

LARISSA DA CUNHA

PRODUÇÃO DO KINGUIO (*Carassius auratus*) EM SISTEMA DE BIOFLOCOS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, da Universidade do Estado de Santa Catarina, como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Ciência Animal, área de concentração em Produção Animal.

Orientador: Prof. Dr. Thiago El Hadi Perez Fabregat.

LAGES

2020

**Ficha catalográfica elaborada pelo programa de geração automática da
Biblioteca Setorial do CAV/UESC,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)**

Cunha, Larissa da
Produção do kinguio (*Carassius auratus*) em sistema de
bioflocos / Larissa da Cunha. -- 2020.
76 p.

Orientador: Thiago El Hadi Perez Fabregat
Tese (doutorado) -- Universidade do Estado de Santa Catarina,
Centro de Ciências Agroveterinárias, Programa de Pós-Graduação
em Ciência Animal, Lages, 2020.

1. Astaxantina. 2. Cor da pele. 3. Enzimas digestivas. 4.
Fermentação. 5. Peixe ornamental. I. Fabregat, Thiago El Hadi Perez
. II. Universidade do Estado de Santa Catarina, Centro de Ciências
Agroveterinárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal.
III. Título.

LARISSA DA CUNHA

PRODUÇÃO DO KINGUIO (*Carassius auratus*) EM SISTEMA DE BIOFLOCOS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, da Universidade do Estado de Santa Catarina, como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Ciência Animal, área de concentração em Produção Animal.

BANCA EXAMINADORA



Dr. Thiago El Hadi Perez Fabregat

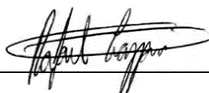
Universidade do Estado de Santa Catarina - UDESC/Lages - SC

Membros:



Professor Dr. Felipe do Nascimento Vieira

Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC/Florianópolis – SC



Professor Dr. Rafael Lazzari

Universidade Federal de Santa Maria - UFSM/Palmeira das Missões – RS



Professor Dr. Everton Skoronski

Universidade do Estado de Santa Catarina-UDESC/Lages – SC



Professor Dr. Diogo Luiz de Alcantara Lopes

Universidade do Estado de Santa Catarina - UDESC/Chapecó - SC

Lages, 16 de dezembro de 2020.

Dedico este trabalho à minha família e ao meu
companheiro Leonardo, fontes de incentivo e
amor inesgotáveis durante o percurso até aqui
percorrido.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus por ter me guiado e permitido chegar até aqui.

À minha família, pelo apoio e amor incondicionais.

Ao meu companheiro Leonardo, por todo apoio, incentivo, companheirismo, paciência e amor; e a sua família por todo apoio, carinho e torcida!

Ao meu orientador Prof. Dr. Thiago El Hadi Perez Fabregat pela oportunidade, orientação e ensinamentos.

Aos Professores Dr. Felipe do Nascimento Vieira, Dr. Rafael Lazzari, Dr. Everton Skoronski e Dr. Diogo Luiz de Alcantara Lopes, pelas valiosas sugestões e participação na banca avaliadora.

Ao Professor Dr. Marcelo Alves Moreira da UDESC-CAV/Lages por toda ajuda e ensinamentos referentes às análises de extração de carotenoides.

Ao Professor Dr. Everton Skoronski pela disponibilidade do uso do Laboratório de Tratamento de Água e Resíduos (LABTRAT) da UDESC-CAV/Lages; e por toda ajuda (do Professor e da equipe do LABTRAT) referente às análises de água e análises enzimáticas.

Ao Juliano Uczay por toda a ajuda com análises laboratoriais e análises estatísticas.

Ao André Fernando Nascimento Gonçalves por toda ajuda com análises estatísticas.

A todos que fizeram parte do Laboratório de Piscicultura da UDESC-CAV/Lages, por toda ajuda, trabalho em equipe e amizade: André Fernando Nascimento Gonçalves, Beatriz Silva da Silveira, Erick William Hessa Melim, Fernanda Picoli, Fernanda Regina Delziovo, Júlia Montibeller da Cruz, Juliano Uczay, Karoline Rocha Nunes, Kayane Pereira Besen, Luiz Augusto Cipriani, Maria Eduarda Schveitzer, Matheus Gasparotto, Nandara Soares de Oliveira, Natalia Ha, Rafaela Gomes, Robson Reginatto, Samara Campos Nascimento, Prof. Thiago El Hadi Perez Fabregat.

A todos os Professores do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da UDESC-CAV/Lages, pelos conhecimentos repassados e a todos os colegas pelas trocas de conhecimento e convivência.

A todos os Técnicos de Laboratório e Funcionários da UDESC-CAV/Lages, por toda dedicação e auxílio nesses anos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001, pela bolsa de doutorado concedida durante todo o curso.

A todos os meus familiares e amigos que ajudaram direta ou indiretamente nesta etapa.

MUITO OBRIGADA!!!

