



UNIwersytet  
PRZYRODNICZY  
W POZNANIU

**Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu**  
**Wydział Medycyny Weterynaryjnej i Nauk o Zwierzętach**

Dziedzina: Nauki rolnicze

Dyscyplina: Zootechnika i rybactwo

**mgr Zuzanna Mikołajczak**

**Zastosowanie mączek z owadów w dietach wzrostowych dla ryb łososiowatych**

*Rozprawa doktorska*

**Promotorzy:** prof. dr hab. Damian Józefiak, prof. UPP dr hab. Jan Mazurkiewicz

**Jednostka:** Katedra Żywienia Zwierząt

**Poznań, 2023 rok**

## **Wykaz artykułów wchodzących w skład jednolitego cyklu publikacyjnego:**

### **1. Mikołajczak i in., 2020**

Mikołajczak Z., Rawski M., Mazurkiewicz J., Kierończyk B., Józefiak D. (2020) The Effect of Hydrolyzed Insect Meals in Sea Trout Fingerling (*Salmo trutta m. trutta*) Diets on Growth Performance, Microbiota and Biochemical Blood Parameters. *Animals*, DOI: 10.3390/ani10061031

MEiN 2020: 100; IF 2020: 2,752; IF-2 letni: 3,231 ;IF 5-letni: 2,739

### **2. Mikołajczak i in., 2022**

Mikołajczak Z., Rawski M., Mazurkiewicz J., Kierończyk B., Kołodziejski P., Pruszyńska-Oszmałek E., Józefiak D. (2022). The first insight into black soldier fly meal in brown trout nutrition as an environmentally sustainable fish meal replacement. *Animal*, 16(5), 100516.

MEiN 2022: 200; IF 2022: 3,730; IF-2 letni: 3,730 ;IF 5-letni: 2,948

### **3. Mikołajczak i in., 2023a**

Mikołajczak Z., Mazurkiewicz J., Rawski M., Kierończyk B., Józefiak A., Świątkiewicz S., Józefiak D. (2022) Black Soldier Fly Full-Fat Meal in Atlantic Salmon Nutrition – Part A: Effects on Growth Performance, Feed Utilization, Selected Nutriphysiological Traits and Production Sustainability in Fries, *Annals of Animal Science*, vol.23, no.1, 2023, pp.225-238. <https://doi.org/10.2478/aoas-2022-0070>

MEiN 2023: 140; IF 2022: 1,900; IF-2 letni: 1,900; IF 5-letni: 2,301

### **4. Mikołajczak i in., 2023b**

Mikołajczak Z., Mazurkiewicz J., Rawski M., Kierończyk B., Józefiak A., Świątkiewicz S., Józefiak D. (2022) Black Soldier Fly Full-Fat Meal in Atlantic Salmon Nutrition – Part B: Effects on Growth Performance, Feed Utilization, Selected Nutriphysiological Traits and Production Sustainability in Pre-smolts, *Annals of Animal Science*, vol.23, no.1, 2023, pp.225-238. <https://doi.org/10.2478/aoas-2022-0070>

MEiN 2023: 140; IF 2022: 1,900; IF-2 letni: 1,900; IF 5-letni: 2,301

### **Źródła finansowania badań:**

1. Projekt *Owady jako nowe źródła białka dla ryb i drobiu* prowadzony w ramach programu TEAM-TECH, finansowany przez Fundację na rzecz Nauki Polskiej (2017-2020) (2016-2/11-0026).
2. Projekt *InnSecta: innowacyjna technologia produkcji materiałów paszowych w oparciu o biomasę owadów* współfinansowany z Funduszy Europejskich przez Narodowe Centrum Badań i Rozwoju (POIR.01.01.01-00-0828/15).
3. Projekt *Regionalna Inicjatywa Doskonałości* finansowany przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego (2019-2022) (005/RID/2018/19).
4. Fundusze Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu.

*Składam serdecznie podziękowania moim promotorom –  
prof. dr hab. Damianowi Józefiakowi oraz prof. UPP dr hab. Janowi Mazurkiewiczowi  
– za okazane wsparcie, zaangażowanie, cenne uwagi i udzieloną pomoc w trakcie  
prowadzenia doświadczeń i przygotowania rozprawy doktorskiej.*

*Zespołom Katedry Żywienia Zwierząt oraz Pracowni Rybactwa Śródlądowego  
i Akwakultury – dr inż. Mateuszowi Rawskiemu oraz dr hab. Bartoszowi Kierończykowi  
– dziękuję za przyjaźń, wsparcie i życzliwość okazane przez lata współpracy.*

*Kochanym rodzicom Hannie i Wojciechowi oraz bratu Szymonowi – dziękuję za Waszą  
cierpliwość, nieocenione wsparcie i nieustanną wiarę we mnie.*

*Partnerowi Jędrzejowi i najdroższym przyjaciółkom – Patrycji, Magdalenie oraz Marcie  
– dziękuję za to, że jesteście.*

## Spis treści

1. Wstęp.....	12
2. Hipoteza i cel badań.....	22
3. Materiał i metody badawcze .....	23
3.1. Eksperyment I (Mikołajczak i in., 2020).....	26
3.1.1. Układ doświadczalny .....	26
3.1.2. Mączki z biomasy larw owadów .....	27
3.1.3. Hydroliza mączek z biomasy larw owadów .....	27
3.1.4. Przygotowanie diet doświadczalnych .....	27
3.1.5. Techniczne warunki testu wzrostowego.....	30
3.1.6. Wskaźniki wzrostu i wykorzystania pasz oraz przeżywalność ryb.....	30
3.1.7. Pobranie materiału biologicznego .....	31
3.1.8. Indeksy organosomatyczne .....	32
3.1.9. Analiza chemiczna materiału biologicznego.....	32
3.1.10. Analiza histomorfometryczna jelit .....	32
3.1.11. Analiza mikrobiomu jelitowego.....	33
3.1.12. Analizy parametrów biochemicznych i immunologicznych surowicy krwi oraz wątroby .....	34
3.2. Eksperyment II (Mikołajczak i in., 2022) .....	36
3.2.1. Układ doświadczalny .....	36
3.2.2. Mączka z biomasy larw <i>Hermetia illucens</i> .....	36
3.2.3. Przygotowanie diet doświadczalnych .....	37
3.2.4. Techniczne warunki testu wzrostowego.....	39
3.2.5. Wskaźniki wzrostu i wykorzystania pasz oraz przeżywalność ryb.....	39
3.2.6. Zrównoważenie środowiskowe chowu ryb .....	39
3.2.7. Badanie strawności składników pokarmowych pasz .....	40
3.2.8. Pobranie materiału biologicznego .....	40
3.2.9. Indeksy organosomatyczne oraz kondycja ryb .....	40
3.2.10. Analiza chemiczna materiału biologicznego.....	41
3.2.11. Analiza mikrobiomu jelitowego.....	41
3.2.12. Analizy parametrów biochemicznych surowicy krwi .....	41
3.3. Eksperyment III (Mikołajczak i in., 2023a) .....	42
3.3.1. Układ doświadczalny .....	42
3.3.2. Mączka z biomasy larw <i>Hermetia illucens</i> .....	42

3.3.3. Przygotowanie diet doświadczalnych.....	43
3.3.4. Ocena właściwości fizycznych pasz.....	45
3.3.5. Techniczne warunki testu wzrostowego.....	46
3.3.6. Wskaźniki wzrostu i wykorzystania pasz oraz przeżywalność ryb.....	46
3.3.7. Zrównoważenie środowiskowe chowu ryb.....	46
3.3.8. Badanie strawności składników pokarmowych pasz.....	47
3.3.9. Pobranie materiału biologicznego.....	47
3.3.10. Indeksy organosomatyczne oraz kondycja ryb.....	47
3.3.11. Analiza chemiczna materiału biologicznego.....	48
3.3.12. Analiza histomorfometryczna jelit.....	48
3.4. Eksperyment IV (Mikołajczak i in., 2023b).....	49
3.4.1. Układ doświadczalny.....	49
3.4.2. Mączka z biomasy larw <i>Hermetia illucens</i> .....	50
3.4.3. Przygotowanie diet doświadczalnych.....	50
3.4.4. Techniczne warunki testu wzrostowego.....	52
3.4.5. Wskaźniki wzrostu i wykorzystania pasz oraz przeżywalność ryb.....	52
3.4.6. Zrównoważenie środowiskowe chowu ryb.....	52
3.4.7. Pobranie materiału biologicznego.....	52
3.4.8. Indeksy organosomatyczne oraz kondycja ryb.....	52
3.4.9. Analiza chemiczna materiału biologicznego.....	53
3.4.10. Analiza histomorfometryczna jelit.....	53
3.4.11. Ocena barwy oraz jakości mięsa.....	53
3.5. Analiza statystyczna.....	55
<b>4. Wyniki badań.....</b>	<b>56</b>
4.1. Eksperyment I (Mikołajczak i in., 2020).....	56
4.1.1. Wskaźniki wzrostu i wykorzystania pasz oraz przeżywalność ryb.....	56
4.1.2. Indeksy organosomatyczne oraz skład ciała ryb.....	56
4.1.3. Charakterystyka histomorfometryczna jelit.....	56
4.1.4. Mikrobiom przewodu pokarmowego.....	56
4.1.5. Parametry biochemiczne i immunologiczne surowicy krwi oraz wątroby....	57
4.2. Eksperyment II (Mikołajczak i in., 2022).....	57
4.2.1. Wskaźniki wzrostu i wykorzystania pasz oraz przeżywalność ryb.....	57
4.2.2. Zrównoważenie środowiskowe chowu ryb.....	57

4.2.3. Strawność składników pokarmowych pasz.....	57
4.2.4. Indeksy organosomatyczne oraz kondycja ryb .....	58
4.2.5. Mikrobiom przewodu pokarmowego .....	58
4.2.6. Parametry biochemiczne surowicy krwi .....	58
4.3. Eksperyment III (Mikołajczak i in., 2023a).....	58
4.3.1. Właściwości fizyczne pasz.....	58
4.3.2. Wskaźniki wzrostu i wykorzystania pasz oraz przeżywalność ryb.....	59
4.3.3. Zrównoważenie środowiskowe chowu ryb .....	59
4.3.4. Strawność składników pokarmowych pasz.....	59
4.3.5. Indeksy organosomatyczne oraz kondycja ryb .....	59
4.3.6. Charakterystyka histomorfometryczna jelit .....	59
4.4. Eksperyment IV (Mikołajczak i in., 2023b).....	60
4.4.1. Wskaźniki wzrostu i wykorzystania pasz oraz przeżywalność ryb.....	60
4.4.2. Zrównoważenie środowiskowe chowu ryb .....	60
4.4.3. Indeksy organosomatyczne oraz kondycja ryb .....	60
4.4.4. Charakterystyka histomorfometryczna jelit .....	60
4.4.5. Ocena barwy oraz jakości mięsa .....	61
<b>5. Dyskusja.....</b>	<b>63</b>
<b>6. Stwierdzenia i wnioski.....</b>	<b>73</b>
<b>7. Literatura .....</b>	<b>74</b>
<b>8. Kopie opublikowanych artykułów w ramach cyklu .....</b>	<b>89</b>
<b>9. Oświadczenia .....</b>	<b>145</b>

### **Wykaz stosowanych skrótów:**

**ALP** (*alkaline phosphatase*) - fosfataza alkaliczna

**ALT** (*alanine transaminase*) – aminotransferaza alaninowa

**AMPs** (*antimicrobial peptides*) – białka przeciwdrobnoustrojowe

**AOAC** (*The Association of Official Analytical Chemists*) – Stowarzyszenie urzędowych chemików analitycznych

**AST** (*aspartate transaminase*) – aminotransferaza asparaginianowa

**BSF** (*black soldier fly*) – *Hermetia illucens*

**BSFM** (*black soldier fly larvae full-fat meal*) – pełnotłusta mączka z biomasy larw *Hermetia illucens*

**BWG** (*body weight gain*) – przyrost masy ciała

**CE** (*cook efficiency*) – wydajność gotowania

**CF** (*Fulton's condition factor*) – wskaźnik kondycji Fultona

**CFL** (*cooled fillet*) – udział procentowy fileta schłodzonego

**CS** (*carcass share*) – procentowy udział tuszki

**DDGS** (*distiller's dried grains with solubles*) – suszony wywar gorzelniany

**DIR** (*daily intake rate*) – wskaźnik dziennego pobrania paszy

**DL/FTL** (*relative distal intestine length*) – względna długość jelita dystalnego

**DL/GIT** (*distal intestine share in total gastrointestinal tract length*) – procentowy udział jelita dystalnego w całkowitej długości przewodu pokarmowego

**ER** (*expansion ratio*) – współczynnik ekspansji peletu

**FAO** (*Food and Agriculture Organization of the United Nations*) – Organizacja Narodów Zjednoczonych do spraw wyżywienia i rolnictwa

**FBW** (*final body weight*) – końcowa masa ciała

**FCE** (*feed conversion efficiency*) – efektywność wykorzystania paszy

**FCR** (*feed conversion ratio*) – współczynnik wykorzystania paszy

**FI** (*feed intake*) – pobranie paszy



**FIFO** (*Fish-In-Fish-Out*) – tzw. indeks rybożerności

**FMU** (*fish meal use*) – względne wykorzystanie mączki rybnej

**FOU** (*fish oil use*) – względne wykorzystanie oleju rybnego

**FS** (*fillet share*) – udział procentowy fileta świeżego

**GGT** (*gamma-glutamyl transpeptidase*) – gamma-glutamylotranspeptydaza

**GIT/FTL** (*relative gastrointestinal tract length*) – względna długość przewodu pokarmowego

**GMO** (*genetically modified organism*) – organizm genetycznie zmodyfikowany

**HPLC** (*high-performance liquid chromatography*) – wysokosprawna chromatografia cieczowa

**HSI** (*hepatosomatic index*) – indeks hepatosomatyczny

**IgM** – immunoglobulina M

**IL/FTL** (*relative intestinal length*) – względna długość jelit

**IL/GIT** (*intestine share in total gastrointestinal tract length*) – procentowy udział jelit w całkowitej długości przewodu pokarmowego

**JTK** – jednostka tworząca kolonię

**Kp** (*nitrogen-to-protein conversion factor*) – empiryczny współczynnik konwersji białka ogólnego

**LER** (*lipid efficiency ratio*) – wydajność wzrostowa tłuszcz paszowego

**NEFA** (*non-esterified fatty acids*) – wolne kwasy tłuszczowe

**PD** (*pellet bulk density*) – gęstość nasypowa peletu

**PER** (*protein efficiency ratio*) – wydajność wzrostowa białka paszowego

**PL/FTL** (*relative proximal intestine length*) – względna długość jelita proksymalnego

**PL/GIT** (*proximal intestine share in total gastrointestinal tract length*) – procentowy udział jelita proksymalnego w całkowitej długości przewodu pokarmowego

**PPV** (*protein production value*) – wartość produkcyjna białka paszowego

**PWG** (*percent of fish body weight gain*) – procentowy przyrost masy ciała

**SGR** (*specific growth rate*) – względny dobowy przyrost masy jednostkowej ryby

**SR** (*survival rate*) – wskaźnik przeżywalności ryb

**SS** (*spleen share*) – procentowy udział śledziony

**SV** (*sinking velocity*) – prędkość opadania peletu

**TC** (*total cholesterol*) – cholesterol całkowity

**TP** (*total protein*) – białko całkowite

**VI** (*volume increase*) – wzrost objętości

**VSI** (*viscerosomatic index*) – indeks wiscerosomatyczny

**WS** (*water stability*) – stabilność peletu w wodzie

## Streszczenie

Akwakultura obecnie stoi przed wyzwaniem zrównoważenia produkcji. Wykorzystywane w niej materiały paszowe – mączka rybna i olej rybny – są identyfikowane jako jedne z najbardziej negatywnie wpływających na środowisko. W perspektywie postępujących problemów związanych z eksploatacją środowiska oraz potrzebą odpowiedzi na upodobania konsumentów, owady są obiecującą alternatywą. Mączki pełnotłuste, mączki odtłuszczone i oleje z biomasy owadów są aktualnie jednymi z najczęściej rozważanych zamienników dla standardowo stosowanych komponentów białkowych i energetycznych. W związku z powyższym przeprowadzono cykl badawczy, którego celem była ocena wpływu zastosowania mączek z owadów jako alternatywy dla mączki rybnej w dietach dla ryb łososiowatych na parametry i zrównoważenie środowiskowe odchowu, współczynniki strawności składników pokarmowych, indeksy organosomatyczne, pomiary histomorfometryczne jelit, mikrobiom przewodu pokarmowego oraz parametry biochemiczne surowicy krwi. Przeprowadzono również ocenę właściwości fizycznych pasz oraz barwy i jakości mięsa ryb. W eksperymencie I zbadano wpływ zastosowania w dietach dla narybku troci wędrownej pełnotłustych mączek z mącznika młynarka oraz drewnojada poddanych hydrolizie enzymatycznej. W eksperymencie II oceniono efekt wzrastającego udziału (0%, 5%, 10% i 20%) pełnotłustej mączki z biomasy larw *Hermetia illucens* w paszach dla narybku pstrąga potokowego. Natomiast w eksperymentach III oraz IV zbadano wpływ wzrastającego udziału (0%, 5%, 10% i 15%) pełnotłustej mączki z biomasy larw *Hermetia illucens* w dietach dla narybku oraz młodocianych osobników łosia atlantyckiego. Bazując na uzyskanych wynikach, możliwe jest zastosowanie hydrolizowanych mączek z mącznika młynarka i drewnojada w paszach dla narybku troci wędrownej w udziale do 10%. Możliwe jest użycie pełnotłustych mączek z *Hermetia illucens* w paszach przeznaczonych dla narybku pstrąga potokowego (do 20% w paszy) i łosia atlantyckiego (do 10% w paszy dla narybku oraz do 15% w paszy dla osobników młodocianych). Co więcej, dowiedziono, że zastosowane w paszach mączki z owadów mogą modyfikować mikrobiom przewodu pokarmowego, wpływać na jego budowę histomorfometryczną, a także na biochemiczne parametry surowicy krwi u ryb łososiowatych. Zastosowanie pełnotłustej mączki z *Hermetia illucens* zwiększyło zrównoważenie środowiskowe chowu ryb łososiowatych.

## Summary

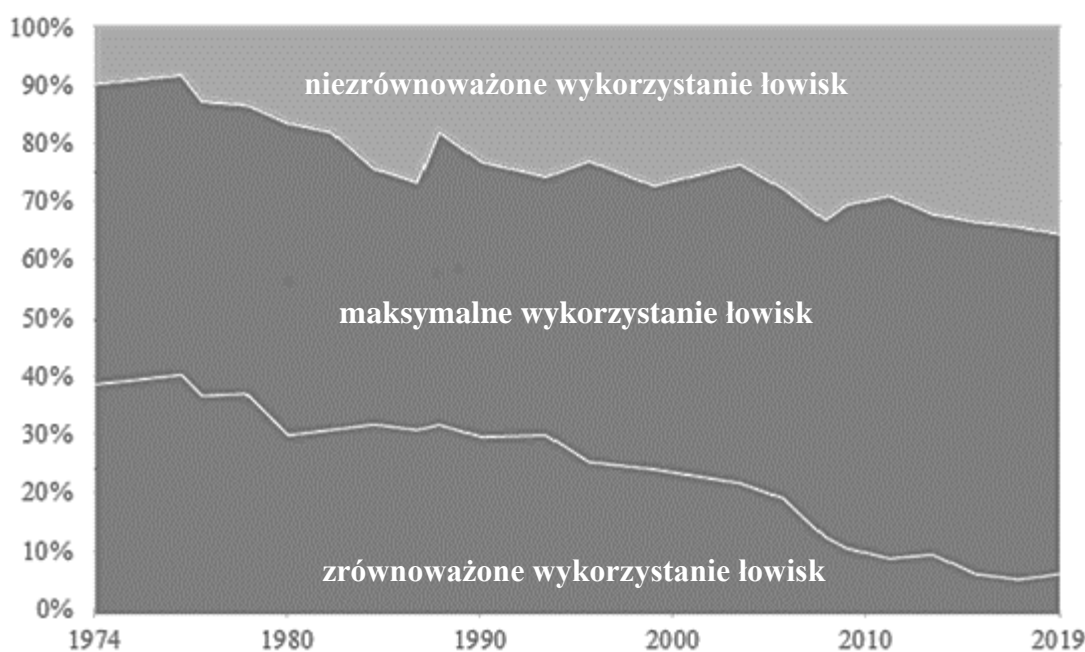
Aquaculture currently faces the challenge of reaching sustainable production. The feed materials used in aquaculture – fishmeal and fish oil – are identified as one of the most negatively affecting the environment. In the perspective of progressive problems related to the exploitation of the environment and the need to respond to consumer preferences, insects are a promising alternative. Insects full-fat meals, defatted meals and oils are currently one of the most frequently considered replacements for the standard protein and energy components. Therefore, a research cycle was carried out to assess the impact of the use of insect meals as an alternative to fishmeal in salmonids diets on the growth performance, feed utilization, environmental sustainability, nutrients digestibility coefficients, organosomatic indices, histomorphometric measurements of the intestines, gastrointestinal tract microbiome, and biochemical parameters of blood serum. In addition, the physical properties of feed, as well as the color and quality of fish meet were assessed. In experiment I, the effect of usage of hydrolyzed full-fat mealworm and superworm meals in sea trout fry diets was assessed. In experiment II, the increasing inclusion (5%, 10%, and 20%) of *Hermetia illucens* larvae full-fat meal in brown trout fry diets was tested. While in experiments III and IV, the effect of the increasing inclusion (5%, 10%, 15%) of *Hermetia illucens* larvae full-fat meal in diets for Atlantic salmon fry and pre-smolts was evaluated. Based on the obtained data, it is possible to use hydrolyzed mealworm and superworm meals in sea trout nutrition in the share of up to 10%. It is also possible to implement *Hermetia illucens* larvae full-fat meals in brown trout (up to 20% of feed) and Atlantic salmon (up to 10% for fries and up to 15% for pre-smolts) nutrition. Additionally, it has been proven, that insect meals as a part of salmonids diets can modify the microbiome of gastrointestinal tract, affect its histomorphometric structure, as well as the biochemical parameters of blood serum. The usage of *Hermetia illucens* larvae full-fat meal improved the environmental sustainability of salmonids rearing.

## 1. Wstęp

Akwakultura ma istotny wkład w światowe bezpieczeństwo żywnościowe, jednak jej dalszy rozwój wymagać będzie transformacji w zarządzaniu zasobami naturalnymi, osobowymi i intelektualnymi w celu rozwoju opartego na innowacjach technologicznych i procesowych oraz nowych inwestycjach o wysoce zrównoważonym środowiskowo charakterze (FAO, 2022). Całkowita produkcja rybołówstwa i akwakultury w roku 2020 osiągnęła 214 milionów ton, co w porównaniu z rokiem 2018 stanowi wzrost o 19,6%. Druga z wymienionych gałęzi w roku 2020 wyniosła globalnie produkcję 123 milionów ton surowców – przekraczając skalę pozyskania zasobów pochodzących z połowów wynoszącą 91 mln ton. W roku 2018 produkcja akwakultury wynosiła 82 miliony ton, osiągając niespotykany w innych obszarach produkcji zwierzęcej niemal 50% wzrost w ciągu zaledwie dwóch lat. Jednocześnie należy zauważyć, że wachlarz gatunków utrzymywanych i produktów dostarczanych na rynek przez akwakulturę ulega ciągłemu poszerzeniu. W chwili obecnej są to przede wszystkim ryby hodowlane słodkowodne, słonowodne i dwuśrodowiskowe, skorupiaki (przede wszystkim krewetki, kraby i raki), mięczaki (ostrygi, przegrzebki, małże i omułki), bezkręgowce, żółwie, żaby oraz algi (FAO, 2020; FAO, 2022).

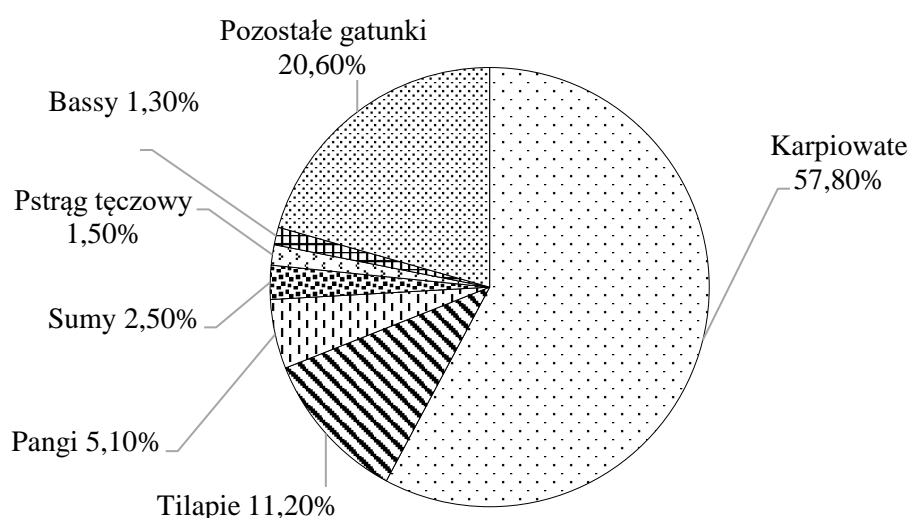
Co istotne, zdecydowana większość produkcji akwakultury pochodzi z chowu słodkowodnych gatunków ryb, podczas gdy rybołówstwo jest głównym źródłem gatunków dwuśrodowiskowych i słonowodnych. Światowe połowy morskie od końca lat 90-tych XX wieku na podstawie przepisów lokalnych i umów międzynarodowych są limitowane do poziomu około 100 mln ton. Ograniczenie to jest jedną z głównych przyczyn rozwoju akwakultury w dobie wzrastającego zapotrzebowania na produkty z organizmów wodnych. Kolejną przesłanką uniemożliwiającą zwiększenie połowów morskich są postępujące zmiany klimatu, prowadzące do zaburzeń cyrkulacji wód oceanicznych, istotnego obniżania zawartości tlenu w wodzie, załamania gradientów temperaturowych i połączeń poszczególnych poziomów sieci troficznych (Free i in., 2019). Rybołówstwo przyczyniając się do nadmiernej eksploatacji zasobów morskich i oceanicznych, dodatkowo zwiększa wyżej opisaną presję antropogeniczną na ekosystemy, co wpływa na zmniejszenie bioróżnorodności i negatywnie modyfikuje ekosystemy wodne (Worm i in., 2009). Należy podkreślić, że dążąc do gospodarowania zasobami naturalnymi z poszanowaniem możliwości regeneracji ekosystemów, nie tylko skala połowów ale termin, technologia i zakres ich prowadzenia są istotne. W związku z powyższym jednym z najważniejszych obecnie zadań jest oszacowanie wzajemnej

relacji połowów zrównoważonych i negatywnie oddziałujących na środowisko. W ostatnich latach obserwuje się znaczący wzrost połowów morskich odbywających się w sposób niezrównoważony środowiskowo (FAO, 2022) (Ryc. 1). Najczęściej taka sytuacja ma miejsce w obszarach południowo-wschodniego Pacyfiku, Morza Śródziemnego i Morza Czarnego. Przełomienie następuje w sytuacji, gdy skala połowów przekracza naturalne możliwości regeneracyjne populacji organizmów zasiedlających łowisko. Sytuacja ta prowadzi do załamania struktury populacji gatunków docelowych, jak również stanowiących przyłów. Maksymalne wykorzystanie łowisk – uznawane przez FAO jako zrównoważone – należy uznać sytuację, w której prowadzona jest najwyższa skala pozyskania umożliwiająca odradzanie się tych populacji. Natomiast jako zrównoważone wykorzystanie łowisk definiuje się wykorzystanie zasobów poniżej zdolności produkcyjnych i odtworzeniowych ekosystemów wykorzystania zbiornika wodnego.



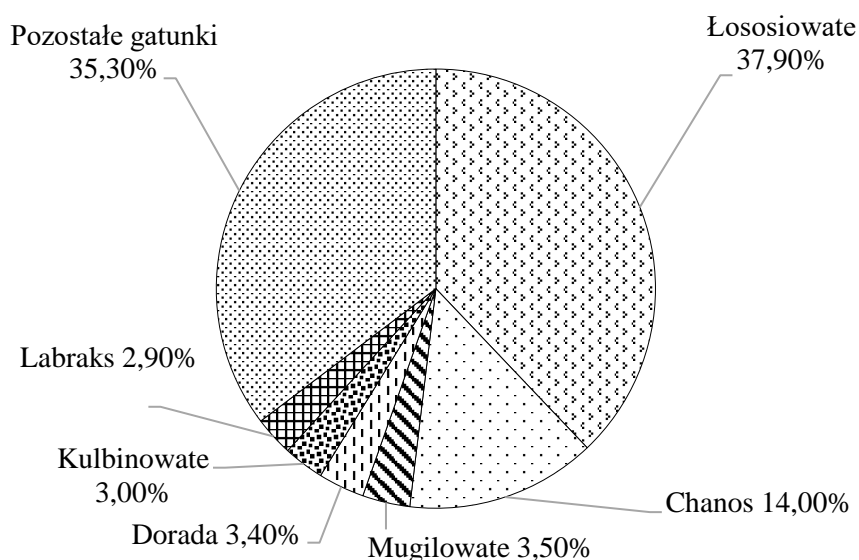
**Rycina 1. Zmiany udziałów poszczególnych statusów zrównoważenia środowiskowego rybołówstwa morskiego w latach 1974-2019 (źródło: FAO, 2022).**

Niemniej jednak, od 2000 roku obserwuje się znaczący wzrost produkcji ryb w systemach akwakultury i dotyczy on zarówno gatunków słodkowodnych, słonowodnych oraz dwuśrodowiskowych (FAO, 2022). W przypadku ryb hodowanych w akwakulturze słodkowodnej, znaczną ich część (aż 57,8%) stanowią ryby z rodziny karpiovatych. Na kolejnym miejscu plasują się tilapie (11,2%), przy czym w największej ilości produkowana jest tilapia nilowa (*Oreochromis niloticus*) i stanowi aż 9% światowej produkcji. Pangie stanowią 5,1% światowej produkcji, natomiast sumy 2,5%. W czołówce znajduje się również pstrąg tęczowy (*Oncorhynchus mykiss*), przedstawiciel rodziny łososiowatych, zajmujący 13 miejsce w światowej produkcji (Ryc. 2).



**Rycina 2. Światowa produkcja głównych grup ryb w akwakulturze słodkowodnej (na podstawie danych FAO, 2022).**

Z kolei w przypadku akwakultury słonowodnej, znaczny udział stanowią ryby łososiowate (łącznie 37,9% globalnej produkcji), z trzema wiodącymi gatunkami: łosoś atlantycki (*Salmo salar*) – 32,6% produkcji, kizucz (*Oncorhynchus kisutch*) – 2,7% produkcji oraz pstrąg tęczowy – 2,6% produkcji. Na drugim miejscu znajduje się chanos produkowany obecnie na poziomie 14%. Znacznie mniejsze udziały w światowej produkcji mają mugilowate (3,5%), dorada (3,4%), kulbinowate (3%) oraz labraks (2,9%). Pozostałe gatunki stanowią aż 35,5% globalnej wartości (Ryc. 3).



**Rycina 3. Światowa produkcja głównych grup ryb w akwakulturze słonowodnej (na podstawie danych FAO, 2022).**

Akwakultura będąc komplementarnym, a równocześnie alternatywnym dla rybołówstwa źródłem produktów obecnie stoi przed wyzwaniem zrównoważenia produkcji. Wykorzystywane w niej materiały paszowe – mączka rybna i olej rybny – są identyfikowane jako jedne z najbardziej wpływających na środowisko i przyczyniających się do postępującego globalnego ocieplenia (Ghamkhar i Hicks, 2020). Szacuje się, że sektor akwakultury zużywa około 69% całkowitej światowej produkcji mączki rybnej oraz nawet 75% całkowitej produkcji oleju rybnego, co w dużym stopniu czyni go uzależnionym od połowów morskich (Naylor i in., 2021). Bazując na danych z roku 2018, około 12% światowej produkcji ryb wykorzystana została na cele niezwiązane z wyżywieniem populacji ludzkiej. Zwracając uwagę na konkretne grupy gatunków, produkcja ryb łososiowatych, będących głównym zainteresowaniem niniejszej pracy, zużywa około 14% mączki rybnej stosowanej w akwakulturze, przy jednoczesnym wykorzystaniu 72% stosowanego oleju rybnego (FAO, 2020). Pomimo stosowania licznych prób zrównoważenia produkcji mączki i oleju rybnego nadal 73% mączki rybnej pochodzi z przetwórstwa całych ryb, w przypadku oleju rybnego ma to miejsce dla 52% (FAO, 2022). Wysoki stopień zależności stale rosnącej produkcji akwakultury od dwóch wspomnianych materiałów paszowych, ma swoje odzwierciedlenie w nieustannie zwiększających się cenach tych komponentów i stanowi długoterminowe wyzwanie ekonomiczne, społeczne i środowiskowe (Ghamkhar i Hicks, 2020). W roku 2021 średni indeks cen ryb opracowany przez FAO wyniósł o 7,2% więcej w porównaniu do roku



2020, a szacunki na rok 2022 wskazują na wzrost o 19% w porównaniu do roku poprzedniego już w pierwszym kwartale (FAO, 2022).

Opisane powyżej trudności związane z zastosowaniem mączki rybnej i oleju rybnego jako głównych źródeł białka i tłuszczu paszowego w produkcji akwakultury stały się przesłankami do poszukiwania alternatyw. Konieczność redukcji udziałów tych materiałów w paszach dla ryb przyczyniła się do wzrostu zastosowania komponentów pochodzenia roślinnego (Fry i in., 2016). Niemniej jednak, produkty te wpływają negatywnie na środowisko naturalne poprzez zwiększenie zużycia wody i zajmowanie kolejnych areałów rolnych (Foley i in., 2011; Pahlow i in., 2015), a także znacznie większą produkcję odpadów (Kokou i Fountoulaki, 2018; Piedrahita 2003). Co więcej, materiały paszowe pochodzenia roślinnego mogą charakteryzować się obecnością czynników antyżywniowych. W przypadku najczęściej stosowanej alternatywy – poekstrakcyjnej śruty sojowej – obecne są inhibitory trypsyny zmniejszające strawność białka, a także saponiny, pogarszające smakowitość paszy. Dodatkowo, w przypadku ryb łososiowatych żywionych paszami z udziałem materiałów paszowych wytworzonych z ziarna soi, odnotowywano występowanie zapalenia jelita dystalnego, a także pogorszone parametry rozrodu (Hardy 1996, 2010; Lazzarotto i in., 2015). Należy również podkreślić, że w przypadku materiałów pochodzenia roślinnego nie zawsze procesy technologiczne (takie jak ekstruzja) będą użytecznym sposobem dezaktywacji składników szkodliwych. Wiele z nich jest opornych na procesy przetwórstwa i należą do nich między innymi kwas fitynowy, gossypol, garbniki czy glukozytolany (Hardy 2010; Krogdahl i in., 2015). Ponadto, stosowanie roślinnych komponentów paszowych z wysoką zawartością włókna i węglowodanów nieskrobiowych w przypadku ryb drapieżnych może zmniejszać biodostępność energii w dietach, co prowadzi do niższych przyrostów masy ciała, a przede wszystkim wyższego wykorzystania białka na cele energetyczne (Sanz i in., 2000). Jednak aspekty żywieniowe nie stanowią jedyne problemu w wykorzystaniu tego źródła składników pokarmowych. Podobnie jak w przypadku mączki rybnej, obserwowany jest wzrost cen soi (FAO, 2018), co więcej, znaczna część importu stanowią rośliny genetycznie modyfikowane. Pomimo faktu, iż nie istnieją dostępne dane literaturowe, które potwierdzałyby szkodliwość roślin GMO, zarówno w żywieniu człowieka, jak i w stosowaniu ich jako komponentów paszowych u zwierząt gospodarskich, temat ten wciąż budzi poważne obawy wśród konsumentów (Ardebili i Rickertsen, 2020).

W perspektywie postępujących problemów związanych z eksploatacją środowiska oraz potrzebą odpowiedzi na upodobania konsumentów, owady są obiecującą alternatywą. Mączki pełnotłuste, mączki odtłuszczone i oleje z biomasy owadów są aktualnie jednymi z najczęściej rozważanych zamienników dla standardowo stosowanych komponentów białkowych i energetycznych. Prowadzony jest nad nimi szereg badań zarówno rozwojowych, jak i wdrożeniowych. Należy podkreślić, że wartość pokarmowa owadów i ich zastosowanie, również w żywieniu człowieka, były obiektem badań jeszcze u schyłku XX wieku (Bukkens 1997). Początkowo najczęściej omawianym gatunkiem była mucha domowa (*Musca domestica*), a produkowana z niej mączka „maggot meal” wykorzystywana była głównie w doświadczeniach poświęconych zastąpieniu mączki rybnej w żywieniu drobiu (Akpodiete i in., 1998; Cadag i in., 1981). Wraz z początkiem XXI wieku poświęcano więcej uwagi innym gatunkom, a obiektem badań stały się świerszcze (Wang i in., 2004, 2005). W późniejszym czasie gamę stosowanych gatunków znacznie rozszerzono. W dostępnej literaturze naukowej przedmiotu znajdują się prace omawiające wykorzystanie produktów pochodzących z owadów z rodziny czarnuchowatych (*Tenebrionidae*) – mącznika młynarka (*Tenebrio molitor*) (Ballitoc i Sun, 2013; Bovera i in., 2015; Ravzanaadii i in., 2012) oraz drewnojada (*Zophobas morio*) (Benzertiha i in., 2019; Latney i in., 2017). Insekty te szeroko stosowano również w doświadczeniach żywieniowych na całym spektrum gatunków ryb (Gasco i in., 2016; Rahman Jabir i in., 2012; Ng, 2001; Sánchez-Muros i in., 2016), w tym rybach łososiowatych (Belforti i in., 2015; Doğankaya, 2016; Gasco i in., 2014). W chwili obecnej najczęściej omawianym gatunkiem jest *Hermetia illucens* (ang. – *black soldier fly*), której produkcja ma swoje zastosowanie zarówno w żywieniu drobiu (Kawasaki i in., 2019; Kierończyk i in., 2020, 2022; Sypniewski i in., 2020), trzody chlewnej (Yu i in., 2019, 2020), zwierząt przeżuwających (Jayanegara i in., 2017; Mulianda i in., 2020) oraz ryb (Magalhães i in., 2017; Rawski i in., 2020; Tippayadara i in., 2021), w tym także gatunków łososiowatych (Belghit i in., 2019a; Bruni i in., 2020; Józefiak i in., 2019; Stadlander i in., 2017). Intensyfikacja prac badawczych nad zastosowaniem produktów pochodzących z owadów jako innowacyjnych materiałów paszowych stały się powodem powstania korzystnych regulacji prawnych (Rozporządzenie Komisji (UE) 2017/893 z dnia 24 maja 2017 r. zmieniające załączniki I i IV do rozporządzenia Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 999/2001 oraz załączniki X, XIV i XV do rozporządzenia Komisji (UE) nr 142/2011) w odniesieniu do przepisów dotyczących przetworzonego białka zwierzęcego – które również

przyspieszają proces wdrażania ich do praktycznej produkcji zwierząt. Obecnie dozwolone jest stosowanie przetworzonego białka zwierzęcego pochodzącego z następujących gatunków owadów: *Hermetia illucens*, muchy domowej (*Musca domestica*), mącznika młynarka (*Tenebrio molitor*), pleśniakowca lśniącego (*Alphitobius diaperinus*), świerszcza domowego (*Acheta domestica*), świerszcza bananowego (*Grylodes sigillatus*), świerszcza kubańskiego (*Gryllus assimilis*) oraz jedwabnika morwowego (*Bombyx mori*).

Głównym argumentem przemawiającym za stosowaniem produktów pochodzących z owadów w żywieniu zwierząt jest ich zrównoważenie środowiskowe (Smetana i in., 2021). W pracy Quang Tran i in. (2022) porównywano ze sobą różne źródła białka: mączki z owadów, mączkę rybną, poekstrakcyjną śrutę sojową, roślinne koncentraty białkowe, mikroalgi oraz białka jednokomórkowe, pod kątem wpływu ich produkcji na różne aspekty środowiskowe. W zdecydowanej większości badanych parametrów mączki z owadów były bezkonkurencyjne. Wykazano, że ich produkcja zużywa najmniejsze ilości wody i w najniższym stopniu przyczynia się do eutrofizacji. Równocześnie obserwuje się niskie zużycie energii, znaczne ograniczenie użytkowanej powierzchni produkcyjnej, a ich potencjał do generowania globalnego ocieplenia jest prawie zerowy. Najbardziej eksploatującymi środowisko komponentami paszowymi są mączka rybna i poekstrakcyjna śruta sojowa (szczególnie pod kątem zużycia wody, energii i postępującej eutrofizacji). Warto również zauważyć, że podobnie jak w przypadku produkcji pozostałych zwierząt gospodarskich, przemysłowa hodowla owadów może generować szereg gazów, w tym również tych przyczyniających się do globalnego ocieplenia. Do gazów najczęściej rejestrowanych w trakcie wielkoskalowej hodowli owadów zaliczane są amoniak, metan, tlenek diazotu oraz dwutlenek węgla. Niemniej jednak ilość emitowanych gazów jest nieporównywalnie niska w stosunku do innych sektorów produkcji zwierzęcej (Halloran i in., 2018). Co istotne, owady charakteryzują się również wysoką wydajnością przetwarzania pasz (co jest typowe dla gatunków zmiennocieplnych), a substrat hodowlany mogą stanowić bioodpady. Szacuje się, że z 2 kg biomasy można wyprodukować średnio 1 kg żywca owadów (Makkar i in., 2014). Czynnikiem pozornie ograniczającym zastosowania mączek z owadów w żywieniu ryb może być ich dostępność i cena. W obecnej chwili, w zależności od gatunku koszt surowcowy 1 kg mączki kształtuje się na poziomie 2,8 - 6 €. Natomiast cena mączki rybnej w zależności od klasy wynosi 2,5 - 4 €. Warto zauważyć, że

w perspektywie nieustającego wzrostu cen mączki rybnej, powstają prace, w których potwierdzono opłacalność wykorzystania alternatywnej mączki z owadów w produkcji ryb (Rawski i in., 2021). Opłacalność ta jest jednak zależna od gatunku ryb, rodzaju mączki (gatunku owadów, stosowanie mączek odtłuszczonych, częściowo odtłuszczonych oraz pełnotłustych) oraz udziału zastosowanej mączki w diecie (Stejskal i in., 2020). Materiały wytworzone z biomasy owadów jako innowacyjne komponenty paszowe spotykają się ze znacznie wyższą akceptacją wśród konsumentów niż ma to miejsce w przypadku organizmów GMO. Według danych literaturowych opartych o badania ankietowe, znaczna część respondentów deklaruje pozytywny stosunek do mięsa zwierząt gospodarskich i ryb, które żywione były mączkami i olejami z owadów (Laureati i in., 2016; Mancuso i in., 2016; Popoff i in., 2017; Verbeke i in., 2015). Oprócz ceny, smaku, jakości mikrobiologicznej i wpływu na zdrowie, konsumenci zwracają również uwagę na zrównoważenie środowiskowe produktów (Szendrő i in., 2020; Verbeke i in., 2015), a także podkreślają, że informacja o materiałach paszowych zastosowanych w akwakulturze i ich wpływie na środowisko może warunkować dokonywane przez nich wybory zakupowe (Bazoche i Poret, 2016).

Na wartość pokarmową owadów składa się ich profil chemiczny, a także szereg aspektów funkcjonalnych. Głównymi składnikami pokarmowymi występującymi w owadach jest białko ogólne, którego procentowy udział w zależności od gatunku waha się pomiędzy 40 a 70%, a także tłuszcz surowy, którego zawartość kształtuje się na poziomie 25 do 55% suchej masy (Józefiak i in., 2016). Następnym w kolejności składnikiem jest popiół surowy, którego ilość wahać się może między 3-5% suchej masy (Finke, 2013; Zielińska i in., 2015). Owady na ogół zawierają więcej fosforu niż wapnia co wiąże się z niekorzystnym stosunkiem tych dwóch pierwiastków. Pod tym względem wyróżniającym się gatunkiem jest *Hermetia illucens*, u którego poziom wapnia jest wyższy niż fosforu. Wynika to z faktu, iż larwy tego gatunku w porównaniu do innych posiadają zmineralizowany egzoszkielet (Oonincx i Finke, 2021). Równocześnie fosfor występujący w owadach cechuje się wysoką biodostępnością – w porównaniu do roślin nie jest związany w formie fitynianów. Należy również nadmienić, iż ważnym składnikiem znajdującym się w egzoszkielecie owadów jest chityna, należąca chemicznie do polisacharydów. Przydatność tego związku w paszach dla zwierząt zawierających produkty pochodzące z owadów można rozpatrywać dwojako. Z jednej strony literatura naukowa wskazuje, iż chityna ma zdolność do wiązania się z białkiem ogólnym (Finke,

2007), co może wpływać na obniżenie jego strawności (Marono i in., 2015). W przypadku owadów stosowanie standardowego współczynnika konwersji białka ( $N \times 6,25$ ) może prowadzić do przeszacowania jego ilości – dla mączek z owadów wartość współczynnika konwersji białka szacowana jest na poziomie 4,76 – 5,60 (Janssen i in., 2017). Inne prace natomiast zwracają uwagę na pozytywny aspekt obecności chityny i jej pochodnych w dietach dla ryb, ze względu na polepszenie ich zdrowotności i statusu immunologicznego (Cha i in., 2008; Esteban i in., 2001). Chityna nie jest jedynym związkiem występującym w owadach wykazującym potencjalnie korzystne efekty na kondycję ryb. Szeroko opisywane są również specyficzne białka przeciwdrobnoustrojowe (AMPs – *antimicrobial peptides*). Są to kationowe białka o niskiej masie cząsteczkowej (od kilku do kilkudziesięciu kDa), które wykazują aktywność przeciwko bakteriom, grzybom, a także niektórym wirusom i pasożytom poprzez perforację ich zewnętrznej błony lub otoczki (Józefiak i in., 2016). Potwierdzono w literaturze naukowej, że ekspresja AMPs zależy między innymi od podawanej owadom paszy w trakcie tuczu (Vogel i in., 2018). Kolejnym związkiem, który powszechnie występuje w owadach i który często wymieniany jest z uwagi na jego funkcjonalność w żywieniu zwierząt jest kwas laurynowy (Gasco i in., 2018). Wykazuje on aktywność przeciwdrobnoustrojową wobec *Esherichia coli*, *Clostridium perfringens* oraz *Salmonella* spp. (Skrivanova i in., 2007), natomiast materiały paszowe bogate w kwas laurynowy wykazują pozytywny wpływ na histomorfometrię przewodu pokarmowego (Yazici i in., 2022). Stwierdzono również, iż zawartość tłuszczu oraz popiołu surowego zależne są od stosowanego w chowie owadów pokarmu (Kierończyk i in., 2020). Larwy BSF utrzymywane na substratach o wysokiej koncentracji energii zmieniają się w poczwarki z wyższą zawartością tłuszczu bogatego w średnio-łańcuchowe kwasy tłuszczowe (MCFA) (Spranghers i in., 2017).

Jednym z powodów, dla którego produkty pochodzące z owadów są tak obszernie testowane w doświadczeniach żywieniowych na rybach jest fakt, iż stanowią one część ich naturalnego pokarmu (Stenberg i in., 2019). Zdecydowana większość dziko żyjących gatunków ryb żywi się owadami przystosowanymi do życia w wodzie (Hodar i in., 2020). Ideę, że wdrożenie materiałów paszowych pochodzących z owadów w żywieniu akwakultury jest powrotem do ewolucyjnego przystosowania tych zwierząt do proponowanego pokarmu dodatkowo popiera fakt, iż niektóre gatunki ryb charakteryzują się aktywnością specyficznego enzymu – chitynazy – w przewodzie pokarmowym,

którego działanie ma wysokie znaczenie odżywcze. Co więcej, chityna rozłożona w procesie chitynolitycznym może być wchłaniana przez przewód pokarmowy efektywniej niż glukoza (Hoar i in., 1979). W przypadku łososia atlantyckiego potwierdzono ekspresję chitynazy w różnych tkankach: żołądkową, której rola skupia się przede wszystkim na dodatkowym trawieniu chityny, a także jelitową. Niemniej jednak, dokładny sposób działania i zależności opisanych enzymów pozostają nieznane (Holen i in., 2022). Ewolucyjne przystosowanie ryb do pobierania składników pokarmowych z owadów poszerza możliwości praktycznego wykorzystania tego materiału paszowego w ich dietach. Surowce pochodzące z owadów wykorzystywano już w żywieniu ryb łososiowatych: pstrągów tęczowych (Belforti i in., 2015; Bruni i in., 2020; Cardinaletti i in., 2019; Józefiak i in., 2019) czy troci wędrowniej (*Salmo trutta m. trutta*) (Hoffmann i in., 2020; Hoffmann i in., 2021a; Hoffmann i in., 2021b), jednak najwięcej prac skupia się na zastosowaniu ich u łososia atlantyckiego (Belghit i in., 2019a; Biancarosa i in., 2019; Stenberg i in., 2019; Weththasinghe i in., 2021).

Jednakże dane dotyczące efektów wdrażania produktów pochodzących z biomasy larw owadów w żywieniu ryb wciąż nie dają jednoznacznej odpowiedzi dotyczących optymalnych udziałów w dietach. Konieczne jest holistyczne podejście skupiające w sobie nie tylko wpływ zastosowanych materiałów na wyniki produkcyjne i wykorzystanie paszy, ale również na funkcjonowanie i rozwój przewodu pokarmowego oraz mikrobiom jelitowy. Jednocześnie z perspektywy postępujących problemów ekologicznych ważnym aspektem jest ocena zrównoważenia środowiskowego chowu ryb. W związku z powyższym, podjęto realizację cyklu badawczego z zastosowaniem mączek z biomasy larw owadów w żywieniu trzech gatunków ryb łososiowatych.

## **2. Hipoteza i cel badań**

Na podstawie danych literaturowych sformułowano następujące hipotezy badawcze:

1. Mączki z biomasy larw owadów stanowią alternatywne źródło białka w dietach dla ryb łososiowatych.
2. Zastosowanie w paszach mączek z biomasy larw owadów zwiększa zrównoważenie środowiskowe chowu ryb łososiowatych.
3. Częściowe zastąpienie mączki rybnej mączkami z biomasy larw owadów nie wpływa negatywnie na wykorzystanie pasz oraz wyniki odchowu i status nutrifizjologiczny ryb łososiowatych.

Celem badań była ocena wpływu zastosowania mączek z owadów jako alternatywy dla mączki rybnej w dietach dla ryb łososiowatych na parametry i zrównoważenie środowiskowe odchowu, współczynniki strawności składników pokarmowych, indeksy organosomatyczne, pomiary histomorfometryczne jelit, mikrobiom przewodu pokarmowego oraz parametry biochemiczne surowicy krwi. Przeprowadzono również ocenę właściwości fizycznych pasz oraz barwy i jakości mięsa ryb.

### 3. Materiał i metody badawcze

Celem weryfikacji zakładanych hipotez przeprowadzono cykl badawczy składający się z łącznie czterech eksperymentów z udziałem trzech gatunków ryb łososiowatych (*Salmonidae*): troci wędrowniej (*Salmo trutta* m. *trutta*), pstrąga potokowego (*Salmo trutta* m. *fario*) oraz łososia atlantyckiego (*Salmo salar*).

W eksperymencie I (Mikołajczak i in., 2020) zbadano wpływ zastosowania w dietach dla narybku troci wędrowniej pełnotłustych mączek z mącznika młynarka oraz drewnojada, poddanych hydrolizie enzymatycznej na: wyniki wskaźników wzrostu i kondycji ryb oraz wykorzystania paszy, wyniki indeksów organosomatyczne, charakterystykę histomorfometryczną jelit, skład mikrobiomu przewodu pokarmowego oraz parametry biochemiczne i immunologiczne surowicy krwi. W tym celu przygotowano trzy pasze: kontrolną, bez udziału mączek z biomasy larw owadów oraz dwie diety doświadczalne z udziałem mączek z biomasy larw testowanych gatunków owadów.

W eksperymencie II (Mikołajczak i in., 2022) oceniono efekt wzrastającego udziału pełnotłustej mączki z biomasy larw *Hermetia illucens* (BSFM) w paszach dla narybku pstrąga potokowego w modelu odpowiedzi na dawkę na: wyniki wskaźników wzrostu i kondycji ryb oraz wykorzystania paszy, zrównoważenie środowiskowe chowu, współczynniki pozornej strawności składników pokarmowych, indeksy organosomatyczne, skład mikrobiomu przewodu pokarmowego oraz parametry biochemiczne surowicy krwi. Przygotowane zostały cztery pasze: kontrolna, bez udziału BSFM oraz trzy pasze doświadczalne z rosnącym udziałem BSFM.

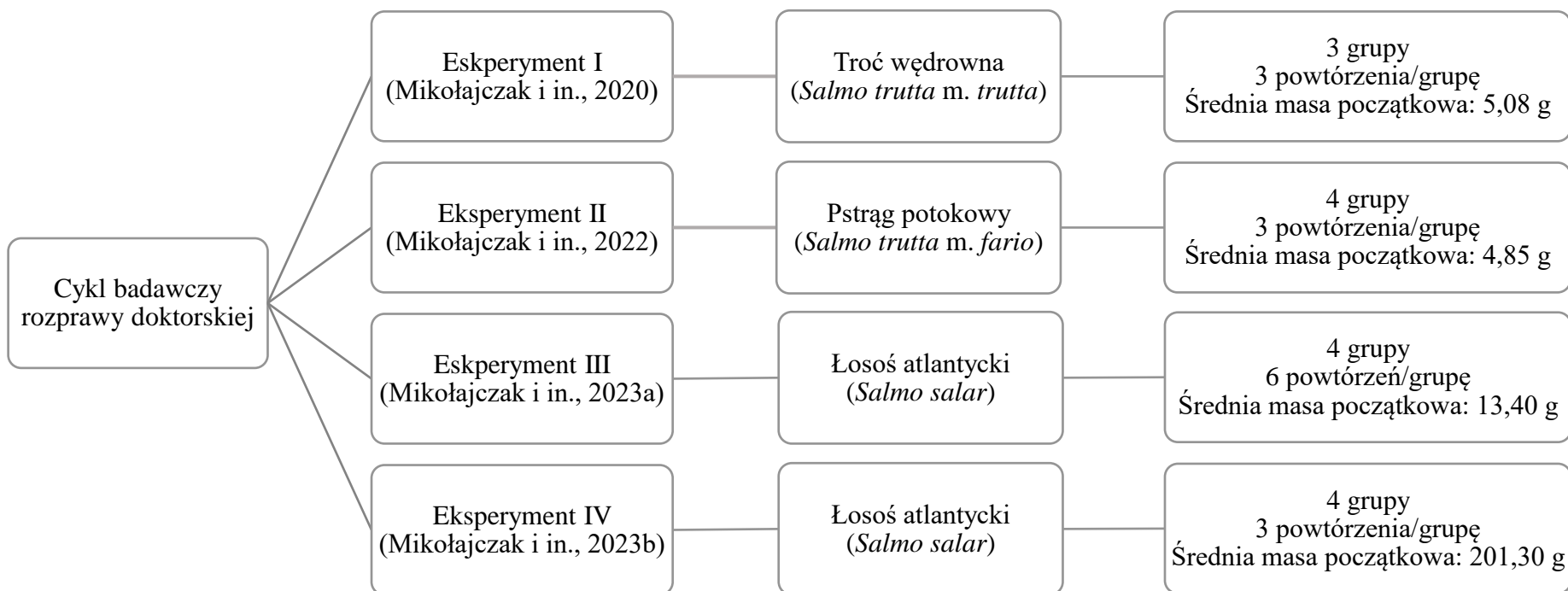
W eksperymencie III (Mikołajczak i in., 2023a) zbadano wpływ wzrastającego udziału BSFM w paszach dla narybku łososia atlantyckiego na: właściwości fizyczne pasz, wyniki wskaźników wzrostu i kondycji ryb oraz wykorzystania paszy, zrównoważenie środowiskowe chowu, współczynniki pozornej strawności składników pokarmowych, indeksy organosomatyczne oraz pomiary histomorfometryczne jelit. W eksperymencie IV (Mikołajczak i in., 2023b) zbadano wpływ udziału BSFM w paszach dla młodocianych osobników łososia atlantyckiego na parametry i zrównoważenie środowiskowe odchowu, indeksy organosomatyczne, charakterystykę histomorfometryczną jelit oraz ocenę barwy i jakości mięsa ryb. Dla obu eksperymentów zastosowano model odpowiedzi na dawkę i przygotowano zostały po cztery pasze:



kontrolna, bez udziału BSFM oraz trzy pasze doświadczalne z rosnącym udziałem BSFM.

Wszystkie prace badawcze przeprowadzono zgodnie z Dyrektywą Parlamentu Europejskiego i Rady 2010/63/UE z dnia 22 września 2010 r. oraz Ustawą o ochronie zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych lub edukacyjnych z dnia 15 stycznia 2015 r.

Rycina 4. Schemat prac badawczych zrealizowanych w ramach rozprawy doktorskiej.

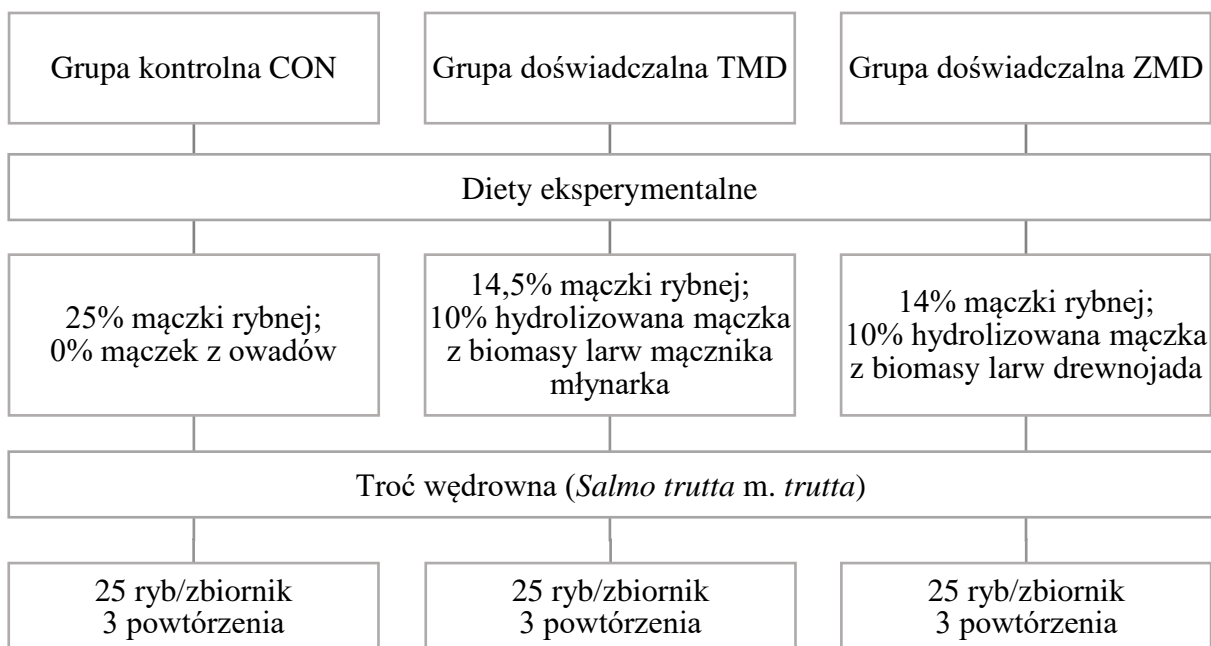


### 3.1. Eksperyment I (Mikołajczak i in., 2020)

#### 3.1.1. Układ doświadczalny

Eksperyment przeprowadzono z udziałem narybku troci wędrowej, test wzrostowy trwał 60 dni. Materiał biologiczny pochodził z Zakładu Doświadczalnego Technologii Produkcji Pasz i Akwakultury w Muchocinie. Ryby po siedmiodniowym okresie aklimacji zostały zważone oraz losowo podzielone na trzy grupy eksperymentalne (Ryc. 5), każda w trzech powtórzeniach – zbiornikach (25 ryb/zbiornik). Średnia masa ciała ryb w pierwszym dniu doświadczenia wynosiła 5,08 grama.

W grupie kontrolnej (CON) ryby otrzymywały paszę, która nie zawierała mączki z biomasy larw owadów, natomiast w grupach eksperymentalnych zastosowano pasze z udziałem hydrolizowanych pełnotłustych mączek z biomasy larw: mącznika młynarka (TMD) oraz drewnojada (ZMD).



Rycina 5. Schemat układu doświadczalnego zastosowanego w eksperymencie I (Mikołajczak i in., 2020)

### **3.1.2. Mączki z biomasy larw owadów**

Mączki z biomasy larw owadów zostały dostarczone przez firmę HiProMine S.A. (Robakowo, Polska). W procesie wytworzenia pełnotłustych mączek larwy suszono w temperaturze 50°C przez 24 h, a następnie zmielono.

### **3.1.3. Hydroliza mączek z biomasy larw owadów**

Pełnotłuste mączki z biomasy larw mącznika młynarka i drewnojada poddano hydrolizie z wykorzystaniem dwóch endopeptydaz: Colorase 7090 (AB Enzymes GmbH, Darmstadt, Niemcy) oraz Flavourzyme (Novozymes A/S, Dania). Pierwszy enzym stosowano w celu rozkładu enzymatycznego białka, natomiast drugi niwelował gorzki smak pozostawiony po działaniu Colorase 7090. Dobór enzymów do doświadczenia dokonany został na podstawie dostępnej literatury naukowej (Ovissipour i in., 2010; Wang i in., 2013; Zheng i in., 2012) oraz poprzednich badań zespołu (Hoffmann i in., 2020). Pełnotłuste mączki zmieszano z wodą destylowaną w stosunku masowym 4:1 aby uzyskać konsystencję odpowiednią do wykonania hydrolizy enzymatycznej. Następnie enzymy dodano do zawiesiny mączek w stężeniu 1,5 g/kg białka w diecie (Colorase 7090) oraz 0,75 g/kg białka w diecie (Flavourzyme). Czas inkubacji mieszanin mączek z enzymem Colorase 7090 wynosił 3 h, natomiast po dodaniu Flavourzyme – 4 h. Inkubację przeprowadzono w szafie termostaticznej ST 3 Comfort (Pol-Eko Aparatura, Wodzisław Śląski, Polska) łącznie przez 7 h w temperaturze 50°C. Następnie przygotowany materiał przechowywano w warunkach chłodniczych (4°C) do czasu przygotowania pasz pełnoporcjowych (12 h).

### **3.1.4. Przygotowanie diet doświadczalnych**

Na potrzeby doświadczenia przygotowano dietę kontrolną (CON) oraz dwie diety eksperymentalne. Diety zostały zbilansowane na podstawie danych literaturowych (Storebakken, 2009; Weththasinghe i in., 2021) i wcześniejszych badań zespołu (Hoffmann i in., 2020; Józefiak i in., 2019). Zapotrzebowanie na składniki pokarmowe oparto o normy żywieniowe (NRC, 2011). W dietach eksperymentalnych zastosowano 10% udział hydrolizowanych pełnotłustych mączek z biomasy larw mącznika młynarka (TMD) lub drewnojada (ZMD), co stanowiło zastąpienie mączki rybnej na poziomie, odpowiednio: 27,5% oraz 30%. Izobiałkowe i izoenergetyczne pasze (Tabela 3) zostały wytworzone w Zakładzie Doświadczalnym Technologii Produkcji Pasz i Akwakultury w Muchocinie Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu. W trakcie procesu produkcji

pasz wszystkie suche komponenty wymieszano z hydrolizowanymi mączkami w mieszalniku wstęgowym (WBN-150, WAMGROUP S.p.A., Ponte Motta/Cavezzo, MO, Włochy). Następnie ekstrudowano z wykorzystaniem jednoślindakowej wyciarkarki spożywczej typu S-60 (Metalchem, Gliwice, Polska) w temperaturze 110°C z wykorzystaniem głowicy z matrycą z otworami o średnicach 1,5 lub 2,5 mm. Gotowy ekstrudat wysuszono w suszarni z wymuszonym przepływem powietrza przez 24 h w temperaturze 40°C, a następnie natłuszczono olejem rybnym w procesie obtaczania. Gotowe pasze zapakowano w szczelne worki z nieprzezroczystego tworzywa sztucznego i przechowywano w temperaturze -18°C do momentu skarmiania.

