegetali con *Hermetia illucens* o PBM ha portato a migliori prestazioni di crescita nonché a una minore rilevanza di alterazioni morfologiche dell'intestino distale (Randazzo, Zarantoniello, Gioacchini, et al., 2021). I risultati ottenuti finora, forniscono risultati promettenti nell'uso di sottoprodotti del pollame, ma sono necessari ulteriori studi al fine di ottenere informazioni univoche e accurate.

1.3.3 Insetti

Come sopra descritto, le fonti proteiche alternative alla farina di pesce sono molteplici (farine vegetali, farine animali, ecc.) ognuna delle quali presenta al contempo pro e contro riguardo l'inclusione nei mangimi commerciali. Attualmente, fra le materie prime di maggiore interesse vi sono gli insetti, indicati dalla FAO come una valida fonte di proteine ed amminoacidi destinati alla formulazione di mangimi commerciali. Gli insetti sono caratterizzati da un alto contenuto proteico, da un profilo amminoacidico simile a quello della farina di pesce e da un alto valore nutrizionale; inoltre, queste caratteristiche possono essere "modificate" attraverso l'impiego di specifici substrati di allevamento, come ad esempio scarti di pesce, ricchi in acidi grassi n-3, o altri substrati ricchi in particolari componenti (M. J. Sánchez-Muros et al., 2014) come la polpa di barbabietola da zucchero essiccata (come substrato ricco di fibre) (Tschirner & Simon, 2015), sottoprodotti ottenuti da processo di tostatura del caffè (Vargas-Abúndez et al., 2019). La produzione di farine di insetto, e il loro utilizzo come alimento per animali da allevamento, presenta quindi numerosi vantaggi. Gli insetti possono infatti essere allevati su scarti alimentari e nutriti con rifiuti organici quali sottoprodotti di cibo e industriali, rappresentando pertanto un'importante occasione di "smaltimento" dei rifiuti organici e un chiaro esempio di produzione sostenibile. Inoltre, i vari scarti

vengono a loro volta trasformati dagli insetti stessi in biomassa di ottima qualità. Un altro grande vantaggio degli insetti risiede nel breve ciclo vitale di questi organismi che corrisponde ad un alto tasso di conversione. Queste caratteristiche fanno sì che l'utilizzo degli insetti come risorsa abbia le più grandi potenzialità di sviluppo nei prossimi 10-20 anni (Hua et al., 2019). I valori nutrizionali degli insetti variano da specie a specie, principalmente per quanto riguarda la quantità e qualità del profilo proteico e lipidico (Barroso et al., 2014). Gli insetti sono caratterizzati da ottimi valori riguardo il loro profilo amminoacidico, essendo particolarmente ricco in aminoacidi essenziali a differenza di quanto accade per le principali fonti proteiche vegetali (Bukkens & Paoletti, 2005; Rumpold & Schlüter, 2013). Per quanto riguarda il profilo amminoacidico, le maggiori somiglianze con le farine a base di pesce sono state rivelate nei ditteri, in particolare nelle larve di *Hermetia illucens*, *Musca domestica* ed *Eristalis tenax*. Ad un buon profilo amminoacidico non corrisponde però un buon profilo lipidico, non tanto per la quantità, ma per più che altro per la qualità. Gli insetti, specialmente nella fase larvale, sono ricchi in acidi grassi saturi (Barroso et al., 2014) ma poveri di polinsaturi. In relazione al fabbisogno lipidico dei pesci, gli insetti possono essere impiegati sia nell'alimentazione delle specie ittiche di acqua dolce, sia per l'allevamento delle specie ittiche marine, con risultati molto promettenti. I pesci d'acqua

dolce richiedono l'apporto di quantità sufficienti di acido linoleico (LA) e/o acido α -linolenico (ALA), in quanto, dispongono di appositi enzimi (elongasi e desaturasi) che sono in grado di allungare e desaturare tali acidi grassi per una sintesi di acido eicosapentaenoico (EPA) e acido docosaesaenoico (DHA); al contrario, tutte le specie marine, non dispongono di questi enzimi e pertanto l'apporto di acido eicosapentaenoico (EPA) e di acido docosaesaenoico (DHA) deve essere effettuato interamente per via alimentare. Inoltre, anche se i pesci d'acqua dolce possiedono un pathway metabolico, le continue conversioni richiedono un dispendio energetico da parte dell'animale che pertanto possono essere spese in altro, quindi anche per loro è opportuno fornire diete ricche di polinsaturi. A differenza di quanto avviene per gli insetti terrestri invece, quelli acquatici contengono quantità di acidi grassi polinsaturi, e in particolare di acido eicosapentaenoico (EPA), nettamente superiori. Tale differenza è dovuta al fatto che, mentre gli insetti terrestri sono principalmente erbivori ed onnivori, quelli acquatici sono attivi predatori che si nutrono di organismi ricchi di acidi grassi della serie omega-3 (Pisa, 2018). Gli insetti sono anche una buona fonte di vitamine e minerali. La maggior parte degli insetti mostra elevate quantità di potassio, calcio, ferro, magnesio (Schabel, 2010) e selenio (Ringø et al., 2012). Dal punto di vista strettamente nutrizionale, il contenuto proteico grezzo varia dal 42 al 63% mentre quello lipidico grezzo può raggiungere percentuali

superiori al 36%. La concentrazione di acidi grassi insaturi invece, varia dal 20 al 70% a seconda della specie di insetto (Makkar et al., 2014). Studi effettuati sulle prepupe di *Hermetia illucens* dimostrano che è possibile incorporare buone quantità di acido α -linolenico (ALA), acido eicosapentaenoico (EPA) e acido docosaesaenoico (DHA) attraverso l'utilizzo di substrati alimentari ricchi di scarti di pesce (M. Sánchez-Muros et al., 2014). Numerosi studi hanno dimostrato che gli insetti e le materie prime derivate da essi sono molto appetibili e, a seconda della specie animale, possono sostituire dal 25 al 100% la farina di soia o di pesce (Makkar et al., 2014). L'arricchimento dei substrati con microalghe ha prodotto dei miglioramenti apprezzabili nella composizione degli acidi grassi delle larve in *Hermetia Illuciens* (Truzzi et al., 2020). Nelle larve di zebrafish (*Danio rerio*) la somministrazione del 25% di mangime a base di *Hermetia illucens* con profilo lipidico inalterato ha dato risultati promettenti, mentre se incrementata al 50% le larve mostravano segni di differente composizione ed accumulo dei lipidi (Zarantoniello et al., 2018)In seguito, c'è stato un miglioramento nella composizione della dieta, sempre in zebrafish (*Danio rerio*), con l'aggiunta del 10% di *Schizochytrium* nel substrato di partenza per l'allevamento delle larve di *Hermetia illucens*, mostrando una possibilità di inclusione di mangime a base di *Hermetia illucens* fino al 50%, rappresentava il miglior compromesso tra la sostenibilità degli ingredienti e

un'adeguata crescita e benessere dei pesci (Zarantoniello, Zimbelli, et al., 2020).

Un'altra importante caratteristica legata alla qualità delle materie prime è la loro digeribilità. Nonostante la digeribilità di diverse specie di insetti sia variabile tra il 79 e il 99% (Marono et al., 2015) alcune componenti, quali la chitina, risultano indigeribili alla maggior parte degli animali monogastrici. La chitina è un polisaccaride presente esclusivamente nell'esoscheletro degli artropodi, il cui contenuto varia tra le specie e i diversi stadi di sviluppo; dopo la cellulosa, la chitina è il più abbondante biopolimero presente in natura. Il contenuto medio di chitina negli insetti è compreso tra l'1 e il 13% della sostanza secca (Henry et al., 2015). Diverse specie di pesce comunque possiedono una serie di enzimi, le chitinasi, capaci di degradare questo polisaccaride. Alcuni autori concordano nell'affermare che la presenza della chitina nella dieta, apporti benefici ai pesci: uno studio effettuato sull'orata (*Sparus aurata*) infatti dimostra che la presenza della chitina, incrementa l'attività del sistema immunitario (Esteban et al., 2001), mentre un altro studio condotto sulla trota iridea (*Oncorhynchus mykiss*) dimostra il potenziamento dell'attività dei macrofagi (SAKAI & M., 1992). Il processo enzimatico che porta alla digestione della chitina è dovuto a due principali categorie di chitinasi. Le endochitinasi attuano una prima degradazione con la funzione di creare

oligomeri, mentre le esochitinasi portano alla totale frammentazione dei monomeri di base (Dahiya Rupinder Tewari Gurinder Singh Hoondal, 2006). Per ovviare a questo problema, sono stati sperimentati diversi processi, sia per quanto riguarda la lavorazione dei mangimi, come l'estrazione alcalina e la degradazione chimico-enzimatica pre-somministrazione, sia integrazione diretta di batteri chitinolitici o chininasi nei mangimi (Henry et al., 2015). Esperimenti condotti sul pesce pagliaccio *Amphiprion ocellaris* non mostravano effetti negativi per quanto riguarda i parametri di crescita e di sopravvivenza, ma l'alta presenza di chitina (sopra inclusioni di farine a base di Hi al 50%) sembrerebbe provocare una riduzione della lunghezza dei villi intestinali, senza però alterare il generale benessere degli individui (Vargas-Abúndez et al., 2019). Studi condotti sulla trota iridea (*Oncorhynchus mykiss*), alimentata per 8 settimane con il 50% di farina di *Hermetia illucens*, hanno fatto osservare una lieve diminuzione dell'accrescimento ma senza altre implicazioni negative (Sealey et al., 2011). Anche una sostituzione al 33% di *Hermetia illucens* nella dieta del rombo (*Psetta maxima*) ha comportato una riduzione dell'assunzione di mangime ed un minore accrescimento (Kroeckel et al., 2012). Una recente ricerca condotta su giovanili di spigole europee (*Dicentrarchus labrax*), alimentate con diete inclusive di farina di *Hermetia illucens* nello stadio prepupa, ha sostenuto che possa essere inclusa al 22%

senza effetti negativi su parametri produttivi, indice di conversione e digeribilità (Magalhães et al., 2017). Nonostante gli studi condotti fino ad ora e le buone qualità della farina derivante da questo insetto, i risultati non sono del tutto soddisfacenti come auspicato (Henry et al., 2015). Il valore massimo di inclusione, a seconda della specie del pesce, può variare dal 6 al 25% (Henry et al., 2015) ed il valore più alto di inclusione è risultato possibile nella dieta delle trote iridee (*Oncorhynchus mykiss*), nel quale la farina di larve può essere inclusa fino al 50% senza effetti negativi (Gasco et al., 2014; Sealey et al., 2011). Anche nella dieta del salmone (*Salmo salar*), si può arrivare ad una percentuale di inclusione del 25%, ma solo se viene fornito anche un supplemento di lisina e metionina (Lock et al., 2016). Una recente ricerca condotta sulle trote iridee, ha dimostrato che un'inclusione del 25 o 50% non ha influito negativamente sull'accrescimento; anzi, ne ha migliorato i parametri produttivi come l'indice di conversione ed il rapporto di efficienza proteica compromettendo però il valore nutrizionale della frazione lipidica dei filetti (Gasco et al., 2014). Caratterizzata quindi da fonti proteiche ad alta efficienza ed a basso impatto ambientale, questa materia prima risulta quella attualmente più studiata nell'ambito della ricerca scientifica. A tal riguardo, risultano fondamentali ulteriori ricerche per alzare la percentuale di inclusione senza compromettere crescita e salute dei pesci.

1.3 Ciclo ovarico di zebrafish

Lo Zebrafish è un piccolo pesce sperimentale utile per il suo ciclo riproduttivo relativamente breve. Difatti, è stato identificato come un ottimo modello per affrontare studi sull'alimentazione, visto che le specie che possiedono un interesse a livello commerciale presentano cicli vitali più lunghi. Zebrafish è caratterizzato da una riproduzione asincrona, la cui maturazione completa degli ovociti nelle femmine avviene in 10 giorni. Studi sui meccanismi riproduttivi dello zebrafish risultano semplificati in seguito ad una conoscenza consolidata dello sviluppo degli ovociti convenzionalmente suddivisi in cinque stadi principali. In particolare, l'oogonio, cellula progenitrice di ovociti premeiotici, rappresenta una continua fornitura di nuovi ovociti ottenuti da più divisioni meiotiche. Una volta che l'oogonio entra in divisione meiotica, diventa ovocita primario (Randazzo et al., 2020). In questa fase, chiamato stadio IA, gli ovociti risiedono inizialmente nei nidi e successivamente si spostano dalla posizione originale e aumentano le loro dimensioni fino a circa 140 μ m. Successivamente, le cellule somatiche vengono reclutate per formare il follicolo definitivo (Stadio 1B) in cui l'ovocita è circondato esternamente da uno strato di cellule della teca ed internamente da uno strato di cellule della granulosa. Nella fase II, gli ovociti aumentano notevolmente le loro dimensioni fino a raggiungere un diametro di circa 340 μ m e compaiono vescicole delimitate da una

membrana, chiamate alveoli corticali. Inoltre, in questa fase, inizia la deposizione lipidica degli oociti e induce la formazione di goccioline di olio contenenti lipidi neutri (Randazzo et al., 2020). Nello Stadio III (ulteriormente suddiviso in Stadio IIIA e Stadio IIIB), l'assorbimento di una glicolipoproteina derivata dal fegato, la vitellogenina, supporta l'ulteriore aumento delle dimensioni del follicolo fino a un diametro di circa 740 μm . Questo processo, chiamato vitellogenesi, gioca un ruolo importante nella crescita degli oociti e permette il passaggio dagli oociti pre-vitellogenicici (Stadi I e II) a quelli vitellogenicici (dallo Stadio III in poi). Al termine di questa fase (Fase IIIB), gli oociti cominciano a maturare, rispondendo agli stimoli ormonali della maturazione. Successivamente, nella fase IV, le vescicole del tuorlo contenenti vitellogenina iniziano a fondersi tra loro e le goccioline di olio diventano più evidenti (Randazzo et al., 2020). Successivamente, l'involucro nucleare subisce un processo di rottura, l'ooplasma si opacizza e il follicolo raggiunge un diametro di 740–760 μm . Poiché la maturazione avviene in poche ore, solo pochi follicoli di solito si trovano in questa fase di sviluppo negli ovari dello zebrafish analizzato. La fase di maturazione finale, descritta come Fase V, implica la completa fusione delle vescicole del tuorlo e la separazione dell'ovocita maturo dalle cellule follicolari. Gli oociti in questa fase (diametro fino a 1 mm) sono raramente osservati nell'ovario dello zebrafish, poiché

vengono ovulati nel lume ovarico e depositi rapidamente. Dopo l'ovulazione, il follicolo post-ovulatorio (POF), composto da cellule follicolari (cellule della granulosa e della teca) senza ovocita, rimane nell'ovario (Randazzo et al., 2020).