RESUMO

O sistema de tecnologia bioflocos (BFT) é um ambiente de criação com baixa renovação de água. O kinguio (*Carassius auratus*) já foi produzido com sucesso em sistemas BFT, mas o efeito desse sistema sobre a coloração da pele ainda não foi avaliado. Além disso, por se tratar de um sistema intensivo, o uso de alimentos funcionais no sistema BFT é uma demanda para reduzir o estresse e promover a saúde dos animais. Uma alternativa que ainda não foi estudada no sistema BFT é a inclusão de alimentos fermentados nas dietas. Para estudar essas duas questões foram realizados dois experimentos com duração de 56 dias. No experimento 1 foram avaliados os efeitos de dois sistemas de produção (água clara e BFT) e de duas dietas (com e sem a suplementação de astaxantina) sobre o desempenho produtivo e a pigmentação da pele do kinguio. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado em esquema fatorial 2X2, com seis repetições por tratamento. Um total de 120 kinguios ($12,18 \pm 0,27$ g) foram pesados e distribuídos em 24 aquários de vidro (15 litros). Duas dietas isoprotéicas (40% de proteína bruta) e isoenergéticas (4250 kcal kg⁻¹ de energia bruta) foram formuladas, uma sem a suplementação de carotenoide (controle) e a outra com a suplementação de 80 mg kg⁻¹ de astaxantina. No experimento 2 foram avaliados os efeitos de diferentes níveis de inclusão de farelo de soja fermentado (FSFM) nas dietas sobre o desempenho produtivo e a saúde intestinal de kinguios produzidos em sistema BFT. Os tratamentos consistiram em cinco dietas isoprotéicas (40% de proteína bruta) e isoenergéticas (4250 kcal kg⁻¹ de energia bruta) com a inclusão de 0, 7, 14, 21 e 28% de FSFM. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado com cinco tratamentos e quatro repetições. Um total de 400 kinguios ($0,25 \pm 0,02$ g) foram pesados e distribuídos em 20 aquários de vidro (15 litros). No experimento 1 não foi observada interação (sistema x dieta) para nenhuma das variáveis avaliadas. Os sistemas de produção e as dietas não afetaram o desempenho produtivo dos animais. A intensidade das cores (vermelho e amarelo) e a concentração de carotenoides na pele foram maiores nos peixes criados no sistema BFT em relação à água clara e nos peixes alimentados com a dieta contendo astaxantina em relação à dieta controle. No experimento 2 as dietas com inclusão de até 21% de FSFM não afetaram o desempenho produtivo dos kinguios. As dietas com inclusão de 21% e 28% de FSFM aumentaram a atividade da amilase no intestino dos peixes. A dieta com inclusão de 21% de FSFM aumentou a altura e a altura total das vilosidades intestinais dos kinguios. Os resultados indicam que o sistema BFT é uma tecnologia eficaz e promissora para a produção do kinguio. O cultivo em sistema BFT promove a pigmentação da pele do kinguio. A suplementação com astaxantina intensifica a pigmentação da pele do kinguio, independentemente do sistema de cultivo utilizado. A inclusão de 21% de FSFM na dieta melhora a saúde intestinal do kinguio produzido em sistema BFT.

Palavras-chave: Astaxantina. Cor da pele. Enzimas digestivas. Fermentação. Peixe ornamental.

ABSTRACT

Biofloc technology (BFT) system is a creation environment with low water renewal. The goldfish (*Carassius auratus*) has already been successfully produced in BFT systems, but the effect of this system on skin color has not yet been rated. Besides, because it is an intensive system, the use of functional foods in the BFT system is a demand to reduce stress and promote the health of animals. An alternative that has not yet been studied in the BFT system is the inclusion of fermented foods in the diets. To answer these questions, two 56 days experiments were carried out. In experiment 1, the effects of two production systems (clear water and BFT) and two diets (with and without astaxanthin supplementation) were evaluated on the productive performance and skin pigmentation of goldfish. The experimental design was completely randomized in a 2X2 factorial design, with six replicates per treatment. A total of 120 goldfish (12.18 ± 0.27 g) were weighed and distributed in 24 glass aquariums (15 liters). Two isoproteic (40% crude protein) and isoenergetic ($4250 \text{ kcal kg}^{-1}$ of gross energy) diets were formulated, one without carotenoid supplementation (control) and the other with supplementation of 80 mg kg^{-1} of astaxanthin. In experiment 2, the effects of different levels of inclusion of fermented soybean meal (FSM) in the diets on the productive performance and intestinal health of goldfish produced in BFT system were evaluated. The treatments consisted of five isoproteic (40% crude protein) and isoenergetic ($4250 \text{ kcal kg}^{-1}$ of gross energy) diets with the inclusion of 0, 7, 14, 21 and 28% of FSM. The experimental design was completely randomized with five treatments and four replications. A total of 400 goldfish (0.25 ± 0.02 g) were weighed and distributed in 20 glass aquariums (15 liters). In experiment 1, no interaction (system x diet) was observed for any of the variables evaluated. The production systems and diets did not affect the productive performance of the animals. The intensity of the colors (red and yellow) and the concentration of carotenoids in the skin were higher in fish raised in the BFT system in relation to clear water and in fish fed the diet containing astaxanthin in relation to the control diet. In experiment 2, diets with inclusion of up to 21% FSM did not affect the productive performance of goldfish. Diets with inclusion of 21% and 28% of FSM increased the activity of amylase in the intestine of fish. The diet with inclusion of 21% of FSM increased the height and the total height of the goldfish intestinal villi. The results indicate that the BFT system is an efficient and promising technology to produce goldfish. BFT cultivation promotes pigmentation of goldfish skin. Astaxanthin supplementation intensified fish skin pigmentation regardless of the culture system used. The inclusion of 21% of FSM in the diet improves the intestinal health of the goldfish produced in the BFT system.

Keywords: Astaxanthin. Digestive enzymes. Fermentation. Ornamental fish. Skin color.

APRESENTAÇÃO

Esta tese contém três capítulos, sendo que nesses se encontram os seguintes manuscritos:

CAPÍTULO 1 – Considerações gerais. Esse capítulo está nas normas do “Manual para elaboração e normalização de trabalhos de conclusão de curso da Udesc”.

CAPÍTULO 2 – Manuscrito elaborado na forma de artigo científico com o título “Biofloc technology (BFT) improves skin pigmentation of goldfish (*Carassius auratus*)”. Esse capítulo apresenta o artigo publicado no periódico “Aquaculture” na íntegra (Aquaculture, v. 522, p. 735132, 2020).

CAPÍTULO 3 – Manuscrito elaborado na forma de artigo científico com o título: “O farelo de soja fermentado pode afetar o desempenho produtivo e a saúde intestinal de kinguios (*Carassius auratus*) produzidos em sistema de bioflocos?”. Esse manuscrito está de acordo com as normas do periódico “Aquaculture Research”.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

CAPÍTULO 2

Fig. 1 – Total carotenoid concentration in goldfish skin (mean $\pm$ standard deviation: $n = 12$) produced in clear water and BFT systems (a), with and without astaxanthin supplementation in the diet (b) for 56 days. There was no interaction ($P > 0.05$) between the factors systems and diets. Means with different letters represent statistical difference ($P < 0.05$)46

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1 - Espécies de peixes que já foram produzidas em sistema de bioflocos.....	18
--	----