**Tabela 1. Skład oraz wyniki analizy chemicznej diet w eksperymencie I (Mikołajczak i in., 2020)**

Materiały paszowe (g/kg)	Diety		
	CON	TMD	ZMD
Mączka rybna <sup>1</sup>	250,0	145,0	140,0
Mączka z mącznika młynarka <sup>2</sup>	0,0	100,0	0,0
Mączka z drewnojada <sup>3</sup>	0,0	0,0	100,0
Poekstrakcyjna śruta sojowa <sup>4</sup>	100,0	100,0	100,0
Mąka pszenna	219,4	220,1	226,3
Gluten kukurydziany	150,0	150,0	150,0
Mączka z krwi <sup>5</sup>	70,0	100,0	100,0
Drożdże browarniane	35,0	35,0	35,0
Olej rybny	164,0	143,0	140,0
Fosforan dwuwapniowy	7,2	0,8	2,1
Premix witaminowo-mineralny <sup>6</sup>	1,5	1,5	1,5
DL-Metionina	1,2	2,2	2,4
L-Lizyna HCL	1,1	1,8	2,0
L-Treonina	0,6	0,6	0,7
Skład chemiczny (g/kg suchej masy), energia brutto			
Sucha masa (g/kg paszy)	930	937	935
Białko ogólne	480	511	498
Tłuszcz surowy	163	146	153
Popiół surowy	65	54	51
Włókno surowe	17	17	17
Chityna <sup>7</sup>	0	9,3	4,8
ZBAW <sup>8</sup>	350	338	350
Energia brutto (MJ/kg)	22,18	22,77	22,55

<sup>1</sup> Skagen, Dania (białko ogólne: 71,4%, tłuszcz surowy: 12,0%); <sup>2</sup> HiProMine S.A., Robakowo, Polska (sucha masa: 95,58%, białko ogólne: 47,0%, tłuszcz surowy: 29,6%); <sup>3</sup> HiProMine S.A., Robakowo, Polska (sucha masa: 96,32%, białko ogólne: 49,3%, tłuszcz surowy: 33,6%); <sup>4</sup> białko ogólne: 45,0%, tłuszcz surowy: 1,8%; <sup>5</sup> APC Europe, Hiszpania, suszona rozpyłowo (białko ogólne: 90,0%); <sup>6</sup> Polfamix BASF Poland Ltd., Kutno, Polska (g/kg): witamina A: 1 000,000 IU; witamina D3: 200,000 IU; witamina E: 1,5 g; witamina K: 0,2 g; witamina B1: 0,05 g; witamina B2: 0,4 g; witamina B12: 0,001 g; kwas nikotynowy, 2,5 g; D-pantotenian wapnia: 1,0 g; chlorek cholinowy: 7,5 g; kwas foliowy: 0,1 g; metionina: 150,0 g; lizyna: 150,0 g; Fe: 2,5 g; Mn: 6,5 g; Cu: 0,8 g; Co: 0,04 g; Zn: 4,0 g; J: 0,008 g; nośnik > 1000,0 g.; <sup>7</sup> Ilość kalkulowana z analizy chityny mączek z biomasy larw owadów; <sup>8</sup> Związki bezazotowe wyciągowe = 1000 – (białko ogólne + ekstrakt eterowy + włókno surowe + popiół surowy)

### **3.1.5. Techniczne warunki testu wzrostowego**

Doświadczenie wzrostowe przeprowadzono w hali odchowu ryb Pracowni Rybactwa Śródlądowego i Akwakultury na Uniwersytecie Przyrodniczym w Poznaniu. Podchów ryb wykonano z zastosowaniem otwartego systemu zasilania wody, którą czerpano z sieci wodociągowej. Woda przeznaczona do eksperymentu była pobierana ze zbiornika głównego o objętości ok. 4 m<sup>3</sup>. Temperatura wody wynosiła 14,7 ± 0,6 °C, a natlenienie wody 7,5 ± 0,3 mg O<sub>2</sub>/dm<sup>3</sup>. Do pomiaru temperatury wody (°C) oraz zawartości rozpuszczonego w wodzie tlenu (mg O<sub>2</sub>/dm<sup>3</sup>) wykorzystano miernik CO-315 (Elmetron, Zabrze, Polska), natomiast konduktywność mierzono z zastosowaniem miernika przewodności EC-3 (HM-Digital, Redondo Beach, USA).

W okresie aklimacji ryby utrzymywano w zbiorniku o pojemności 500 dm<sup>3</sup>. Zbiorniki przeznaczone do doświadczenia wykonane były z laminatu włókna szklanego barwionego na szary kolor. Objętość całkowita wynosiła 60 dm<sup>3</sup>, natomiast objętość robocza 50 dm<sup>3</sup>. Projekt zbiorników pozwalał na utrzymanie maksymalnego poziomu wody wraz z przepływem wynoszącym 2 dm<sup>3</sup>/min. W hali odchowu ryb zastosowano sztuczne oświetlenie, które pozwoliło na utrzymanie fotoperiodu 16:8 (światło:ciemność) przez cały czas trwania eksperymentu. Kontrola fotoperiodu była możliwa poprzez zastosowanie cyfrowego programatora czasowego TSGE2 (Bemko, Warszawa, Polska). Doświadczenie trwało 8 tygodni, w tym czasie ryby karmiono paszami doświadczalnymi w sposób ciągły przez 12 godzin/dobę przy zastosowaniu automatycznych karmników taśmowych (FIAP Fishtech GmbH., Ursensollen, Niemcy). Ryby ważono co dwa tygodnie w celu dostosowania dziennej naważki paszy do aktualnej biomasy ryb, a na podstawie wyników masy ciała kalkulowano parametry wzrostowe i wykorzystanie paszy. Dawkę paszy oparto na wykresach żywieniowych dla łososi atlantyckich biorąc pod uwagę masę ciała ryb oraz temperaturę wody. Śmiertelność zwierząt była monitorowana codziennie, a w przypadku zaobserwowania osobników martwych natychmiast je usuwano.

### **3.1.6. Wskaźniki wzrostu i wykorzystania pasz oraz przeżywalność ryb**

Efektywność zastosowanych pasz pełnoporcjowych oceniano na podstawie wyliczonych wskaźników wzrostowych. Cykliczne pomiary liczebności, biomasy ryb oraz zużycia paszy posłużyły do wyliczenia szeregu parametrów: końcowej masy ciała (FBW), przyrost masy ciała (BWG), względny dobowy przyrost masy jednostkowej ryby

(SGR), wskaźnik dziennego pobrania paszy (DIR), współczynnik wykorzystania paszy (FCR), wydajność wzrostowa białka paszowego (PER), wydajność produkcyjna białka paszowego (PPV) oraz wskaźnik przeżywalności ryb (SR):

$FBW \text{ (g/szt.)} = \text{biomasa ryb w zbiorniku (g)} / \text{liczba ryb w zbiorniku (szt.)}$

$BWG \text{ (g)} = \text{końcowa średnia masa jednostkowa ryb (g)} - \text{początkowa średnia masa jednostkowa ryb (g)}$

$SGR \text{ (\%/dzień)} = [(\ln \text{ końcowa średnia masa jednostkowa ryb (g)} - \ln \text{ początkowa średnia masa jednostkowa ryb (g)}) / \text{liczba dni doświadczenia}] \times 100$

$DIR \text{ (\%/dzień)} = [(\text{pobranie paszy (g)} / \text{biomasa ryb (g)}) / \text{liczba dni doświadczenia}] \times 100$

$FCR \text{ (g/g)} = \text{masa pobranej paszy (g)} / \text{przyrost masy ciała (g)}$

$PER = \text{przyrost masy ciała (g)} / \text{masa białka zadanego rybom w paszy (g)}$

$PPV = (\text{retencja białka w ciele ryb (g suchej masy)} / \text{masa białka zadanego rybom w paszy (g)}) \times 100$

$SR \text{ (\%)} = [\text{końcowa ilość ryb (szt.)} / \text{początkowa ilość ryb (szt.)}] \times 100$

### **3.1.7. Pobranie materiału biologicznego**

W ostatnim dniu doświadczenia pobrano materiał biologiczny do analiz laboratoryjnych. Określono biomasę ryb w każdym zbiorniku, następnie uśmiercono je poprzez przedawkowanie MS-222 (Metanosulfonian trikainy, 300 mg/L). Krew pobierano pośmiertnie od 9 ryb/zbiornik, próby łączono ze względu na małą objętość materiału badawczego uzyskując 3 próby/zbiornik (9 prób/grupę). Próby krwi przechowywano w lodówce przez 30 minut, a następnie oddzielono surowicę poprzez wirowanie (Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Niemcy) w następujących warunkach: 4°C i 3500 obrotów/min przez 15 minut. Uzyskane próby surowicy przechowywano w temperaturze -80°C. Osobniki wykorzystane do obliczania indeksów somatycznych ważono i mierzono indywidualnie. W tym celu rejestrowano masy wnętrzności i wątroby, które pobrano również do późniejszego oznaczenia glikogenu wątrobowego i trójglicerydów (5 ryb/zbiornik; 15 ryb/grupę). Fragment jelita proksymalnego ryb (9 ryb/grupę) została pobrana i przeniesiona do probówek z roztworem Bouina (Merck, Darmstadt, Niemcy) do czasu dalszych analiz. Dodatkowo pobrano próby treści



pokarmowej jelit (12 ryb/zbiornik, próby łączono uzyskując 3 próby/zbiornik), które natychmiast zamrożono i przechowywano w temperaturze  $-80^{\circ}\text{C}$ . Identyczną procedurę kriokonserwacji zastosowano do pozostałych prób ciała ryb.

### **3.1.8. Indeksy organosomatyczne**

Wyniki pomiarów masy ciała, wnętrzości oraz wątroby użyto do obliczenia indeksów organosomatycznych zgodnie z literaturą naukową (Hoffmann i in., 2020):

$$\text{HSI (\%)} = (\text{masa wątroby (g)}/\text{masa ciała (g)}) \times 100$$

$$\text{VSI (\%)} = (\text{masa wnętrzości (g)}/\text{masa ciała (g)}) \times 100$$

### **3.1.9. Analiza chemiczna materiału biologicznego**

Analizie chemicznej poddano mączkę rybną oraz hydrolizowane mączki z biomasy larw owadów wykorzystane do zbilansowania diet, pasze użyte w eksperymentach oraz próby ciała ryb. Przeprowadzono je zgodnie z zaleceniami Association of Official Agricultural Chemists (AOAC, 2005) dla: suchej masy (934.01), białka ogólnego (976.05), ekstraktu eterowego (920.39), popiołu surowego (942.05) oraz włókna surowego (985.29). Skład aminokwasowy białka oraz profil kwasów tłuszczowych hydrolizowanych pełnotłustych mączek z biomasy larw owadów zanalizowano w akredytowanym laboratorium (J.S. Hamilton S.A., Gdynia, Polska). Skład aminokwasowy określono za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) z automatycznym analizatorem aminokwasów AAA 400 (Ingos Ltd., Praga, Czechy). Profil kwasów tłuszczowych określono zgodnie z metodą EN-ISO 12966-1:2015-01. Poziom energii brutto oznaczono zgodnie z metodą ISO 9831 przy zastosowaniu bomby kalorymetrycznej (KL 12 Mn, Precyzja-Bit PPHU, Bydgoszcz, Polska) standaryzowanej kwasem benzoesowym. Zawartość chityny została określona zgodnie z metodą opisaną przez Soon i in. (2018).

### **3.1.10. Analiza histomorfometryczna jelit**

Pobrane próby proksymalnych odcinków jelit przeanalizowano zgodnie z metodyką Sobolewskiej i in. (2017). Próby odwodniono, oczyszczono i zatopiono w blokach parafinowych. Uformowane bloki pocięto na mikrotomie obrotowym Thermo Shandon (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) na skrawki o grubości  $10\ \mu\text{m}$ . Przygotowane próby umieszczano na szkiełkach mikroskopowych pokrytych albuminą jaja z dodatkiem glicerolu. Preparaty analizowano przy użyciu

mikroskopu AnMN-800 F (Opta-Tech, Warszawa, Polska) wyposażonego w kamerę Opta-View do rejestracji obrazów mikroskopowych. W celu pomiaru wysokości i szerokości kosmków jelitowych, a także grubości mięśniówki zastosowano oprogramowanie MultiScan v. 18.03 (Computer Scanning Systems II Ltd., Warszawa, Polska).

### 3.1.11. Analiza mikrobiomu jelitowego

Próby treści pokarmowej jelit zostały przygotowane i przeanalizowane zgodnie z protokołami opisanymi w literaturze (Rawski i in., 2016, 2018). Sondy oligonukleotydowe zastosowane w badaniu mikrobiologicznym zostały przedstawione w tabeli 4. Przygotowane preparaty analizowano przy użyciu mikroskopu Carl Zeiss Axio Imager M2 (Carl Zeiss, Jena, Niemcy). Wykryte bakterie wyrażano w jednostkach tworzących kolonię na gram treści pokarmowej (JTK/g), obliczeń dokonano według równania Józefiak i in. (2019):

$$\log JTK/g = \log \left( N \times \left( \frac{WA}{PA} \right) \times \left( \frac{S_{weight} + D_{weight}}{S_{weight}} \right) \times \left( \frac{1000}{S_{volume}} \right) \right)$$

gdzie:

N – liczba widocznych komórek bakteryjnych;

WA – obszar roboczy filtra (*working area*);

PA – obszar obrazu (*picture area*);

S<sub>weight</sub> – masa próby (*sample weight*);

D<sub>weight</sub> – masa współczynnika rozcieńczenia (*dilution factor weight*);

S<sub>volume</sub> – objętość próby pipetowana na filtr (*sample volume*).

**Tabela 2. Sondy oligonukleotydowe użyte w analizie FISH**

Sonda	Oznaczana grupa bakterii	Sekwencja 5' – 3'	Bibliografia
Aer66	<i>Aeromonas</i> spp.	CTA CTT TCC CGC TGC CGC	(Huber i in., 2004)
Bmy843	<i>Bacillus</i> spp.	CTT CAG CAC TCA GGT TCG	(Salzman i in., 2002)
Car193	<i>Carnobacterium</i> spp.	AGC CAC CTT TCC TTC AAG	(Huber i in., 2004)
Enfm93	<i>Enterococcus</i> spp.	CCG GAA AAA GAG GAG TGG C	(Waar i in., 2005)
Lab722	Grupa <i>Lactobacillus</i>	YCA CCG CTA CAC ATG RAG TTC CAC T <sup>1</sup>	(Sghir i in., 2000)

<sup>1</sup>Y – oznacza nietypowo parujący nukleotyd (C/T), natomiast R – oznacza nietypowo parujący nukleotyd (A/G)

### 3.1.12. Analizy parametrów biochemicznych i immunologicznych surowicy krwi oraz wątroby

Analizy surowicy krwi przeprowadzono zgodnie z metodami opisanymi przez Kołodziejskiego i in. (2018). Do oznaczenia poziomów: białka całkowitego (TP), albuminy, glukozy, trójglicerydów i cholesterolu całkowitego (TC) użyto komercyjnych zestawów testowych (Pointe Scientific, Canton, MI, USA). Zestaw płynnych odczynników testowych (numery katalogowe: LAT A7526, AST A7560, ALP A7516, Pointe Scientific, Canton, MI, USA) zastosowano do określenia aktywności enzymatycznej aminotransferazy alaninowej (ALT), aminotransferazy asparaginianowej (AST) oraz fosfatazy alkalicznej (ALP).

Zawartość wolnych kwasów tłuszczowych (NEFA) oraz poziom glikogenu zmierzono metodą enzymatyczną z zastosowaniem zestawów testowych Wako Diagnostic (Chiny) (Kołodziejski i in., 2017). Pobrane próby wątroby zważono i umieszczono w probówkach zawierających KOH (30%). Próby wątroby inkubowano w temperaturze 100°C przez 15 minut, a następnie pozostawiono do schłodzenia. W późniejszym etapie do probówek dodano etanol (98%) oraz wodę destylowaną. Próby odwirowano (3500 obrotów/min., 30 min.). Do prób bez supernatantu dodano bufor cytrynianowy (pH 4,4) z enzymem glukoamylazą (aktywność: 12 000 U/L). Tak

przygotowane próby inkubowano przez 120 minut w 55°C w celu hydrolizy glikogenu do glukozy. Aby określić stężenie glukozy w roztworach zastosowano kolorymetryczny test enzymatyczny (oksydaza glukozy, Pointe Scientific, Canton, MI, USA), a uzyskane wartości wykorzystano do obliczenia stężeń glikogenu w tkankach wątroby.

Poziomy immunoglobuliny M (IgM) i lizozymu w surowicy oznaczano za pomocą zestawów ELISA z przeciwciałami (Sunred Biotechnology, Szanghaj, Chiny).

Stężenie trójglicerydów w tkankach wątroby oznaczono według metody opisanej w pracy Kołodziejki i in. (2018). Lipidy w pobranych próbach wątroby ekstrahowano zmodyfikowaną metodą Folcha obejmującą rozdrobnienie materiału w młynku z zastosowaniem Tissue Lyzer II (Qiagen, Niemcy). Po ekstrakcji lipidów określono kolorymetrycznie stężenie trójglicerydów poprzez zastosowanie zestawu do testu enzymatycznego (oksydaza glicerofosforanowa, Pointe Scientific, Canton, MI, USA).

## 3.2. Eksperyment II (Mikołajczak i in., 2022)

### 3.2.1. Układ doświadczalny

Eksperyment przeprowadzono z udziałem narybku pstrąga potokowego, test wzrostowy trwał 60 dni. Materiał biologiczny pochodził z Zakładu Doświadczalnego Technologii Produkcji Pasz i Akwakultury w Muchocinie. Ryby po siedmiodniowym okresie aklimacji zostały zważone oraz losowo podzielone na cztery grupy eksperymentalne (Ryc. 6), każda w trzech powtórzeniach – zbiornikach (10 ryb/zbiornik). Średnia masa ciała ryb w pierwszym dniu doświadczenia wynosiła 4,85 grama.

W grupie kontrolnej (CON) ryby otrzymywały pasze, która nie zawierała BSFM, natomiast w grupach eksperymentalnych zastosowano pasze z wzrastającym procentowym udziałem BSFM: 5% (BSFL5), 10% (BSFL10) i 20% (BSFL20).



Rycina 6. Schemat układu doświadczalnego zastosowanego w eksperymencie II (Mikołajczak i in., 2022)

### 3.2.2. Mączka z biomasy larw *Hermetia illucens*

BSFM została dostarczona przez HiProMine S.A. (Robakowo, Polska). W trakcie tuczu, larwy karmione były mieszanką roślinnych produktów ubocznych (Weththasinghe i in., 2021). W celu uzyskania pełnotłustych mączek larwy zostały zamrożone w temperaturze  $-20^{\circ}\text{C}$ , następnie suszono je w temperaturze  $50^{\circ}\text{C}$  przez 24 h, a później zmielono. Higienizacja surowca paszowego została wykonana poprzez ogrzewanie

w temperaturze 100°C przez 95 minut zgodnie z rekomendacją Unii Europejskiej z załącznika IV Europejskich Rozporządzeń Komisji nr 141/2011 w sprawie przetwarzania produktów ubocznych pochodzenia zwierzęcego. Skład chemiczny BSFM był następujący: 97,5% suchej masy, 40,4% białka ogólnego, 41,3% tłuszczu surowego oraz 5,5% popiołu surowego.

### **3.2.3. Przygotowanie diet doświadczalnych**

Na potrzeby doświadczenia przygotowano dietę kontrolną (CON) oraz trzy diety eksperymentalne. W dietach eksperymentalnych zastosowano różne udziały BSFM: BSFL5 – dieta z 5,0% dodatkiem BSFM oraz z 32,5% dodatkiem mączki rybnej; BSFL10 – dieta z 10,0% dodatkiem BSFM oraz z 30,0% dodatkiem mączki rybnej; BSFL20 – dieta z 20,0% dodatkiem BSFM oraz z 25,0% dodatkiem mączki rybnej. W diecie kontrolnej zastosowano udział mączki rybnej na poziomie 35,0%. Izobiałkowe i izoenergetyczne pasze (Tabela 6.) zostały wytworzone w Zakładzie Doświadczalnym Technologii Produkcji Pasz i Akwakultury (Muchocin, Polska) z zastosowaniem zasad i warunków technicznych opisanych w rozdziale 3.1.4, dotyczącym eksperymentu I.

**Tabela 5. Skład oraz wyniki analizy chemicznej diet w eksperymencie II (Mikołajczak i in., 2022)**

Materiały paszowe (g/kg)	Diety			
	CON	BSFL5	BSFL10	BSFL20
Mączka rybna <sup>1</sup>	350	325	300	250
BSFM <sup>2</sup>	0	50	100	200
Izolat białka sojowego <sup>3</sup>	80	80	80	80
Gluten pszeniczny <sup>4</sup>	120	120	120	120
Mąka pszenna	147	147	147	147
Maltodekstryna	132	124	117	102
Olej rybny	140	123	105	70
Lecytyna	10	10	10	10
Premix witaminowo-mineralny <sup>5</sup>	15	15	15	15
Premix witaminowy <sup>6</sup>	1	1	1	1
Chlorek choliny	2	2	2	2
TiO <sub>2</sub>	3	3	3	3
Skład chemiczny (g/kg suchej masy), energia brutto				
Sucha masa (g/kg paszy)	947	948	951	948
Białko ogólne	471	468	477	476
Tłuszcz surowy	177	195	184	193
Popiół surowy	69	66	68	66
Włókno surowe	6,6	10	13	20
Chityna <sup>7</sup>	0	4	8	16
Energia brutto (MJ/kg)	22,29	22,69	22,75	23,01

<sup>1</sup> Skagen, Dania (białko ogólne: 71,4%, tłuszcz surowy: 12,0%); <sup>2</sup> HiProMine S.A., Robakowo, Polska (sucha masa: 97,5%, białko ogólne: 40,4%, tłuszcz surowy: 41,3%); <sup>3</sup> Foodchem International Corporation, Shanghai, Chiny (białko ogólne >90,0%); <sup>4</sup> Cargill, Kiszkowo, Polska (białko ogólne: >75,0%, tłuszcz surowy: 1,6%); <sup>5</sup> Polfamix BASF Poland Ltd., Kutno, Polska (g/kg): witamina A: 1 000,000 IU; witamina D3: 200,000 IU; witamina E: 1,5 g; witamina K: 0,2 g; witamina B1: 0,05 g; witamina B2: 0,4 g; witamina B12: 0,001 g; kwas nikotynowy, 2,5 g; D-pantotenian wapnia: 1,0 g; mioinozytol: 500 IU; chlorek choliny: 7,5 g; kwas foliowy: 0,1 g; metionina: 150,0 g; lizyna: 150,0 g; Fe: 2,5 g; Mn: 6,5 g; Cu: 0,8 g; Co: 0,04 g; Zn: 4,0 g; J: 0,008 g; nośnik > 1000,0 g.; <sup>6</sup> Vitazol AD3EC, BIOWET, Drwalew, Polska (g/kg): witamina A 50 000 IU; witamina D3 5 000 IU; witamina E 30,0 mg; witamina C 100,0 mg. <sup>7</sup> Ilość kalkulowana z analizy chityny mączek z biomasy larw owadów.

### 3.2.4. Techniczne warunki testu wzrostowego

Eksperyment przeprowadzono zgodnie z opisem metodyki w rozdziale 3.1.5., dotyczącym eksperymentu I. W tym przypadku temperatura wody wynosiła  $15 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ , natlenienie wody  $7,5 \pm 0,3 \text{ mg/dm}^3$  i zastosowano fotoperiod 17:7 (światło:ciemność) przez cały czas trwania doświadczenia. Ryby ważono w odstępach 10-dniowych.

### 3.2.5. Wskaźniki wzrostu i wykorzystania pasz oraz przeżywalność ryb

Kalkulowanie parametrów wzrostu i wykorzystania paszy przeprowadzono zgodnie z metodyką przedstawioną dla eksperymentu I (rozdział 3.1.6.), jednak rozszerzono je o spożycie paszy (FI):

$$\text{FI (g)} = \text{pasza skarmiona (g)} - \text{pasza niezjedzona (g)}$$

### 3.2.6. Zrównoważenie środowiskowe chowu ryb

Wskaźniki zrównoważenia środowiskowego chowu ryb wyliczono na podstawie surowych danych dotyczących wzrostu i wykorzystania paszy zgodnie z literaturą naukową (Rawski i in., 2020; Stejskal i in., 2020). Względne wykorzystanie materiałów paszowych pochodzenia morskiego (mączki rybnej oraz oleju rybnego) obliczono według następujących wzorów:

$$\text{FMU (g/kg masy ryb)} = \text{udział mączki rybnej w paszy (g/kg)} \times \text{współczynnik wykorzystania paszy (g/g)}$$

$$\text{FOU (g/kg masy ryb)} = \text{udział oleju rybnego w paszy (g/kg)} \times \text{współczynnik wykorzystania paszy (g/g)}$$

Wskaźnik FIFO obliczono według następującego wzoru:

$$\text{FIFO} = [(\text{udział mączki rybnej w paszy (g/kg)} + \text{udział oleju rybnego w paszy (g/kg)}) / (\text{średnia masa mączki rybnej pochodzącej z połowów (g/kg)} + \text{średnia masa oleju rybnego pochodzącego z połowów (g/kg)})] \times (\text{pobranie paszy (g)} / \text{przyrost masy ciała (g)})$$

Uśredniona ilość mączki rybnej wyprodukowanej z surowców pochodzących z połowów została przyjęta na poziomie 225 g/kg, natomiast uśredniona ilość oleju rybnego na poziomie 50 g/kg (Jackson, 2009).



### **3.2.7. Badanie strawności składników pokarmowych pasz**

W celu określenia pozornych współczynników strawności białka ogólnego oraz tłuszczu surowego pasz dla pstrągów potokowych zastosowano zbiorniki metaboliczne według opisu Rawskiego i in. (2020) będące modyfikacją projektu Allana i in. (1999). Parametry fizykochemiczne wody były takie same jak w przypadku testu wzrostowego w eksperymencie II (rozdział 3.2.4.). Test strawności trwał 45 dni, w tym czasie 15 dni stanowił okres wstępny, natomiast przez 30 dni właściwy, w którym wykonywano kolekcję odchodów. W tej części doświadczenia wykorzystano 120 ryb o średniej masie ciała 4,85 g, które zostały podzielone na cztery grupy (3 zbiorniki/grupę i 10 ryb/zbiornik). Ryby żywiono paszami kontrolną (CON) i eksperymentalnymi (BSFL5, BSFL10, BSFL20) używanymi również w teście wzrostowym (rozdziały 3.2.3. oraz 3.2.4.). Pasza podawana była w godzinach 7:00-13:00 przy zastosowaniu automatycznych karmników taśmowych opisanych w metodyce eksperymentu I (rozdział 3.1.5.). Kolekcja odchodów odbywała się trzy razy na dobę w godzinach 7:00, 17:00 oraz 23:00, które zbierano do naczyń filtracyjnych wyposażonych w sączki celulozowe. Otrzymany materiał (3 próby/grupę) zamrażano i przechowywano w temperaturze  $-20^{\circ}\text{C}$  do czasu dalszych analiz. Na podstawie wyników analizy chemicznej (opisanej w rozdziale 3.2.8.) wyliczono współczynniki pozornej strawności białka ogólnego i tłuszczu surowego zgodnie ze wzorem (Kierończyk i in., 2018):

Współczynnik pozornej strawności całkowitej =  $1 - ((\text{TiO}_2 \text{ w paszy (g/kg)} / \text{TiO}_2 \text{ w odchodach (g/kg)}) \times (\text{składnik pokarmowy w odchodach (g/kg)} / \text{składnik pokarmowy w paszy (g/kg)}))$

### **3.2.8. Pobranie materiału biologicznego**

Pobranie materiału biologicznego wykonano zgodnie z metodyką opisaną w rozdziale 3.1.7. dotyczącym eksperymentu I. Do kalkulowania indeksów somatycznych oraz w celu pobrania krwi wykorzystano 30 ryb/grupę. Treść jelit pobierano od 10 ryb/zbiornik i łączono uzyskując 3 próby/grupę.

### **3.2.9. Indeksy organosomatyczne oraz kondycja ryb**

Do obliczeń indeksów organosomatycznych zastosowano wzory podane w metodyce eksperymentu I (rozdział 3.1.8.). Zakres pomiarów rozszerzono o wyliczenie wskaźnika Fultrona (CF, Fulton's condition factor) według wzoru:

$CF = (\text{końcowa średnia masa jednostkowa ryb (g)} / \text{całkowita długość ciała (cm}^3\text{)}) \times 100$

### **3.2.10. Analiza chemiczna materiału biologicznego**

Analizie chemicznej poddano mączkę rybną oraz mączkę BSF wykorzystane do zbilansowania diet, pasze użyte w eksperymentach oraz odchody ryb. Analizy przeprowadzono tożsamo z opisem metodyki przedstawionym w rozdziale 3.1.9. dotyczącym eksperymentu I.

### **3.2.11. Analiza mikrobiomu jelitowego**

Analizy mikrobiomu jelitowego wykonano zgodnie z metodyką opisaną w rozdziale 3.1.11. dotyczącym eksperymentu I. W tym przypadku zastosowano jedynie trzy sondy oligonukleotydowe: Car193, Enfm93 oraz Lab 722 (charakterystyka sond została podana w tabeli 4.).

### **3.2.12. Analizy parametrów biochemicznych surowicy krwi**

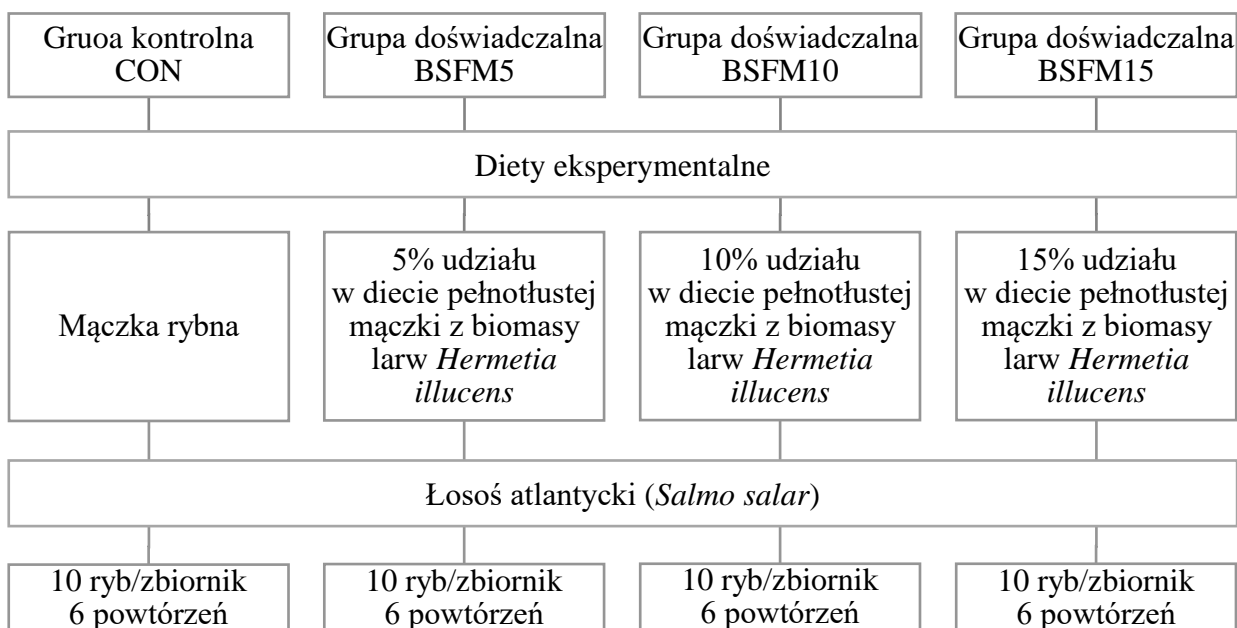
Analizy biochemiczne surowicy krwi zostały przeprowadzone zgodnie z metodyką opisaną w rozdziale 3.1.12. dotyczącym eksperymentu I. Dodatkowo oszacowano stężenie gamma-glutamylotranspeptydazy (GGT) korzystając z komercyjnych, płynnych odczynników testowych (Pointe Scientific, Canton, MI, USA).

### 3.3. Eksperyment III (Mikołajczak i in., 2023a)

#### 3.3.1. Układ doświadczalny

Eksperyment przeprowadzono z udziałem narybku osobników łososia atlantyckiego, test wzrostowy trwał 60 dni. Materiał biologiczny pochodził z Zakładu Doświadczalnego Technologii Produkcji Pasz i Akwakultury w Muchocinie. Ryby po siedmiodniowym okresie aklimacji zostały zważone oraz losowo podzielone na cztery grupy eksperymentalne (Ryc. 7), każda w sześciu powtórzeniach – zbiornikach (10 ryb/zbiornik). Średnia masa ciała ryb w pierwszym dniu doświadczenia wynosiła 13,4 grama.

W grupie kontrolnej (CON) ryby otrzymywały pasze, która nie zawierała BSFM, natomiast w grupach eksperymentalnych zastosowano pasze z wzrastającym procentowym udziałem BSFM: 5% (BSFM5), 10% (BSFM10) i 15% (BSFM15).



Rycina 7. Schemat układu doświadczalnego zastosowanego w eksperymencie III (Mikołajczak i in., 2023a)

#### 3.3.2. Mączka z biomasy larw *Hermetia illucens*

Mączka BSF została dostarczona przez HiProMine S.A. (Robakowo, Polska). Tucz larw oraz sposób przygotowania mączek odpowiadał metodyce opisanej w eksperymencie II (rozdział 3.2.2.).

Na podstawie zawartości aminokwasów w białku obliczono empiryczny współczynnik konwersji azotu na białko dla mączki z BSF według następującego wzoru:

$K_p = (\text{całkowita zawartość aminokwasów} / \text{całkowita zawartość białka na podstawie analizy azotu} \times 6,25) \times 6,25$

Formułę oparto na stosunku aminokwasów do całkowitej zawartości białka z konwersją  $N \times 6,25$  na podstawie danych literaturowych (Janssen i in., 2017). Ze względu na obecność chityny w biomacie owadów, która mogłaby potencjalnie prowadzić do przeszacowania ilości białka, wykonano obliczenia:

$$K_p \text{ mączki z BSF} = (412,1 \text{ g} / 503,1 \text{ g}) \times 6,25 = 5,12$$

gdzie: 412,1 g – suma aminokwasów w 1000 g suchej masy mączki z BSF; 503,1 g – całkowita zawartość białka w 1000 g mączki z BSF obliczona na podstawie  $N \times 6,25$ ; 6,25 – standardowo używane  $K_p$ ; 5,12 –  $K_p$  obliczone dla mączki z BSF.

### **3.3.3. Przygotowanie diet doświadczalnych**

Na potrzeby doświadczenia przygotowano dietę kontrolną (CON) oraz trzy diety eksperymentalne. W dietach eksperymentalnych zastosowano różne udziały pełnotłustej mączki BSFM: BSFM5 – dieta z 5,0% dodatkiem BSFM oraz z 36,1% dodatkiem mączki rybnej; BSFM10 – dieta z 10,0% dodatkiem BSFM oraz z 33,3% dodatkiem mączki rybnej; BSFM15 – dieta z 15,0% dodatkiem BSFM oraz z 30,3% dodatkiem mączki rybnej. W diecie kontrolnej zastosowano udział mączki rybnej na poziomie 39,0%. Izobiałkowe i izoenergetyczne pasze (Tabela 7.) zostały wytworzone w Zakładzie Doświadczalnym Technologii Produkcji Pasz i Akwakultury (Muchocin, Polska) z zastosowaniem zasad i warunków technicznych opisanych w rozdziale 3.1.4, dotyczącym eksperymentu I.

**Tabela 6. Skład oraz wyniki analizy chemicznej diet w eksperymencie III (Mikołajczak i in., 2023a)**

Materiały paszowe (g/kg)	Diety			
	CON	BSFM5	BSFM10	BSFM15
Mączka rybna <sup>1</sup>	390	361	333	303
BSFM <sup>2</sup>	0	50	100	150
Mączka z kryla <sup>3</sup>	50	50	50	50
Mączka z hemoglobiny <sup>4</sup>	100	100	100	100
Izolat białka sojowego <sup>5</sup>	100	100	100	100
Gluten pszeniczny <sup>6</sup>	50	50	50	50
Mąka pszenna	90	73	54	38
Maltodekstryna	50	50	50	50
Olej rybny <sup>7</sup>	125	121	118	114
Lecytyna <sup>8</sup>	10	10	10	10
Premix witaminowo-mineralny <sup>9</sup>	15	15	15	15
Premix witaminowy <sup>10</sup>	1	1	1	1
Chlorek choliny	2	2	2	2
Kreda pastewna	14	14	14	14
TiO <sub>2</sub>	3	3	3	3
Skład chemiczny (g/kg suchej masy), energia brutto				
Białko ogólne	479,9	480,0	480,5	480,1
Tłuszcz surowy	200,5	200,0	200,6	200,0
Popiół surowy	108,2	109,0	110,0	110,7
Włókno surowe	8,8	15,0	15,0	14,9
ZBAW <sup>11</sup>	156,3	153,4	149,2	147,0
Ca	15,0	15,0	15,0	14,9
P	11,0	11,2	11,6	11,9
Energia brutto (MJ/kg)	21,84	21,77	21,74	21,66

<sup>1</sup> Agro-Fish, Kartoszyno, Polska (białko ogólne: 62,0%, tłuszcz surowy: 16,0%); <sup>2</sup> HiProMine S.A., Robakowo, Polska; (sucha masa: 97,0%, białko ogólne: 50,3%, białko ogólne korygowane: 41,2%, tłuszcz surowy: 16,2%); <sup>3</sup> CC Moore, Anglia (białko ogólne: 60,0%, tłuszcz surowy: 23,0%); <sup>4</sup> APC (GB) Ltd, Ings Road, Doncaster, Wielka Brytania (białko ogólne: 92,0%); <sup>5</sup> SUPRO 590, Solae Belgium N.V., Belgia (białko ogólne: 87,5%, tłuszcz surowy: 3,2%); <sup>6</sup> Gluvital, Cargill, Polska (białko ogólne: >75,0%, tłuszcz surowy: 1,6%); <sup>7</sup> Agro-Fish, Kartoszyno, Polska; <sup>8</sup> BergaPure, Berg + Schmidt GmbH & Co. KG, Hamburg, Niemcy (97% czystej lecytyny); <sup>9</sup> Premix (g/kg): witamina A: 1,000,000 IU; witamina D3: 200,000 IU; witamina E: 1,5 g; witamina K: 0,2 g; witamina B1: 0,05 g; witamina B2: 0,4 g; witamina B12: 0,001 g; kwas nikotynowy: 2,5 g; inozytol: 35 g; D-pantotenian wapnia: 1,0 g; mioinozytol: 500 IU; chlorek choliny: 7,5 g; kwas foliowy: 0,1 g; metionina: 150,0 g; lizyna: 150,0 g; Fe: 2,5 g; Mn: 6,5 g; Cu: 0,8 g; Co: 0,04 g; Zn: 4,0 g; J: 0,008 g; nośnik > 1000,0 g; <sup>10</sup> Vitamin mix (g/kg): witamina A: 50,000 IU; witamina D3: 5000 IU; witamina E: 30,0 mg; witamina C: 100,0 mg; <sup>11</sup> Związki bezazotowe wyciągowe = 1000 – (białko ogólne + ekstrakt eterowy + włókno surowe + popiół surowy)

### 3.3.4. Ocena właściwości fizycznych pasz

Dla każdego parametru ocenę przeprowadzono w dziesięciu powtórzeniach. W trakcie trwania analiz właściwości fizycznych zapewnione zostały stałe warunki środowiskowe, tj. temperatura 21°C oraz 60% wilgotności powietrza (Toyotomi, YD-C312, Nagoya, Japonia).

Analiza gęstości nasypowej peletu (PD) – przeprowadzono zgodnie ze zmodyfikowaną metodyką Irungu i in. (2018). Zważono łącznie dziesięć losowo pobranych prób paszy o objętości 1 dm<sup>3</sup>.

Pomiar prędkości opadania (SV) przeprowadzono zgodnie ze zmodyfikowaną metodą opisaną przez Dasa i in. (1993). Kolumnę sedymentacyjną (Terra-robson, Wierzbno, Polska) o wysokości 105 cm wypełniono 100 cm wody. Do wody wprowadzono po 20 losowo wybranych granulek z każdej porcji paszy i mierzono czas dotarcia do dna kolumny z dokładnością do 0,1 s.

Pomiar stabilności peletu w wodzie (WS) przeprowadzono stosując zmodyfikowaną wersję metod zaproponowanych w literaturze (Das i in., 1993; Umar i in., 2013). Pobrano 100 g paszy i umieszczono w kolbie, do której następnie dodano 500 ml wody destylowanej. Kolbę umieszczono na wstrząsarce laboratoryjnej. Po 10 minutach separowano cząstki o wielkości poniżej 1 mm. Następnie pozostałość suszono na filtrach celulozowych w temperaturze 50°C przez 24 h, a następnie zważono w celu obliczenia proporcji peletu rozdrobnionego.

$$WS (\%) = [(początkowa\ masa\ próby\ (g) - końcowa\ masa\ próby\ (g)) / początkowa\ masa\ próby] \times 100$$

Wzrost objętości (VI) przeprowadzono zgodnie z metodyką Rawskiego i in. (2020). Próby paszy w objętości 25 ml umieszczono w kolbie miarowej i dopełniono 100 ml wody destylowanej. Po 10 minutach zmierzono objętość i obliczono ekspansję paszy w wodzie.

$$VI (\%) = [(objętość\ końcowa - objętość\ początkowa) / objętość\ początkowa] \times 100$$

Współczynnik ekspansji (ER) obliczono według wzoru opisanego przez Sayed i in. (2014). Wynik przedstawiono jako stosunek średnicy peletu do średnicy otworu w matrycy ekstrudera. Analizę przeprowadzono za pomocą suwmiarki elektronicznej (Yato, YT-7201, Szanghaj, Chiny) z dokładnością do 0,01 mm.

$$\text{ER (\%)} = (\text{średnica peletu (mm)} / \text{średnica matrycy (mm)}) \times 100$$

### 3.3.5. Techniczne warunki testu wzrostowego

Doświadczenie wzrostowe i strawnościowe przeprowadzono w hali odchowu ryb Pracowni Rybactwa Śródlądowego i Akwakultury na Uniwersytecie Przyrodniczym w Poznaniu przy zastosowaniu eksperymentalnego systemu akwakultury (eRAS, *experimental Recirculated Aquaculture System*). Woda w systemie eRAS była oczyszczana przez filtry biologiczne i napowietrzana systemem zasilanym dmuchawą membranową (HiBlow, Japonia). Ubytki wody w systemie były uzupełniane wodą wodociągową w ilości nieprzekraczającej 5% objętości wody na dobę. Przepływ wody wynosił 2 dm<sup>3</sup>/min. W okresie aklimacji ryby utrzymywano w zbiorniku o pojemności 500 dm<sup>3</sup>. Zbiorniki przeznaczone do doświadczenia wykonane były z laminatu włókna szklanego barwionego na szary kolor. Objętość całkowita wynosiła 60 dm<sup>3</sup>, natomiast objętość robocza 50 dm<sup>3</sup>. Pozostałe warunki doświadczenia były tożsame z metodyką opisaną w rozdziale 3.1.5 dotyczącym eksperymentu I. W tym przypadku temperatura wody wynosiła 14,7 ± 0,6 °C, natlenienie wody 7,5 ± 0,3 mg/dm<sup>3</sup> i zastosowano fotoperiod 16:8 (światło:ciemność) przez cały czas trwania doświadczenia. Ryby ważono w odstępach 10-dniowych.

### 3.3.6. Wskaźniki wzrostu i wykorzystania pasz oraz przeżywalność ryb

Kalkulowanie parametrów wzrostu i wykorzystania paszy przeprowadzono zgodnie z metodyką przedstawioną dla eksperymentu I (rozdział 3.1.6.), jednak rozszerzono je o wyliczenie procentowego przyrostu masy ciała (PWG) oraz wydajności wzrostowej tłuszczu paszowego (LER):

$$\text{PWG (\%)} = [(\text{końcowa masa ciała (g)} - \text{początkowa masa ciała (g)}) / \text{początkowa masa ciała (g)}] \times 100$$

$$\text{LER} = \text{BWG (g)} / (\text{spożycie paszy (g)} \times \text{masa tłuszczu zadanego rybom w paszy (g)})$$

### 3.3.7. Zrównoważenie środowiskowe chowu ryb

Wskaźniki zrównoważenia środowiskowego wyliczono tożsamo z metodyką opisaną w rozdziale 3.2.6. dotyczącym eksperymentu II, jednak rozszerzono je o efektywność wykorzystania paszy (FCE) stanowiący wskaźnik wzrostu ryb dla każdej paszy i będący odwróconym współczynnikiem wykorzystania paszy FCR :

FCE (g/g) = przyrost masy ciała (g) / masa pobranej paszy (g)

### **3.3.8. Badanie strawności składników pokarmowych pasz**

Test strawności trwał 45 dni, w tym czasie 15 dni stanowił okres adaptacyjny, natomiast przez 30 dni pobierano próby kału. Do tej części doświadczenia wykorzystano 120 ryb o średniej masie ciała 13,4 g, które zostały podzielone na cztery grupy (3 zbiorniki/grupę i 10 ryb/zbiornik). Ryby skarmiano paszami kontrolną i eksperymentalnymi używanymi równocześnie w testach wzrostowych (rozdziały 3.3.3. oraz 3.3.5.). Obsługa zbiorników strawnościowych oraz kolekcja kału opisana została szerzej w rozdziale 3.2.7. dotyczącym doświadczenia II, natomiast parametry wody były takie same jak w rozdziale 3.3.5.

### **3.3.9. Pobranie materiału biologicznego**

Pobranie materiału biologicznego wykonano zgodnie z metodyką opisaną w rozdziale 3.1.7. dotyczącym eksperymentu I. Do kalkulowania indeksów somatycznych wykorzystano 32 ryby/grupę. Fragment jelita został pobrany od 30 ryb/grupę.

### **3.3.10. Indeksy organosomatyczne oraz kondycja ryb**

Do obliczeń indeksów organosomatycznych zastosowano wzory podane w metodyce eksperymentu I (rozdział 3.1.8.) oraz II (rozdział 3.2.9.). Dodatkowo rozszerzono ten punkt o szereg wskaźników tj. względne długości przewodu pokarmowego (GIT/FTL), jelit (IL/FTL), jelita proksymalnego (PL/FTL) oraz jelita dystalnego (DL/FTL), jak również udziały procentowe jelit (IL/GIT), jelita proksymalnego (PL/GIT) i jelita dystalnego (DL/GIT) w całkowitej długości przewodu pokarmowego:

$$\text{GIT/FTL (\%)} = (\text{długość przewodu pokarmowego (mm)} / \text{całkowita długość ciała ryby (mm)}) \times 100$$

$$\text{IL/FTL (\%)} = (\text{całkowita długość jelit (mm)} / \text{całkowita długość ciała ryby (mm)}) \times 100$$

$$\text{PL/FTL (\%)} = (\text{długość jelita proksymalnego (mm)} / \text{całkowita długość ciała ryby (mm)}) \times 100$$

$$\text{DL/FTL (\%)} = (\text{długość jelita dystalnego (mm)} / \text{całkowita długość ciała ryby (mm)}) \times 100$$



$IL/GIT (\%) = (\text{całkowita długość jelit (mm)} / \text{całkowita długość przewodu pokarmowego (mm)}) \times 100$

$PL/GIT (\%) = (\text{długość jelita proksymalnego (mm)} / \text{całkowita długość przewodu pokarmowego (mm)}) \times 100$

$DL/GIT (\%) = (\text{długość jelita dystalnego (mm)} / \text{całkowita długość przewodu pokarmowego (mm)}) \times 100$

### **3.3.11. Analiza chemiczna materiału biologicznego**

Analizie podstawowej poddano materiały paszowe wykorzystane do zbilansowania diet, diety kontrolną i eksperymentalne, jak również odchody zebrane w trakcie doświadczenia strawnościowego. Analizy przeprowadzono tożsamo z opisem metodyki przedstawionym w rozdziale 3.1.9. dotyczącym eksperymentu I.

### **3.3.12. Analiza histomorfometryczna jelita**

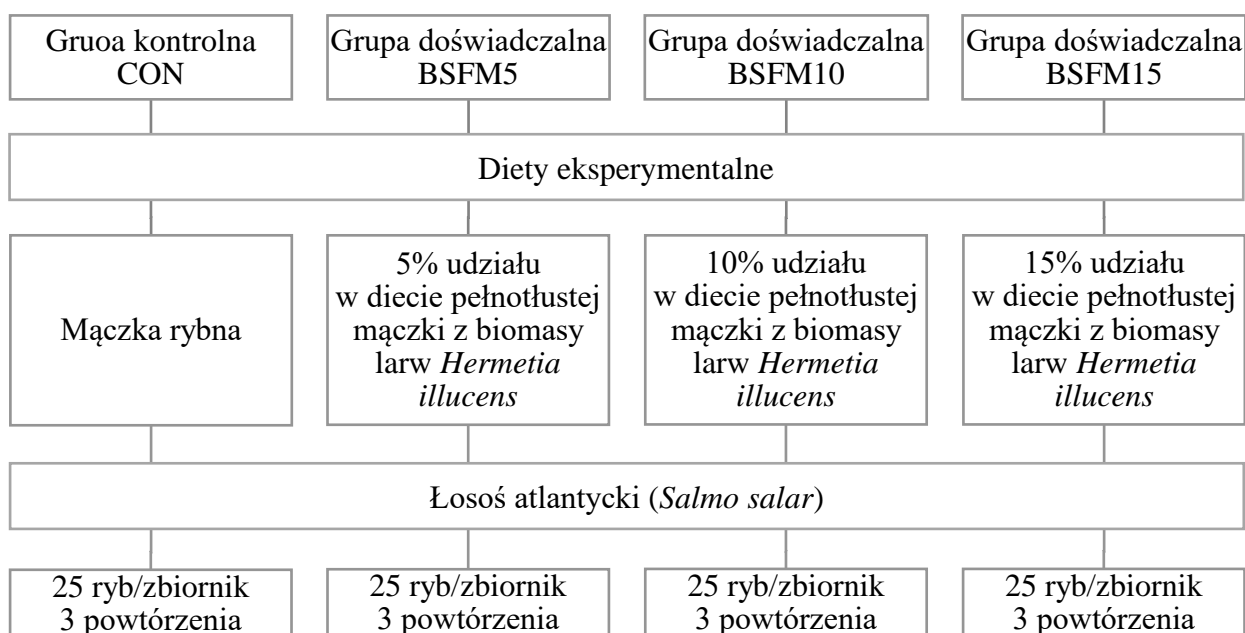
Analizę histomorfometryczną wykonano zgodnie z opisem metodyki w eskperymencie I (rozdział 3.1.10.)

### 3.4. Doświadczenie IV (Mikołajczak i in., 2023b)

#### 3.4.1. Układ doświadczalny

Eksperyment przeprowadzono z udziałem młodocianych osobników łosia atlantyckiego, test wzrostowy trwał 60 dni. Materiał biologiczny pochodził z Zakładu Doświadczalnego Technologii Produkcji Pasz i Akwakultury w Muchocinie. Ryby po siedmiodniowym okresie aklimacji zostały zważone oraz losowo podzielone na cztery grupy eksperymentalne (Ryc. 8), każda w trzech powtórzeniach – zbiornikach (25 ryb/zbiornik). Średnia masa ciała ryb w pierwszym dniu doświadczenia wynosiła 201,3 gramy.

W grupie kontrolnej (CON) ryby otrzymywały pasze, która nie zawierała BSFM, natomiast w grupach eksperymentalnych zastosowano pasze z wzrastającym procentowym udziałem BSFM: 5% (BSFM5), 10% (BSFM10) i 15% (BSFM15).



Rycina 8. Schemat układu doświadczalnego zastosowanego w eksperymencie IV (Mikołajczak i in., 2023b)

### **3.4.2. Mączka z biomasy larw *Hermetia illucens***

Mączka z biomasy larw *Hermetia illucens* została pozyskana od HiProMine S.A. (Robakowo, Polska). Tucz larw oraz sposób przygotowania mączek odpowiadał metodyce opisanej w eksperymencie II (rozdział 3.2.2.). Natomiast wyliczenie empirycznego współczynnika konwersji białka był tożsamy z eksperymentem III (rozdział 3.3.2.). W doświadczeniach III i IV została użyta ta sama mączka BSFM oraz mączka rybna.

### **3.4.3. Przygotowanie diet doświadczalnych**

Na potrzeby doświadczenia przygotowano dietę kontrolną (CON) oraz trzy diety eksperymentalne. W dietach eksperymentalnych zastosowano różne udziały BSFM: BSFM5 – dieta z 5,0% dodatkiem BSFM oraz z 27,1% dodatkiem mączki rybnej; BSFM10 – dieta z 10,0% dodatkiem BSFM oraz z 24,3% dodatkiem mączki rybnej; BSFM15 – dieta z 15,0% dodatkiem BSFM oraz z 21,3% dodatkiem mączki rybnej. W diecie kontrolnej zastosowano udział mączki rybnej na poziomie 30,0 Izobiałkowe i izoenergetyczne pasze (Tabela 8.) zostały wytworzone w Zakładzie Doświadczalnym Technologii Produkcji Pasz i Akwakultury (Muchocin, Polska) z zastosowaniem zasad i warunków technicznych opisanych w rozdziale 3.1.4, dotyczącym eksperymentu I.

**Tabela 7. Skład oraz wyniki analizy chemicznej diet w doświadczeniu IV (Mikołajczak i in., 2023b)**

Materiały paszowe (g/kg)	Diety			
	CON	BSFM5	BSFM10	BSFM15
Mączka rybna <sup>1</sup>	300	271	243	213
Mączka z BSF <sup>2</sup>	0	50	100	150
Mączka z hemoglobiny <sup>3</sup>	95	95	95	95
Drożdże paszowe	60	60	60	60
DDGS	50	50	50	50
Poekstrakcyjna śruta sojowa <sup>4</sup>	90	90	90	90
Gluten pszenny <sup>5</sup>	120	120	120	120
Mąka pszenna	120	109	97	88
Olej rybny <sup>6</sup>	129	119	109	98
Lecytyna <sup>7</sup>	10	10	10	10
Premix witaminowo-mineralny <sup>8</sup>	15	15	15	15
Premix witaminowy <sup>9</sup>	1	1	1	1
Chlorek choliny	2	2	2	2
Kreda pastewna	5	5	5	5
TiO <sub>2</sub>	3	3	3	3
Skład chemiczny (g/kg suchej masy), energia brutto				
Białko ogólne	450,0	450,1	450,4	450,4
Tłuszcz surowy	200,0	200,5	200,8	200,0
Popiół surowy	92,6	90,5	88,3	85,9
Włókno surowe	15,3	18,5	21,8	25,2
ZBW <sup>10</sup>	194,0	194,1	192,8	193,7
Ca	9,7	9,8	9,9	10,0
P	9,9	9,6	9,2	8,9
Energia brutto (MJ/kg)	48,37	48,41	48,37	48,34

<sup>1</sup> Agro-Fish, Kartoszyno, Polska (białko ogólne: 62,0%, tłuszcz surowy: 16,0%); <sup>2</sup> HiProMine S.A., Robakowo, Polska (sucha masa: 97,0%, białko ogólne: 50,3%, białko ogólne korygowane: 41,2%, tłuszcz surowy: 16,2%); <sup>3</sup> APC (GB) Ltd, Ings Road, Doncaster, Wielka Brytania (białko ogólne: 92,0%); <sup>4</sup> Wyekstrahowana rozpuszczalnikami (białko ogólne: 45,0%, tłuszcz surowy: 1,8%); <sup>5</sup> Gluvital, Cargill, Polska (białko ogólne: >75,0%, tłuszcz surowy: 1,6%); <sup>6</sup> Agro-Fish, Kartoszyno, Polska; <sup>7</sup> BergaPure, Berg + Schmidt GmbH & Co. KG, Hamburg, Niemcy (97% czystej lecytyny); <sup>8</sup> Premix (g/kg): witamina A: 1,000,000 IU; witamina D3: 200,000 IU; witamina E: 1,5 g; witamina K: 0,2 g; witamina B1: 0,05 g; witamina B2: 0,4 g; witamina B12: 0,001 g; kwas nikotynowy: 2,5 g; inozytol: 35 g; D-pantotienian wapnia: 1,0 g; mioinozytol: 500 IU; chlorek choliny: 7,5 g; kwas foliowy: 0,1 g; metionina: 150,0 g; lizyna: 150,0 g; Fe: 2,5 g; Mn: 6,5 g; Cu: 0,8 g; Co: 0,04 g; Zn: 4,0 g; J: 0,008 g; nośnik > 1000,0 g; <sup>9</sup> Vitamin mix (g/kg): witamina A: 50,000 IU; witamina D3: 5000 IU; witamina E: 30,0 mg; witamina C: 100,0 mg; <sup>10</sup> Związki bezazotowe wyciągowe = 1000 – (białko ogólne + ekstrakt eterowy + włókno surowe + popiół surowy)

#### **3.4.4. Techniczne warunki testu wzrostowego**

Doświadczenie wzrostowe przeprowadzono w Zakładzie Doświadczalnym Technologii Produkcji Pasz i Akwakultury w Muchocinie. Każdy zbiornik charakteryzowała pojemność 260 dm<sup>3</sup>. Woda pobierana była z naturalnego cieką, przepływała przez system filtrów wypełnionych grubym żwirem, następnie trafiała do dwóch zbiorników wyrównawczych (każdy o pojemności 5,5 m<sup>3</sup>), w których była napowietrzana (sześć dyfuzorów dyskowych zasilanych dmuchawą Hiblow HP-200) i przez system rur była rozdzielana do zbiorników. Pozostałe warunki doświadczenia dotyczące obsługi były tożsame z metodyką opisaną w rozdziale 3.1.5 dotyczącym eksperymentu I. W tym przypadku temperatura wody wynosiła od 14,2 do 16,3°C, natlenienie wody od 7,8 do 8,4 mg/dm<sup>3</sup> i zastosowano fotoperiod 16:8 h (światło:ciemność) przez cały czas trwania doświadczenia. Ryby ważono w odstępach 10-dniowych.

#### **3.4.5. Wskaźniki wzrostu i wykorzystania pasz oraz przeżywalność ryb**

Kalkulowanie parametrów wzrostu i wykorzystania paszy przeprowadzono zgodnie z metodyką przedstawioną w poprzednich rozdziałach (3.1.6., 3.2.5., 3.3.6.).

#### **3.4.6. Zrównoważenie środowiskowe chowu ryb**

Wskaźniki zrównoważenia środowiskowego wyliczono tożsamo z metodyką opisaną w rozdziałach 3.2.6. oraz 3.3.7.

#### **3.4.7. Pobranie materiału biologicznego**

Pobranie materiału biologicznego wykonano zgodnie z metodyką opisaną w rozdziale 3.1.7. dotyczącym eksperymentu I. Do kalkulowania indeksów somatycznych wykorzystano 18 ryb/grupę. Fragment jelita został pobrany od 15 ryb/grupę. Pobrany został również mięsień najdłuższy grzbietu w celu oceny barwy i jakości mięsa, który do czasu wykonania analiz przechowywany był w 4°C (9 ryb/grupę).

#### **3.4.8. Indeksy organosomatyczne oraz kondycja ryb**

Do obliczeń indeksów organosomatycznych zastosowano wzory podane w metodyce doświadczenia I (rozdział 3.1.8.) oraz II (rozdział 3.2.9.). Wskaźniki jelitowe, tj. względne długości przewodu pokarmowego (GIT/FTL), jelita proksymalnego (PL/FTL) oraz jelita dystalnego (DL/FTL) zostały wyliczone zgodnie

z metodyką opisaną w rozdziale 3.3.10. dotyczącym doświadczenia III. Indeksy organosomatyczne rozszerzono o wyliczenia procentowego udziału tuszki (CS) oraz procentowego udziału śledziona (SS):

$$CS (\%) = (\text{końcowa masa tuszki (g)} / \text{końcowa masa ciała (g)}) \times 100$$

$$SS (\%) = (\text{końcowa masa śledziona (g)} / \text{końcowa masa ciała (g)}) \times 100$$

### **3.4.9. Analiza chemiczna materiału biologicznego**

Analizie podstawowej poddano materiały paszowe wykorzystane do zbilansowania diet, diety kontrolną i eksperymentalne, jak również tuszki ryb. Analizy przeprowadzono tożsamo z opisem metodyki przedstawionym w rozdziale 3.1.9. dotyczącym eksperymentu I.

### **3.4.10. Analiza histomorfometryczna jelita**

Analizę histomorfometryczną wykonano zgodnie z opisem metodyki w doświadczeniu I (rozdział 3.1.10.).

### **3.4.11. Ocena barwy oraz jakości mięsa**

Oceny barwy mięśnia najdłuższego grzbietu dokonano na stanowisku badawczym oświetlonym naturalnym źródłem światła. Wszystkie fotografie zostały wykonane przy użyciu aplikacji na smartfon Color Analysis v. 7.0.0 (Research Lab Tools). Aplikacja pozwoliła na zarejestrowanie L (jasność), a (wskaźnik zaczerwienienia) oraz b (wskaźnik żółtości). Wartości RGB, nasycenia (*chroma*) oraz barwy (*hue*) zostały przeanalizowane przy użyciu oprogramowania ImageJ v. 1.53.

Wartość pH tkanki mięśniowej zmierzono przy użyciu elektrody szklanej (pH 100 L; VWR International, Leuven, Belgia). Pomiarów dokonywano trzykrotnie w mięśniu najdłuższym grzbietu (9 ryb/grupę). Pomiaru wykonywane były w mięsie świeżym bezpośrednio po uboju ryb, po 24 h w mięsie schłodzonym w temperaturze 4°C oraz ostatni raz po ugotowaniu.

Parametry jakościowe mięsa oznaczono w wypreparowanych płatach rybnych bez skóry pozyskanych z lewej strony ciała. Procedurę gotowania płatów przeprowadzono w temperaturze 100°C przez 10 minut. Udział procentowy płata świeżego (FS), płata schłodzonego (CFL) oraz wydajność gotowania (CE) obliczono według następujących wzorów:

$$\text{FS (\%)} = (\text{masa płata świeżego (g)} / \text{końcowa masa ciała (g)}) \times 100$$

$$\text{CFL (\%)} = (\text{masa płata schłodzonego (g)} / \text{masa płata świeżego (g)}) \times 100$$

$$\text{CE (\%)} = (\text{masa płata przed gotowaniem (g)} / \text{masa płata po gotowaniu (g)}) \times 100$$

### 3.5. Analiza statystyczna

W eksperymentach I, III oraz IV analizę rozkładu normalnego przeprowadzono z zastosowaniem testu Kołmogorowa-Smirnowa, natomiast do sprawdzenia równości wariancji wykorzystano test Levene'a. W przypadku eksperymentu II w celu określenia normalności rozkładu danych oraz równości wariancji zastosowano testy Shapiro-Wilka oraz Bartlett'a. Jednoczynnikowa analiza wariancji ANOVA została zastosowana w celu wykazania różnic pomiędzy grupami, a w przypadku ich istotności przeprowadzono test Duncana. Poziom istotności statystycznej ustalono na  $P \leq 0,05$ . Zastosowano następujący model statystyczny:

$$Y_i = \mu + \alpha_i + \delta_{ij}$$

gdzie:  $Y_i$  – obserwowana zmienna zależna;  $\mu$  – średnia;  $\alpha_i$  – efekt diety;  $\delta_{ij}$  – błąd losowy.

Do przeprowadzenia analiz statystycznych stosowano oprogramowanie SAS® Studio 3.5 (SAS Institute Inc. 2016) (eksperyment I) lub R Studio (eksperymenty II, III oraz IV).



## **4. Wyniki badań**

W poniższym rozdziale przedstawiono wyniki badań wzrostowych i analiz laboratoryjnych. W ich opisie odniesienia mówiące o braku lub występowaniu statystycznie istotnych różnic porównują grupy doświadczalne w odniesieniu do grup kontrolnych, chyba że wskazane jest inne porównanie pomiędzy grupami.

### **4.1. Eksperyment I (Mikołajczak i in., 2020)**

#### **4.1.1. Wskaźniki wzrostu i wykorzystania pasz oraz przeżywalność ryb**

Nie zaobserwowano istotnie statystycznych różnic pomiędzy grupami w przypadku parametrów wzrostu oraz wykorzystania pasz u troci wędrowej, w tym: końcowej masy ciała (FBW), przyrostu masy ciała (BWG), względnego dobowego przyrostu masy jednostkowej ryb (SGR), wskaźnika dziennego pobrania paszy (DIR), współczynnika wykorzystania paszy (FCR) oraz wartości produkcyjnej białka paszowego (PPV). Zastosowane pasze doświadczalne nie miały również wpływu na przeżywalność ryb. Jedynie w przypadku wydajności wzrostowej białka paszowego (PER), ryby żywione paszami z dodatkiem hydrolizowanych mączek z biomasy larw owadów cechowały się statystycznie istotnie niższymi wartościami tego parametru ( $P = 0,029$ ).