1.4 Dieta e riproduzione

Negli ultimi anni sono state proposte diverse formulazioni che ad oggi sono disponibili sul mercato e contengono principalmente farina di pesce e olio di pesce a causa del loro alto valore nutrizionale in termini di lipidi e profilo amminoacidico. Queste vengono formulate per supportare adeguatamente la riproduzione dei pesci, perchè è noto che gli squilibri nutrizionali sono dannosi per la maturazione dei gameti. Difatti, il successo di una produzione continua in acquacoltura si basa sulla capacità di controllare la maturazione sessuale e le prestazioni riproduttive dei pesci al fine di garantire una progenie di alta qualità (Migaud et al., 2013). Il processo di maturazione degli ovociti è una delle attività metaboliche più impegnative per i pesci e avere una nutrizione di qualità risulta essere molto importante non solo per la corretta assegnazione delle macromolecole all'interno degli ovociti ma anche per la loro maturazione (Randazzo et al., 2020). Analisi fatte sui pesci teleostei hanno dimostrato che

l'energia che utilizzano per sostenere la riproduzione deriva sia dalle proteine che dai lipidi, ma quest'ultimi sono i principali regolatori della fisiologia riproduttiva. Infatti, gli acidi grassi (in particolare quelli insaturi) come l'acido docosaesaenoico (DHA, 22: 6n3) ed eicosapentaenoico (EPA, 20: 5n3) sono nutrienti fondamentali per i processi fisiologici dei riproduttori come lo sviluppo gonadico, la gametogenesi e la velocità nella riproduzione nonché per lo sviluppo embrionale e larvale. Carenze di queste molecole, possono causare una diminuzione generale di salute dei pesci, scarsa crescita, scarsa efficienza alimentare, anemia e alta mortalità (Piccinetti et al., 2012). La maggior parte degli studi ai fini dell'acquacoltura ha evidenziato che la presenza di acidi grassi polinsaturi (PUFA) nelle diete, migliora le performance di crescita e la riproduzione dei pesci; inoltre concorrono all'assorbimento di vitamine ed altri micronutrienti liposolubili. In particolare, durante la gametogenesi, i PUFA vengono mobilitati dai siti di stoccaggio (muscolo e fegato), trasferiti agli ovari, incorporati nell'uovo come tuorlo e utilizzati come principale fonte nutritiva dall'embrione. Inoltre, i lipidi neutri vengono immagazzinati sotto forma di goccioline d'olio, che aumentano di numero all'aumentare delle dimensioni dell'ovocita. Quindi, affinché la riproduzione abbia successo, questa viene influenzata dalla proporzione delle principali classi di acidi grassi e dalla loro interazione. Le femmine sane usano questi lipidi principalmente per la loro

produzione di ovociti, il che rende la loro necessaria elevata richiesta. Per risolvere il problema sulla sostenibilità degli ingredienti utilizzati per formulare le diete, sono stati oggetto di studio numerose farine, che venivano estrapolate da insetti. In particolare, l'uso di diversi livelli di inclusione nella dieta di prepupa di Black Soldier Fly (*Hermetia illucens*; BSF) è stato ampiamente studiato in diverse specie di pesci con risultati promettenti (Randazzo, Zarantoniello, Cardinaletti, et al., 2021). Tuttavia, il profilo degli acidi grassi di *Hermetia illucens* (ricco di SFA e povero di PUFA) rappresenta la principale limitazione, soprattutto considerando il fabbisogno dei lipidi. A questo proposito Randazzo et al. (2020), hanno dimostrato che un 50% dell'inclusione dietetica di farina di prepupa di *Hermetia illucens* influisce negativamente sulle prestazioni riproduttive delle femmine di zebrafish. Difatti, questo studio ha mostrato una diminuzione nella deposizione delle uova, probabilmente a causa di un ritardo nella maturazione degli ovociti causata dalla necessità di una biosintesi dei PUFA da parte del pesce e conseguente accumulo di ovociti, dall'aumento degli ovociti atretici e da una riduzione dei POF (premature ovarian failure). Seppur ci sia stata una diminuzione nella deposizione delle uova dal gruppo BSF50, non è stata influenzato il successo di schiusa dello stesso gruppo sperimentale, prova dello straordinario sforzo che le femmine

mettono nell'evento riproduttivo scegliendo la qualità piuttosto che la quantità (Randazzo et al., 2020).

Nei pesci selvatici e in allevamento, si può spesso osservare un'interruzione del processo riproduttivo, a causa di un'atresia follicolare, processo nel quale le femmine non riescono a completare la maturazione e l'ovulazione a causa della degenerazione degli ovociti vitellogenici prima della stessa ovulazione. Questo processo viene indotto da fattori di stress, compresa la disponibilità e la qualità del cibo che interferiscono con l'oogenesi. Integrare, quindi, gli insetti con fonti ricche di PUFA è importante anche se la destinazione finale del mangime è riservata ai pesci dulciacquicoli. Oltre alle farine di insetto, anche farine ed oli di origine vegetale come i cereali, possono determinare problemi nelle performance riproduttive. Uno studio effettuato sulla spigola, alimentata con una dieta contenente olio di arachidi, suggerisce che una carenza alimentare a lungo termine di n-3 PUFA riduce la produzione di steroidi (Navas et al., 1998). A questo punto, diete carenti di PUFA causano svantaggi nella riproduzione, ma al fine di continuare a confermare ed approfondire conoscenze sull'utilizzo della farina di insetto e/o farine vegetali nell'alimentazione dei pesci, sarà necessario condurre ulteriori studi in modo più approfondito quando si testano nuovi ingredienti.

2. SCOPO DELLA TESI

Il pesante sfruttamento delle risorse ittiche del pianeta ha portato ad un lento ma inesorabile impoverimento degli oceani e la costante richiesta di farina di pesce ha determinato un rapido aumento dei costi legati all'acquacoltura e quindi un incremento del prezzo di mercato del pesce. Come noto, però, la produzione di pesce da acquacoltura dipende fortemente dalla disponibilità di farina e olio di pesce, entrambe risorse a cui vanno trovate valide alternative. Tra quelle già prese in considerazione dall'industria mangimistica e dalla comunità scientifica, come le diete a base vegetale, quella attualmente ritenuta più interessante, anche nell'ottica della sostenibilità ambientale, è la farina di insetto. Nonostante siano già numerosi gli studi condotti sull'utilizzo della farina di insetto come ingrediente dei mangimi destinati a diverse specie ittiche resta ancora molto da capire in merito agli effetti che queste diete possono avere sulla riproduzione.

Lo scopo della tesi è quello di valutare gli effetti dell'inclusione di farina di prepupe Black Soldier Fly (*Hermetia illucens*; BSF) sulle performance riproduttive delle femmine adulte di zebrafish. I pesci sono stati alimentati con cinque diete sperimentali caratterizzate da livelli di inclusione crescenti (0, 25, 50, 75 e 100% rispetto alla FM) di farina di prepupe di BSF. Nello specifico, a differenza di studi passati, le larve di BSF sono state allevate su un substrato

costituito da sottoprodotto del caffè (coffee silverskin) ed arricchito con il 10% di *Schizochytrium* sp. come fonte di acidi grassi polinsaturi. Le diete sperimentali sono state testate per valutare effetti sulla crescita, sul metabolismo lipidico, risposta allo stress e prestazioni riproduttive delle femmine adulte di zebrafish attraverso un approccio multidisciplinare comprendente analisi biometriche, gascromatografiche, istologiche e molecolari.

3. MATERIALI E METODI

3.1 Modelli sperimentali

3.1.1 Zebrafish

Negli ultimi anni, lo Zebrafish (*Danio rerio*) è diventato uno dei più importanti modelli tra gli organismi vertebrati utilizzati per studiare la genetica alla base dello sviluppo, delle funzionalità del corpo e della malattia, accompagnato da un aumento degli strumenti e metodi disponibili per studiarlo (Dahm & Geisler, 2006). Recentemente, la legislazione italiana lo ha riconosciuto come specie “da laboratorio” in seguito alla promulgazione del D.L. n. 26 del 4 marzo 2014. L'uso di questo pesce come modello per migliorare il processo di produzione dell'acquacoltura è emerso come un importante campo di ricerca (Ribas & Piferrer, 2013; Ulloa et al., 2011) . Dal punto di vista strettamente biologico, molte sono le caratteristiche che determinano il successo di questa specie. Alcune tra le caratteristiche che lo rendono così prezioso nella ricerca sono la sua natura sociale strutturata, la riproduttività costante durante tutto l'anno, l'alta fecondità, la capacità di rigenerare molti tessuti e/o parti di organo, il genoma totalmente mappato, la trasparenza embrionale e, non da ultimo, il

basso costo di allevamento (Lawrence, 2007; Spence et al., 2008). Gli embrioni si schiudono 3 giorni dopo la fecondazione (Lawrence, 2007). Altro vantaggio riguarda il rapido accrescimento e la maturazione sessuale. Dopo 5 giorni dalla nascita, si ottengono delle larve già capaci di nuotare, e che raggiungono la maturità sessuale in soli tre mesi. Recenti osservazioni sostengono che la differenza di habitat tra l'ambiente selvatico e quello di laboratorio potrebbe influenzare negativamente la socialità di questo organismo a causa di potenziali sovraffollamenti, ambienti isolati o strutture troppo semplificate (Graham et al., 2018). Per ovviare a questa problematica, risulterebbe utile condurre maggiori studi sulle dinamiche sociali di questo pesce nel suo habitat originario al fine anche di migliorare il benessere in cattività che, ad oggi, è probabilmente sottovalutato (Graham et al., 2018). I principali obiettivi dell'acquacoltura sono quelli di promuovere una produzione ittica di alta qualità e il benessere del pesce strettamente correlati a un'adeguata nutrizione dei pesci (Oliva-Teles et al., 2015) oltre che promuovere la sostenibilità ambientale. Questa specie è stata proposta in maniera specifica, da diversi autori, come modello animale per lo studio della nutrizione dei pesci da allevamento (Aleström et al., 2006; Ulloa et al., 2011; Yossa et al., 2011).

3.1.2 *Hermetia illucens*

Tra circa un milione di specie di insetti conosciute, quello che maggiormente viene utilizzato è il Black Soldier Fly (BSF) (*Hermetia illucens*). In particolare, le larve di questi Ditteri mostrano una composizione di amminoacidi essenziali simile a quella di FM (Barroso et al., 2014). L'allevamento di *Hermetia illucens* è stato proposto fin dagli anni '90 per lo smaltimento dei rifiuti organici attraverso la loro conversione in biomassa ricca di lipidi e proteine da utilizzare in alimentazione animale, in biodiesel e per la produzione di chitina (Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2013). La mosca adulta è nera e lunga dai 15 ai 20 mm, mentre le larve dal colore biancastro possono raggiungere i 27 mm di lunghezza e pesare fino a 220 mg (Diener et al., 2011; Hardouin & Mahoux, 2003). A seconda di condizioni alimentari e della dieta, le larve possono maturare in 2-4 mesi, mentre la fase di pupa può durare dai 14 giorni ai 5 mesi (Veldkamp et al., 2012). Le femmine depositano le uova in crepe e fessure asciutte, in luoghi adiacenti ad una fonte alimentare (Diener et al., 2011). Gli adulti invece non si alimentano perché sfruttano i grassi immagazzinati nello stadio larvale (Diclaro & Kaufman, 2009). Per l'*Hermetia illucens*, questi aspetti rappresentano dei vantaggi rispetto ad altri insetti, poiché sono necessarie minori cure e soprattutto la mancata nutrizione dell'adulto riduce notevolmente il rischio di trasformarsi in un vettore di

malattie. Uno svantaggio nella gestione riproduttiva di questi insetti è rappresentato dalla necessità di un ambiente caldo per la degradazione del substrato alimentare di cui necessitano che, in ambienti freddi o temperati, si traduce in un elevato e dispendioso utilizzo di energia (Veldkamp et al., 2012). *Hermetia illucens* è antagonista in natura della mosca domestica e quindi può essere utilizzata anche per ridurre le popolazioni di quest'ultima, considerato che quest'ultima rappresenta invece un importante vettore di patologie ((Newton et al., 2005; Sheppard et al., 1994). Dal punto di vista nutrizionale, le larve di *H. illucens* contengono dal 40 al 44% di proteina grezza mentre la percentuale di lipidi varia in funzione alla tipologia del substrato in cui essa è allevata. Anche il contenuto in acidi grassi è strettamente dipendente dalla dieta somministrata. Infine, le larve di *Hermetia illucens* sono anche ricche in Ca, P e lisina ed il contenuto in ceneri è variabile dall'11 al 28% (Arango Gutiérrez et al., 2004).

3.2 Etica

Tutte le procedure che coinvolgono animali sono state condotte in linea con la legislazione italiana sugli animali da esperimento e sono state approvate dal Comitato Etico dell'Università Politecnica delle Marche (Ancona, Italia) e dal Ministero della Salute (626/2018-PR).

3.3 Allevamento degli insetti

Il substrato per l'allevamento degli insetti è stato ricavato da un sottoprodotto dell'industria del caffè (coffee silverskin; umidità 44%). Il coffee silverskin è stato macinato (Saccaria Caffè S.R.L., Marina di Montemarciano, AN, Italia) fino a ottenere una granulometria di $0,4\pm 2\text{mm}$ e arricchito da un 10% (p/p) di *Schizochytrium* sp. (fornito liofilizzato da AlghItaly Società Agricola S.R.L., Sommacampagna, VR, Italia). È stata aggiunta acqua distillata per raggiungere un'umidità finale del substrato di alimentazione di ~70%. Le larve di BSF di sei giorni, fornite da Smart Bugs s.s. (Ponzano Veneto, TV, Italia), sono state divise in gruppi di 640 esemplari per replica ($n = 65$ per un totale di 41600 larve di BSF) e mantenuti seguendo le condizioni di allevamento riportate in Zarantoniello et al. (2020). La quantità di alimentazione per larva era di 100mg/giorno, ottenibile aggiungendo nuovo substrato di alimentazione una volta alla settimana (448 g per ogni scatola). Una volta raggiunto lo stadio prepupale, identificato dal cambiamento di colore del tegumento da bianco a nero (Milanović et al., 2021), gli insetti sono stati raccolti, lavati, asciugati e conservati a -80°C .

3.4 Produzione delle diete destinate agli zebrafish

Le prepupe di BSF non sgrassate sono state liofilizzate e macinate per la preparazione delle diete sperimentali. Sono state formulate 5 diete sperimentali per essere grossolanamente iso-proteiche (50% di CP, Nx6,25, su sostanza secca) e iso-lipidiche (13% su sostanza secca). È stata preparata una dieta di controllo (Hi0) contenente FM, una miscela di proteine vegetali (glutine di grano e concentrati di proteine di piselli) e FO come ingredienti principali, facendo riferimento a una dieta standard disponibile in commercio per zebrafish (Zebrafeed, Sparos ltd, Olhão, Portogallo). Le diete a base di BSF sono state preparate includendo graduali livelli di farina di prepupa BSF (approssimativamente 25, 50, 75 e 100% denominate Hi25 e Hi50, Hi75 e Hi100, rispettivamente) per sostituire FM nella formulazione Hi0. Tutti gli ingredienti macinati (0,5mm) e il FO sono stati accuratamente miscelati (Kenwood kMix KMX53 stand Mixer; Kenwood, De Longhi S.p.a., TV, Italia) per 20 min aggiungendo acqua per ottenere una consistenza appropriata per formare il pellet. I pellet sono stati ottenuti mediante l'utilizzo di un tritacarne da 1 mm, essiccati a 40°C per 48-72 ore e poi macinati e conservati in sacchi sottovuoto a -20°C fino al momento dell'uso. Gli ingredienti e la composizione approssimativa delle diete sono riportati nella Tabella 2.

Tabella 2. Ingredienti (g/Kg) e composizione approssimativa (g/100g) delle diete sperimentali utilizzate in questo studio.

	Hi0	Hi25	Hi50	Hi75	Hi100
<i>Ingredienti (g/kg)</i>					
Farina di pesce ¹	470	400	250	110	-
Mix di proteine vegetali ²	220	230	298	385	440
Farina di prepupa BSF	-	115	235	350	460
Farina di frumento ³	198	172	120	110	72
Olio di pesce	80	51	25	10	-
Lectina di soia	8	8	8	11	4
Integratori alimentari e vitaminici ⁵	14	14	14	14	14
Binder	10	10	10	10	10
<i>Composizione approssimativa (%)</i>					
Sostanza secca	97.08 ± 0.06	95.78 ± 0.13	94.93 ± 0.05	93.63 ± 0.05	92.70 ± 0.04
Proteina grezza	51.57 ± 0.13	50.75 ± 2.57	50.39 ± 0.28	51.23 ± 1.49	50.50 ± 3.15
Lipidi grezzi	14.38 ± 0.64	13.10 ± 0.42	12.93 ± 0.38	13.24 ± 0.46	12.99 ± 0.51
Estratto privo di azoto	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

Materia prima gentilmente fornita da Skretting Italia. 2 Mix di proteine vegetali (concentrato proteico di piselli: glutine di frumento, 0,6:1 p/p in tutte le diete sperimentali) fornito da Lombarda trading srl (Casale Belvedere, CR, Italia) e Sacchetto spa (Lagansco, CN, Italia). 3 Consorzio Agrario (PN, Italia); 4 Composizione integratore minerale e vitaminico (% mix): CaHPO₄·2H₂O, 78,9; MgO, 2,725; KCl, 0,005; NaCl, 17,65; FeCO₃, 0,335; ZnSO₄·H₂O, 0,197; MnSO₄·H₂O, 0,094; CuSO₄·5H₂O, 0,027; Na₂SeO₃, 0,067; tiamina cloridrato (vitamina B1), 0,16; riboflavina (vitamina B2), 0,39; piridossina idrocloruro (vitamina B6), 0,21; cianocobalamina (vitamina B12), 0,21; niacina (vitamina PP o B3), 2,12; pantotenato di calcio, 0,63; acido folico, 0,10; biotina (vitamina H), 1,05; mio-inositolo (vitamina B7), 3,15; soggiorno C Roche (vitamina C), 4,51; tocoferolo (vitamina E), 3,15; menadione (vitamina K3), 0,24; retinolo (vitamina A 2500 UI / kg dieta), 0,026; colecalciferolo (vitamina D3 2400 UI / kg dieta), 0,05; cloruro di colina, 83,99. Per la composizione approssimativa, i valori riportati come media ± DS (n = 3).