CAPÍTULO 2

Table 1. Composition of the experimental diets.....	41
Table 2. Water quality parameters (mean $\pm$ standard deviation) in clear water and BFT systems, with and without astaxanthin supplementation in the diet for 56 days.....	42
Table 3. Productive performance parameters of goldfish (mean $\pm$ standard deviation: n = 12) produced in clear water and BFT systems, with and without astaxanthin supplementation in the diet (2x2 factorial ANOVA) for 56 days.....	44
Table 4. Skin color parameters (<i>L a b</i>) of goldfish (mean $\pm$ standard deviation: n = 36) produced in clear water and BFT systems, with and without astaxanthin supplementation in the diet (2x2 factorial ANOVA) for 56 days.....	45

CAPÍTULO 3

Tabela 1 - Composição do farelo de soja fermentado (FSFM).....	59
Tabela 2 - Formulação e composição centesimal das dietas experimentais.....	60
Tabela 3 - Composição de aminoácidos das dietas experimentais.....	61
Tabela 4 - Parâmetros de qualidade da água (média $\pm$ desvio padrão).....	62
Tabela 5 - Desempenho zootécnico de kinguios (média $\pm$ desvio padrão) alimentados com dietas contendo diferentes níveis de inclusão de FSFM, em sistema BFT, durante 56 dias.....	65
Tabela 6 - Concentração de bactérias por grama de intestino (log UFC g ⁻¹) (média $\pm$ desvio padrão) de kinguios alimentados com dietas contendo diferentes níveis de inclusão de FSFM, em sistema BFT, durante 56 dias.....	65
Tabela 7 - Morfometria do intestino médio (média $\pm$ desvio padrão) de kinguios alimentados com dietas contendo diferentes níveis de inclusão de FSFM, em sistema BFT, durante 56 dias.....	65
Tabela 8 - Atividade de enzimas digestivas (média $\pm$ desvio padrão) no intestino de kinguios alimentados com dietas contendo diferentes níveis de inclusão de FSFM, em sistema BFT, durante 56 dias.....	66

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS	13
1 INTRODUÇÃO.....	13
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1 PRODUÇÃO DE PEIXES ORNAMENTAIS	15
2.1.1 Pigmentação de peixes ornamentais	15
2.2 SISTEMA DE BIOFLOCOS (BIOFLOC TECHNOLOGY - BFT).....	17
2.3 ALIMENTOS FERMENTADOS EM DIETAS PARA PEIXES	20
2.3.1 Farelo de soja fermentado em dietas para peixes	22
2.4 KINGUIO (<i>Carassius auratus</i>)	23
REFERÊNCIAS	25
CAPÍTULO 2 – Biofloc technology (BFT) improves skin pigmentation of goldfish (<i>Carassius auratus</i>).....	37
1 Introduction	38
2 Material and methods	39
2.1 Experimental design	39
2.2 Animals, facilities and system management	39
2.3 Food management and experimental diets	40
2.4 Water quality	41
2.5 Productive performance and sample collection	42
2.6 Skin color measurement.....	43
2.7 Skin carotenoid concentration.....	43
2.8 Statistical analyzes	43
3 Results	44
4 Discussion.....	46
5 Conclusion	49
References	49
CAPÍTULO 3 – O farelo de soja fermentado pode afetar o desempenho produtivo e a saúde intestinal de kinguios (<i>Carassius auratus</i>) produzidos em sistema de bioflocos?	56
1. Introdução	56
2 Materiais e Métodos	58
2.1 Farelo de soja fermentado.....	58
2.2 Dietas experimentais	60
2.3 Animais e instalações	61
2.4 Qualidade da água	62

2.5 Desempenho produtivo e coleta de amostras	62
2.6 Avaliações microbiológicas.....	63
2.7 Morfometria intestinal.....	63
2.8 Análises enzimáticas.....	63
2.9 Análises estatísticas.....	64
3 Resultados.....	64
4 Discussão	66
5 Conclusão	68
Referências	68
CONSIDERAÇÕES FINAIS	76

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

1 INTRODUÇÃO

Os principais desafios ambientais enfrentados para maior expansão das atividades aquícolas estão relacionados aos prováveis impactos das produções intensivas na biodiversidade dos ecossistemas (OECD/FAO, 2015). Nos sistemas intensivos, a oferta excessiva de ração e o uso de densidades inadequadas pode resultar em um efluente rico em elementos tóxicos, principalmente amônia e nitrito, que quando descartados causam impactos negativos no meio ambiente (BOSMA; VERDEGEM, 2011). Várias estratégias são usadas para resolver problemas associados a produção de compostos nitrogenados em sistemas aquícolas (AVNIMELECH, 2006; ELALOUF et al., 2018). O sistema de bioflocos (Biofloc Technology - BFT) é um desses métodos que tem mostrado vantagens sobre os sistemas tradicionais de fluxo de água contínuo (AZIM; LITTLE, 2008; KRUMMENAUER et al., 2014; LI et al., 2018).

O sistema BFT é um ambiente de criação com baixa renovação de água (CRAB et al., 2012). Nesse sistema, a manipulação da relação carbono:nitrogênio (C:N) e a aeração contínua favorecem o desenvolvimento de uma biota predominantemente heterotrófica formada por bactérias e outros microrganismos que ficam aderidos em superfícies ou em suspensão na coluna d'água (BALLESTER et al., 2010; SCHRADER; GREEN; PERSCHBACHER et al., 2011; BAKAR et al., 2015). Os compostos nitrogenados presentes na água do cultivo são incorporados na biomassa microbiana (AVNIMELECH, 2007), que pode servir como fonte suplementar de alimento para as espécies cultivadas (NAJDEGERAMI; BAKHSHI; LAKANI, 2016; LI et al., 2018).

Espécies de peixes ornamentais foram produzidas com sucesso em sistemas BFT com resultados positivos ao crescimento (FELIX; SUDHA, 2013; FAIZULLAH et al., 2015; WANG et al., 2015; HARINI et al., 2016), mas seu efeito sobre a coloração da pele ainda não foi avaliado. Dentre os componentes dos bioflocos existem microrganismos fotossintéticos que possuem a capacidade de sintetizar pigmentos carotenoides (JU et al., 2008). Os carotenoides são componentes bioativos que apresentam alta atividade antioxidante (SHINDO et al., 2007; ALISHAHI et al., 2014; JAGRUTHI et al., 2014) e que conferem a pigmentação dos animais aquáticos (DAS; BISWAS, 2016). Níveis elevados desses compostos já foram encontrados nos bioflocos (ZHANG et al., 2015; ZHAO et al., 2016).