#### **4.1.2. Indeksy organosomatyczne oraz skład ciała ryb**

Zastosowane pasze doświadczalne nie miały wpływu na skład chemiczny ciała ryb (wilgotność, białko ogólne, tłuszcz surowy oraz popiół surowy). Niemniej jednak, grupa żywiona paszą z udziałem drewnojada cechowała się istotnie wyższymi wartościami indeksów hepatosomatycznego (HSI) ( $P < 0,001$ ) oraz wiscerosomatycznego (VSI) ( $P = 0,010$ ).

#### **4.1.3. Charakterystyka histomorfometryczna jelit**

Zastosowanie pasz doświadczalnych nie miało wpływu na wysokość, szerokość oraz powierzchnię kosmków jelitowych, jak również grubość warstwy mięśniowej.

#### **4.1.4. Mikrobiom przewodu pokarmowego**

Nie zaobserwowano różnic istotnych statystycznie w przypadku ogólnej liczby bakterii (log JTK/g) oraz populacji *Bacillus* spp. W grupie żywionej paszą z udziałem drewnojada odnotowano istotne obniżenie liczby bakterii *Aeromonas* spp. ( $P = 0,037$ ) oraz *Enterococcus* spp. ( $P = 0,017$ ). W obu grupach ryb żywionych paszami z udziałem

hydrolizowanych mączek z owadów zaobserwowano istotne obniżenie koncentracji bakterii *Carnobacterium* spp. ( $P = 0,001$ ). Natomiast w przypadku *Lactobacillus* spp. jedynie w grupie żywionej paszą z dodatkiem mącznika wykazano ten sam efekt ( $P = 0,025$ ).

#### **4.1.5. Parametry biochemiczne i immunologiczne surowicy krwi oraz wątroby**

Zaobserwowano istotnie zwiększone stężenie aminotransferazy asparaginowej (AST) ( $P = 0,002$ ) przy jednoczesnym obniżeniu stężenia fosfatazy alkalicznej (ALP) ( $P < 0,001$ ) w przypadku ryb żywionych paszą z udziałem drewnojada. Dodatkowo, grupa ta cechowała się podwyższoną zawartością lipidów w wątrobie ( $P = 0,004$ ). Jednocześnie ryby żywione paszami z udziałem hydrolizowanych mączek z owadów cechowały się istotnie wyższym poziomem cholesterolu całkowitego (TC) we krwi ( $P < 0,001$ ). W przypadku poziomu trójglicerydów, jedynie grupa żywiona paszą z udziałem mącznika istotnie obniżała te wartości ( $P = 0,034$ ). Dla pozostałych parametrów nie zaobserwowano różnic istotnych statystycznie (aminotransferaza alaninowa (ALT), białko całkowite (TP), wolne kwasy tłuszczowe (NEFA), glukoza, immunoglobulina M, lizozym oraz zawartość glikogenu w wątrobie).

### **4.2. Eksperyment II (Mikołajczak i in., 2022)**

#### **4.2.1. Wskaźniki wzrostu i wykorzystania pasz oraz przeżywalność ryb**

Nie odnotowano istotnie statystycznych różnic pomiędzy grupami w przypadku parametrów wzrostu oraz wykorzystania pasz u pstrągów potokowych, w tym: FBW, BWG, SGR, DIR, FI, FCR oraz PER. Zastosowane pasze doświadczalne nie miały również wpływu na przeżywalność ryb.

#### **4.2.2. Zrównoważenie środowiskowe chowu ryb**

Zastosowanie w paszach dla pstrągów potokowych BSFM w ilościach 10 lub 20% istotnie obniżało względne zużycie mączki rybnej (FMU) i oleju rybnego (FOU) oraz wskaźnik FIFO ( $P < 0,001$ ). W grupie z 5% udziałem mączki z owadów istotny wpływ na obniżenie wartości odnotowano jedynie we względnym zużyciu oleju rybnego.

#### **4.2.3. Strawność składników pokarmowych pasz**

Nie wykazano istotnych statystycznie różnic pomiędzy grupami CON i BSFL10 w zakresie strawności białka ogólnego i tłuszczu surowego pasz. W grupie BSFL20 zaobserwowano istotne obniżenie strawności białka ogólnego ( $P < 0,001$ ) oraz tłuszczu

surowego ( $P = 0,006$ ) pasz. W przypadku ryb żywionych paszą z 5% udziałem BSFM odnotowano obniżoną strawność białka ogólnego ( $P < 0,001$ ).

#### **4.2.4. Indeksy organosomatyczne oraz kondycja ryb**

Zastosowane pasze doświadczalne nie miały wpływu na kondycję ryb. Indeks VSI cechował się najniższą wartością w grupie CON ( $P = 0,018$ ), natomiast wartości HSI obniżały się istotnie we wszystkich grupach z udziałem BSFM ( $P < 0,001$ ).

#### **4.2.5. Mikrobiom przewodu pokarmowego**

Testowane pasze doświadczalne nie wykazały istotnego wpływu na skład mikrobiomu przewodu pokarmowego: ogólnej liczby bakterii, jak również wybranych populacji bakteryjnych, w tym: *Carnobacterium* spp., *Lactobacillus* spp. oraz *Enterococcus* spp.

#### **4.2.5. Parametry biochemiczne surowicy krwi**

Pstrągi potokowe żywione paszą z 10 i 20% udziałem BSFM charakteryzowały się wzrostem stężenia AST ( $P = 0,002$ ) oraz TC ( $P = 0,007$ ) w surowicy krwi. Jednocześnie, 20% udział BSFM w paszy prowadził do obniżenia się GGT ( $P = 0,002$ ) oraz albumin ( $P < 0,001$ ). Globuliny osiągały najwyższe stężenie u ryb żywionych paszami z udziałem BSFM ( $P < 0,001$ ), a poziom NEFA był najwyższy w grupie BSFL20 ( $P = 0,003$ ). Dla pozostałych parametrów, w tym: ALT, trójglicerydy, białko całkowite oraz glukoza, nie zaobserwowano istotnych statystycznie różnic pomiędzy grupami.

### **4.3. Eksperyment III (Mikołajczak i in., 2023a)**

#### **4.3.1. Właściwości fizyczne pasz**

Zwiększenie udziału BSFM w paszach doprowadziło do obniżenia się wartości gęstości nasypowej peletu (PD), przy jednoczesnym zwiększeniu objętości (VI) ( $P < 0,001$ ). Udział BSFM w paszy na poziomie 10 i 15% prowadził do szybszego opadania peletu (SV) w porównaniu do CON i BSFM5 ( $P < 0,001$ ). Wszystkie pasze z dodatkiem BSFM zwiększały wartości współczynnika ekspansji (ER) ( $P < 0,001$ ). W przypadku pomiaru stabilności peletu w wodzie (WS) nie zaobserwowano różnic istotnych statystycznie pomiędzy paszami doświadczalnymi.

#### **4.3.2. Wskaźniki wzrostu i wykorzystania pasz oraz przeżywalność ryb**

Łososie atlantyckie żywione paszami z 5 i 10% udziałem BSFM nie różniły się od grupy kontrolnej pod kątem parametrów wzrostu i wykorzystania paszy, w tym: FBW, procentowym przyroście masy ciała (PWG), BWG, FI, FCR, PER oraz wydajności wzrostowej tłuszczu paszowego (LER). Zwiększenie poziomu BSFM do 15% w paszy spowodowało istotne obniżenie wartości BWG ( $P = 0,006$ ), PWG ( $P = 0,006$ ), SGR ( $P = 0,016$ ), PER ( $P = 0,011$ ) oraz LER ( $P = 0,011$ ), przy jednoczesnym wzroście wartości FCR ( $P = 0,004$ ). Zastosowane pasze doświadczalne nie miały wpływu na przeżywalność ryb.

#### **4.3.3 Zrównoważenie środowiskowe chowu ryb**

We wszystkich grupach doświadczalnych, w których zastosowano BSFM odnotowano obniżenie wartości FMU ( $P = 0,002$ ). Dodatkowo, grupy BSFM5 i BSFM10 charakteryzowały się obniżonymi wartościami wskaźników FOU ( $P = 0,026$ ) i FIFO ( $P = 0,007$ ). Wzrost wskaźnika FCE obserwowany był jedynie w grupie z 15% udziałem BSFM ( $P = 0,011$ ).

#### **4.3.4. Strawność składników pokarmowych pasz**

Zastosowane pasze doświadczalne nie miały istotnego wpływu na wartości współczynników pozornej strawności białka ogólnego i tłuszczu surowego.

#### **4.3.5. Indeksy organosomatyczne oraz kondycja ryb**

Nie odnotowano istotnych statystycznie różnic pomiędzy rybami żywionymi paszami doświadczalnymi w przypadku indeksów organosomatycznych (VSI, HSI), względnych długości poszczególnych segmentów przewodu pokarmowego w odniesieniu do długości ciała: całkowita (GIT/FTL), jelita (IL/FTL), jelita proksymalnego (PL/FTL), jelita dystalnego (DL/FTL), względnych długości poszczególnych segmentów przewodu pokarmowego w odniesieniu do długości przewodu pokarmowego: jelita (IL/GIT), jelita proksymalnego (PL/GIT), jelita dystalnego (DL/GIT) oraz kondycji ryb.

#### **4.3.6. Charakterystyka histomorfometryczna jelit**

Zastosowanie pasz doświadczalnych nie miało wpływu na wyniki histomorfometryczne jelit ryb: długość, szerokość i powierzchnię kosmków jelitowych oraz grubość warstwy mięśniowej.

#### **4.4. Eksperyment IV (Mikołajczak i in., 2023b)**

##### **4.4.1. Wskaźniki wzrostu i wykorzystania pasz oraz przeżywalność ryb**

Zastosowanie pasz doświadczalnych nie spowodowało istotnego wpływu na wskaźniki wzrostu i wykorzystanie pasz, w tym: FBW, BWG, PWG, FI, SGR oraz PER. W przypadku ryb żywionych paszami z 15% udziałem BSFM zaobserwowano wyższe wartości FCR ( $P = 0,020$ ) oraz obniżenie wartości LER ( $P = 0,011$ ). Nie odnotowano wpływu pasz doświadczalnych na przeżywalność ryb.

##### **4.4.2. Zrównoważenie środowiskowe chowu ryb**

We wszystkich grupach doświadczalnych, w których zastosowano BSFM odnotowano obniżenie wartości FMU, FOU oraz FIFO ( $P < 0,001$ ). W przypadku ryb żywionych paszą z 5% udziałem BSFM stwierdzono brak różnic w przypadku parametru FCE.

##### **4.4.3. Indeksy organosomatyczne oraz kondycja ryb**

Zastosowane pasze doświadczalne nie wpływały na kondycję ryb oraz indeksy organosomatyczne, w tym: HSI, procentowy udział tuszki (CS) oraz procentowy udział śledziony (SS). Również wartości indeksów jelitowych (GIT/FTL, PL/FTL, DL/FTL) nie różniły się pomiędzy grupami.

##### **4.4.4. Charakterystyka histomorfometryczna jelit**

Różnice istotne statystycznie pomiędzy grupami były obserwowane dla wszystkich badanych parametrów jelita proksymalnego. Obniżona wysokość kosmków jelitowych obserwowana była we wszystkich grupach żywionych paszami z udziałem BSFM ( $P < 0,001$ ). W przypadku szerokości kosmków, jedynie grupa BSFM15 nie wykazywała różnic, ponadto w grupie BSFM5 odnotowano obniżone wartości, natomiast w grupie BSFM10 wyższe ( $P < 0,001$ ). Pod kątem powierzchni kosmków jelitowych ryby żywione paszami z 5 i 15% udziałem BSFM charakteryzowały się niższymi wartościami ( $P < 0,001$ ). Grubość warstwy mięśniowej wzrastała wraz z poziomem włączenia BSFM do pasz dla łososi atlantyckich ( $P < 0,001$ ).

W przypadku jelita dystalnego nie obserwowano różnic pomiędzy grupami w zakresie wysokości i powierzchni kosmków jelitowych oraz grubości warstwy mięśniowej. Jednocześnie ryby żywione paszą z 5% udziałem BSFM charakteryzowały się istotnym zwiększeniem szerokości kosmków ( $P = 0,025$ ).

#### **4.4.5. Ocena barwy oraz jakości mięsa**

Zastosowane pasze doświadczalne nie miały wpływu na wyniki analiz kolorymetrycznych mięsa, w tym: wskaźniki L (jasności), a (zaczerwienienie), b (żółtości), wartości R, G, B oraz nasycenia (chroma) i barwy (hue), a także na jakość mięsa łososi atlantyckich: pH mierzone w mięsie świeżym bezpośrednio po uboju ryb, po 24 h w mięsie schłodzonym w temperaturze 4°C oraz po ugotowaniu, udział procentowy płata świeżego (FS), płata schłodzonego (CFL) oraz wydajność gotowania (CE).

### **Wykaz analiz przeprowadzonych samodzielnie przez Doktorantkę:**

1. Bilansowanie składu diet doświadczalnych.
2. Przygotowanie pasz doświadczalnych.
3. Przeprowadzenie hydrolizy mączek z owadów.
4. Wykonanie badań *in vitro* z rybami (testy wzrostowe i strawnościowe).
5. Pobranie materiału biologicznego do dalszych analiz.
6. Obliczanie wskaźników wzrostu i wykorzystania pasz oraz przeżywalności ryb.
7. Obliczanie wskaźników zrównoważenia środowiskowego.
8. Obliczanie wskaźników somatycznych i kondycji ryb.
9. Udział w przygotowaniu preparatów histologicznych.
10. Przeprowadzenie analizy fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* – wykonanie preparatów mikroskopowych, analiza mikroskopowa, liczenie koncentracji wybranych grup bakterii.
11. Udział w przygotowaniu analizy biochemicznej surowicy krwi ryb.
12. Wykonanie analizy statystycznej uzyskanych wyników badań.

### **Wykaz analiz zleconych przez Doktorantkę:**

1. Określenie składu podstawowego, energii, zawartości aminokwasów w białku, zawartości kwasów tłuszczowych, wapnia, fosforu i chityny w mączce rybnej oraz w mączkach z owadów.
2. Określenie składu podstawowego, energii, zawartości aminokwasów w białku, wapnia, fosforu i chityny w paszach doświadczalnych.
3. Określenie składu podstawowego ciała ryb.
4. Wykonanie i opis preparatów histologicznych przewodu pokarmowego.
5. Wykonanie analizy biochemicznej surowicy krwi ryb.

## 5. Dyskusja

Dostępne dane literaturowe obejmują szerokie spektrum wyników doświadczeń omawiających efekty zastosowania mączek z owadów w akwakulturze. Jednakże, w zależności od gatunku ryb, rodzaju zastosowanej mączki, sposobu i stopnia substytucji mączki rybnej obserwowano efekty zarówno pozytywne (Hoffmann i in., 2020; 2021b; Hossain i in., 2021; Józefiak i in., 2019; Rawski i in., 2020, 2021; Terova i in., 2019), jak i negatywne (Dietz i Liebert, 2018; Dumas i in., 2018; Roncarati i in., 2015). Główny nurt badawczy skupia się na wynikach odchowu, wykorzystania paszy oraz szeregu aspektów żywieniowych i fizjologicznych. Jednak uzyskiwane wyniki nie dają jednoznacznych odpowiedzi w zakresie praktycznej oceny zrównoważenia środowiskowego chowu ryb w przypadku zastosowania mączek z owadów, ich wpływu na jakość wytwarzanych pasz oraz najczęściej zawężone są do modelu odpowiedzi na dawkę (ang. *dose response*) dla jednego rodzaju mączki. W celu poszerzenia dostępnej wiedzy naukowej i aplikacyjnej podjęto cykl badawczy obejmujący cztery eksperymenty wzrostowe porównujące wiele wariantów dawkowania, technologii obróbki materiałów paszowych i wytwarzania pasz z udziałem mączek z: mącznika młynarka (*Tenebrio molitor*), drewnojada (*Zophobas morio*) i *Hermetia illucens*. Na podstawie wyników kolejnych prac podejmowano konsekwentne decyzje dążące do optymalizacji zastosowania tej grupy materiałów paszowych. Wykonano testy wzrostowe, strawnościowe, analizy laboratoryjne pasz, mikrobiologiczne treści pokarmowej, biochemiczne i immunologiczne surowicy krwi, jak również oceniono rozwój mikro i makro struktur przewodu pokarmowego. Jako uzupełnienie powyższych wyników dokonano analizy parametrów zrównoważenia środowiskowego chowu ryb.

W przedstawionej rozprawie doktorskiej omówiono spektrum zastosowanych gatunków owadów, różnice w stosowanych metodach produkcji materiałów paszowych, jak również w samym bilansowaniu diet. W eksperymencie I (Mikołajczak i in., 2020) do pasz dla troci wędrowej wprowadzono hydrolizowane pełnotłuste mączki z mącznika młynarka oraz drewnojada. Warto podkreślić, że w przypadku drewnojada miało to miejsce po raz pierwszy w dostępnej literaturze naukowej. Hydrolizowane materiały paszowe ulegają efektywniejszemu wchłanianiu na skutek zawartości związków o niskiej masie cząsteczkowej, co ostatecznie skutkuje w poprawie wzrostu i wykorzystania pasz (Martínez-Alvarez i in., 2015). W eksperymentach II (Mikołajczak i in., 2022), III (Mikołajczak i in., 2023a) oraz IV (Mikołajczak i in., 2023b), w których wykorzystywanym materiałem paszowym była BSFM zaobserwowano wzrost



zawartości włókna surowego w dietach, co jest konsekwencją występowania chityny w egzoszkieletach owadów, która ze względu na budowę chemiczną kwalifikowana jest jako polisacharyd. Jednocześnie chityna może zawierać w swojej strukturze nieaminokwasowe wiązania azotowe. Ze względu na obecność chityny w biomasie owadów dochodzi do przeszacowania ilości białka właściwego (aminokwasowego) podczas bilansowania diet (Finke, 2007; Gasco i in., 2018), które osiągać będzie wyższy poziom wraz ze wzrostem udziału mączek z owadów (Rawski i in., 2020). Aby zniwelować te różnice, istotnym jest wykonanie obliczeń empirycznego współczynnika konwersji białka ogólnego ( $K_p$ ), co zostało wprowadzone w eksperymentach III (Mikołajczak i in., 2023a) oraz IV (Mikołajczak i in., 2023b). Wyniki dokonanych obliczeń zgodne są z pracą Janssen i in. (2017), którzy oszacowali wartość  $K_p$  dla mączek z owadów na poziomie 4,76 – 5,60, w zależności od jakości białka ogólnego i poziomu jego oczyszczenia – co może skutkować ponad 20% przeszacowaniem względem standardowo stosowanego współczynnika ( $N \times 6,25$ ). Wspomniana korekta pozwoliła na zbilansowanie diet izobiałkowych. Dodatkowo nie zaobserwowano różnic w składzie chemicznym diet, które mogłyby potencjalnie zaburzać wzrost i rozwój ryb.

Ponadto rozszerzając metodykę prac badawczych na podstawie obserwacji własnych i danych literaturowych w eksperymencie III (Mikołajczak i in., 2023a) ekstrudat został poddany postprodukcyjnym testom laboratoryjnym określającym właściwości fizyczne gotowych pasz. Dane literaturowe w tym zakresie są wciąż ograniczone a stosowana metodyka badawcza jest zróżnicowana, co znacznie utrudnia ich porównanie. Wzrost udziału BSFM w paszach dla łososia atlantyckiego prowadził do wyższych wartości współczynnika ekspansji oraz niższej gęstości nasypowej peletu. Uzyskane wyniki własne pokrywają się z pracą Rawskiego i in. (2020). Głównym powodem obserwowanych wyników, jest fakt, że stosowanie pełnotłustych mączek z owadów prowadzi do lepszego rozprowadzenia oleju w paszach podczas procesu ekstruzji. W prezentowanych badaniach zawartości tłuszczu surowego w BSFM oraz mączce rybnej były zbliżone i wynosiły około 16%. Jednakże sposób substytucji mączki rybnej wymuszony niższą zawartością białka ogólnego w testowanej mączce wymagał w procesie bilansowania składu diet wprowadzenia wyższych udziałów BSFM niż zastępowanego materiału. Konsekwencją tego była zwiększona zawartość tłuszczu surowego w materiale przeznaczonym do ekstruzji, a obniżona ilość oleju nanoszona na gotowe peletki. Wzrost udziału BSFM w paszach prowadził również do szybszego opadania (SV) i wzrostu objętości peletu po 10 minutach w wodzie. Wyższa prędkość

opadania z jednoczesnym obniżeniem gęstości nasypowej można tłumaczyć nasileniem tworzenia się porów w strukturze ekstrudatu. Podobny efekt w przypadku SV obserwowano wcześniej w pelecie z wyższym procentowym udziałem DDGS (Kannadhasan i in., 2009). Ponadto, Liu i in. (2021) stwierdzili, że dodatek mąki pszennej prowadzi do bardziej porowatej struktury peletu i ma to związek z ekspansją, która wpływa na stabilność wodną paszy. Może to być zatem przyczyna znacznie wyższych wartości SV w grupach z dodatkiem BSFM, gdyż charakteryzowały się one wyższym udziałem włókna surowego. Należy jednak podkreślić, że opisane powyżej zmiany nie przyczyniły się do obniżenia stabilności peletu w wodzie, co sugeruje, że BSFM może być z powodzeniem stosowana w paszach dla akwakultury do poziomu 15%.

We wszystkich czterech doświadczeniach badano wpływ zastosowanych materiałów paszowych na wyniki chowu ryb, w tym przyrosty i wykorzystanie pasz. W eksperymencie I (Mikołajczak i in., 2020) nie zaobserwowano różnic w przyrostach masy ciała ryb, względnym dobowym przyroście masy jednostkowej ryb, wskaźniku dziennego pobrania paszy, współczynnika wykorzystania paszy, wartości produkcyjnej białka paszowego oraz przeżywalności ryb. Zaobserwowano jednak niższe wartości wydajności wzrostowej białka paszowego w przypadku troci wędrownych żywionych paszami z udziałem hydrolizowanych mączek z owadów, niezależnie od ich rodzaju (gatunku, z którego zostały wytworzone). W eksperymencie II (Mikołajczak i in., 2022) nie odnotowano istotnych różnic pomiędzy grupami w wartościach wszystkich ocenianych parametrów wzrostu ryb i wykorzystania pasz. Z kolei w eksperymencie III (Mikołajczak i in., 2023a) 15% udział BSFM wpłynął negatywnie na przyrosty masy ciała ryb, współczynnik wykorzystania paszy, wydajność wzrostową białka i tłuszczu paszowego. Wyniki częściowo potwierdzają obserwacje w doświadczeniu IV (Mikołajczak i in., 2023b), w którym odnotowano pogorszenie wartości współczynnika wykorzystania paszy oraz wydajności wzrostowej tłuszczu paszowego w grupie z najwyższym udziałem mączki z owadów. Literatura naukowa potwierdza, że niższe wyniki wykorzystania białka niekoniecznie muszą przejawiać się w pogorszonych wynikach wzrostowych oraz wydajności paszy (Stadtlander i in., 2017). Belghit i in. (2018) wskazują, że nawet wysoki udział odtłuszczonej mączki BSF (60% diety) może nie wpływać na końcową masę ciała ryb, pobranie i wykorzystanie paszy oraz wydajność wzrostową białka i tłuszczu paszowego. Z kolei 25% zastąpienie mączki rybnej BSFM prowadziło do pogorszenia wykorzystania paszy oraz niższej końcowej masy ciała łososi atlantyckich (Weththasinghe i in., 2021), co zgodne jest z wynikami w eksperymencie

III. Podobne rezultaty odnotowano w badaniach Fishera i in. (2020), w których 30% udział mączki z *Hermetia illucens* obniżył wykorzystanie paszy i przyrosty masy ciała łososi atlantyckich. W przypadku eksperymentu I pogorszenie efektywności wzrostowej białka paszowego nastąpiło prawdopodobnie na skutek braku zastosowania empirycznego współczynnika konwersji azotu na białko, a tym samym przeszacowania ilości białka ogólnego w mączkach z owadów (Finke 2007). Wyjaśnieniem pogorszenia wydajności wzrostowej tłuszczu paszowego może być zdolność chityny zawartej w mączkach z owadów do ograniczenia strawności i retencji tłuszczu surowego (Belghit i in., 2019b; Renna i in., 2017).

Zrównoważenie środowiskowe chowu ryb, istotne w perspektywie problemów szerzej opisanych we wstępie niniejszej pracy, zostało ocenione w eksperymentach II (Mikołajczak i in., 2022), III (Mikołajczak i in., 2023a) oraz IV (Mikołajczak i in., 2023b). Jedną z najpowszechniejszych metod oceny zrównoważenia alternatywnych źródeł białka w paszach akwakultury polega na zastosowaniu wskaźnika „fish-in-fish-out” (FIFO), który jest połączeniem współczynnika wykorzystania paszy z wydajnością produkcyjną mączki rybnej i oleju rybnego (Naylor i in., 2021). Wskaźnik FIFO określa ile ryb z połowów jest potrzebnych, aby pokryć zapotrzebowanie na paszę dla wyprodukowania 1 kg ryb hodowlanych (Jannathulla i in., 2019). W 2017 roku wartość FIFO dla łososia atlantyckiego osiągała 1,87 – co niewątpliwie implikuje potrzebę dalszej optymalizacji składu stosowanych diet (Naylor i in., 2021). W przypadku wyników eksperymentu II z pstrągiem potokowym obniżenie wartości FIFO zaobserwowano w grupach z 10 i 20% udziałem BSFM. Co więcej, w grupie z największym udziałem mączki z owadów odnotowano redukcję tego parametru o aż 30% względem grupy kontrolnej. W eksperymencie III miało to miejsce jedynie w grupach ryb żywionych paszami z 5 i 10% udziałem BSFM. Brak różnic w stosunku do grupy kontrolnej w diecie z 15% udziałem wynika z pogorszonych parametrów wzrostowych. Natomiast w przypadku eksperymentu IV, pozytywny efekt obserwowany był we wszystkich grupach niezależnie od zastosowanych udziałów BSFM.

Określenie współczynników strawności białka i tłuszczu stosowanych pasz było pierwszym etapem do lepszego poznania wpływu zastosowanych diet na fizjologię procesów trawienia i wchłaniania składników pokarmowych. W eksperymencie II stwierdzono obniżenie strawności białka ogólnego w grupach z 5% i 10% udziałem BSFM oraz tłuszczu surowego w grupie z 20% udziałem tej mączki. Warto jednak podkreślić, że dla obu składników pokarmowych współczynniki strawności były wysokie

(na poziomie 97,9 – 98,6% dla białka ogólnego oraz 98,1 – 99,4% dla tłuszczu surowego), a wyniki nie wpływały na opisane wcześniej wskaźniki wzrostu ryb i wykorzystania pasz. Tymczasem w eksperymencie III nie wykazano istotnych różnic w wartościach współczynników strawności białka i tłuszczu, natomiast obserwowane były pogorszone parametry wzrostowe w grupie z 15% udziałem BSFM. Według Marono i in. (2015), współczynniki strawności białka są ujemnie skorelowane z obecnością chityny w materiałach paszowych wytworzonych z owadów. Skutkiem jest niższa biodostępność białka związanego z chityną dla enzymów proteolitycznych (Henry i in., 2015) lub generalnie niższej aktywności tych enzymów (Belghit i in., 2018). Co więcej, pomimo wysokiego udziału owadów w pokarmie naturalnym wykazano, że łosoś atlantycki charakteryzuje się niską zdolnością do trawienia chityny (Olsen i in., 2006).

W omawianym cyklu badawczym zaobserwowano zróżnicowanie wpływu zastosowanych mączek wytworzonych z owadów na indeksy organosomatyczne ryb. W eksperymencie I odnotowano podwyższenie wartości indeksów hepato i wiscerosomatycznych u troci wędrównych karmionych paszą z udziałem hydrolizowanej mączki z drewnojada. Jednocześnie, w tej grupie odnotowano wzrost udziału lipidów w wątrobie. Efekt ten można wytłumaczyć wyższym poziomem kwasu palmitynowego w paszy z udziałem hydrolizowanej mączki z drewnojada w porównaniu do innych grup. Wyniki wskazują, że doprowadziło to do powiększenia wątroby na skutek nagromadzenia się tłuszczu w tkance tego narządu. Według Huang i in. (2016) wyższe poziomy lipidów w diecie mogą prowadzić do odkładania się tłuszczu w jamie trzewnej i wątrobie ryb, jednak ma to również związek z profilem kwasów tłuszczowych. Równocześnie pasza z udziałem hydrolizowanej mączki z drewnojada cechowała się wyższymi poziomami nasyconych kwasów tłuszczowych. Potencjalnym czynnikiem modulującym skład wątroby ryb, a także jej budowy oraz metabolizmu, jest stosunek między kwasami tłuszczowymi n-3 oraz n-6 (Kowalska i in., 2012; Piedecausa i in., 2007). Zmniejszony udział kwasów n-3 w dietach z zastosowaniem produktów pochodzących z owadów może powodować brak równowagi stosunku n-3/n-6 co zwiększa prawdopodobieństwo powstania złogów lipidowych w wątrobie. W eksperymencie II, pstrągi potokowe wykazywały niższe wartości indeksu hepatosomatycznego we wszystkich grupach z udziałem BSFM, jednak indeks wiscerosomatyczny był wyższy w grupach z 5 i 10% udziałem tej mączki. Wyniki te są zgodne z pracą Stenberg i in. (2019), a powodem rosnących wartości może być obecność tłuszczu okołonarządowego. W eksperymentach III i IV nie obserwowano istotnego

wpływu zastosowania w paszach mączek z owadów na wskaźniki organosomatyczne i jelitowe. Warto również podkreślić, że ze względu na możliwość wystąpienia zaburzeń metabolicznych powodowanych przez obecność węglowodanów i lipidów, a także obecność lipidów utlenionych czy niedoboru witamin rozpuszczalnych w tłuszczach, indeks hepatosomatyczny nie powinien przekraczać 1-2% (Munshi i Dutta, 2017). Z drugiej strony, doświadczenie Hoffmann i in. (2021a) wskazuje, że nawet bardzo wysoki indeks hepatosomatyczny może nie mieć wpływu na strukturę wątroby, której budowa histomorfologiczna pozostaje prawidłowa.

Jednym z ważniejszych elementów wyjaśniających mechanizm działania czynników alimentarnych jest zarówno budowa makroskopowa przewodu pokarmowego, jak również jego charakterystyka histomorfologiczna. W eksperymencie I stwierdzono, że zastosowane w paszach hydrolizowane mączki z owadów nie wpłynęły na wysokość i szerokość kosmków jelitowych, ich powierzchnię, ani grubość warstwy mięśniowej jelit. Potencjalnie troć wędrowna będąca gatunkiem dzikim może charakteryzować się wyższą tolerancją na materiały paszowe pochodzące z owadów niż w przypadku hodowlanego łososia atlantyckiego w pozostałych omawianych pracach. W przypadku troci dzikożyjących nawet 70-90% ich naturalnej diety mogą stanowić muchówki, głównie z rodzin ochotkowatych (*Chironomidae*) i wujkowatych (*Empididae*) (Lyse i in., 1998). W eksperymencie III, nie stwierdzono wpływu zastosowanych diet z udziałem mączek z owadów na analizowane parametry histomorfometryczne, ani też na oceniane indeksy jelitowe. Również w eksperymencie IV, z wykorzystaniem młodocianych osobników łososia atlantyckiego odnotowano brak różnic pomiędzy grupami w przypadku indeksów jelitowych. Niemniej jednak, pomimo braku istotnych statystycznie różnic zaobserwowano numeryczny wzrost PL/FTL kosztem DL/FTL. Ponieważ aktywność enzymów jest najwyższa w bliższej części jelita, efekt ten można uznać za pozytywny ze względu na prawdopodobieństwo bardziej efektywnego trawienia (Krogdahl i in., 2015). W przypadku jelita proksymalnego, w prezentowanym doświadczeniu, w grupach z wykorzystaniem BSFM na poziomie 5 i 15% zaobserwowano obniżenie wysokości kosmków jelitowych. Według Renna i in. (2017), włączenie do diet częściowo odtłuszczonej mączki BSF (nawet do 40%) nie wywoływało zmian morfologicznych w jelitach pstrąga tęczowego. Z drugiej strony Dumas i in. (2018) obserwowali zmniejszenie wysokości kosmków w jelicie proksymalnym w grupie z 26% udziałem mączki BSF. Równocześnie efekt ten przejawiał się we wzroście ryb – grupa z najwyższym włączeniem BSFM charakteryzowała się również obniżonym BWG. Jest

to zgodne z obserwacjami, że zmiany w strukturze kosmków jelitowych mogą prowadzić do pogorszenia wchłaniania składników pokarmowych (English i in., 2021). Niemniej jednak taki efekt nie był obserwowany w opisywanym cyklu badawczym. W dystalnej części jelita szerokość kosmków była większa w grupie BSFM5. Pozostałe grupy nie różniły się od grupy kontrolnej, jednakże zaobserwowano numeryczny wzrost szerokości kosmków. Wspomniana praca Dumas i in. (2018) nie stwierdza wpływu włączenia BSFM do diet pstrągów tęczowych na strukturę jelita dystalnego. Według Egertona i in. (2020) większe kosmki (również pod kątem ich szerokości), co odnotowano w eksperymencie IV, są równoznaczne z większymi enterocytami lub wzrostem ich liczebności, co z kolei zapewnia zwiększenie powierzchni wchłaniania składników odżywczych oraz metabolitów.

Mikrobiom jelitowy ryb przeanalizowano w przypadku dwóch doświadczeń: eksperymentu I, z zastosowaniem hydrolizowanych mączek z mącznika młynarka i drewnojada w dietach dla troci wędrownej oraz eksperymentu II z wykorzystaniem BSFM w żywieniu pstrąga potokowego. W przypadku pierwszej pracy, stwierdzono, że zastosowanie hydrolizowanych mączek z wybranych gatunków owadów – mącznika młynarka oraz drewnojada moduluje mikrobiom przewodu pokarmowego ryb. Odnotowano obniżenie koncentracji *Carnobacterium* spp. oraz grupy *Lactobacillus* u ryb żywionych paszą z udziałem hydrolizowanej mączki z mącznika młynarka. Wpływ ten może potencjalnie zwiększyć szansę na proliferację bakterii chorobotwórczych i dalszą nierównowagę mikroflory. Wynika to z faktu, iż obie te grupy zaliczają się do bakterii potencjalnie probiotycznych. Inaczej sytuacja ta wygląda w przypadku pasz z udziałem hydrolizowanej mączki z drewnojada, gdzie nie tylko nie zaobserwowano wpływu czynnika żywieniowego na populację grupy *Lactobacillus* spp., lecz również odnotowano obniżenie koncentracji *Aeromonas* spp. i *Enterococcus* spp. Redukcja *Aeromonas* spp. to jednoznacznie pozytywna zmiana, ponieważ rodzaj ten obejmuje bakterie chorobotwórcze i oportunistyczne, takie jak *A. hydrophila* czy *A. salmonicida*, które mogą wytwarzać cytotoksyny, enterotoksyny i endotoksyny negatywnie oddziałujące na funkcje bariery jelitowej (Karataş Düğenci i in., 2003; Ringø i in., 2004). Podobna sytuacja obserwowana jest dla *Enterococcus* spp. Pomimo faktu, że wiele bakterii należących do tego rodzaju wykazuje właściwości probiotyczne, większość z nich przejawia także działanie potencjalnie patogenne, co może prowadzić do zasiedlenia tkanek gospodarza i przemieszczania się przez komórki nabłonkowe (Araujo i in., 2015). Populacja bakterii z rodzaju *Bacillus* nie ulegała wpływowi czynnika żywieniowego.

Utrzymanie frekwencji występowania tej grupy można rozpatrywać jako efekt pozytywny ponieważ posiadają one zdolność do produkcji metabolitów, takich jak kwas octowy, kwas mlekowy i bakteriocyny, co potencjalnie wpływa na poprawę zdrowia ryb (Ramesh i in., 2015; Thankappan i in., 2015). W przypadku eksperymentu II nie odnotowano istotnych statystycznie różnic pomiędzy grupami pod kątem składu mikrobioty jelitowej. Według pracy Rimoldi i in. (2019) w przypadku pstrąga tęczowego żywnego paszą z udziałem BSFM wykazano zmniejszenie koncentracji bakterii potencjalnie patogennych np. *Aeromonas* i *Citrobacter*, jednocześnie nie odnotowując wpływu na grupy *Lactobacillus* lub *Enterococcus*. W badaniu Józefiak i in. (2019) udział mączek z owadów na poziomie 20% diety powodował zwiększenie liczby bakterii *Lactobacillus* sp./*Enterococcus* sp., jednak odnotowano również wyższą koncentrację *Clostridium coccoides*. Co istotne, jakość mikrobiologiczna larw owadów jest zależna od substratu, na którym żerowały, co może mieć kluczowe znaczenie, ze względu na produkowane metabolity bakteryjne oraz ekspresje bakteriocyn (Osimani i in., 2019). Pozytywny wpływ diet z udziałem drewnojada na mikrobiom przewodu pokarmowego troci wędrównej może mieć swoje potwierdzenie w niezachwianej budowie mikrostruktur jelit.

W eksperymentach I (Mikołajczak i in., 2020) oraz II (Mikołajczak i in., 2022) analizie poddano surowicę krwi ryb żywnych dietami z udziałem mączek z owadów. Nie zaobserwowano istotnych statystycznie różnic w przypadku stężenia aminotransferazy alaninowej we krwi. Dodatkowo, w obydwu doświadczeniach odnotowano wyższe wartości aminotransferazy asparaginowej – w grupie z udziałem hydrolizowanej mączki z drewnojada w przypadku eksperymentu I oraz w grupach z 10 i 20% udziałem BSFM w przypadku eksperymentu II. Wymienione aminotransferazy stanowią markery kondycji wątroby, a jakakolwiek degradacja tego organu prowadzić będzie do wzrostu ich stężenia (Reddy i Singh, 2011). Odnotowany wzrost stężenia może mieć związek z opisanymi wcześniej wyższymi wynikami indeksów hepatosomatycznego i wiscerosomatycznego, a także wspomnianą wysoką zawartością kwasu palmitynowego w hydrolizowanej mączce z drewnojada. W tej samej grupie zaobserwowano niższe stężenie fosfatazy alkalicznej, enzymu obecnego w błonie prawie wszystkich komórek zwierzęcych, którego aktywność związana jest z ich uszkodzeniem (Agrahari i in., 2007; Villanueva i in., 1997). Obserwowane wartości mogą świadczyć o zachowaniu homeostazy komórkowej oraz mieć związek z numerycznymi różnicami we względnych przyrostach masy ryb, co wcześniej sugerowano w badaniach

przeprowadzonych na dorszu atlantyckim (*Gadus morhua*) (Lemieux i in., 1999). Zawartość białka całkowitego we krwi, która uznawana jest za wskaźnik odżywienia (McCarthy i in., 1973), nie wykazywała istotnych różnic pomiędzy grupami w przypadku obu doświadczeń. Według pracy Panettieri i in. (2020) wahania w całkowitej zawartości białka w surowicy krwi ryb mogą wynikać z szeregu zmian fizjologicznych, m.in. uszkodzeń tkanek, różnic w objętości krwi i osocza, uwodnienia czy też odpowiedzi organizmu na warunki stresowe. Efektów tych nie obserwowano jednak w prezentowanych badaniach własnych. Odnotowano wyższy poziom albumin w przypadku ryb żywionych paszami z udziałem hydrolizowanych mączek z owadów. W przypadku eksperymentu II grupa z 20% udziałem BSFM prezentowała niższe od pozostałych grup wyniki tego parametru. Według danych literaturowych, dojrzały łosoś atlantycki charakteryzuje się poziomem albumin równym 40% białka w surowicy krwi (Gopal i in., 1997). Poziom ten nie został odzwierciedlony w niniejszych badaniach i należy podkreślić, że w literaturze naukowej brakuje danych dla narybku i osobników młodocianych. We wcześniejszych pracach próbowano również ustalić prawidłowe wartości parametrów krwi u zdrowego łososia atlantyckiego i bazując na tych informacjach poziom albumin powinien oscylować między 18 a 24 g/L, jednak wartości te mogą zmieniać się sezonowo i również dotyczą jedynie ryb dojrzałych (Sandnes i in., 1988). Podwyższony poziom cholesterolu obserwowano w przypadku grup żywionych paszami z udziałem hydrolizowanych mączek z owadów w eksperymencie I oraz grup z 10 i 20% udziałem BSFM w eksperymencie II. Literatura naukowa nie wskazuje jednoznacznie czy wysoki poziom cholesterolu w surowicy krwi ryb jest efektem pozytywnym czy negatywnym. Część prac naukowych sugeruje, że włączenie BSFM w diety różnych gatunków ryb nie wpływa na zawartość cholesterolu całkowitego czy trójglicerydów (Belghit i in., 2019a; Cardinaletti i in., 2019; Zhou i in., 2018). Z kolei inne badania wskazują, że dodatek mączki z owadów może prowadzić do obniżenia poziomu tych substancji (Khosravi i in., 2018; Wang i in., 2019). Należy jednak podkreślić, że obecność cholesterolu we krwi może odgrywać ważną rolę w układzie odpornościowym ryb, co sugerowano wcześniej w badaniach z wykorzystaniem pstrąga tęczowego (Deng i in., 2013). Ponadto, niższe wartości trójglicerydów mogą być związane z występowaniem chityny w paszach zawierających mączki z owadów oraz jej potencjałem do wiązania kwasów żółciowych i wolnych kwasów tłuszczowych (Gasco i in., 2018). Dodatkowo, w doświadczeniu II zaobserwowano niższe stężenie gamma-glutamylotranspeptydazy (GGT) w grupie BSFL20, natomiast pozostałe grupy, w tym



kontrolna, nie różniły się od siebie. Aktywność enzymatyczna GGT obserwowana jest przede wszystkim w komórkach wątroby, a według Kumara i in. (2017) wyższe wartości mogą być związane z jej niewydolnością. Wyższy udział BSFM w paszy zadziałał w tym przypadku pozytywnie.

Przedstawiony cykl badawczy obejmuje kompleksowe wyniki badań dotyczące zastosowania mączek z różnych gatunków owadów (mącznika młynarka, drewnojada oraz *Hermetia illucens*) w żywieniu trzech gatunków ryb łososiowatych (troci wędrowniej, pstrąga potokowego oraz łososia atlantyckiego). Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że mączki z owadów posiadają potencjał jako częściowy zamiennik mączki rybnej. Bazując na uzyskanych danych, możliwe jest zastosowanie hydrolizowanych mączek z mącznika młynarka i drewnojada w paszach dla narybku troci wędrowniej w udziale do 10%. Również możliwe jest użycie pełnotłustych mączek z *Hermetia illucens* w paszach przeznaczonych dla pstrąga potokowego (w ilości do 20% paszy) i łososia atlantyckiego (do 10% paszy dla narybku oraz do 15% paszy dla osobników młodocianych). Co więcej, dowiedziono, że zastosowane w paszach mączki z owadów mogą modyfikować mikrobiom przewodu pokarmowego, wpływać na jego budowę histomorfometryczną, a także na biochemiczne parametry surowicy krwi u ryb łososiowatych. Zastosowanie pełnotłustej mączki z *Hermetia illucens* poprawiło zrównoważenie środowiskowe chowu ryb łososiowatych.

## 6. Stwierdzenia i wnioski

1. Wyniki przeprowadzonego cyklu badawczego potwierdziły wysoką przydatność mączek z biomasy larw owadów w żywieniu ryb łososiowatych, jako czynnika pozytywnie wpływającego na homeostazę i rozwój przewodu pokarmowego oraz zrównoważenie środowiskowe chowu.
2. Potwierdzono hipotezę 1, że mączki z biomasy larw owadów stanowią alternatywne źródło białka w dietach dla ryb łososiowatych:
  - 2.1. Zastosowanie w paszach hydrolizowanych mączek z mącznika młynarka oraz drewnojada na poziomie 10% nie wpłynęło negatywnie na wskaźniki odchowu oraz wykorzystanie pasz u narybku troci wędrownej.
  - 2.2. Udział pełnotłustej mączki z *Hermetia illucens* w paszy na poziomie 20% nie wpłynął negatywnie na wskaźniki odchowu oraz wykorzystanie pasz u narybku pstrąga potokowego.
  - 2.3. Optymalny udział pełnotłustej mączki z *Hermetia illucens* w paszach dla łososi atlantyckich wyniósł: do 10% dla narybku oraz do 15% dla osobników młodocianych.
3. Potwierdzono hipotezę 2, że wykorzystanie w paszach pełnotłustej mączki z *Hermetia illucens* zwiększa zrównoważenie środowiskowe chowu ryb łososiowatych.
4. Potwierdzono hipotezę 3, że częściowe zastąpienie mączki rybnej mączkami z owadów nie wpływa negatywnie na wykorzystanie pasz oraz wyniki odchowu i status nutrifizjologiczny ryb łososiowatych:
  - 4.1. Odnotowano wysokie wartości współczynników strawności białka ogólnego i tłuszczu surowego u ryb łososiowatych żywionych paszami z udziałem pełnotłustej mączki z *Hermetia illucens*.
  - 4.2. Zastosowanie pełnotłustych mączek z biomasy larw owadów w paszach nie zaburza mikrostruktury przewodu pokarmowego narybku ryb łososiowatych.
  - 4.3. Stwierdzono pozytywny wpływ zastosowania hydrolizowanej mączki z drewnojada w paszy na mikrobiom przewodu pokarmowego u narybku troci wędrownej.

## 7. Literatura:

1. Agrahari S., Pandey K. C., Gopal K. (2007) Biochemical alteration induced by monocrotophos in the blood plasma of fish, *Channa punctatus* (Bloch). *Pesticide Biochemistry and Physiology* 88 (3): 268-272.
2. Akpodiete O. J., Ologhobo A. D., Onifade A. A. (1998) Maggot meal as a substitute for fish meal in laying chicken diet. *Ghana Journal of Agricultural Science*, 31(2): 137-142.
3. Allan G. L., Rowland S. J., Parkinson S., Stone D. A., Jantrarotai W. (1999) Nutrient digestibility for juvenile silver perch *Bidyanus bidyanus*: development of methods. *Aquaculture*, 170(2): 131-145.
4. AOAC, Association of Official Agricultural Chemists (2005) Official Methods of Analysis. AOAC, Arlington, VA, USA.
5. Araujo C., Munoz-Atienza E., Hernandez P. E., Herranz C., Cintas L. M., Igrejas G., Poeta P. (2015) Evaluation of *Enterococcus* spp. from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum), feed, and rearing environment against fish pathogens. *Foodborne Pathogens and Disease*, 12(4): 311-322.
6. Ardebili A. T., Rickertsen, K. (2020) Personality traits, knowledge, and consumer acceptance of genetically modified plant and animal products. *Food Quality and Preference*, 80, 103825.
7. Ballitoc D. A., Sun S. (2013) Ground yellow mealworms (*Tenebrio molitor* L.) feed supplementation improves growth performance and carcass yield characteristics in broilers. *Open Science Repository Agriculture*, 18, e23050425.
8. Bazoche P., Poret S. (2016) What do trout eat: Acceptance of insects in animal feed. *J. Recherche Sci. Soc*, 1-14.
9. Belforti M., Gai F., Lussiana C., Renna M., Malfatto V., Rotolo L., Schiavone A., Zoccarato I., Gasco L. (2015) *Tenebrio molitor* meal in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) diets: effects on animal performance, nutrient digestibility and chemical composition of fillets. *Italian Journal of Animal Science*, 14(4): 4170.
10. Belghit I., Liland N. S., Gjerdal P., Biancarosa I., Menchetti E., Li Y., Waagbo R., Krogdahl A., Lock E. J. (2019a) Black soldier fly larvae meal can replace fish meal in diets of sea-water phase Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture*, 503: 609-619.
11. Belghit I., Liland N. S., Waagbø R., Biancarosa I., Pelusio N., Li Y., Krogdahl A., Lock E. J. (2018) Potential of insect-based diets for Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture*, 491: 72-81.

12. Belghit I., Waagbø R., Lock E. J., Liland N. S. (2019b) Insect-based diets high in lauric acid reduce liver lipids in freshwater Atlantic salmon. *Aquaculture Nutrition*, 25(2): 343-357.
13. Benzertiha A., Kierończyk B., Rawski M., Józefiak A., Kozłowski K., Jankowski J., Józefiak D. (2019) *Tenebrio molitor* and *Zophobas morio* full-fat meals in broiler chicken diets: Effects on nutrients digestibility, digestive enzyme activities, and cecal microbiome. *Animals*, 9(12): 1128.
14. Biancarosa I., Sele V., Belghit I., Ørnsrud R., Lock E. J., Amlund H. (2019) Replacing fish meal with insect meal in the diet of Atlantic salmon (*Salmo salar*) does not impact the amount of contaminants in the feed and it lowers accumulation of arsenic in the fillet. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 36(8): 1191-1205.
15. Bovera F., Piccolo G., Gasco L., Marono S., Loponte R., Vassalotti G., Mastellone V., Lombardi P., Attia Y. A., Nizza A. (2015) Yellow mealworm larvae (*Tenebrio molitor*, L.) as a possible alternative to soybean meal in broiler diets. *British poultry science*, 56(5), 569-575.
16. 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.
17. Bukkens S. G. (1997) The nutritional value of edible insects. *Ecology of Food and Nutrition*, 36(2-4), 287-319.
18. Cadag M. T., Lopez P. L., Mania R. P. (1981) Production and evaluation of maggot meal from common housefly (*Musca domestica*) as animal feed. *Philippine Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 7(1): 40-41.
19. Cardinaletti G., Randazzo B., Messina M., Zarantoniello M., Giorgini E., Zimbelli A., Bruni L., Parisi G., Olivotto I., Tulli F. (2019) Effects of graded dietary inclusion level of full-fat *Hermetia illucens* prepupae meal in practical diets for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Animals*, 9(5): 251.
20. Cha S. H., Lee J. S., Song C. B., Lee K. J., Jeon Y. J. (2008) Effects of chitosan-coated diet on improving water quality and innate immunity in the olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture*, 278(1-4): 110-118.
21. National Research Council (NRC). (2011) Nutrient Requirements of Fish and Shrimp. Washington, DC: The National Academies Press.
22. Das H. K., Hattula M. T., Myllymäki O. M., Mälkki Y. (1993) Effects of

formulation and processing variables on dry fish feed pellets containing fish waste. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 61(2): 181-187.

23. Deng J., Kang B., Tao L., Rong H., Zhang X. (2013) Effects of dietary cholesterol on antioxidant capacity, non-specific immune response, and resistance to *Aeromonas hydrophila* in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed soybean meal-based diets. *Fish & shellfish immunology*, 34(1): 324-331.
24. Dietz C., Liebert F. (2018) Does graded substitution of soy protein concentrate by an insect meal respond on growth and N-utilization in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)? *Aquaculture reports*, 12: 43-48.
25. Doğankaya L. (2017) Effects of fish meal substitution with super worm (*Zophobas morio*) meal on growth performance of rainbow trout fingerlings. *Aquatic Sciences and Engineering*, 32(1): 1-7.
26. Dumas A., Raggi T., Barkhouse J., Lewis E., Weltzien E. (2018) The oil fraction and partially defatted meal of black soldier fly larvae (*Hermetia illucens*) affect differently growth performance, feed efficiency, nutrient deposition, blood glucose and lipid digestibility of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 492: 24-34.
27. Egerton S., Wan A., Murphy K., Collins F., Ahern G., Sugrue I., Busca K., Egan F., Muller N., Whooley J., McGinnity P., Culloty S., Ross R. P., Stanton C. (2020) Replacing fishmeal with plant protein in Atlantic salmon (*Salmo salar*) diets by supplementation with fish protein hydrolysate. *Scientific reports*, 10(1): 4194.
28. English G., Wanger G., Colombo S. M. (2021) A review of advancements in black soldier fly (*Hermetia illucens*) production for dietary inclusion in salmonid feeds. *Journal of Agriculture and Food Research*, 5: 100164.
29. Esteban M. A., Cuesta A., Ortuno J., Meseguer J. (2001) Immunomodulatory effects of dietary intake of chitin on gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) innate immune system. *Fish & shellfish immunology*, 11(4): 303-315.
30. FAO (2018) Oilseeds, oils & meals. In Proceedings of the Monthly Price and Policy Update, Rome, Italy.
31. FAO (2020). The State of Food and Agriculture 2020. Overcoming water challenges in agriculture. Rome. <https://doi.org/10.4060/cb1447en>.
32. FAO (2022) The State of World Fisheries and Aquaculture 2022. Towards Blue Transformation. Rome, FAO. <https://doi.org/10.4060/cc0461en>.
33. Finke M. D. (2007) Estimate of chitin in raw whole insects. *Zoo biology*: published in affiliation with the American zoo and aquarium association, 26(2): 105-115.

34. Finke M. D. (2013) Complete nutrient content of four species of feeder insects. *Zoo biology*, 32(1): 27-36.
35. Fisher H. J., Collins S. A., Hanson C., Mason B., Colombo S. M., Anderson D. M. (2020) Black soldier fly larvae meal as a protein source in low fish meal diets for Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture*, 521: 734978.
36. Foley J. A., Ramankutty N., Brauman K. A., Cassidy E. S., Gerber J. S., Johnson M., Zaks D. M. (2011) Solutions for a cultivated planet. *Nature*: 478.
37. Free C. M., Thorson J. T., Pinsky M. L., Oken K. L., Wiedenmann J., Jensen O. P. (2019) Impacts of historical warming on marine fisheries production. *Science*, 363(6430): 979-983.
38. Fry J. P., Love D. C., MacDonald G. K., West P. C., Engstrom P. M., Nachman K. E., Lawrence R. S. (2016) Environmental health impacts of feeding crops to farmed fish. *Environment international*, 91: 201-214.
39. Gasco L., Belforti M., Rotolo L., Lussiana C., Parisi G., Terova G., Roncarati A. Gai F. (2014) Mealworm (*Tenebrio molitor*) as a potential ingredient in practical diets for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). In Abstract book conference “insects to feed The world” The Netherlands (Vol. 14, p. 17).
40. Gasco L., Finke M., Van Huis A. (2018) Can diets containing insects promote animal health? *Journal of Insects as Food and Feed*, 4(1): 1-4.
41. Gasco L., Henry M., Piccolo G., Marono S., Gai F., Renna M., Lussiana C., Antonopoulou E., Mola P., Chatzifotis S. (2016) *Tenebrio molitor* meal in diets for European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) juveniles: growth performance, whole body composition and in vivo apparent digestibility. *Animal Feed Science and Technology*, 220: 34-45.
42. Ghamkhar R., Hicks A. (2020) Comparative environmental impact assessment of aquafeed production: Sustainability implications of forage fish meal and oil free diets. *Resources, Conservation and Recycling*, 161, 104849.
43. Gopal V., Parvathy S., Balasubramanian P. R. (1997) Effect of heavy metals on the blood protein biochemistry of the fish *Cyprinus carpio* and its use as a bio-indicator of pollution stress. *Environmental monitoring and assessment*, 48: 117-124.
44. Halloran A., Hansen H. H., Jensen L. S., Bruun S. (2018). Comparing environmental impacts from insects for feed and food as an alternative to animal production. *Edible insects in sustainable food systems*, 163-180.
45. Hardy R. W. (1996). Alternate protein sources for salmon and trout diets. *Animal*

*Feed Science and Technology*, 59(1-3): 71-80.

46. Hardy R. W. (2010). Utilization of plant proteins in fish diets: effects of global demand and supplies of fishmeal. *Aquaculture research*, 41(5): 770-776.
47. Harper, J.M. (1994) *The Technology of Extrusion Cooking*; Frame, N., Ed.; Blackie Academic & Professional: London, UK.
48. Henry M., Gasco L., Piccolo G., Fountoulaki E. (2015) Review on the use of insects in the diet of farmed fish: past and future. *Animal Feed Science and Technology*, 203: 1-22.
49. Hodar A. R., Vasava R. J., Mahavadiya D. R., Joshi N. H. (2020) Fish meal and fish oil replacement for aqua feed formulation by using alternative sources: A review. *J. Exp. Zool. India*, 23(1): 13-21.
50. Hoffmann L., Rawski M., Nogales-Mérida S., Kołodziejcki P., Pruszyńska-Oszmałek E., Mazurkiewicz J. (2021a) Mealworm meal use in sea trout (*Salmo trutta m. trutta*, L.) fingerling diets: effects on growth performance, histomorphology of the gastrointestinal tract and blood parameters. *Aquaculture Nutrition*, 27(5): 1512-1528.
51. Hoffmann L., Rawski M., Nogales-Merida S., Mazurkiewicz J. (2020) Dietary inclusion of *Tenebrio molitor* meal in sea trout larvae rearing: Effects on fish growth performance, survival, condition, and GIT and liver enzymatic activity. *Annals of Animal Science*, 20(2): 579-598.
52. Hoffmann L., Rawski M., Pruszyńska-Oszmałek E., Kołodziejcki P., Mazurkiewicz J. (2021b) Environmentally sustainable feeding system for sea trout (*Salmo trutta m. trutta*): Live food and insect meal-based diets in larval rearing. *Aquaculture reports*, 21: 100795.
53. Holen M. M., Kent M. P., Vaaje-Kolstad G., Sandve S. R. (2022) Gene family expansion and functional diversification of chitinase and chitin synthase genes in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *BioRxiv*, 2022-05.
54. Hossain M. S., Fawole F. J., Labh S. N., Small B. C., Overturf K., Kumar V. (2021) Insect meal inclusion as a novel feed ingredient in soy-based diets improves performance of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 544: 737096.
55. Huang Y., Wen X., Li S., Li W., Zhu D. (2016) Effects of dietary lipid levels on growth, feed utilization, body composition, fatty acid profiles and antioxidant parameters of juvenile chu's croaker *Nibea coibor*. *Aquaculture international*, 24: 1229-1245.
56. Huber I., Spanggaard B., Appel K. F., Rossen L., Nielsen T., Gram L. (2004) Phylogenetic analysis and in situ identification of the intestinal microbial community of

rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). *Journal of applied microbiology*, 96(1): 117-132.

57. Irungu F. G., Mutungi C. M., Faraj A. K., Affognon H., Kibet N., Tanga C., Ekese S., Nakimbugwe D., Fiaboe K. K. M. (2018) Physico-chemical properties of extruded aquafeed pellets containing black soldier fly (*Hermetia illucens*) larvae and adult cricket (*Acheta domesticus*) meals. *Journal of Insects as Food and Feed*, 4(1): 19-30.

58. Jackson A. (2009) Fish in–fish out ratios explained. *Aquaculture Europe*, 34(3): 5-10.

59. Jannathulla R., Rajaram V., Kalanjiam R., Ambasankar K., Muralidhar M., Dayal J. S. (2019) Fishmeal availability in the scenarios of climate change: Inevitability of fishmeal replacement in aquafeeds and approaches for the utilization of plant protein sources. *Aquaculture Research*, 50(12): 3493-3506.

60. Janssen R. H., Vincken J. P., van den Broek L. A., Fogliano V., Lakemond C. M. (2017) Nitrogen-to-protein conversion factors for three edible insects: *Tenebrio molitor*, *Alphitobius diaperinus*, and *Hermetia illucens*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(11): 2275-2278.

61. Jayanegara A., Novandri B., Yantina N., Ridla M. (2017) Use of black soldier fly larvae (*Hermetia illucens*) to substitute soybean meal in ruminant diet: An in vitro rumen fermentation study. *Veterinary world*, 10(12): 1439.

62. Józefiak A., Nogales-Mérida S., Mikołajczak Z., Rawski M., Kierończyk B., Mazurkiewicz J. (2019) The Utilization of Full-Fat Insect Meal in Rainbow Trout Nutrition: The Effects on Growth Performance, Intestinal Microbiota and Gastrointestinal Tract Histomorphology. *Annals of Animal Science*, 19(3): 747-765.

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

64. Kannadhason S., Muthukumarappan K., Rosentrater K. A. (2009) Effects of ingredients and extrusion parameters on aquafeeds containing DDGS and tapioca starch. *Journal of Aquaculture Feed Science and Nutrition*, 1(1): 6-21.

65. Düğenci S. K., Candan A. (2003) Isolation of *Aeromonas* strains from the intestinal flora of Atlantic Salmon (*Salmo Salar* L. 1758). *Turkish Journal of Veterinary & Animal Sciences*, 27(5): 1071-1075.

66. Kawasaki K., Hashimoto Y., Hori A., Kawasaki T., Hirayasu H., Iwase S. I., Hashizume A., Ido A., Miura C., Miura T., Nakamura S., Seyama T., Matsumoto Y.,



- Kasai K., Fujitani, Y. (2019) Evaluation of black soldier fly (*Hermetia illucens*) larvae and pre-pupae raised on household organic waste, as potential ingredients for poultry feed. *Animals*, 9(3): 98.
67. Khosravi S., Kim E., Lee Y. S., Lee S. M. (2018) Dietary inclusion of mealworm (*Tenebrio molitor*) meal as an alternative protein source in practical diets for juvenile rockfish (*Sebastes schlegeli*). *Entomological Research*, 48(3): 214-221.
68. Kierończyk B., Rawski M., Józefiak A., Mazurkiewicz J., Świątkiewicz S., Siwek M., Siwek M., Bednarczyk M., Szumacher-Strabel M., Cieślak A., Benzertiha A., Józefiak D. (2018) Effects of replacing soybean oil with selected insect fats on broilers. *Animal Feed Science and Technology*, 240: 170-183.
69. Kierończyk B., Sypniewski J., Mikołajczak Z., Rawski M., Pruszyńska-Oszmałek E., Sassek M., Kołodziejcki P., Józefiak D. (2022) Replacement of soybean oil with cold-extracted fat from *Hermetia illucens* in young turkey diets: Effects on performance, nutrient digestibility, selected organ measurements, meat and liver tissue traits, intestinal microbiota modulation, and physiological and immunological status. *Animal Feed Science and Technology*, 286: 115210.
70. Kierończyk B., Sypniewski J., Rawski M., Czekala W., Świątkiewicz S., Józefiak D. (2020) From waste to sustainable feed material: the effect of *Hermetia illucens* oil on the growth performance, nutrient digestibility, and gastrointestinal tract morphometry of broiler chickens. *Annals of Animal Science*, 20(1): 157-177.
71. Kokou F., Fountoulaki E. (2018) Aquaculture waste production associated with antinutrient presence in common fish feed plant ingredients. *Aquaculture*, 495: 295-310.
72. Kołodziejcki P. A., Pruszyńska-Oszmałek E., Strowski M. Z., Nowak K. W. (2017) Long-term obestatin treatment of mice type 2 diabetes increases insulin sensitivity and improves liver function. *Endocrine*, 56: 538-550.
73. Kolodziejcki P. A., Sassek M., Chalupka D., Leciejewska N., Nogowski L., Mackowiak P., Jozefiak D., Stadnicka K., Siwek M., Bednarczyk M., Szawackowski T., Pruszyńska-Oszmałek E. (2018) GLP1 and GIP are involved in the action of synbiotics in broiler chickens. *Journal of animal science and biotechnology*, 9(1): 1-9.
74. Kowalska A., Zakęś Z., Siwicki A. K., Jankowska B., Jarmołowicz S., Demska-Zakęś K. (2012) Impact of diets with different proportions of linseed and sunflower oils on the growth, liver histology, immunological and chemical blood parameters, and proximate composition of pikeperch *Sander lucioperca* (L.). *Fish physiology and biochemistry*, 38: 375-388.

75. Krogdahl Å., Sundby A., Holm H. (2015) Characteristics of digestive processes in Atlantic salmon (*Salmo salar*). Enzyme pH optima, chyme pH, and enzyme activities. *Aquaculture*, 449: 27-36.
76. Kumar N., Krishnani K. K., Gupta S. K., Singh N. P. (2017) Cellular stress and histopathological tools used as biomarkers in *Oreochromis mossambicus* for assessing metal contamination. *Environmental toxicology and pharmacology*, 49: 137-147.
77. La'Toya V. L., Toddes B. D., Wyre N. R., Brown D. C., Michel K. E., Briscoe J. A. (2017) Effects of various diets on the calcium and phosphorus composition of mealworms (*Tenebrio molitor* larvae) and superworms (*Zophobas morio* larvae). *American journal of veterinary research*, 78(2): 178-185.
78. Laureati M., Proserpio C., Jucker C., Savoldelli S. (2016) New Sustainable Protein Sources: Consumers' Willingness to Adopt Insects as Feed and Food." *Italian Journal of Food Science*, 28(4).
79. Lazzarotto V., Corraze G., Leprevost A., Quillet E., Dupont-Nivet M., Médale F. (2015) Three-year breeding cycle of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed a plant-based diet, totally free of marine resources: consequences for reproduction, fatty acid composition and progeny survival. *PloS one*, 10(2): e0117609.
80. Lemieux H., Blier P., Dutil J. D. (1999) Do digestive enzymes set a physiological limit on growth rate and food conversion efficiency in the Atlantic cod (*Gadus morhua*)? *Fish Physiology and Biochemistry*, 20: 293-303.
81. Liu K., Frost J., Welker T. L., Barrows F. T. (2021) Comparison of new and conventional processing methods for their effects on physical properties of fish feed. *Animal Feed Science and Technology*, 273: 114818.
82. Lyse A. A., Stefánsson S. O., Fernö A. (1998) Behaviour and diet of sea trout post-smolts in a Norwegian fjord system. *Journal of Fish Biology*, 52(5): 923-936.
83. Jabir M. A. R., Jabir S. A. R., Vikineswary S. (2012) Nutritive potential and utilization of super worm (*Zophobas morio*) meal in the diet of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) juvenile. *African Journal of Biotechnology*, 11(24): 6592-6598.
84. Magalhães R., Sánchez-López A., Leal R. S., Martínez-Llorens S., Oliva-Teles A., Peres H. (2017) Black soldier fly (*Hermetia illucens*) pre-pupae meal as a fish meal replacement in diets for European seabass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture*, 476: 79-85.
85. Makkar H. P., Tran G., Heuzé V., Ankers P. (2014) State-of-the-art on use of insects as animal feed. *Animal feed science and technology*, 197: 1-33.