3.5 Pesci

Gli embrioni di Zebrafish AB sono stati mantenuti per 48 ore in un sistema Tecniplast (Varese, Italia), sottoposti alle seguenti condizioni: temperatura di 28°C, pH 7.0, concentrazioni di NO₂ e NH₃ <0,01mg/L, concentrazione di NO₃ <10mg/L e fotoperiodo 12L/12D, rispettivamente. Dopo questo primo periodo, gli embrioni sono stati raccolti delicatamente, contati sotto uno stereomicroscopio (Leica Wild M3B, Leica Microsystems, Nussloch, Germania) e suddivisi casualmente in cinque gruppi sperimentali (in triplicato) secondo le cinque diete di prova.

3.6 Disegno sperimentale

Le larve di zebrafish sono state inizialmente allevate in quindici vasche da 20 litri (3 vasche per gruppo sperimentale con 500 larve per vasca, 1500 per gruppo sperimentale). L'acqua delle vasche per le larve aveva le stesse caratteristiche chimico-fisiche della vasca dei riproduttori e veniva sostituita 10 volte al giorno da un sistema di gocciolamento. Dopo 30 giorni dalla fecondazione (dpf), i pesci di ciascuna vasca sono stati trasferiti in vasche più grandi (80L; 15 in totale, 3 per gruppo sperimentale) dotate di filtrazione

meccanica e biologica (Panaque, Capranica, Italia) e alimentate con le stesse diete sperimentali per 6 mesi. Tutte le vasche sono state sifonate 30 minuti dopo l'alimentazione per rimuovere eventuali campioni in eccesso e morti. Dopo 6 mesi, i pesci si sono riprodotti (vedere i dettagli nella sezione successiva) e parte delle femmine sono state raccolte e anestetizzate con una dose letale di MS222 (1g/L, Merck KGaA, Darmstadt, Germania). Fegato, ovari e carcassa (pesce intero privato di visceri) sono stati campionati e adeguatamente conservati per ulteriori analisi.

3.7 Programma di alimentazione

A partire da 5 giorni dalla fecondazione (dpf) fino a 6 mesi, gli zebrafish sono stati alimentati come segue: gruppo Hi0: pesci alimentati con una dieta con lo 0% di farina di prepupe di BSF non sgrassata; Gruppi Hi25, Hi50, Hi75 e Hi100: pesci alimentati con diete comprendenti rispettivamente il 25, 50, 75 e 100% di farina di prepupe di BSF non sgrassata rispetto a FM. La granulometria delle diete sperimentali è stata <math><100\mu\text{m}</math> da 5 a 15 dpf, $101-200\mu\text{m}$ da 16 a 30 dpf e $201-400\mu\text{m}$ da 31 a 60 dpf e $401-600\mu\text{m}$ da 61 fino alla fine dell'esperimento. I pesci sono stati alimentati con le diete sperimentali (2% di peso corporeo) due volte al giorno e, inoltre, da 5 a 10 dpf, i rotiferi della specie

Brachionus plicatilis (5ind/mL) sono stati forniti a tutti i gruppi, secondo Lawrence et al., 2012.

3.8 Biometria

Per le misurazioni della crescita, 10 femmine di zebrafish per vasca (30 femmine per gruppo sperimentale) sono state campionate casualmente alla fine dell'esperimento (6 mesi), misurate e pesate individualmente. La lunghezza standard e il peso umido sono stati determinati rispettivamente da un calibro (precisione: 0,1 mm) e da una bilancia analitica (precisione: 0,1 mg). Inoltre, fegati e ovari sono stati pesati individualmente per calcolare rispettivamente gli indici epatosomatico (ESI) e gonadosomatico (GSI). Le seguenti formule: $[(\text{peso del fegato}/\text{peso totale}) \times 100]$ per ESI e $[(\text{peso dell'ovaio}/\text{peso totale}) \times 100]$ per GSI, sono state utilizzate. La sopravvivenza è stata valutata alla fine dell'esperimento (6 mesi) contando il numero di pesci rispetto alle larve iniziali.

3.9 Raccolta degli embrioni e tasso di schiusa

Per la raccolta degli embrioni, gli zebrafish sono stati raccolti in modo casuale a 6 mesi e trasferiti in vasche da riproduzione (Tecniplast). In particolare, 7

maschi e 5 femmine (in triplicato) sono stati trasferiti giornalmente in una vasca da riproduzione (9 vasche di riproduzione per gruppo sperimentale) per valutare il tasso di schiusa e la raccolta degli embrioni, per un periodo di 10 giorni, secondo Randazzo et al., 2020. 20-30 minuti dopo la comparsa della luce, le uova sono state raccolte da ciascuna vasca di riproduzione. Solo le uova fecondate, con un blastodisco ben sviluppato a 3 ore dopo la fecondazione, sono state adeguatamente conservate per le analisi dei lipidi o utilizzate per il calcolo del tasso di schiusa. Le uova fecondate destinate al tasso di schiusa (150 uova fecondate per ogni gruppo sperimentale) sono state trasferite in piastre Petri di 10 cm di diametro (50 uova fecondate per piastra) contenenti il mezzo E3 (5mM NaCl, 0,17mM KCl, 0,33mM CaCl, 0,33mM MgSO₄ a pH 7,0) e quindi mantenute in un incubatore a 28°C fino alla schiusa (~ 3 dpf). Le larve schiuse sono state infine contate e il tasso di schiusa è stato calcolato per ciascuna capsula di Petri utilizzando la seguente formula $[(\text{larve schiuse} / 150) \times 100]$.

3.10 Estrazione dei lipidi e composizione degli acidi grassi

Per il contenuto di lipidi e composizione degli acidi grassi sono state analizzate le diete sperimentali, le carcasse di zebrafish di sei mesi (pesce intero privato delle viscere; 5 femmine per vasca, 15 femmine per gruppo sperimentale) e le

uova appena fecondate (9 pool di 300 uova per vasca, 9 vasche per gruppo sperimentale). I campioni sono stati tritati e omogeneizzati (omogeneizzatore MZ 4110, DCG Eltronic, Monza, Italia) e successivamente sono state liofilizzate sia le carcasse che le uova appena fecondate (Edwards EF4, Crawley, Sussex, Inghilterra). Alle aliquote di 200 mg di ciascun campione (tre aliquote per campione) sono stati aggiunti 100 μ l di standard interno (estere metilico dell'acido nonadecanoico, 99,6%, Dr.Ehrenstorfer GmbH, Germania) e: (i) le diete sperimentali sono state estratte overnight con il metodo Folch (1957); (ii) l'estrazione dei lipidi dalle carcasse di zebrafish e dalle uova appena fecondate è stata effettuata su polveri liofilizzate a seguito di un'estrazione assistita da microonde (MAE). Tutti gli estratti lipidici sono stati fatti evaporare sotto gas inerte a flusso laminare (N^2) fino a peso costante e risospesi in 0,5 ml di n-eptano. Gli esteri metilici degli acidi grassi (FAME) sono stati preparati secondo Canonico et al. (2016) utilizzando l'estere metilico dell'acido nonadecanoico (19: 0; Dr. Ehrenstorfer GmbH) come standard interno. I FAME sono stati determinati da un sistema GC Agilent-6890 (Milano, Italia) accoppiato a un rivelatore selettivo di massa (MS) quadrupolo Agilent-5973N (Milano, Italia). Per separare i FAME è stata utilizzata una colonna capillare CPS ANALITICA CC-wax-MS (30m \times 0,25mm ID, spessore del film

0,25 μ m). Per ogni campione analizzato, sono state eseguite almeno tre analisi sul GCMS.

3.11 Istologia

Fegati e ovari sono stati campionati alla fine dell'esperimento (6 mesi) da 5 femmine di zebrafish da ciascuna vasca (15 femmine per gruppo sperimentale) e processati secondo Randazzo et al., 2020. I campioni sono stati fissati per immersione nella soluzione di Bouin (Merck KGaA) e poi conservati a 4°C per 24 ore. I campioni sono stati quindi lavati tre volte (dieci minuti ciascuno) con etanolo (70%) e conservati in una nuova soluzione di etanolo al 70%. I campioni sono stati quindi disidratati in soluzioni crescenti di etanolo (80, 95 e 100%), lavati con xilene (Bio-Optica, Milano, Italia) e inclusi in paraffina (Bio-Optica). I blocchi di paraffina solidificata sono stati tagliati con un microtomo (Leica RM2125 RTS, Nussloch, Germania) e le sezioni da 5 μ m sono state colorate con ematossilina Mayer ed eosina Y (Merck KGaA). Le sezioni sono state osservate utilizzando uno Zeiss Axio Imager.A2 (Oberkochen, Germania) e le immagini sono state acquisite per mezzo di una fotocamera digitale a colori combinata AxioCam 503 (Zeiss, Oberkochen, Germania). Gli ovari sono stati completamente sezionati ed un numero significativo di sezioni istologiche,

raccolte a intervalli di 300 μ m, da ciascuna ovario (15 per gruppo dietetico), è stato osservato per contare il numero di ovociti previtellogeni, di classe III, IV, POF e atresici (in base alle loro caratteristiche morfologiche) secondo Randazzo et al., 2020. La conta degli ovociti è stata eseguita utilizzando il software ZEN 2.3 lite (Zeiss). Per ridurre al minimo la ripetizione durante il conteggio, gli ovociti sono stati contrassegnati in ciascuna sezione. I risultati sono stati riportati come percentuale di ovociti previtellogeni, di classe III e IV, POF e ovociti atresici sul numero totale di ovociti contati. Inoltre, per accertare il grado di accumulo di grasso nel fegato, è stata eseguita un'analisi quantitativa su un numero significativo di sezioni per pesce (15 femmine di zebrafish per gruppo sperimentale). La percentuale di frazione grassa (PFF) è stata calcolata tramite il software ImageJ impostando un valore di soglia omogeneo. Le aree non valutabili come i vasi sanguigni non sono state prese in considerazione.

3.12 *Analisi molecolari*

3.12.1 Estrazione di RNA e sintesi del cDNA.

L'estrazione dell'RNA totale di campioni di fegato da 5 pesci zebra femmina per vasca (15 femmine per gruppo sperimentale) è stata eseguita utilizzando il reagente RNazol RT (Merck KGaA) seguendo il protocollo del produttore. La concentrazione finale di RNA è stata determinata dal NanoPhotometer P-Class (Implen, München, Germania), mentre l'integrità dell'RNA è stata verificata mediante colorazione GelRed™ delle bande di RNA ribosomiale 28S e 18S su gel di agarosio all'1%. La sintesi del cDNA è stata eseguita utilizzando il LunaScript RT SuperMix Kit (New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts, USA) utilizzando 1 µg di RNA totale.

3.12.2 Real-time PCR

Le PCR sono state effettuate in un termociclatore iCycler iQ5 (Bio-Rad Hercules, California, USA). Le reazioni sono state impostate su una piastra a 96 pozzetti miscelando per ogni campione, 1 µL di cDNA diluito 1:10, 5 µL di 2x iQ™ Sybr Green (Bio-Rad) concentrato come agente intercalante fluorescente, 0,3 µM di primer forward e 0,3 µM di primer reverse. Il profilo termico per tutte le reazioni è stato di 3 minuti a 95°C e quindi 45 cicli di 20 secondi a 95°C, 20 secondi a 60°C e 20 secondi a 72°C. Alla fine di ogni ciclo è stata monitorata la fluorescenza e le analisi della curva di melting hanno

mostrato in tutti i casi un unico picco. È stata eseguita la quantificazione relativa dell'espressione dei geni coinvolti nella risposta allo stress (*nr3c1* e *hsp70.1*) e nella biosintesi degli acidi grassi polinsaturi a catena lunga (*elovl2*, *elovl5* e *fads2*). Il complesso della proteina 2/3 correlato all'actina, subunità 1A (*arpc1a*) e la proteina ribosomiale grande, 13 (*rpl13*) sono stati utilizzati come standard interno in ciascun campione al fine di standardizzare i risultati eliminando la variazione nella quantità e qualità di mRNA e cDNA. Nessun prodotto di amplificazione è stato osservato nei controlli negativi e non sono state osservate formazioni di dimeri di primer nei controlli. I prodotti di amplificazione sono stati sequenziati e l'omologia è stata verificata. I dati ottenuti sono stati analizzati utilizzando la versione 2.0 del software del sistema ottico iQ5 (Bio-Rad), inclusi i file GeneEx Macro iQ5 Conversion e GeneEx Macro iQ5. I primers (Tabella 3) sono stati disegnati utilizzando Primer3 a partire dalle sequenze di zebrafish disponibili in ZFIN.

Tabella 3. Sequenze di primer utilizzate nel presente studio e il loro ID Zebrafish Information Network.

<i>Gene</i>	<i>Forward primer (5'- 3')</i>	<i>Reverse primer (5'- 3')</i>	<i>ZFIN ID</i>
<i>nr3c1</i>	5'-AGACCTTGGTCCCCTTCACT-3'	5'-CGCCTTTAATCATGGGAGAA-3'	ZDB-GENE-050522-503
<i>hsp70.1</i>	5'-TGTTCAAGTTCTCTGCCGTTG-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>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

3.13 *Analisi statistica*

Tutti i dati sono stati analizzati da ANOVA a una via, con la dieta come variabile esplicativa. Tutti i test ANOVA sono stati seguiti dal test post-hoc di Tukey. È stato utilizzato il pacchetto software statistico Prism5 (GraphPad Software). La significatività è stata fissata a $p < 0.05$ e tutti i risultati sono presentati come $media \pm DS$.

4. RISULTATI

4.1 Biometrie

Come riportato in Figura 2a, i gruppi Hi0 e Hi25 (25.6 ± 1.9 e 25.9 ± 1.7 mm, rispettivamente) hanno evidenziato valori di lunghezza standard significativamente ($p < 0.05$) più alti rispetto al gruppo Hi100 (23.8 ± 1.5 mm), mentre Hi50 e Hi75 erano caratterizzati da valori intermedi (25.4 ± 2.2 e 24.4 ± 1.9 mm, rispettivamente). Non sono state evidenziate differenze significative tra i gruppi sperimentali considerando il peso umido (0.35 ± 0.07 , 0.40 ± 0.07 , 0.38 ± 0.08 , 0.39 ± 0.12 e 0.36 ± 0.10 per Hi0, Hi25, Hi50, Hi75 e Hi100 rispettivamente; Fig. 2b), l'ESI (2.2 ± 0.6 , 2.2 ± 0.7 , 2.1 ± 0.5 , 2.9 ± 0.5 e $2.4 \pm 0.7\%$ per Hi0, Hi25, Hi50, Hi75 e Hi100, rispettivamente; Fig. 2c) e il GSI (11.4 ± 2.7 , 13.4 ± 4.4 , 12.7 ± 3.7 , 13.6 ± 2.9 e 12.8 ± 2.9 per Hi0, Hi25, Hi50, Hi75 e Hi100 rispettivamente; Fig. 2d).