A intensificação dos sistemas de produção aquícolas pode levar a condições estressantes para os animais. O estresse põe em risco a saúde, podendo causar surtos de doenças e mortalidades (MOHAPATRA et al., 2013). Como em todo sistema intensivo, no sistema BFT existem condições que podem causar estresse aos organismos cultivados, como picos de

compostos nitrogenados, quedas de oxigênio dissolvido (FISCHER et al., 2020) e excesso de sólidos suspensos (ROMANO et al., 2020). Neste cenário, a indústria de alimentos aquícolas demanda por aditivos alimentares e/ou alimentos funcionais que possam mitigar os efeitos nocivos do estresse (DAWOOD et al., 2019). Uma alternativa que ainda não foi avaliada no sistema BFT é a inclusão de alimentos fermentados nas dietas. Essa é uma alternativa recente que tem apresentado resultados promissores relacionados à saúde dos peixes (AZARM; LEE, 2014; SOTOUDEH et al., 2016; NOVRIADI et al., 2018; DAWOOD et al., 2020).

O farelo de soja fermentado (FSFM) já foi avaliado como substituto da farinha de peixe (JIANG et al., 2018; RAHIMNEJAD et al., 2019; LI et al., 2020) e como ingrediente funcional em dietas para peixes (WANG et al., 2016; RAHIMNEJAD et al., 2019; LI et al., 2020). Estudos mostram que a substituição parcial da farinha de peixe pelo FSFM não prejudica o crescimento dos peixes (HASSAAN; SOLTAN; ABDEL-MOEZ, 2015; LEE; AZARM; CHANG, 2016; LIANG et al., 2017; JIANG et al., 2018; RAHIMNEJAD et al., 2019; LI et al., 2020). Além disso, já foram encontrados inúmeros efeitos benéficos da inclusão de FSFM nas dietas sobre a saúde dos peixes, como: aumento da capacidade antioxidante (AZARM; LEE, 2014; HASSAAN; SOLTAN; ABDEL-MOEZ, 2015; LEE; AZARM; CHANG, 2016; WANG et al., 2016; JIANG et al., 2018), modulação da microbiota, diminuição de inflamações e aumento das vilosidades intestinais (REFSTIE et al., 2005; YAMAMOTO et al., 2010; NOVRIADI et al., 2018; RAHIMNEJAD et al., 2019; LI et al., 2020), assim como melhora da atividade das enzimas digestivas (SOTOUDEH et al., 2016).

O kinguio (*Carassius auratus*) é uma das espécies ornamentais mais populares e produzidas no mundo (DEY, 2016). Trata-se de um peixe extremamente valorizado pela sua atraente coloração da pele, sendo uma das características mais importantes que afeta o seu preço de mercado (VILLAR-MARTÍNEZ et al., 2013). A produção do kinguio em sistema BFT proporciona melhor controle da qualidade da água e maior crescimento dos animais quando comparado ao sistema tradicional (com trocas de água) (FAIZULLAH et al., 2015; WANG et al., 2015; CASTRO et al., 2016). Recentemente foi descoberto que o sistema BFT pode aumentar a atividade das enzimas digestivas e dos sistemas imunológico e antioxidante dos kinguios (YU et al., 2020). No entanto, ainda não existem resultados referentes a capacidade de pigmentação e nem sobre os possíveis efeitos da inclusão de alimentos fermentados nas dietas de kinguios produzidos nesse sistema. Diante disso, o objetivo geral desta tese foi avaliar o efeito do sistema BFT sobre a pigmentação da pele do kinguio e verificar se a suplementação com FSFM pode afetar a saúde intestinal de kinguios produzidos nesse sistema.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 PRODUÇÃO DE PEIXES ORNAMENTAIS

O comércio global de peixes ornamentais foi revisado por Dey (2016). Trata-se de uma indústria multibilionária em mais de 125 países, com um valor de varejo de mais de US\$ 10 bilhões e um crescimento médio anual superior a 10%. Estima-se que todo o setor, incluindo plantas, acessórios, aquário, ração e medicamentos, vale mais de US\$ 18 a 20 bilhões. Ainda segundo Dey (2016), mais de 2500 espécies de peixes estão envolvidas, das quais mais de 60% são de água doce. Cerca de 30 espécies de peixes de água doce dominam o mercado global, como o kinguio (*Carassius auratus*), o tetra-neon (*Paracheirodon innesi*), o acará-bandeira (*Pterophyllum scalare*), o peixe-zebra (*Danio rerio*) e o acará-disco (*Symphysodon aequifasciatus*). Somente as espécies guppy (*Poecelia reticulata*) e tetra-neon representam mais de 25% do mercado em volume e mais de 14% em valor (DEY, 2016).

Os peixes ornamentais podem ser produzidos em sistemas de produção semi-intensivos (SILVA; SCHULZ, 2006; RIBEIRO, PRETO; FERNANDES, 2008) e intensivos (KAISER; PAULET; ENDEMANN, 1998; ASANO et al., 2003; HALACHMI, 2006; ELALOUF et al., 2018). No sistema de produção semi-intensivo o menor controle da qualidade da água e da quantidade e qualidade de alimento pode predispor os peixes ao estresse, a doenças e à maior mortalidade (ZUANON; SALARO; FURUYA, 2011). Por outro lado, a intensificação excessiva dos sistemas pode levar a problemas sérios, como suscetibilidade a doenças, resistência a antibióticos e baixa qualidade da ninhada (DEY, 2016). Dessa forma, é extremamente importante que se desenvolvam técnicas de manejo e sistemas de produção que permitam o máximo crescimento com menor dano possível ao estado de saúde dos animais.