86. Mancuso T., Baldi L., Gasco L. (2016) An empirical study on consumer acceptance of farmed fish fed on insect meals: The Italian case. *Aquaculture international*, 24: 1489-1507.
87. Marono S., Piccolo G., Loponte R., Di Meo C., 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(3): 3889.
88. Martínez-Alvarez O., Chamorro S., Brenes A. (2015) Protein hydrolysates from animal processing by-products as a source of bioactive molecules with interest in animal feeding: A review. *Food Research International*, 73: 204-212.
89. McCarthy D. H., Stevenson J. P., Roberts M. S. (1973) Some blood parameters of the rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson) I. The Kamloops variety. *Journal of fish Biology*, 5(1): 1-8.
90. Mikołajczak Z., Rawski M., Mazurkiewicz J., Kierończyk B., Kołodziejski P., Pruszyńska-Oszmałek E., Józefiak D. (2022) The first insight into black soldier fly meal in brown trout nutrition as an environmentally sustainable fish meal replacement. *Animal*, 16(5): 100516.
91. Mikołajczak Z., Rawski M., Mazurkiewicz J., Kierończyk B., Józefiak D. (2020). The effect of hydrolyzed insect meals in sea trout fingerling (*Salmo trutta m. trutta*) diets on growth performance, microbiota and biochemical blood parameters. *Animals*, 10(6): 1031.
92. Mikołajczak Z., Mazurkiewicz J., Rawski M., Kierończyk B., Józefiak A., Świątkiewicz S., Józefiak D. (2023a). Black soldier fly full-fat meal in Atlantic salmon nutrition–Part A: Effects on growth performance, feed utilization, selected nutriphysiological traits and production sustainability in fries. *Annals of Animal Science*.
93. Mikołajczak Z., Mazurkiewicz J., Rawski M., Kierończyk B., Józefiak A., Świątkiewicz S., Józefiak D. (2023b). Black soldier fly full-fat meal in Atlantic salmon nutrition–Part B: Effects on growth performance, feed utilization, selected nutriphysiological traits and production sustainability in pre-smolts. *Annals of Animal Science*.
94. Mulianda R., Harahap R. P., Laconi E. B., Ridla M., Jayanegara A. (2020) Nutritional evaluation of total mixed ration silages containing maggot (*Hermetia illucens*) as ruminant feeds. *J. Anim. Health Prod*, 8(3): 138-144.
95. Munshi J. S. Datta. Hiran M. Dutta. (2017) *Fish Morphology: Horizon of New*

*Research.*

96. Naylor R. L., Hardy R. W., Buschmann A. H., Bush S. R., Cao L., Klinger D. H., Little D. C., Lubchenco J., Shumway S. E., Troell, M. (2021) A 20-year retrospective review of global aquaculture. *Nature*, 591(7851): 551-563.
97. Ng W. K., Liew F. L., Ang L. P., Wong K. W. (2001) Potential of mealworm (*Tenebrio molitor*) as an alternative protein source in practical diets for African catfish, *Clarias gariepinus*. *Aquaculture Research*, 32: 273-280.
98. Olsen R. E., Suontama J., Langmyhr E., Mundheim H., Ringø E., Melle W., Malde M. K., Hemre G. I. (2006) The replacement of fish meal with Antarctic krill, *Euphausia superba* in diets for Atlantic salmon, *Salmo salar*. *Aquaculture Nutrition*, 12(4): 280-290.
99. Oonincx D. G. A. B., Finke M. D. (2021) Nutritional value of insects and ways to manipulate their composition. *Journal of Insects as Food and Feed*, 7(5): 639-659.
100. Osimani A., Milanović V., Roncolini A., Riolo P., Ruschioni S., Isidoro N., Loreto N., Franciosi E., Tuohy K., Olivotto I., Zarantonello M., Cardinali F., Garofalo C., Aquailanti L., Clementi, F. (2019) *Hermetia illucens* in diets for zebrafish (*Danio rerio*): A study of bacterial diversity by using PCR-DGGE and metagenomic sequencing. *PLoS One*, 14(12), e0225956.
101. Ovissipour M., Benjakul S., Safari R., Motamedzadegan A. (2010) Fish protein hydrolysates production from yellowfin tuna *Thunnus albacares* head using Alcalase and Protamex. *International Aquatic Research*, 2(2): 87.
102. Pahlow M., Van Oel P. R., Mekonnen M. M., Hoekstra A. Y. (2015) Increasing pressure on freshwater resources due to terrestrial feed ingredients for aquaculture production. *Science of the Total Environment*, 536: 847-857.
103. Panettieri V., Chatzifotis S., Messina C. M., Olivotto I., Manuguerra S., Randazzo B., Ariano A., Bovera F., Santulli A., Severino L., Piccolo, G. (2020) Honey bee pollen in meagre (*Argyrosomus regius*) juvenile diets: Effects on growth, diet digestibility, intestinal traits, and biochemical markers related to health and stress. *Animals*, 10(2), 231.
104. Piedecausa M. A., Mazón M. J., García B. G., Hernández M. D. (2007) Effects of total replacement of fish oil by vegetable oils in the diets of sharpsnout seabream (*Diplodus puntazzo*). *Aquaculture*, 263(1-4): 211-219.
105. Piedrahita R. H. (2003) Reducing the potential environmental impact of tank aquaculture effluents through intensification and recirculation. *Aquaculture*, 226(1-4): 35-44.
106. Popoff M., MacLeod M., Leschen W. (2017). Attitudes towards the use of insect-

derived materials in Scottish salmon feeds. *Journal of Insects as Food and Feed*, 3(2): 131-138.

107. Quang Tran H., Van Doan H., Stejskal V. (2022) Environmental consequences of using insect meal as an ingredient in aquafeeds: A systematic view. *Reviews in Aquaculture*, 14(1): 237-251.

108. Ramesh D., Vinothkanna A., Rai A. K., Vignesh V. S. (2015) Isolation of potential probiotic *Bacillus* spp. and assessment of their subcellular components to induce immune responses in *Labeo rohita* against *Aeromonas hydrophila*. *Fish & shellfish immunology*, 45(2): 268-276.

109. Ravzanaadii N., Kim S. H., Choi W. H., Hong S. J., Kim N. J. (2012) Nutritional value of mealworm, *Tenebrio molitor* as food source. *International Journal of Industrial Entomology*, 25(1): 93-98.

110. Rawski M., Kierończyk B., Długosz J., Świątkiewicz S., Józefiak D. (2016) Dietary probiotics affect gastrointestinal microbiota, histological structure and shell mineralization in turtles. *PLoS One*, 11(2): e0147859.

111. Rawski M., Kierończyk B., Świątkiewicz S., Józefiak D. (2018) Long-term study on single and multiple species probiotic preparations for Florida softshell turtle (*Apalone ferox*) nutrition. *Animal Science Papers & Reports*, 36(1).

112. Rawski M., Mazurkiewicz J., Kierończyk B., Józefiak D. (2020) Black soldier fly full-fat larvae meal as an alternative to fish meal and fish oil in Siberian sturgeon nutrition: The effects on physical properties of the feed, animal growth performance, and feed acceptance and utilization. *Animals*, 10(11): 2119.

113. Rawski M., Mazurkiewicz J., Kierończyk B., Józefiak D. (2021) Black soldier fly full-fat larvae meal is more profitable than fish meal and fish oil in siberian sturgeon farming: The effects on aquaculture sustainability, economy and fish gut development. *Animals*, 11(3): 604.

114. Reddy P. B., Singh R. K. (2011). Biomarker responses in fish exposed to industrial effluent. In *International Conference on Green technology and environmental Conservation* (GTEC-2011) (pp. 191-204). IEEE.

115. Renna M., Schiavone A., Gai F., Dabbou S., Lussiana C., Malfatto V., Prearo M., Capucchio M. T., Biasato I., Biasibetti E., De Marco M., Brugiapaglia A., Zoccarato I., Gasco, L. (2017) Evaluation of the suitability of a partially defatted black soldier fly (*Hermetia illucens* L.) larvae meal as ingredient for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) diets. *Journal of animal science and biotechnology*, 8(1): 1-13.

116. Rimoldi S., Gini E., Iannini F., Gasco L., Terova G. (2019). The effects of dietary insect meal from *Hermetia illucens* prepupae on autochthonous gut microbiota of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Animals*, 9(4): 143.
117. Ringø E., Jutfelt F., Kanapathippillai P., Bakken Y., Sundell K., Glette J., Mayhew T. M., Myklebust R., Olsen R. E. (2004) Damaging effect of the fish pathogen *Aeromonas salmonicida* ssp. *salmonicida* on intestinal enterocytes of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Cell and tissue research*, 318: 305-311.
118. Roncarati A., Gasco L., Parisi G., Terova G. (2015) Growth performance of common catfish (*Ameiurus melas* Raf.) fingerlings fed mealworm (*Tenebrio molitor*) diet. *Journal of Insects as Food and Feed*, 1(3): 233-240.
119. Salzman N. H., de Jong H., Paterson Y., Harmsen H. J., Welling G. W., Bos N. A. (2002) Analysis of 16S libraries of mouse gastrointestinal microflora reveals a large new group of mouse intestinal bacteria. *Microbiology*, 148(11): 3651-3660.
120. Sánchez-Muros M., De Haro C., Sanz A., Trenzado C. E., Villareces S., Barroso F. G. (2016) Nutritional evaluation of *Tenebrio molitor* meal as fishmeal substitute for tilapia (*Oreochromis niloticus*) diet. *Aquaculture Nutrition*, 22(5): 943-955.
121. Sandnes K., Lie Ø., Waagbø R. (1988) Normal ranges of some blood chemistry parameters in adult farmed Atlantic salmon, *Salmo salar*. *Journal of Fish Biology*, 32(1): 129-136.
122. Sanz A., De la Higuera M. (2000) Protein nutrition in fish: protein/energy ratio and alternative protein sources to fish meal. *Journal of Physiology and Biochemistry*, 56(3): 275-282.
123. Khater E. S. G., Bahnasawy A. H., Ali S. A. (2014) Physical and mechanical properties of fish feed pellets. *Journal of Food Processing & Technology*, 5(10): 1.
124. Sghir A., Gramet G., Suau A., Rochet V., Pochart P., Dore J. (2000) Quantification of bacterial groups within human fecal flora by oligonucleotide probe hybridization. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(5): 2263-2266.
125. Skřivanová E., Marounek M., Benda V., Březina P. (2006) Susceptibility of *Escherichia coli*, *Salmonella* sp and *Clostridium perfringens* to organic acids and monolaurin. *Veterinární medicína*.
126. Smetana S., Spykman R., Heinz V. (2021) Environmental aspects of insect mass production. *Journal of Insects as Food and Feed*, 7(5): 553-571.
127. Sobolewska A., Elminowska-Wenda G., Bogucka J., Dankowiakowska A., Kułakowska A., Szczerba A., Stadnicka K., Szpinda M., Bednarczyk M. (2017) The

influence of in ovo injection with the prebiotic DiNovo® on the development of histomorphological parameters of the duodenum, body mass and productivity in large-scale poultry production conditions. *Journal of animal science and biotechnology*, 8(1): 1-8.

128. Soon C. Y., Tee Y. B., Tan C. H., Rosnita A. T., Khalina A. (2018) Extraction and physicochemical characterization of chitin and chitosan from *Zophobas morio* larvae in varying sodium hydroxide concentration. *International Journal of Biological Macromolecules*, 108: 135-142.

129. Spranghers T., Ottoboni M., Klootwijk C., Obyn A., Deboosere S., De Meulenaer B., Michiels J., Eeckhout M., De Clercq P., De Smet S. (2017) Nutritional composition of black soldier fly (*Hermetia illucens*) prepupae reared on different organic waste substrates. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 97(8): 2594-2600.

130. 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.

131. Stejskal V., Tran H. Q., Prokesova M., Gebauer T., Giang P. T., Gai F., Gasco L. (2020) Partially defatted *Hermetia illucens* larva meal in diet of Eurasian perch (*Perca fluviatilis*) juveniles. *Animals*, 10(10): 1876.

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

133. Storebakken T. (2002) Atlantic salmon, *Salmo salar*. Nutrient requirements and feeding of finfish for aquaculture, 79-102.

134. Sypniewski J., Kierończyk B., Benzertiha A., Mikołajczak Z., Pruszyńska-Oszmałek E., Kołodziejcki P., Sassek M., Rawski M., Czekala W., Józefiak D. (2020) Replacement of soybean oil by *Hermetia illucens* fat in turkey nutrition: Effect on performance, digestibility, microbial community, immune and physiological status and final product quality. *British poultry science*, 61(3), 294-302.

135. Szendrő K., Nagy M. Z., Tóth K. (2020) Consumer acceptance of meat from animals reared on insect meal as feed. *Animals*, 10(8): 1312.

136. Terova G., Rimoldi S., Ascione C., Gini E., Ceccotti C., Gasco L. (2019) Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) gut microbiota is modulated by insect meal from *Hermetia illucens* prepupae in the diet. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 29: 465-486.

137. Thankappan B., Ramesh D., Ramkumar S., Natarajaseenivasan K., Anbarasu K. (2015) Characterization of *Bacillus* spp. from the gastrointestinal tract of *Labeo rohita*—towards to identify novel probiotics against fish pathogens. *Applied biochemistry and biotechnology*, 175: 340-353.
138. Tippayadara N., Dawood M. A., Krutmuang P., Hoseinifar S. H., Doan H. V., Paolucci M. (2021) Replacement of fish meal by Black soldier fly (*Hermetia illucens*) larvae meal: Effects on growth, haematology, and skin mucus immunity of Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Animals*, 11(1): 193.
139. Umar S., Kamarudin M. S., Ramezani-Fard E. (2013) Physical properties of extruded aquafeed with a combination of sago and tapioca starches at different moisture contents. *Animal Feed Science and Technology*, 183(1-2): 51-55.
140. Verbeke W., Spranghers T., De Clercq P., De Smet S., Sas B., Eeckhout M. (2015) Insects in animal feed: Acceptance and its determinants among farmers, agriculture sector stakeholders and citizens. *Animal Feed Science and Technology*, 204: 72-87.
141. Villanueva J., Vanacore R., Goicoechea O., Amthauer R. (1997) Intestinal alkaline phosphatase of the fish *Cyprinus carpio*: regional distribution and membrane association. *Journal of Experimental Zoology*, 279(4): 347-355.
142. Vogel H., Müller A., Heckel D. G., Gutzeit H., Vilcinskas A. (2018) Nutritional immunology: diversification and diet-dependent expression of antimicrobial peptides in the black soldier fly *Hermetia illucens*. *Developmental & Comparative Immunology*, 78: 141-148.
143. Waar K., Degener J. E., van Luyn M. J., Harmsen H. J. (2005) Fluorescent in situ hybridization with specific DNA probes offers adequate detection of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* in clinical samples. *Journal of Medical Microbiology*, 54(10): 937-944.
144. Wang D., Bai Y. Y., Li J. H., Zhang C. X. (2004) Nutritional value of the field cricket (*Gryllus testaceus* Walker). *Insect Science*, 11(4): 275-283.
145. Wang D., Zhai S. W., Zhang C. X., Bai Y. Y., An S. H., Xu Y. N. (2005) Evaluation on nutritional value of field crickets as a poultry feedstuff. *Asian-australasian journal of animal sciences*, 18(5): 667-670.
146. Wang G., Peng K., Hu J., Yi C., Chen X., Wu H., Huang Y. (2019). Evaluation of defatted black soldier fly (*Hermetia illucens* L.) larvae meal as an alternative protein ingredient for juvenile Japanese seabass (*Lateolabrax japonicus*) diets. *Aquaculture*, 507, 144-154.





147. Wang J., Wang Y., Dang X., Zheng X., Zhang W. (2013) Housefly larvae hydrolysate: orthogonal optimization of hydrolysis, antioxidant activity, amino acid composition and functional properties. *BMC Research Notes*, 6(1): 1-10.
148. Weththasinghe P., Hansen J. Ø., Nøklund D., Lagos L., Rawski M., Øverland M. (2021a) Full-fat black soldier fly larvae (*Hermetia illucens*) meal and paste in extruded diets for Atlantic salmon (*Salmo salar*): Effect on physical pellet quality, nutrient digestibility, nutrient utilization and growth performances. *Aquaculture*, 530, 735785.
149. Worm B., Hilborn R., Baum J. K., Branch T. A., Collie J. S., Costello C., Fogarty M. J., Fultron E. A., Hutchings J. A., Jennings S., Jensen O. P., Lotze H. K., Mace P. M., McClanahan T. R., Minto C., Palumbi S. R., Parma A. M., Ricard D., Rosenberg A. A., Zeller D. (2009) Rebuilding global fisheries. *Science*, 325(5940): 578-585.
150. Yazici M., Mazlum Y., Mehmet N. A. Z., Çiğdem Ü. R. K. Ü., Türkmen M., Akayli T. (2022) Effects of Adding Laurel (*Laurus nobilis*) Essential Oil to the Diet of Tilapia Fish on Growth and Intestinal Histology. *Aquatic Sciences and Engineering*, 37(4): 195-204.
151. Yu M., Li Z., Chen W., Rong T., Wang G., Ma X. (2019) *Hermetia illucens* larvae as a potential dietary protein source altered the microbiota and modulated mucosal immune status in the colon of finishing pigs. *Journal of animal science and biotechnology*, 10: 1-16.
152. Yu M., Li Z., Chen W., Wang G., Rong T., Liu Z., Wang F., Ma X. (2020) *Hermetia illucens* larvae as a fishmeal replacement alters intestinal specific bacterial populations and immune homeostasis in weanling piglets. *Journal of Animal Science*, 98(3): skz395.
153. Zheng K., Liang M., Yao H., Wang J., Chang Q. (2012) Effect of dietary fish protein hydrolysate on growth, feed utilization and IGF-I levels of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Aquaculture Nutrition*, 18(3): 297-303.
154. Zhou J. S., Liu S. S., Ji H., Yu H. B. (2018) Effect of replacing dietary fish meal with black soldier fly larvae meal on growth and fatty acid composition of Jian carp (*Cyprinus carpio* var. Jian). *Aquaculture nutrition*, 24(1): 424-433.
155. Zielińska E., Baraniak B., Karaś M., Rybczyńska K., Jakubczyk A. (2015) Selected species of edible insects as a source of nutrient composition. *Food Research International*, 77: 460-466.

**8. Kopie opublikowanych artykułów w ramach cyklu.**

Article

# The Effect of Hydrolyzed Insect Meals in Sea Trout Fingerling (*Salmo trutta m. trutta*) Diets on Growth Performance, Microbiota and Biochemical Blood Parameters

Zuzanna Mikołajczak <sup>1,\*</sup> , Mateusz Rawski <sup>2</sup>, Jan Mazurkiewicz <sup>2</sup>, Bartosz Kierończyk <sup>1</sup>  and Damian Józefiak <sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Department of Animal Nutrition, Poznań University of Life Sciences, Wołyńska 33, 60-637 Poznań, Poland; bartosz.kieronczyk@up.poznan.pl

<sup>2</sup> Institute of Zoology, Division of Inland Fisheries and Aquaculture, Poznań University of Life Sciences, Wojska Polskiego 71c, 60-625 Poznań, Poland; mateusz.rawski@up.poznan.pl (M.R.); jan.mazurkiewicz@up.poznan.pl (J.M.)

\* Correspondence: zuzanna.mikolajczak@up.poznan.pl (Z.M.); damian.jozefiak@up.poznan.pl (D.J.)

Received: 7 May 2020; Accepted: 9 June 2020; Published: 13 June 2020



**Simple Summary:** The replacement of fishmeal by environmentally sustainable alternative meals has been one of the targets in aquaculture in recent decades. A number of factors support the use of insect meals, as a group of products characterized by high crude protein and crude fat content, in fish nutrition. Insects are readily accepted by a number of fish species, and they are part of the natural diet of omnivorous and carnivorous species. The present study was conducted to evaluate the effects of hydrolyzed *Tenebrio molitor* and *Zophobas morio* meals as a partial replacement for fishmeal in sea trout (*Salmo trutta m. trutta*) diets on growth performance, feed utilization, organosomatic indices, serum biochemistry, gut histology, and microbiota. In the present study, insect meals inclusion did not cause any adverse impacts on growth performance, feed utilization or gut histomorphology. However, an effect on the organosomatic indices, serum biochemistry, and microbiota was observed. In conclusion, hydrolyzed *T. molitor* and *Z. morio* meals seem to be promising alternative protein sources for sea trout nutrition.

**Abstract:** The present study is the first introduction of hydrolyzed superworm meal in sea trout nutrition. It was conducted to evaluate the effects of inclusion in the diet of hydrolyzed insect meals as a partial replacement for fishmeal on growth performance, feed utilization, organosomatic indices, serum biochemical parameters, gut histomorphology, and microbiota composition of sea trout (*Salmo trutta m. trutta*). The experiment was performed on 225 sea trout fingerlings distributed into three groups (3 tanks/treatment, 25 fish/tank). The control diet was fishmeal-based. In the experimental groups, 10% of hydrolyzed mealworm (TMD) and superworm (ZMD) meals were included. The protein efficiency ratio was lower in the TMD and ZMD. Higher organosomatic indices and liver lipid contents were found in the group fed ZMD. The ZMD increased levels of aspartate aminotransferase, and decreased levels of alkaline phosphatase. The *Aeromonas* spp. and *Enterococcus* spp. populations decreased in the ZMD. The concentrations of the *Carnobacterium* spp. decreased in the ZMD and TMD, as did that of the *Lactobacillus* group in the TMD. In conclusion, insect meals may be an alternative protein source in sea trout nutrition, as they yield satisfying growth performance and have the capability to modulate biochemical blood parameters and microbiota composition.

**Keywords:** *Tenebrio molitor*; *Zophobas morio*; hydrolyzed insect meals; fish nutrition; fish health; blood biochemistry; microbiota; growth performance; feed efficiency

## 1. Introduction

The replacement of fishmeal (FM) by environmentally sustainable alternative protein sources has been one of the targets of aquaculture in recent decades [1]. Plant meals have been used as the main alternative; however, insect meals have recently emerged as one of the most promising components of fish nutrition [2–4]. This is caused by their high nutritive value—protein and fat content, anti-pathogenic and anti-inflammatory properties connected with antimicrobial peptides, and lauric acid and chitin presence—as well as their environmental sustainability due to their taking part in a circular economy and wide presence in the natural diets of many fish species [5,6]. Nevertheless, in the available literature, information about the effect of insect meals on growth performance, microbiota of the gastrointestinal tract, and blood biochemical parameters in salmonid fish is still scarce, and most of the research is focused only on salmon and rainbow trout [7–11].

One of the key factors that has caused increased interest in research for alternative feed materials is the growing price of FM and its harmful effects on the environment [12,13]. However, many alternatives can lead to secondary, adverse health effects—nutritional disorders and metabolic disturbances may be caused by the use of dietary plant meal, i.e., enteritis in the distal intestine, hypertrophic mucus production, a reduction in reproductive rates, high mortality or growth depression [14,15]. Another important source of protein—animal byproducts, such as blood meal, meat and bone meal, as well as feather meal—is associated with legislative issues and consumer intolerance; moreover, it may contain antinutritional factors, i.e., indigestible pepsin or high levels of crude ash [16] or cause amino acid imbalance in the diet due to high levels of proline or glycine and low tryptophan and tyrosine content [17].

Compared with other salmonids, sea trout (*Salmo trutta* m. *trutta*) tolerate higher water temperatures, and may play a crucial role in aquaculture under the pressure of the progressing global warming [18]. In the wild, they consume a wide spectrum of terrestrial and aquatic insects, which makes insect meals natural and environmentally sustainable feed components for the species [19,20]. The dietary inclusion of up to 25% insect meal does not affect growth performance in most fish species [9,21–27], and some research conducted on turbot and seabass [28,29] demonstrated an improvement in performance and digestibility. Moreover, some substances present in insects, such as chitin and antimicrobial peptides (AMPs), may play an important role in immune system modulation [30,31] and the stabilization of the homeostasis between animal and host gut microbiota [32]. However, it must be emphasized that processing—such as drying, fat extraction or enzymatic hydrolysis [33], as well as rearing methods and technologies, i.e., usage of different organic waste substrates [3,34,35], rearing period length and environmental conditions [36]—can also improve the nutritional value of insect meals.

In the available literature, data about the use of insect meals in sea trout diets are scarce and they can be found in only one published study described recently by our team [37]. Moreover, information on the microbiota of this species is very limited. The effects of insects on blood plasma parameters and immunological responses have been studied only in salmon [38]. However, the presence of insect meals may positively affect the microbiota composition and improve the gastrointestinal health of these animals [7,31].

Considering all the aspects mentioned above, this research aimed to evaluate the impact of mealworm (*Tenebrio molitor*) and superworm (*Zophobas morio*) larval meals hydrolyzed by bacterial enzymes and used as partial replacements for fishmeal on the blood immune responses and the microbiota of the gastrointestinal tract of sea trout compared to their growth performance and the feed efficiency.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Insect Meals

The insects were purchased from a commercial supplier (HiProMine S.A., Robakowo, Poland). To obtain full-fat meals, the larvae were oven-dried at 50 °C for 24 h and finely ground. The chemical composition and amino acid profile of the meals were determined for diet formulation (Tables 1 and 2).

**Table 1.** Amino acid profiles of hydrolyzed insect larvae meals (% of crude protein) compared to the fishmeal used in the study.

Item	Insect Larvae Meals		
	TM <sup>1</sup>	ZM <sup>2</sup>	FM <sup>3</sup>
<b>Amino Acids</b>			
Indispensable amino acids (IAA)			
Arginine	5.02	4.50	5.91
Histidine	3.21	3.04	2.13
Isoleucine	4.77	4.67	4.79
Leucine	8.34	7.61	7.99
Lysine	5.64	5.62	7.99
Methionine	1.62	1.46	3.11
Phenylalanine	4.28	3.98	3.99
Threonine	5.21	4.97	4.39
Valine	7.40	6.94	5.77
Tryptophan	1.00	1.16	1.08
Dispensable amino acids (DAA)			
Alanine	9.09	8.32	6.79
Aspartic acid	8.28	8.19	9.70
Cysteine	0.83	0.75	0.90
Glycine	5.96	5.21	6.56
Glutamic acid	13.87	13.79	14.57
Proline	7.17	6.13	4.30
Serine	5.09	4.48	4.45
Tyrosine	6.85	6.61	3.10
IAA/DAA	0.81	0.82	0.94

<sup>1</sup> TM, enzyme-hydrolyzed mealworm meal; <sup>2</sup> ZM, enzyme-hydrolyzed superworm meal; <sup>3</sup> FM, fishmeal (Skagen, Denmark).

**Table 2.** Fatty acid composition of the hydrolyzed insect meal (g·kg<sup>-1</sup> dry matter).

Item	Insect Larvae Meals	
	TM <sup>1</sup>	ZM <sup>2</sup>
<b>Fatty Acids</b>		
C14:0	29	9
C16:0	192	306
C18:0	35	91
Saturated fatty acids (SFA)	259	421
C16:1n7	19	6
C18:1n9	409	300
Monounsaturated fatty acids (MUFA)	435	315
C18:2n-6 (LA)	281	239
C20:4n-6 (ARA)	<0.1	<0.1
Polyunsaturated fatty acids (PUFA n-6)	281	239
C18:3n-3 (LNA)	13	9
C18:4n-3	<0.1 <sup>3</sup>	<0.1
C20:5n-3 (EPA)	<0.1	<0.1
C22:5n-3	<0.1	<0.1
C22:6n-3 (DHA)	<0.1	<0.1
Polyunsaturated fatty acids (PUFA n-3)	13	9
n-3/n-6	0.05	0.04
PUFA/SFA	1.14	0.60
C14:0	29	9
C16:0	192	306
C18:0	35	91

<sup>1</sup> TM, enzyme-hydrolyzed mealworm meal; <sup>2</sup> ZM, enzyme-hydrolyzed superworm meal; <sup>3</sup> <0.1 = fatty acids detected at lower amounts than 1 g·kg<sup>-1</sup> of sample.

## 2.2. Preparation of Insect Meal Hydrolysates

Two commercial proteases were used to hydrolyze the dried larvae meals in two subsequent steps. The full-fat larvae meals were ground and mixed using distilled water at a ratio of 4:1 (w:v) to achieve a consistency suitable for enzyme hydrolysis. Initially, the diluted bacterial (*Bacillus amyloliquefaciens*) endopeptidase enzyme Corolase® 7090 (AB Enzymes GmbH, Darmstadt, Germany) was added to the meals at a concentration of 1.5 g·kg<sup>-1</sup> of protein, and the mixture was heated for five hours at 50 °C, according to the manufacturer's instructions. Next, 0.75 g·kg<sup>-1</sup> of the fungal protease enzyme Flavourzyme® (endopeptidase and exopeptidase from *Aspergillus oryzae*; supplied by Novozymes A/S, Denmark) was added to the mixture, which was homogenized and hydrolyzed for three hours. The hydrolyzed meals were kept at 4 °C until diet preparation.

## 2.3. Diet Formulation and Preparation

A control diet (CON) and two experimental diets were formulated (Table 3). The control diet was based on previous results described by our research team and literature [37,39]. A 10% hydrolyzed insect meal inclusion was fixed for both the experimental diets. Hydrolyzed mealworm (TMD) and superworm (ZMD) meals were used. The isonitrogenous (490 g·kg<sup>-1</sup> of crude protein) and isoenergetic (22.5 MJ·kg<sup>-1</sup>) diets were manufactured at the Feed Production Technology and Aquaculture Experimental Station in Muchocin, Poland. In the feed production process, all the dried ingredients were mixed with hydrolyzed insect biomass in a batch-type ribbon blender (WBN-150, WAMGROUP S.p.A., Ponte Motta/Cavezzo, MO, Italy). The mixture was then passed through a semi-industrial single-screw extruder (Metalchem S-60, Gliwice, Poland) at 110 °C to obtain pellets with 1.5-mm and 2.5-mm diameters. After extrusion, the pellets were dried in an airflow drier for 24 h at 40 °C. After drying, fish oil was added onto the mildly heated pellets. The diets were packed in plastic bags and stored at -18 °C until use.

## 2.4. Fish and Feeding Trial

All animal handling protocols and methods complied with the recommendations of Directive 2010/63/EU of the European Parliament and the council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes, the Polish law of 15 January 2015 on the protection of animals used for scientific purposes (Dz.U.2015 poz. 266), and the good practices and recommendations of the National Ethics Committee for Animal Experiments and the Local Ethics Committee for Animal Experiments of Poznań University of Life Sciences [40]. The trial was performed in the Division of Inland Fisheries and Aquaculture, which, as a unit of the Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science of Poznań University of Life Sciences, is certified for animal experiments (approved unit no. 0091) by the National Ethics Committee for Animal Experiments (based on authorization by the Ministry of Science and Higher Education).

Sea trout fingerlings were transported from the Feed Production Technology and Aquaculture Experimental Station in Muchocin, Poland, to the Division of Inland Fisheries and Aquaculture laboratory. Firstly, fish were acclimated for seven days. After that time, on the 1st day of the experimental period, 225 fish with an average body weight of 5.08 ± 0.9 g were weighed individually and distributed randomly into nine tanks (25 fish in each). The fiberglass tanks used had 60 L capacities, which were supplied with 2 L min<sup>-1</sup> water from the reservoir in an open-flow system. The water parameters were recorded daily. The temperature was 14.7 ± 0.6 °C, the dissolved oxygen was constant at 7.5 ± 0.3 mg L<sup>-1</sup>, and the photoperiod was maintained at 16:8 (light:dark) throughout the experiment.

The trial lasted eight weeks, and, during this time, the animals were fed by automatic band feeders (12 h discharge time, FIAP Fishtech GmbH., Ursensollen, Germany). During the experiment, the animals were weighed and counted every two weeks to adjust the feed intake ratio, and the growth and feed efficiency parameters were recorded. The feed ratio was based on a feeding chart designed

for Atlantic salmon, taking into consideration the average body weight of the fingerlings and the water temperature [39]. The fish mortality was monitored daily.

**Table 3.** Formulation and analyzed chemical composition of the experimental diets.

Ingredients (g·kg <sup>-1</sup> )	Diets		
	CON <sup>1</sup>	TMD <sup>2</sup>	ZMD <sup>3</sup>
Fishmeal <sup>4</sup>	250	145	140
Mealworm meal <sup>5</sup>	-	100	-
Superworm meal <sup>6</sup>	-	-	100
Soybean meal <sup>7</sup>	100	100	100
Wheat flour	219	220	226
Corn gluten	150	150	150
Blood meal <sup>8</sup>	70	100	100
Brewer yeast	35	35	35
Fish oil	164	143	140
Dicalcium phosphate	7.2	0.8	2.1
Premix <sup>9</sup>	1.5	1.5	1.5
DL-Methionine	1.2	2.2	2.4
L-Lysine HCL	1.1	1.8	2.0
L-Threonine	0.6	0.6	0.7
<b>Proximate analysis (g·kg<sup>-1</sup> DM)</b>			
Dry matter	930	937	935
Crude protein	480	511	498
Crude lipid	163	146	153
Ash	65	54	51
Crude fiber	17	17	17
Chitin <sup>10</sup>	0	9.3	4.8
NFE <sup>11</sup>	350	338	350
Gross energy (MJ·kg <sup>-1</sup> )	22.18	22.77	22.55

<sup>1</sup> CON—fishmeal diet (control); <sup>2</sup> TMD—enzyme-hydrolyzed mealworm diet; <sup>3</sup> ZMD—enzyme-hydrolyzed superworm diet; <sup>4</sup> Skagen, Denmark (crude protein: 71.4%); <sup>5</sup> Mealworm meal, HiProMine S.A., Poland (dry matter: 95.58%, crude protein: 47.0%, crude lipid: 29.6%); <sup>6</sup> Superworm meal, HiProMine S.A., Poland (dry matter: 96.32%, crude protein: 49.3%, crude lipid: 33.6%); <sup>7</sup> Solvent-extracted 45% crude protein, 1.8% crude lipid; <sup>8</sup> Spray-dried 90% protein, APC Europe, Spain; <sup>9</sup> Polfamix BASF Poland Ltd. (Kutno, Poland) (g·kg<sup>-1</sup>): vitamin A, 1 000,000 IU; vitamin D<sub>3</sub>, 200,000 IU; vitamin E, 1.5 g; vitamin K, 0.2 g; vitamin B<sub>1</sub>, 0.05 g; vitamin B<sub>2</sub>, 0.4 g; vitamin B<sub>12</sub>, 0.001 g; nicotinic acid, 2.5 g; D-calcium pantothenate, 1.0 g; choline chloride, 7.5 g; folic acid, 0.1 g; methionine, 150.0 g; lysine, 150.0 g; Fe, 2.5 g; Mn, 6.5 g; Cu, 0.8 g; Co, 0.04 g; Zn, 4.0 g; J, 0.008 g; carrier > 1000.0 g; <sup>10</sup> Calculated amount from chitin analysis of insect meals; <sup>11</sup> Nitrogen-free extract = 1000 – (crude protein + ether extract + crude fiber + ash).

## 2.5. Sample Collection and Organosomatic Indices

At the beginning of the trial, 200 g of euthanized fish biomass was collected and preserved at 20 °C for body composition analysis. Fish biomass was weighted for each tank, and animals used for somatic indices calculations and other analysis were weighed and measured individually. The growth performance test was performed in triplicate—3 tanks per treatment—and each tank was considered as experimental unit (n = 3/treatment—representing 25 fish/tank). The fish were euthanized using an overdose of MS-222 [41] and decapitated for dissection, sampling and further analysis. Blood sampling was performed postmortem. Blood samples were collected from the caudal veins of nine fish per tank with nonheparinized 1-ml syringes. The samples were pooled, with 3 fish/sample, which was the experimental unit (3 samples/tank, n = 9/treatment). The samples were kept in a refrigerator for 30 min to allow the formation of a clot. The serum was separated by centrifugation at 4 °C and 3500 RPM for 15 min (Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Germany). The serum samples were stored at –82 °C for further analysis. The viscera and liver weights were recorded and used for the calculation of the organosomatic indices. The livers from five fish per tank were removed for the determination of liver glycogen and triglycerides (n = 15/treatment). The whole-body proximate compositions were

determined for all the sampled fish. All the samples were kept at  $-82\text{ }^{\circ}\text{C}$  until they were used for further analysis.

### 2.6. Analysis of the Biological Material

The raw materials, experimental diets, and fish carcasses were analyzed according to the Association of Official Agricultural Chemists (AOAC) [42] methodology for dry matter (934.01), crude protein (976.05), ether extract (920.39), crude ash (920.153) and crude fiber (985.29). The proximate amino acid and fatty acid compositions of the hydrolyzed insect meals and experimental diets were analyzed according to AOAC (2005) [42] procedures at an accredited laboratory (J.S. Hamilton S. A, Gdynia, Poland). The amino acids were determined using high-performance liquid chromatography (HPLC) with an Automatic Amino Acid Analyzer AAA 400 (Ingos Ltd., Prague, Czech Republic). The fatty acid composition of the hydrolyzed insect meals and experimental diets was analyzed according to the method described in EN-ISO 12966-1:2015-01 (European standard). The gross energy content was analyzed according to the ISO 9831 method using an adiabatic bomb calorimeter (KL 12 Mn, Precyzja-Bit PPHU, Bydgoszcz, Poland) standardized with benzoic acid. The chitin composition of the insect meals was determined using the method described by Soon et al. (2018) [43].

### 2.7. Blood Serum Immunology

The blood serum immunology was assessed according to the methods described by Kołodziejcki et al. (2018) [44]. For the assays of serum concentrations of total protein (TP), albumin, glucose, triglycerides, and total cholesterol (TC), commercial assay kits (Pointe Scientific, Canton, MI, USA) were used. A liquid assay reagent set (catalog number: ALT, A7526; AST, A7560; ALP, A7516, Pointe Scientific, Canton, MI, USA) was used to determine the enzymatic activities of alanine aminotransferase (ALT), aspartate transaminase (AST), and alkaline phosphatase (ALP).

The free fatty acids (FFA) content as well as the glycogen levels were measured by enzymatic assay kits from Wako Diagnostics (China); the methodology described by Kołodziejcki et al. (2017) [45] was used for these analyses. Five liver samples from each tank were weighed and immediately placed into tubes containing KOH (30%). Then, the liver samples were boiled for 15 min and cooled. Next, ethanol (98%) and distilled water were added into the tubes. The samples were then centrifuged at 3500 rpm for 30 min, and the supernatants were discarded. A citrate buffer (pH 4.4) with enzyme glucoamylase (activity: 12,000 U/L) was added to the tubes, and the samples were incubated for 2 h at  $55\text{ }^{\circ}\text{C}$  to hydrolyze glycogen into glucose. To determine the glucose concentrations in the solutions, a colorimetric enzyme assay was used (glucose oxidase, Pointe Scientific, Canton, MI, USA), and these values were used to calculate the concentrations of glycogen in the liver tissues.

The levels of immunoglobulin M (IgM) and lysozyme (LZM) in the serum were measured using double antibody sandwich ELISA kits (Sunred Biotechnology, Shanghai, China).

### 2.8. Liver Triglycerides

The liver triglyceride levels were determined according to methods described by Kołodziejcki et al. (2018) [44]. The lipids in the liver samples were extracted by a modified Folch method [46], which includes bead mill disruption of the tissue material with a Tissue Lyzer II (Qiagen, Germany). After the extraction of the lipids, the concentration of the triglycerides was determined by a colorimetric enzyme assay kit (glycerol phosphate oxidase, Pointe Scientific, Canton, MI, USA).

### 2.9. Gut Histomorphology

Samples of the anterior portion of the intestines of nine fish per treatment were collected and submerged in Bouin's solution (Merck) until analysis, which was performed according to methods described by Sobolewska et al. (2017) [47]. The samples were dehydrated, cleared and embedded in paraffin blocks. Formed blocks were cut on a rotary microtome (Thermo Shandon, Chadwick Road, Astmoor, Runcorn, Cheshire, United Kingdom) into slices of  $10\text{-}\mu\text{m}$  thickness [48]. The slices were



placed on microscope slides coated with ovo albumin with an addition of glycerol. The samples were analyzed using an AnMN-800 F microscope (OPTA-TECH, Warsaw, Poland) equipped with an Opta-View camera for recording microscopic images. MultiScan v. 18.03 microscope imaging software (Computer Scanning Systems II Ltd., Warsaw, Poland) was used to measure villus height and width and muscular thickness.

### 2.10. Microbial Community Analysis by Fluorescent In Situ Hybridization (FISH)

The gastrointestinal tract digesta taken from the gut of 12 fish per tank was sampled, and digesta was pooled into 3 samples per tank (the experimental unit was a sample representing 4 fish  $n = 9/\text{treatment}$ ). The digesta was immediately frozen and stored at  $-82\text{ }^{\circ}\text{C}$ . The samples were prepared and observed following the protocols described by Rawski et al. (2016; 2018) [49,50]. The oligonucleotide probes used for this study are shown in Table 4. The samples were visualized using a Carl Zeiss Microscope Axio Imager M2. The numbers of detected bacteria are expressed in colony-forming units/g of digesta ( $\text{CFU mL}^{-1}$ ) and were calculated according to the equation of Józefiak et al. 2019 [7] given below:

$$\log \text{CFU/g} = \log\left(N \times \left(\frac{WA}{PA}\right) \times \left(\frac{Sweight + Dweight}{Sweight}\right) \times \left(\frac{1000}{Svolume}\right)\right) \quad (1)$$

where  $N$  is the number of visible bacterial cells,  $WA$  is the working area of the filter,  $PA$  is the picture area,  $Sweight$  is the sample weight,  $Dweight$  is the dilution factor weight, and  $Svolume$  is the volume of the sample pipetted onto the filter.

**Table 4.** Oligonucleotide probes used in fluorescent in-situ hybridization with fish fed three diets.

Probe	Group of Bacteria	Sequence 5'-3'	References
Aer66	<i>Aeromonas</i> spp.	CTA CTT TCC CGC TGC CGC	[51]
Bmy843	<i>Bacillus</i> spp.	CTT CAG CAC TCA GGT TCG	[52]
CAR193	<i>Carnobacterium</i> spp.	AGC CAC CTT TCC TTC AAG	[51]
Enfm93	<i>Enterococcus</i> spp.	CCG GAA AAA GAG GAG TGG C	[53]
Lab722	<i>Lactobacillus</i> group	YCA CCG CTA CAC ATG RAG TTC CAC T	[54]

### 2.11. Statistical Analysis

SAS software was used to analyze the data. To determine the normality of the data distribution and equality of the variances, Kolmogorov–Smirnov and Levene's tests were used. One-way ANOVA was used, and, if there were significant differences among the treatments, further analysis was performed by a corrected Duncan's post hoc test. The data are presented as the mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM). The statistical significance level was set at  $p < 0.05$ .

The analysis of variance was conducted according to the following general model:

$$Y_i = \mu + \alpha_i + \delta_{ij} \quad (2)$$

where  $Y_i$  is the observed dependent variable,  $\mu$  is the overall mean,  $\alpha_i$  is the effect of the diet, and  $\delta_{ij}$  is the random error.

## 3. Results

### 3.1. Amino Acid and Fatty Acid Composition

The amino acid (AA) composition of the experimental diets is presented in Table 5. Compared with those in the TMD and ZMD treatments, the control diet exhibited a similar ratio between IAA and DAA. The contents of EPA and DHA were relatively low in both types of meals. In the case of experimental diets, the inclusion of insect meals affected the fatty acid profile, especially the content

of n-3 PUFAs. Compared with that in the control diet, the n-3/n-6 fatty acid ratios decreased in the experimental diets containing insects (Table 6).

**Table 5.** Amino acid profiles of experimental diets (g·kg<sup>-1</sup> dry matter).

Amino Acids	Diets		
	CON <sup>1</sup>	TMD <sup>2</sup>	ZMD <sup>3</sup>
Indispensable amino acids (IAA)			
Arginine	21.7	20.3	21.5
Histidine	12.9	13.9	14.5
Isoleucine	15.3	13.9	14.7
Leucine	36.1	36.8	39.8
Lysine	27.2	24.9	27.1
Methionine	12.5	11.7	12.6
Phenylalanine	21.4	21.8	23.2
Threonine	18.6	18.2	15.8
Valine	24.0	24.5	26.5
Tryptophan	4.3	4.5	4.6
Dispensable amino acids (DAA)			
Alanine	23.1	24.0	25.7
Aspartic acid	32.6	33.0	36.0
Cysteine	4.9	5.8	5.3
Glycine	21.6	20.4	21.4
Glutamic acid	93.2	89.9	99.0
Proline	31.9	31.8	34.1
Serine	19.5	20.5	21.1
Tyrosine	12.2	13.2	14.0
IAA/DAA	0.81	0.80	0.78

<sup>1</sup> CON—fishmeal diet (control); <sup>2</sup> TMD—enzyme-hydrolyzed mealworm diet; <sup>3</sup> ZMD—enzyme-hydrolyzed superworm diet.

**Table 6.** Fatty acid profiles of experimental diets (g·kg<sup>-1</sup> dry matter).

Fatty Acids	Diets		
	CON <sup>1</sup>	TMD <sup>2</sup>	ZMD <sup>3</sup>
C14:0	38	39	35
C16:0	135	146	176
C18:0	27	31	42
Saturated fatty acids (SFA)	211	223	261
C16:1n7	43	39	35
C18:1n9	276	300	303
Monounsaturated fatty acids (MUFA)	492	500	479
C18:2n-6 (LA)	97	108	106
C20:4n-6 (ARA)	5	8	7
Polyunsaturated fatty acids (PUFA n-6)	114	123	120
C18:3n-3 (LNA)	27	23	21
C18:4n-3	16	15	14
C20:5n-3 (EPA)	38	31	28
C22:5n-3	5	8	7
C22:6n-3 (DHA)	60	46	42
Polyunsaturated fatty acids (PUFA n-3)	162	139	113
n-3/n-6	1.43	1.13	0.94
PUFA/SFA	1.31	1.17	0.89
C14:0	38	39	35
C16:0	135	146	176
C18:0	27	31	42

<sup>1</sup> CON—fishmeal diet (control); <sup>2</sup> TMD—enzyme-hydrolyzed mealworm diet; <sup>3</sup> ZMD—enzyme-hydrolyzed superworm diet.

### 3.2. Growth Performance and Nutrient Utilization

At the end of the experimental period, the growth performance parameters (final body weight, body weight gain (BWG), and specific growth rate (SGR)) were not affected by the inclusion of the insect meals (Table 7). Among the feed efficiency parameters, the daily feed intake (DIR), feed conversion ratio (FCR), and protein production value (PPV) were not different among the treatment groups; only the protein efficiency ratio (PER) significantly decreased in TMD and ZMD in comparison to CON ( $p = 0.029$ ).

**Table 7.** Growth performance and feed utilization of sea trout fed with experimental diets.

Item	Diets			p-Value
	CON <sup>1</sup>	TMD <sup>2</sup>	ZMD <sup>3</sup>	
Initial body weight (g)	5.75 ± 0.04	5.84 ± 0.03	5.85 ± 0.12	0.639
Final body weight (g)	21.20 ± 0.51	20.97 ± 0.72	20.60 ± 0.20	0.729
BWG (g) <sup>4</sup>	15.47 ± 0.50	15.10 ± 0.69	14.77 ± 0.09	0.632
SGR (%/day) <sup>5</sup>	2.33 ± 0.04	2.28 ± 0.06	2.25 ± 0.02	0.435
DIR (%/day) <sup>6</sup>	1.39 ± 0.02	1.44 ± 0.04	1.48 ± 0.03	0.184
FCR <sup>7</sup>	0.99 ± 0.02	1.04 ± 0.04	1.07 ± 0.02	0.200
PER <sup>8</sup>	2.10 ± 0.04 <sup>a</sup>	1.88 ± 0.07 <sup>b</sup>	1.87 ± 0.04 <sup>b</sup>	0.029
PPV (%) <sup>9</sup>	32.51 ± 0.81	28.82 ± 2.08	28.58 ± 0.53	0.140
Survival (%) <sup>10</sup>	100 ± 0.00	99 ± 1.33	99 ± 1.33	0.630

<sup>1</sup> CON—fishmeal diet (control); <sup>2</sup> TMD—enzyme-hydrolyzed mealworm diet; <sup>3</sup> ZMD—enzyme-hydrolyzed superworm diet; values in the same row having different superscript letters are significantly different at  $p < 0.05$ , ( $n = 3$ ); <sup>4</sup> Body weight gain (BWG) = [(final body weight—initial body weight (g))/initial body weight, g] × 100; <sup>5</sup> Specific growth rate (SGR) = [(ln final body weight (g)—ln initial body weight (g))/number of days] × 100; <sup>6</sup> Daily intake rate (DIR) = [(feed intake (g)/total weight (g))/number of days] × 100; <sup>7</sup> Feed conversion ratio (FCR) = total feed supplied (g DM)/weight gain (g); <sup>8</sup> Protein efficiency ratio (PER) = [weight gain (g)]/total protein fed (g DM); <sup>9</sup> Protein production value (PPV) = [protein retention in fish (g DM)/total protein fed (g DM) × 100]; <sup>10</sup> Survival = [total number of fish harvested/total number of fish stocked] × 100; values in the same row having different superscript letters are significantly different at  $p < 0.05$  ( $n = 3$ ); 3.3. Organosomatic indices and body composition.

The sea trout fingerlings fed with ZMD exhibited higher hepatosomatic index (HSI) ( $p < 0.001$ ) and viscerosomatic index (VSI) ( $p = 0.010$ ) values than those in the CON and TMD treatments. These values were related to the significant increase in lipid content in the liver in the ZMD treatment ( $p = 0.004$ ). However, the liver glycogen and whole-body composition parameters were not affected by the inclusion of the insect meals (Table 8).

**Table 8.** Organosomatic indices and whole-body composition (% of wet weight) of sea trout fed with experimental diets.

Item	Diets			p-Value
	CON <sup>1</sup>	TMD <sup>2</sup>	ZMD <sup>3</sup>	
Organosomatic indices (%)				
HIS <sup>4</sup>	1.45 ± 0.04 <sup>b</sup>	1.44 ± 0.05 <sup>b</sup>	1.78 ± 0.07 <sup>a</sup>	<0.001
VSI <sup>5</sup>	7.78 ± 0.17 <sup>b</sup>	7.94 ± 0.21 <sup>b</sup>	8.62 ± 0.22 <sup>a</sup>	0.010
Liver energy reserves (%)				
Liver lipid	4.05 ± 0.18 <sup>b</sup>	4.12 ± 0.14 <sup>b</sup>	4.96 ± 0.26 <sup>a</sup>	0.004
Liver glycogen	1.76 ± 0.07	1.8 ± 0.05	1.71 ± 0.06	0.549
Whole-body composition (%)				
Moisture	76.16 ± 0.16	76.05 ± 0.73	76.00 ± 0.35	0.973
Crude protein	15.45 ± 0.06	15.40 ± 0.47	15.28 ± 0.11	0.914
Crude lipid	5.39 ± 0.13	5.42 ± 0.27	5.47 ± 0.16	0.955
Crude ash	2.39 ± 0.07	2.51 ± 0.07	2.60 ± 0.06	0.150

<sup>1</sup> CON—fishmeal diet (control); <sup>2</sup> TMD—enzyme-hydrolyzed mealworm diet; <sup>3</sup> ZMD—enzyme-hydrolyzed superworm diet; values in the same row having different superscript letters are significantly different at  $p < 0.05$ ; <sup>4</sup> Hepatosomatic index (HSI) = [(liver weight (g)/body weight (g)) × 100]; <sup>5</sup> Viscerosomatic index (VSI) = [(viscera weight (g)/body weight (g)) × 100]; values in the same row having different superscript letters are significantly different at  $p < 0.05$  ( $n = 15$ ).

### 3.3. Blood Serum Immunology

Significant differences were found in the serum analysis (Table 9). The aspartate aminotransferase (AST) value increased in the fish provided feed supplemented with ZMD ( $p = 0.002$ ). ZMD meal reduced the concentration of alkaline phosphatase (ALP) compared to the levels of this enzyme in the CON and TMD treatments ( $p < 0.001$ ). The concentration of triglycerides was significantly lower in the TMD treatment than in the CON treatment ( $p = 0.034$ ); however, no differences were observed between the ZMD and other treatments. Additionally, the albumin content as well as the total cholesterol in the blood serum increased in those fish that consumed the insect meals ( $p = 0.010$ ;  $p < 0.001$ , respectively). In the case of alanine aminotransferase (ALT), total protein content, free fatty acids, glucose, immunoglobulin M and lysozyme, there were no significant differences observed among the treatments.

**Table 9.** Serum biochemistry values of sea trout fed with experimental diets.

Item	Diets			p-Value
	CON <sup>1</sup>	TMD <sup>2</sup>	ZMD <sup>3</sup>	
Alanine aminotransferase (U L <sup>-1</sup> )	4.56 ± 1.12	4.54 ± 0.83	3.92 ± 0.42	0.616
Aspartate aminotransferase (U L <sup>-1</sup> )	32.29 ± 3.07 <sup>b</sup>	30.86 ± 4.07 <sup>b</sup>	55.46 ± 7.25 <sup>a</sup>	0.002
Alkaline phosphatase (U L <sup>-1</sup> )	90.49 ± 3.91 <sup>a</sup>	79.80 ± 3.65 <sup>a</sup>	65.81 ± 3.52 <sup>b</sup>	<0.001
Total protein (g L <sup>-1</sup> )	55.6 ± 1.1	57.2 ± 1.1	54.4 ± 0.4	0.097
Albumin (g L <sup>-1</sup> )	25.7 ± 0.2 <sup>b</sup>	27.3 ± 0.4 <sup>a</sup>	27.4 ± 0.6 <sup>a</sup>	0.010
Triglycerides (mg dL <sup>-1</sup> )	493.19 ± 15.84 <sup>a</sup>	384.25 ± 33.82 <sup>b</sup>	412.04 ± 29.61 <sup>ab</sup>	0.034
Total cholesterol (mg dL <sup>-1</sup> )	290.41 ± 11.08 <sup>b</sup>	365.12 ± 13.37 <sup>a</sup>	342.86 ± 6.54 <sup>a</sup>	<0.001
Free fatty acids (mmol L <sup>-1</sup> )	0.60 ± 0.01	0.60 ± 0.02	0.58 ± 0.01	0.522
Glucose (mg dL <sup>-1</sup> )	87.56 ± 3.07	91.17 ± 3.59	88.33 ± 2.89	0.702
Immunoglobulin M (mg mL <sup>-1</sup> )	0.40 ± 0.03	0.37 ± 0.03	0.45 ± 0.06	0.419
Lysozyme (µg mL <sup>-1</sup> )	15.48 ± 1.07	14.11 ± 0.95	15.05 ± 0.99	0.615

<sup>1</sup> CON—fishmeal diet (control); <sup>2</sup> TMD—enzyme-hydrolyzed mealworm diet; <sup>3</sup> ZMD—enzyme-hydrolyzed superworm diet; values in the same row having different superscript letters are significantly different at  $p < 0.05$  (n = 9).

### 3.4. Gut Histomorphology

The anterior part of the gastrointestinal tract did not exhibit any significant differences in villus height, villus width, or villus area among the sea trout fed the insect meals or the control diet. The muscular layer thickness was also not affected by insect meals inclusion (Table 10).

**Table 10.** Histomorphology of the anterior portion of the gut of sea trout fed with experimental diets.

Item	Diets			p-Value
	CON <sup>1</sup>	TMD <sup>2</sup>	ZMD <sup>3</sup>	
Villus height	275.83 ± 14.58	326.20 ± 14.58	287.55 ± 14.58	0.056
Villus width	85.00 ± 4.38	93.15 ± 4.38	97.18 ± 4.38	0.156
Villus area	4438.84 ± 372.8	4798.02 ± 372.8	5345.44 ± 395.5	0.245
Muscular layer thickness	80.13 ± 4.23	73.38 ± 4.23	82.70 ± 4.23	0.293

<sup>1</sup> CON—fishmeal diet (control); <sup>2</sup> TMD—enzyme-hydrolyzed mealworm diet; <sup>3</sup> ZMD—enzyme-hydrolyzed superworm diet; Values in the same row having different superscript letters are significantly different at  $p < 0.05$  (n = 9).

### 3.5. Microbial Community Analysis by Fluorescent In-Situ Hybridization (FISH)

The inclusion of ZMD meal significantly decreased the concentrations of *Aeromonas* spp., *Enterococcus* spp. and *Carnobacterium* spp. ( $p = 0.037$ ,  $p = 0.017$ , and  $p = 0.001$ , respectively); the concentration of *Carnobacterium* spp. also decreased in the fish in the TMD treatment. The inclusion of TMD meal significantly reduced the concentration of the *Lactobacillus* group ( $p = 0.025$ ). The total

number of bacteria and *Bacillus* spp. did not exhibit any significant differences among the treatments (Table 11).

**Table 11.** Microbiology results of the digesta of sea trout fed with experimental diets.

Target	Diets			p-Value
	CON <sup>1</sup>	TMD <sup>2</sup>	ZMD <sup>3</sup>	
Total number of bacteria	9.49	9.52	9.54	0.576
<i>Aeromonas</i> spp.	9.34 <sup>a</sup>	9.36 <sup>a</sup>	9.24 <sup>b</sup>	0.037
<i>Carnobacterium</i> spp.	9.34 <sup>a</sup>	9.17 <sup>b</sup>	9.10 <sup>b</sup>	0.001
<i>Enterococcus</i> spp.	9.29 <sup>a</sup>	9.29 <sup>a</sup>	9.15 <sup>b</sup>	0.017
<i>Lactobacillus</i> group	9.38 <sup>a</sup>	9.18 <sup>b</sup>	9.23 <sup>ab</sup>	0.025
<i>Bacillus</i> spp.	9.13	9.12	9.19	0.508

<sup>1</sup> CON—fishmeal diet (control); <sup>2</sup> TMD—enzyme-hydrolyzed mealworm diet; <sup>3</sup> ZMD—enzyme-hydrolyzed superworm diet; Values in the same row having different superscript letters are significantly different at  $p < 0.05$  (n = 9).

#### 4. Discussion

Currently, insect meals are promoted as natural alternative protein sources for fish nutrition. Although insects are a source of high-quality protein, they also provide antimicrobial peptides (AMPs) and chitin, which are considered health promoters in animal nutrition [15,31,55]. Chitin and its derivative products have been demonstrated to be beneficial to fish nutrition and health [56,57]. AMPs are the main contributors to microbiological homeostasis in insects due to their activity against potentially pathogenic bacteria, fungi, parasites and viruses [58]. However, it should be emphasized that FM replacement by insect meals creates the need to supplement certain amino acids, especially methionine (Table 1).

The present study represents the first introduction of hydrolyzed *Z. morio* meal to sea trout diets. The results are characterized by a high survival rate and satisfactory growth performance and feed utilization parameters [37,59]. The positive effect of hydrolyzed fish protein was previously proven by a significant reduction in vertebral anomalies [60]. Moreover, protein hydrolysate was previously observed as a positive factor in growth and disease resistance [61]. The main mode of action that is used to explain this effect is the fact that hydrolyzed meals may contain low-molecular-weight compounds. These compounds may be related to more effective absorption, which results in improved growth performance and feed utilization [62]. In the present study, there were no differences in the final body weight, BWG, SGR, DIR, FCR, PPV or survival rate among the treatment groups. However, the protein efficiency ratio was reduced significantly in those fish fed insect meals. These results are in agreement with those of Stadtlander et al. [8], who showed that the inclusion of black soldier fly (BSF, *Hermetia illucens*) meal in a rainbow trout diet yielded results similar to those of a control diet in terms of growth and feed conversion. However, protein utilization was decreased in the BSF group. These differences may be due to the crude protein bonding to the chitin [63], which causes an overestimation of its content in the raw materials and the diet, causing a reduction in the PER values. It is important to emphasize that the nitrogen-to-protein conversion factor (Kp) of 6.25 generally used for proteins leads to an overestimation of protein content in insects because of the presence of nonprotein nitrogen (NPN) sources, such as chitin, nucleic acids, or phospholipids. To avoid this overestimation, Kp values of 4.76 for the protein content in whole insects and 5.60 for the protein extracts should be used [64]. The results of the present study are in agreement with the findings of Hoffmann et al. [37], in which no effect on average total length or body mass, SGR, FCR, or PER was observed throughout the experiment. A significant effect of insect meals on survival rate was not observed in either study; however, in the present study, the survival rate was numerically higher and close to 100%.

Among the organosomatic indices, the HSI and VSI of the fish fed with ZMD were significantly higher than those of the TMD and CON groups. Moreover, these differences were related to the higher liver lipid levels found in the fish in the ZMD treatment. This can be explained by the presence of

higher levels of palmitic acid (PA) in the diet with ZMD meal than in the other diets, as this caused the enlargement of the liver due to the accumulation of fat in this organ. A similar increase in the HSI was observed in Japanese sea bass (*Lateolabrax japonicus*) fed diets with relatively high levels of PA [65]. Hoffmann et al. (2020) [37] have shown a reduction in VSI values in sea trout fed hydrolyzed and full-fat mealworm meals compared to those fed the control diet. However, in the same study, the inclusion of *T. molitor* full-fat meal and the use of a diet with *T. molitor* hydrolyzed with a 1.0% mixture of enzymes did not lead to differences in the HSI values compared to those generated by a fishmeal-based diet [37]. According to Huang et al. (2016) [66], higher lipid levels in diets lead to fat storage in the visceral cavity and liver of fish; however, this accumulation may also depend on the fatty acid composition of the diet. This may be the reason for the observed differences in the effects of dietary inclusions on organosomatic indices between *T. molitor* and *Z. morio*; specifically, this pattern may be due to differences in PA and saturated fatty acid (SFA) content, which was higher in the ZMD treatment group. What is more, the ratio between n-3 and n-6 fatty acids is reported as a potential modulate factor of the biochemical composition of fish liver and its structure as well as metabolism [25,67,68]. The reduction in n-3 fatty acid composition in insect diets creates an imbalance in the n-3/n-6 ratio which increases the lipid deposits in the liver. The higher level of n-6 in fish products can negatively affect human health due to the pro-inflammatory properties of this acid [69]. However, the effect of the diet on the chemical composition of fish, and, indirectly, on human health, should be considered in further studies.