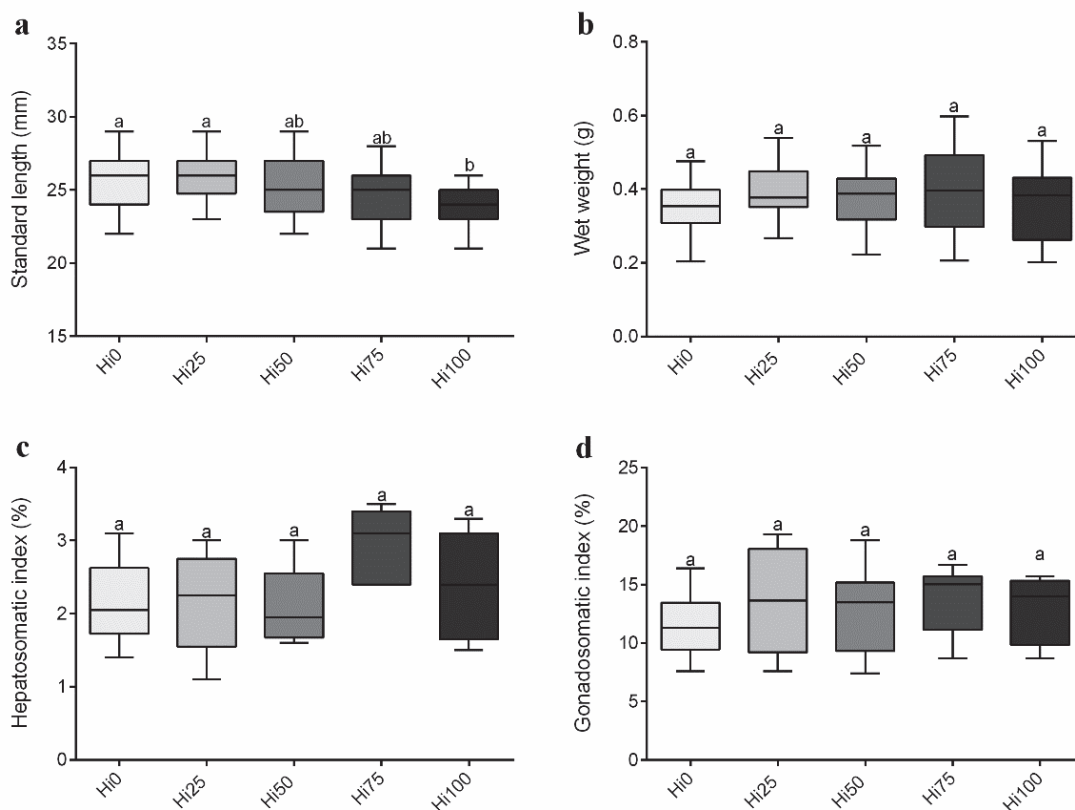


Figura 2. Misure biometriche di femmine adulte di zebrafish. (a) lunghezza standard (mm); (b) peso umido (g); (c) indice epatosomatico (%); (d) indice gonadosomatico (%). I pesci sono stati alimentati con diete comprendenti 0, 25, 50, 75 e 100% di farina di prepupe di BSF rispetto a FM (Hi0, Hi25, Hi50, Hi75 e Hi100). I boxplot mostrano minimo e massimo (whiskers), primo quartile, mediana e terzo quartile (riquadro). Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative tra i gruppi sperimentali ($p < 0.05$; $n = 30$).

4.2 Performance riproduttive

Come riporta la Figura 3a, aumentando i livelli di inclusione di farina prepupe di BSF rispetto a FM, è stato registrato un decremento significativo ($p < 0.05$) del numero totale di uova per vasca di riproduzione durante un periodo di 10 giorni (1034 ± 29.2 , 920.0 ± 17.6 , 792.0 ± 31.0 , 544.0 ± 23.2 e 450.7 ± 16.9 per Hi0, Hi25, Hi50, Hi75 e Hi100, rispettivamente).

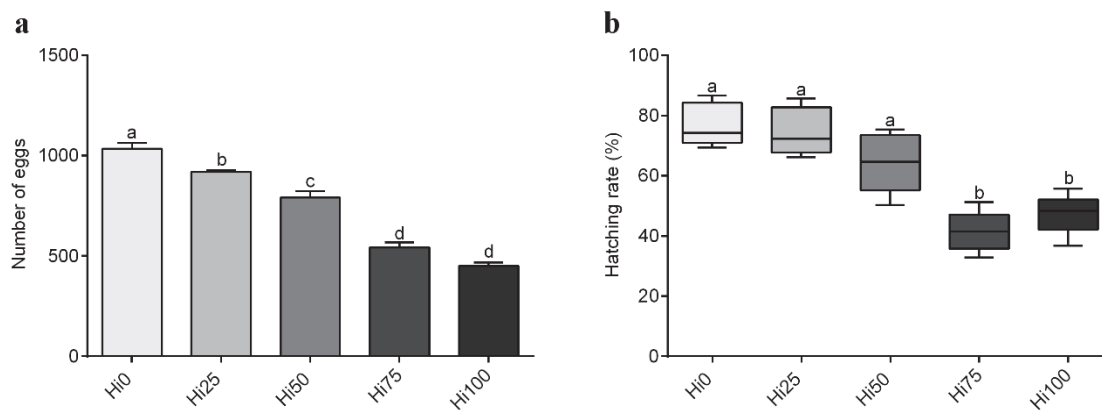


Figura 3. (a) Numero di uova totali deposte in un periodo di 10 giorni per ogni vasca di riproduzione e (b) tasso di schiusa (%). Pesci alimentati con diete che includono lo 0, 25, 50, 75 e il 100% della farina di BSF rispetto a FM (Hi0, Hi25, Hi50, Hi75 e Hi100). (a) I valori sono presentati come media \pm SD ($p < 0.05$; $n = 3$). (b) I boxplot mostrano il minimo e il massimo (whiskers), il primo quartile, la mediana e il terzo quartile (riquadro). Lettere diverse denotano differenze statisticamente significative tra i gruppi sperimentali ($p < 0.05$; $n = 9$).

La Figura 3b riporta il tasso di schiusa. I gruppi sperimentali alimentati con le più alte inclusioni di farina di prepupa BSF (Hi75 e Hi100) rispetto a FM erano caratterizzati da percentuali di schiusa significativamente ($p < 0.05$) più basse (41.6 ± 6.6 e 47.3 ± 6.5 %, rispettivamente) rispetto agli altri gruppi sperimentali che non hanno evidenziato differenze significative tra di loro (76.5 ± 7.0 , 74.4 ± 7.7 e 64.0 ± 9.5 % per Hi0, Hi25 e Hi50).

4.3 Contenuto e composizione degli acidi grassi

4.3.1. Diete.

Come riportato nella Figura 4a, le diete a base di BSF hanno mostrato percentuali significativamente ($p < 0.05$) più alte di SFA (acidi grassi saturi) e percentuali significativamente ($p < 0.05$) più basse di PUFA (acidi grassi polinsaturi) rispetto alla dieta di controllo. Tuttavia, escludendo la dieta di controllo, si sono evidenziati valori significativamente ($p < 0.05$) crescenti di PUFA dal gruppo Hi25 al gruppo Hi100. L'aumento dei livelli di inclusione della farina di prepupe di BSF nelle diete ha determinato una riduzione significativa ($p < 0.05$) delle percentuali n3 e un significativo ($p < 0.05$) aumento delle percentuali n6. Conseguentemente, il rapporto tra n6/n3 ha mostrato differenze significative ($p < 0.05$) tra le diete sperimentali, aumentando dalla dieta di controllo alla dieta Hi100 (Fig. 4b).

4.3.2 Femmine adulte di zebrafish.

Come riportato nella Figura 4c, l'aumento dei livelli di inclusione della farina di prepupe di BSF rispetto a FM ha mostrato un significativo ($p < 0.05$) aumento dei SFA (24.2 ± 0.5 , 27.5 ± 0.5 , 30.5 ± 0.6 , 31.7 ± 0.8 e $34.2 \pm 1.2\%$ per Hi0, Hi25, Hi50, Hi75 e Hi100, rispettivamente), degli acidi grassi monoinsaturi -MUFA- (27.6 ± 0.2 , 28.7 ± 0.3 , 30.4 ± 0.3 , $31.0 \pm$ e $32.4 \pm 0.6\%$ per Hi0, Hi25, Hi50, Hi75

e Hi100, rispettivamente), degli n6 (12.8 ± 0.2 , 13.5 ± 0.2 , 16.0 ± 0.2 , 18.1 ± 0.3 e $20.0 \pm 0.8\%$ per Hi0, Hi25, Hi50, Hi75 e Hi100, rispettivamente) e degli n9 (17.5 ± 0.1 , 18.5 ± 0.2 , 20.9 ± 0.2 , 22.5 ± 0.3 e $23.8 \pm 0.6\%$ per Hi0, Hi25, Hi50, Hi75 e Hi100, rispettivamente). Considerando i PUFA (48.3 ± 0.4 , 43.7 ± 0.9 , 39.0 ± 0.9 , 37.3 ± 1.0 e $33.4 \pm 1.5\%$ per Hi0, Hi25, Hi50, Hi75 e Hi100, rispettivamente) e gli n3 (35.2 ± 0.4 , 30.0 ± 0.8 , 22.8 ± 0.8 , 18.9 ± 1.0 e $12.9 \pm 1.0\%$ per le percentuali di Hi0, Hi25, Hi50, Hi75 e Hi100, rispettivamente), l'aumento dei livelli di inclusione della farina di prepupe di BSF ha determinato una significativa ($p < 0.05$) diminuzione di queste classi di acidi grassi. Di conseguenza, il rapporto n6/n3 (Fig. 3d) è caratterizzato da differenze significative ($p < 0.05$) tra i gruppi sperimentali, aumentando dal gruppo Hi0 al gruppo Hi100 (0.40 ± 0.04 e 1.6 ± 0.10 per Hi0 e Hi100, rispettivamente). Come è osservabile nella Tabella 4, gli SFA più rappresentati in tutti i gruppi sperimentali erano l'acido palmitico (16:0), stearico (18:0) e miristico (14:0). Considerando i MUFA, gli acidi oleico (18:1n9) e palmitoleico (16:1n7) erano predominanti in tutti i gruppi sperimentali e il loro contenuto è significativamente ($p < 0.05$) aumentato e diminuito, rispettivamente, con l'aumentare dei livelli di inclusione nella dieta di farina di prepupe di BSF rispetto a FM. L'acido linoleico (18:2n6), eicosapentaenoico (20:5n3; EPA) e docosaesaenoico (22:6n3; DHA) erano i PUFA più abbondanti in tutti i gruppi

sperimentali. Le percentuali di acido linoleico e acido arachidonico (20:4n6) sono significativamente ($p<0.05$) più alte con l'aumento del contenuto di farina di prepupe di BSF nella dieta. Inoltre, è stata osservata una significativa ($p<0,05$) diminuzione della percentuale di EPA nelle femmine di zebrafish alimentate con diete che presentavano livelli crescenti di inclusione di farina di prepupe di BSF, mentre, per quanto riguarda il DHA, è stata osservata una tendenza simile, ma più lieve rispetto all'EPA. Di conseguenza, il rapporto DHA/EPA è risultato significativamente maggiore con l'aumento dei livelli di inclusione di farina di prepupe di BSF rispetto a FM.

4.3.3 Uova fecondate

Nella Figura 4e viene presentato il contenuto di acidi grassi delle uova fecondate. Aumentando i livelli di inclusione della farina di prepupe di BSF nella dieta è stato osservato un aumento significativo ($p<0.05$) del contenuto di SFA (25.2 ± 0.4 , 26.8 ± 0.9 , 31.1 ± 0.3 , 31.3 ± 0.7 and 35.4 ± 0.5 % per Hi0, Hi25, Hi50, Hi75 e Hi100, rispettivamente) e n6 (10.6 ± 0.1 , 11.6 ± 0.5 , 13.5 ± 0.2 , 18.8 ± 0.7 and 24.2 ± 0.9 % per Hi0, Hi25, Hi50, Hi75 e Hi100, rispettivamente) nelle uova fecondate, con l'unica eccezione dei livelli di SFA che non hanno mostrato differenze significative tra i gruppi Hi50 e Hi75. I gruppi Hi0 e Hi25 hanno mostrato un contenuto di MUFA (20.9 ± 0.4 e 21.5 ± 0.7 % rispettivamente) e n9 (12.3 ± 0.1 e 12.9 ± 0.3 % rispettivamente)

significativamente ($p < 0.05$) più basso rispetto ai gruppi Hi50 (24.4 ± 0.3 e 17.0 ± 0.2 % per MUFA e n9 rispettivamente), Hi75 (25.7 ± 0.4 e 17.6 ± 0.3 % per MUFA e n9 rispettivamente) e Hi100 (23.9 ± 0.3 e 15.4 ± 0.2 % per MUFA e n9 rispettivamente). Contrariamente, i gruppi Hi0 e Hi25 hanno mostrato un contenuto di PUFA (53.9 ± 0.8 e 51.7 ± 1.6 % rispettivamente) nelle uova fecondate significativamente ($p < 0.05$) più alto rispetto ai gruppi Hi50 ($41.4 \pm 0.3\%$), Hi75 ($43.0 \pm 1.1\%$) e Hi100 ($40.6 \pm 0.7\%$). Infine, l'aumento dei livelli di inclusione della farina di prepupe di BSF nelle diete dei pesci ha portato ad una diminuzione significativa ($p < 0.05$) del contenuto di n3 (43.0 ± 0.9 , 39.8 ± 2.0 , 27.7 ± 0.4 , 23.7 ± 0.4 e 16.1 ± 1.0 % per Hi0, Hi25, Hi50, Hi75 e Hi100, rispettivamente) e, di conseguenza, del rapporto n6/n3 (0.25 ± 0.01 , 0.29 ± 0.03 , 0.49 ± 0.01 , 0.80 ± 0.02 e 1.5 ± 0.14 per Hi0, Hi25, Hi50, Hi75 e Hi100, rispettivamente) delle uova fecondate. Considerando il profilo di acidi grassi nelle uova fecondate riportato nella Tabella 4, gli SFA con la concentrazione più alta in tutti i gruppi sperimentali sono stati l'acido palmitico (16:0), e stearico (18:0), il cui contenuto nelle uova fecondate aumentava significativamente ($p < 0.05$) all'aumentare dell'inclusione di farina di BSF nella dieta. L'acido oleico (18:1n9) è risultato il MUFA più abbondante in tutti i gruppi sperimentali seguito dall'acido palmitoleico (16:1n7). Mentre, i PUFA più abbondanti in tutti i gruppi sperimentali erano l'acido linoleico (18:2n6),

EPA (20:5n3) e DHA (22:6n3). Tuttavia, aumentando i livelli di inclusione di farina di prepupe di BSF si è registrata una diminuzione significativa ($p < 0.05$) del contenuto di DHA e, in particolare, del contenuto di EPA nelle uova fecondate. Il rapporto DHA/EPA è risultato significativamente ($p < 0.05$) più basso nei gruppi Hi0 e Hi25 rispetto a Hi50, Hi75 e Hi100.