2.1.1 Pigmentação de peixes ornamentais

Os peixes ornamentais são caracterizados por uma ampla diversidade de cores e padrões de coloração, sendo essa uma das características mais importantes que afeta o seu preço de mercado (SINHA; ASIMI, 2007; YESILAYER et al., 2010). Os carotenoides são as principais fontes de pigmentos dos animais aquáticos (GUPTA et al., 2007; SEFC; BROWN; CLOTFELTER, 2014). São compostos não solúveis em água e solúveis em solventes, como acetona, álcool e clorofórmio (KAUR; SHAH, 2017), com coloração amarela intenso, laranja ou vermelha (GUPTA et al., 2007). São constituídos de um grupo de mais de 600 pigmentos naturais, que são produzidos por todos os organismos fotossintéticos (incluindo cianobactérias, microalgas, fitoplâncton e plantas superiores) e por microrganismos não fotossintetizantes, como algumas bactérias, fungos e leveduras (AMBRÓSIO et al., 2006; VALDUGA et al.,

2009). Os peixes não possuem a capacidade de sintetizar pigmentos carotenoides (KAUR; SHAH, 2017). Assim para as espécies cultivadas é necessário que seja feita a suplementação das dietas com esses pigmentos (YANAR et al., 2008; SEFC; BROWN; CLOTFELTER, 2014).

Os carotenoides utilizados nas dietas animais podem ser oriundos de fontes naturais ou sintéticas. As fontes naturais (fermentos, bactérias, algas, vegetais superiores e farinha de crustáceos) compreendem uma mistura de vários carotenoides e podem variar em função da digestibilidade, o que torna complexa a interpretação da eficiência de pigmentação (REZENDE, 2010). As fontes sintéticas, são geralmente compostas por um carotenoide puro (β -caroteno, astaxantina, cantaxantina), o que permite identificar claramente a eficiência de pigmentação (REZENDE, 2010). Na literatura existem diversos estudos avaliando a inclusão de fontes naturais e sintéticas de carotenoides em dietas de diferentes espécies de peixes ornamentais (ALISHAHI et al., 2014; FRIES et al., 2014; SORNSUPHARP et al., 2015; EATON et al., 2016). É importante ressaltar que a eficiência do ingrediente testado em termos de pigmentação é espécie-específica. Além disso, a deposição de pigmentos em peixes também depende do tipo de carotenoide e do nível de suplementação utilizado (YEDIER et al., 2014).

Dentre as fontes de carotenoides naturais mais aplicadas em dietas para peixes ornamentais destaca-se a microalga *Haematococcus pluvialis* (fonte de astaxantina). A *Haematococcus pluvialis* já se mostrou eficaz para intensificar a pigmentação da pele de diversos peixes ornamentais tais como o kinguio (*Carassius auratus*) (50 a 80 mg kg⁻¹ de astaxantina advinda da microalga) (GOUVEIA; REMA, 2005; BESEN et al., 2019), o ciclídeo midas (*Amphilophus citrinellus*) (160 mg kg⁻¹ de astaxantina advinda da microalga) (PAN; CHIEN, 2009), o tetra-serpae (*Hyphessobrycon eques*) (1,5 g kg⁻¹ de biomassa seca da microalga) (BERCHIELLI-MORAIS; FERNANDES; SIPAÚBA-TAVARES, 2016) e o peixe papagaio (*Cichlasoma citrinellum* × *Cichlasoma synspilum*) (400 mg kg⁻¹ de astaxantina advinda da microalga) (LI et al., 2018).

Outras microalgas também já foram testadas como fontes naturais de carotenoides. A microalga *Chlorella vulgaris* foi eficiente na pigmentação da carpa koi (*Cyprinus carpio*) e do kinguio (80 mg kg⁻¹ de carotenoides) (GOUVEIA et al., 2003; GOUVEIA; REMA, 2005). A microalga *Spirulina platensis* melhorou a pigmentação da carpa koi (*Cyprinus carpio*) (75 g kg⁻¹ de peso seco Spirulina) (SUN et al., 2012). A microalga *Dunaliella salina* (fonte de β -caroteno) proporcionou melhorias na pigmentação da pele do acará severo (*Heros severus*) (100 mg kg⁻¹ de biomassa da microalga) (ALISHAHI et al., 2014) e do peixe oscar (*Astronotus ocellatus*) (200 mg kg⁻¹ de biomassa da microalga) (ALISHAHI; KARAMIFAR; MESBAH, 2015). Farinhas de crustáceos também demonstram resultados positivos no quesito

pigmentação. A inclusão de 20% de farinha do camarão *Streptocephalus sirindhornae* proporcionou melhor resultado em comparação a spirulina em termos de carotenoides totais e das concentrações de cantaxantina, astaxantina e β -caroteno na pele e na musculatura do ciclídeo híbrido flowerhorn (*Amphilophus citrinellus* x *Cichlasoma trimaculatum*) (SORNSUPHARP et al., 2015).

Dentre os carotenoides sintéticos mais utilizados em dietas de peixes encontram-se a astaxantina, a cantaxantina e o β -caroteno. A astaxantina sintética já teve eficiência de pigmentação comprovada para várias espécies de peixes ornamentais tais como o kinguio (PARIPATANANONT et al., 1999; GOUVEIA; REMA, 2005; BESEN et al., 2019), o tetra-serpae (*Hyphessobrycon callistus*) (WANG et al., 2006), a carpa koi (YUANGSOI et al., 2011), o ciclídeo midas (PAN; CHIEN, 2009), o peixe oscar (ALISHAHI; KARAMIFAR; MESBAH, 2015) e o peixe palhaço (*Amphiprion ocellaris*) (YASIR; QIN, 2010). A cantaxantina também melhorou a pigmentação da pele do kinguio (YESILAYER et al., 2010; BESEN et al., 2019). O β -caroteno é um pigmento bastante testado em dietas de peixes ornamentais, mas geralmente a eficiência de pigmentação dele é menor do que a da astaxantina (WANG et al., 2006; PAN; CHIEN, 2009; YASIR; QIN, 2010).

2.2 SISTEMA DE BIOFLOCOS (BIOFLOC TECHNOLOGY - BFT)

A expansão da produção aquícola é restrita devido aos impactos que pode causar ao meio ambiente pela descarga de efluentes ricos em matéria orgânica nos corpos d'água e por sua dependência do óleo de peixe e da farinha de peixe (BOSSIER et al., 2016). A tecnologia do sistema bioflocos (BFT) oferece solução para ambos os problemas (CRAB et al., 2012; MORENO-ARIAS et al., 2016; YUN et al., 2017; NHI et al., 2018). O sistema BFT possui algumas vantagens frente aos sistemas de produção tradicionais com fluxo de água contínuo, como: maior biossegurança, evitando a entrada de patógenos no sistema ou a disseminação de doenças no ambiente; prevenção do escape de peixes do cultivo e redução do uso de água e da descarga de efluentes no ambiente (WASIELESKY et al., 2006; SAMOCHA et al., 2007; KRUMMENAUER et al., 2012; 2014).