In terms of the hematological parameters of the serum, there were no significant differences in the ALT concentration. However, the AST analyses showed higher values in the ZMD treatment group. These two aminotransferases are potential biomarkers of liver health [70]. According to this information, any degradation of the liver will elevate the concentration of this enzyme. The inclusion of BSF meal in the diets of Atlantic salmon led to a decrease in the ALT concentration, while the AST concentration was not affected by diet [11]. In the case of birds, insect meal inclusion showed no effect on these aminotransferase concentrations in barbary partridges (*Alectoris barbara*) [71] or laying hens [72]. In contrast, the inclusion of mealworm meal in broiler chicken diets increased the concentrations of both parameters; however, the possibility of liver damage was excluded by analyses of other enzymes [73]. Perhaps the enlargement observed in our study represents only the excessive fat accumulation due to the high content of PA mentioned previously. These results suggest that further analyses are needed to correctly describe the effects of insect use on liver physiology. According to the literature, ALP is present in the membrane of almost all animal cells, and its activity is commonly related to cellular damage [74,75]. The decrease in this enzyme in the ZMD group may be related to cellular homeostasis. The reduction in this compound is related to an improvement in health status in birds [44]. In contrast, in children, higher levels of ALP are associated with bone growth [76]; therefore, our findings may indicate that the level of ALP is correlated with numeric differences in growth rate in the TMD and CON groups, which was suggested previously by Lemieux et al. (1999) [77] in a study conducted on Atlantic cod (*Gadus morhua*). The total protein content, which is considered an indicator of nutritional status [78], was not affected by insect meal inclusion. According to Panettieri et al. (2020) [79] variations in the total protein content in the blood serum of fish can be a response to a number of physiological changes, i.e., tissue injury or destruction, differences in blood volume and plasma hydration and organism response to stress conditions. However, those effects were not observed in the present study. The albumin levels were significantly higher in the TMD and ZMD groups than in the control. The proteins in blood serum mainly consist of albumin and globulin. It was reported that, in adult Atlantic salmon, albumin constituted approximately 40% of the serum protein values [80]. Previous studies have tried to establish the normal values of blood parameters in healthy Atlantic salmon, and, according to this information, the albumin levels oscillated between 18 and 24 g·L<sup>-1</sup>; however, these values vary seasonally, and data were available for adult fish only [81]. In common carp (*Cyprinus carpio*) exposed to heavy metals at lethal and sublethal concentrations, albumin levels may be significantly decreased to meet the immediate energy demand of toxic stress [80]. In birds, albumin

has been shown to be a source of the amino acids necessary for tissue protein synthesis [82]. The fish fed both insect meals showed significantly higher cholesterol levels than those in the CON group, while the inclusion of TM meal led to a decrease in triglycerides. According to the current literature, the inclusion of BSF meal in Atlantic salmon, rainbow trout, and Jian carp (*Cyprinus carpio var. Jian*) diets did not have an impact on total cholesterol or triglyceride content [83–85]. On the other hand, a number of papers have reported that the addition of insect meal can reduce the concentrations of total cholesterol as well as triglycerides in the blood serum of various fish species [29,30,86,87]. These results are mainly explained as a positive effect of dietary chitin, which has the ability to bind bile acids and free fatty acids [31]. In addition, it was suggested that blood cholesterol may play an important role in the immune defense system [88]; however, in the present study, the increase in total cholesterol concentration was not related to higher lysozyme activity, which is an important nonspecific immune system factor in fish. Insect meals inclusion did not affect the content of IgM, which contributes to innate and adaptive immunity in fish [89]. It has been observed that mealworm meal supplementation reinforces the innate and adapted immune responses of yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*) [90]. In general, the results obtained from the hematological analyses in this study allow us to conclude that the inclusion of insect meals in sea trout diets did not negatively affect blood parameters; in particular, the fish growth performance and survival rate were not affected among any of the groups.

The hydrolyzed insect meals did not affect the gut histomorphology (i.e., the villus height, width and area and muscular thickness), which has a crucial role in nutrient absorption and gut health. The use of mealworm and BSF meal in Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*) diets did not affect villus height [91]. Moreover, the mucosal thickness was lower in fish fed with added BSF meal; in contrast, mealworm diets increased the thickness of the muscular layer. However, in a study carried out on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), the villus height decreased with mealworm and tropical house cricket (*Grylloides sigillatus*) inclusion, while an increase in villus height was observed with the addition of the Turkestan cockroach (*Blatta lateralis*) [7]. In this study, the mucosal thicknesses were lower and higher in the tropical house cricket and Turkestan cockroach treatment groups, respectively, than in the control group. Moreover, the inclusion of BSF meal in the diet decreased the prevalence of steatosis in the proximal intestine of Atlantic salmon [38]. This variety of results arises mainly from the wide range of fish species used in the experiments as well as the use of different insect species and their level of inclusion in the feed. Moreover, the technology used in the production of the diets, the drying process, fat extraction, etc., as well as for storage, may affect the properties of insect meals as well as their effects on gut microstructures. Thus, the focus should be placed on species-specific solutions as well as on processing technologies for further studies and gut health assessments.

The abovementioned findings suggest that a crucial role is played by the GIT microbiome. The present study shows a lack of effects of insect supplementation on the total number of bacteria, which is in agreement with the findings of research carried out by Bruni et al. (2018) [92] on rainbow trout. This result indicates that the use of partially defatted BSF meal did not affect the amount of digesta-associated bacterial communities; however, it did increase the number of mucosa-associated bacteria. This study showed that the inclusion of insect meals also had no influence on the concentration of *Bacillus* spp. This genus of bacteria is well known, due to its probiotic properties and production of secondary metabolites, such as acetic acid, lactic acid and bacteriocins, and may contribute to potentially improving fish health [93,94]. In terms of insect meal use, it has been reported that the inclusion of mealworms at a concentration of 50% in fish diets reduced *Bacillus* spp. in gilt-head bream (*Sparus aurata*) and brown trout [95]. In contrast, the inclusion of mealworm as well as BSF meal led to an increase in *Bacillus* spp. in the case of Siberian sturgeon [91]. The inclusion of *Z. morio* meal significantly decreased the concentration of *Carnobacterium* spp., but, in the case of the *T. molitor* meal, a reduction in *Carnobacterium* spp. as well as the *Lactobacillus* group was observed. Both *Carnobacterium* spp. and the *Lactobacillus* group are lactic acid bacteria (LAB), which produce inhibitory substances against fish pathogens [96]. The described effect can potentially provide an increased chance for pathogen proliferation and further microbiota imbalance. However, despite

those changes, a significant decrease in the concentration of *Aeromonas* spp. and *Enterococcus* spp. was observed in the ZM group. The reduction in *Aeromonas* spp. is a positive change, as this genus includes pathogenic and opportunistic bacteria, such as *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas salmonicida*, that may produce cytotoxins, enterotoxins and endotoxins, negatively affecting intestinal barrier functions [97,98]. The decrease in *Enterococcus* spp. can also be seen as a positive effect of ZM meal inclusion. Despite the fact that a number of bacteria belonging to this genus may be used as probiotics due to their antimicrobial properties, many of them are virulent, and this can lead to the invasion of host tissue and displacement through epithelial cells [99]. The obtained results are in opposition to the findings of an experiment on *A. baerii*, which showed a decrease in *Carnobacterium* spp., the *Lactobacillus* group, *Aeromonas* spp., and *Enterococcus* spp. in a control treatment fishmeal [91]. However, in a study that included BSF, mealworm, tropical house cricket, and Turkestan cockroach meal in rainbow trout diets, the concentration of LAB from *Lactobacillus* sp./*Enterococcus* sp. was lower in all the groups fed with insects than in the control group, which was fed fishmeal. In the same experiment, the number of *Enterobacteriaceae* bacteria increased as a result of *T. molitor* inclusion. Moreover, according to Osimani et al. (2019) [100] the microbiota of black soldier fly may have been influenced by the feeding substrates used during the rearing process of insects. The microbiological composition of insects can be connected with the rearing methods and used substrates, which affect the microbiological value of insect meals due to secondary metabolites of bacteria and bacteriocin expression. Those differences indirectly affected the bacterial community of the gastrointestinal tract of zebrafish (*Danio rerio*) [100].

All described results can be explained by the presence of chitin, which is a component of the exoskeleton of insects, shellfish, fungi, molds, and protozoa. It is considered as a factor modulating the microbiome of the gastrointestinal tract [101]. It has been shown that a 5% addition of chitin to the diet of *Salmo salar* affected individual bacterial groups by decreasing the populations of *Bacillus* spp., *Lactobacillus* spp., *Pseudomonas* spp., and *Staphylococcus* spp. [102]. The antimicrobial properties of shrimp chitin and chitosan against many pathogenic microorganisms, i.e., *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Listeria monocytogenes*, and *Staphylococcus aureus*, have been observed [103], which suggest the potential of usage chitin and its derivatives as prebiotic or immunostimulants [104,105]. The effect of dietary chitin on the composition of the gastrointestinal tract of *Gadus morhua* was also demonstrated by Zhou et al. (2013) [106]. However, it has to be emphasized that the presence of chitin in the diet can reduce feed intake and digestibility as well as nutrient absorption [26,28] due to possible intestinal inflammation [25,30]. The second explanation for the differences in microbiological composition among the groups may be the presence of AMPs. AMPs can be classified into four groups ( $\alpha$ -helical peptides, cysteine-rich peptides, proline-rich peptides, and glycine-rich proteins), and, depending on the group they belong to, these peptides may be effective against a wide spectrum of potentially pathogenic bacteria species, i.e., *S. aureus*, *E. coli*, *L. monocytogenes*, and *Salmonella typhimurium* [58].

## 5. Conclusions

The use of hydrolyzed insect meals did not affect the growth performance or feed efficiency parameters, including final body weight, BWG, SGR, DIR, FCR and PPV. The effects of ZMD meal were found in the HSI, VSI and liver lipids. Effects of ZMD and TMD on serum biochemistry were observed, which are key points for further studies due to the limited information about hematological parameters in fish. In terms of intestinal histomorphology, there were no aberrations or structural changes, which can be considered an advantage of using insects for sea trout nutrition. The ZMD and TMD treatments decreased the concentrations of groups of bacteria key for fish health, including the *Lactobacillus* group, *Carnobacterium* spp., *Aeromonas* spp., and *Enterococcus* spp., which provides a need for further complex analyzes of insect meal effects on fish microbiome and health. In general, hydrolyzed insect meals appear to be a promising alternative protein source for sea trout nutrition.

**Author Contributions:** Conceptualization, Z.M., D.J., J.M., and M.R.; methodology, Z.M., D.J., J.M., and M.R.; software, Z.M., and B.K.; validation, D.J., and J.M.; formal analysis, Z.M., D.J., J.M., M.R., B.K.; investigation, Z.M., D.J., J.M., M.R., and B.K.; resources, D.J., J.M.; data curation, Z.M., D.J., J.M., M.R., and B.K.; writing—original



draft, Z.M.; writing—review & editing, D.J., J.M., M.R., and B.K.; visualization, Z.M., D.J., and M.R.; supervision, D.J.; project administration, D.J., and J.M.; funding acquisition, D.J., and J.M. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This work was funded by several sources, i.e., the funds of Poznań University of Life Sciences; the project TEAM TECH no. POIR.04.04.00-00-204E/16-00, entitled Insects as Novel Protein Sources for Fish and Poultry, financed by the Foundation of Polish Science (POIR 4.4); and funds of the National Centre for Research and Development, no POIR.01.01.01-00-0828/15, entitled InnSecta: Innovative Technology of Feedstuffs Production Based on Insect Biomass.

**Acknowledgments:** We gratefully acknowledge contributions and logistical support provided by Poznan University of Life Sciences. The authors would like to thank Sanan Talibov, Silvia Nogales-Mérida and Abdelbasset Benzertiha for their contribution to the technical parts of the insect meal and feed preparation, the growth experiment, and data analysis.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

- Huntington, T.C.; Hasan, M.R. Fish as feed inputs for aquaculture-practices, sustainability and implications: A global synthesis. In *Fish as Feed for Aquaculture: Practices, Sustainability and Implications*; FAO Fisheries and Aquaculture Technical Paper. No. 518; FAO: Rome, Italy, 2009; ISBN 9789251064191.
- Engle, C.R.; D’Abramo, L.; Ponniah, A.G.; Slater, M. Global aquaculture 2050. *J. World Aquacult. Soc.* **2017**, *48*, 3–6. [[CrossRef](#)]
- Zarantoniello, M.; Zimbelli, A.; Randazzo, B.; Compagni, M.D.; Truzzi, C.; Antonucci, M.; Riolo, P.; Loreto, N.; Osimani, A.; Milanović, V.; et al. Black Soldier Fly (*Hermetia illucens*) reared on roasted coffee by-product and Schizochytrium sp. as a sustainable terrestrial ingredient for aquafeeds production. *Aquaculture* **2020**, *518*, 734659. [[CrossRef](#)]
- Gasco, L.; Acuti, G.; Bani, P.; Dalle Zotte, A.; Danieli, P.P.; De Angelis, A.; Fortina, R.; Marino, R.; Parisi, G.; Piccolo, G.; et al. Insect and fish by-products as sustainable alternatives to conventional animal proteins in animal nutrition. *Ital. J. Anim. Sci.* **2020**, *19*, 360–372. [[CrossRef](#)]
- Nogales-Mérida, S.; Gobbi, P.; Józefiak, D.; Mazurkiewicz, J.; Dudek, K.; Rawski, M.; Kierończyk, B.; Józefiak, A. Insect meals in fish nutrition. *Rev. Aquac.* **2018**, *11*, 1080–1103. [[CrossRef](#)]
- Gahukar, R.T. Edible Insects Farming: Efficiency and Impact on Family Livelihood, Food Security, and Environment Compared With Livestock and Crops. In *Insects as Sustainable Food Ingredients*; Academic Press: Cambridge, MA, USA, 2016; pp. 85–111.
- Józefiak, A.; Nogales-Mérida, S.; Mikołajczak, Z.; Rawski, M.; Kierończyk, B.; Mazurkiewicz, J. The Utilization of Full-Fat Insect Meal in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Nutrition: The Effects on Growth Performance, Intestinal Microbiota and Gastrointestinal Tract Histomorphology. *Ann. Anim. Sci.* **2019**, *19*, 747–765. [[CrossRef](#)]
- Stadtlander, T.; Stamer, A.; Buser, A.; Wohlfahrt, J.; Leiber, F.; Sandrock, C. *Hermetia illucens* meal as fish meal replacement for rainbow trout on farm. *J. Insects Food Feed* **2017**, *73*, 204–212. [[CrossRef](#)]
- Lock, E.R.; Arsiwalla, T.; Waagbø, R. Insect larvae meal as an alternative source of nutrients in the diet of Atlantic salmon (*Salmo salar*) postsmolt. *Aquac. Nutr.* **2016**, *22*, 1202–1213. [[CrossRef](#)]
- Li, Y.; Kortner, T.M.; Chikwati, E.M.; Belghit, I.; Lock, E.-J.; Krogdahl, Å. Total replacement of fish meal with black soldier fly (*Hermetia illucens*) larvae meal does not compromise the gut health of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture* **2020**, *520*, 734967. [[CrossRef](#)]
- Belghit, I.; Liland, N.S.; Waagbø, R.; Biancarosa, I.; Pelusio, N.; Li, Y.; Krogdahl, Å.; Lock, E.J. Potential of insect-based diets for Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture* **2018**, *491*, 72–81. [[CrossRef](#)]
- Hardy, R.W. Utilization of plant proteins in fish diets: Effects of global demand and supplies of fishmeal. *Aquac. Res.* **2010**, *41*, 770–776. [[CrossRef](#)]
- Olsen, R.L.; Hasan, M.R. A limited supply of fishmeal: Impact on future increases in global aquaculture production. *Trends Food Sci. Technol.* **2012**, *27*, 120–128. [[CrossRef](#)]
- Francis, G.; Makkar, H.P.S.; Becker, K. Antinutritional factors present in plant-derived alternate fish feed ingredients and their effects in fish. *Aquaculture* **2001**, *199*, 197–227. [[CrossRef](#)]
- Oliwa-Teles, A. Nutrition and health of aquaculture fish. *J. Fish Dis.* **2012**, *35*, 83–108. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

16. Meeker, D.L.; Hamiltom, C.R. *An Overview of the Rendering Industry in: Essential Rendering—All about the Animal by-Products Industry*; National Renderers Association: Arlington, VA, USA, 2006; pp. 1–17.
17. Jayathilakan, K.; Sultana, K.; Radhakrishna, K.; Bawa, A.S. Utilization of byproducts and waste materials from meat, poultry and fish processing industries: A review. *J. Food Sci. Technol.* **2012**, *49*, 278–293. [[CrossRef](#)]
18. Vandeputte, M.; Labbé, L. Cultured Aquatic Species Information Programme. *Salmo trutta*. In *Cultured Aquatic Species Fact Sheets*; FAO Fisheries and Aquaculture Department: Rome, Italy, 2012.
19. Skrodenyte, V.; Sruoga, A.; Butkauskas, D.; Skrupskelis, K. Phylogenetic analysis of intestinal bacteria of freshwater salmon *Salmo salar* and sea trout *Salmo trutta trutta* and diet. *Fish. Sci.* **2008**, *74*, 1307–1314. [[CrossRef](#)]
20. Elliott, J.M. The Food of Trout (*Salmo trutta*) in a Dartmoor Stream. *J. Appl. Ecol.* **1967**, *4*, 59–71. [[CrossRef](#)]
21. Dietz, C.; Liebert, F. Does graded substitution of soy protein concentrate by an insect meal respond on growth and N-utilization in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)? *Aquac. Rep.* **2018**, *12*, 43–48. [[CrossRef](#)]
22. Katya, K.; Borsra, M.Z.S.; Ganesan, D.; Kuppusamy, G.; Herriman, M.; Salter, A.; Ali, S.A. Efficacy of insect larval meal to replace fish meal in juvenile barramundi, *Lates calcarifer* reared in freshwater. *Int. Aquat. Res.* **2017**, *9*, 303–312. [[CrossRef](#)]
23. Gasco, L.; Henry, M.; Piccolo, G.; Marono, S.; Gai, F.; Renna, M.; Lussiana, C.; Antonopoulou, E.; Mola, P.; Chatzifotis, S. *Tenebrio molitor* meal in diets for European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) juveniles. *Anim. Feed Sci. Technol.* **2016**, *220*, 34–35. [[CrossRef](#)]
24. Zarantoniello, M.; Randazzo, B.; Truzzi, C.; Giorgini, E.; Marcellucci, C.; Vargas-Abúndez, J.A.; Zimbelli, A.; Annibaldi, A.; Parisi, G.; Tulli, F.; et al. A six-months study on Black Soldier Fly (*Hermetia illucens*) based diets in zebrafish. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 1–12. [[CrossRef](#)]
25. Vargas-Abúndez, A.J.; Randazzo, B.; Foddai, M.; Sanchini, L.; Truzzi, C.; Giorgini, E.; Gasco, L.; Olivotto, I. Insect meal based diets for clownfish: Biometric, histological, spectroscopic, biochemical and molecular implications. *Aquaculture* **2019**, *498*, 1–11. [[CrossRef](#)]
26. Zarantoniello, M.; Bruni, L.; Randazzo, B.; Vargas, A.; Gioacchini, G.; Truzzi, C.; Annibaldi, A.; Riolo, P.; Parisi, G.; Cardinaletti, G.; et al. Partial Dietary Inclusion of *Hermetia illucens* (Black Soldier Fly) Full-Fat Prepupae in Zebrafish Feed: Biometric, Histological, Biochemical, and Molecular Implications. *Zebrafish* **2018**, *15*, 519–532. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Vargas, A.; Randazzo, B.; Riolo, P.; Truzzi, C.; Gioacchini, G.; Giorgini, E.; Loreto, N.; Ruschioni, S.; Zarantoniello, M.; Antonucci, M.; et al. Rearing Zebrafish on Black Soldier Fly (*Hermetia illucens*): Biometric, Histological, Spectroscopic, Biochemical, and Molecular Implications. *Zebrafish* **2018**, *15*, 404–419. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Kroeckel, S.; Harjes, A.G.E.; Roth, I.; Katz, H.; Wuertz, S.; Susenbeth, A.; Schulz, C. When a turbot catches a fly: Evaluation of a pre-pupae meal of the Black Soldier Fly (*Hermetia illucens*) as fish meal substitute—Growth performance and chitin degradation in juvenile turbot (*Psetta maxima*). *Aquaculture* **2012**, *364*, 345–352. [[CrossRef](#)]
29. Magalhães, R.; Sánchez-López, A.; Leal, R.S.; Martínez-Llorens, S.; Oliva-Teles, A.; Peres, H. Black soldier fly (*Hermetia illucens*) pre-pupae meal as a fish meal replacement in diets for European seabass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture* **2017**, *476*, 79–85. [[CrossRef](#)]
30. Li, S.; Ji, H.; Zhang, B.; Zhou, J.; Yu, H. Defatted black soldier fly (*Hermetia illucens*) larvae meal in diets for juvenile Jian carp (*Cyprinus carpio* var. Jian): Growth performance, antioxidant enzyme activities, digestive enzyme activities, intestine and hepatopancreas histological structure. *Aquaculture* **2017**, *477*, 62–70. [[CrossRef](#)]
31. Gasco, L.; Finke, M.; van Huis, A. Can diets containing insects promote animal health? *J. Insects Food Feed* **2018**, *4*, 1–4. [[CrossRef](#)]
32. Rimoldi, S.; Terova, G.; Ascione, C.; Giannico, R.; Brambilla, F. Next generation sequencing for gut microbiome characterization in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed animal by-product meals as an alternative to fishmeal protein sources. *PLoS ONE* **2018**, *13*, e0193652. [[CrossRef](#)]
33. Purschke, B.; Meinschmidt, P.; Horn, C.; Rieder, O.; Jäger, H. Improvement of techno-functional properties of edible insect protein from migratory locust by enzymatic hydrolysis. *Eur. Food Res. Technol.* **2018**, *244*, 999–1013. [[CrossRef](#)]

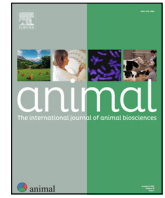
34. Spranghers, T.; Ottoboni, M.; Klootwijk, C.; Owyn, A.; Deboosere, S.; De Meulenaer, B.; Michiels, J.; Eeckhout, M.; De Clercq, P.; De Smet, S. Nutritional composition of black soldier fly (*Hermetia illucens*) prepupae reared on different organic waste substrates. *J. Sci. Food Agric.* **2017**, *97*, 2594–2600. [CrossRef]
35. Truzzi, C.; Giorgini, E.; Annibaldi, A.; Antonucci, M.; Illuminati, S.; Scarponi, G.; Riolo, P.; Isidoro, N.; Conti, C.; Zarantoniello, M.; et al. Fatty acids profile of black soldier fly (*Hermetia illucens*): Influence of feeding substrate based on coffee-waste silverskin enriched with microalgae. *Anim. Feed Sci. Technol.* **2020**, *259*, 114309. [CrossRef]
36. Oonincx, D.G.A.B.; Van Keulen, P.; Finke, M.D.; Baines, F.M.; Vermeulen, M.; Bosch, G. Evidence of Vitamin D synthesis in insects exposed to UVb light. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 1–10. [CrossRef] [PubMed]
37. Hoffmann, L.; Rawski, M.; Nogales-Merida, S.; Mazurkiewicz, J. Dietary inclusion of *Tenebrio molitor* meal in sea trout larvae rearing: Effects on fish growth performance, survival, condition, and GIT and liver enzymatic activity. *Ann. Anim. Sci.* **2020**, *8*, 10807. [CrossRef]
38. Li, Y.; Kortner, T.M.; Chikwati, E.M.; Munang'andu, H.M.; Lock, E.J.; Krogdahl, Å. Gut health and vaccination response in pre-smolt Atlantic salmon (*Salmo salar*) fed black soldier fly (*Hermetia illucens*) larvae meal. *Fish Shellfish Immunol.* **2019**, *86*, 1106–1113. [CrossRef] [PubMed]
39. Storebakken, T. Atlantic salmon, *Salmo salar*. In *Nutrient Requirements and Feeding of Finfish for Aquaculture*; CABI Publishing: Alabama, USA, 2002; pp. 79–102.
40. Ministry of Science and Higher Education, Poland. Available online: <http://www.bip.nauka.gov.pl/dobre-praktyki/> (accessed on 11 June 2020).
41. Leary, S.; Underwood, W.; Anthony, R.; Cartner, S. *AVMA Guidelines for the Euthanasia of Animals: 2013 Edition*; AVMA: Schaumburg, IL, USA, 2013.
42. AOAC. *Official Methods of Analysis of AOAC International*; AOAC: Washington, DC, USA, 2005.
43. Soon, C.Y.; Tee, Y.B.; Tan, C.H.; Rosnita, A.T.; Khalina, A. Extraction and physicochemical characterization of chitin and chitosan from *Zophobas morio* larvae in varying sodium hydroxide concentration. *Int. J. Biol. Macromol.* **2018**, *108*, 135–142. [CrossRef]
44. Kolodziejski, P.A.; Sassek, M.; Chalupka, D.; Leciejewska, N.; Nogowski, L.; Mackowiak, P.; Jozefiak, D.; Stadnicka, K.; Siwek, M.; Bednarczyk, M.; et al. GLP1 and GIP are involved in the action of synbiotics in broiler chickens. *J. Anim. Sci. Biotechnol.* **2018**, *19*, 13. [CrossRef] [PubMed]
45. Kołodziejski, P.A.; Pruszyńska-Oszmałek, E.; Strowski, M.Z.; Nowak, K.W. Long-term obestatin treatment of mice type 2 diabetes increases insulin sensitivity and improves liver function. *Endocrine* **2017**, *53*, 538–550. [CrossRef]
46. Folch, J.; Lees, M.; Sloane Stanley, G.H. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J. Biol. Chem.* **1957**, *226*, 497–509.
47. Sobolewska, A.; Elminowska-Wenda, G.; Bogucka, J.; Dankowiakowska, A.; Kułakowska, A.; Szczerba, A.; Stadnicka, K.; Szpinda, M.; Bednarczyk, M. The influence of in ovo injection with the prebiotic DiNovo® on the development of histomorphological parameters of the duodenum, body mass and productivity in large-scale poultry production conditions. *J. Anim. Sci. Biotechnol.* **2017**, *8*, 45. [CrossRef]
48. Giorgini, E.; Randazzo, B.; Gioacchini, G.; Cardinaletti, G.; Vaccari, L.; Tibaldi, E.; Olivotto, I. New insights on the macromolecular building of rainbow trout (*O. mykiss*) intestine: FTIR Imaging and histological correlative study. *Aquaculture* **2018**, *497*, 1–9. [CrossRef]
49. Rawski, M.; Kieronczyk, B.; Dlugosz, J.; Swiatkiewicz, S.; Józefiak, D. Dietary probiotics affect gastrointestinal microbiota, histological structure and shell mineralization in turtles. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0147859. [CrossRef] [PubMed]
50. Rawski, M.; Kierończyk, B.; Świątkiewicz, S.; Józefiak, D. Long-term study on single and multiple species probiotic preparations for florida softshell turtle (*Apalone ferox*) nutrition. *Anim. Sci. Pap. Rep.* **2018**, *36*, 87–98.
51. Huber, I.; Spanggaard, B.; Appel, K.F.; Rossen, L.; Nielsen, T.; Gram, L. Phylogenetic analysis and in situ identification of the intestinal microbial community of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). *J. Appl. Microbiol.* **2004**, *96*, 117–132. [CrossRef] [PubMed]
52. Salzman, N.H.; de Jong, H.; Paterson, Y.; Harmsen, H.J.M.; Welling, G.W.; Bos, N.A. Analysis of 16S libraries of mouse gastrointestinal microflora reveals a large new group of mouse intestinal bacteria. *Microbiology* **2002**, *148*, 3651–3660. [CrossRef] [PubMed]

53. Waar, K.; Degener, J.E.; Van Luyn, M.J.; Harmsen, H.J.M. Fluorescent in situ hybridization with specific DNA probes offers adequate detection of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* in clinical samples. *J. Med. Microbiol.* **2005**, *54*, 937–944. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Sghir, A.; Gramet, G.; Suau, A.; Rochet, V.; Pochart, P.; Dore, J. Quantification of bacterial groups within human fecal flora by oligonucleotide probe hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.* **2000**, *66*, 2263–2266. [[CrossRef](#)]
55. Dong, X.Q.; Zhang, D.M.; Chen, Y.K.; Wang, Q.J.; Yang, Y.Y. Effects of antimicrobial peptides (AMPs) on blood biochemical parameters, antioxidase activity, and immune function in the common carp (*Cyprinus carpio*). *Fish Shellfish Immunol.* **2015**, *47*, 429–434. [[CrossRef](#)]
56. Cha, S.H.; Lee, J.S.; Song, C.B.; Lee, K.J.; Jeon, Y.J. Effects of chitosan-coated diet on improving water quality and innate immunity in the olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture* **2008**, *278*, 110–118. [[CrossRef](#)]
57. Esteban, M.A.; Cuesta, A.; Ortuño, J.; Meseguer, J. Immunomodulatory effects of dietary intake of chitin on gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) innate immune system. *Fish Shellfish Immunol.* **2001**, *11*, 303–315. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. Yi, H.Y.; Chowdhury, M.; Huang, Y.D.; Yu, X.Q. Insect antimicrobial peptides and their applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2014**, *98*, 5807–5822. [[CrossRef](#)]
59. Kizak, V.; Guner, Y.; Turel, M.; Can, E.; Kayim, M. Comparison of the survival and growth performance in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and brown trout (*Salmo trutta fario*) fry. *Afr. J. Agric. Res.* **2011**, *6*, 5672–5674.
60. Peruzzi, S.; Puvanendran, V.; Riesen, G.; Seim, R.R.; Hagen, Ø.; Martínez-Llorens, S.; Falk-Petersen, I.B.; Fernandes, J.M.O.; Jobling, M. Growth and development of skeletal anomalies in diploid and triploid Atlantic salmon (*Salmo salar*) fed phosphorus-rich diets with fish meal and hydrolyzed fish protein. *PLoS ONE* **2018**, *13*, e0194340. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
61. Andrews, S.R.; Sahu, N.P.; Pal, A.K.; Kumar, S. Haematological modulation and growth of Labeo rohita fingerlings: Effect of dietary mannan oligosaccharide, yeast extract, protein hydrolysate and chlorella. *Aquac. Res.* **2009**, *41*, 61–69. [[CrossRef](#)]
62. Martínez-Alvarez, O.; Chamorro, S.; Brenes, A. Protein hydrolysates from animal processing by-products as a source of bioactive molecules with interest in animal feeding: A review. *Food Res. Int.* **2015**, *73*, 204–212. [[CrossRef](#)]
63. Finke, M.D. Estimate of chitin in raw whole insects. *Zoo Biol.* **2007**, *26*, 105–115. [[CrossRef](#)]
64. Janssen, R.H.; Vincken, J.P.; Van Den Broek, L.A.M.; Fogliano, V.; Lakemond, C.M.M. Nitrogen-to-Protein Conversion Factors for Three Edible Insects: *Tenebrio molitor*, *Alphitobius diaperinus*, and *Hermetia illucens*. *J. Agric. Food Chem.* **2017**, *65*, 2275–2278. [[CrossRef](#)]
65. Xu, H.; Dong, X.; Zuo, R.; Mai, K.; Ai, Q. Response of juvenile Japanese seabass (*Lateolabrax japonicus*) to different dietary fatty acid profiles: Growth performance, tissue lipid accumulation, liver histology and flesh texture. *Aquaculture* **2016**, *461*, 40–47. [[CrossRef](#)]
66. Huang, Y.; Wen, X.; Li, S.; Li, W.; Zhu, D. Effects of dietary lipid levels on growth, feed utilization, body composition, fatty acid profiles and antioxidant parameters of juvenile chu's croaker *Nibea coibor*. *Aquac. Int.* **2016**, *435*, 200–206. [[CrossRef](#)]
67. Kowalska, A.; Zakeš, Z.; Siwicki, A.K.; Jankowska, B.; Jarmolowicz, S.; Demska-Zakeš, K. Impact of Diets with Different Proportions of Linseed and Sunflower Oils on the Growth, Liver Histology, Immunological and Chemical Blood Parameters, and Proximate Composition of Pikeperch Sander *Lucioperca* (L.). *Fish Physiol. Biochem.* **2012**, *38*, 375–388. [[CrossRef](#)]
68. Piedecausa, M.A.; Mazón, M.J.; García García, B.; Hernández, M.D. Effects of total replacement of fish oil by vegetable oils in the diets of sharpnose seabream (*Diplodus puntazzo*). *Aquaculture* **2007**, *263*, 211–219. [[CrossRef](#)]
69. Bhardwaj, K.; Verma, N.; Trivedi, R.K.; Bhardwaj, S.; Shukla, N. Significance of ratio of Omega-3 and Omega-6 in human health with special reference to flaxseed oil. *Int. J. Biol. Chem.* **2016**, *10*, 1–6. [[CrossRef](#)]
70. Reddy, P.B.; Singh, R.K. Biomarker responses in fish exposed to industrial effluent. In Proceedings of the International Conference on Green Technology and Environmental Conservation, GTEC-2011, Chennai, India, 15–17 December 2011; pp. 191–204.

71. Loponte, R.; Nizza, S.; Bovera, F.; De Riu, N.; Fliegerova, K.; Lombardi, P.; Vassalotti, G.; Mastellone, V.; Nizza, A.; Moniello, G. Growth performance, blood profiles and carcass traits of Barbary partridge (*Alectoris barbara*) fed two different insect larvae meals (*Tenebrio molitor* and *Hermetia illucens*). *Res. Vet. Sci.* **2017**, *115*, 183–188. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
72. Bovera, F.; Loponte, R.; Pero, M.E.; Cutrignelli, M.I.; Calabrò, S.; Musco, N.; Vassalotti, G.; Panettieri, V.; Lombardi, P.; Piccolo, G.; et al. Laying performance, blood profiles, nutrient digestibility and inner organs traits of hens fed an insect meal from *Hermetia illucens* larvae. *Res. Vet. Sci.* **2018**, *120*, 86–93. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
73. Bovera, F.; Piccolo, G.; Gasco, L.; Marono, S.; Loponte, R.; Vassalotti, G.; Mastellone, V.; Lombardi, P.; Attia, Y.A.; Nizza, A. Yellow mealworm larvae (*Tenebrio molitor*, L.) as a possible alternative to soybean meal in broiler diets. *Br. Poult. Sci.* **2015**, *56*, 569–575. [[CrossRef](#)]
74. Villanueva, J.; Vanacore, R.; Goicoechea, O.; Amthauer, R. Intestinal alkaline phosphatase of the fish *Cyprinus carpio*: Regional distribution and membrane association. *J. Exp. Zool.* **1997**, *279*, 347–355. [[CrossRef](#)]
75. Agrahari, S.; Pandey, K.C.; Gopal, K. Biochemical alteration induced by monocrotophos in the blood plasma of fish, *Channa punctatus* (Bloch). *Pestic. Biochem. Physiol.* **2007**, *88*, 268–272. [[CrossRef](#)]
76. Newsome, P.N.; Cramb, R.; Davison, S.M.; Dillon, J.F.; Foulerton, M.; Godfrey, E.M.; Hall, R.; Harrower, U.; Hudson, M.; Langford, A.; et al. Guidelines on the management of abnormal liver blood tests. *Gut* **2018**, *67*, 6–19. [[CrossRef](#)]
77. Lemieux, H.; Blier, P.; Dutil, J.D. Do digestive enzymes set a physiological limit on growth rate and food conversion efficiency in the Atlantic cod (*Gadus morhua*)? *Fish Physiol. Biochem.* **1999**, *20*, 293–303. [[CrossRef](#)]
78. McCarthy, D.H.; Stevenson, J.P.; Roberts, M.S. Some blood parameters of the rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson): I. The Kamloops variety. *J. Fish Biol.* **1973**, *5*, 1–8. [[CrossRef](#)]
79. Panettieri, V.; Chatzifotis, S.; Messina, C.M.; Olivotto, I.; Manuguerra, S.; Randazzo, B.; Ariano, A.; Bovera, F.; Santulli, A.; Severino, L.; et al. Honey bee pollen in meagre (*Argyrosomus regius*) juvenile diets: Effects on growth, diet digestibility, intestinal traits, and biochemical markers related to health and stress. *Animals* **2020**, *10*, 231. [[CrossRef](#)]
80. Gopal, V.; Parvathy, S.; Balasubramanian, P.R. Effect of heavy metals on the blood protein biochemistry of the fish *Cyprinus carpio* and its use as a big-indicator of pollution stress. *Environ. Monit. Assess.* **1997**, *48*, 117–124. [[CrossRef](#)]
81. Sandnes, K.; Lie, Ø.; Waagbø, R. Normal ranges of some blood chemistry parameters in adult farmed Atlantic salmon, *Salmo salar*. *J. Fish Biol.* **1988**, *32*, 129–136. [[CrossRef](#)]
82. Aman Yaman, M.; Kita, K.; Okumura, J. Different responses of protein synthesis to refeeding in various muscles of fasted chicks. *Br. Poult. Sci.* **2000**, *41*, 224–228. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
83. Belghit, I.; Liland, N.S.; Gjesdal, P.; Biancarosa, I.; Menchetti, E.; Li, Y.; Waagbø, R.; Krogdahl, Å.; Lock, E.J. Black soldier fly larvae meal can replace fish meal in diets of sea-water phase Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture* **2019**, *503*, 609–619. [[CrossRef](#)]
84. Zhou, J.S.; Liu, S.S.; Ji, H.; Yu, H.B. Effect of replacing dietary fish meal with black soldier fly larvae meal on growth and fatty acid composition of Jian carp (*Cyprinus carpio* var. Jian). *Aquac. Nutr.* **2018**, *24*, 424–433. [[CrossRef](#)]
85. Cardinaletti, G.; Randazzo, B.; Messina, M.; Zarantoniello, M.; Giorgini, E.; Zimbelli, A.; Bruni, L.; Parisi, G.; Olivotto, I.; Tulli, F. Effects of graded dietary inclusion level of full-fat *hermetia illucens* prepupae meal in practical diets for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Animals* **2019**, *9*, 251. [[CrossRef](#)]
86. Khosravi, S.; Kim, E.; Lee, Y.S.; Lee, S.M. Dietary inclusion of mealworm (*Tenebrio molitor*) meal as an alternative protein source in practical diets for juvenile rockfish (*Sebastes schlegeli*). *Entomol. Res.* **2018**, *48*, 214–221. [[CrossRef](#)]
87. Wang, G.; Peng, K.; Hu, J.; Yi, C.; Chen, X.; Wu, H.; Huang, Y. Evaluation of defatted black soldier fly (*Hermetia illucens* L.) larvae meal as an alternative protein ingredient for juvenile Japanese seabass (*Lateolabrax japonicus*) diets. *Aquaculture* **2019**, *507*, 114–154. [[CrossRef](#)]
88. Deng, J.; Kang, B.; Tao, L.; Rong, H.; Zhang, X. Effects of dietary cholesterol on antioxidant capacity, non-specific immune response, and resistance to *Aeromonas hydrophila* in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed soybean meal-based diets. *Fish Shellfish Immunol.* **2013**, *34*, 324–331. [[CrossRef](#)]
89. Mashoof, S.; Criscitiello, M.F. Fish immunoglobulins. *Biology* **2016**, *5*, 45. [[CrossRef](#)]

90. Su, J.; Gong, Y.; Cao, S.; Lu, F.; Han, D.; Liu, H.; Jin, J.; Yang, Y.; Zhu, X.; Xie, S. Effects of dietary *Tenebrio molitor* meal on the growth performance, immune response and disease resistance of yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*). *Fish Shellfish Immunol.* **2017**, *69*, 59–66. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
91. Józefiak, A.; Nogales-Mérida, S.; Rawski, M.; Kierończyk, B.; Mazurkiewicz, J. Effects of insect diets on the gastrointestinal tract health and growth performance of Siberian sturgeon (*Acipenser baerii* Brandt, 1869). *BMC Vet. Res.* **2019**, *15*, 348. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
92. Bruni, L.; Pastorelli, R.; Viti, C.; Gasco, L.; Parisi, G. Characterisation of the intestinal microbial communities of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed with *Hermetia illucens* (black soldier fly) partially defatted larva meal as partial dietary protein source. *Aquaculture* **2018**, *487*, 56–63. [[CrossRef](#)]
93. Thankappan, B.; Ramesh, D.; Ramkumar, S.; Natarajaseenivasan, K.; Anbarasu, K. Characterization of *Bacillus* spp. from the Gastrointestinal Tract of *Labeo rohita*—Towards to Identify Novel Probiotics against Fish Pathogens. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2015**, *175*, 340–353. [[CrossRef](#)]
94. Ramesh, D.; Vinothkanna, A.; Rai, A.K.; Vignesh, V.S. Isolation of potential probiotic *Bacillus* spp. and assessment of their subcellular components to induce immune responses in *Labeo rohita* against *Aeromonas hydrophila*. *Fish Shellfish Immunol.* **2015**, *45*, 268–276. [[CrossRef](#)]
95. Antonopoulou, E.; Nikouli, E.; Piccolo, G.; Gasco, L.; Gai, F.; Chatzifotis, S.; Mente, E.; Kormas, K.A. Reshaping gut bacterial communities after dietary *Tenebrio molitor* larvae meal supplementation in three fish species. *Aquaculture* **2019**, *503*, 628–635. [[CrossRef](#)]
96. Ringø, E.; Wesmajervi, M.S.; Bendiksen, H.R.; Berg, A.; Olsen, R.E.; Johnsen, T.; Mikkelsen, H.; Seppola, M.; Strøm, E.; Holzapfel, W. Identification and characterization of carnobacteria isolated from fish intestine. *Syst. Appl. Microbiol.* **2001**, *24*, 183–191. [[CrossRef](#)]
97. Karataş Düğenci, S.; Candan, A. Isolation of *Aeromonas* Strains from the Intestinal Flora of Atlantic Salmon (*Salmo salar* L. 1758). *Turk. J. Vet. Anim. Sci.* **2003**, *27*, 1071–1075.
98. Ringø, E.; Jutfelt, F.; Kanapathipillai, P.; Bakken, Y.; Sundell, K.; Glette, J.; Mayhew, T.M.; Myklebust, R.; Olsen, R.E. Damaging effect of the fish pathogen *Aeromonas salmonicida* ssp. *salmonicida* on intestinal enterocytes of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Cell Tissue Res.* **2004**, *318*, 305–311. [[CrossRef](#)]
99. Araújo, C.; Muñoz-Atienza, E.; Hernández, P.E.; Herranz, C.; Cintas, L.M.; Igrejas, G.; Poeta, P. Evaluation of enterococcus spp. from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum), feed, and rearing environment against fish pathogens. *Foodborne Pathog. Dis.* **2015**, *12*, 311–322. [[CrossRef](#)]
100. Osimani, A.; Milanović, V.; Roncolini, A.; Riolo, P.; Ruschioni, S.; Isidoro, N.; Loreto, N.; Franciosi, E.; Tuohy, K.; Olivotto, I.; et al. *Hermetia illucens* in diets for zebrafish (*Danio rerio*): A study of bacterial diversity by using PCR-DGGE and metagenomic sequencing. *PLoS ONE* **2019**, *14*, e0225956. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
101. Ringø, E.; Zhou, Z.; Olsen, R.E.; Song, S.K. Use of chitin and, krill in aquaculture—The effect on gut microbiota and the immune system: A review. *Aquac. Nutr.* **2012**, *18*, 117–131. [[CrossRef](#)]
102. Askarian, F.; Zhou, Z.; Olsen, R.E.; Sperstad, S.; Ringø, E. Culturable autochthonous gut bacteria in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) fed diets with or without chitin. Characterization by 16S rRNA gene sequencing, ability to produce enzymes and in vitro growth inhibition of four fish pathogens. *Aquaculture* **2012**, *326*, 1–8. [[CrossRef](#)]
103. Tsai, G.J.; Su, W.H.; Chen, H.C.; Pan, C.L. Antimicrobial activity of shrimp chitin and chitosan from different treatments and applications of fish preservation. *Fish. Sci.* **2002**, *68*, 170–177. [[CrossRef](#)]
104. Ringø, E.; Dimitroglou, A.; Hoseinifar, S.H.; Davies, S.J. Prebiotics in Finfish: An Update. In *Aquaculture Nutrition*; Wiley: New York, NY, USA, 2014.
105. Song, S.K.; Beck, B.R.; Kim, D.; Park, J.; Kim, J.; Kim, H.D.; Ringø, E. Prebiotics as immunostimulants in aquaculture: A review. *Fish Shellfish Immunol.* **2014**, *40*, 40–48. [[CrossRef](#)]
106. Zhou, Z.; Karlsen, Ø.; He, S.; Olsen, R.E.; Yao, B.; Ringø, E. The effect of dietary chitin on the autochthonous gut bacteria of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). *Aquac. Res.* **2013**, *44*, 1889–1900. [[CrossRef](#)]





## The first insight into black soldier fly meal in brown trout nutrition as an environmentally sustainable fish meal replacement



Z. Mikołajczak<sup>a</sup>, M. Rawski<sup>b</sup>, J. Mazurkiewicz<sup>b</sup>, B. Kierończyk<sup>a</sup>, P. Kołodziejcki<sup>c</sup>, E. Pruszyńska-Oszmałek<sup>c</sup>, D. Józefiak<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Animal Nutrition, Poznań University of Life Sciences, Wołyńska 33, 60-637 Poznań, Poland

<sup>b</sup> Laboratory of Inland Fisheries and Aquaculture, Department of Zoology, Poznań University of Life Sciences, Wojska Polskiego 71c, 60-625 Poznań, Poland

<sup>c</sup> Department of Animal Physiology, Biochemistry and Biostructure, Poznań University of Life Sciences, Wołyńska 35, 60-637 Poznań, Poland

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 20 August 2021

Revised 11 March 2022

Accepted 14 March 2022

Available online 23 April 2022

#### Keywords:

Fish nutrition

*Hermetia illucens*

Insect meal

*Salmo trutta m. fario*

Sustainable aquaculture

### ABSTRACT

Insect meals are considered among the most promising feed materials in fish nutrition due to their sustainability and possibility of fish meal replacement. The present study is the first application of full-fat black soldier fly larvae (BSFL) meal in brown trout (*Salmo trutta m. fario*) diets. Two experiments were performed on 240 brown trout fingerlings (average body mass 4.85 g) distributed into four groups (12 tanks for the growth performance experiment, 10 fish/tank; and 12 metabolic tanks for the digestibility test, 10 fish/tank). The experimental group design was conducted as follows: control diet, with no BSFL and 35% fish meal, and experimental diets: BSFL5 – with 5% BSFL full-fat meal and 32.5% fish meal; BSFL10 – with 10% BSFL full-fat meal and 30% fish meal; and BSFL20 – with 20% BSFL full-fat meal and 25% fish meal. No effects were recorded in the case of growth performance and feed utilization parameters. The environmental sustainability of the usage of insect meals in fish diets was proven – due to the lower fish meal inclusion, the fish-in-fish-out ratio decreased by 31% in BSFL20. In the case of the viscerosomatic index, increases in BSFL5 and BSFL20 were reported. In all experimental groups, decreases in hepatosomatic index values were observed. Crude protein digestibility decreased in BSFL5 and BSFL20, while crude fat digestibility decreased only in the BSFL20 group. The effect of including BSFL full-fat meal in a brown trout diet on serum biochemical parameters was reported. The aspartate transaminase concentration increased in BSFL10 and BSFL20, while the gamma-glutamyl transpeptidase values decreased in BSFL20. In the case of total cholesterol, higher values were observed in BSFL10 and BSFL20. The albumin content decreased in the BSFL20 group, while globulin showed the highest values in the control group. The microbiota composition was not affected by insect meal inclusion. In conclusion, the results of the present study showed the high potential of BSFL full-fat meal application of up to 20% in a brown trout diet.

© 2022 The Authors. Published by Elsevier B.V. on behalf of The Animal Consortium. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

### Implications

Fish meal is one of the least environmentally sustainable feed ingredients. Therefore, investigation of novel protein sources in fish nutrition is needed. The present study evaluated the usage of *Hermetia illucens* in brown trout fry diets. The experiment performed indicated that the substitution of black soldier fly larvae full-fat meal did not affect the growth performance, feed utilization, digestibility of protein and fat, chemical blood parameters, or microbiota of the gastrointestinal tract. Furthermore, the envi-

ronmental sustainability of the usage of insect meals in fish diets was proven.

### Introduction

In recent years, insect meals have been considered among the most promising feed materials in fish nutrition (Nogales-Mérida et al., 2018). This is supported by the fact that insects are characterized by high CP and crude fat contents as well as by their beneficial properties, including the antimicrobial peptides they produce and the prebiotic features of chitin (Józefiak and Engberg, 2017), and may be used as functional additives in fish nutrition and to modulate the microbiome of the gastrointestinal tract (GIT) (Józefiak et al., 2019) and the immune response

\* Corresponding author.

E-mail address: [damian.jozefiak@up.poznan.pl](mailto:damian.jozefiak@up.poznan.pl) (D. Józefiak).

(Henry et al., 2018). Currently, black soldier flies (*Hermetia illucens*) have become the most widely studied and applied species due to their short period of rearing, high fertility, favourable waste to high-quality protein conversion rate and health-promoting fatty acid composition (Smetana et al., 2019).

The most widely used technologies of insect biomass processing are drying techniques, which can be divided into traditional methods, such as roasting, frying, and sun-drying, as well as modern methods, such as freeze-drying, oven-drying, and microwave-assisted drying (Melgar-Lalanne et al., 2019). Moreover, an increasing number of scientific papers have reported the usage of partially defatted insect meal in aquafeed (Renna et al., 2017; Stejskal et al., 2020). However, all of the abovementioned procedures increase the costs of production. It must be emphasized that the majority of studies on insect meal usage in salmonids include Atlantic salmon (*Salmo salar*) (Weththasinghe et al., 2021) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) (Cardinaletti et al., 2019). The first efforts were made in the case of closely related sea trout (Hoffmann et al., 2020; Mikołajczak et al., 2020). However, in the scientific literature, there is no information about their application in brown trout (*Salmo trutta* m. *fario*).

Brown trout seems to be a promising species for aquaculture production in the current era of global warming. *Salmo trutta* is characterized by higher tolerance for summer temperatures, which in the long term of progressing climate change trends and lead to becoming suitable competition for Atlantic salmon production (Vandeputte and Labbé, 2012).

Considering all of the factors mentioned above, the aim of this study was to evaluate the impact of black soldier fly larvae (BSFL) full-fat meal as a replacement for fish meal at three different addition levels (5%, 10% and 20%) in brown trout diets on growth performance, production sustainability, protein and fat digestibility coefficients, biochemical blood parameters and microbiota of GIT. The examined hypothesis assumed that the use of insect meals will not adversely affect brown trout growth performance, feed utilization or physiological parameters.

## Material and methods

### Preparation of insect full-fat meals

Insect biomass was supplied by HiProMine S.A., Robakowo, Poland. BSF larvae were fed a mix of plant by-products (Weththasinghe et al., 2021). To obtain full-fat insect meals, the biomass of insects was frozen at  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , air-dried at  $50\text{ }^{\circ}\text{C}$  for 24 h and then homogenized using a beater mill (the diameter was less than 0.1 mm). The hygienization of raw material was performed by heating at  $100\text{ }^{\circ}\text{C}$  for 95 min according to the recommendations of Annex IV of European Commission Regulation No. 141/2011 concerning the processing of animal by-products.

### Diet formulation and preparation

The isonitrogenous and isoenergetic diets were manufactured, including a control diet (CON) and three experimental diets. The arrangement of diets was as follows: CON – without the addition of BSFL full-fat meal and with 35% fish meal; BSFL5 – with 5% BSFL full-fat meal and 32.5% fish meal; BSFL10 – with 10% BSFL full-fat meal and 30% fish meal; and BSFL20 – with 20% BSFL full-fat meal and 25% fish meal. All experimental diets were prepared at the Feed Production Technology and Aquaculture Experimental Station in Muchocin, Poland, using a single-screw extruder (Metalchem S-60, Gliwice, Poland). The extrusion conditions were  $90\text{ }^{\circ}\text{C}$  in the cylinder and  $110\text{ }^{\circ}\text{C}$  in the head, 52 rpm screw speed and a matrix

size of 2 mm (Rawski et al., 2020). The diets were packed in plastic bags and stored at  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ . All chemical compositions of the components and results of chemical analyses of diets are presented in Supplementary Table S1.

### Fish and growth performance trial

Brown trout were transported from the Feed Production Technology and Aquaculture Experimental Station in Muchocin to the Laboratory of Inland Fisheries and Aquaculture in Poznań. During acclimatization, fish were kept in 500-l tanks. Before the experiment, fish were fed commercial feed for salmonids (Aller Performa, Poland).

On the 1st day of the experimental period, 240 healthy fish were randomly selected from the primary tank and weighed (the average BW was 4.85 g). Fish were allocated to 12 tanks with a net capacity of 50 l (10 fish per tank) for the growth performance experiment and 12 tanks with a cylindrical shape, conical bottom and a net capacity of 50 l for the digestibility test. Fish distribution among the experimental groups was made randomly. Tanks were supplied with 2 l/min of filtrated tap water in an open-flow system. The water parameters were recorded daily. The temperature was  $15\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ , the concentration of oxygen was  $7.5\text{ mg} \pm 0.3\text{ mg/l}$ , and the photoperiod was maintained at 17:7 (light:dark) during the entire experiment.

The experiment lasted 8 weeks. To reduce stress caused by contact with personnel, trout were fed using automatic belt feeders (12 h discharge time, FIAP Fishtech GmbH, Germany). Fish were acclimated to the experimental conditions for 1 week, and the CON diet was given to them 3 days before the start of the experiment. Each trial was carried out in three replications (tanks) per diet. The feed ratio was based on a feeding chart designed for rainbow trout taking into consideration the average BW and the water temperature (Twibell and Wilson, 2002). The fish mortality and health condition were monitored daily. All animals were weighed at 10-day intervals.

To calculate the growth performance and feed utilization factors, equations described by Hoffmann et al. (2020) were used as follows:

$$\text{Survival Rate}(\%) = \left( N_t \times N_o^{-1} \right) \times 100$$

where  $N_t$  is the final number of fish (pc) and  $N_o$  is the initial number of fish (pc).

$$\text{Specific Growth Rate} (\% \text{day}^{-1}) = (100 \times (\ln w_t - \ln w_o) \times t^{-1})$$

where  $w_t$  is the final mean fish weight (g),  $w_o$  is the initial mean fish weight (g), and  $t$  is the number of experimental days.

$$\text{Feed Conversion Ratio} = f_d \times (w_t - w_o)^{-1}$$

where  $f_d$  is the weight of the diet (g),  $w_t$  is the final mean fish weight (g), and  $w_o$  is the initial mean fish weight (g).

$$\text{Protein Efficiency Ratio} = (w_t - w_o) \times P^{-1}$$

where  $w_t$  is the final mean fish weight (g),  $w_o$  is the initial mean fish weight (g) and  $P$  is the weight of the protein in the fish diets (g).

All growth performance results are presented as the means, where  $n = 3$  tanks per group (10 fish/tank, 30 fish/group).

### Environmental sustainability assessment

The environmental sustainability assessment was calculated on the basis of raw data for growth performance and feed utilization parameters according to Rawski et al. (2020, 2021).

The relative usage of marine-derived feed materials – fish meal and fish oil – was calculated according to two formulas:



Fish Meal Use (g/kg of fish gain) = fish meal share in the diet (g/kg) × feed conversion ratio (g/g).

Fish Oil Use (g/kg of fish gain) = fish oil share in the diet (g/kg) × feed conversion ratio (g/g).

The fish-in-fish-out ratio (**FIFO**) was calculated as a practical measure of the quantity of live fish from capture fisheries required for each unit of farmed fish produced, as follows:

$$\begin{aligned} \text{FIFO} = & ((\text{level of fish meal in the diet (g/kg)} \\ & + \text{level of fish oil in the diet (g/kg)}) \\ & / (\text{yields of fish meal from wild fish (g/kg)} \\ & + \text{yields of fish oil from wild fish (g/kg)})) \\ & \times (\text{feed intake (g)} / \text{BW gain (g)}). \end{aligned}$$

where the yield of fish meal from wild fish was assumed to be 225 g/kg of fresh fish weight, and the yield of fish oil from wild fish was assumed to be 50 g/kg of fresh fish weight (Stejskal et al., 2020).

#### Sample collection and somatic indices

On the last day of the experiment, all fish were weighed individually, and ten animals from each tank (30 fish/group were used to collect samples for somatic indices) were euthanized using an overdose of MS-222 (Leary et al., 2013) and decapitated for dissection and sampling for further analysis. Measurements of the carcass, viscera and liver were recorded to calculate the condition factor, viscerosomatic index and hepatosomatic index as described by Hoffmann et al. (2020) as follows:

$$\text{Condition Factor} = \left[ w_t / (l_g)^3 \right] \times 100$$

where  $w_t$  is the final mean fish weight (g) and  $l_g$  is the total length of the body (cm).

$$\text{Viscerosomatic Index (\%)} = (v_t \times w_t^{-1}) \times 100$$

where  $v_t$  is the final visceral weight (g) and  $w_t$  is the final mean fish weight (g).

$$\text{Hepatosomatic Index (\%)} = (l_t \times w_t^{-1}) \times 100$$

where  $l_t$  is the final liver weight (g) and  $w_t$  is the final mean fish weight (g).

All somatic index results are presented as the means, where  $n = 30$  per group (3 tanks/treatment × 10 fish/tank = 30 fish/group).

Blood sampling was performed *post mortem*, and blood was collected by auricular and ventricular puncture from ten fish/tank (30 fish/group, analysed individually for each fish). Blood was collected from the animals using BD Vacutainer® SST™ II Advance tubes (BD Medical, New Jersey, USA). The blood was set aside for 20 min to form a clot. After this time, the blood was centrifuged for 15 min at 3500g in the temperature 4 °C (Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Germany). The obtained serum was transferred to new eppendorf tubes and frozen for further analysis at –80 °C.

#### Biological material analyses

Feed materials, experimental diets, and faeces were analysed according to the Association of Official Agricultural Chemists (AOAC) (2005) methodology for DM (934.01), CP (976.05), ether extract (920.39), crude ash (920.153) and crude fibre (985.29). TiO<sub>2</sub> analyses were performed according to the recommendations of Myers et al. (2004). The gross energy content was analysed according to the ISO 9831 method using an adiabatic bomb calorimeter (KL 12Mn, Precyzja-Bit PPHU, Poland) standardized with benzoic acid. For the chitin composition of the insect meals, the method described by Soon et al. (2018) was used.

#### Blood serum parameters

The blood serum parameters were assessed according to Kolodziejcki et al. (2018). To assay serum concentrations of total protein, albumin, glucose, triglycerides, and total cholesterol, commercial assay kits (Pointe Scientific, Canton, MI, USA) were used. The concentration of non-esterified fatty acids (NEFAs) was estimated with a kit from Wako Chemicals (Richmond VA, USA). Globulin values were calculated based on the total protein and albumin results. A liquid assay reagent set (Pointe Scientific, Canton, MI, USA) was used to determine the enzymatic activities of alanine aminotransferase (ALT), aspartate transaminase (AST), and gamma-glutamyl transpeptidase (GGT).

All blood serum results are presented as the means, where  $n = 30$  per group (3 tanks/treatment × 10 fish/tank = 30 fish/group).

#### Microbial community analysis by fluorescence in situ hybridization

The samples were prepared and observed following the protocols described by Józefiak et al. (2019). The oligonucleotide probes used for this study are shown in Table 1. The samples were visualized using a Carl Zeiss Axio Imager M2 Microscope. The numbers of detected bacteria are expressed in colony-forming units/g of digesta (CFU/ml) and were calculated according to Józefiak et al. (2019).

All microbiological results are presented as the means, where  $n = 3$  per group (digesta collected from 10 fish per tank pooled in one sample).

#### Digestibility trial

This experiment was performed to determine the apparent digestibility coefficients of CP and crude fat in experimental diets for brown trout. Metabolic tanks were used as a modification of the Allan et al. (1999) design according to Rawski et al. (2020). They were equipped with a conical bottom with a separation grille and a two-valve bottom separation and drainage system. The tanks were supplied with filtrated tap water in an open-flow system. The temperature was 15 °C ± 0.5 °C, the concentration of oxygen was 7.5 mg ± 0.3 mg/l, and the photoperiod was maintained at 17:7 (light:dark) during the entire experiment. The digestibility test lasted 45 days, including 15 days of the adaptation period and 30 days of the period of faecal sampling. For the experiment, 120

**Table 1**  
Oligonucleotide probes used in fluorescence in situ hybridization of digesta samples from brown trout.

Probe	Group of bacteria	Sequence 5'–3'	References
Car193	<i>Carnobacterium</i> spp.	AGC CAC CTT TCC TTC AAG	(Huber et al., 2004)
Enfm93	<i>Enterococcus</i> spp.	CCG GAA AAA GAG GAG TGG C	(Waar et al., 2005)
Lab722	<i>Lactobacillus</i> spp.	YCA CCG CTA CAC ATG RAG TTC CAC T	(Sghir et al., 2000)

fish with an average BW of 4.85 g were used and divided into four groups (3 tanks/group and 10 fish/tank). Fish were fed the same diets used in the growth performance trial. The feed was given at 1% fish weight per day for 6 h (from 07:00 h to 13:00 h) using automatic belt feeders. After feeding, the uneaten feed was removed. The accumulated faeces were obtained by opening the bottom separation system and collecting faeces for filtration vessels. Faecal collection was conducted three times per day between 07:00 h, 17:00 h, and 23:00 h. Filtration was carried out through cellulose filters. The obtained faeces were frozen at -20 °C for further analysis. The coefficients of apparent ileal digestibility of CP and crude fat were calculated according to the following formulas described by Kierończyk et al. (2018):

1. Coefficients of apparent total digestibility (%):

Coefficients of apparent total digestibility =  $1 - ((\text{TiO}_2 \text{ (g/kg) in the diet} / \text{TiO}_2 \text{ (g/kg) in the faeces}) \times (\text{nutrient (g/kg) in the faeces} / \text{nutrient (g/kg) in the diet}))$ .

All digestibility results are presented as the means, where the n value is equal to 3 per group (excreta collected from 10 fish from one tank during the whole experimental period pooled in one sample).

Statistical analysis

R studio software was used to analyse the data. To determine the normality of the data distribution and the equality of variances, Shapiro-Wilk and Bartlett's tests were used. One-way ANOVA was used, and if there were significant differences among treatments, further analysis was performed by corrected Duncan's post hoc test. Data are presented as the mean ± SE of the mean. The statistical significance level was declared at  $P < 0.05$ .

The statistical ANOVA was conducted according to the following general model:

$$Y_{ij} = \mu + \alpha_i + \delta_{ij}$$

where  $Y_{ij}$  is the observed dependent variable,  $\mu$  is the overall mean,  $\alpha_i$  is the effect of the diet, and  $\delta_{ij}$  is the random error.

Results

The final BW, BW gain, specific growth rate, daily intake rate, feed conversion ratio, protein efficiency ratio, and survival rate

**Table 2**  
Growth performance, feed utilization and environmental sustainability parameters of brown trout fed experimental diets.

Parameters	Treatments <sup>1</sup>				SEM	P-value
	CON	BSFL5	BSFL10	BSFL20		
<b>Growth performance</b>						
Initial BW (g)	4.81	4.67	4.75	5.00	0.0693	0.399
Final BW (g)	10.69	10.31	10.76	10.65	0.1299	0.684
BW gain (g)	5.88	5.64	6.02	5.64	0.1134	0.645
Specific growth rate (%/day)	1.38	1.37	1.42	1.31	0.0245	0.453
Survival rate (%)	100	100	100	100	0.0000	1.000
<b>Feed utilization</b>						
Daily intake rate (%/day)	1.29	1.30	1.32	1.30	0.0067	0.606
Feed intake (g, as fed)	5.79	5.64	5.90	5.87	0.0669	0.568
Feed conversion ratio	0.99	1.00	0.98	1.04	0.0140	0.456
Protein efficiency ratio	2.15	2.14	2.14	2.01	0.0301	0.343
<b>Environmental sustainability</b>						
Fish meal use (g/kg of fish gain)	345.33 <sup>a</sup>	325.00 <sup>a</sup>	295.00 <sup>b</sup>	260.83 <sup>c</sup>	10.2714	< 0.001
Fish oil use (g/kg of fish gain)	138.13 <sup>a</sup>	123.00 <sup>b</sup>	103.25 <sup>c</sup>	73.03 <sup>d</sup>	7.4534	< 0.001
FIFO	1.76 <sup>a</sup>	1.63 <sup>a</sup>	1.45 <sup>b</sup>	1.21 <sup>c</sup>	0.0641	< 0.001

Abbreviations: BSFL = black soldier fly larvae; CON = control group, without the addition of BSFL full-fat meal and with 35% fish meal; BSFL5 = 5% addition of BSFL full-fat meal and 32.5% fish meal; BSFL10 = 10% addition of BSFL full-fat meal and 30% fish meal; BSFL20 = 20% addition of BSFL full-fat meal and 25% fish meal; FIFO = fish-in-fish-out ratio.  
<sup>1</sup> Values are presented as the means (n = 3/treatment).<sup>a-d</sup> Values within a row with different superscripts differ significantly at  $P < 0.05$ .

were not affected by the addition of BSFL meal to the brown trout diet (Table 2). In the case of environmental sustainability, feed conversion efficiency did not show any differences among the groups. However, the results of fish meal use, fish oil use and FIFO decreased with an increasing share of insect meal ( $P < 0.001$ , Table 2).

The results of the condition and somatic indices are shown in Table 3. The condition factor was not affected by the inclusion of BSFL meal. In the case of viscerosomatic index, BSFL5 and BSFL20 were characterized by higher values than CON ( $P = 0.018$ ). The hepatosomatic index results decreased in all groups containing BSFL meal compared to CON ( $P < 0.001$ ).

All results of serum analysis are presented in Table 4. The AST values increased in BSFL10 and BSFL20 compared to CON ( $P = 0.002$ ). GGT and albumin showed decreased values in BSFL20 ( $P = 0.002$  and  $P < 0.001$ , respectively). In the case of NEFAs, BSFL20 had the highest value among the groups ( $P = 0.003$ ), similar to the globulin estimation ( $P < 0.001$ ). In the case of total cholesterol, only BSFL5 did not show any significant differences compared to CON; additionally, higher values were observed in BSFL10 and BSFL20 ( $P = 0.007$ ).

There were no significant differences among the groups in the total number of bacteria, *Carnobacterium* spp., *Lactobacillus* group, or *Enterococcus* spp. among the groups (Table 5).