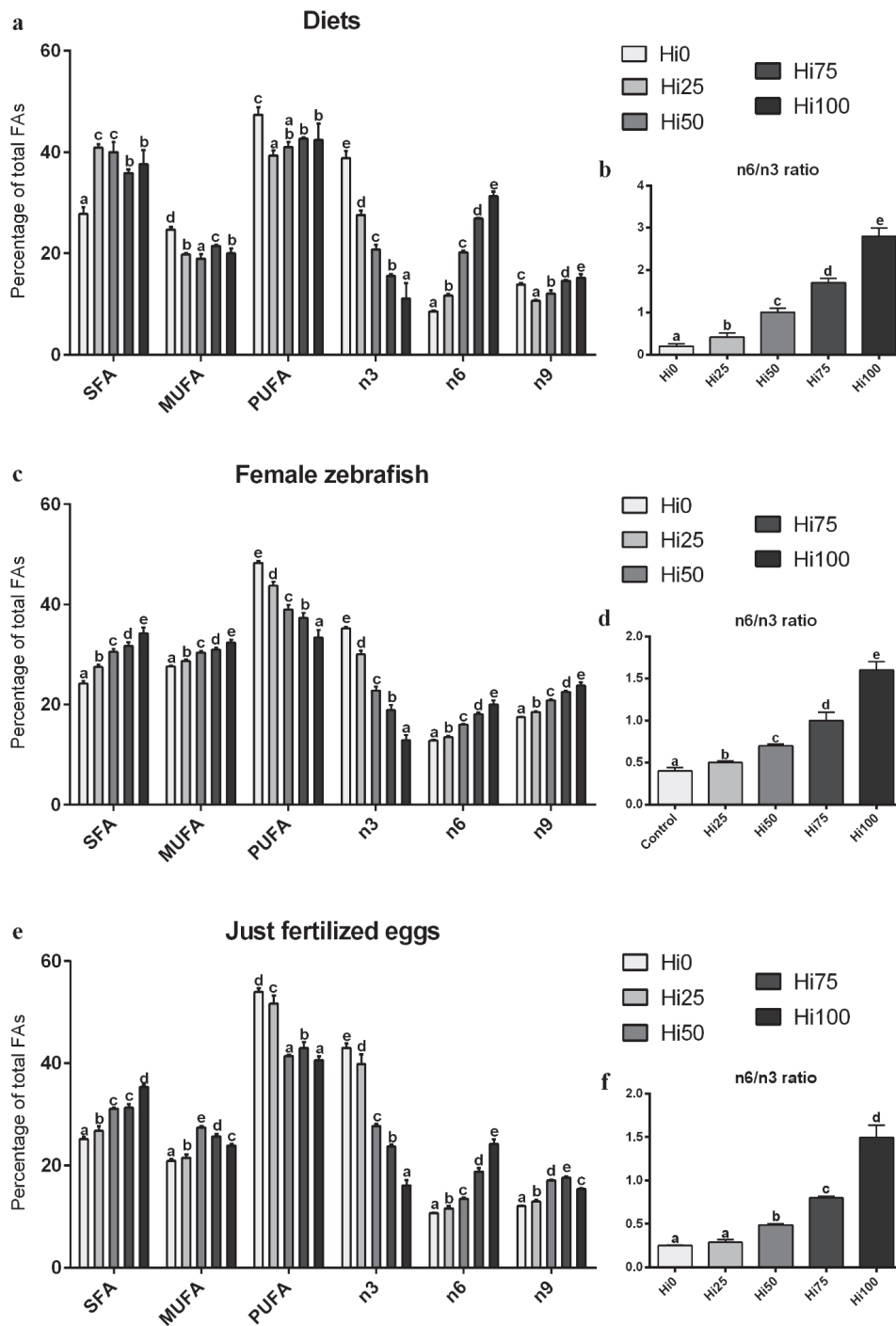


Figura 4. Contenuto di SFA, MUFA e PUFA (come % di acidi grassi totali) e contributo degli acidi grassi omega 3 (n3), omega 6 (n6) e omega 9 (n9) al profilo lipidico. (a,b) diete sperimentali; (c,d) zebrafish femmina; (e, f) uova fecondate. Le diete Hi0, Hi25, Hi50, Hi75 e Hi100 erano caratterizzate rispettivamente da 0, 25, 50, 75 o 100% di inclusione di farina di prepupa di BSF. Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative tra gruppi sperimentali confrontati all'interno della stessa classe di acidi grassi ($p < 0.05$). I valori sono presentati come media \pm DS ($n=3$ per diete sperimentali; $n=12$ per zebrafish femmina; $n=9$ per uova fecondate).

Tabella 4. Composizione degli acidi grassi (% esteri metilici degli acidi grassi) delle femmine di zebrafish e delle uova fecondate

	Females					Just fertilized eggs				
	Hi0	Hi25	Hi50	Hi75	Hi100	Hi0	Hi25	Hi50	Hi75	Hi100
10:0	0.01±0.01 ^a	0.04±0.01 ^b	0.09±0.01 ^c	0.09±0.01 ^d	0.12±0.01 ^e	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
12:0	0.28±0.03 ^a	2.90±0.10 ^b	4.20±0.20 ^c	5.00±0.30 ^d	5.50±0.30 ^e	0.06±0.01 ^a	0.52±0.04 ^b	0.86±0.03 ^c	0.89±0.02 ^c	1.48±0.04 ^d
13:0	0.05±0.01 ^a	0.05±0.01 ^a	0.05±0.01 ^a	0.06±0.01 ^a	0.07±0.01 ^b	0.020±0.00 ₁	0.022±0.00 ₂	0.028±0.00 ₂	0.030±0.00 ₁	0.037±0.00 ₁
14:0	4.1±0.2 ^b	4.2±0.1 ^b	4.2±0.3 ^b	3.7±0.3 ^a	4.7±0.2 ^c	3.1±0.2 ^c	2.5±0.2 ^a	3.3±0.1 ^d	2.9±0.1 ^b	3.6±0.1 ^c
14:1n5	0.58±0.10 ^a	0.62±0.05 ^a	0.69±0.12 ^a	0.67±0.13 ^a	0.88±0.12 ^b	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
15:0	0.82±0.06 ^c	0.74±0.07 ^a _b	0.69±0.06 ^a	0.71±0.05 ^a	0.80±0.06 ^{bc}	0.82±0.04 ^b	0.75±0.04 ^a	0.89±0.02 ^c	0.75±0.02 ^a	0.88±0.02 ^c
15:1n5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
16:0	14.7±0.6 ^a	15.2±0.6 ^a	16.4±0.7 ^b	16.7±0.5 ^{bc}	17.3±0.4 ^c	17.4±0.3 ^a	17.8±0.6 ^a	19.0±0.4 ^b	19.0±0.5 ^b	22.8±0.3 ^c
16:1n9	0.75±0.07 ^a	0.77±0.08 ^a	1.30±0.10 ^b	1.21±0.10 ^b	1.75±0.20 ^c	1.13±0.05 ^a	1.30±0.07 ^b	1.83±0.03 ^d	2.32±0.07 ^e	1.74±0.04 ^c
16:1n7	6.9±0.1 ^c	6.9±0.1 ^c	6.5±0.3 ^b	5.8±0.1 ^a	5.7±0.2 ^a	6.0±0.3 ^d	5.6±0.3 ^c	6.3±0.1 ^b	5.3±0.1 ^a	5.3±0.1 ^a
16:2n7	0.25±0.01 ^a	0.27±0.03 ^a _b	0.29±0.02 ^b	0.35±0.02 ^c	0.42±0.04 ^d	0.25±0.03 ^a	0.28±0.01 ^b	0.27±0.01 ^a _b	0.41±0.01 ^d	0.36±0.01 ^c
17:0	0.71±0.08 ^a	0.80±0.07 ^b	0.78±0.08 ^a _b	0.82±0.06 ^b _c	0.90±0.09 ^c	0.60±0.09 ^a	0.89±0.03 ^b	0.94±0.03 ^b _c	0.98±0.01 ^c	1.13±0.02 ^d
17:1n7	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
18:0	3.3±0.2 ^a	3.4±0.2 ^a	3.9±0.3 ^b	4.4±0.3 ^c	4.5±0.3 ^c	3.1±0.1 ^a	4.2±0.1 ^b	6.0±0.1 ^c	6.6±0.1 ^d	5.4±0.1 ^c
18:1n9	14.8±0.4 ^a	16.2±0.6 ^b	18.5±0.5 ^c	20.4±0.7 ^d	21.2±0.8 ^e	10.1±0.1 ^a	10.9±0.2 ^b	14.3±0.1 ^d	14.5±0.2 ^e	12.9±0.1 ^c
18:1n7	2.6±0.1 ^c	2.7±0.2 ^c	2.3±0.2 ^b	2.0±0.2 ^a	2.0±0.2 ^a	2.80±0.02 ^a	3.02±0.07 ^c	4.11±0.04 ^e	2.88±0.03 ^b	3.17±0.03 ^d
18:2n6	10.5±0.3 ^a	10.8±0.4 ^a	12.5±0.6 ^b	13.4±0.6 ^c	13.6±0.5 ^c	7.77±0.09 ^d	7.62±0.16 ^c	6.84±0.08 ^a	7.30±0.09 ^b	8.22±0.01 ^c
18:3n6	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
18:3n3	2.0±0.1 ^d	1.8±0.1 ^{cd}	1.5±0.2 ^{ab}	1.7±0.1 ^{bc}	1.4±0.3 ^a	1.03±0.2 ^d	0.87±0.03 ^c	0.51±0.04 ^a	0.48±0.01 ^a	0.55±0.01 ^b
20:0	0.16±0.01 ^b	0.13±0.01 ^a	0.12±0.01 ^a	0.15±0.01 ^b	0.15±0.01 ^b	0.13±0.01 ^c	0.12±0.01 ^b	0.11±0.01 ^a	0.10±0.01 ^a	0.11±0.01 ^a
20:1n9	1.28±0.08 ^d	1.03±0.07 ^c	0.83±0.06 ^b	0.70±0.06 ^a	0.67±0.05 ^a	0.77±0.01 ^b _c	0.66±0.07 ^a	0.97±0.01 ^d	0.73±0.01 ^b	0.80±0.02 ^c
20:2n6	0.45±0.02 ^a _b	0.42±0.03 ^a	0.49±0.04 ^b	0.66±0.05 ^c	0.95±0.06 ^d	0.60±0.01 ^a	0.69±0.08 ^a	1.00±0.01 ^b	1.77±0.31 ^c	2.42±0.12 ^d
20:3n6	0.54±0.03 ^a	0.61±0.04 ^a	1.01±0.05 ^b	1.46±0.08 ^c	1.77±0.10 ^d	1.0±0.1 ^a	1.2±0.1 ^a	2.1±0.2 ^b	3.0±0.4 ^c	4.0±0.4 ^d
21:0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
20:4n6	1.3±0.1 ^a	1.6±0.1 ^b	1.9±0.1 ^c	2.5±0.2 ^d	3.7±0.1 ^e	1.27±0.05 ^a	2.10±0.20 ^b	3.50±0.20 ^c	6.80±0.40 ^d	9.50±0.80 ^e
20:3n3	0.21±0.02 ^b	0.19±0.02 ^b	0.15±0.03 ^a	0.14±0.02 ^a	0.15±0.03 ^a	0.21±0.02 ^b	0.23±0.01 ^b	0.22±0.01 ^b	0.17±0.02 ^a	0.45±0.05 ^c
20:5n3	13.9±0.6 ^c	10.8±0.5 ^d	6.3±0.5 ^c	4.3±0.3 ^b	2.0±0.2 ^a	15.70±0.20 _e	11.10±0.20 _d	4.00±0.10 ^c	2.80±0.02 ^b	2.19±0.05 ^a
22:0	0.11±0.01 ^a _b	0.10±0.01 ^a	0.10±0.02 ^a	0.12±0.02 ^b	0.12±0.02 ^b	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

22:1n9	0.75±0.05 ^e	0.55±0.04 ^d	0.30±0.04 ^c	0.21±0.04 ^b	0.11±0.02 ^a	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
23:0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
24:0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
22:6n3	19.1±1.0 ^e	17.2±0.8 ^d	14.9±0.8 ^c	12.7±0.6 ^b	9.4±0.7 ^a	26.1±0.9 ^d	27.6±1.1 ^e	23.0±0.4 ^c	20.3±0.4 ^b	12.9±1.0 ^a
24:1n9	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
DHA/EPA	1.4±0.2 ^a	1.6±0.2 ^a	2.4±0.2 ^b	3.0±0.4 ^c	4.7±0.6 ^d	1.7±0.1 ^a	2.5±0.1 ^b	5.8±0.1 ^c	7.3±0.1 ^d	5.9±0.4 ^c

Le diete includono 0, 25, 50, 75 e 100% di farina di BSF (Hi0, Hi25, Hi50, Hi75 e Hi100). Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative tra i gruppi sperimentali confrontati all'interno della stessa matrice ($p < 0.05$). I valori sono presentati come media \pm SD (n=12 per zebrafish femmina; n=9 per uova fecondate).

4.4 Analisi istologica del fegato e ovario di zebrafish

La Figura 5 riporta l'analisi istologica effettuata sul fegato delle femmine di zebrafish che ha evidenziato un grado variabile di accumulo lipidico in tutti i gruppi sperimentali. I gruppi Hi0, Hi25 e Hi50 (Fig 5a-c) erano caratterizzati da un modesto accumulo lipidico nel parenchima epatico, con la presenza diffusa di epatociti con citoplasma ricco di grasso inframmezzati a normali epatociti. I gruppi Hi75 e Hi100 (Fig. 5d,e), invece, hanno evidenziato una condizione di steatosi epatica, con epatociti rigonfi e un abbondante accumulo lipidico intra-citoplasmatico. Questi risultati sono stati confermati dalla quantificazione della percentuale di frazione grassa nel fegato (Fig. 5f). In particolare, non si sono riscontrate differenze significative tra i gruppi Hi0, Hi25 e Hi50 (44.7±4.5, 47.0±2.5 e 49.6±2.1 %, rispettivamente), mentre i gruppi Hi75 e Hi100 (58.9±1.0 e 59.4±1.6 %, rispettivamente) erano

caratterizzati da valori significativamente ($p < 0.05$) più alti rispetto agli altri gruppi.

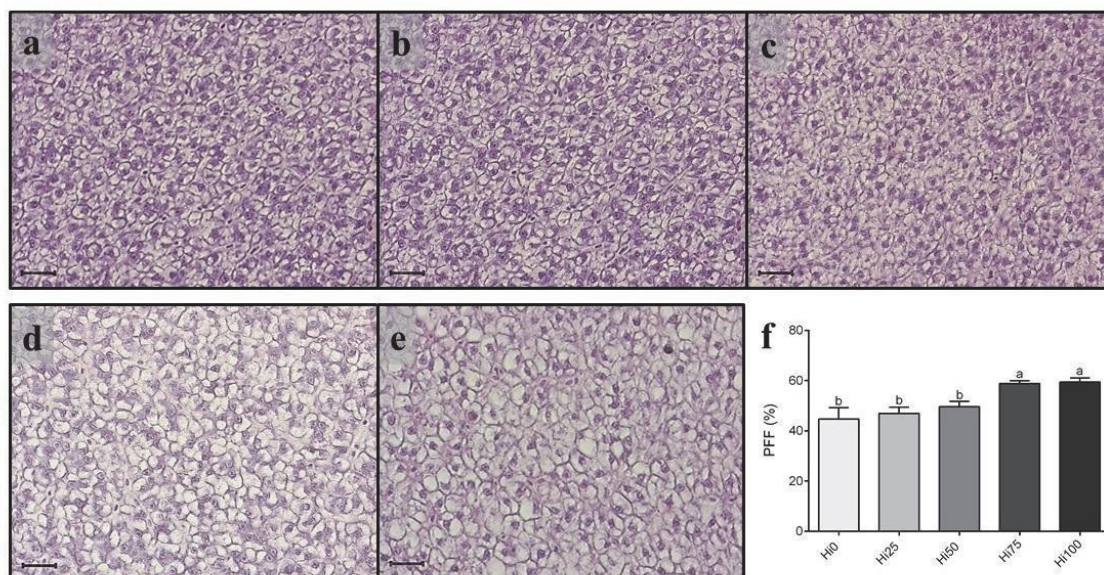


Figura 5. (a-e) Esempio di istomorfologia del parenchima epatico di zebrafish e (f) percentuale di frazione grassa (PFF) calcolata su sezioni di fegato. Pesci alimentati con diete che includono lo 0, 25, 50, 75 e il 100% della farina di BSF rispetto a FM (Hi0, Hi25, Hi50, Hi75 e Hi100). (a) Hi0, (b) Hi25, (c) Hi50, (d) Hi75 e (e) Hi100. Scale bars: 10 µm. Per la PFF, i valori sono presentati come media \pm SD ($n = 5$), Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative tra i gruppi sperimentali ($p < 0.05$).

Nella Figura 6 sono riportate le immagini istologiche rappresentative dell'ovario di zebrafish, mentre la frequenza delle diverse classi di oociti analizzati previtellogeni (PV), classe III (III), classe IV (IV), follicoli post-ovulazione (POF) e oociti atresici (A) è riportata nella Tabella 5. Le analisi non hanno rilevato differenze significative ($p \geq 0,05$) tra tutti i gruppi sperimentali per oociti di classe IV, POF e stadi A osservati. Al contrario, il gruppo Hi100 ha mostrato una percentuale significativamente più alta ($p < 0,05$) di PV e una

percentuale significativamente più bassa ($p < 0,05$) di ovociti di classe III rispetto al gruppo di controllo (Hi0). Queste due fasi erano caratterizzate da una leggera tendenza crescente e decrescente (rispettivamente per PV e classe III) a seguito del livello dietetico del pasto prepupe BSF.