A produção de organismos aquáticos em sistema BFT teve repercussão na década de 90 com estudos realizados em Israel, avaliando a formação de uma cadeia microbiana baseada em bactérias heterotróficas, por meio de mudanças na relação carbono:nitrogênio (C:N) da água do cultivo de tilápias (*Oreochromis niloticus*) e do camarão-tigre-gigante (*Penaeus monodon*) (AVNIMELECH, 1999). Nesse mesmo período, nos Estados Unidos, iniciaram pesquisas para o desenvolvimento de sistemas de produção ambientalmente corretos, com objetivo de diminuir

a emissão de efluentes em viveiros revestidos da produção intensiva de camarões (HOPKINS; SANDIFER; BROWDY, 1995). Desde então essa tecnologia vem sendo estudada e aplicada para a produção de diversas espécies de peixes (Tabela 1).

Tabela 1 - Espécies de peixes que já foram produzidas em sistema de bioflocos.

Peixes	Autores
<i>Brycon orbignyanus</i>	Sgnaulin et al., 2018
<i>Carassius auratus</i>	Faizullah et al., 2015; Wang et al., 2015; Castro et al., 2016; Yu et al., 2020
<i>Carassius auratus gibelio</i>	Li et al., 2018; Qiao et al., 2018; Zhang et al., 2018
<i>Clarias gariepinus</i>	Bakar et al., 2015; Ekasari et al., 2016; Romano et al., 2018
<i>Cyprinus carpio</i>	Zhao et al., 2014; Najdegerami; Bakhshi; Lakani, 2016; Haghparsat et al., 2020
<i>Ictalurus punctatus</i>	Schrader; Green; Perschbacher et al., 2011; Green et al., 2020
<i>Labeo rohita</i>	Ahmad et al., 2016; Ahmad et al., 2019; Vadhel et al., 2020
<i>Lepomis macrochirus</i>	Fischer et al., 2020
<i>Micropterus salmoides</i>	Romano et al., 2020
<i>Mugil cf. hospes</i>	Rocha et al., 2012
<i>Oreochromis niloticus</i>	Avnimelech, 2007; Azim; Little, 2008; Luo et al., 2014; Ekasari et al., 2015; Long et al., 2015; Pérez-Fuentes et al., 2016; Doan et al., 2019; Mohammadi; Rafiee; Abdelrahman, 2020
<i>Rhamdia quelen</i>	Battisti et al., 2020

Fonte: Elaborada pela autora, 2020.

O sistema BFT caracteriza-se pela produção de organismos aquáticos com baixa renovação de água (CRAB et al., 2012). Nesse sistema, flocos microbianos são formados através da manipulação da relação C:N na água de cultivo (AVNIMELECH, 1999; AVNIMELECH, 2007; AZIM; LITTLE, 2008). A fertilização do sistema com fontes ricas em carbono orgânico favorece o desenvolvimento de uma biota bacteriana predominantemente heterotrófica, a qual tem capacidade de assimilar os compostos nitrogenados presentes na água do cultivo e transformá-los em proteína microbiana (AVNIMELECH, 2007). Trata-se de um sistema de produção intensivo, povoado com altas densidades de estocagem (FRÓES et al., 2012; LOPES et al., 2012; LIMA et al., 2015). Como todo sistema intensivo, o sistema BFT possui uma grande exigência por sistemas de aeração eficientes para manutenção dos níveis de oxigênio dissolvido e para que os bioflocos sejam mantidos em suspensão na coluna d'água (AVNIMELECH, 2009).

Os flocos microbianos ou bioflocos podem ser definidos como partículas na forma de material floculado, colonizados por bactérias heterotróficas aderidas, microalgas, flagelados, ciliados, rotíferos, nematoides, dentre outros microrganismos, que ficam aderidos em

superfícies ou em suspensão na coluna d'água. (HARGREAVES, 2006; SILVA et al., 2008; BALLESTER et al., 2010). Os bioflocos se desenvolvem quando a relação C:N é mantida acima de 12:1 (AVNIMELECH, 1999; AVNIMELECH, 2007; AZIM; LITTLE, 2008). Para isso diversas fontes de carbono já foram utilizadas como fertilizantes desse sistema, tais como o acetato, glicerol (CRAB et al., 2010), glicose (CRAB et al., 2010; WANG et al., 2015), açúcar (FAIZULLAH et al., 2015), café (CASTRO et al., 2016), goma de tapioca (ASADUZZAMAN et al., 2008; 2010), farinha de trigo (AZIM; LITTLE, 2008), milho (AHMAD et al., 2016), sacarose (LI et al., 2018) e o melaço de cana-de-açúcar (BURFORD et al., 2004; SAMOCHA et al., 2007; SILVA et al., 2009; BAKAR et al., 2015; CASTRO et al., 2016).

As partículas microbianas que compõem os bioflocos são ricas em proteínas e outros elementos nutricionais essenciais (AZIM; LITTLE, 2008). Essas partículas podem ser utilizadas como fonte suplementar de alimento aos organismos cultivados (NAJDEGERAMI; BAKHSHI; LAKANI, 2016; LI et al., 2018). Essa suplementação alimentar pode proporcionar melhorias no desempenho zootécnico e nas taxas de conversão alimentar dos animais (LUO et al., 2014; AHMAD et al., 2016). A composição nutricional dos bioflocos depende de diversos fatores, tais como: a condição ambiental, a fonte de carbono introduzida no meio de cultivo, a biota microbiana presente na água, a ração e a espécie produzida (AVNIMELECH, 2007). Na literatura já foram mencionados bioflocos com mais de 30% de proteína bruta (KUHN et al., 2009; MAHANAND; MOULICK; RAO, 2013; LONG et al., 2015; LI et al., 2018). A produção de peixes e camarões em sistema de bioflocos pode gerar uma economia nos custos com a alimentação, através da redução dos níveis de proteína das dietas (AZIM; LITTLE, 2008; CORREIA et al., 2014; XU; PAN, 2014; FUGIMURA et al., 2015), da diminuição da oferta de ração (ROSTIKA; SUDARYONO, 2014; NAJDEGERAMI; BAKHSHI; LAKANI, 2016) e também da substituição de ingredientes onerosos das dietas, como a farinha de peixe, por ingredientes alternativos, como proteínas de origem vegetal (MORENO-ARIAS et al., 2016; YUN et al., 2017; NHI et al., 2018).