The results of the digestibility trial are shown in Table 6. CP digestibility was decreased in all groups including BSFL meal except for BSFL10, which did not differ compared to CON ( $P < 0.001$ ), while crude fat digestibility was lower only in BSFL20 ( $P < 0.006$ ).

Discussion

Fish meal is the main animal protein source in salmonid fish nutrition. In recent years, up to 12% of the total fish production was used for non-food purposes, which was approximately 20 million tons. Moreover, the greatest part of this number was reduced to fish meal and fish oil (15 million tonnes) (Food and Agriculture Organization, 2018). It is estimated that up to 90% of fish delivered for non-food purposes could be used in human nutrition (Olsen and Hasan, 2012). This situation emphasizes research on innovative protein and fat sources for sustainable aquaculture. Based on data presented by Jannathulla et al. (2019), the FIFO ratio for salmonids decreased by 68% from 2000 to 2015. This trend is con-

**Table 3**  
Condition and somatic indices of brown trout fed experimental diets.

Parameter	Treatments <sup>1</sup>				SEM	P-value
	CON	BSFL5	BSFL10	BSFL20		
Condition factor	1.14	1.18	1.15	1.14	0.0069	0.120
Viscerosomatic index	12.82 <sup>b</sup>	14.22 <sup>a</sup>	13.15 <sup>ab</sup>	14.04 <sup>a</sup>	0.1872	0.018
Hepatosomatic index	1.97 <sup>a</sup>	1.71 <sup>c</sup>	1.81 <sup>b</sup>	1.82 <sup>b</sup>	0.0187	< 0.001

Abbreviations: BSFL = black soldier fly larvae; CON = control group, without the addition of BSFL full-fat meal and with 35% fish meal; BSFL5 = 5% addition of BSFL full-fat meal and 32.5% fish meal; BSFL10 = 10% addition of BSFL full-fat meal and 30% fish meal; BSFL20 = 20% addition of BSFL full-fat meal and 25% fish meal.

<sup>1</sup> Values are presented as the means ( $n = 30/\text{treatment}$ ).<sup>a-c</sup> Values within a row with different superscripts differ significantly at  $P < 0.05$ .

**Table 4**  
Selected serum biochemical values of brown trout fed experimental diets.

Parameter	Treatments <sup>1</sup>				SEM	P-value
	CON	BSFL5	BSFL10	BSFL20		
AST (U/l)	33.79 <sup>b</sup>	33.64 <sup>b</sup>	41.43 <sup>a</sup>	41.17 <sup>a</sup>	1.0097	0.002
ALT (U/l)	5.44	5.71	5.55	5.58	0.4349	0.997
GGT (U/l)	88.36 <sup>a</sup>	76.25 <sup>ab</sup>	89.72 <sup>a</sup>	66.48 <sup>b</sup>	2.5334	0.002
NEFAs (mmol/l)	0.71 <sup>b</sup>	0.70 <sup>b</sup>	0.76 <sup>b</sup>	0.94 <sup>a</sup>	0.0263	0.003
Triglycerides (mg/dl)	398.54	343.74	383.35	384.61	9.2414	0.181
Total cholesterol (mg/dl)	656.09 <sup>c</sup>	696.93 <sup>bc</sup>	812.58 <sup>a</sup>	770.67 <sup>ab</sup>	17.9087	0.007
Total protein (g/dl)	4.05	4.24	4.31	4.25	0.0589	0.441
Albumin (g/dl)	2.97 <sup>a</sup>	2.80 <sup>a</sup>	2.76 <sup>a</sup>	2.44 <sup>b</sup>	0.0452	< 0.001
Globulin (g/dl)	1.12 <sup>b</sup>	1.52 <sup>a</sup>	1.62 <sup>a</sup>	1.81 <sup>a</sup>	0.0627	< 0.001
Glucose (mg/dl)	69.73	66.80	72.13	73.05	1.3553	0.363

Abbreviations: BSFL = black soldier fly larvae; CON = control group, without the addition of BSFL full-fat meal and with 35% fish meal; BSFL5 = 5% addition of BSFL full-fat meal and 32.5% fish meal; BSFL10 = 10% addition of BSFL full-fat meal and 30% fish meal; BSFL20 = 20% addition of BSFL full-fat meal and 25% fish meal; AST = aspartate transaminase; ALT = alanine aminotransferase; GGT = gamma-glutamyl transpeptidase; NEFAs = non-esterified fatty acids.

<sup>1</sup> Values are presented as the means ( $n = 30/\text{treatment}$ ).<sup>a-c</sup> Values within a row with different superscripts differ significantly at  $P < 0.05$ .

**Table 5**  
Selected intestinal microbial populations in the digesta of brown trout fed experimental diets at the end of the experimental period.

Group of bacteria (CFU/ml)	Treatments <sup>1</sup>				SEM	P-value
	CON	BSFL5	BSFL10	BSFL20		
Total number of bacteria	9.06	9.01	9.17	9.11	0.0504	0.791
<i>Carnobacterium</i> spp.	8.32	7.92	8.44	8.20	0.0826	0.126
<i>Lactobacillus</i> group	8.51	8.50	8.84	8.66	0.0764	0.388
<i>Enterococcus</i> spp.	7.96	7.68	8.33	8.06	0.0949	0.083

Abbreviations: CFU = colony-forming units/g of digesta; BSFL = black soldier fly larvae; CON = control group, without the addition of BSFL full-fat meal and with 35% fish meal; BSFL5 = 5% addition of BSFL full-fat meal and 32.5% fish meal; BSFL10 = 10% addition of BSFL full-fat meal and 30% fish meal; BSFL20 = 20% addition of BSFL full-fat meal and 25% fish meal.

<sup>1</sup> Values are presented as the means ( $n = 3/\text{treatment}$ ).

**Table 6**  
Apparent digestibility coefficients of crude protein and crude fat in brown trout fed experimental diets.

Coefficients of apparent total digestibility (%)	Treatments <sup>1</sup>				SEM	P-value
	CON	BSFL5	BSFL10	BSFL20		
CP	98.6 <sup>a</sup>	98.3 <sup>b</sup>	98.4 <sup>ab</sup>	97.9 <sup>c</sup>	0.0008	<0.001
Crude fat	99.4 <sup>a</sup>	98.8 <sup>a</sup>	98.8 <sup>a</sup>	98.1 <sup>b</sup>	0.0016	<0.006

Abbreviations: BSFL = black soldier fly larvae; CON = control group, without the addition of BSFL full-fat meal and with 35% fish meal; BSFL5 = 5% addition of BSFL full-fat meal and 32.5% fish meal; BSFL10 = 10% addition of BSFL full-fat meal and 30% fish meal; BSFL20 = 20% addition of BSFL full-fat meal and 25% fish meal.

<sup>a-c</sup> Values within a row with different superscripts differ significantly at  $P < 0.05$ .

<sup>1</sup> Values are presented as the means ( $n = 3/\text{treatment}$ ).

needed to reduced availability and a higher demand for fish meal in aquaculture nutrition. The FIFO value for salmon in 2017 reached 1.87, which still creates a need for further diet optimization (Naylor et al., 2021). The results of the present study show that there is a possibility to balance isonitrogenous diets for brown trout with 20% BSFL meal and substitution of fish meal. Moreover, the parameters of environmental sustainability showed significant reductions in fish meal use, fish oil use and FIFO in aquafeeds. The inclusion of 20% BSFL meal as a replacement in high fish meal diets

reduced the FIFO ratio by 30%. What is crucial is that it did not result in deteriorated growth performance or feed utilization parameters. These results are in agreement with several studies performed on salmonids using a spectrum of BSFL meal doses and different meal production methods. However, according to Weththasinghe et al. (2021), the inclusion of 25% full-fat BSFL meal increased the value of feed conversion ratio, while inclusions of 6.25 and 12.5% did not affect this ratio in comparison to the control group in Atlantic salmon nutrition. In an experiment conducted on

sea trout (*Salmo trutta m. trutta*) by Hoffmann et al. (2020), the feed conversion ratio and protein efficiency ratio results were not affected by the addition of hydrolysed mealworm (*Tenebrio molitor*) meal. However, Mikołajczak et al. (2020) reported that the addition of enzyme-hydrolysed mealworm and superworm (*Zophobas morio*) meals caused a decrease in protein efficiency ratio values compared to the control group. It is important to emphasize that this effect was not observed in the present study. These observations suggest that protein assimilation of full-fat BSFL meal at the level of 20% in brown trout did not differ from the values observed in the control group. Moreover, the usage of BSFL meal did not cause any adverse effects on the survival rate.

The inclusion of insect meal in brown trout diets led to increasing viscerosomatic index results. This outcome is in agreement with experiment conducted on Atlantic salmon, where the inclusion of *H. illucens* affected the numerically increased viscerosomatic index (Stenberg et al., 2019). The increasing results are mainly explained by the higher hepatic and intraperitoneal fat contents. Numerically lower triglycerides levels in blood serum of all groups containing insects compared to CON can potentially support this thesis due to the action of specific enzymes which could hydrolyse triglycerides transported in the bloodstream, thus providing free fatty acids for uptake by adipose tissue (Zhang et al., 2017). However, in the present study, the addition of BSFL meal to brown trout diets led to a decrease in the hepatosomatic index value. From a physiological point of view, hepatosomatic index is a substantial index used to investigate the effects of diet on liver functionality, fish health and body condition (Dernekbaşı, 2012). This decrease can be a manifestation of lower fat accumulation in the liver due to a reduction in crude fat utilization or lack of its retention. Nevertheless, this effect can be considered positive compared to other studies, which showed opposite results, where the addition of superworm and hydrolysed mealworm meals led to an increase in the hepatosomatic index values of sea trout (Hoffmann et al., 2020; Mikołajczak et al., 2020), especially since values oscillating between 1–2% are taken as a range reported for healthy salmonid fish (Munshi and Dutta, 2017). Due to described situation, another explanation for higher viscerosomatic index results in insect groups may be an increase in relative intestinal length or intestinal weight (Melenchón et al., 2021). While the increasing length of intestines should provide to higher digestibility of nutrients, this explanation is not supported by our findings. However, it could be speculated that higher viscerosomatic index results are connected with increasing weight of intestines, which could be effect of thicker muscular layer in BSFL groups. The main muscular layer function is to promote intestine peristalsis – a thicker muscularis increase the rate of peristalsis, and the time of digesta remaining in intestines is decreased, thus decreasing the time for absorption of nutrients, which in fact is one of the argument to explain lower digestibility of CP in insect addition groups (Liu et al., 2018).

The 10 and 20% substitutions of full-fat BSFL meal led to decreasing AST concentrations in the blood serum of brown trout. Simultaneously, the ALT concentration did not change among the groups. These aminotransferase enzymes are used as indicators to estimate liver and kidney damage and increase during stress factor influence (Kilercioglu et al., 2020). The normal range of AST concentration for mature Atlantic salmon has been estimated to be 202 – 351 IU/l depending on the season (Sandnes et al., 1988), and similar results have been reported for other salmonid species of different ages. However, our distinctly lower AST (33.64 – 41.43 IU/l) results are in agreement with those conducted on rainbow trout (Pastorino et al., 2020) and sea trout (Mikołajczak et al., 2020). GGT enzyme activity occurs especially in biliary liver cells. According to Kumar et al. (2017), increasing GGT values can be considered a negative effect due to liver insufficiency. However,

the addition of BSFL5 and BSFL20 led to a reduction in this enzyme in blood serum. In the case of the lipid profile in the biochemistry of blood serum, an increase in NEFAs concentration in BSFL20 was observed, along with increases in the total cholesterol values in BSFL10 and BSFL20; however, the concentration of triglycerides did not differ among the groups. These observations are in line with the findings of Mikołajczak et al. (2020). It is important to emphasize that blood cholesterol seems to play an important role in the fish immune system (Deng et al., 2013). In particular, triglycerides values were numerically lower in the BSFL groups, which can be related to dietary chitin occurrence and its potential to bind bile acids and free fatty acids (Gasco et al., 2018). Regarding the protein profile of blood serum, the albumin level decreased in the BSFL20 group, while the globulin concentration increased in all BSFL groups. Higher globulin values may be correlated with lipid profiles because  $\beta$ -globulins are responsible for the transport of plasma fats and lipids (Chernyavskikh et al., 2019).

The results of the present study showed that the addition of BSFL meal did not lead to changes in the microbiota of GIT among the groups. According to Rimoldi et al. (2019), the microbiota of rainbow trout fed BSF meal manifested a reduction in potential pathogenic genera, such as *Aeromonas* and *Citrobacter*. However, no effects on the concentrations of *Lactobacillus* or *Enterococcus* were observed. Conversely, Huyben et al. (2019) reported that 30% addition of meals from different black soldier fly life stages provided an abundance of lactic acid bacteria in the GIT microbiota of rainbow trout. Similarly, in an experiment conducted on rainbow trout by Józefiak et al. (2019), the inclusion of several insect species – black soldier fly, mealworm, tropical house cricket (*Grylodes sigillatus*), and Turkestan cockroach (*Blatta lateralis*) – at the level of 20% provided an increased number of *Lactobacillus* sp./*Enterococcus* sp. In addition, in the same study, a higher concentration of *Clostridium coccoides* was observed. Another experiment showed that the addition of 10% hydrolysed superworm meal in a sea trout diet led to decreases in the concentration of *Aeromonas* spp., *Carnobacterium* spp., and *Enterococcus* spp., while the total numbers of bacteria, bacteria from the *Lactobacillus* group and *Bacillus* spp. were not affected by this source of protein. Nevertheless, the inclusion of hydrolysed mealworm meal provided lower concentrations of *Carnobacterium* spp. and *Lactobacillus* groups in the GIT microbiota of sea trout compared to a control diet based on fish meal (Mikołajczak et al., 2020).

The results of the digestibility test showed that inclusion of 20% BSFL in brown trout diets led to lower CP and crude fat digestibility. These findings are in agreement with Basto et al. (2020), where the inclusion of full-fat and defatted BSFL meal in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) resulted in a decrease in CP from 92.6% for the reference diet to 89.3% for full-fat BSFL meal, along with a decrease in crude fat digestibility from 98.2% for the reference diet to 96.8% for full-fat BSFL meal. The decrease in crude fat digestibility by BSFL inclusion was previously reported by Weththasinghe et al. (2021) in experiments conducted on Atlantic salmon. Lower digestibility values of CP in groups fed insects can be explained by the high level of chitin present in the BSFL exoskeleton. According to the literature, even when the gastrointestinal microbiome functions properly and in balance and chitinase activity has been detected in the digestive system, the chitin digestibility is usually very low (Renna et al., 2017). Moreover, the presence of chitin in mealworms and black soldier flies is negatively correlated with the digestibility of CP (Marono et al., 2015). The lower utilization of nutrients in experimental groups can be an effect of higher crude fibre levels in diets (Nguyen et al., 2018). However, it is important to emphasize that despite some statistically significant differences, the percentage disparities were not high and oscillated between 97.9–98.6% for CP and 98.1–99.4% for crude fat, indicating the high digestibility of these nutrients. The differences among the treat-

ments, despite their significant character from a statistical point of view, may not be relevant in terms of their biological meaning, as confirmed by the growth performance results.

## Conclusion

In conclusion, the results of the present study showed that the use of up to 20% BSFL full-fat meal in brown trout diets may be applied with no adverse effects on growth performance and feed utilization. Despite the fact that insect meal dietary application caused decreases in CP and crude fat digestibility. The physiological status based on organosomatic indices and biochemical blood parameters was not affected by insect diets, and the homeostasis of fish organisms was not disturbed. The composition of the GIT microbiota was not affected by the experimental diets. Considering all of the factors mentioned above, *H. illucens* can be a promising protein source and fishmeal replacement in brown trout nutrition.

## Ethics approval

The experimental protocols and methods utilized during this study complied with the recommendations of Directive 2010/63/EU of the European Parliament and the council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes, the Polish law of 15 January 2015 on the protection of animals used for scientific purposes (Dz.U.2015 poz. 266), and the good practices and recommendations of the National Ethics Committee for Animal Experiments and the Local Ethics Committee for Animal Experiments of Poznań University of Life Sciences. The place of experimentation was certified for animal experiments by the National Ethics Committee for Animal Experiments (based on authorization by the Ministry of Science and Higher Education – approved unit no. 0091) – the Laboratory of Inland Fisheries and Aquaculture (the Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science of Poznań University of Life Sciences).

## Data and model availability statement

None of the data were deposited in an official repository. The data that support the study are available upon request.

## Author ORCIDs

Z. Mikołajczak, 0000-0003-4869-8260  
 M. Rawski, 0000-0001-8734-724X  
 J. Mazurkiewicz, 0000-0002-3344-1094  
 B. Kierończyk, 0000-0001-6006-117X  
 P. Kołodziejwski, 0000-0003-0715-0223  
 E. Pruszyńska-Oszmałek, 0000-0002-7182-6905  
 D. Józefiak, 0000-0002-6606-7975

## Author contributions

**Z. Mikołajczak:** conceptualization, methodology, software, formal analysis, investigation, data curation, writing the original draft, writing – review & editing

**M. Rawski:** conceptualization, methodology, formal analysis, investigation, data curation, writing – review & editing

**J. Mazurkiewicz:** conceptualization, methodology, validation, formal analysis, investigation, resources, data curation, writing – review & editing, project administration, funding acquisition

**B. Kierończyk:** software, formal analysis, investigation, data curation, writing – review & editing

**P. Kołodziejwski:** software, formal analysis, data curation, writing – review & editing

**E. Pruszyńska-Oszmałek:** software, formal analysis, data curation, writing – review & editing

**D. Józefiak:** conceptualization, methodology, validation, formal analysis, investigation, resources, data curation, writing – review & editing, supervision, project administration, funding acquisition

## Declaration of interest

None.

## Acknowledgements

We gratefully acknowledge contributions and logistical support provided by Poznań University of Life Sciences. The authors would like to thank Sanan Talibov, Silvia Nogales-Mérida and Abdelbasset Benzertiha for their contribution to the technical parts of the insect meal and feed preparation, the growth experiment, and data analysis.

## Financial support statement

This work was supported by the project TEAM TECH no. POIR.04.04.00-00-204E/16-00, titled Insects as Novel Protein Sources for Fish and Poultry, financed by the Foundation of Polish Science (POIR 4.4); the funds of Poznań University of Life Sciences; and funds of the National Centre for Research and Development, no POIR.01.01.01-00-0828/15, titled InnSecta: Innovative Technology of Feedstuffs Production Based on Insect Biomass. The research was financed/co-financed within the framework of Ministry of Science and Higher Education program as “Regional Initiative Excellence” 2019–2022, Project No. 005/RID/2018/19.

## Supplementary materials

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.animal.2022.100516>.

## References

- Allan, G.L., Rowland, S.J., Parkinson, S., Stone, D.A.J., Jantrarat, W., 1999. Nutrient digestibility for juvenile silver perch *Bidyanus bidyanus*: Development of methods. *Aquaculture* 170, 131–145.
- Association of Official Agricultural Chemists (AOAC), 2005. Official Methods of Analysis. AOAC, Arlington, VA, USA.
- Basto, A., Matos, E., Valente, L.M.P., 2020. Nutritional value of different insect larvae meals as protein sources for European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles. *Aquaculture* 521, 735085.
- Cardinaletti, G., Randazzo, B., Messina, M., Zarantoniello, M., Giorgini, E., Zimbelli, A., Bruni, L., Parisi, G., Olivetto, I., Tulli, F., 2019. Effects of graded dietary inclusion level of full-fat hermetia *illucens* prepupae meal in practical diets for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Animals* 9, 251.
- Chernyavskikh, S.D., Borodaeva, Z., Borisovskiy, I.P., Ostapenko, S.I., Galtseva, O.A., 2019. Blood protein spectrum in representatives of the fish superclass. *EurAsian Journal of BioSciences* 13, 979–981.
- Deng, J., Kang, B., Tao, L., Rong, H., Zhang, X., 2013. Effects of dietary cholesterol on antioxidant capacity, non-specific immune response, and resistance to *Aeromonas hydrophila* in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed soybean meal-based diets. *Fish and Shellfish Immunology* 34, 324–331.
- Dernekbaşı, S., 2012. Digestibility and liver fatty acid composition of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed by graded levels of canola oil. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 12, 105–113.
- Food and Agriculture Organization, 2018. The State of World Fisheries and Aquaculture 2018 - Meeting the sustainable development goals. FAO, Rome, Italy.
- Gasco, L., Finke, M., van Huis, A., 2018. Can diets containing insects promote animal health? *Journal of Insects as Food and Feed* 4, 1–4.
- Henry, M.A., Gasco, L., Chatzifotis, S., Piccolo, G., 2018. Does dietary insect meal affect the fish immune system? The case of mealworm, *Tenebrio molitor* on European sea bass, *Dicentrarchus labrax*. *Developmental and Comparative Immunology* 81, 204–209.
- Hoffmann, L., Rawski, M., Nogales-Merida, S., Mazurkiewicz, J., 2020. Dietary inclusion of *Tenebrio molitor* meal in sea trout larvae rearing: Effects on fish

- growth performance, survival, condition, and GIT and liver enzymatic activity. *Annals of Animal Science* 20, 579–598.
- Huber, I., Spanggaard, B., Appel, K.F., Rossen, L., Nielsen, T., Gram, L., 2004. Phylogenetic analysis and in situ identification of the intestinal microbial community of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). *Journal of Applied Microbiology* 96, 117–132.
- Huyben, D., Vidaković, A., Werner Hallgren, S., Langeland, M., 2019. High-throughput sequencing of gut microbiota in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed larval and pre-pupae stages of black soldier fly (*Hermetia illucens*). *Aquaculture* 500, 485–491.
- Jannathulla, R., Rajaram, V., Kalanjiam, R., Ambasankar, K., Muralidhar, M., Dayal, J. S., 2019. Fishmeal availability in the scenarios of climate change: Inevitability of fishmeal replacement in aquafeeds and approaches for the utilization of plant protein sources. *Aquaculture Research* 50, 3493–3506.
- Józefiak, A., Engberg, R.M., 2017. Insect proteins as a potential source of antimicrobial peptides in livestock production. A review. *Journal of Animal and Feed Sciences* 26, 87–99.
- Józefiak, A., Nogales-Mérida, S., Mikołajczak, Z., Rawski, M., Kierończyk, B., Mazurkiewicz, J., 2019. The Utilization of Full-Fat Insect Meal in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Nutrition: The Effects on Growth Performance, Intestinal Microbiota and Gastrointestinal Tract Histomorphology. *Annals of Animal Science* 19, 747–765.
- Kierończyk, B., Rawski, M., Józefiak, A., Mazurkiewicz, J., Świątkiewicz, S., Siwek, M., Bednarczyk, M., Szumacher-Strabel, M., Cieślak, A., Benzertiha, A., Józefiak, D., 2018. Effects of replacing soybean oil with selected insect fats on broilers. *Animal Feed Science and Technology* 240, 170–183.
- Kilercioglu, S., Ay, O., Oksuz, H., Yilmaz, M.B., 2020. The effects of the neurotoxic agent emamectin benzoate on the expression of immune and stress-related genes and blood serum profiles in the Rainbow trout. *Molecular Biology Reports* 47, 5243–5251.
- Kolodziejski, P.A., Sassek, M., Chalupka, D., Leciejewska, N., Nogowski, L., Mackowiak, P., Jozefiak, D., Stadnicka, K., Siwek, M., Bednarczyk, M., Szwaczkowski, T., Pruszyńska-Oszmalek, E., 2018. GLP1 and GIP are involved in the action of synbiotics in broiler chickens. *Journal of Animal Science and Biotechnology* 9, 1–9.
- Kumar, N., Krishnani, K.K., Gupta, S.K., Singh, N.P., 2017. Cellular stress and histopathological tools used as biomarkers in *Oreochromis mossambicus* for assessing metal contamination. *Environmental toxicology and pharmacology* 49, 137–147.
- Leary, S., Underwood, W., Anthony, R., Cartner, S., 2013. AVMA Guidelines for the Euthanasia of Animals. AVMA, Schaumburg, IL, USA.
- Liu, W., Wu, J.P., Li, Z., Duan, Z.Y., Wen, H., 2018. Effects of dietary coated protease on growth performance, feed utilization, nutrient apparent digestibility, intestinal and hepatopancreas structure in juvenile Gibel carp (*Carassius auratus gibelio*). *Aquaculture Nutrition* 24, 47–55.
- Marono, S., Piccolo, G., Loponte, R., Meo, C.D., 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.
- Melenchón, F., Larrán, A.M., de Mercado, E., Hidalgo, M.C., Cardenete, G., Barroso, F. G., Fabrikov, D., Lourenço, H.M., Pessoa, M.F., Tomás-Almenar, C., 2021. Potential use of black soldier fly (*Hermetia illucens*) and mealworm (*Tenebrio molitor*) insectmeals in diets for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture Nutrition* 27, 491–505.
- Melgar-Lalanne, G., Hernández-Álvarez, A.J., Salinas-Castro, A., 2019. Edible Insects Processing: Traditional and Innovative Technologies. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 18, 1166–1191.
- Mikołajczak, Z., Rawski, M., Mazurkiewicz, J., Kierończyk, B., Józefiak, D., 2020. The effect of hydrolyzed insect meals in sea trout fingerling (*Salmo trutta m. trutta*) diets on growth performance, microbiota and biochemical blood parameters. *Animals* 10, 1031.
- Munshi, J.S.D., Dutta, H.M., 2017. Fish morphology: Horizon of new research. Routledge, London, UK.
- Myers, W.D., Ludden, P.A., Nayigihugu, V., Hess, B.W., 2004. Technical Note: A procedure for the preparation and quantitative analysis of samples for titanium dioxide. *Journal of Animal Science* 82, 179–183.
- Naylor, R.L., Hardy, R.W., Buschmann, A.H., Bush, S.R., Cao, L., Klinger, D.H., Little, D. C., Lubchenco, J., Shumway, S.E., Troell, M., 2021. A 20-year retrospective review of global aquaculture. *Nature* 591, 551–563.
- Nguyen, H.Q., Chu, T.C., Nguyen, T.T., Le Lund, I., 2018. Effects of Dietary Digestible Protein and Energy Levels on Growth Performance, Feed Utilization, and Body Composition of Juvenile Permit, *Trachinotus falcatus* (Linnaeus, 1758). *Journal of the World Aquaculture Society* 49, 943–952.
- Nogales-Mérida, S., Gobbi, P., Józefiak, D., Mazurkiewicz, J., Dudek, K., Rawski, M., Kierończyk, B., Józefiak, A., 2018. Insect meals in fish nutrition. *Reviews in Aquaculture* 11, 1080–1103.
- Olsen, R.L., Hasan, M.R., 2012. A limited supply of fishmeal: Impact on future increases in global aquaculture production. *Trends in Food Science and Technology* 27, 120–128.
- Pastorino, P., Bergagna, S., Dezzutto, D., Barbero, R., Righetti, M., Pagliasso, G., Gasco, L., Gennero, M.S., Pizzul, E., Dondo, A., Prearo, M., 2020. Long-Term Assessment of Baseline Blood Biochemistry Parameters in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Maintained under Controlled Conditions. *Animals* 10, 1466.
- Rawski, M., Mazurkiewicz, J., Kierończyk, B., Józefiak, D., 2020. Black soldier fly full-fat larvae meal as an alternative to fish meal and fish oil in siberian sturgeon nutrition: The effects on physical properties of the feed, animal growth performance, and feed acceptance and utilization. *Animals* 10, 2119.
- Rawski, M., Mazurkiewicz, J., Kierończyk, B., Józefiak, D., 2021. Black Soldier Fly Full-Fat Larvae Meal is More Profitable than Fish Meal and Fish Oil in Siberian Sturgeon Farming: The Effects on Aquaculture Sustainability, Economy and Fish GIT Development. *Animals* 11, 604.
- Renna, M., Schiavone, A., Gai, F., Dabbou, S., Lussiana, C., Malfatto, V., Prearo, M., Capucchio, M.T., Biasato, I., Biasibetti, E., De Marco, M., Brugiapaglia, A., Zoccarato, I., Gasco, L., 2017. Evaluation of the suitability of a partially defatted black soldier fly (*Hermetia illucens* L.) larvae meal as ingredient for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) diets. *Journal of Animal Science and Biotechnology* 8, 1–13.
- Rimoldi, S., Gini, E., Iannini, F., Gasco, L., Terova, G., 2019. The effects of dietary insect meal from *Hermetia illucens* prepupae on autochthonous gut microbiota of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Animals* 9, 143.
- Sandnes, K., Lie, O., Waagbø, R., 1988. Normal ranges of some blood chemistry parameters in adult farmed Atlantic salmon, *Salmo salar*. *Journal of Fish Biology* 32, 129–136.
- Sghir, A., Gramet, G., Suau, A., Rochet, V., Pochart, P., Dore, J., 2000. Quantification of bacterial groups within human fecal flora by oligonucleotide probe hybridization. *Applied and Environmental Microbiology* 66, 2263–2266.
- Smetana, S., Schmitt, E., Mathys, A., 2019. Sustainable use of *Hermetia illucens* insect biomass for feed and food: Attributional and consequential life cycle assessment. *Resources, Conservation and Recycling* 144, 285–296.
- Soon, C.Y., Tee, Y.B., Tan, C.H., Rosnita, A.T., Khalina, A., 2018. Extraction and physicochemical characterization of chitin and chitosan from *Zophobas morio* larvae in varying sodium hydroxide concentration. *International Journal of Biological Macromolecules* 108, 135–142.
- Stejskal, V., Tran, H.Q., Prokesova, M., Gebauer, T., Giang, P.T., Gai, F., Gasco, L., 2020. Partially defatted *Hermetia illucens* larva meal in diet of eurasian perch (*Perca fluviatilis*) juveniles. *Animals* 10, 1876.
- Stenberg, O.K., Holen, E., Piemontese, L., Liland, N.S., Lock, E.J., Espe, M., Belghit, I., 2019. Effect of dietary replacement of fish meal with insect meal on in vitro bacterial and viral induced gene response in Atlantic salmon (*Salmo salar*) head kidney leukocytes. *Fish and Shellfish Immunology* 91, 223–232.
- Twibell, R.G., Wilson, R.P., 2002. Nutrient requirements and feeding of finfish for aquaculture. *Aquaculture* 1, 419–420.
- Vandeputte, M., Labbé, L., 2012. Cultured Aquatic Species Information Programme. *Salmo trutta*. FAO Culture Species Information programme, Rome, Italy.
- Waar, K., Degener, J.E., Van Luyn, M.J., Harmsen, H.J.M., 2005. Fluorescent in situ hybridization with specific DNA probes offers adequate detection of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* in clinical samples. *Journal of Medical Microbiology* 54, 937–944.
- Weththasinghe, P., Hansen, J., Nøklund, D., Lagos, L., Rawski, M., Øverland, M., 2021. Full-fat black soldier fly larvae (*Hermetia illucens*) meal and paste in extruded diets for Atlantic salmon (*Salmo salar*): Effect on physical pellet quality, nutrient digestibility, nutrient utilization and growth performances. *Aquaculture* 530, 735785.
- Zhang, D., Yan, Y., Tian, H., Jiang, G., Li, X., Liu, W., 2017. Resveratrol supplementation improves lipid and glucose metabolism in high-fat diet-fed blunt snout bream. *Fish Physiology and Biochemistry* 44, 163–173.



## BLACK SOLDIER FLY FULL-FAT MEAL IN ATLANTIC SALMON NUTRITION – PART A: EFFECTS ON GROWTH PERFORMANCE, FEED UTILIZATION, SELECTED NUTRIPHYSIOLOGICAL TRAITS AND PRODUCTION SUSTAINABILITY IN FRIES\*

Zuzanna Mikołajczak<sup>1</sup>, Jan Mazurkiewicz<sup>2</sup>, Mateusz Rawski<sup>2</sup>, Bartosz Kierończyk<sup>1</sup>, Agata Józefiak<sup>3</sup>, Sylwester Świątkiewicz<sup>4</sup>, Damian Józefiak<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Animal Nutrition, Poznań University of Life Sciences, Wołyńska 33, 60-637 Poznań, Poland

<sup>2</sup>Laboratory of Inland Fisheries and Aquaculture, Department of Zoology, Poznań University of Life Sciences, Wojska Polskiego 71c, 60-625 Poznań, Poland

<sup>3</sup>Department of Preclinical Sciences and Infectious Diseases, Poznań University of Life Sciences, Wołyńska 35, 60-637 Poznań, Poland

<sup>4</sup>Department of Animal Nutrition and Feed Science, National Research Institute of Animal Production, 32-083 Balice n. Kraków, Poland

\*Corresponding author: damian.jozefiak@up.poznan.pl

### Abstract

Black soldier fly larva meal (BSFM) application as an innovative feed material has been developed in aquaculture nutrition. However, recent scientific literature is still lacking in the case of insect meal effects on different stages of salmonid fish, and the vast majority of research is focused on farmed Atlantic salmon. Therefore, the holistic approach was undertaken in the cycle of two studies carried out: on fries and pre-smolts. This study aimed to evaluate the effect of fish meal (FM) replacement by full-fat BSFM in Atlantic salmon fry diets on the growth performance, feed utilization, crude protein and crude fat digestibility, somatic indices, histomorphology of intestines, and environmental sustainability. Additionally, pellet quality was assessed. Two experiments were performed on 360 Atlantic salmon fries – each of which lasted 60 days. For the first experiment, 240 individuals were distributed to four experimental groups: six replicates (tanks) per group and 10 fish per tank. For the second experiment, 120 individuals were distributed to four experimental groups: three replicates (tanks) per group and 10 fish per tank were used. The following groups were applied: CON – without the addition of full-fat BSFM and with 39% FM; BSFM5 – with 5% addition of full-fat BSFM and 36.1% FM; BSFM10 – with 10% full-fat BSFM and 33.3% FM; BSFM15 – with 15% addition of full-fat BSFM and 30.3% FM. The present study showed satisfactory results of BSFM inclusion at the levels of 5% and 10% as a replacement for fish meal in feeds for Atlantic salmon fries. No negative effects on growth performance, feed utilization, protein and fat digestibility, or intestinal structure were recorded. Simultaneously, insect meal inclusion in Atlantic salmon diets significantly improved the environmental sustainability of the feed. In the case of BSFM15, decreases in body weight gain, protein lipid efficiency ratio, and lipid efficiency ratio, as well as increases in feed conversion ratio, were observed. Therefore, the use of shares higher than 10% of BSFM in Atlantic salmon fries may not be recommended.

**Key words:** black soldier fly, Atlantic salmon nutrition, innovative feed materials, sustainability, insect meals

A wide spectrum of insect meals as a replacement for fish meal (FM) have been studied in various salmonids: rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) (Cardinaletti et al., 2019; Józefiak et al., 2019; Bruni et al., 2020), sea trout (*Salmo trutta* m. *trutta*) (Hoffmann et al., 2020, 2021 b; Mikołajczak et al., 2020), and brown trout (Mikołajczak et al., 2022). In addition to these new innovative products, those produced from insects have been started to R&D for trout feed (Acar et al., 2021). However, in Atlantic salmon (*Salmo salar*) nutrition, the main focus is on black soldier fly larvae meal (BSFM; *Hermetia illucens*) due to the large aquaculture scale and the highest

meal availability (Belghit et al., 2019 a; Biancarosa et al., 2019; Stenberg et al., 2019; Li et al., 2020; Weththasinghe et al., 2021 a). The BSFM application as an innovative feed material has been developed in aquaculture nutrition due to its sustainability in terms of land use, water consumption, CO<sub>2</sub> emissions, short larval rearing period, and especially its ability to convert food waste to high-quality feed (Sprangers et al., 2017; Meneguz et al., 2018; Zarantonello et al., 2021). Additionally, in recent scientific literature, insect meals are considered a source of antimicrobial peptides (AMPs) (Xia et al., 2021), chitin (Gaudioso et al., 2021), and lauric acid (Belghit et

\*This work was supported by the funds of the National Centre for Research and Development, no. POIR.01.01.01-00-0828/15, titled Inn-Secta: Innovative Technology of Feedstuffs Production Based on Insect Biomass and the funds of Poznań University of Life Sciences.

al., 2019 b), which seem to be chemical compounds that positively affect the microbiome of the gastrointestinal tract and immune system.

The vast majority of research and review papers point to environmental sustainability as the main argument for the use of insects in aquaculture nutrition (Arru et al., 2019; Goyal et al., 2021). However, only a few research works focused on growth performance and feed utilization simultaneously apply calculations that would confirm the environmental balance of insects (Stejskal et al., 2020; Rawski et al., 2021). One of the simplest methods to assess the sustainability of novel protein sources is the application of the fish-in-fish-out ratio, which is the combination of an improved feed conversion ratio (FCR) and a reduction in FM and fish oil ratios (Naylor et al., 2021). Based on the data already obtained during growth trials, it is possible to easily assess the environmental sustainability of the innovative feed materials used, which in the future will allow for more effective meta-analyses in this field, as well in species other than salmonids. Additionally, there is a lack of data about full-fat BSFM usage among stages of Atlantic salmon production. Due to their natural life cycle, the species reproduces in two environments – fresh and salt waters (Hosfeld et al., 2009). In nature they undergo long-distance migrations, which is an important step in their maturity, and the change in the environment from fresh to seawater is connected with several physiological responses, a process called smoltification (Juntti and Fernald, 2016).

Considering significant changes taking place during this process in salmon physiology, it can be assumed that it is important to implement similar experimental diets in different life stages of Atlantic salmon as a continuation in a cycle of two treatments. Because the results obtained in the case of young and older individuals cannot be compared with each other in any way, it is important to create a niche in which nutritional research will be extended for the further period of salmon rearing. For instance, Lazzarotto et al. (2015) showed that the effect of applied diets in salmonids can be related to fish age. Based on this research, the early inclusion of plant-based materials may significantly influence reproduction performance and survival rates, while older fish are less susceptible to this effect. A comprehensive approach to fish nutrition, especially in terms of life stage, will help to explain alimentary factor modes of action and effects on the growth performance, feed utilization, and health of fish, especially in the case of studies on innovative feed materials. Additionally, a key factor, which is production sustainability, is omitted in most scientific papers. Therefore, the holistic approach was undertaken in the cycle of two studies carried out: on fries and pre-smolts.

The current study aimed to present the results of study performed on Atlantic salmon fries at the laboratory scale. The scientific goals of the study were to assess the possibility of dietary application of BSFM at the levels of 5, 10, and 15% as the substitution of FM, and their effects on growth performance, feed utilization, and

selected nutriphysiological traits of fish, as well as to calculate the environmental potential of this innovative feed material. To meet this question, the research hypothesis was that the usage of BSFM in diets for Atlantic salmon will not affect growth parameters, feed utilization, and designated gastrointestinal tract functions and structures, and at the same time, it will increase the environmental sustainability of fish feed.

## Material and methods

### Ethical statement

The experimental protocols and methods utilized during this study complied with the recommendations of Directive 2010/63/EU of the European Parliament and the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes, the Polish law of 15 January 2015 on the protection of animals used for scientific purposes (Journal of Laws 2015, item 266), and the good practices and recommendations of the National Ethics Committee for Animal Experiments and the Local Ethics Committee for Animal Experiments of Poznań University of Life Sciences. The place of experimentation was certified for animal experiments by the National Ethics Committee for Animal Experiments (based on authorization by the Ministry of Science and Higher Education – approved unit no. 0091) – the Laboratory of Inland Fisheries and Aquaculture (the Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science of Poznań University of Life Sciences).

### Insect full-fat meal preparation

Insect biomass was purchased from HiProMine S.A., Robakowo, Poland. BSF larvae were fed a mix of plant byproducts normalized in terms of dry matter (DM) content by the addition of wheat middlings (Weththasinghe et al., 2021 a). The biomass of insects was frozen at  $-20^{\circ}\text{C}$  and then dried first at  $130^{\circ}\text{C}$  for 1 hour and then at  $80^{\circ}\text{C}$  for 23 hours until a constant weight was reached using a chamber air dryer (HiProMine S.A., Robakowo, Poland). The prepared insects were homogenized using a beater mill (diameter less than 0.1 mm) to obtain a full-fat meal. The chemical analyses of meals were performed in the Laboratory of the Department of Animal Nutrition (Poznań University of Life Sciences). Ingredients were analysed according to the procedures described in detail below.

Amino acid profile analyses were performed to assess the amount of protein and amino acids as well as for conversion factor establishment for BSFM. The BSFM protein content was estimated based on the amino acid content. In further calculations for the diet, the conversion factor ( $K_p$ ) for BSFM was calculated according to the following formula:

$$K_p = (\text{total amino acid content} / \text{total protein content} \text{ based on } N \times 6.25 \text{ analysis}) \times 6.25$$



The formula was based on the ratio of amino acids to total protein content with  $N \times 6.25$  conversion, as previously established by Janssen et al. (2017). Due to the presence of chitin in insect biomass, which could lead to overestimation of protein, a calculation based on the analysis of BSFM used for the present experiment was performed, i.e.:

$$BSFM\ Kp = (412.1\ g/503.1\ g) \times 6.25 = 5.12$$

where:

412.1 g was the sum of amino acids in 1000 g of BSFM DM;

503.1 g was the total protein content in 1000 g of BSFM calculated on an  $N \times 6.25$  basis;

6.25 was the traditionally used  $Kp$ ;

5.12 was the  $Kp$  calculated for BSFL.

The nutritional composition and amino acid profile of the meals corrected by calculated KP are presented in Table 1.

### Diet formulation and preparation

The isonitrogenous, isoenergetic, and isolipidic diets were manufactured: a control diet (CON) and three experimental diets. The arrangement of diets was as follows: CON – without the addition of full-fat BSFM and with 39% FM; BSFM5 – with 5% addition of full-fat BSFM and 36.1% FM; BSFM10 – with 10% full-fat BSFM and 33.3% FM; BSFM15 – with 15% addition of full-fat BSFM and 30.3% FM. All experimental diets were manufactured at the Experimental Station of Feed Production Technology and Aquaculture in Muchocin, Poland using a single-screw extruder (Metalchem S-60, Gliwice, Poland). The extrusion conditions were 90°C in the cylinder and 110°C in the head, 52 rpm screw speed, and a matrix size of 2 mm (Rawski et al., 2020). After drying and screening of dusty fractions, pellets were sprayed at 40°C with fish oil in the amount specified in the recipe. The diets were packed in plastic bags and stored at –18°C. The ingredient composition of the diets used in the fry experiments is presented in Table 2.

### Biological material analyses

Experimental diets and faeces (sampled during digestibility trial – description below) were analysed according to the AOAC (AOAC, 2005) methodology for crude protein (976.05), ether extract (920.39), crude ash (920.153), and crude fibre (985.29). The dry matter content was analysed according to the ISO 6496 method.  $TiO_2$  analyses were performed according to the recommendations of Myers et al. (2004). The gross energy content was analysed according to the ISO 9831 method using an adiabatic bomb calorimeter (KL 12Mn, Precyzja-Bit PPHU, Poland) standardized with benzoic acid. To determine the number of macro elements (C and P), the methodology described by Ptak et al. (2013) was applied. The amino acid profile was determined using an AAA-400 automatic amino acid analyser (Ingos Ltd., Prague,

Czech Republic) and ninhydrin for postcolumn derivatization. Before carrying out profile analyses, hydrolysis in 6 N HCl for 24 h at 110°C was applied according to the AOAC procedure (994.12) (AOAC, 2005). The chemical composition and amino acid profile of the experimental diets are presented in Table 3.

Table 1. Chemical composition and amino acid profile of insect larval meal and fish meal used in experimental diets

Nutrients	BSFM	FM
% of DM		
crude protein	41.21	61.80
crude fat	16.19	16.50
nitrogen-free extract <sup>1</sup>	9.54	4.20
ash	11.91	17.50
crude fibre	12.06	0.71
Ca	1.32	3.92
P	2.35	2.16
Amino acid profile (% of crude protein)		
Indispensable amino acids (IAA)		
arginine	5.47	6.07
histidine	3.25	2.09
isoleucine	4.73	4.24
leucine	7.83	7.48
lysine	6.83	6.63
methionine	2.13	2.53
phenylalanine	4.76	3.07
threonine	4.43	4.10
valine	6.80	5.79
Dispensable amino acids (DAA)		
alanine	8.22	6.87
aspartic acid	7.30	9.40
cysteine	0.77	9.59
glycine	6.15	6.41
glutamic acid	13.07	14.50
proline	6.68	4.28
serine	4.88	4.17
tyrosine	6.71	3.00

BSFM = black soldier fly larvae meal; FM = fish meal (brown fish meal, 62% total protein, 16% fat, Agro-Fish, Kartoszyno, Poland).

<sup>1</sup>Nitrogen-free extract = dry matter % – (crude protein % + crude fat % + crude fibre % + ash %).

### Feed physical properties

All feed physical property assessments were performed according to Rawski et al. (2020) and conducted in 10 replicates for each parameter. The analysis conditions were a temperature of 21°C and 60% air-controlled humidity (Toyotomi, YD-C312, Nagoya, Japan).

1. Pellet bulk density (PD) analysis was conducted using a modified method described by Irungu et al. (2018). A total of ten randomly sampled replications of 1000 mL of feed were weighed (W), and the density was expressed as  $g/dm^3$ .

$$PD\ (g/dm^3) = \text{sample weight}/dm^3$$

Table 2. Ingredient composition of the experimental diets in Atlantic salmon fry

Ingredients (g/kg)	CON	BSFM5	BSFM10	BSFM15
FM <sup>1</sup>	390	361	333	303
BSFM <sup>2</sup>	0	50	100	150
Krill meal <sup>3</sup>	50	50	50	50
Blood cells <sup>4</sup>	100	100	100	100
Soy protein isolate <sup>5</sup>	100	100	100	100
Wheat gluten <sup>6</sup>	50	50	50	50
Wheat meal	90	73	54	38
Maltodextrin	50	50	50	50
Fish oil <sup>7</sup>	125	121	118	114
Lecithin <sup>8</sup>	10	10	10	10
Premix <sup>9</sup>	15	15	15	15
Vitamin mix <sup>10</sup>	1	1	1	1
Choline chloride	2	2	2	2
Chalk	14	14	14	14
TiO <sub>2</sub>	3	3	3	3
Total (g)	1000	1000	1000	1000

FM = fish meal; BSFM = black soldier fly larvae meal; CON = control group, without the addition of full-fat BSFM and with 39% FM; BSFM5 = 5% addition of full-fat BSFM and 36.1% FM; BSFM10 = 10% addition of full-fat BSFM and 33.3% FM; BSFM15 = 15% addition of full-fat BSFM and 30.3% FM.

<sup>1</sup>Brown fish meal, 62% total protein, 16% fat, Agro-Fish, Kartoszyno, Poland.

<sup>2</sup>HiProMine S.A., Poland.

<sup>3</sup>Krill Meal (Antarctic), 60% total protein, 23% fat, less than 13% of ash, CC Moore, England.

<sup>4</sup>AP 301 P, 92% total protein, APC (GB) Ltd, Ings Road, Doncaster, UK.

<sup>5</sup>SUPRO 590, 87.5% total protein, 3.2% fat, Solae Belgium N.V., Belgium.

<sup>6</sup>Gluvital, Cargill, Poland.

<sup>7</sup>Agro-Fish, Kartoszyno, Poland.

<sup>8</sup>BergaPure, deoiled lecithin, 97% pure lecithin, Berg + Schmidt GmbH & Co. KG, Hamburg, Germany.

<sup>9</sup>Premix (g kg<sup>-1</sup>): vitamin A, 1,000,000 IU; vitamin D<sub>3</sub>, 200,000 IU; vitamin E, 1.5 g; vitamin K, 0.2 g; vitamin B<sub>1</sub>, 0.05 g; vitamin B<sub>2</sub>, 0.4 g; vitamin B<sub>12</sub>, 0.001 g; nicotinic acid, 2.5 g; inositol, 35 g; D-calcium pantothenate, 1.0 g; myoinositol, 500 IU; choline chloride, 7.5 g; folic acid, 0.1 g; methionine, 150.0 g; lysine, 150.0 g; Fe, 2.5 g; Mn, 6.5 g; Cu, 0.8 g; Co, 0.04 g; Zn, 4.0 g; I, 0.008 g; carrier > 1000.0 g.

<sup>10</sup>Vitamin mix (g kg<sup>-1</sup>): vitamin A, 50,000 IU; vitamin D<sub>3</sub>, 5000 IU; vitamin E, 30.0 mg; vitamin C, 100.0 mg.

Table 3. Chemical composition and amino acid profile of the experimental diets used in Atlantic salmon fry

Nutrients	CON	BSFM5	BSFM10	BSFM15
% of DM				
crude protein	47.99	48.00	48.05	48.01
crude fat	20.05	20.00	20.06	20.00
nitrogen-free extract <sup>1</sup>	15.63	15.34	14.92	14.70
ash	10.82	10.90	11.00	11.07
crude fibre	0.88	1.42	1.94	2.48
Ca	1.50	1.50	1.50	1.49
P	1.10	1.12	1.16	1.19
gross energy (MJ/kg)	21.84	21.77	21.74	21.66
energy/protein ratio	45.51	45.36	45.23	45.13
Amino acid profile (% of crude protein)				
arginine	5.49	5.36	5.23	5.09
histidine	2.74	2.71	2.68	2.65
lysine	6.18	6.07	5.96	5.85
tryptophan	0.87	0.84	0.81	0.78
phenylalanine + tyrosine	6.22	6.15	6.08	6.01
methionine + cysteine	2.38	2.33	2.27	2.22
threonine	3.64	3.57	3.49	3.41
leucine	7.65	7.50	7.35	7.20
isoleucine	7.65	4.14	4.06	3.98
valine	5.76	5.67	5.57	5.47

FM = fish meal; BSFM = black soldier fly larvae meal; CON = control group, without the addition of full-fat BSFM and with 39% FM; BSFM5 = 5% addition of full-fat BSFM and 36.1% FM; BSFM10 = 10% addition of full-fat BSFM and 33.3% FM; BSFM15 = 15% addition of full-fat BSFM and 30.3% FM.

<sup>1</sup>Nitrogen-free extract = dry matter % - (crude protein % + crude fat % + crude fibre % + ash %).

2. Sinking velocity (SV) was conducted using a modified method described by Das et al. (1993). A sedimentation column (Terra-Robson, Wierzbno, Poland) with a height of 105 cm was filled with 100 cm of water. A total of twenty randomly selected pellets per feed batch were inserted into the water individually, and the time taken to reach the bottom was measured with an accuracy of 0.1 s.

$$SV (s/100 \text{ cm}) = \text{sinking time (s)} / \text{water column height (cm)}$$

3. Water stability (WS) was conducted using modified methods proposed by Das et al. (1993) and Umar et al. (2013). For each feed, 100 g was placed in a flask, and 500 mL of distilled water was added and placed on a horizontal shaker. Then, the feed was filtered after 10 minutes through a 1-mm strainer on paper filters. After water filtration, the residues were dried at 50°C for 24 h and weighed to calculate the disintegrated feed proportion.

$$WS (\%) = ((\text{final sample weight} - \text{initial sample weight}) / \text{initial sample weight}) \times 100$$

4. Volume increase (VI) was conducted using the method described by Rawski et al. (2020). A volume of 25 mL of feed was placed in a volumetric flask, and the flask was filled with 100 mL of water. After 10 minutes, the volume of the feed was measured, and the expansion in water was calculated.

$$VI (\%) = ((\text{final volume} - \text{initial volume}) / \text{initial volume}) \times 100$$

5. The expansion ratio (ER) was calculated according to the formula described by Khater et al. (2014). The result is presented as the ratio of pellet diameter to extrusion matrix perforation diameter. The analysis was performed using an electronic calliper (Yato, YT-7201, Shanghai, China) with an accuracy of up to 0.01 mm.

$$ER (\%) = (\text{pellet diameter (mm)} / \text{matrix diameter (mm)}) \times 100$$

#### Animal handling and growth performance trial

Atlantic salmon fries were transported from the Experimental Station of Feed Production Technology and Aquaculture in Muchocin to the Laboratory of Inland Fisheries and Aquaculture. The study was carried out using an experimental Recirculated Aquaculture System (eRAS). During acclimation, fish were kept in a 500 L tank. One week before the right part of the experiment, 240 healthy fish were randomly selected from the adaptation tank and transferred into experimental tanks (24 tanks with a capacity of 50 L, 10 fish per tank, 6 tanks per group) and then fed commercial feed for salmonids (Aller Performa – 48% crude protein, 21% crude fat, 22.1 MJ gross energy/kg, Aller Aqua, Poland). On the 1st day of the experimental period, all fish in each tank were bulk weighed (average body weight was 13.4 g ± 1 g). The eRAS was supplied with tap water, and technological water was purified by a biological filter and aerated using an aeration system powered with

a membrane blower (HiBlow, Japan). The water flow was 2 L/min per each experimental tank. The water parameters were recorded daily. The temperature was 15°C ± 0.5°C, the dissolved oxygen was 7.5 mg ± 0.3 mg L<sup>-1</sup>, and the photoperiod was maintained at 16:8 (light:dark) during the experiment.

The experiment lasted 60 days. To reduce stress caused by contact with personnel, salmon were fed continuously using automatic belt feeders (12 h discharge time, FIAP Fishtech GmbH, Germany) during both acclimation and experimental periods. Each trial was carried out in six replications (tanks) per diet. The feed ratio was based on a feeding chart designed for Atlantic salmon, taking into consideration the average body weight and the water temperature (National Research Council, 2011). The fish mortality and health condition were monitored daily. All animals were weighed at 10-day intervals.

To calculate the growth performance and feed utilization factors, the following formulas were used:

1. Final Body Weight (FBW):

$$FBW (g) = \text{fish biomass in the tank (g)} / \text{number of fish in the tank}$$

2. Body Weight Gain (BWG):

$$BWG (g) = \text{final body weight (g)} - \text{initial body weight (g)}$$

3. Percent of Body Weight Gain (PWG):

$$PWG (\%) = ((\text{final body weight (g)} - \text{initial body weight (g)}) / \text{initial body weight (g)}) \times 100$$

4. Feed Intake (FI):

$$FI (g) = \text{applied feed (g)} - \text{uneaten feed (g)}$$

5. Feed Conversion Ratio (FCR):

$$FCR = \text{feed intake (g)} / \text{body weight gain (g)}$$

6. Specific Growth Rate (SGR):

$$SGR (\%/day) = 100 \times (\ln \text{final body weight} - \ln \text{initial body weight}) / \text{number of experimental days}$$

7. Survival Rate (SR):

$$SR (\%) = (\text{final number of live fish} / \text{initial number of live fish}) \times 100$$

8. Protein Efficiency Ratio (PER):

$$PER = (\text{body weight gain (g)}) / (\text{feed intake (g)} \times \text{protein level in the diet (\%)})$$

9. Lipid Efficiency Ratio (LER):

$$LER = (\text{body weight gain (g)}) / (\text{feed intake (g)} \times \text{lipid level in the diet (\%)})$$

All growth performance results are presented as the means, where n = 6 tanks per group (10 fish/tank, 60 fish/group).

#### Digestibility trial

This trial was performed to determine the apparent digestibility coefficients of crude protein and crude fat in the Atlantic salmon fry experiment. Salmonids were transported from the Experimental Station of Feed Production Technology and Aquaculture in Muchocin to the Laboratory of Inland Fisheries and Aquaculture laboratory. Metabolic tanks were used as a modification of the Allan et al. (1999) design according to Rawski et al.

(2020). Tanks were equipped with a conical bottom with a separation grille and a two-valve bottom separation and drainage system. The tanks were supplied with filtrated tap water in an open-flow system. The temperature was  $15^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ , the concentration of oxygen was  $7.5 \text{ mg} \pm 0.3 \text{ mg L}^{-1}$ , and the photoperiod was maintained at 16:8 (light:dark) during the entire experiment. The digestibility test lasted 45 days, including 15 days of the adaptation period and 30 days of the period of faecal sampling. For the experiment, 120 fish with an average body weight of 13.4 grams ( $\pm 1 \text{ g}$ ) were used and divided into 4 groups (3 tanks/group and 10 fish/tank). Animals were fed the same diets used in growth performance trials but with the addition of titanium dioxide ( $\text{TiO}_2$ ) as a digestibility marker in the amount of 0.3% (Kierończyk et al., 2020). The feed was given in the amount of 1% of fish weight per day for 6 hours (from 7:00 to 13:00) using automatic belt feeders. After feeding, the rest of the uneaten feed was removed. The accumulated faeces were obtained by opening the bottom separation system and collecting faeces for filtration vessels. The faecal collection was conducted 3 times per day between 7:00, 17:00, and 23:00. Filtration was carried out through cellulose filters. The obtained faeces were frozen at  $-20^{\circ}\text{C}$  for further analysis. The coefficients of apparent ileal digestibility of crude protein and crude fat were calculated according to the following formulas described by Kierończyk et al. (2018):

1. Coefficients of apparent total digestibility (%):

$$\text{Coefficients of apparent total digestibility} = 1 - ((\text{TiO}_2 \text{ (g kg}^{-1} \text{ in the diet)/TiO}_2 \text{ (g kg}^{-1} \text{ in the faeces)}) \times (\text{nutrient (g kg}^{-1} \text{ in the faeces/nutrient (g kg}^{-1} \text{ in the diet)}))$$

### Sample collection and somatic indices

On the last day of the experiment, all fish were weighed individually, and 5 animals from each tank were euthanized using an overdose of MS-222 (Leary et al., 2013) and decapitated for dissection and sampling for further analysis. Measurements of the carcass, viscera, and liver were recorded to calculate the condition factor (CF), viscerosomatic index (VSI), and hepatosomatic index (HSI) as described by Hoffmann et al. (2020), while measurements of total intestines, proximal intestines, distal intestines, gastrointestinal tract, and total fish length were assessed to calculate numerous intestinal indices according to Rawski et al. (2021):

1. Condition Factor (CF):

$$CF = (\text{body weight (g)/fish total length (cm}^3) \times 100$$

2. Viscerosomatic Index (VSI):

$$VSI (\%) = (\text{viscera weight (g)/body weight (g)}) \times 100$$

3. Hepatosomatic Index (HSI):

$$HSI (\%) = (\text{liver weight (g)/body weight (g)}) \times 100$$

4. Relative Gastrointestinal Tract Length (GIT/FTL):

$$GIT/FTL (\%) = (\text{gastrointestinal tract length (mm)/fish total length (mm)}) \times 100$$

5. Relative Intestinal Length (IL/FTL):

$$IL/FTL (\%) = (\text{intestine length (mm)/fish total length (mm)}) \times 100$$

6. Relative Proximal Intestine Length (PL/FTL):

$$PL/FTL (\%) = (\text{proximal intestine length (mm)/fish total length (mm)}) \times 100$$

7. Relative Distal Intestine Length (DL/FTL):

$$DL/FTL (\%) = (\text{distal intestine length (mm)/fish total length (mm)}) \times 100$$

8. Intestine Share in Total Gastrointestinal Tract Length (IL/GIT):

$$IL/GIT (\%) = (\text{intestine length (mm)/gastrointestinal tract length (mm)}) \times 100$$

9. Proximal Intestine Share in Total Gastrointestinal Tract Length (PL/GIT)

$$PL/GIT (\%) = (\text{proximal intestine length (mm)/gastrointestinal tract length (mm)}) \times 100$$

10. Distal Intestine Share in Total Gastrointestinal Tract Length (DL/GIT)

$$DL/GIT (\%) = (\text{distal intestine length (mm)/gastrointestinal tract length (mm)}) \times 100$$

All somatic index results are presented as the means, where  $n = 32$  per group (6 tanks/treatment  $\times$  8 fish/tank).

### Gut histomorphology

At the end of the experiment, 24 fish were sampled from each treatment (6 fish/group). Samples of the intestine were collected, submerged in Bouin's solution (Merck), and stored at  $4^{\circ}\text{C}$ . Histological examination was performed using the methodology described by Bogucka et al. (2016). The samples were dehydrated, cleared, and embedded in paraffin blocks. Formed blocks were cut on a rotary microtome (Thermo Shandon, Chadwick Road, Astmoor, Runcorn, Cheshire, United Kingdom) into slices of  $10\text{-}\mu\text{m}$  thickness. The slices were placed on microscope slides coated with ovo-albumin with the addition of glycerol. The prepared samples were analysed using an AnMN-800 F microscope (OPTA-TECH, Warsaw, Poland) equipped with an Opta-View camera for recording microscopic images. MultiScan v. 18.03 microscope imaging software (Computer Scanning Systems II Ltd., Warsaw, Poland) was used to measure villus height and width and muscular layer thickness. Ten villi per fish were randomly selected from a cross-section. The length was measured from the top of the villus to its base, while the width was measured at half of its length.

### Environmental sustainability assessment

The environmental sustainability assessment was calculated based on raw data for growth performance and feed utilization parameters according to Rawski et al. (2020, 2021).

The relative usage of marine-derived feed materials – fish meal (FMU) and fish oil (FOU) – was calculated according to two formulas:

$$1. \text{ FMU (g/kg of fish gain)} = \text{fish meal share in the diet (g kg}^{-1}) \times \text{feed conversion ratio (g/g)}$$

$$2. \text{ FOU (g/kg of fish gain)} = \text{fish oil share in the diet (g kg}^{-1}) \times \text{feed conversion ratio (g/g)}$$

The fish-in-fish-out ratio (FIFO) was calculated as a practical measure of the quantity of live fish from cap-

ture fisheries required for each unit of farmed fish produced, as follows:

$$1. \text{FIFO} = ((\text{level of fish meal in the diet (g kg}^{-1}\text{)} + \text{level of fish oil in the diet (g kg}^{-1}\text{)}) / (\text{yields of fish meal from wild fish (g kg}^{-1}\text{)} + \text{yields of fish oil from wild fish (g kg}^{-1}\text{)}) \times (\text{feed intake (g)/body weight gain (g)})$$

where the yield of fish meal from wild fish was assumed to be 225 g kg<sup>-1</sup> of fresh fish weight and the yield of fish oil from wild fish was assumed to be 50 g kg<sup>-1</sup> of fresh fish weight (Stejskal et al., 2020).

### Statistical analysis

R studio software was used to analyse the data for both experiments conducted in this study. To determine the normality of the data distribution and equality of variances, Kolmogorov–Smirnov and Levene's tests were used. One-way ANOVA was used, and if there were significant differences among treatments, further analysis was performed by correcting Duncan's post-hoc test. Data are presented as the mean ± standard error of the mean (SEM). The statistical significance level was declared at  $P < 0.05$ . The statistical analysis of variance was conducted according to the following general model:

$$Y_i = \mu + ai + \delta_{ij}$$

where:  $Y_i$  is the observed dependent variable,  $\mu$  is the overall mean,  $ai$  is the effect of the diet, and  $\delta_{ij}$  is the random error.

## Results

### Feed physical properties

In terms of the physical properties of feed, the increasing inclusion of BSFM meal in diets leads to decreasing results in PD and increasing results of VI ( $P < 0.0001$ ). In groups BSFM10 and BSFM15, higher values in SV compared to CON and BSFM5 were observed ( $P = 0.0005$ ). All groups with insect addition showed increased ER values compared to CON; however, there were no significant differences between groups BSFM10 and BSFM15 ( $P < 0.0001$ ). Additionally, no significant differences were observed in terms of WS. All results of the feed physical property assessment are presented in Table 4.

### Growth performance trial

In the case of the experiment conducted on Atlantic salmon fry, the BWG, PWG, SGR, PER, and LER showed decreases in the BSFM15 group compared to the CON ( $P = 0.0064$ ;  $P = 0.0064$ ,  $P = 0.0161$ ;  $P = 0.0111$ ;  $P = 0.0111$ , respectively), while the FCR in the mentioned group showed the highest result ( $P = 0.0035$ ). However, there were no significant differences in FBW and FI results. No mortality during the entire experiment was recorded. The results of the growth performance trial on Atlantic salmon fry are presented in Table 5.

Table 4. Physical properties of experimental diets for Atlantic salmon fry

Parameter	CON	BSFM5	BSFM10	BSFM15	SEM	P value
PD (g/dm <sup>3</sup> )	639 a	612 b	588 c	548 d	5.4185	<0.0001
SV (s/100 cm)	11.4 b	12.0 b	13.7 a	14.1 a	0.2869	0.0005
WS (%)	93.4	92.4	93.4	95.4	1.8123	0.3400
VI (%)	43.8 d	50.0 c	57.5 b	63.8 a	1.4979	<0.0001
ER (%)	119 c	126 b	127 ab	131 a	0.9906	<0.0001

FM = fish meal; BSFM = black soldier fly larvae meal; CON = control group, without the addition of full-fat BSFM and with 39% FM; BSFM5 = 5% addition of full-fat BSFM and 36.1% FM; BSFM10 = 10% addition of full-fat BSFM and 33.3% FM; BSFM15 = 15% addition of full-fat BSFM and 30.3% FM; PD – pellet density; SV – sinking velocity; WS – water stability; VI – volume increase; ER – expansion rate.

a-d – values within a row with different letters differ significantly at  $P < 0.05$ . Values are presented as the means ( $n = 10/\text{treatment}$ ), pooled standard error of the mean, SEM.