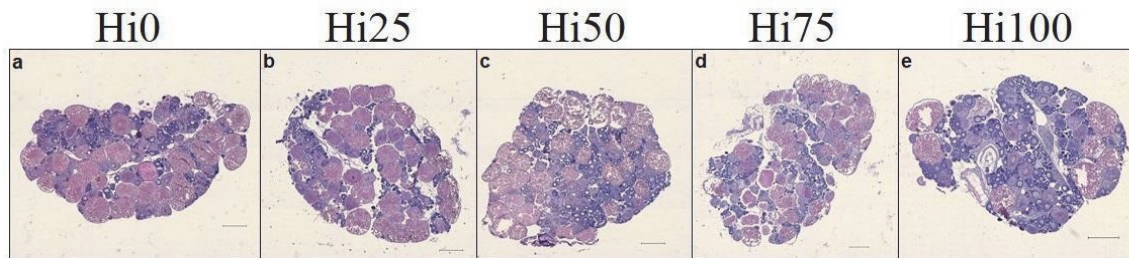


Figura 6. Esempio di istomorfologia dell'ovario di zebrafish. (a) Pesci alimentati con dieta di controllo contenente FM (Hi0) e diete con il (b) 25% (Hi25), (c) 50% (Hi50), (d) 75% (Hi75), (e) 100% (Hi100) di sostituzione di FM con farina di prepupae di BSF. Scale bars: 500 μ m.

Tabella 5. Percentuale di oociti previtellogeni (PV), classe III (III), classe IV (IV), follicoli post-ovulazione (POF) e atresici (A) in pesci alimentati con la dieta di controllo contenente FM (Hi0) e diete con il 25% (Hi25), 50% (Hi50), 75% (Hi75) e 100% (Hi100) di sostituzione di FM con farina di prepupae di BSF

	Hi0	Hi25	Hi50	Hi75	Hi100
PV	89.54 \pm 4.98 ^a	91.58 \pm 5.76 ^{ab}	91.46 \pm 3.68 ^{ab}	91.46 \pm 4.31 ^{ab}	97.98 \pm 1.76 ^b
III	17.79 \pm 8.11 ^a	9.93 \pm 6.56 ^{ab}	9.21 \pm 7.24 ^{ab}	8.59 \pm 5.25 ^{ab}	2.02 \pm 1.76 ^b
IV	0.41 \pm 0.34 ^a	0.17 \pm 0.20 ^a	0.17 \pm 0.20 ^a	0.20 \pm 0.15 ^a	n.d.
POF	0.06 \pm 0.08 ^a	0.17 \pm 0.19 ^a	0.82 \pm 1.16 ^a	0.09 \pm 0.08 ^a	0.04 \pm 0.07 ^a
A	0.03 \pm 0.05 ^a	n.d.	0.01 \pm 0.01 ^a	0.08 \pm 0.09 ^a	n.d.

I risultati sono espressi in percentuale ($[\text{numero di ovociti in ogni stadio} / \text{ovociti totali}] \times 100$) come media \pm SD (n=15). Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative tra i gruppi sperimentali ($p < 0.05$).

4.5 Analisi molecolari

Risposta allo stress. Nella Figura 7a e 7b è riportata l'espressione dei geni coinvolti nella risposta allo stress che mostra valori significativamente ($p < 0.05$) più alti nel gruppo caratterizzato dal livello più alto di inclusione di farina di prepupe di BSF rispetto a FM (Hi100) rispetto agli altri gruppi sperimentali (ad eccezione dell'espressione del gene *nr3c1* nel gruppo Hi75). Non sono state rilevate differenze significative tra gli altri gruppi sperimentali.

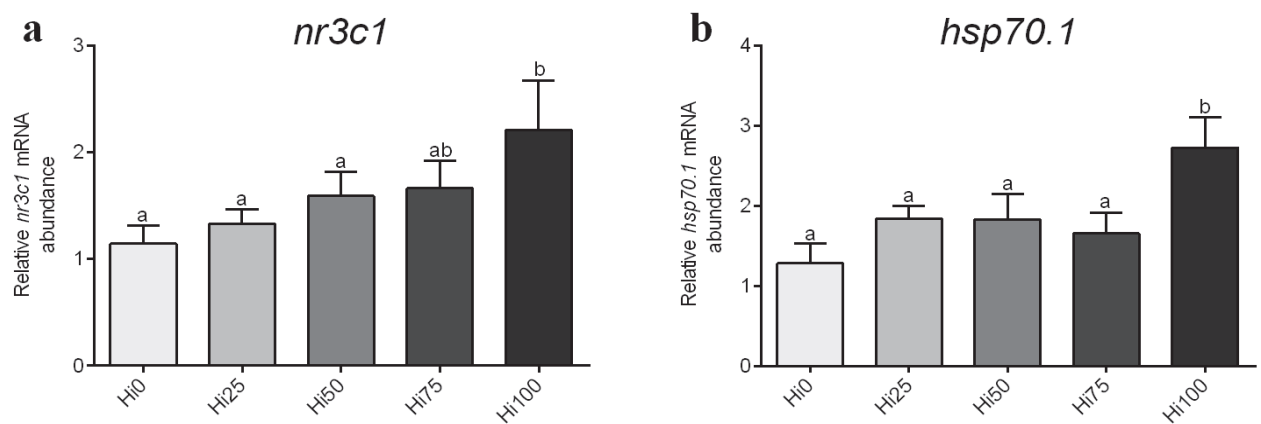


Figura 7. Livelli relativi di mRNA dei geni coinvolti nella risposta allo stress analizzati in campioni di fegato di femmine di zebrafish adulte. (a) *nr3c1* e (b) *hsp70.1*. Pesci alimentati con diete che includono lo 0, 25, 50, 75 e il 100% della farina di BSF rispetto a FM (Hi0, Hi25, Hi50, Hi75 e Hi100). Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative tra i gruppi sperimentali ($p < 0.05$). I valori sono presentati come media \pm SD (n = 5).

Metabolismo lipidico. Come riportato nelle Figure 8a e 8b, le femmine di zebrafish alimentate con inclusioni di farina di prepupe di BSF più alte hanno mostrato un'espressione di *elovl2* ed *elovl5* significativamente ($p < 0.05$) più alta

(ad eccezione dell'espressione di *elovl5* nel gruppo Hi75). Inoltre, maggiore era l'inclusione della farina BSF, maggiore era l'espressione di *fads2* (Fig. 8c). Tuttavia, non sono state evidenziate differenze significative tra i gruppi Hi25, Hi50 e Hi75 e tra i gruppi Hi75 e Hi100.

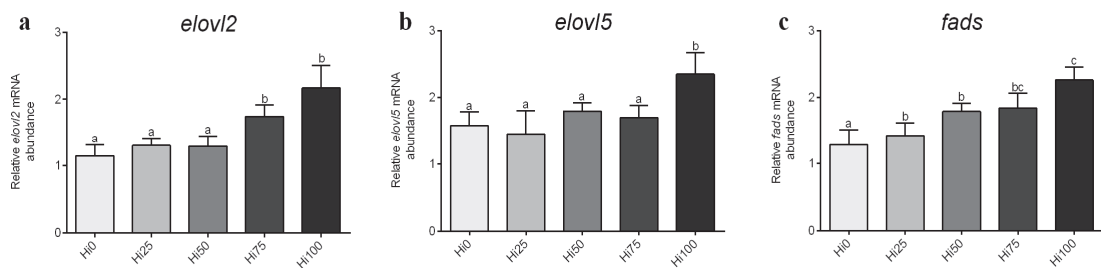


Figura 8. Livelli relativi di mRNA di geni coinvolti nel metabolismo lipidico analizzati in campioni di fegato di femmine di zebrafish adulte. a) *elovl2*, (b) *elovl5* e (c) *fads2*. Pesci alimentati con diete che includono lo 0, 25, 50, 75 e il 100% della farina di BSF rispetto a FM (Hi0, Hi25, Hi50, Hi75 e Hi100). Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative tra i gruppi sperimentali ($p < 0.05$). I valori sono presentati come media \pm DS ($n = 5$).

5. DISCUSSIONE

Fino ad oggi, la maggior parte delle ricerche scientifiche basate sull'utilizzo della farina di insetti nella formulazione dei mangimi per pesci si è concentrata sugli effetti dei diversi livelli di inclusione sulle prestazioni dei pesci durante la fase di accrescimento andando a valutare anche la qualità nutrizionale del prodotto finale mentre, gli effetti dell'alimentazione sulla riproduzione rimane ancora da valutare in modo approfondito (Caimi et al., 2020; Henry et al., 2015; Magalhães et al., 2017; Stadtlander et al., 2017). Lo sviluppo degli oociti e le prestazioni riproduttive sono processi delicati, noti per essere profondamente influenzati dalla qualità dell'alimentazione dei riproduttori. Gli acidi grassi essenziali derivati dai lipidi della dieta influenzano la composizione biochimica del tuorlo, e di conseguenza lo sviluppo embrionale. Inoltre, PUFA a lunga catena come ARA ed EPA sono importanti componenti strutturali dei fosfolipidi della membrana cellulare (Tocher, 2003) e rappresentano i due più importanti precursori degli eicosanoidi coinvolti nella maturazione dei follicoli, nella schiusa e nello sviluppo delle larve nei pesci (Ann Sorbera et al., 2001; Henrotte et al., 2011), mentre, un adeguato apporto di DHA nelle uova è fondamentale per supportare lo sviluppo del tessuto neurale durante la fase embrionale (Benítez-Santana et al., 2007). Le prepupe di BSF utilizzate in questo studio sono state allevate su substrato composto da coffee-silverskin

arricchito con *Schizochytrium* sp. per migliorare il profilo di acidi grassi degli insetti e determinando un aumento nel loro contenuto di PUFA (soprattutto DHA, EPA e in misura minore ARA) come dimostrato da Truzzi et al. (2020). Come precedentemente descritto da Zarantonello et al. (2020a,b) "la farina di prepupe di BSF arricchita" potrebbe essere inclusa nelle diete delle larve e dei giovanili di zebrafish sostituendo fino al 100% della FM senza compromettere la crescita dei pesci. Nel presente studio, durante l'intera prova di alimentazione, le femmine di zebrafish si sono ben adattate alle diete sperimentali poiché l'inclusione di farina di prepupe "arricchita" nelle diete non ha influenzato né le prestazioni di crescita (ad eccezione della lunghezza standard) né gli indici somatici a sostegno della fattibilità di sostituire FM durante l'allevamento dello zebrafish dallo stadio larvale precoce (5 dpf) agli adulti (6 mesi). Considerando il contenuto di FA, le femmine di zebrafish e le uova fecondate riflettevano gli andamenti di PUFA, n3 e n6 delle diete sperimentali. Infatti, è ben noto che il profilo di acidi grassi nella dieta è uno dei fattori più importanti che influenzano il profilo di acidi grassi dei tessuti e delle uova dei pesci (Turchini et al., 2011). In particolare, l'aumento dei livelli di inclusione della farina delle prepupe di BSF ha portato ad una diminuzione di EPA e DHA e ad un parallelo aumento del contenuto di ARA sia nelle carcasse che nelle uova dei pesci. Questa tendenza è in accordo con studi

precedenti che hanno mostrato un profilo di FA simile nelle specie di acqua dolce alimentate con diete carenti di LC-PUFA (El-Sayed et al., 2005; Jeong et al., 2002; Ling et al., 2006; Randazzo et al., 2020). Nel presente studio, è stata rilevata una quantità minore di EPA e DHA nelle carcasse e nelle uova dei pesci alimentati con diete a base di BSF rispetto alla dieta di controllo, e questo potrebbe spiegare la riduzione del numero di uova deposte con l'aumento dei livelli dietetici degli insetti e il peggioramento del tasso di schiusa che caratterizza i gruppi Hi75 e Hi100. In precedenza, Randazzo e collaboratori (2020) hanno ottenuto risultati simili dopo aver testato due diete sperimentali in cui sia il 25% che il 50% di FM sono stati sostituiti con farina di prepupe BSF nelle femmine di zebrafish. Inoltre, gli stessi autori hanno correlato la riduzione delle uova totali deposte a un ritardo nella maturazione oocitaria dovuto alla mancanza di acidi grassi essenziali nella dieta. Infatti, questa ipotesi è supportata dai nostri risultati come evidenziano le analisi istologiche in cui l'aumento dei livelli di BSF nella dieta ha determinato un aumento di oociti previtellogenici ed una parallela diminuzione di oociti di stadio III. Tuttavia, come già suggerito da Randazzo et al., (2020), l'input limitato di EPA e DHA è stata probabilmente risolto, in una certa misura, dalla sintesi ex-novo di questi due LC-PUFA da parte delle femmine di zebrafish. Infatti, rispetto alle specie marine che non hanno la capacità di sintetizzare LC-PUFA, le specie di pesci

d'acqua dolce riescono a sintetizzare EPA e DHA dai precursori a catena più corta dell'acido α -linolenico (18:3n-3) (Tocher, 2010). Nel presente studio, l'attivazione di questa via è stata suggerita dalla maggiore espressione genica di desaturasi ed elongasi in tutti i gruppi sperimentali alimentati con diete a base di BSF, specialmente nei due livelli più alti (Hi75 e Hi100) supportando l'ipotesi che il meccanismo primario responsabile dell'aumento della biosintesi dei PUFA durante la carenza di LC-PUFA nella dieta è la l'incremento di espressione di desaturasi ed elongasi (Bell et al., 2003). Pertanto, la capacità delle femmine di zebrafish di sintetizzare una quantità ottimale di EPA e DHA, essenziali per produrre uova di qualità, dipendeva dal contenuto di acido α -linolenico fornito dalle diete. Nonostante la riduzione del contenuto di acido α -linolenico, le femmine di zebrafish sono state in grado di produrre uova di buona qualità (seppur in minor numero rispetto al controllo) fino al 50% di sostituzione di FM, senza compromettere il successo della schiusa. Al contrario, quando i livelli di inclusione di BSF risultavano più elevati (Hi75 e Hi100) l'apporto di acido α -linolenico era probabilmente troppo basso per non influenzare la qualità delle uova portando ad una riduzione sia per la deposizione delle uova che per il tasso di schiusa. Infine, tra i possibili fattori che influenzano il successo dello sviluppo dell'ovocita va considerato anche il corretto funzionamento del fegato poiché è l'organo coinvolto nella sintesi della

vitellogenina prima del suo trasporto all'ovario. Il presente studio ha mostrato un grave grado di steatosi epatica nelle femmine di zebrafish alimentate con diete Hi75 e Hi100, come supportato dai valori PFF. L'accumulo di grasso epatico è stato precedentemente attribuito sia all'alto contenuto di SFA che all'elevato rapporto n6/n3 delle diete con farine a base di BSF (Bruni et al., 2020; Cardinaletti et al., 2019; Elia et al., 2018; Leamy et al., 2013). Poiché la steatosi epatica è una condizione patologica per i pesci, la significativa sovra-espressione dei marker di stress è in accordo con lo scenario mostrato dal gruppo Hi100 caratterizzato dall'accumulo di grasso più grave. In base a questi risultati, studi precedenti eseguiti su zebrafish e pesci ossei come la trota iridea hanno mostrato una correlazione tra la steatosi epatica e la sovra-espressione dei marcatori di stress aumentando i livelli BSF nella dieta (Cardinaletti et al., 2019; Zarantoniello, Randazzo, et al., 2020). Pertanto, la steatosi epatica e la condizione di stress hanno rivelato una situazione sfavorevole che potrebbe aver interferito con la sintesi della vitellogenina e quindi con la qualità delle uova.

6. CONCLUSIONE

In questo studio sono stati evidenziati gli effetti dell'inclusione di farina di prepupe di BSF sulla riproduzione dello zebrafish. L'integrazione del substrato di allevamento BSF con *Shizochytrium sp* ha fornito acidi grassi essenziali sufficienti per garantire la crescita dei pesci. Tuttavia, considerando la domanda di PUFA necessaria a sostenere le performance riproduttive, il 50% di sostituzione della FM con farina di prepupe di BSF ha rappresentato il valore limite che garantisce la qualità delle uova riducendo al minimo gli effetti negativi ed ottenendo una leggera riduzione del tasso di deposizione delle uova. Questi risultati potrebbero rappresentare il punto di partenza per sviluppare nuovi e più efficaci metodi di arricchimento per la produzione di BSF con un profilo ottimale di acidi grassi.