O sistema BFT apresenta grande potencial para produção de peixes ornamentais, devido a presença de pigmentos carotenoides em sua composição (JU et al., 2008; ZHANG et al., 2015; ZHAO et al., 2016). Dentre os componentes dos bioflocos são encontrados microrganismos fotossintéticos, principalmente algas, dinoflagelados e cianobactérias, que possuem a capacidade de sintetizar carotenoides (JU et al., 2008; BALLESTER et al., 2010; RAY et al., 2010; SCHRADER; GREEN; PERSCHBACHER et al., 2011; EMERENCIANO et al., 2012; MAHANAND; MOULICK; RAO, 2013; MONROY-DOSTA et al., 2013; BAKAR et al., 2015; FUGIMURA et al., 2015). Ju et al. (2008), identificaram 11 tipos de carotenoides em

amostras de bioflocos da produção do camarão *Litopenaeus vannamei*: peridinina, fucoxantina, luteína, zeaxantina, aloxantina, diadinoxantina, diatoxantina, astaxantina, violaxantina, crocoxantina e β -caroteno. Zhang et al. (2015), encontraram a quantidade de 5,4 mg g⁻¹ de carotenoides em amostras de bioflocos advindas da produção do camarão *Litopenaeus vannamei* durante 48 dias. Resultados semelhantes aos encontrados por Zhao et al. (2016), que relatam a quantidade média de 4,83 mg g⁻¹ de carotenoides em amostras de bioflocos produzidos com diferentes fontes de carbono no cultivo do *Litopenaeus vannamei* durante 30 dias. Ainda são necessários estudos para avaliar os bioflocos como fonte de pigmentos para peixes ornamentais.

Assim como em todo sistema intensivo, no sistema BFT existem condições que podem causar estresse aos organismos cultivados, como altas densidades de estocagem (DENG et al., 2019), picos de compostos nitrogenados (FISCHER et al., 2020), excesso de sólidos suspensos totais (ROMANO et al., 2020). O estresse põe em risco a saúde, podendo causar surtos de doenças e mortalidades (MOHAPATRA et al., 2013). Nesse cenário, a indústria de alimentos aquícolas demanda por aditivos alimentares e/ou alimentos funcionais que possam mitigar os efeitos nocivos do estresse (DAWOOD et al., 2019). Nesse sentido, a inclusão de cepas bacterianas benéficas (probióticas) nas dietas ou na água do cultivo é uma alternativa que já vem sendo avaliada com o objetivo de melhorar a saúde dos animais produzidos nesse sistema (HOSTINS 2017; MIAO et al., 2017; KATHIA et al., 2018; DOAN et al., 2019; MOHAMMADI; RAFIEE; ABDELRAHMAN, 2020). Uma alternativa que ainda não foi avaliada no sistema BFT é a inclusão de alimentos fermentados nas dietas. Alimentos fermentados têm apresentado resultados promissores relacionados à saúde dos peixes (AZARM; LEE, 2014; SOTOUDEH et al., 2016; NOVRIADI et al., 2018; DAWOOD et al., 2020).

2.3 ALIMENTOS FERMENTADOS EM DIETAS PARA PEIXES

A fermentação microbiana é uma técnica usada desde os tempos antigos com a ideia básica de preservar alimentos perecíveis. Atualmente, a fermentação é aplicada para melhorar as propriedades nutricionais e funcionais dos alimentos (SANJUKTA; RAI, 2016). Existem dois principais sistemas de fermentação: a fermentação submersa e a fermentação em estado sólido (FES). A fermentação submersa é baseada no cultivo de um microrganismo em meio líquido contendo nutrientes, enquanto a FES consiste no crescimento microbiano em substratos sólidos, como farelos e bagaços, em presença limitada de umidade (HAYES; GARCÍA-

VAQUERO, 2016). A FES é uma das técnicas de fermentação mais utilizada para produção de fermentados vegetais para peixes (HASSAAN et al., 2018; JIANG et al., 2018).

O uso de fermentados vegetais em dietas para peixes tem mostrado resultados satisfatórios ao crescimento e a saúde dos animais (HASSAAN; SOLTAN; ABDEL-MOEZ, 2015; LEE; AZARM; CHANG, 2016; JIANG et al., 2018; NOVRIADI et al., 2018; DAWOOD et al., 2020). Já foi comprovado que a FES melhora a biodisponibilidade e a digestibilidade de nutrientes e diminui a presença de antinutrientes das proteínas vegetais (HASSAAN; SOLTAN; ABDEL-MOEZ, 2015; WANG et al., 2016; HASSAAN et al., 2018). Durante o processo de fermentação, microrganismos degradam macromoléculas de proteínas em compostos solúveis de baixo peso molecular, que são mais facilmente digeridos e absorvidos (AZARM; LEE, 2014). Esses microrganismos quebram as cadeias proteicas, liberando pequenas cadeias de aminoácidos e peptídeos bioativos que podem trazer benefícios à saúde (SANJUKTA; RAI, 2016). Em suma, durante o processo fermentativo, ocorre a produção de metabólitos secundários com ação prebiótica (antibióticos, peptídeos bioativos de baixo peso molecular, enzimas e fatores de crescimento) e o incremento da população de microrganismos benéficos com função probiótica (ZHANG et al., 2014; MUKHERJEE, CHAKRABORTY, DUTTA, 2016; DAWOOD; KOSHIO, 2019; NWACHUKWU et al., 2019).