Table 5. Growth performance and feed utilization parameters of Atlantic salmon fry fed experimental diets

Parameter	CON	BSFM5	BSFM10	BSFM15	SEM	P value
IBW (g)	13.7	13.2	13.0	13.6	0.2085	0.9410
FBW (g)	26.3	25.9	25.3	24.7	0.3144	0.3050
BWG (g)	12.6 a	12.7 a	12.4 a	11.0 b	2.0587	0.0064
PWG (%)	91.4 a	96.0 a	95.6 a	80.9 b	1.1587	0.0064
FI (g)	112	108	106	111	1.6325	0.5300
FCR	0.89 b	0.85 b	0.86 b	1.01 a	0.0192	0.0035
SGR	1.11 a	1.12 a	1.07 a	0.95 b	0.0223	0.0161
PER	2.43 a	2.55 a	2.56 a	2.15 b	0.0522	0.0111
LER	6.22 a	6.53 a	6.56 a	5.53 b	0.1340	0.0111

FM = fish meal; BSFM = black soldier fly larvae meal; CON = control group, without the addition of full-fat BSFM and with 39% FM; BSFM5 = 5% addition of full-fat BSFM and 36.1% FM; BSFM10 = 10% addition of full-fat BSFM and 33.3% FM; BSFM15 = 15% addition of full-fat BSFM and 30.3% FM; IBW – initial fish body weight; FBW – final fish body weight; BWG – fish body weight gain; PWG – percent of fish body weight gain; FI – feed intake; FCR – feed conversion ratio; SGR – specific growth rate; PER – protein efficiency ratio; LER – lipid efficiency ratio.

a-d – values within a row with different letters differ significantly at  $P < 0.05$ . Values are presented as the means ( $n = 6/\text{treatment}$ ), pooled standard error of the mean, SEM.

Table 6. Somatic indices of Atlantic salmon fry fed experimental diets

Parameter	CON	BSFM5	BSFM10	BSFM15	SEM	P value
CF	1.21	1.22	1.20	1.18	0.0082	0.3090
VSI (%)	11.45	11.35	10.49	11.93	0.2024	0.0857
HIS (%)	1.99	2.17	1.93	1.89	0.0630	0.4140

FM = fish meal; BSFM = black soldier fly larvae meal; CON = control group, without the addition of full-fat BSFM and with 39% FM; BSFM5 = 5% addition of full-fat BSFM and 36.1% FM; BSFM10 = 10% addition of full-fat BSFM and 33.3% FM; BSFM15 = 15% addition of full-fat BSFM and 30.3% FM; CF – condition factor; VSI – viscerosomatic index; HIS – hepatosomatic index.

Values are presented as the means (n = 30/treatment), pooled standard error of the mean, SEM.

Table 7. Histomorphology of intestines of Atlantic salmon fry fed with experimental diets

Parameter	CON	BSFM5	BSFM10	BSFM15	SEM	P value
Villus height (µm)	346.42	393.55	467.70	393.55	19.4538	0.1720
Villus width (µm)	110.30	117.41	120.15	124.95	2.3168	0.1510
Villus area (mm <sup>2</sup> )	122.72	147.90	178.81	156.92	9.2084	0.2010
Muscular layer thickness (µm)	44.73	47.04	45.06	40.78	1.9262	0.7350

FM = fish meal; BSFM = black soldier fly larvae meal; CON = control group, without the addition of full-fat BSFM and with 39% FM; BSFM5 = 5% addition of full-fat BSFM and 36.1% FM; BSFM10 = 10% addition of full-fat BSFM and 33.3% FM; BSFM15 = 15% addition of full-fat BSFM and 30.3% FM.

Values are presented as the means (n = 30/treatment), pooled standard error of the mean, SEM.

Table 8. Environmental sustainability parameters of Atlantic salmon fry fed experimental diets

Parameter	CON	BSFM5	BSFM10	BSFM15	SEM	P value
FCE (g/g)	1.12 a	1.17 a	1.18 a	0.99 b	0.0241	0.0111
FMU (g/kg)	349.0 a	308.2 b	285.9 b	307.0 b	6.5795	0.0017
FOU (g/kg)	111.8 ab	103.3 b	101.3 b	115.5 a	2.0281	0.0261
FIFO	1.68 a	1.50 b	1.41 b	1.54 ab	0.0301	0.0070

FM = fish meal; BSFM = black soldier fly larvae meal; CON = control group, without the addition of full-fat BSFM and with 39% FM; BSFM5 = 5% addition of full-fat BSFM and 36.1% FM; BSFM10 = 10% addition of full-fat BSFM and 33.3% FM; BSFM15 = 15% addition of full-fat BSFM and 30.3% FM; FCE – feed conversion efficiency; FMU – fish meal use; FOU – fish oil used, FIFO – the fish-in-fish-out ratio.

a-d – values within a row with different letters differ significantly at P<0.05. Values are presented as the means (n = 6/treatment), pooled standard error of the mean, SEM.

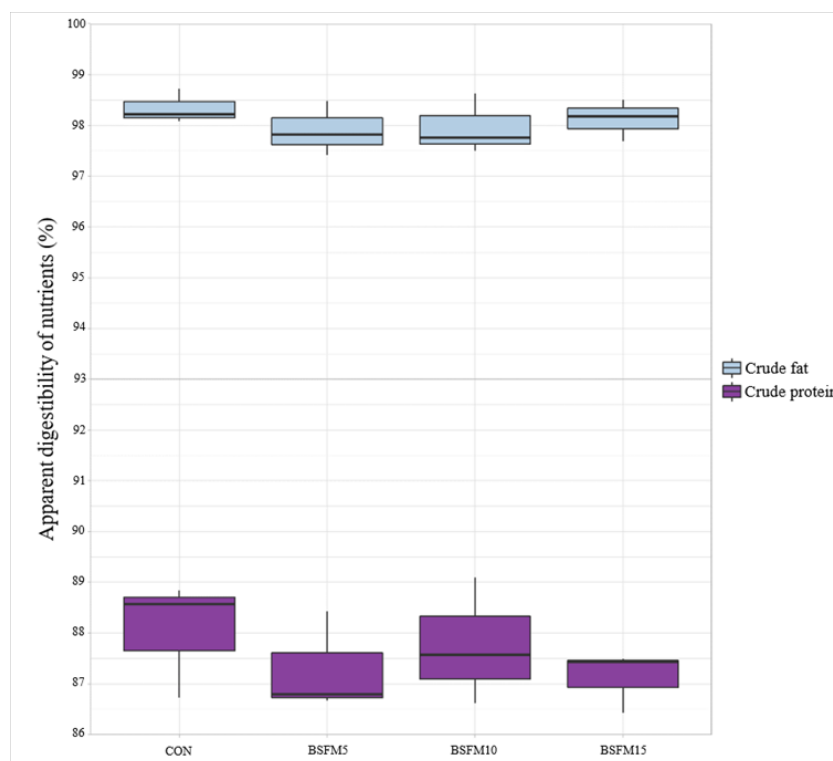


Figure 1. The effect of experimental diets on nutrients (crude fat – upper and crude protein – lower) digestibility of Atlantic salmon fry. FM = fish meal; BSFM = black soldier fly larvae meal; CON = control group, without the addition of full-fat BSFM and with 39% FM; BSFM5 = 5% addition of full-fat BSFM and 36.1% FM; BSFM10 = 10% addition of full-fat BSFM and 33.3% FM; BSFM15 = 15% addition of full-fat BSFM and 30.3% FM; No statistically significant differences were observed among the groups

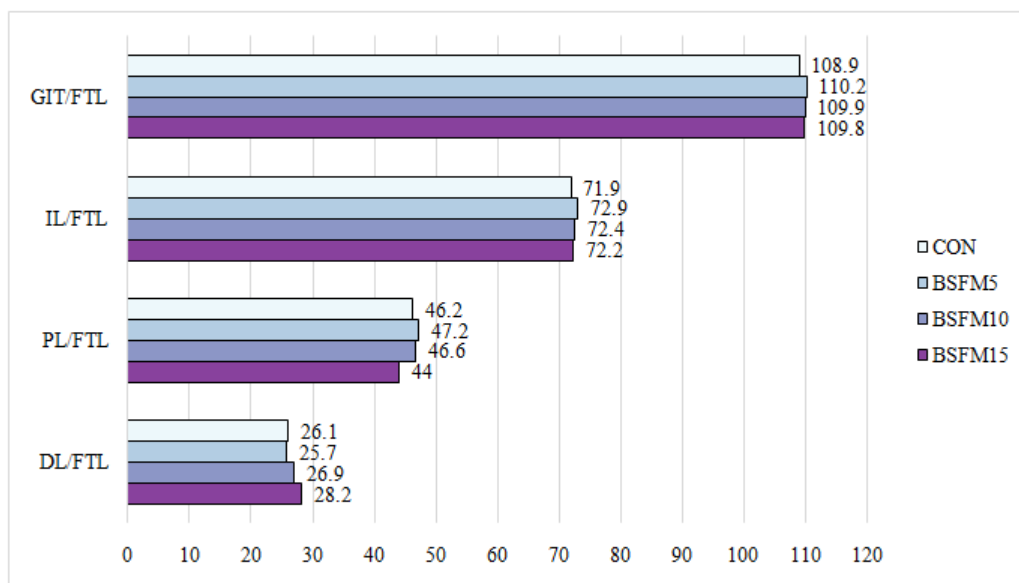


Figure 2. The effect of experimental diets on the percentage of length of individual parts of the gastrointestinal tract in the total body length of Atlantic salmon fry. FM = fish meal; BSFM = black soldier fly larvae meal; CON = control group, without the addition of full-fat BSFM and with 39% FM; BSFM5 = 5% addition of full-fat BSFM and 36.1% FM; BSFM10 = 10% addition of full-fat BSFM and 33.3% FM; BSFM15 = 15% addition of full-fat BSFM and 30.3% FM; GIT/FTL – relative gastrointestinal tract length; IL/FTL – relative intestinal length; PL/FTL – relative proximal intestine length; DL/FTL – relative distal intestine length; No statistically significant differences were observed among the groups ( $P \geq 0.05$ )

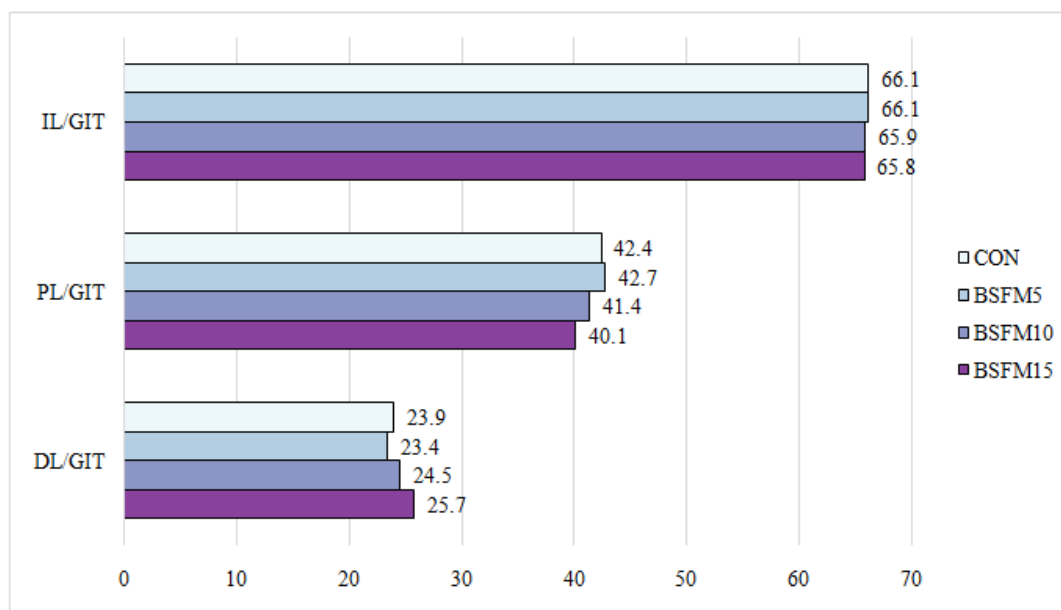


Figure 3. The effect of experimental diets on the percentage of length of individual parts of intestines in the total gastrointestinal tract length of Atlantic salmon fry. FM = fish meal; BSFM = black soldier fly larvae meal; CON = control group, without the addition of full-fat BSFM and with 39% FM; BSFM5 = 5% addition of full-fat BSFM and 36.1% FM; BSFM10 = 10% addition of full-fat BSFM and 33.3% FM; BSFM15 = 15% addition of full-fat BSFM and 30.3% FM; IL/GIT – intestinal share in total gastrointestinal tract length; PL/GIT – proximal intestine share in total gastrointestinal tract length; DL/GIT – distal intestine share in total gastrointestinal tract length; no statistically significant differences were observed among the groups ( $P \geq 0.05$ )

**Digestibility trial**

During the digestibility of nutrients trial, no significant differences among the groups in terms of crude protein and crude fat were reported. The results of digestibility of nutrients of Atlantic salmon fry are presented in Figure 1.

**Somatic indices**

In the case of somatic indices of Atlantic salmon fry, there were no significant differences in CF, VSI or HIS among the groups. The results are presented in Table 6. Similarly, in terms of gastrointestinal tract indices, including GIT/FTL, IL/FTL, PL/FTL, DL/FTL, IL/GIT,

PL/GIT, and DL/GIT, no significant differences were reported. The results of those indices are presented on the graphs in Figures 2 and 3.

### Gut histomorphology

Experimental groups did not show any significant differences in comparison to the control group. All histomorphology results are presented in Table 7.

### Environmental sustainability assessment

In terms of environmental sustainability parameters, a decrease in the FCE value was observed only in the BSFM15 group ( $P = 0.0111$ ). In the case of FMU, all groups with insects showed decreased values compared to CON ( $P = 0.0017$ ), while FOU values of insect groups did not differ from CON ( $P = 0.0261$ ). Additionally, BSFM5 and BSFM10 were significantly different compared to CON, and a decrease was observed ( $P = 0.0070$ ). All results of the environmental sustainability parameters are presented in Table 8.

## Discussion

The basic chemical composition of full-fat black soldier fly larvae meal (BSFM) and fish meal (FM) showed lower crude protein content and higher crude fat and crude fibre levels in insect meal. These findings are in agreement with several scientific papers (Belghit et al., 2018; Nogales-Mérida et al., 2018; Józefiak et al., 2019; Basto et al., 2020; Rawski et al., 2020). The higher content of crude fibre can be explained by the occurrence of chitin in insect exoskeletons due to its chemical structure, which qualifies it as a polysaccharide. Simultaneously, chitin can contain non-amino acid nitrogen bonds in its structure. According to suggestions of previous researchers (Finke, 2007; Gasco et al., 2018), protein overestimation would occur due to the presence of chitin in insect biomass. Additionally, the overestimation will reach a higher level as the inclusion of insect meal in fish diets increases (Rawski et al., 2020). Therefore, it is crucial to perform calculations of the crude protein conversion ratio (Kp) to compensate for differences in the content of nutrients. The current study confirmed the foregoing statement of Janssen et al. (2017), who assessed Kp for insect meals in the range from 4.76 to 5.60, depending on crude protein quality and purification. The abovementioned correction in the nitrogen to protein conversion ratio allowed us to calculate isonitrogenous diets for Atlantic salmon. No differences were observed in the chemical composition of diets, which could potentially affect and disturb the proper growth performance of fish. Substantial dissimilarities were reported in the crude fibre content only, which seems to be justified. Additionally, according to Storebakken (2009), the requirement for calcium has not been established in Atlantic salmon. However, the level of total phosphorus in the diet, depending on the literature, was estimated at 6 g/kg (Ketola, 1975) or even

10–11 g/kg for juvenile salmon (Åsgård and Shearer, 1997). Therefore, the diets designed for the experiment meet the requirements in terms of mineral composition.

The data focused on the pellet quality of aquafeeds with insect material inclusion are still limited. However, our findings are in line with Rawski et al. (2020) – an increase in the share of BSFM in Atlantic salmon diets led to increasing results of sinking velocity (SV), volume increase (VI), and expansion ratio (ER), with a simultaneous decrease in pellet density (PD). In contrast, Weththasinghe et al. (2021 a) reported that higher inclusion of full-fat BSFM meal or paste led to a decrease in ER, while the SV did not show any differences among the groups. In turn, Irungu et al. (2018) reported that an increase in insect inclusion in aquafeeds led to higher pellet bulk density. The main reason for the observed results, which was suggested previously (Rawski et al., 2020), is that the usage of full-fat insect meals provided better oil dispersed in the feed during extrusion. However, it is important to emphasize that in the present study, the percentage values of crude fat in BSFM and FM were quite similar, oscillating at approximately 16%. Simultaneously, in the mentioned study, the higher ER and SV positively related to a decrease in PD could be explained by increasing pore formation in the pellet structure. A similar effect in the case of SV was previously observed in pellets with higher DDGS inclusion (Kannadhasan et al., 2009). Additionally, Liu et al. (2021) reported that the addition of wheat flour leads to a more porous pellet texture due to expansion, which affects the water stability of feed. Therefore, this might be the reason for the much higher SV in groups with the addition of BSFM, since BSFM was characterized by a significantly higher crude fibre proportion.

In the present study, the addition of 15% BSFM affected body weight gain (BWG), percent body weight gain (PWG), feed conversion ratio (FCR), protein efficiency ratio (PER) and lipid efficiency ratio (LER). However, 5 and 10% BSFM inclusion did not affect growth performance or feed utilization parameters. Compared to Weththasinghe et al. (2021 b), feed intake presented lower values than control in groups including defatted BSFM (accounting for approximately 15% of diet) and *H. illucens* exoskeleton (accounting for approximately 7% of diet); however, this outcome did not negatively affect the FCR results. Additionally, the FCR in the group with the inclusion of full-fat BSFM (more than 20% of diet) did not differ from the control group and simultaneously showed the highest values in final fish body weight (FBW). Belghit et al. (2018) reported that even a high amount of defatted BSFM inclusion (60% of diets) did not affect FBW, FCR, FI, PER, or LER. In contrast, 25% substitution of FM by full-fat BSFM led to higher values in FCR and lower FBW, which is in line with our findings (Weththasinghe et al., 2021 a). Similar results were observed by Fisher et al. (2020), where the inclusion of BSFM at the level of 30% significantly decreased the BWG and increased the FCR of Atlantic salmon pre-



smolts. The most common explanation in the scientific literature for the effect of insect addition in fish diets on growth performance and feed utilization is the presence of chitin (Belghit et al., 2018; Fisher et al., 2020; Mikołajczak et al., 2020; Hoffmann et al., 2021 a; Weththasinghe et al., 2021 a) due to crude protein overestimation (Finke, 2007). However, to minimize this effect and avoid distorting the results, a corrected K<sub>p</sub> value was applied.

Despite the fact that crude protein and crude fat digestibility were lowest in the group with 15% BSFM inclusion, the differences were not statistically significant. Our findings are in agreement with Weththasinghe et al. (2021 a). Previously stated reductions in PER values could be an outcome of numerical digestibility results. According to Marono et al. (2015), the presence of chitin in insects is negatively correlated with protein digestion. This is probably due to the reduced availability of protein for protease enzymes by chitin (Henry et al., 2015) or decreased activity of these enzymes (Belghit et al., 2018). In fact, Atlantic salmon is characterized by a low capacity for chitin digestibility (Olsen et al., 2006). This chemical compound can also be responsible for the numerically lower crude fat digestibility. By analysing the fatty acid profile of previous studies by our research team, it can be concluded that lauric acid can comprise approximately 46% of all estimated fatty acids (Rawski et al., 2020). Antecedent consideration highlights that lauric acid can be a satisfactory energy source for salmonids by simple oxidation, which results in low tissue deposition (Renna et al., 2017; Belghit et al., 2019 b). This statement explains the reduction in LER results, and limited lipid retention simultaneously affects lower crude fat digestibility.

No effect on the condition factor of Atlantic salmon fries was found among the groups. This result is in line with Belghit et al. (2018). However, no changes to the hepatosomatic index (HSI) and viscerosomatic index (VSI) were observed in our research, which is in contrast to the abovementioned study, where increasing inclusion of BSF meal and oil led to higher HSI and VSI results. This observation was previously pointed out in the scientific literature focused on insect-derived material addition in salmonid juvenile and fingerling diets (Hoffmann et al., 2020; Mikołajczak et al., 2020; Fawole et al., 2021). The reason for fat storage in the visceral cavity and liver of fish may depend on the fatty acid composition in the diets (Huang et al., 2016). Due to the possibility of metabolic disorders indicated by carbohydrates and lipids, the presence of oxidized fat and vitamin deficiency (A, D, E, and K) the HSI should not exceed 1–2% (Munshi and Dutta, 1998). Therefore, the only result in terms of liver condition was elevated HSI in the group with a 5% BSFM addition. However, Hoffmann et al. (2021 a) reported that excellent fish conditions can be observed even with a very high (over 3.48) hepatosomatic index without a negative effect on liver histomorphology.

While the vast majority of recent scientific literature is focused on sea-water phase Atlantic salmon (Elia et

al., 2018; Belghit et al., 2019 a; Li et al., 2020), the comparison of obtained results to experiments conducted on fish of different ages is not satisfactory. In the present research, no effect on the relative length of gastrointestinal tract sections, villus width, height and area, or muscular layer thickness was observed. According to Demirci et al. (2021) the use of different dietary protein sources has morphometric effects on the rainbow trout digestive system. Li et al. (2019) reported that the usage of a diet wherein 85% of the protein was supplied by BSFM leads to an increasing share of mid and distal intestines and simultaneously provides a decrease in the prevalence of steatosis in pyloric caeca enterocytes of salmon. It is also conjectured that insect meals stimulate the regulation of T-cell activity and xenobiotic metabolism in the proximal and distal intestines. According to Mikołajczak et al. (2020), the inclusion of mealworm (*Tenebrio molitor*) and superworm (*Zophobas morio*) meals did not affect the histomorphology of sea trout. Additionally, Hoffmann et al. (2021 a) observed that the usage of mealworm meal at the levels of 30 and 40% sea trout diets led to a decrease in villus width and villus surface, as well as an increase in the thickness of the muscle membrane. In contrast, Rawski et al. (2021) showed that 20% inclusion of BSFM in Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*) diets increased villus height, villus width and villus surface. In general, the changes in intestinal morphology may be the effect of the presence of antimicrobial peptides (AMPs) in insect meals, which modulate the microbial community of the gastrointestinal tract (Tang et al., 2008). It is crucial to emphasize that the gaps in the scientific literature regarding the influence of BSFM on intestine histomorphology should be filled with novel experiments, since knowledge about this area is limited.

FM is the main protein source used in aquaculture feeds (Naylor et al., 2021). In farmed salmon, FM dietary inclusion oscillates between 20% and 50% (Jannathulla et al., 2019). Additionally, more often, this feed material is considered a potential pathway to introduce microplastics to the food chain of aquaculture products (Gündoğdu et al., 2021). The most important parameter describing feed sustainability in the nutrition of different species is the fish-in-fish-out ratio (FIFO). In general, FIFO is the requirement of wild-caught fish for nutritive purposes (as feed materials – FM and fish oil) necessary to produce one kg of farmed animals (Jannathulla et al., 2019). However, this ratio interacts with FCR, so feed intake and hence body weight gain influence the final FIFO score. The results observed in our research illustrate this situation well. Due to the lower growth performance of fish in BSFM15, FIFO did not differ significantly from the CON. However, BSFM5 and BSFM10 presented a decrease in FIFO, which indicates the potential of insects as a sustainable protein source in Atlantic salmon fries. Depending on the year, the FIFO ratio for salmonids oscillates between 2.57 and 0.82, which is an effect of an increase in alternate protein source utilization (Jannathulla et al., 2019). Naylor et al. (2021) emphasized that salmon

is one of the critical species, where FIFO exceeded 1.0, and the ratio reached 1.87 in 2017. However, the effect of insect-derived feed material utilization on environmental sustainability is still a new research object, and the summary data do not distinguish between seawater and freshwater phases of Atlantic salmon, which makes it impossible to clearly compare these results. Therefore, the presented results are an important incorporation into scientific knowledge.

### Conclusions

The present study showed satisfactory results of BSFM inclusion at the levels of 5% and 10% as a replacement for fish meal in feeds for Atlantic salmon fries. No negative effects on growth performance, feed utilization, protein and fat digestibility, or intestinal structure were recorded. Simultaneously, insect meal inclusion in Atlantic salmon fry diets significantly improved the environmental sustainability of the feed. However, due to the lack of positive results observed in growth performance and sustainability, the use of shares higher than 10% of BSFM in Atlantic salmon fries may not be recommended.

### Acknowledgment

We gratefully acknowledge the contributions and logistical support provided by Poznań University of Life Sciences. The authors would like to thank Silvia Nogales-Mérida, Sanan Talibov, Joanna Kowalska, Krzysztof Florczyk and Jan Banaszak for their contribution to the technical parts of the insect meal and feed preparation, the growth experiment, and data analysis.

### References

- Acar Ü., Giannetto A., Giannetto D., Kesbiç O.S., Yılmaz S., Romano A., Tezel R., Türker A., Güllü K., Fazio F. (2021). Evaluation of an innovative and sustainable pre-commercial compound as replacement of fish meal in diets for rainbow trout during pre-fattening phase: Effects on growth performances, haematological parameters and fillet quality traits. *Animals* 11: 3547.
- Allan G.L., Rowland S.J., Parkinson S., Stone D.A.J., Jantraratotai W. (1999). Nutrient digestibility for juvenile silver perch *Bidyanus bidyanus*: Development of methods. *Aquaculture*, 170: 131–145.
- AOAC (2005). Association of Official Agricultural Chemists. Official Methods of Analysis. AOAC, Arlington, VA, USA.
- Arru B., Furesi R., Gasco L., Madau F.A., Pulina P. (2019). The Introduction of insect meal into fish diet: the first economic analysis on European sea bass farming. *Sustainability*, 11: 1697.
- Åsgård T., Shearer K.D. (1997). Dietary phosphorus requirement of juvenile Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Aquac. Nutr.*, 3: 17–23.
- Basto A., Matos E., Valente L.M.P. (2020). Nutritional value of different insect larvae meals as protein sources for European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles. *Aquaculture*, 521: 735085.
- Belghit I., Liland N.S., Waagbø R., Biancarosa I., Pelusio N., Li Y., Krogdahl Å., Lock E.J. (2018). Potential of insect-based diets for Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture*, 491: 72–81.
- Belghit I., Liland N.S., Gjesdal P., Biancarosa I., Menchetti E., Li Y., Waagbø R., Krogdahl Å., Lock E.J. (2019 a). Black soldier fly larvae meal can replace fish meal in diets of sea-water phase Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture*, 503: 609–619.
- Belghit I., Waagbø R., Lock E.J., Liland N.S. (2019 b). Insect-based diets high in lauric acid reduce liver lipids in freshwater Atlantic salmon. *Aquac. Nutr.*, 25: 343–357.
- Biancarosa I., Sele V., Belghit I., Ørnsrud R., Lock E.J., Amlund H. (2019). Replacing fish meal with insect meal in the diet of Atlantic salmon (*Salmo salar*) does not impact the amount of contaminants in the feed and it lowers accumulation of arsenic in the fillet. *Food Addit. Contam. Part A Chem. Anal. Control. Expo Risk Assess.*, 36: 1191–1205.
- Bogucka J., Dankowiakowska A., Elminowska-Wenda G., Sobolewska A., Szczerba A., Bednarczyk M. (2016). Effects of prebiotics and synbiotics delivered *in ovo* on broiler small intestine histomorphology during the first days after hatching. *Folia Biol. (Kraków)*, 64: 131–143.
- 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.
- Cardinaletti G., Randazzo B., Messina M., Zarantoniello M., Giorgini E., Zimbelli A., Bruni L., Parisi G., Olivotto I., Tulli F. (2019). Effects of graded dietary inclusion level of full-fat *Hermetia illucens* prepupae meal in practical diets for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Animals*, 9: 251.
- Das H.K., Hattula M.T., Myllymäki O.M., Mälkki Y. (1993). Effects of formulation and processing variables on dry fish feed pellets containing fish waste. *J. Sci. Food Agric.*, 61: 181–187.
- Demirci B., Terzi F., Kesbiç O.S., Acar U., Yılmaz S., Kesbiç F.I. (2021). Does dietary incorporation level of pea protein isolate influence the digestive system morphology in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)? *Anat. Histol. Embryol.*, 50: 956–964.
- Elia A.C., Capucchio M.T., Caldaroni B., Magara G., Dörr A.J.M., 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.
- Fawole F.J., Labh S.N., Hossain M.S., Overturf K., Small B.C., Welker T.L., Hardy R.W., Kumar V. (2021). Insect (black soldier fly larvae) oil as a potential substitute for fish or soy oil in the fish meal-based diet of juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Anim. Nutr.*, 7: 1360–1370.
- Finke M.D. (2007). Estimate of chitin in raw whole insects. *Zoo Biology: published in affiliation with the American Zoo and Aquarium Association*, 26: 105–115.
- Fisher H.J., Collins S.A., Hanson C., Mason B., Colombo S.M., Anderson D.M. (2020). Black soldier fly larvae meal as a protein source in low fish meal diets for Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture*, 521: 734978.
- Galkanda-Arachchige H.S.C., Wilson A.E., Davis D.A. (2020). Success of fishmeal replacement through poultry by-product meal in aquaculture feed formulations: a meta-analysis. *Rev. Aquac.*, 12: 1624–1636.
- Gasco L., Gai F., Maricchiolo G., Genovese L., Ragonese S., Bottari T., Caruso G. (2018). Fishmeal alternative protein sources for aquaculture feeds. In: *Feeds for the aquaculture sector*. Springer, Cham, pp. 1–28.
- Gaudioso G., Marzorati G., Faccenda F., Weil T., Lunelli F., Cardinaletti G., Marino G., Olivotto I., Parisi G., Tibaldi E., Tuohy K.M., Fava F. (2021). Processed animal proteins from insect and poultry by-products in a fish meal-free diet for rainbow trout: Impact on intestinal microbiota and inflammatory markers. *Int. J. Mol. Sci.*, 22: 5454.
- Goyal S., Ott D., Liebscher J., Höfling D., Müller A., Dautz J., Gutzeit H.O., Schmidt D., Reuss R. (2021). Sustainability analysis of fish feed derived from aquatic plant and insect. *Sustainability*, 13: 7371.
- Gündoğdu S., Eroldoğan O.T., Evliyaoglu E., Turchini G.M., Wu X.G. (2021). Fish out, plastic in: Global pattern of plastics in commercial fishmeal. *Aquaculture*, 534: 736316.
- Henry M., Gasco L., Piccolo G., Fountoulaki E. (2015). Review on the use of insects in the diet of farmed fish: Past and future. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 203: 1–22.
- Hoffmann L., Rawski M., Nogales-Merida S., Mazurkiewicz J. (2020). Dietary inclusion of *Tenebrio molitor* meal in sea trout larvae

- rearing: Effects on fish growth performance, survival, condition, and GIT and liver enzymatic activity. *Ann. Anim. Sci.*, 20: 579–598.
- Hoffmann L., Rawski M., Nogales-Mérida S., Kołodziejcki P., Pruszyńska-Oszmałek E., Mazurkiewicz J. (2021 a). Mealworm meal use in sea trout (*Salmo trutta m. trutta*, L.) fingerling diets: effects on growth performance, histomorphology of the gastrointestinal tract and blood parameters. *Aquac. Nutr.*, 27: 1512–1528.
- Hoffmann L., Rawski M., Pruszyńska-Oszmałek E., Kołodziejcki P., Mazurkiewicz J. (2021 b). Environmentally sustainable feeding system for sea trout (*Salmo trutta m. trutta*): Live food and insect meal-based diets in larval rearing. *Aquac. Rep.*, 21: 100795.
- Hosfeld C.D., Hammer J., Handeland S.O., Fivelstad S., Stefansson S.O. (2009). Effects of fish density on growth and smoltification in intensive production of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture*, 294: 236–241.
- Huang Y., Wen X., Li S., Li W., Zhu D. (2016). Effects of dietary lipid levels on growth, feed utilization, body composition, fatty acid profiles and antioxidant parameters of juvenile chu's croaker *Nibea coibor*. *Aquac. Int.*, 24: 1229–1245.
- Irunge F.G., Mutungi C.M., Faraj A.K., Affognon H., Kibet N., Tanga C., Ekesi S., Nakimbugwe D., Fiaboe K.K.M. (2018). Physico-chemical properties of extruded aquafeed pellets containing black soldier fly (*Hermetia illucens*) larvae and adult cricket (*Acheta domestica*) meals. *J. Insects Food Feed*, 4: 19–30.
- Jannathulla R., Rajaram V., Kalanjiam R., Ambasankar K., Muralidhar M., Dayal J.S. (2019). Fishmeal availability in the scenarios of climate change: Inevitability of fishmeal replacement in aquafeeds and approaches for the utilization of plant protein sources. *Aquac. Res.*, 50: 3493–3506.
- Janssen R.H., Vincken J.P., Van Den Broek L.A.M., Fogliano V., Lakemond C.M.M. (2017). Nitrogen-to-protein conversion factors for three edible insects: *Tenebrio molitor*, *Alphitobius diaperinus*, and *Hermetia illucens*. *J. Agric. Food Chem.*, 65: 2275–2278.
- Józefiak A., Nogales-Mérida S., Mikołajczak Z., Rawski M., Kierończyk B., Mazurkiewicz J. (2019). The utilization of full-fat insect meal in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) nutrition: the effects on growth performance, intestinal microbiota and gastrointestinal tract histomorphology. *Ann. Anim. Sci.*, 19: 747–765.
- Juntti S.A., Fernald R.D. (2016). Timing reproduction in teleost fish: cues and mechanisms. *Curr. Opin. Neurobiol.*, 38: 57–62.
- Kannadhasan S., Muthukumarappan K., Rosentrater K. (2009). Effects of ingredients and extrusion parameters on aquafeeds containing DDGS and tapioca starch. *J. Aquac. Feed Sci. Nutr.*, 1: 6–21.
- Ketola H.G. (1975). Requirement of Atlantic salmon for dietary phosphorus. *Trans. Am. Fish Soc.*, 104: 548–551.
- Khater E.S.G., Bahnasawy A.H., Ali S.A. (2014). Physical and mechanical properties of fish feed pellets. *J. Food Process Technol.*, 5: 1.
- Kierończyk B., Rawski M., Józefiak A., Mazurkiewicz J., Świątkiewicz S., Siwek M., Bednarczyk M., Szumacher-Strabel M., Cieślak A., Benzertiha A., Józefiak D. (2018). Effects of replacing soybean oil with selected insect fats on broilers. *Anim. Feed Sci. Tech.*, 240: 170–183.
- Kierończyk B., Sypniewski J., Rawski M., Czekala W., Świątkiewicz S., Józefiak D. (2020). From waste to sustainable feed material: the effect of *Hermetia Illucens* oil on the growth performance, nutrient digestibility, and gastrointestinal tract morphometry of broiler chickens. *Ann. Anim. Sci.*, 20: 157–177.
- Lazarotto V., Corraze G., Leprevost A., Quillet E., Dupont-Nivet M., Médale F. (2015). Three-year breeding cycle of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed a plant-based diet, totally free of marine resources: Consequences for reproduction, fatty acid composition and progeny survival. *PLoS One*, 10(2), e0117609.
- Leary S., Underwood W., Anthony R., Cartner S. (2013). AVMA guidelines for the euthanasia of animals: 2013 edition. Schaumburg, IL: American Veterinary Medical Association.
- Li Y., Bruni L., Jaramillo-Torres A., Kortner T.M., Chikwati E.M., Belghit I., Lock E.J., Krogdahl Å. (2019). Gut health and microbiota in post-smolt Atlantic salmon (*Salmo salar*) fed larvae meal from black soldier fly (*Hermetia illucens*). In: *Aquaculture Europe*, 2019.
- Li Y., Kortner T.M., Chikwati E.M., Belghit I., Lock E.J., Krogdahl Å. (2020). Total replacement of fish meal with black soldier fly (*Hermetia illucens*) larvae meal does not compromise the gut health of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture*, 520: 734967.
- Liu K., Frost J., Welker T.L., Barrows F.T. (2021). Comparison of new and conventional processing methods for their effects on physical properties of fish feed. *Anim. Feed Sci. Tech.*, 273: 114818.
- Luthada-Raswiswi R., Mukaratirwa S., O'Brien G. (2021). Animal protein sources as a substitute for fishmeal in aquaculture diets: a systematic review and meta-analysis. *Appl. Sci.*, 11: 3854.
- 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. *Ital. J. Anim. Sci.*, 14: 3889.
- Meneguz M., Schiavone A., Gai F., Dama A., Lussiana C., Renna M., Gasco L. (2018). Effect of rearing substrate on growth performance, waste reduction efficiency and chemical composition of black soldier fly (*Hermetia illucens*) larvae. *J. Sci. Food Agric.*, 98: 5776–5784.
- Mikołajczak Z., Rawski M., Mazurkiewicz J., Kierończyk B., Józefiak D. (2020). The effect of hydrolyzed insect meals in sea trout fingerling (*Salmo trutta m. trutta*) diets on growth performance, microbiota and biochemical blood parameters. *Animals*, 10: 1031.
- Mikołajczak Z., Rawski M., Mazurkiewicz J., Kierończyk B., Kołodziejcki P., Pruszyńska-Oszmałek E., Józefiak D. (2022). The first insight into black soldier fly meal in brown trout nutrition as an environmentally sustainable fish meal replacement. *Animal*, 16: 100516.
- Munshi J.S.D., Dutta H.M. (1998). *Fish morphology: Horizon of new research*. CRC Press LCC.
- Myers W.D., Ludden P.A., Nayigihugu V., Hess B.W. (2004). Technical note: A procedure for the preparation and quantitative analysis of samples for titanium dioxide. *J. Anim. Sci.*, 82: 179–183.
- National Research Council (2011). *Nutrient Requirements of Fish and Shrimp*. The National Academies Press, Washington, DC.
- Naylor R.L., Hardy R.W., Buschmann A.H., Bush S.R., Cao L., Klinger D.H., Little D.C., Lubchenco J., Shumway S.E., Troell M. (2021). A 20-year retrospective review of global aquaculture. *Nature*, 591: 551–563.
- Nogales-Mérida S., Gobbi P., Józefiak D., Mazurkiewicz J., Dudek K., Rawski M., Kierończyk B., Józefiak A. (2018). Insect meals in fish nutrition. *Rev. Aquac.*, 11: 1080–1103.
- Olsen R.E., Suontama J., Langmyhr E., Mundheim H., Ringø E., Melle W., Malde M.K., Hemre G.I. (2006). The replacement of fish meal with Antarctic krill, *Euphausia superba* in diets for Atlantic salmon, *Salmo salar*. *Aquac. Nutr.*, 12: 280–290.
- Ptak A., Józefiak D., Kierończyk B., Rawski M., Żyła K., Świątkiewicz S. (2013). Effect of different phytases on the performance, nutrient retention and tibia composition in broiler chickens. *Arch. Anim. Breed*, 56: 1028–1038.
- Rawski M., Mazurkiewicz J., Kierończyk B., Józefiak D. (2020). Black soldier fly full-fat larvae meal as an alternative to fish meal and fish oil in Siberian sturgeon nutrition: The effects on physical properties of the feed, animal growth performance, and feed acceptance and utilization. *Animals*, 10: 2119.
- Rawski M., Mazurkiewicz J., Kierończyk B., Józefiak D. (2021). Black soldier fly full-fat larvae meal is more profitable than fish meal and fish oil in Siberian sturgeon farming: the effects on aquaculture sustainability, economy and fish GIT development. *Animals*, 11: 604.
- Renna M., Schiavone A., Gai F., Dabbou S., Lussiana C., Malfatto V., Prearo M., Capucchio M.T., Biasato I., Biasibetti E., De Marco M., Brugiapaglia A., Zoccarato I., Gasco L. (2017). Evaluation of the suitability of a partially defatted black soldier fly (*Hermetia illucens* L.) larvae meal as ingredient for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) diets. *J. Anim. Sci. Biotechnol.*, 8: 1–13.
- Spranghers T., Ottoboni M., Klootwijk C., Ovin A., Deboosere S., De Meulenaer B., Michiels J., Eeckhout M., De Clercq P., De Smet S. (2017). Nutritional composition of black soldier fly (*Hermetia illucens*) prepupae reared on different organic waste substrates. *J. Sci. Food Agric.*, 97: 2594–2600.
- Stejskal V., Tran H.Q., Prokesova M., Gebauer T., Giang P.T., Gai F.,

- Gasco L. (2020). Partially defatted *Hermetia illucens* larva meal in diet of Eurasian perch (*Percas fluviatilis*) juveniles. *Animals*, 10: 1876.
- Stenberg O.K., Holen E., Piemontese L., Liland N.S., Lock E.J., Espe M., Belghit I. (2019). Effect of dietary replacement of fish meal with insect meal on *in vitro* bacterial and viral induced gene response in Atlantic salmon (*Salmo salar*) head kidney leukocytes. *Fish Shellfish Immunol.* 91: 223–232.
- Storebakken T. (2009). Atlantic salmon, *Salmo salar*. In: Nutrient requirements and feeding of finfish for aquaculture, Webster C.D., Lim C. (eds). CABI Publishing, pp. 79–102.
- Tang Z., Yin Y., Zhang Y., Huang R., Sun Z., Li T., Chu W., Kong X., Li L., Geng M., Tu Q. (2008). Effects of dietary supplementation with an expressed fusion peptide bovine lactoferricin–lactoferrampin on performance, immune function and intestinal mucosal morphology in piglets weaned at age 21 d. *Br. J. Nutr.*, 101: 998–1005.
- Umar S., Kamarudin M.S., Ramezani-Fard E. (2013). Physical properties of extruded aquafeed with a combination of sago and tapioca starches at different moisture contents. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 183: 51–55.
- Weththasinghe P., Hansen J., Nøklund D., Lagos L., Rawski M., Øverland M. (2021 a). Full-fat black soldier fly larvae (*Hermetia illucens*) meal and paste in extruded diets for Atlantic salmon (*Salmo salar*): Effect on physical pellet quality, nutrient digestibility, nutrient utilization and growth performances. *Aquaculture*, 530: 735785.
- Weththasinghe P., Øvrum Hansen J., Rawski M., Józefiak D., Ghimire S., Øverland M. (2021 b). Insects in Atlantic salmon (*Salmo salar*) diets – comparison between full-fat, defatted, and de-chitinised meals, and oil and exoskeleton fractions. *J. Insects Food Feed*, 8: 1235–1247.
- Xia J., Ge C., Yao H. (2021). Antimicrobial peptides from black soldier fly (*Hermetia illucens*) as potential antimicrobial factors representing an alternative to antibiotics in livestock farming. *Animals*, 11: 1937.
- Zarantonello M., Randazzo B., Nozzi V., Truzzi C., Giorgini E., Cardinaletti G., Freddi L., Ratti S., Girolametti F., Osimani A., Notarstefano V., Milanović V., Riolo P., Isidoro N., Tulli F., Gioacchini G., Olivotto I. (2021). Physiological responses of Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*) juveniles fed on full-fat insect-based diet in an aquaponic system. *Science*, 11: 1–13.

Received: 6 VI 2022

Accepted: 9 IX 2022



## BLACK SOLDIER FLY FULL-FAT MEAL IN ATLANTIC SALMON NUTRITION – PART B: EFFECTS ON GROWTH PERFORMANCE, FEED UTILIZATION, SELECTED NUTRIPHYSIOLOGICAL TRAITS AND PRODUCTION SUSTAINABILITY IN PRE-SMOLTS\*

Zuzanna Mikołajczak<sup>1</sup>, Jan Mazurkiewicz<sup>2</sup>, Mateusz Rawski<sup>2</sup>, Bartosz Kierończyk<sup>1</sup>, Agata Józefiak<sup>3</sup>, Sylwester Świątkiewicz<sup>4</sup>, Damian Józefiak<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Animal Nutrition, Poznań University of Life Sciences, Wołyńska 33, 60-637 Poznań, Poland

<sup>2</sup>Laboratory of Inland Fisheries and Aquaculture, Department of Zoology, Poznań University of Life Sciences, Wojska Polskiego 71c, 60-625 Poznań, Poland

<sup>3</sup>Department of Preclinical Sciences and Infectious Diseases, Poznań University of Life Sciences, Wołyńska 35, 60-637 Poznań, Poland

<sup>4</sup>Department of Animal Nutrition and Feed Science, National Research Institute of Animal Production, 32-083 Balice n. Kraków, Poland

\*Corresponding author: damian.jozefiak@up.poznan.pl

### Abstract

Black soldier larva meal (BSFM) seems to be a competitive protein and fat source for widely used fish meal (FM) and fish oil. Because of the still present problem of overfished seas and oceans for feed purposes, even a low substitution of the mentioned feed materials could have a positive impact on the environment. Due to the specificity of salmon metabolic processes, with particular attention to smoltification and the various requirements for nutrients related to individual stages, it is important to implement similar dietary inclusion levels of innovative feed materials in different life stages of Atlantic salmon. Thus, a holistic approach was undertaken in the cycle of two studies carried out: on fries and pre-smolts. This study aims to evaluate the effect of FM replacement by full-fat BSFM in Atlantic salmon pre-smolt diets on growth performance, feed utilization, somatic indices, histomorphology of intestines, colorimetric assessment and raw meat quality, as well as environmental sustainability. The following groups were applied: CON – without addition of full-fat BSFM and with 30% FM; BSFM5 – with 5% addition of full-fat BSFM and 27.1% FM; BSFM10 – with 10% full-fat BSFM and 24.3% FM; and BSFM15 – with 15% addition of full-fat BSFM and 21.3% FM. The present study showed satisfactory results of BSFM inclusion up to 15% as a replacement for FM in feeds for Atlantic salmon pre-smolts. The present study showed that BSFM is a suitable feed material for Atlantic salmon proper diet balancing and may be used to decrease FM content. The semi-technical application of BSFM containing diets confirmed their effectiveness during the growth phase of Atlantic salmon. According to our results, BSFM can be recommended as an alternative feed component in Atlantic salmon pre-smolt nutrition at levels up to 15%. Simultaneously, insect inclusion significantly improved the environmental sustainability of the rearing process.

**Key words:** black soldier fly, Atlantic salmon nutrition, innovative feed materials, sustainability, insect meals

Studies on the use of innovative feed materials in aquafeeds for salmonids have developed rapidly in recent years and have led to an increasing number of scientific contributions on this topic (De Santis et al., 2016; Gong et al., 2019; Tibbetts et al., 2020; Sørensen et al., 2021). At the same time, one of the most tested alternatives is insect-derived materials (Hoffmann et al., 2020, 2021; Mikołajczak et al., 2020; Terova et al., 2021), particularly black soldier fly meal (BSFM, *Hermetia illucens*) (Józefiak et al., 2019; Weththasinghe et al., 2021 a, b; Mikołajczak et al., 2022). Recently, the vast majority of BSFM utilization in Atlantic salmon (*Salmo salar*) nutrition has mainly included its im-

plementation in post-smolts diets during the seawater growth phase, and the inclusion levels reach up to 15% (Belghit et al., 2019 a; Bruni et al., 2020; Li et al., 2020 a, b; Husein et al., 2021). As a feed material, BSFM contains 30–58% crude protein and 40% crude fat (Nogales-Mérida et al., 2018). The requirements of Atlantic salmon before smoltification for crude protein are estimated between 50 and 60% of the diet and 18–30% for crude fat (Storebakken, 2009). BSFM seems to be a competitive protein and fat source for widely used fish meal (FM) and fish oil, even a low substitution of which could have a positive environmental impact, due to the still present problem of overfished seas and oceans for

\*This work was supported by the funds of the National Centre for Research and Development, no. POIR.01.01.01-00-0828/15, titled Inn-  
Sector: Innovative Technology of Feedstuffs Production Based on Insect Biomass and the funds of Poznań University of Life Sciences.

feed purposes (Franco et al., 2021; Mohan et al., 2022). Moreover, the use of BSFM as an alternative feed material is supported by its mineral composition – it is a rich source of calcium (Palma et al., 2019); fatty acid profile – due to the high content of lauric acid, whose additional antimicrobial effect and positive influence on fish health have been previously confirmed (Skriwanova et al., 2007; Belghit et al., 2019 b); and the presence of chitin – which can positively affect the immune system (Gopalakannan and Arul, 2006; Askarian et al., 2012).

In nutritional experiments performed on fish, meat quality assessment should be one of the most important elements (Alfiko et al., 2022). While the inclusion of insect-derived materials in fish diets does not affect the appearance and colour assessment of the meat, it can have a significant influence on the fatty acid profile (Renna et al., 2017; Husein et al., 2021). Lipids are important determiners of taste; thus, the described effect may result in palatability. Some studies reported that a panel that conducted sensory testing of the fillets was unable to detect a significant difference between groups containing insects or without them (Sealey et al., 2011; Lock et al., 2016). According to scientific literature data based on surveys, a significant portion of consumers declare a positive attitude towards meat from farmed animals and fish fed insect meals and fats (Verbeke et al., 2015; Laureati et al., 2016; Mancuso et al., 2016; Popoff et al., 2017). Apart from the question of price, taste, microbiological quality and health influence, respondents also emphasized the importance of environmental sustainability (Verbeke et al., 2015; Szendrő et al., 2020) and even underlined that information about the environmental impact of feeding methods in aquaculture may influence consumer choice (Bazoche and Poret, 2016).

Due to the specificity of salmon metabolic processes, with particular attention to smoltification and the various requirements for nutrients related to the stage of the individuals, or even other tolerance for specific feed materials depending on age, it is important to implement similar experimental diets in different life stages of Atlantic salmon as a continuation of the two treatments. The current study aims to present the results of our second experiment with Atlantic salmon pre-smolts reared on a semitechnical scale. The scientific goals were to assess the possibility of dietary application of BSFM at the levels of 5, 10, and 15% and the effect on growth performance, feed utilization, selected nutrphysiological traits, and meat quality of fish, as well as to calculate the environmental potential of this innovative feed material. To meet this question, the research hypothesis was that the addition of BSFM to Atlantic salmon diets will not disturb growth parameters, feed utilization, and designated gastrointestinal tract (GIT) functions and structures, and at the same time, it will increase the environmental sustainability of fish feed.

## Material and methods

### Ethical statement

The experimental protocols and methods utilized during this study complied with the recommendations of Directive 2010/63/EU of the European Parliament and the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes, the Polish law of 15 January 2015 on the protection of animals used for scientific purposes (Journal of Laws 2015, item 266), and the good practices and recommendations of the National Ethics Committee for Animal Experiments and the Local Ethics Committee for Animal Experiments of Poznań University of Life Sciences. The place of experimentation was certified for animal experiments by the National Ethics Committee for Animal Experiments (based on authorization by the Ministry of Science and Higher Education – approved unit no. 0091) – the Laboratory of Inland Fisheries and Aquaculture (the Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science of Poznań University of Life Sciences).

### Insect full-fat meal preparation

Insect biomass was purchased from HiProMine S.A., Robakowo, Poland. BSF larvae were fed a mix of plant byproducts normalized in terms of dry matter (DM) content by the addition of wheat middlings (Weththasinghe et al., 2021 a). Insect biomass was frozen at  $-20^{\circ}\text{C}$  and then dried first at  $130^{\circ}\text{C}$  for 1 hour and then at  $80^{\circ}\text{C}$  for 23 hours until a constant weight was reached using a chamber air dryer (HiProMine S.A., Robakowo, Poland). The prepared insects were homogenized using a beater mill (diameter less than 0.1 mm) to obtain a full-fat meal. The chemical analyses of meals were performed in the Laboratory of the Department of Animal Nutrition (Poznań University of Life Sciences). Ingredients were analysed according to the procedures described in detail below.

Amino acid profile analyses were performed to assess the amount of protein and amino acids as well as for conversion factor establishment for BSFM. The BSFM protein content was estimated based on the amino acid content. In further calculations for the diet, the conversion factor (Kp) for BSFM was calculated according to the following formula:

$$Kp = (\text{total amino acid content} / \text{total protein content based on } N \times 6.25 \text{ analysis}) \times 6.25$$

The formula is based on the ratio of amino acids to total protein content with  $N \times 6.25$  conversion, as previously established by Janssen et al. (2017). Due to the presence of chitin in insect biomass, which could lead to overestimation of protein, a calculation based on the analysis of BSFM used for the present experiment was performed, i.e.:

$$BSFM\ Kp = (412.1\ g/503.1\ g) \times 6.25 = 5.12$$

where:

412.1 g was the sum of amino acids in 1000 g of *BSFM DM*,

503.1 g was the total protein content in 1000 g of *BSFM* calculated on an  $N \times 6.25$  basis,

6.25 was the traditionally used Kp,

5.12 was the Kp calculated for BSFL.

The chemical composition and amino acid profile of the meals corrected by calculated KP are presented in Table 1.

Table 1. Chemical composition and amino acid profile of insect larval meal and fishmeal used in experimental diets

Nutrients	BSFM	FM
% of DM		
crude protein	41.21	61.80
crude fat	16.19	16.50
nitrogen-free extract <sup>1</sup>	9.54	4.20
ash	11.91	17.50
crude fibre	12.06	0.71
Ca	1.32	3.92
P	2.35	2.16
Amino acid profile (% of crude protein)		
Indispensable amino acids (IAA)		
arginine	5.47	6.07
histidine	3.25	2.09
isoleucine	4.73	4.24
leucine	7.83	7.48
lysine	6.83	6.63
methionine	2.13	2.53
phenylalanine	4.76	3.07
threonine	4.43	4.10
valine	6.80	5.79
Dispensable amino acids (DAA)		
alanine	8.22	6.87
aspartic acid	7.30	9.40
cysteine	0.77	9.59
glycine	6.15	6.41
glutamic acid	13.07	14.50
proline	6.68	4.28
serine	4.88	4.17
tyrosine	6.71	3.00

BSFM = black soldier fly larvae meal; FM = fishmeal (Brown fishmeal, 62% total protein, 16% fat, Agro-Fish, Kartoszyno, Poland).

<sup>1</sup>Nitrogen-free extract = dry matter % – (crude protein % + crude fat % + crude fibre % + ash %).

### Diet formulation and preparation

The isonitrogenous, isoenergetic, and isolipidic diets were manufactured: a control diet (CON) and three

experimental diets. The arrangement of diets was as follows: CON – without addition of full-fat BSFM and with 30% FM; BSFM5 – with 5% addition of full-fat BSFM and 27.1% FM; BSFM10 – with 10% full-fat BSFM and 24.3% FM; BSFM15 – with 15% addition of full-fat BSFM and 21.3% FM. All experimental diets were manufactured at the Experimental Station of Feed Production Technology and Aquaculture in Muchocin, Poland using a single-screw extruder (Metalchem S-60, Gliwice, Poland). The extrusion conditions were 90°C in the cylinder and 110°C in the head, 52 rpm screw speed, and a matrix size of 2 mm (Rawski et al., 2020). After drying and screening of dusty fractions, pellets were sprayed at 40°C with fish oil in the amount specified in the recipe. The diets were packed in plastic bags and stored at –18°C. The ingredient composition of diets of experiments on pre-smolts is presented in Table 2.

Table 2. Ingredient composition of the experimental diets in Atlantic salmon pre-smolts

Ingredients (g/kg)	CON	BSFM5	BSFM10	BSFM15
FM <sup>1</sup>	300	271	243	213
BSFM <sup>2</sup>	0	50	100	150
Blood cells <sup>3</sup>	95	95	95	95
Yeasts	60	60	60	60
DDGS	50	50	50	50
Soybean meal <sup>4</sup>	90	90	90	90
Wheat gluten <sup>5</sup>	120	120	120	120
Wheat meal	120	109	97	88
Fish oil <sup>6</sup>	129	119	109	98
Lecithin <sup>7</sup>	10	10	10	10
Premix <sup>8</sup>	15	15	15	15
Vitamin mix <sup>9</sup>	1	1	1	1
Choline chloride	2	2	2	2
Chalk	5	5	5	5
TiO <sub>2</sub>	3	3	3	3
Total (g)	1000	1000	1000	1000

FM = fish meal; BSFM = black soldier fly larvae meal; CON = control group, without the addition of full-fat BSFM and with 30% of FM; BSFM5 = 5% addition of full-fat BSFM and 27.1% of FM; BSFM10 = 10% addition of full-fat BSFM and 24.3% of FM; BSFM15 = 15% addition of full-fat BSFM and 21.3% of FM.

<sup>1</sup>Brown fishmeal, 62% total protein, 16% fat, Agro-Fish, Kartoszyno, Poland.

<sup>2</sup>Dried black soldier fly larvae, HiProMine S.A., Poland.

<sup>3</sup>AP 301 P, 92% total protein, APC (GB) Ltd, Ings Road, Doncaster, UK.

<sup>4</sup>Solvent extracted 45% crude protein, 1.8% crude lipid;

<sup>5</sup>Gluvital, Cargill, Poland.

<sup>6</sup>Agro-Fish, Kartoszyno, Poland.

<sup>7</sup>BergaPure, deoiled lecithin, 97% pure lecithin, Berg + Schmidt GmbH & Co. KG, Hamburg, Germany.

<sup>8</sup>Premix (g kg<sup>-1</sup>): vitamin A, 1,000,000 IU; vitamin D<sub>3</sub>, 200,000 IU; vitamin E, 1.5 g; vitamin K, 0.2 g; vitamin B<sub>1</sub>, 0.05 g; vitamin B<sub>2</sub>, 0.4 g; vitamin B<sub>12</sub>, 0.001 g; nicotinic acid, 2.5 g; inositol, 35 g; D-calcium pantothenate, 1.0 g; myoinositol, 500 IU; choline chloride, 7.5 g; folic acid, 0.1 g; methionine, 150.0 g; lysine, 150.0 g; Fe, 2.5 g; Mn, 6.5 g; Cu, 0.8 g; Co, 0.04 g; Zn, 4.0 g; I, 0.008 g; carrier > 1000.0 g.

<sup>9</sup>Vitamin mix (g kg<sup>-1</sup>): vitamin A, 50,000 IU; vitamin D<sub>3</sub>, 5000 IU; vitamin E, 30.0 mg; vitamin C, 100.0 mg.

### Biological material analyses

Experimental diets and whole fish bodies were analysed according to the AOAC (AOAC, 2005) methodology for crude protein (976.05), ether extract (920.39), crude ash (920.153), and crude fibre (985.29). The dry matter content was analysed according to the ISO 6496 method. The gross energy content was analysed according to the ISO 9831 method using an adiabatic bomb calorimeter (KL 12Mn, Precyzja-Bit PPHU, Poland) standardized with benzoic acid. To determine the number of macroelements (C and P), the methodology de-

scribed by Ptak et al. (2013) was applied. The amino acid profile was determined using an AAA-400 automatic amino acid analyser (Ingos Ltd., Prague, Czech Republic) and ninhydrin for postcolumn derivatization. Before carrying out profile analyses, hydrolysis in 6 N HCl for 24 h at 110°C was applied according to the AOAC procedure (994.12) (AOAC, 2005). The chemical composition and amino acid profile of the experimental diets are presented in Table 3, while the chemical composition of the whole fish body can be found in Table 4.

Table 3. Chemical composition and amino acid profile of the experimental diets used in Atlantic salmon pre-smolts

Nutrients	CON	BSFM5	BSFM10	BSFM15
% of DM				
crude protein	45.00	45.01	45.04	45.04
crude fat	20.00	20.05	20.08	20.00
nitrogen-free extract <sup>1</sup>	19.40	19.41	19.28	19.37
ash	9.26	9.05	8.83	8.59
crude fibre	1.53	1.85	2.18	2.52
Ca	0.97	0.98	0.99	1.00
P	0.99	0.96	0.92	0.89
gross energy (MJ/kg)	21.77	21.79	21.79	21.77
energy/protein ratio	48.37	48.41	48.37	48.34
Amino acid profile (% of crude protein)				
arginine	4.14	4.09	4.03	3.98
histidine	2.31	2.33	2.35	2.37
lysine	4.34	4.33	4.31	4.29
tryptophan	0.78	0.75	0.72	0.69
phenylalanine + tyrosine	4.77	4.86	4.94	5.02
methionine + cysteine	1.79	1.77	1.76	1.74
threonine	3.02	3.03	3.05	3.06
leucine	6.20	6.17	6.13	6.09
isoleucine	3.47	3.45	3.43	3.42
valine	4.75	4.75	4.74	4.74

FM = fish meal; BSFM = black soldier fly larvae meal; CON = control group, without the addition of full-fat BSFM and with 30% FM; BSFM5 = 5% addition of full-fat BSFM and 27.1% FM; BSFM10 = 10% addition of full-fat BSFM and 24.3% FM; BSFM15 = 15% addition of full-fat BSFM and 21.3% FM.  
<sup>1</sup>Nitrogen-free extract = dry matter % – (crude protein % + crude fat % + crude fibre % + ash %).

Table 4. Chemical composition of the whole body of Atlantic salmon pre-smolts fed with experimental diets

Nutrients	CON	BSFM5	BSFM10	BSFM15
Dry matter (%)	32.56	31.32	32.70	31.06
Crude protein (%)	18.83	18.41	18.61	18.48
Crude fat (%)	11.64	11.29	11.91	10.41
Ash (%)	2.11	2.13	2.04	2.30

FM = fish meal; BSFM = black soldier fly larvae meal; CON = control group, without the addition of full-fat BSFM and with 30% FM; BSFM5 = 5% addition of full-fat BSFM and 27.1% FM; BSFM10 = 10% addition of full-fat BSFM and 24.3% FM; BSFM15 = 15% addition of full-fat BSFM and 21.3% FM.



### Animal handling and growth performance trial

Atlantic salmon pre-smolts were maintained at the Experimental Station of Feed Production Technology and Aquaculture in Muchocin. Water was collected from a natural watercourse, flowed through a system of filters filled with thick gravel, and then sent to two equalizing tanks (each with a capacity of 5 m<sup>3</sup>), where it was aerated (Hiblow HP200, Hiblow, Japan) and distributed to the tanks through a system of pipes. Water parameters were recorded daily throughout the entire 60-day experiment. The temperature ranged from 14.2°C to 16.3°C, the concentration of oxygen ranged from 7.8 mg to 8.4 mg L<sup>-1</sup>, and the photoperiod was maintained at 16:8 (light:dark). Fish were fed using automatic belt feeders (12 h discharge time, FIAP Fishtech GmbH, Germany). The feed ratio was based on a feeding chart designed for Atlantic salmon, taking into consideration the average body weight and water temperature (NRC, 2011). The trial was carried out in three replications (tanks) per diet and 25 fish per tank with a water capacity of 260 L. Fish mortality and health condition were monitored daily. All animals were weighed at 10-day intervals. To calculate the growth performance and feed utilization parameters, the following formulas were used:

1. Final Body Weight (FBW):

$$FBW (g) = \text{fish biomass in the tank (g)} / \text{number of fish in the tank}$$

2. Body Weight Gain (BWG):

$$BWG (g) = \text{final body weight (g)} - \text{initial body weight (g)}$$

3. Percent of Body Weight Gain (PWG):

$$PWG (\%) = (\text{final body weight (g)} - \text{initial body weight (g)}) / \text{initial body weight (g)} \times 100$$

4. Feed Intake (FI):

$$FI (g) = \text{applied feed (g)} - \text{uneaten feed (g)}$$

5. Feed Conversion Ratio (FCR):

$$FCR = \text{feed intake (g)} / \text{body weight gain (g)}$$

6. Specific Growth Rate (SGR):

$$SGR (\%/day) = 100 \times (\ln \text{final body weight} - \ln \text{initial body weight}) / \text{number of experimental days}$$

7. Survival Rate (SR):

$$SR (\%) = (\text{final number of live fish} / \text{initial number of live fish}) \times 100$$

8. Protein Efficiency Ratio (PER):

$$PER = (\text{body weight gain (g)}) / (\text{feed intake (g)} \times \text{protein level in the diet (\%)})$$

9. Lipid Efficiency Ratio (LER):

$$LER = (\text{body weight gain (g)}) / (\text{feed intake (g)} \times \text{lipid level in the diet (\%)})$$

All growth performance results are presented as the means, where n = 3 tanks per group (20 fish/tank, 60 fish/group).