7. BIBLIOGRAFIA

- Abdul-Halim, H. H., Aliyu-Paiko, M., & Hashim, R. (2014). Partial Replacement of Fish Meal with Poultry By-product Meal in Diets for Snakehead, *Channa striata* (Bloch, 1793), Fingerlings. In *Journal of the World Aquaculture Society* (Vol. 45, Issue 2, pp. 233–241).
<https://doi.org/10.1111/jwas.12112>
- Adamidou, S. (2008). EFFECT OF EXTRUSION ON THE NUTRITIONAL VALUE OF PEAS (*Pisum sativum*), CHICKPEAS (*Cicer arietinum*) AND FABABEANS (*Vicia faba*) AND INCLUSION IN FEEDS FOR EUROPEAN SEABASS (*Dicentrarchus labrax*) AND GILTHEAD SEABREAM (*Sparus aurata*). *PhD Dissertation, September*, 1–210.
<https://dspace.stir.ac.uk/handle/1893/615%0Apapers3://publication/uuid/12B33780-1BB9-4361-9218-D5967347C75F>
- Aleström, P., Holter, J. L., & Nourizadeh-Lillabadi, R. (2006). Zebrafish in functional genomics and aquatic biomedicine. *Trends in Biotechnology*, 24(1), 15–21. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2005.11.004>
- Ann Sorbera, L., Francisco Asturiano, J., Carrillo, M., & Zanuy, S. (2001). Effects of Polyunsaturated Fatty Acids and Prostaglandins on Oocyte Maturation in a Marine Teleost, the European Sea Bass (*Dicentrarchus*

labrax)1. *Biology of Reproduction*, 64(1), 382–389.

<https://doi.org/10.1095/biolreprod64.1.382>

Arango Gutiérrez, G. P., Vergara Ruiz, R. A., & Mejía Vélez, H. (2004).

Compositional, microbiological and protein digestibility analysis of the larva meal of *Hermetia illuscens* L.(Diptera: Stratiomyidae) at

Angelópolis-Antioquia, Colombia. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, 57(2), 2491–2500.

Ayadi, F. Y., Rosentrate, K. A., & Muthukumar, K. (2012). Alternative

Protein Sources for Aquaculture Feeds. In *Journal of Aquaculture Feed Science and Nutrition* (Vol. 4, Issue 1, pp. 1–26).

<https://doi.org/10.3923/joafsnu.2012.1.26>

Bandara, T. (2018). Alternative feed ingredients in aquaculture: Opportunities and challenges. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 6(2), 3087–3094.

<http://www.entomoljournal.com/archives/2018/vol6issue2/PartAJ/6-1-130-287.pdf>

Barroso, F. G., de Haro, C., Sánchez-Muros, M. J., Venegas, E., Martínez-

Sánchez, A., & Pérez-Bañón, C. (2014). The potential of various insect species for use as food for fish. *Aquaculture*, 422–423, 193–201.

<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.12.024>

Bell, J. G., Tocher, D. R., Henderson, R. J., Dick, J. R., & Crampton, V. O. (2003). Altered fatty acid compositions in atlantic salmon (*Salmo salar*) fed diets containing linseed and rapeseed oils can be partially restored by a subsequent fish oil finishing diet. *The Journal of Nutrition*, *133*(9), 2793–2801. <https://doi.org/10.1093/jn/133.9.2793>

Benítez-Santana, T., Masuda, R., Juárez Carrillo, E., Ganuza, E., Valencia, A., Hernández-Cruz, C. M., & Izquierdo, M. S. (2007). Dietary n-3 HUFA deficiency induces a reduced visual response in gilthead seabream *Sparus aurata* larvae. *Aquaculture*, *264*(1), 408–417. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.10.024>

Borowitzka, M. A. (1997). Microalgae for aquaculture: Opportunities and constraints. In *Journal of Applied Phycology* (Vol. 9). Kluwer Academic Publishers.

Borquez, A., Serrano, E., Dantagnan, P., Carrasco, J., & Hernandez, A. (2011). Feeding high inclusion of whole grain white lupin (*Lupinus albus*) to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): effects on growth, nutrient digestibility, liver and intestine histology and muscle fatty acid composition. *Aquaculture Research*, *42*(8), 1067–1078.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2010.02690.x>

Brown, M. R., Jeffrey, S. W., Volkman, J. K., & Dunstan, G. A. (1997).

Nutritional properties of microalgae for mariculture. *Aquaculture*, 151(1–4), 315–331. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(96\)01501-3](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(96)01501-3)

Brown, M. R., Skabo, S., & Wilkinson, B. (1998). The enrichment and

retention of ascorbic acid in rotifers fed microalgal diets. *Aquaculture*

Nutrition, 4(3), 151–156. <https://doi.org/10.1046/j.1365->

2095.1998.00060.x

Bruni, L., Randazzo, B., Cardinaletti, G., Zarantoniello, M., Mina, F., Secci,

G., Tulli, F., Olivotto, I., & Parisi, G. (2020). Dietary inclusion of full-fat

Hermetia illucens prepupae meal in practical diets for rainbow trout

(*Oncorhynchus mykiss*): Lipid metabolism and fillet quality

investigations. *Aquaculture*, 529, 735678.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735678>

Bukkens, S. G., & Paoletti, M. (2005). *Insects in the human diet: nutritional*

aspects.

Caimi, C., Renna, M., Lussiana, C., Bonaldo, A., Gariglio, M., Meneguz, M.,

Dabbou, S., Schiavone, A., Gai, F., Elia, A. C., Prearo, M., & Gasco, L.

(2020). First insights on Black Soldier Fly (*Hermetia illucens* L.) larvae

meal dietary administration in Siberian sturgeon (*Acipenser baerii* Brandt) juveniles. *Aquaculture*, 515, 734539.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734539>

Cardinaletti, G., Randazzo, B., Messina, M., Zarantoniello, M., Giorgini, E., Zimbelli, A., Bruni, L., Parisi, G., Olivotto, I., & Tulli, F. (2019). Effects of Graded Dietary Inclusion Level of Full-Fat *Hermetia illucens* Prepupae Meal in Practical Diets for Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). In *Animals* (Vol. 9, Issue 5). <https://doi.org/10.3390/ani9050251>

Catarina, A., & Xavier, F. (2012). Nutritional Value and Uses of Microalgae in Aquaculture. *Aquaculture*, Table 1. <https://doi.org/10.5772/30576>

Chemello, G., Piccinetti, C., Randazzo, B., Carnevali, O., Maradonna, F., Magro, M., Bonaiuto, E., Vianello, F., Radaelli, G., Fifi, A. P., Gigliotti, F., & Olivotto, I. (2016). Oxytetracycline Delivery in Adult Female Zebrafish by Iron Oxide Nanoparticles. *Zebrafish*, 13(6), 495–503. <https://doi.org/10.1089/zeb.2016.1302>

Chen, W., Ai, Q., Mai, K., Xu, W., Liufu, Z., Zhang, W., & Cai, Y. (2011). Effects of dietary soybean saponins on feed intake, growth performance, digestibility and intestinal structure in juvenile Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Aquaculture*, 318(1–2), 95–100.

<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.04.050>

- Dahiya Rupinder Tewari Gurinder Singh Hoondal, N. (2006). MINI-REVIEW Biotechnological aspects of chitinolytic enzymes: a review. *Appl Microbiol Biotechnol*, 71, 773–782. <https://doi.org/10.1007/s00253-005-0183-7>
- Dahm, R., & Geisler, R. (2006). Learning from small fry: The zebrafish as a genetic model organism for aquaculture fish species. *Marine Biotechnology*, 8(4), 329–345. <https://doi.org/10.1007/s10126-006-5139-0>
- Delaporte, M., Soudant, P., Moal, J., Lambert, C., Quéré, C., Miner, P., Choquet, G., Paillard, C., & Samain, J. F. (2003). Effect of a monospecific algal diet on immune functions in two bivalve species - *Crassostrea gigas* and *Ruditapes philippinarum*. *Journal of Experimental Biology*, 206(17), 3053–3064. <https://doi.org/10.1242/jeb.00518>
- Diclaro, J., & Kaufman, P. (2009). *Black soldier fly Hermetia illucens Linnaeus (Insecta: Diptera: Stratiomyidae)*.
- Diener, S., Zurbrügg, C., Gutiérrez, F. R., Nguyen, D. H., Morel, A., Koottatep, T., & Tockner, K. (2011). Black soldier fly larvae for organic waste treatment—prospects and constraints. *Proceedings of the*

WasteSafe, 2, 13–15.

El-Sayed, A.-F. M., Mansour, C. R., & Ezzat, A. A. (2005). Effects of dietary lipid source on spawning performance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) broodstock reared at different water salinities. *Aquaculture*, 248(1), 187–196.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.04.024>

Elia, A. C., Capucchio, M. T., Caldaroni, B., Magara, G., Dörr, A. J. M., Biasato, I., Biasibetti, E., Righetti, M., Pastorino, P., Prearo, M., Gai, F., Schiavone, A., & Gasco, L. (2018). Influence of *Hermetia illucens* meal dietary inclusion on the histological traits, gut mucin composition and the oxidative stress biomarkers in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*).

Aquaculture, 496, 50–57.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.07.009>

Esteban, M. A., Cuesta, A., Ortuño, J., & Meseguer, J. (2001).

Immunomodulatory effects of dietary intake of chitin on gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) innate immune system. *Fish and Shellfish Immunology*, 11(4), 303–315. <https://doi.org/10.1006/fsim.2000.0315>

FAO. (2020). The State of World Fisheries and Aquaculture 2020.

Sustainability in action. In *Fao*.

<https://doi.org/https://doi.org/10.4060/ca9229en>

Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2013). Edible insects. Future prospects for food and feed security. In *Food and Agriculture Organization of the United Nations* (Vol. 171).

Gasco, L., Rotolo, L., Parisi, G., & Terova, G. (2014). Mealworm (*Tenebrio molitor*) as a potential ingredient in practical diets for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Abstract Book Conference Insects to Feed The World, September*, 78.

<https://www.researchgate.net/publication/288267673>

Gatlin III, D. M., Barrows, F. T., Brown, P., Dabrowski, K., Gaylord, T. G., Hardy, R. W., Herman, E., Hu, G., Krogdahl, Å., Nelson, R., Overturf, K., Rust, M., Sealey, W., Skonberg, D., J Souza, E., Stone, D., Wilson, R., & Wurtele, E. (2007). Expanding the utilization of sustainable plant products in aquafeeds: a review. *Aquaculture Research*, 38(6), 551–579.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2007.01704.x>

Graham, C., von Keyserlingk, M. A. G., & Franks, B. (2018). Zebrafish welfare: Natural history, social motivation and behaviour. *Applied Animal Behaviour Science*, 200(April 2017), 13–22.

<https://doi.org/10.1016/j.applanim.2017.11.005>

- Gunben, E. M., Senoo, S., Yong, A., & Shapawi, R. (2014). High potential of poultry by-product meal as a main protein source in the formulated feeds for a commonly cultured grouper in Malaysia (*Epinephelus fuscoguttatus*). *Sains Malaysiana*, 43(3), 399–405.
- Hardouin, J., & Mahoux, G. (2003). *Zootecnie d'insectes-Elevage et utilisation au bénéfice de l'homme et de certains animaux*.
- Henrotte, E., Milla, S., Mandiki, S. N. M., & Kestemont, P. (2011). Arachidonic acid induces production of 17,20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one (DHP) via a putative PGE2 receptor in fish follicles from the Eurasian perch. *Lipids*, 46(2), 179–187. <https://doi.org/10.1007/s11745-010-3512-2>
- Henry, M., Gasco, L., Piccolo, G., & Fountoulaki, E. (2015). Review on the use of insects in the diet of farmed fish: Past and future. In *Animal Feed Science and Technology* (Vol. 203, Issue 1, pp. 1–22). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2015.03.001>
- Hooper, J., Clark, J. M., Charman, C., & Agnew, D. (2005). Seal mitigation measures on trawl vessels fishing for krill in CCAMLR subarea 48.3. *CCAMLR Science*, 12, 195–205.
- Hua, K., Cobcroft, J. M., Cole, A., Condon, K., Jerry, D. R., Mangott, A.,

Praeger, C., Vucko, M. J., Zeng, C., Zenger, K., & Strugnell, J. M. (2019). The Future of Aquatic Protein: Implications for Protein Sources in Aquaculture Diets. *One Earth*, 1(3), 316–329. <https://doi.org/10.1016/j.oneear.2019.10.018>

Jeong, B. Y., Jeong, W. G., Moon, S. K., & Ohshima, T. (2002). Preferential accumulation of fatty acids in the testis and ovary of cultured and wild sweet smelt *Plecoglossus altivelis*. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part B, Biochemistry & Molecular Biology*, 131(2), 251–259. [https://doi.org/10.1016/s1096-4959\(01\)00501-2](https://doi.org/10.1016/s1096-4959(01)00501-2)

Kotzamanis, Y. P., Van Eys, J., Taylor, S., Lindley, N., Andersen, M., Petsas, G., Atherinos, L., Ilia, V., & Vatsos, I. N. (2008). Evaluation of partial substitution of dietary fish meal by soybean meal supplemented with synthetic amino acids on growth performance, serum chemistry and histology of the juvenile european sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and gilthead sea bream (*Sparus au.* *Resource Management: Natural, Human and Material Resources for the Sustainable Development of Aquaculture. Short Communications of Contributions Presented at the International Conference Aquaculture Europe*, 15–18.

Kroeckel, S., Harjes, A.-G. E., Roth, I., Katz, H., Wuertz, S., Susenbeth, A.,

- & Schulz, C. (2012). *(No Title)*.
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.08.041>
- Krogdahl, Å., & Bakke, A. M. (2015). Antinutrients. In *Dietary Nutrients, Additives, and Fish Health* (pp. 211–235).
<https://doi.org/https://doi.org/10.1002/9781119005568.ch10>
- Lawrence, C. (2007). The husbandry of zebrafish (*Danio rerio*): A review. *Aquaculture*, 269(1–4), 1–20.
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.04.077>
- Leamy, A. K., Egnatchik, R. A., & Young, J. D. (2013). Molecular mechanisms and the role of saturated fatty acids in the progression of non-alcoholic fatty liver disease. *Progress in Lipid Research*, 52(1), 165–174. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.plipres.2012.10.004>
- Lin, S., & Luo, L. (2011). Effects of different levels of soybean meal inclusion in replacement for fish meal on growth, digestive enzymes and transaminase activities in practical diets for juvenile tilapia, *Oreochromis niloticus*×*O. aureus*. *Animal Feed Science and Technology*, 168(1–2), 80–87. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2011.03.012>
- Ling, S., Kuah, M.-K., Tengku Muhammad, T. S., Kolkovski, S., & Shu-Chien, A. C. (2006). Effect of dietary HUFA on reproductive

performance, tissue fatty acid profile and desaturase and elongase mRNAs in female swordtail *Xiphophorus helleri*. *Aquaculture*, 261(1), 204–214.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.06.045>

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

<https://doi.org/10.1111/anu.12343>

Magalhães, R., Sánchez-López, A., Leal, R. S., Martínez-Llorens, S., Oliveira, A., & Peres, H. (2017). *Black soldier fly (Hermetia illucens) prepupae meal as a fish meal replacement in diets for European seabass (Dicentrarchus labrax)*.

<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.04.021>

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

<https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2014.07.008>

Marono, S., Piccolo, G., Loponte, R., Meo, C. Di, Attia, Y. A., Nizza, A., & Bovera, F. (2015). *In Vitro Crude Protein Digestibility of Tenebrio Molitor and Hermetia Illucens Insect Meals and its Correlation with*

Chemical Composition Traits. *Italian Journal of Animal Science*, 14, 3889. <https://doi.org/10.4081/ijas.2015.3889>

Migaud, H., Bell, G., Cabrita, E., Mcandrew, B., Davie, A., Bobe, J., Herr Aez, M. P., & Carrillo, M. (2013). *Gamete quality and broodstock management in temperate fish*. <https://doi.org/10.1111/raq.12025>

Milanovi'c, V. M., Roncolini, A., Cardinali, F., Garofalo, C., Aquilanti, L., Riolo, P., Ruschioni, S., Corsi, L., Isidoro, N., Zarantoniello, M., Olivotto, I., Ceccobelli, S., Tavoletti, S., Clementi, F., & Osimani, A. (2021). *Occurrence of Antibiotic Resistance Genes in Hermetia illucens Larvae Fed Coffee Silverskin Enriched with Schizochytrium limacinum or Isochrysis galbana Microalgae*. <https://doi.org/10.3390/genes12020213>

Muller-Feuga, A., Robert, R., Cahu, C., Robin, J., & Divanach, P. (2007). Uses of Microalgae in Aquaculture. In *Live Feeds in Marine Aquaculture* (Issue November 2007). <https://doi.org/10.1002/9780470995143.ch7>

Navas, J. M., Mañanós, E., Thrush, M., Ramos, J., Zanuy, S., Carrillo, M., Zohar, Y., & Bromage, N. (1998). Effect of dietary lipid composition on vitellogenin, 17 β -estradiol and gonadotropin plasma levels and spawning performance in captive sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Aquaculture*, 165(1–2), 65–79. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(98\)00246-4](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(98)00246-4)

- Naylor, R. L., Hardy, R. W., Bureau, D. P., Chiu, A., Elliott, M., Farrell, A. P., Forster, I., Gatlin, D. M., Goldburg, R. J., Hua, K., & Nichols, P. D. (2009). Feeding aquaculture in an era of finite resources (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (2009) 106, (15103-15110) DOI: 10.1073/pnas.0905235106). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(42), 18040. <https://doi.org/10.1073/pnas.0910577106>
- Newton, L., Craig, S., Wes D, W., Gary, B., & Robert, D. (2005). Using the black soldier fly, *Hermetia illucens*, as a value-added tool for the management of swine manure. *Journal Korean Entomology and Applied Science*, 36(12), 17 pp.
- Oliva-Teles, A., Enes, P., & Peres, H. (2015). *Replacing fishmeal and fish oil in industrial aquafeeds for carnivorous fish* (pp. 203–233). <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100506-4.00008-8>
- Opstvedt, J., Aksnes, A., Hope, B., & Pike, I. H. (2003). Efficiency of feed utilization in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) fed diets with increasing substitution of fish meal with vegetable proteins. *Aquaculture*, 221(1–4), 365–379. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(03\)00026-7](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(03)00026-7)
- Palmelegiano, G. B., Gai, F., Gasco, L., Lembo, G., Spedicato, M. T., Trotta,

P., & Zoccarato, I. (2009). Partial replacement of fish meal by T-Iso in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) juveniles diets. *Italian Journal of Animal Science*, 8(SUPPL. 2), 869–871.

<https://doi.org/10.4081/ijas.2009.s2.869>

Piccinetti, C. C., Ricci, L. A., Tokle, N., Radaelli, G., Pascoli, F., Cossignani, L., Palermo, F., Mosconi, G., Nozzi, V., Raccanello, F., & Olivotto, I. (2012). Malnutrition may affect common sole (*Solea solea* L.) growth, pigmentation and stress response: Molecular, biochemical and histological implications. *Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology*, 161(4), 361–371.

<https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2011.12.009>

Pisa, U. D. I. (2018). *Sostituzione della farina di pesce con farina di Hermetia illucens nei mangimi per pesci : effetto sulle performance zootecniche.*

Primavera, J. H., Friess, D. A., Van Lavieren, H., & Lee, S. Y. (2018). The mangrove ecosystem. In *World Seas: An Environmental Evaluation Volume III: Ecological Issues and Environmental Impacts* (pp. 1–34). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-805052-1.00001-2>

Pueyo, J. J., Hena, A., Kamal, M., Riche, M., Clemente, A., Herman, E. M., & Schmidt, M. A. (2016). *The Potential for Engineering Enhanced*

Functional-Feed Soybeans for Sustainable Aquaculture Feed

*AQUACULTURE IS THE FASTEST GROWING SEGMENT OF
GLOBAL ANIMAL PRODUCTION THAT WILL REQUIRE NEW
SUSTAINABLE SOURCES OF FEED.*

<https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00440>

Pulz, O., & Gross, W. (2004). Valuable products from biotechnology of microalgae. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 65(6), 635–648.

<https://doi.org/10.1007/s00253-004-1647-x>

Randazzo, B., Zarantoniello, M., Cardinaletti, G., Cerri, R., Giorgini, E., Belloni, A., Contò, M., Tibaldi, E., & Olivotto, I. (2021). *Hermetia illucens* and poultry by-product meals as alternatives to plant protein sources in gilthead seabream (*Sparus aurata*) diet: A multidisciplinary study on fish gut status. *Animals*, 11(3), 1–22.

<https://doi.org/10.3390/ani11030677>

Randazzo, B., Zarantoniello, M., Gioacchini, G., Cardinaletti, G., Belloni, A., Giorgini, E., Faccenda, F., Cerri, R., Tibaldi, E., & Olivotto, I. (2021). Physiological response of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) to graded levels of *Hermetia illucens* or poultry by-product meals as single or combined substitute ingredients to dietary plant proteins. *Aquaculture*,

538, 736550. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.736550>

Randazzo, B., Zarantoniello, M., Gioacchini, G., Giorgini, E., Truzzi, C.,
Notarstefano, V., Cardinaletti, G., Huyen, K. T., Carnevali, O., &
Olivotto, I. (2020). Can insect-based diets affect Zebrafish (*Danio rerio*)
reproduction? A multidisciplinary study. *Zebrafish*, *17*(5), 287–304.
<https://doi.org/10.1089/zeb.2020.1891>

Rennie, M. D., Kennedy, P. J., Mills, K. H., Rodgers, C. M. C., Charles, C.,
Hrenchuk, L. E., Chalanchuk, S., Blanchfield, P. J., Paterson, M. J., &
Podemski, C. L. (2019). Impacts of freshwater aquaculture on fish
communities: A whole-ecosystem experimental approach. *Freshwater
Biology*, *64*(5), 870–885.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1111/fwb.13269>

Ribas, L., & Piferrer, F. (2013). *The zebrafish (Danio rerio) as a model
organism, with emphasis on applications for finfish aquaculture
research*. <https://doi.org/10.1111/raq.12041>

Ringø, E., Zhou, Z., Olsen, R. E., & Song, S. K. (2012). Use of chitin and
krill in aquaculture - the effect on gut microbiota and the immune system:
a review. *Aquaculture Nutrition*, *18*(2), 117–131.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2011.00919.x>

- Rumpold, B. A., & Schlüter, O. K. (2013). Nutritional composition and safety aspects of edible insects. *Molecular Nutrition & Food Research*, 57(5), 802–823. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201200735>
- SAKAI, & M. (1992). The immunostimulating effects of chitin in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Diseases in Asian Aquaculture I*. <http://ci.nii.ac.jp/naid/10019211684/en/>
- Salze, G., Tocher, D. R., Roy, W. J., & Robertson, D. A. (2005). Egg quality determinants in cod (*Gadus morhua* L.): Egg performance and lipids in eggs from farmed and wild broodstock. *Aquaculture Research*, 36(15), 1488–1499. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2005.01367.x>
- Sánchez-Muros, M., Barroso, F. G., & Manzano-Agugliaro, F. (2014). Insect meal as renewable source of food for animal feeding: A review. *Journal of Cleaner Production*, 65, 16–27. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2013.11.068>
- Sánchez-Muros, M. J., Barroso, F. G., & Manzano-Agugliaro, F. (2014). Insect meal as renewable source of food for animal feeding: A review. *Journal of Cleaner Production*, 65, 16–27. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2013.11.068>
- Sandberg, A.-S., Andersson, H., Carlsson, N.-G., & Sandström, B. (1987).

Degradation Products of Bran Phytate Formed during Digestion in the Human Small Intestine: Effect of Extrusion Cooking on Digestibility. *The Journal of Nutrition*, 117(12), 2061–2065.

<https://doi.org/10.1093/jn/117.12.2061>

Sarker, P. K., Kapuscinski, A. R., Lanois, A. J., Livesey, E. D., Bernhard, K.

P., & Coley, M. L. (2016). *Towards Sustainable Aquafeeds: Complete Substitution of Fish Oil with Marine Microalga Schizochytrium sp.*

Improves Growth and Fatty Acid Deposition in Juvenile Nile Tilapia

(Oreochromis niloticus). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0156684>

Schabel, H. G. (2010). Forest insects as food: A global review. *Forest Insects*

As Food: Humans Bite Back.

Sealey, W., Gaylord, G., Barrows, F., Tomberlin, J., McGuire, M., Ross, C., &

St-Hilaire, S. (2011). Sensory Analysis of Rainbow Trout, *Oncorhynchus mykiss*, Fed Enriched Black Soldier Fly Prepupae, *Hermetia illucens*.

Journal of the World Aquaculture Society, 42.

<https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.2010.00441.x>

Sheppard, D. C., Newton, G., Thompson, S., & Savage, S. (1994). A value

added manure management system using the black soldier fly.

Bioresource Technology, 50, 275–279.

- Spence, R., Gerlach, G., Lawrence, C., & Smith, C. (2008). The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*. *Biol. Rev*, *83*(13), 13–34.
<https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.2007.00030.x>
- Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E., & Isambert, A. (2006). Commercial applications of microalgae. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, *101*(2), 87–96. <https://doi.org/10.1263/jbb.101.87>
- Stadtlander, T., Stamer, A., Buser, A., Wohlfahrt, J., Leiber, F., & Sandrock, C. (2017). *Hermetia illucens* meal as fish meal replacement for rainbow trout on farm. *Journal of Insects as Food and Feed*, *3*(3), 165–175.
<https://doi.org/10.3920/JIFF2016.0056>
- Tacon, A. G. J., & Metian, M. (2008). Global overview on the use of fish meal and fish oil in industrially compounded aquafeeds: Trends and future prospects. *Aquaculture*, *285*(1–4), 146–158.
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.08.015>
- Tacon, A. G. J., & Metian, M. (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>
- Tocher, D. R. (2003). Metabolism and Functions of Lipids and Fatty Acids in Teleost Fish. *Reviews in Fisheries Science*, *11*(2), 107–184.

<https://doi.org/10.1080/713610925>

Tocher, D. R. (2010). Fatty acid requirements in ontogeny of marine and freshwater fish. *Aquaculture Research*, 41(5), 717–732.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2008.02150.x>

Towers, L. (2016). Effects of Fish Meal Substitution with Poultry By-product Meal on Juvenile Nile Tilapia | The Fish Site. In *March 29*.

file:///D:/VERY LATEST PROJECT RESEARCH/Documents/BLOOD MEAL RESEARCH WEB FILES/Effects of Fish Meal Substitution with Poultry By-product Meal on Juvenile Nile Tilapia The Fish Site.htm

Tredici, M. R., Biondi, N., Ponis, E., Rodolfi, L., & Chini Zittelli, G. (2009).

Advances in microalgal culture for aquaculture feed and other uses. In *New Technologies in Aquaculture: Improving Production Efficiency, Quality and Environmental Management* (pp. 610–676). Elsevier Inc.

<https://doi.org/10.1533/9781845696474.3.610>

Truzzi, C., Giorgini, E., Annibaldi, A., Antonucci, M., Illuminati, S.,

Scarponi, G., Riolo, P., Isidoro, N., Conti, C., Zarantoniello, M., Cipriani,

R., & Olivotto, I. (2020). Fatty acids profile of black soldier fly

(*Hermetia illucens*): Influence of feeding substrate based on coffee-waste silverskin enriched with microalgae. *Animal Feed Science and*

Technology, 259, 114309.

<https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2019.114309>

Tschirner, M., & Simon, A. (2015). Influence of different growing substrates and processing on the nutrient composition of black soldier fly larvae destined for animal feed. *Journal of Insects as Food and Feed*, 1(4), 249–259. <https://doi.org/10.3920/JIFF2014.0008>

Turchini, G M, Francis, D. S., Senadheera, S. P. S. D., Thanuthong, T., & De Silva, S. S. (2011). Fish oil replacement with different vegetable oils in Murray cod: Evidence of an “omega-3 sparing effect” by other dietary fatty acids. *Aquaculture*, 315(3), 250–259.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.02.016>

Turchini, Giovanni M, Torstensen, B. E., & Ng, W.-K. (2009). Fish oil replacement in finfish nutrition. *Reviews in Aquaculture*, 1(1), 10–57.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1753-5131.2008.01001.x>

Ulloa, P. E., Iturra, P., Neira, R., & Araneda, C. (2011). Zebrafish as a model organism for nutrition and growth: Towards comparative studies of nutritional genomics applied to aquacultured fishes. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 21(4), 649–666. <https://doi.org/10.1007/s11160-011-9203-0>

Universiti putra malaysia iranian cottonseed meal varieties as substitute for soybean meal in rainbow trout (o. (2009).

Vargas-Abúndez, A. J., Randazzo, B., Foddai, M., Sanchini, L., Truzzi, C., Giorgini, E., Gasco, L., & Olivotto, I. (2019). Insect meal based diets for clownfish: Biometric, histological, spectroscopic, biochemical and molecular implications. *Aquaculture*, 498, 1–11.
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.08.018>

Veetil, B. K., Quang, N. X., & Thu Trang, N. T. (2019). Changes in mangrove vegetation, aquaculture and paddy cultivation in the Mekong Delta: A study from Ben Tre Province, southern Vietnam. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 226, 106273.
<https://doi.org/10.1016/j.ecss.2019.106273>

Veldkamp, T., van Duinkerken, Huis, A., Lakemond, C. M. M., Ottevanger, E., Bosch, G., & van Boekel. (2012). *Insects as a sustainable feed ingredient in pig and poultry diets : a feasibility study = Insecten als duurzame diervoedergrondstof in varkens- en pluimveevoeders : een haalbaarheidsstudie.*

Vizcaíno, A. J., López, G., Sáez, M. I., Jiménez, J. A., Barros, A., Hidalgo, L., Camacho-Rodríguez, J., Martínez, T. F., Cerón-García, M. C., &

Alarcón, F. J. (2014). Effects of the microalga *Scenedesmus almeriensis* as fishmeal alternative in diets for gilthead sea bream, *Sparus aurata*, juveniles. *Aquaculture*, *431*, 34–43.

<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.05.010>

Wodzinski, R. J., & Ullah, A. H. J. (1996). Phytase. *Advances in Applied Microbiology*, *42*, 263–302.

Yossa, R., Sarker, P. K., Karanth, S., Ekker, M., & Vandenberg, G. W.

(2011). Effects of dietary biotin and avidin on growth, survival, feed conversion, biotin status and gene expression of zebrafish *Danio rerio*.

Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology, *160*(4), 150–158.

<https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2011.07.005>

Zarantoniello, M., Bruni, L., Randazzo, B., Vargas, A., Gioacchini, G.,

Truzzi, C., Annibaldi, A., Riolo, P., Parisi, G., Cardinaletti, G., Tulli, F.,

& Olivotto, I. (2018). Partial Dietary Inclusion of *Hermetia illucens*

(Black Soldier Fly) Full-Fat Prepupae in Zebrafish Feed: Biometric,

Histological, Biochemical, and Molecular Implications. *Zebrafish*, *15*(5),

519–532. <https://doi.org/10.1089/zeb.2018.1596>

Zarantoniello, M., Randazzo, B., Gioacchini, G., Truzzi, C., Giorgini, E.,

Riolo, P., Gioia, G., Bertolucci, C., Osimani, A., Cardinaletti, G., Lucon-Xiccato, T., Milanović, V., Annibaldi, A., Tulli, F., Notarstefano, V., Ruschioni, S., Clementi, F., & Olivotto, I. (2020). Zebrafish (*Danio rerio*) physiological and behavioural responses to insect-based diets: a multidisciplinary approach. *Scientific Reports*, *10*(1), 1–16.
<https://doi.org/10.1038/s41598-020-67740-w>

Zarantoniello, M., Zimbelli, A., Randazzo, B., Compagni, M. D., Truzzi, C., Antonucci, M., Riolo, P., Loreto, N., Osimani, A., Milanović, V., Giorgini, E., Cardinaletti, G., Tulli, F., Cipriani, R., Gioacchini, G., & Olivotto, I. (2020). Black Soldier Fly (*Hermetia illucens*) reared on roasted coffee by-product and *Schizochytrium* sp. as a sustainable terrestrial ingredient for aquafeeds production. *Aquaculture*, *518*(October 2019). <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734659>