### Sample collection and somatic indices

On the last day of the experiment, all fish were weighed individually, and 6 animals from each tank were euthanized and decapitated for dissection and sampling for further analysis. Measurements of the carcass, liver, spleen, total intestines, proximal intestines, distal intestines, GIT, and total fish length were recorded to calculate numerous indices:

1. Condition Factor (CF):

$$CF = (\text{body weight (g)} / (\text{fish total length (cm)})^3) \times 100$$

2. Hepatosomatic Index (HSI):

$$HSI (\%) = (\text{liver weight (g)} / \text{body weight (g)}) \times 100$$

3. Relative GIT Length (GIT/FTL):

$$GIT/FTL (\%) = (\text{GIT length (mm)} / \text{fish total length (mm)}) \times 100$$

4. Relative Proximal Intestine Length (PL/FTL):

$$PL/FTL (\%) = (\text{proximal intestine length (mm)} / \text{fish total length (mm)}) \times 100$$

5. Relative Distal Intestine Length (DL/FTL):

$$DL/FTL (\%) = (\text{distal intestine length (mm)} / \text{fish total length (mm)}) \times 100$$

6. Carcass Share (CS):

$$CS (\%) = (\text{final carcass weight (g)} / \text{final body weight (g)}) \times 100$$

7. Spleen Share (SS):

$$SS (\%) = (\text{final spleen weight (g)} / \text{final body weight (g)}) \times 100$$

### Gut histomorphology

At the end of the experiment, 30 fish were sampled from each treatment. Samples of the proximal and distal portions of the GIT were collected, submerged in Bouin's solution (Merck), and stored at 4°C. Histological examination was performed using the methodology described by Bogucka et al. (2016). The samples were dehydrated, cleared and embedded in paraffin blocks. Formed blocks were cut on a rotary microtome (Thermo Shandon, Chadwick Road, Astmoor, Runcorn, Cheshire, United Kingdom) into slices of 10-µm thickness. The slices were placed on microscope slides coated with ovo-albumin with an addition of glycerol. The prepared samples were analysed using an AnMN-800 F microscope (OPTATECH, Warsaw, Poland) equipped with an Opta-View camera for recording microscopic images. MultiScan v. 18.03 microscope imaging software (Computer Scanning Systems II Ltd., Warsaw, Poland) was used to measure villus height and width and muscular layer thickness. Ten

villi per fish were randomly selected from a cross-section. The length was measured from the top of the villus to its base, while the width was measured at half of its length. The muscular layer thickness was defined as the average of five measurements per fish.

#### Colorimetric assessment and raw meat quality

During the last day of the experiment, 18 fish from each treatment were randomly chosen to take images of fresh fillets. A space with a natural daylight source was prepared. All images were taken using the Color Analysis Smartphone App v. 7.0.0. (Research Lab Tools), which allowed us to record L (lightness), a (redness index), and b (yellowness index). The RGB, chroma, and hue values were recorded based on ImageJ v.1.53 analyses.

The pH value was measured using a combined glass and reference electrode (pH 100 L; VWR International, Leuven, Belgium). Measurements were recorded in the meat of nine randomly selected fish three times: in fresh fillets directly after slaughter, after 24 h in cooled fillets, and the last time after cooking.

The cooking procedure was performed at 100°C for 10 minutes. The fillet share, cooled fillet and cooking efficiency were calculated according to the following formulas:

##### 1. Fillet Share (FS):

$$FS (\%) = (\text{final fillet weight (g)} / \text{final body weight (g)}) \times 100$$

##### 2. Cooled Fillet (CFL):

$$CFL (\%) = (\text{cooled fillet weight (g)} / \text{final fillet weight (g)}) \times 100$$

##### 3. Cooking Efficiency (CE):

$$CE (\%) = (\text{fillet weight before cooking (g)} / \text{fillet weight after cooking (g)}) \times 100$$

#### Environmental sustainability assessment

The environmental sustainability assessment was calculated based on raw data for growth performance and feed utilization parameters. The relative usage of marine-derived feed materials – fish meal (FMU) and fish oil (FOU) – was calculated according to two formulas:

$$1. FMU (\text{g/kg of fish gain}) = \text{fishmeal share in the diet} (\text{g kg}^{-1}) \times \text{feed conversion ratio (g/g)}$$

$$2. FOU (\text{g/kg of fish gain}) = \text{fish oil share in the diet} (\text{g kg}^{-1}) \times \text{feed conversion ratio (g/g)}$$

The fish-in-fish-out ratio (FIFO) was calculated as a practical measure of the quantity of live fish from capture fisheries required for each unit of farmed fish produced, as follows:

$$FIFO = ((\text{level of fishmeal in the diet (g kg}^{-1}) + \text{level of fish oil in the diet (g kg}^{-1})) / (\text{yields of fishmeal from wild fish (g kg}^{-1}) + \text{yields of fish oil from wild fish (g kg}^{-1}))) \times (\text{feed intake (g)} / \text{body weight gain (g)})$$

where the yield of fishmeal from wild fish was assumed to be 225 g kg<sup>-1</sup> of fresh fish weight and the yield of fish oil from wild fish was assumed to be 50 g kg<sup>-1</sup> of fresh fish weight (Stejskal et al., 2020).

#### Statistical analysis

R studio software was used to analyse the data for both experiments conducted in this study. To determine the normality of the data distribution and equality of variances, Kolmogorov–Smirnov and Levene's tests were used. One-way ANOVA was used, and if there were significant differences among treatments, further analysis was performed by correcting Duncan's post-hoc test. Data are presented as the mean ± standard error of the mean (SEM). The statistical significance level was declared at  $P < 0.05$ . The statistical analysis of variance was conducted according to the following general model:

$$Y_i = \mu + \alpha_i + \delta_{ij}$$

where:  $Y_i$  is the observed dependent variable,  $\mu$  is the overall mean,  $\alpha_i$  is the effect of the diet, and  $\delta_{ij}$  is the random error.

## Results

#### Growth performance trial

In the experiment conducted on Atlantic salmon pre-smolts no significant differences were found in FBW, BWG, FI, SGR, SR, or PER among the groups. However, in group BSFM15, an increase in FCR and a decrease in LER compared to CON were reported ( $P = 0.0195$  and  $P = 0.0114$ , respectively). The results of growth performance and feed utilization of Atlantic salmon pre-smolts are presented in Table 5.

#### Somatic indices

In the case of somatic indices, there were no significant differences in CF, HSI, CS, and SS among the groups (Table 6). Similarly, in terms of GIT indices, including GIT/FTL, PL/FTL and DL/FTL, no significant differences were reported. The results of those indices are presented in the graphs in Figure 1.

#### Gut histomorphology

All parameters represent the proximal intestine and showed significant differences among the groups. A decrease in villus height was observed among all groups fed BSFM diets ( $P < 0.0001$ ). In the case of villus width, only BSFM15 did not differ from the CON; moreover, BSFM5 showed a decrease, while in BSFM10, an increase in villus width was recorded ( $P < 0.0001$ ). In turn, CON and BSFM10 did not differ in terms of villus area; however, BSFM5 and BSFM15 showed a decrease in this item ( $P < 0.0001$ ). The muscular layer thickness increased with the inclusion of insects in the diets ( $P < 0.0001$ ).

Table 5. Growth performance, survival rate and feed utilization parameters of Atlantic salmon pre-smolts fed with experimental diets

Parameter	CON	BSFM5	BSFM10	BSFM15	SEM	P value
IBW (g)	201.2	201.0	202.0	201.1	0.3728	0.8180
FBW (g)	473.6	468.2	462.5	460.5	2.4136	0.2110
BWG (g)	272.4	267.2	260.5	259.4	2.4358	0.1910
PWG (%)	135.4	132.9	129.5	124.0	1.4618	0.1010
SR	98.7	98.7	98.7	97.3	0.5946	0.8590
FI (g)	6613	6610	6627	6610	18.0278	0.9900
FCR	0.98 b	0.99 b	1.02 ab	1.03 a	0.0078	0.0195
SGR	1.43	1.41	1.38	1.38	0.0091	0.1930
PER	2.23	2.19	2.13	2.08	0.0238	0.0678
LER	6.47 a	6.43 a	6.09 a	5.18 b	0.1641	0.0114

FM = fish meal; BSFM = black soldier fly larvae meal; CON = control group, without the addition of full-fat BSFM and with 30% FM; BSFM5 = 5% addition of full-fat BSFM and 27.1% FM; BSFM10 = 10% addition of full-fat BSFM and 24.3% FM; BSFM15 = 15% addition of full-fat BSFM and 21.3% FM; IBW – initial fish body weight; FBW – final fish body weight; BWG – fish body weight gain; PWG – percent of fish body weight gain; SR – fish survival rate; FI – feed intake; FCR – feed conversion ratio; SGR – specific growth rate; PER – protein efficiency ratio; LER – lipid efficiency ratio.

a–b – values within a row with different letters differ significantly at P<0.05. Values are presented as the means (n = 3/treatment), pooled standard error of the mean, SEM.

Table 6. Somatic indices of Atlantic salmon pre-smolts fed with experimental diets

Parameter	CON	BSFM5	BSFM10	BSFM15	SEM	P value
CS (%)	90.3	90.6	90.2	91.3	0.2936	0.5370
SS (%)	0.17	0.17	0.15	0.17	0.0049	0.4530
CF	0.79	0.84	0.78	0.86	0.0191	0.3630
HSI (%)	1.06	1.12	1.03	1.08	0.0206	0.4690

FM = fish meal; BSFM = black soldier fly larvae meal; CON = control group, without the addition of full-fat BSFM and with 30% FM; BSFM5 = 5% addition of full-fat BSFM and 27.1% FM; BSFM10 = 10% addition of full-fat BSFM and 24.3% FM; BSFM15 = 15% addition of full-fat BSFM and 21.3% FM; CS – carcass share; SS – spleen share; CF – condition factor; HSI – hepatosomatic index.

Values are presented as the means (n = 18/treatment), pooled standard error of the mean, SEM.

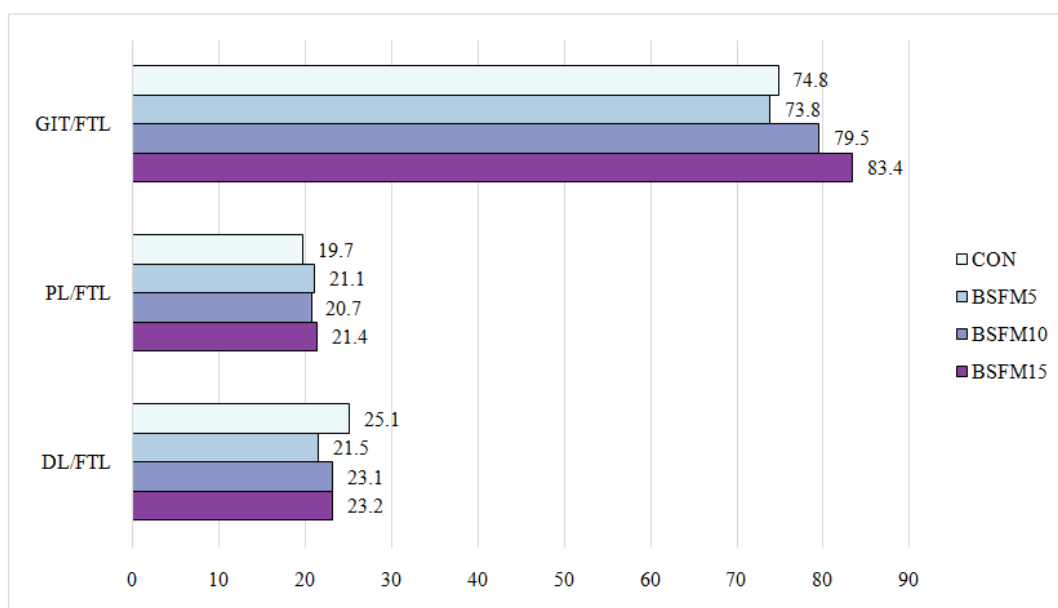


Figure 1. The effect of experimental diets on the percentage of length of individual parts of the gastrointestinal tract in the total body length of Atlantic salmon pre-smolts. FM = fish meal; BSFM = black soldier fly larvae meal; CON = control group, without the addition of full-fat BSFM and with 30% FM; BSFM5 = 5% addition of full-fat BSFM and 27.1% FM; BSFM10 = 10% addition of full-fat BSFM and 24.3% FM; BSFM15 = 15% addition of full-fat BSFM and 21.3% FM; GIT:FTL – relative gastrointestinal tract length; PL:FTL – relative proximal intestine length; DL:FTL – relative distal intestine length; no statistically significant differences were observed among the groups (P≥0.05)

Table 7. Histomorphology of proximal and distal intestines of Atlantic salmon pre-smolts fed with experimental diets

Parameter	CON	BSFM5	BSFM10	BSFM15	SEM	P value
Proximal intestine						
villus height ( $\mu\text{m}$ )	781.04 a	592.20 b	605.56 b	530.18 b	18.5074	<0.0001
villus width ( $\mu\text{m}$ )	123.24 b	109.00 c	145.73 a	112.34 bc	2.6153	<0.0001
villus area ( $\text{mm}^2$ )	301.80 a	199.57 b	276.51 a	188.55 b	8.7725	<0.0001
muscular layer thickness ( $\mu\text{m}$ )	105.81 c	131.19 b	151.28 ab	154.79 a	4.4038	<0.0001
Distal intestine						
villus height ( $\mu\text{m}$ )	535.69	513.08	513.08	580.69	12.5467	0.2220
villus width ( $\mu\text{m}$ )	128.64 b	152.59 a	138.76 ab	144.58 ab	2.8854	0.0253
villus area ( $\text{mm}^2$ )	215.56	245.29	232.03	270.25	8.1266	0.1070
muscular layer thickness ( $\mu\text{m}$ )	222.08	217.27	248.84	220.76	6.0209	0.2260

FM = fish meal; BSFM = black soldier fly larvae meal; CON = control group, without the addition of full-fat BSFM and with 30% FM; BSFM5 = 5% addition of full-fat BSFM and 27.1% FM; BSFM10 = 10% addition of full-fat BSFM and 24.3% FM; BSFM15 = 15% addition of full-fat BSFM and 21.3% FM. a–c – values within a row with different letters differ significantly at  $P < 0.05$ . Values are presented as the means ( $n = 30$ /treatment for villus height, villus width and villus area;  $n = 15$ /treatment for muscular layer thickness), pooled standard error of the mean, SEM.

Table 8. Colorimetric assessment and raw meat quality of Atlantic salmon pre-smolts fed with experimental diets

Parameter	CON	BSFM5	BSFM10	BSFM15	SEM	P value
Cie L	63.1	62.9	63.0	61.5	0.7819	0.8710
Cie A	7.08	7.76	6.51	7.21	0.3585	0.6860
Cie B	13.2	13.2	12.0	12.1	0.3055	0.3040
Chroma	15.1	15.5	13.8	14.2	0.4012	0.4430
Hue	24.6	23.6	24.7	23.5	0.5076	0.7650
R	174	175	172	169	1.9686	0.7830
G	148	147	148	144	2.0398	0.8910
B	130	129	132	128	2.2386	0.9590
Meat pH 0 h	6.60	6.60	6.66	6.67	0.0245	0.6070
Meat pH 24 h	6.38	6.39	6.40	6.50	0.0355	0.6900
Meat pH after cooking	6.37	6.44	6.38	6.50	0.0333	0.5290
Fillet share (%)	53.1	53.0	53.9	53.5	0.4118	0.8630
Cooled fillet (%)	97.1	97.2	97.3	97.3	0.1113	0.7960
Cooking efficiency (%)	91.7	92.3	91.4	92.8	0.4680	0.7610

FM = fish meal; BSFM = black soldier fly larvae meal; CON = control group, without the addition of full-fat BSFM and with 30% FM; BSFM5 = 5% addition of full-fat BSFM and 27.1% FM; BSFM10 = 10% addition of full-fat BSFM and 24.3% FM; BSFM15 = 15% addition of full-fat BSFM and 21.3% FM. Values are presented as the means ( $n = 18$ /treatment for colorimetric assessment;  $n = 9$ /treatment for cooking efficiency), pooled standard error of the mean, SEM.

Table 9. Environmental sustainability parameters of Atlantic salmon pre-smolts fed with experimental diets

Parameter	CON	BSFM5	BSFM10	BSFM15	SEM	P value
FCE (g/g)	1.02 a	1.00 ab	0.98 b	0.97 b	0.0078	0.0367
FMU (g/kg)	294.5 a	274.4 b	254.8 c	229.6 d	7.3546	<0.0001
FOU (g/kg)	126.6 a	118.7 b	111.6 c	101.4 d	2.8637	<0.0001
FIFO	1.53 a	1.43 b	1.33 c	1.20 d	0.0372	<0.0001

FM = fish meal; BSFM = black soldier fly larvae meal; CON = control group, without the addition of full-fat BSFM and with 30% FM; BSFM5 = 5% addition of full-fat BSFM and 27.1% FM; BSFM10 = 10% addition of full-fat BSFM and 24.3% FM; BSFM15 = 15% addition of full-fat BSFM and 21.3% FM; FCE – feed conversion efficiency; FMU – fish meal use; FOU – fish oil used, FIFO – the fish-in-fish-out ratio.

a–d – values within a row with different letters differ significantly at  $P < 0.05$ . Values are presented as the means ( $n = 3$ /treatment), pooled standard error of the mean, SEM.

The distal intestine results did not show any significant differences in terms of villus height and area or muscular layer thickness. However, villus width showed an increase in BSFM5 ( $P = 0.0253$ ). All gut histomorphology parameters are presented in Table 7.

#### Colorimetric assessment and raw meat quality

No effect of experimental diets on colorimetric assessment results was recorded during the study. The pH value of raw meat after slaughter varied between 6.60 and 6.67. After 24 h from the end of the experiment and

after cooking, the pH of the meat decreased slightly. The numerical differences between experimental groups in the fillet share were not wide, and the values were within a range of 53.0–53.9. All results are presented in Table 8.

### Environmental sustainability assessment

In terms of environmental sustainability parameters, a decrease in the FCE value was observed in the BSFM10 and BSFM15 groups ( $P = 0.0367$ ). However, all groups with insect addition presented decreases in FMU, FOU, and FIFO ( $P < 0.0001$  for all parameters). All results of the environmental sustainability parameters of Atlantic salmon pre-smolts are presented in Table 9.

## Discussion

A wide spectrum of results, both positive (Józefiak et al., 2019; Rawski et al., 2020, 2021) and negative (Roncarati et al., 2015; Dietz and Liebert, 2018; Dumas et al., 2018) effects of insect meal application in aquaculture, was observed over the last decade (Weththasinghe et al., 2022; Hua, 2021). However, due to insect biomass processing technology development, the products that were tested should not be compared without mentioning that fact. Thus, publications with the same product compared among species and stages of development are needed. Considering the two presented experiments conducted on Atlantic salmon, the following mode of action could be assumed. In the following study, the inclusion of BSFM in diets up to 15% did not affect growth performance. However, Atlantic salmon fries showed a physiologically lower tolerance to the BSFM content in feeds, which resulted in a decrease in final body weight in the mentioned group. In both cases, a 15% share resulted in higher FCR values, which from the livestock and aquaculture production perspective is an undesirable effect. These observations were not confirmed by nutrient digestibility or intestinal histomorphology results of Atlantic salmon fry experiments due to the lack of statistically significant differences. Nevertheless, the structure of the gastrointestinal tract of older individuals indicated a decrease in villus height in the proximal intestine, which may result in decreased protein absorption in this section, which could ultimately affect the abovementioned FCR results. Importantly and worth emphasizing, in the case of both experiments, no effect of diets on somatic indices or meat quality was found. However, one of the most important results of the conducted research is the confirmation of the environmental sustainability of insect-based feed. All groups with BSFM inclusion in the diets showed a positive effect on the FIFO ratio. The results suggest that in the nutrition of Atlantic salmon fries, it is optimal to use lower BSFM shares (up to 10%), while pre-smolts can tolerate a wider range (up to 15%) without significantly affecting growth performance. Moreover, the authors' research team has previously conducted experiments with the usage of insects in salmonid diets. An experiment

using BSFM in brown trout nutrition showed no effect on growth performance or feed utilization and simultaneously improved the environmental sustainability parameters (Mikołajczak et al., 2022). In this experiment, a positive effect of diet on the hepatosomatic index was also found. Despite no differences in growth performance, crude protein and crude fat digestibility were reduced in some insect groups (especially with 20% BSFM in the diets). In turn, the usage of mealworm (*Tenebrio molitor*) and superworm (*Zophobas morio*) in sea trout nutrition did not affect the growth performance but decreased the protein efficiency ratio (Mikołajczak et al., 2020). The addition of superworm meal increased liver lipid values, which resulted in an increasing hepatosomatic index. No differences were observed in the histomorphological assessment of the intestines. Previous experiments indicate that insect meals may also modulate the microbiota of the gastrointestinal tract (Mikołajczak et al., 2020), as well as the biochemical blood parameters (Mikołajczak et al., 2020, 2022).

The results of the chemical analyses of the experimental diets confirmed the isonitrogenous, isolipidic and isoenergetic properties of the applied feeds. In terms of key nutrients, balanced diets should not disturb the proper growth performance of fish. The highest numerical differences were observed in the case of crude fibre, which increased with the higher share of BSFM in the diet. This can be explained by the chitin content, which qualifies it as a polysaccharide. Despite the fact that ash content decreased in all diets with insect inclusion, the calcium remained at a similar level. A decrease in phosphorus levels was recorded in the BSFM groups; however, the proper level of total phosphorus in the diet was maintained according to dietary requirements not exceeding 6 g/kg (Storebakken, 2009).

In the present study, the inclusion of BSFM in Atlantic salmon pre-smolt diets did not affect the final body weight (FBW), body weight gain (BWG), percent of body weight gain (PWG), feed intake (FI), specific growth rate (SGR), survival rate (SR), or protein efficiency ratio (PER). Nevertheless, a significant increase in the feed conversion ratio (FCR) was observed in the BSFM15 group. In the case of FCR, the recorded results are in agreement with Weththasinghe et al. (2021 b), where 20% inclusion of full-fat BSFM resulted in the highest FCR level. It should be noted that this effect was also accompanied by an increase in FBW, SGR, and FI, which was not observed in our study. In turn, the usage of full-fat BSFM at a level of 16% in Atlantic salmon diets resulted in a decrease in FCR and simultaneously did not show any differences in terms of FBW, SGR and FI compared to the control group (Weththasinghe et al., 2021 a). The initial body weight of the fish may contribute to these differences between the experimental results. Despite the fact that in the described studies the individuals are called pre-smolts, their body weight is only a dozen grams, while fish used in our study weighed approximately 200 g at the beginning. Considering stud-

ies on another farmed salmonid species – rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), which had a higher initial body weight, the results are not so divergent. There were no significant differences in FBW, SGR, BWG or PER (Renna et al., 2017; Cardinaletti et al., 2019); however, FCR, even without significant differences, showed higher results with increasing dietary BSFM inclusion (Cardinaletti et al., 2019). Therefore, it is important during data comparison with the scientific literature to not only focus on the fish age determination or phase – fresh or saltwater but also, or even primarily, on body weight, which perhaps better describes their stage of development.

No effect on somatic indices, including carcass share (CS), spleen share (SS), condition factor (CF), or hepatosomatic index (HSI), was observed among the groups. The vast majority of scientific literature that also studied the effects of different insect diets on somatic indices of salmonids has focused mainly on HSI and VSI (Stenberg et al., 2019; Hoffmann et al., 2020; Hossain et al., 2021; Weththasinghe et al., 2021 b). Taking into account these data, as well as the established norms for HSI (Munshi and Dutta, 2017), the condition of the liver was not disturbed by either the control diet or any of the experimental groups. Despite the lack of literature data that would examine the influence of insect introduction in fish nutrition on changes in the spleen indices, the usage of BSFM in the diets of Atlantic salmon did not affect these organs compared to the control group. The results of the spleen share were slightly higher than those found in other studies. However, as the authors pointed out, smolts show lower values of spleenosomatic index, which indicate an emptying of the spleen blood cell reservoirs (Nordgarden et al., 2002). This process has probably not yet occurred in the case of our fish.

In the present study, no statistically significant differences were observed in the GIT/FTL, PL/FTL, or DL/FTL. However, a slight increase in PL/FTL was observed at the expense of DL/FTL. Because enzyme activity is highest in the proximal intestine, this effect could be considered positive because of the increasing digestion probability (Krogdahl et al., 2015). Nevertheless, the digestibility of nutrients was not the subject of this study, which was due to the difficulties associated with the collection of fish faeces, widely described in the literature (Austreng, 1978; Choubert et al., 1982; Allan et al., 1999). In the previous part of the presented experimental cycle conducted on Atlantic salmon fries, no significant differences were observed in the case of crude protein and crude fat digestibility; however, GIT somatic indices seemed to demonstrate opposite results, where DL/FTL numerically showed an increase in insect groups at the expense of PL/FTL.

In the present study, in all BSFM groups, a decrease in villus height in the case of proximal intestine histomorphology was observed; nevertheless, because BSFM10 showed the highest values in the case of villus width, this group was the only one that did not differ from the CON in the event of villus area. According

to Renna et al. (2017), the dietary inclusion of partially defatted BSFM up to 40% did not induce morphological changes in the rainbow trout intestine. In turn, Dumas et al. (2018) reported that the content of partially defatted BSFM at a level of 26% led to a decrease in villus height in the anterior intestinal part, which is in line with our research. These changes in the structure of the intestinal villi can lead to a decrease in nutrient absorption (English et al., 2021). Importantly, in the aforementioned study, this effect was manifested in the growth performance – the group with the highest BSFM inclusion was also characterized by reduced BWG. Nevertheless, such observations were not recorded in our experiment.

In the distal intestine, villus width was higher in fish from the BSFM5 group. The rest of the BSFM groups did not differ from the CON group; however, a numerical increase in villus width was observed. In contrast, Dumas et al. (2018) reported no effect of BSFM inclusion on the posterior intestine of rainbow trout. According to Egerton et al. (2020), larger villi equate to larger enterocytes or an increase in their number, which provide a greater surface area for the absorption of nutrients and metabolites.

No significant differences in the colorimetric assessment of Atlantic salmon raw meat were observed in our study. These findings are in agreement with several scientific papers in which BSFM was introduced into salmonid diets (Renna et al., 2017; Secci et al., 2019; Bruni et al., 2020; Husein et al., 2021). In our research, the proportions of these parameters seem to be preserved and in line with the literature on Atlantic salmon (Secci et al., 2019; Bruni et al., 2020): a clear advantage of L and reduced shares in b and a, with b showing higher values. Simultaneously, in the case of raw meat pH, the results presented by scientific papers are not unequivocal. Bruni et al. (2020) reported much lower pH values than we obtained in our study – even at 6.08. In turn, Secci et al. (2019) presented values closer to 6.40. Moreover, our results indicate that the pH of the meat was quite stable even 24 h after the analyses and oscillated at approximately 6.40, which is in agreement with Renna et al. (2017).

Modern aquaculture diets for predatory fish such as Atlantic salmon showed a significant decrease in fish meal (FM) use from >60% in the 1990s to <20% in the 2010s (Ytrestøyl et al., 2015). Simultaneously, it has been reported that total FM replacement in salmon diets has negative consequences on production parameters (Davidson et al., 2018; Robaina et al., 2019). In the present study, FIFO values decreased with the increase in the BSFM share in the diets. Despite the fact that even with the highest inclusion of BSFM, the FIFO value still exceeded 1.0, these results are still significantly lower compared to the estimated FIFO of salmon feed in 2017 (Naylor et al., 2021). Nevertheless, data on the influence of various alternative protein sources on FIFO values and FM use in aquafeeds are still limited and need further consideration.

## Conclusions

The present study showed that BSFM is a suitable feed material for Atlantic salmon proper diet balancing and may be used to decrease fish meal content. The semi-technical application of BSFM-containing diets confirmed their effectiveness during the growth phase of Atlantic salmon. According to our results, BSFM can be recommended as an alternative feed component in Atlantic salmon pre-smolt nutrition at levels up to 15%. Simultaneously, insect inclusion significantly improved the environmental sustainability of the rearing process.

## Acknowledgment

We gratefully acknowledge the contributions and logistical support provided by Poznań University of Life Sciences. The authors would like to thank Silvia Nogales-Mérida, Sanan Talibov, Joanna Kowalska, Krzysztof Florczyk and Jan Banaszak for their contribution to the technical parts of the insect meal and feed preparation, the growth experiment, and data analysis.

## References

- Alfiko Y., Xie D., Astuti R.T., Wong J., Wang L. (2022). Insects as a feed ingredient for fish culture: Status and trends. *Aquac. Fish.* 7: 166–178.
- Allan G.L., Rowland S.J., Parkinson S., Stone D.A.J., Jantrarat W. (1999). Nutrient digestibility for juvenile silver perch *Bidyanus bidyanus*: Development of methods. *Aquaculture*, 170: 131–145.
- Askarian F., Zhou Z., Olsen R.E., Sperstad S., Ringø E. (2012). Culturable autochthonous gut bacteria in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) fed diets with or without chitin. Characterization by 16S rRNA gene sequencing, ability to produce enzymes and *in vitro* growth inhibition of four fish pathogens. *Aquaculture*, 326: 1–8.
- Association of Official Agricultural Chemists (AOAC) (2005). Official Methods of Analysis. AOAC, Arlington, VA, USA.
- Austreng E. (1978). Digestibility determination in fish using chromic oxide marking and analysis of contents from different segments of the gastrointestinal tract. *Aquaculture*, 13: 265–272.
- Bazoche P., Poret S. (2016). What do trout eat: Acceptance of insects in animal feed. *J. Recherche Sci. Soc.*, 1–4.
- Belghit I., Liland N.S., Gjesdal P., Biancarosa I., Menchetti E., Li Y., Waagbø R., Krogdahl Å., Lock E.J. (2019 a). Black soldier fly larvae meal can replace fish meal in diets of sea-water phase Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture*, 503: 609–619.
- Belghit I., Waagbø R., Lock E.J., Liland N.S. (2019 b). Insect-based diets high in lauric acid reduce liver lipids in freshwater Atlantic salmon. *Aquac. Nutr.*, 25: 343–357.
- Bogucka J., Dankowiakowska A., Elminowska-Wenda G., Sobolewska A., Szczerba A., Bednarczyk M. (2016). Effects of prebiotics and synbiotics delivered *in ovo* on broiler small intestine histomorphology during the first days after hatching. *Folia Biol. (Kraków)*, 64: 131–143.
- Bruni L., Belghit I., Lock E.J., Secci G., Taiti C., Parisi G. (2020). Total replacement of dietary fish meal with black soldier fly (*Hermetia illucens*) larvae does not impair physical, chemical or volatile composition of farmed Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *J. Sci. Food Agric.*, 100: 1038–1047.
- Cardinaletti G., Randazzo B., Messina M., Zarantoniello M., Giorgini E., Zimbelli A., Bruni L., Parisi G., Olivotto I., Tulli F. (2019). Effects of graded dietary inclusion level of full-fat *Hermetia illucens* prepupae meal in practical diets for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Animals*, 529: 735678.
- Choubert G., De la Noüe J., Luquet P. (1982). Digestibility in fish: Improved device for the automatic collection of feces. *Aquaculture*, 29: 185–189.
- Davidson J., Kenney P.B., Barrows F.T., Good C., Summerfelt S.T. (2018). Fillet quality and processing attributes of post-smolt Atlantic salmon, *Salmo salar*, fed a fishmeal-free diet and a fishmeal-based diet in recirculation aquaculture systems. *J. World Aquac. Soc.*, 49: 183–196.
- De Santis C., Tocher D.R., Ruohonen K., El-Mowafi A., Martin S.A.M., Dehler C.E., Secombes C.J., Crampton V. (2016). Air-classified faba bean protein concentrate is efficiently utilized as a dietary protein source by post-smolt Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture*, 452: 169–177.
- Dietz C., Liebert F. (2018). Does graded substitution of soy protein concentrate by an insect meal respond on growth and N-utilization in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)? *Aquac. Rep.*, 12: 43–48.
- Dumas A., Raggi T., Barkhouse J., Lewis E., Weltzien E. (2018). The oil fraction and partially defatted meal of black soldier fly larvae (*Hermetia illucens*) affect differently growth performance, feed efficiency, nutrient deposition, blood glucose and lipid digestibility of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 492: 24–34.
- Egerton S., Wan A., Murphy K., Collins F., Ahern G., Sugrue I., Busca K., Egan F., Muller N., Whooley J., McGinnity P., Culloty S., Ross R.P., Stanton C. (2020). Replacing fishmeal with plant protein in Atlantic salmon (*Salmo salar*) diets by supplementation with fish protein hydrolysate. *Sci. Rep.*, 10: 1–16.
- English G., Wanger G., Colombo S.M. (2021). A review of advancements in black soldier fly (*Hermetia illucens*) production for dietary inclusion in salmonid feeds. *J. Sci. Food Agric.*, 5: 100164.
- Franco A., Scieuzo C., Salvia R., Petrone A.M., Tafi E., Moretta A., Schmitt E., Falabella P. (2021). Lipids from *Hermetia illucens*, an innovative and sustainable source. *Sustainability*, 13: 10198.
- Gong Y., Bandara T., Huntley M., Johnson Z.I., Dias J., Dahle D., Sørensen M., Kiron V. (2019). Microalgae *Scenedesmus* sp. as a potential ingredient in low fishmeal diets for Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture*, 501: 455–464.
- Gopalakannan A., Arul V. (2006). Immunomodulatory effects of dietary intake of chitin, chitosan and levamisole on the immune system of *Cyprinus carpio* and control of *Aeromonas hydrophila* infection in ponds. *Aquaculture*, 255: 179–187.
- Hoffmann L., Rawski M., Nogales-Mérida S., Mazurkiewicz J. (2020). Dietary inclusion of *Tenebrio molitor* meal in sea trout larvae rearing: Effects on fish growth performance, survival, condition, and GIT and liver enzymatic activity. *Ann. Anim. Sci.*, 20: 579–598.
- Hoffmann L., Rawski M., Nogales-Mérida S., Kołodziejcki P., Pruszyńska-Oszmałek E., Mazurkiewicz J. (2021). Mealworm meal use in sea trout (*Salmo trutta* m. *trutta*, L.) fingerling diets: effects on growth performance, histomorphology of the gastrointestinal tract and blood parameters. *Aquac. Nutr.*, 27: 1512–1528.
- Hossain M.S., Fawole F.J., Labh S.N., Small B.C., Overturf K., Kumar V. (2021). Insect meal inclusion as a novel feed ingredient in soy-based diets improves performance of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 544: 737096.
- Hua K. (2021). A meta-analysis of the effects of replacing fish meals with insect meals on growth performance of fish. *Aquaculture*, 530: 735732.
- Husein Y., Bruni L., Secci G., Taiti C., Belghit I., Lock E.J., Parisi G. (2021). Does sous-vide cooking preserve the chemical and volatile composition of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) fed *Hermetia illucens* larvae meal? *J. Insects Food Feed*, 7: 69–77.
- Janssen R.H., Vincken J.P., Van Den Broek L.A.M., Fogliano V., Lakemond C.M.M. (2017). Nitrogen-to-protein conversion factors for three edible insects: *Tenebrio molitor*, *Alphitobius diaperinus*, and *Hermetia illucens*. *J. Agric. Food Chem.*, 65: 2275–2278.
- Józefiak A., Nogales-Mérida S., Mikołajczak Z., Rawski M., Kierończyk B., Mazurkiewicz J. (2019). The utilization of full-fat insect meal in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) nutrition: the effects on growth performance, intestinal microbiota and gastrointestinal tract histomorphology. *Ann. Anim. Sci.*, 19: 747–765.

- Krogdahl Å., Sundby A., Holm H. (2015). Characteristics of digestive processes in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Enzyme pH optima, chyme pH, and enzyme activities*. *Aquaculture*, 449: 27–36.
- Laureati M., Proserpio C., Jucker C., Savoldelli S. (2016). New sustainable protein sources: Consumers' willingness to adopt insects as feed and food. *It. J. Food Sci.*, 28.
- Li Y., Bruni L., Jaramillo-Torres A., Gajardo K., Kortner T.M., Krogdahl A. (2020 a). Differential response of digesta and mucosa-associated intestinal microbiota to dietary black soldier fly (*Hermetia illucens*) larvae meal in seawater phase Atlantic salmon (*Salmo salar*). *bioRxiv*.
- Li Y., Kortner T.M., Chikwati E.M., Belgit I., Lock E.J., Krogdahl Å. (2020 b). Total replacement of fish meal with black soldier fly (*Hermetia illucens*) larvae meal does not compromise the gut health of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture*, 520: 734967.
- 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. *Aquac. Nutr.*, 22: 1202–1213.
- Mancuso T., Baldi L., Gasco L. (2016). An empirical study on consumer acceptance of farmed fish fed on insect meals: the Italian case. *Aquac. Int.*, 24: 1489–1507.
- Mikołajczak Z., Rawski M., Mazurkiewicz J., Kierończyk B., Józefiak D. (2020). The effect of hydrolyzed insect meals in sea trout fingerling (*Salmo trutta m. trutta*) diets on growth performance, microbiota and biochemical blood parameters. *Animals*, 10: 1031.
- Mikołajczak Z., Rawski M., Mazurkiewicz J., Kierończyk B., Kołodziejewski P., Pruszyńska-Oszmałek E., Józefiak D. (2022). The first insight into black soldier fly meal in brown trout nutrition as an environmentally sustainable fish meal replacement. *Animal*, 16: 100516.
- Mohan K., Rajan D.K., Muralisankar T., Ganesan A.R., Sathishkumar P., Revathi N. (2022). Use of black soldier fly (*Hermetia illucens* L.) larvae meal in aquafeeds for a sustainable aquaculture industry: A review of past and future needs. *Aquaculture*, 553: 738095.
- Munshi J.S.D., Dutta H.M. (1998). *Fish morphology: Horizon of new research*. CRC Press LCC.
- National Research Council (2011). *Nutrient Requirements of Fish and Shrimp*. The National Academies Press, Washington, DC.
- Naylor R.L., Hardy R.W., Buschmann A.H., Bush S.R., Cao L., Klingler D.H., Little D.C., Lubchenco J., Shumway S.E., Troell M. (2021). A 20-year retrospective review of global aquaculture. *Nature*, 591: 551–563.
- Nogales-Mérida S., Gobbi P., Józefiak D., Mazurkiewicz J., Dudek K., Rawski M., Kierończyk B., Józefiak A. (2018). Insect meals in fish nutrition. *Rev. Aquac.*, 11: 1080–1103.
- Nordgarden U., Hemre G.I., Hansen T. (2002). Growth and body composition of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) parr and smolt fed diets varying in protein and lipid contents. *Aquaculture*, 207: 65–78.
- Palma L., Fernandez-Bayo J., Niemeier D., Pitesky M., Vander Gheynst J.S. (2019). Managing high fiber food waste for the cultivation of black soldier fly larvae. *npj Sci. Food*, 3: 15.
- Popoff M., MacLeod M., Leschen W. (2017). Attitudes towards the use of insect-derived materials in Scottish salmon feeds. *J. Insects Food Feed*, 3: 131–138.
- Ptak A., Józefiak D., Kierończyk B., Rawski M., Żyła K., Świątkiewicz S. (2013). Effect of different phytases on the performance, nutrient retention and tibia composition in broiler chickens. *Arch. Anim. Breed.*, 56: 1028–1038.
- Rawski M., Mazurkiewicz J., Kierończyk B., Józefiak D. (2020). Black soldier fly full-fat larvae meal as an alternative to fish meal and fish oil in Siberian sturgeon nutrition: The effects on physical properties of the feed, animal growth performance, and feed acceptance and utilization. *Animals*, 10: 2119.
- Rawski M., Mazurkiewicz J., Kierończyk B., Józefiak D. (2021). Black soldier fly full-fat larvae meal is more profitable than fish meal and fish oil in Siberian sturgeon farming: the effects on aquaculture sustainability, economy and fish GIT development. *Animals*, 11: 604.
- Renna M., Schiavone A., Gai F., Dabbou S., Lussiana C., Malfatto V., Prearo M., Capucchio M.T., Biasato I., Biasibetti E., De Marco M., Brugiapaglia A., Zoccarato I., Gasco L. (2017). Evaluation of the suitability of a partially defatted black soldier fly (*Hermetia illucens* L.) larvae meal as ingredient for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) diets. *J. Anim. Sci. Biotechnol.*, 8: 1–13.
- Robaina L., Pirhonen J., Mente E., Sánchez J., Goosen N. (2019). Fish diets in aquaponics In: *Aquaponics food production systems combined aquaculture and hydroponic production technologies for the future*. Springer Nature Switzerland AG, Cham, Switzerland. pp. 340.
- Roncarati A., Gasco L., Parisi G., Terova G. (2015). Growth performance of common catfish (*Ameiurus melas* Raf.) fingerlings fed mealworm (*Tenebrio molitor*) diet. *J. Insects Food Feed*, 1: 233–240.
- Sealey W.M., Gaylord T.G., Barrows F.T., Tomberlin J.K., McGuire M.A., Ross C., St-Hilaire S. (2011). Sensory analysis of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, fed enriched black soldier fly prepupae, *Hermetia illucens*. *J. World Aquac. Soc.*, 42: 34–45.
- Secci G., Mancini S., Iaconisi V., Gasco L., Basto A., Parisi G. (2019). Can the inclusion of black soldier fly (*Hermetia illucens*) in diet affect the flesh quality/nutritional traits of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) after freezing and cooking? *Int. J. Food Sci. Nutr.*, 70: 161–171.
- Skrivanova E., Marounek M., Benda V., Brezina P. (2007). Susceptibility of *Escherichia coli*, *Salmonella* sp. and *Clostridium perfringens* to organic acids and monolaurin. *Vet. Med.*, 51: 81–88.
- Sørensen S.L., Park Y., Gong Y., Vasanth G.K., Dahle D., Korsnes K., Phuong T.H., Kiron V., Øyen S., Pittman K., Sørensen M. (2021). Nutrient digestibility, growth, mucosal barrier status, and activity of leucocytes from head kidney of Atlantic salmon fed marine- or plant-derived protein and lipid sources. *Front. Immunol.*, 11: 623726.
- Stejskal V., Tran H.Q., Prokesova M., Gebauer T., Giang P.T., Gai F., Gasco L. (2020). Partially defatted *Hermetia illucens* larva meal in diet of Eurasian perch (*Perca fluviatilis*) juveniles. *Animals*, 10: 1876.
- Stenberg O.K., Holen E., Piemontese L., Liland N.S., Lock E.J., Espe M., Belgit I. (2019). Effect of dietary replacement of fish meal with insect meal on *in vitro* bacterial and viral induced gene response in Atlantic salmon (*Salmo salar*) head kidney leukocytes. *Fish Shellfish Immunol.*, 91: 223–232.
- Storebakken T. (2009). Atlantic salmon, *Salmo salar*. In: *Nutrient requirements and feeding of finfish for aquaculture*, Webster C.D., Lim C. (eds). Cabi Publishing, pp. 79–102.
- Szendrő K., Nagy M.Z., Tóth K. (2020). Consumer acceptance of meat from animals reared on insect meal as feed. *Animals*, 10: 1312.
- Terova G., Gini E., Gasco L., Moroni F., Antonini M., Rimoldi S. (2021). Effects of full replacement of dietary fishmeal with insect meal from *Tenebrio molitor* on rainbow trout gut and skin microbiota. *J. Anim. Sci. Biotechnol.*, 12: 30.
- Tibbetts S.M., Scaife M.A., Armenta R.E. (2020). Apparent digestibility of proximate nutrients, energy and fatty acids in nutritionally-balanced diets with partial or complete replacement of dietary fish oil with microbial oil from a novel *Schizochytrium* sp. (T18) by juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture*, 520: 735003.
- Verbeke W., Spranghers T., De Clercq P., De Smet S., Sas B., Eeckhout M. (2015). Insects in animal feed: Acceptance and its determinants among farmers, agriculture sector stakeholders and citizens. *Anim. Feed Sci. Tech.*, 204: 72–87.
- Weththasinghe P., Hansen J., Nøklund D., Lagos L., Rawski M., Øverland M. (2021 a). Full-fat black soldier fly larvae (*Hermetia illucens*) meal and paste in extruded diets for Atlantic salmon (*Salmo salar*): Effect on physical pellet quality, nutrient digestibility, nutrient utilization and growth performances. *Aquaculture*, 530: 735785.
- Weththasinghe P., Øvrum Hansen J., Rawski M., Józefiak D., Ghimire S., Øverland M. (2021 b). Insects in Atlantic salmon (*Salmo salar*) diets – comparison between full-fat, defatted, and de-chitinised meals, and oil and exoskeleton fractions. *J. Insects Food Feed*, 8: 1–14.



Weththasinghe P., Hansen J.Ø., Mydland L.T., Øverland M. (2022) A systematic meta-analysis based review on black soldier fly (*Hermetia illucens*) as a novel protein source for salmonids. Rev. Aquac., 14: 938–956.

Ytrestøyl T., Aas T.S., Åsgård T. (2015). Utilisation of feed resources

in production of Atlantic salmon (*Salmo salar*) in Norway. Aquaculture, 448: 365–374.

Received: 6 VI 2022

Accepted: 9 IX 2022

## **9. Oświadczenia.**

mgr Zuzanna Mikołajczak  
Katedra Żywienia Zwierząt  
Wydział Medycyny Weterynaryjnej i Nauk o Zwierzętach  
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu  
ul. Wołyńska 33, 60-637 Poznań

OŚWIADCZENIE DOTYCZĄCE WKŁADU W PRZYGOTOWANIE  
OPUBLIKOWANYCH PRAC NAUKOWYCH

Jako jeden ze współautorów niżej wymienionych prac, deklaruje następujący udział w ich powstaniu:

1. **Mikołajczak Z.**, Rawski M., Mazurkiewicz J., Kierończyk B., Józefiak D. (2020) The Effect of Hydrolyzed Insect Meals in Sea Trout Fingerling (*Salmo trutta m. trutta*) Diets on Growth Performance, Microbiota and Biochemical Blood Parameters. *Animals*, DOI: 10.3390/ani10061031  
**Łączny wkład: 60%**
2. **Mikołajczak Z.**, Rawski M., Mazurkiewicz J., Kierończyk B., Kołodziejcki P., Pruszyńska-Oszmałek E., Józefiak D. (2022). The first insight into black soldier fly meal in brown trout nutrition as an environmentally sustainable fish meal replacement. *Animal*, 16(5), 100516.  
**Łączny wkład: 65%**
3. **Mikołajczak Z.**, Mazurkiewicz J., Rawski M., Kierończyk B., Józefiak A., Świątkiewicz S., Józefiak D. (2022) Black Soldier Fly Full-Fat Meal in Atlantic Salmon Nutrition – Part A: Effects on Growth Performance, Feed Utilization, Selected Nutriphysiological Traits and Production Sustainability in Fries, *Annals of Animal Science*, vol.23, no.1, 2023, pp.225-238. <https://doi.org/10.2478/aoas-2022-0070>  
**Łączny wkład: 60%**
4. **Mikołajczak Z.**, Mazurkiewicz J., Rawski M., Kierończyk B., Józefiak A., Świątkiewicz S., Józefiak D. (2022) Black Soldier Fly Full-Fat Meal in Atlantic Salmon Nutrition – Part B: Effects on Growth Performance, Feed Utilization, Selected Nutriphysiological Traits and Production Sustainability in Pre-smolts, *Annals of Animal Science*, vol.23, no.1, 2023, pp.225-238. <https://doi.org/10.2478/aoas-2022-0070>  
**Łączny wkład: 60%**

Udział w formułowaniu celu badań oraz układu doświadczalnego. Udział w bilansowaniu diet doświadczalnych. Prowadzenie doświadczeń wzrostowych i bilansowych. Udział w pobieraniu próbek materiału biologicznego oraz częściowe wykonywanie analiz laboratoryjnych. Wykonanie obliczeń wskaźników wzrostu, wykorzystania pasz, zrównowazenia środowiskowego, wskaźników somatycznych oraz przeżywalności. Opracowanie i analiza statystyczna wyników, udział w interpretacji merytorycznej uzyskanych wyników. Napisanie pierwowzoru publikacji naukowych oraz udział w ich korekcie przez współautorów i w trakcie ich recenzji przez czasopisma naukowe.

  
mgr Zuzanna Mikołajczak

prof. dr hab. Damian Józefiak  
Katedra Żywienia Zwierząt

dla:  
mgr Zuzanna Mikołajczak  
Katedra Żywienia Zwierząt  
Wydział Medycyny Weterynaryjnej i Nauk o Zwierzętach  
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu  
ul. Wołyńska 33, 60-637 Poznań

## OŚWIADCZENIE DOTYCZĄCE WKŁADU W PRZYGOTOWANIE OPUBLIKOWANYCH PRAC NAUKOWYCH

Jako jeden ze współautorów niżej wymienionych prac, deklaruję następujący udział w ich powstaniu:

1. Mikołajczak Z., Rawski M., Mazurkiewicz J., Kierończyk B., **Józefiak D.** (2020) The Effect of Hydrolyzed Insect Meals in Sea Trout Fingerling (*Salmo trutta m. trutta*) Diets on Growth Performance, Microbiota and Biochemical Blood Parameters. *Animals*, DOI: 10.3390/ani10061031  
**Łączny wkład: 15%**
2. Mikołajczak Z., Rawski M., Mazurkiewicz J., Kierończyk B., Kołodziejski P., Pruszyńska-Oszmałek E., **Józefiak D.** (2022). The first insight into black soldier fly meal in brown trout nutrition as an environmentally sustainable fish meal replacement. *Animal*, 16(5), 100516.  
**Łączny wkład: 10%**
3. Mikołajczak Z., Mazurkiewicz J., Rawski M., Kierończyk B., Józefiak A., Świątkiewicz S., **Józefiak D.** (2022) Black Soldier Fly Full-Fat Meal in Atlantic Salmon Nutrition – Part A: Effects on Growth Performance, Feed Utilization, Selected Nutriphysiological Traits and Production Sustainability in Fries, *Annals of Animal Science*, vol.23, no.1, 2023, pp.225-238. <https://doi.org/10.2478/aoas-2022-0070>  
**Łączny wkład: 10%**
4. Mikołajczak Z., Mazurkiewicz J., Rawski M., Kierończyk B., Józefiak A., Świątkiewicz S., **Józefiak D.** (2022) Black Soldier Fly Full-Fat Meal in Atlantic Salmon Nutrition – Part B: Effects on Growth Performance, Feed Utilization, Selected Nutriphysiological Traits and Production Sustainability in Pre-smolts, *Annals of Animal Science*, vol.23, no.1, 2023, pp.225-238. <https://doi.org/10.2478/aoas-2022-0070>  
**Łączny wkład: 10%**

Nadzór merytoryczny prowadzonych prac badawczych. Udział w opracowywaniu i interpretacji wyników. Udział w korekcie prac naukowych i procesie recenzji przez czasopisma naukowe.

KIEROWNIK KATEDRY

Prof. dr hab. Damian Józefiak

.....  
prof. dr hab. Damian Józefiak

prof. UPP, dr hab. Jan Mazurkiewicz  
Pracownia Rybactwa Śródlądowego i Akwakultury  
Wydział Medycyny Weterynaryjnej i Nauk o Zwierzętach  
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

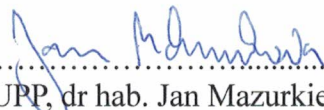
dla:  
mgr Zuzanna Mikołajczak  
Katedra Żywienia Zwierząt  
Wydział Medycyny Weterynaryjnej i Nauk o Zwierzętach  
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu  
ul. Wołyńska 33, 60-637 Poznań

### OŚWIADCZENIE DOTYCZĄCE WKŁADU W PRZYGOTOWANIE OPUBLIKOWANYCH PRAC NAUKOWYCH

Jako jeden ze współautorów niżej wymienionych prac, deklaruję następujący udział w ich powstaniu:

1. Mikołajczak Z., Rawski M., **Mazurkiewicz J.**, Kierończyk B., Józefiak D. (2020) The Effect of Hydrolyzed Insect Meals in Sea Trout Fingerling (*Salmo trutta m. trutta*) Diets on Growth Performance, Microbiota and Biochemical Blood Parameters. *Animals*, DOI: 10.3390/ani10061031  
**Łączny wkład: 15%**
2. Mikołajczak Z., Rawski M., **Mazurkiewicz J.**, Kierończyk B., Kołodziejcki P., Pruszyńska-Oszmałek E., Józefiak D. (2022). The first insight into black soldier fly meal in brown trout nutrition as an environmentally sustainable fish meal replacement. *Animal*, 16(5), 100516.  
**Łączny wkład: 10%**
3. Mikołajczak Z., **Mazurkiewicz J.**, Rawski M., Kierończyk B., Józefiak A., Świątkiewicz S., Józefiak D. (2022) Black Soldier Fly Full-Fat Meal in Atlantic Salmon Nutrition – Part A: Effects on Growth Performance, Feed Utilization, Selected Nutriphysiological Traits and Production Sustainability in Fries, *Annals of Animal Science*, vol.23, no.1, 2023, pp.225-238. <https://doi.org/10.2478/aoas-2022-0070>  
**Łączny wkład: 10%**
4. Mikołajczak Z., **Mazurkiewicz J.**, Rawski M., Kierończyk B., Józefiak A., Świątkiewicz S., Józefiak D. (2022) Black Soldier Fly Full-Fat Meal in Atlantic Salmon Nutrition – Part B: Effects on Growth Performance, Feed Utilization, Selected Nutriphysiological Traits and Production Sustainability in Pre-smolts, *Annals of Animal Science*, vol.23, no.1, 2023, pp.225-238. <https://doi.org/10.2478/aoas-2022-0070>  
**Łączny wkład: 10%**

Nadzór merytoryczny prowadzonych prac badawczych. Udział w opracowywaniu i interpretacji wyników. Udział w korekcie prac naukowych i procesie recenzji przez czasopisma naukowe.

  
.....  
prof. UPP, dr hab. Jan Mazurkiewicz

dr inż. Mateusz Rawski  
Pracownia Rybactwa Śródlądowego i Akwakultury  
Wydział Medycyny Weterynaryjnej i Nauk o Zwierzętach  
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

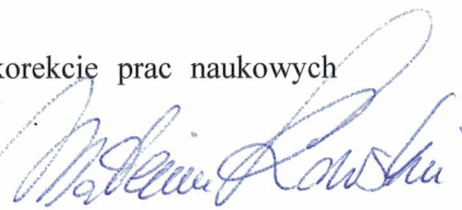
dla:  
mgr Zuzanna Mikołajczak  
Katedra Żywienia Zwierząt  
Wydział Medycyny Weterynaryjnej i Nauk o Zwierzętach  
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu  
ul. Wołyńska 33, 60-637 Poznań

### OŚWIADCZENIE DOTYCZĄCE WKŁADU W PRZYGOTOWANIE OPUBLIKOWANYCH PRAC NAUKOWYCH

Jako jeden ze współautorów niżej wymienionych prac, deklaruję następujący udział w ich powstaniu:

1. Mikołajczak Z., **Rawski M.**, Mazurkiewicz J., Kierończyk B., Józefiak D. (2020) The Effect of Hydrolyzed Insect Meals in Sea Trout Fingerling (*Salmo trutta m. trutta*) Diets on Growth Performance, Microbiota and Biochemical Blood Parameters. *Animals*, DOI: 10.3390/ani10061031  
**Łączny wkład: 5%**
2. Mikołajczak Z., **Rawski M.**, Mazurkiewicz J., Kierończyk B., Kołodziejski P., Pruszyńska-Oszmałek E., Józefiak D. (2022). The first insight into black soldier fly meal in brown trout nutrition as an environmentally sustainable fish meal replacement. *Animal*, 16(5), 100516.  
**Łączny wkład: 5%**
3. Mikołajczak Z., Mazurkiewicz J., **Rawski M.**, Kierończyk B., Józefiak A., Świątkiewicz S., Józefiak D. (2022) Black Soldier Fly Full-Fat Meal in Atlantic Salmon Nutrition – Part A: Effects on Growth Performance, Feed Utilization, Selected Nutriphysiological Traits and Production Sustainability in Fries, *Annals of Animal Science*, vol.23, no.1, 2023, pp.225-238. <https://doi.org/10.2478/aoas-2022-0070>  
**Łączny wkład: 5%**
4. Mikołajczak Z., Mazurkiewicz J., **Rawski M.**, Kierończyk B., Józefiak A., Świątkiewicz S., Józefiak D. (2022) Black Soldier Fly Full-Fat Meal in Atlantic Salmon Nutrition – Part B: Effects on Growth Performance, Feed Utilization, Selected Nutriphysiological Traits and Production Sustainability in Pre-smolts, *Annals of Animal Science*, vol.23, no.1, 2023, pp.225-238. <https://doi.org/10.2478/aoas-2022-0070>  
**Łączny wkład: 5%**

Udział w opracowywaniu i interpretacji wyników. Udział w korekcie prac naukowych i procesie recenzji przez czasopisma naukowe.



.....  
dr inż. Mateusz Rawski

dr inż. Bartosz Kierończyk  
Katedra Żywienia Zwierząt

dla:  
mgr Zuzanna Mikołajczak  
Katedra Żywienia Zwierząt  
Wydział Medycyny Weterynaryjnej i Nauk o Zwierzętach  
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu  
ul. Wołyńska 33, 60-637 Poznań

OŚWIADCZENIE DOTYCZĄCE WKŁADU W PRZYGOTOWANIE  
OPUBLIKOWANYCH PRAC NAUKOWYCH

Jako jeden ze współautorów niżej wymienionych prac, deklaruję następujący udział w ich powstaniu:

1. Mikołajczak Z., Rawski M., Mazurkiewicz J., **Kierończyk B.**, Józefiak D. (2020) The Effect of Hydrolyzed Insect Meals in Sea Trout Fingerling (*Salmo trutta m. trutta*) Diets on Growth Performance, Microbiota and Biochemical Blood Parameters. *Animals*, DOI: 10.3390/ani10061031  
**Łączny wkład: 5%**
2. Mikołajczak Z., Rawski M., Mazurkiewicz J., **Kierończyk B.**, Kołodziejcki P., Pruszyńska-Oszmałek E., Józefiak D. (2022). The first insight into black soldier fly meal in brown trout nutrition as an environmentally sustainable fish meal replacement. *Animal*, 16(5), 100516.  
**Łączny wkład: 4%**
3. Mikołajczak Z., Mazurkiewicz J., Rawski M., **Kierończyk B.**, Józefiak A., Świątkiewicz S., Józefiak D. (2022) Black Soldier Fly Full-Fat Meal in Atlantic Salmon Nutrition – Part A: Effects on Growth Performance, Feed Utilization, Selected Nutriphysiological Traits and Production Sustainability in Fries, *Annals of Animal Science*, vol.23, no.1, 2023, pp.225-238. <https://doi.org/10.2478/aoas-2022-0070>  
**Łączny wkład: 5%**
4. Mikołajczak Z., Mazurkiewicz J., Rawski M., **Kierończyk B.**, Józefiak A., Świątkiewicz S., Józefiak D. (2022) Black Soldier Fly Full-Fat Meal in Atlantic Salmon Nutrition – Part B: Effects on Growth Performance, Feed Utilization, Selected Nutriphysiological Traits and Production Sustainability in Pre-smolts, *Annals of Animal Science*, vol.23, no.1, 2023, pp.225-238. <https://doi.org/10.2478/aoas-2022-0070>  
**Łączny wkład: 5%**

Udział w opracowywaniu i interpretacji wyników. Udział w korekcie prac naukowych i procesie recenzji przez czasopisma naukowe.

  
dr inż. Bartosz Kierończyk

dr Agata Józefiak  
Katedra Nauk Przedklinicznych i Chorób Zakaźnych  
Wydział Medycyny Weterynaryjnej i Nauk o Zwierzętach  
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

dla:  
mgr Zuzanna Mikołajczak  
Katedra Żywienia Zwierząt  
Wydział Medycyny Weterynaryjnej i Nauk o Zwierzętach  
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu  
ul. Wołyńska 33, 60-637 Poznań

### OŚWIADCZENIE DOTYCZĄCE WKŁADU W PRZYGOTOWANIE OPUBLIKOWANYCH PRAC NAUKOWYCH

Jako jeden ze współautorów niżej wymienionych prac, deklaruję następujący udział w ich powstaniu:

1. Mikołajczak Z., Mazurkiewicz J., Rawski M., Kierończyk B., **Józefiak A.**, Świątkiewicz S., Józefiak D. (2022) Black Soldier Fly Full-Fat Meal in Atlantic Salmon Nutrition – Part A: Effects on Growth Performance, Feed Utilization, Selected Nutriphysiological Traits and Production Sustainability in Fries, *Annals of Animal Science*, vol.23, no.1, 2023, pp.225-238. <https://doi.org/10.2478/aoas-2022-0070>  
**Łączny wkład: 5%**
2. Mikołajczak Z., Mazurkiewicz J., Rawski M., Kierończyk B., **Józefiak A.**, Świątkiewicz S., Józefiak D. (2022) Black Soldier Fly Full-Fat Meal in Atlantic Salmon Nutrition – Part B: Effects on Growth Performance, Feed Utilization, Selected Nutriphysiological Traits and Production Sustainability in Pre-smolts, *Annals of Animal Science*, vol.23, no.1, 2023, pp.225-238. <https://doi.org/10.2478/aoas-2022-0070>  
**Łączny wkład: 5%**

Udział w opracowywaniu i interpretacji wyników. Udział w korekcie prac naukowych i procesie recenzji przez czasopisma naukowe.

  
dr Agata Józefiak



prof. dr hab. Sylwester Świątkiewicz  
Instytut Zootechniki Państwowy Instytut Badawczy  
ul. Krakowska 1, 32-083 Balice

dla:  
mgr Zuzanna Mikołajczak  
Katedra Żywienia Zwierząt  
Wydział Medycyny Weterynaryjnej i Nauk o Zwierzętach  
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu  
ul. Wołyńska 33, 60-637 Poznań

OŚWIADCZENIE DOTYCZĄCE WKŁADU W PRZYGOTOWANIE  
OPUBLIKOWANYCH PRAC NAUKOWYCH

Jako jeden ze współautorów niżej wymienionych prac, deklaruję następujący udział w ich powstaniu:

1. Mikołajczak Z., Mazurkiewicz J., Rawski M., Kierończyk B., Józefiak A., **Świątkiewicz S.**, Józefiak D. (2022) Black Soldier Fly Full-Fat Meal in Atlantic Salmon Nutrition – Part A: Effects on Growth Performance, Feed Utilization, Selected Nutriphysiological Traits and Production Sustainability in Fries, *Annals of Animal Science*, vol.23, no.1, 2023, pp.225-238. <https://doi.org/10.2478/aoas-2022-0070>

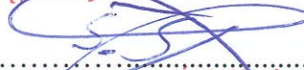
**Łączny wkład: 5%**

2. Mikołajczak Z., Mazurkiewicz J., Rawski M., Kierończyk B., Józefiak A., **Świątkiewicz S.**, Józefiak D. (2022) Black Soldier Fly Full-Fat Meal in Atlantic Salmon Nutrition – Part B: Effects on Growth Performance, Feed Utilization, Selected Nutriphysiological Traits and Production Sustainability in Pre-smolts, *Annals of Animal Science*, vol.23, no.1, 2023, pp.225-238. <https://doi.org/10.2478/aoas-2022-0070>

**Łączny wkład: 5%**

Udział w opracowywaniu i interpretacji wyników. Udział w korekcie prac naukowych i procesie recenzji przez czasopisma naukowe.

Zastępca Dyrektora ds. Nauki



Prof. dr hab. Sylwester Świątkiewicz

dr inż. Ewa Pruszyńska-Oszmałek  
Katedra Fizjologii, Biochemii i Biostruktury Zwierząt  
Wydział Medycyny Weterynaryjnej i Nauk o Zwierzętach  
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

dla:  
mgr Zuzanna Mikołajczak  
Katedra Żywienia Zwierząt  
Wydział Medycyny Weterynaryjnej i Nauk o Zwierzętach  
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu  
Ul. Wołyńska 33, 60-637 Poznań

OŚWIADCZENIE DOTYCZĄCE WKŁADU W PRZYGOTOWANIE  
OPUBLIKOWANYCH PRAC NAUKOWYCH

Jako jeden ze współautorów niżej wymienionych prac, deklaruję następujący udział w ich powstaniu:

1. Mikołajczak Z., Rawski M., Mazurkiewicz J., Kierończyk B., Kołodziejcki P., **Pruszyńska-Oszmałek E.**, Józefiak D. (2022). The first insight into black soldier fly meal in brown trout nutrition as an environmentally sustainable fish meal replacement. *Animal*, 16(5), 100516.  
**Łączny wkład: 3%**

Udział w interpretacji wyników oraz w korekcie pracy naukowej.

.....  
dr inż. Ewa Pruszyńska-Oszmałek

dr hab. Paweł Kołodziejcki  
Katedra Fizjologii, Biochemii i Biostruktury Zwierząt  
Wydział Medycyny Weterynaryjnej i Nauk o Zwierzętach  
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

dla:  
mgr Zuzanna Mikołajczak  
Katedra Żywienia Zwierząt  
Wydział Medycyny Weterynaryjnej i Nauk o Zwierzętach  
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu  
Ul. Wołyńska 33, 60-637 Poznań

OŚWIADCZENIE DOTYCZĄCE WKŁADU W PRZYGOTOWANIE  
OPUBLIKOWANYCH PRAC NAUKOWYCH

Jako jeden ze współautorów niżej wymienionych prac, deklaruję następujący udział w ich powstaniu:

1. Mikołajczak Z., Rawski M., Mazurkiewicz J., Kierończyk B., **Kołodziejcki P.**, Pruszyńska-Oszmałek E., Józefiak D. (2022). The first insight into black soldier fly meal in brown trout nutrition as an environmentally sustainable fish meal replacement. *Animal*, 16(5), 100516.  
**Łączny wkład: 3%**

Udział w interpretacji wyników oraz w korekcie pracy naukowej.

  
.....  
dr hab. Paweł Kołodziejcki