O tipo de microrganismo utilizado durante o processo de fermentação é um parâmetro chave para o seu sucesso (CHI; CHO, 2016). Para ser comercialmente viável, qualquer processo de fermentação deve estar atento ao funcionamento celular do microrganismo utilizado (HAYES; GARCÍA-VAQUERO, 2016). Alguns microrganismos podem impactar positivamente apenas as propriedades físico-químicas dos substratos, enquanto outros melhoram apenas as propriedades biológicas, e outros pode melhorar os dois conjuntos de propriedades (CHI; CHO, 2016).

As bactérias ácido lácticas (BAL), incluindo os gêneros *Lactobacillus* e *Bacillus*, são tradicionalmente usadas em processos de fermentação (SINGH; VIJ; HATI, 2014; OLMOS; BRU; GARRO, 2015). Sabe-se que as BAL produzem vários compostos biogênicos, incluindo ácidos graxos, açúcares e peptídeos bioativos (HAYES; GARCÍA-VAQUERO, 2016). As bactérias do gênero *Lactobacillus* já foram aplicadas como probióticos em dietas para peixes resultando em benefícios ao desempenho e saúde dos animais (SUBHARANJANI et al., 2015; AHIRE; MOKASHE; CHAUDHARI, 2019; DOAN et al., 2019; SAFARI et al., 2019; MOHAMMADI; RAFIEE; ABDELRAHMAN, 2020; PAIXÃO et al., 2020). Bactérias desse gênero também já foram utilizadas com sucesso para produção de fermentados vegetais para alimentação de peixes (SKREDE et al., 2002; WANG et al., 2016; JIANG et al., 2018;

NWACHUKWU et al., 2019). A bactéria *Lactobacillus plantarum* foi utilizada para fermentar o farelo de soja, resultando na redução significativa dos oligossacarídeos indigestíveis (sacarose, rafinose e estaquiose) e fatores antinutricionais (tanino, inibidores de tripsina, glicinina e β -conglucina) no farelo de soja fermentado (WANG et al., 2016).

2.3.1 Farelo de soja fermentado em dietas para peixes

A soja é um excelente substrato para a produção de alimentos funcionais pelo seu baixo custo e alto valor nutricional (OLMOS; BRU; GARRO, 2015). O farelo de soja fermentado (FSFM) já foi bastante avaliado como substituto da farinha de peixe e como ingrediente funcional em dietas para peixes (SOTOUDEH et al., 2016; WANG et al., 2016; RAHIMNEJAD et al., 2019; CHOI et al., 2020; HE et al., 2020; LI et al., 2020). O processo de fermentação microbiana aumenta a qualidade nutricional do farelo de soja, removendo fatores antinutricionais e alérgenos (REFSTIE et al., 2005; HASSAAN; SOLTAN; ABDEL-MOEZ, 2015; WANG et al., 2016; CHI; CHO, 2016), o que protege os animais de patologias intestinais (YAMAMOTO et al., 2010; WANG et al., 2016; LI et al., 2020). O FSFM também apresenta melhor digestibilidade e pode apresentar maior teor de proteína e maiores níveis de aminoácidos em comparação ao farelo de soja cru (OLMOS; BRU; GARRO, 2015; SHIU et al., 2015; LI et al., 2019), o que pode resultar no melhor aproveitamento da dieta e maior crescimento dos animais (HASSAAN; SOLTAN; ABDEL-MOEZ, 2015; JIANG et al., 2018). Além disso, durante a fermentação da soja, peptídeos bioativos específicos são produzidos como resultado da hidrólise de proteínas (SINGH; VIJ; HATI, 2014; CHI; CHO, 2016). Tais peptídeos podem atuar como compostos reguladores e exibir propriedades funcionais como atividades anti-hipertensivas, antimicrobianas, antioxidantes, antidiabéticas e anticâncer (SINGH; VIJ; HATI, 2014; SANJUKTA; RAI, 2016).

Estudos mostram que a substituição parcial da farinha de peixe pelo FSFM não prejudica o crescimento dos peixes (HASSAAN; SOLTAN; ABDEL-MOEZ, 2015; LEE; AZARM; CHANG, 2016; LIANG et al., 2017; JIANG et al., 2018; RAHIMNEJAD et al., 2019; LI et al., 2020). Já foram encontrados inúmeros efeitos benéficos da inclusão de FSFM em dietas sobre a saúde dos peixes, como: aumento da capacidade antioxidante (AZARM; LEE, 2014; HASSAAN; SOLTAN; ABDEL-MOEZ, 2015; LEE; AZARM; CHANG, 2016; WANG et al., 2016; JIANG et al., 2018), modulação da microbiota, diminuição de inflamações e aumento das vilosidades intestinais (REFSTIE et al., 2005; YAMAMOTO et al., 2010; NOVRIADI et al., 2018; RAHIMNEJAD et al., 2019; LI et al., 2020), assim como aumento da atividade das enzimas digestivas (SOTOUDEH et al., 2016).

2.4 KINGUIO (*Carassius auratus*)

O kinguio é um dos peixes ornamentais mais populares e produzidos no mundo (DEY, 2016). É muito valorizado pela sua atraente coloração da pele (VILLAR-MARTÍNEZ et al., 2013), sendo a coloração laranja-avermelhado a mais almejada comercialmente para a espécie (GOUVEIA; REMA, 2005; YESILAYER et al., 2010; JEBARAJA; SIVAKUMAR; VASAGAM, 2012). É um animal que se enquadra nas principais características procuradas em peixes ornamentais, tanto por produtores quanto por aquaristas iniciantes, tais como: facilidade de manejo, resistência e prolificidade (LIMA; BERNARDINO; PROENÇA, 2001). São peixes onívoros, que aceitam alimentos tanto de origem animal como vegetal (SALES; JANSSENS, 2003). Sua alimentação é composta principalmente por materiais vegetais, detritos, organismos bentônicos, larvas de mosquitos, microalgas e zooplâncton (SARBAHI, 1951; PENTTINEN; HOLOPAINEN, 1992).

Diversos estudos já foram realizados para avaliar a eficiência de diferentes fontes de carotenoides na pigmentação da pele do kinguio. O carotenoide sintético mais utilizado é a astaxantina (PARIPATANANONT et al., 1999; GOUVEIA; REMA, 2005; YESILAYER et al., 2010). Mas também já foram testados outros pigmentos como a cantaxantina (YESILAYER et al., 2010). Algumas fontes naturais de carotenoides também já foram avaliadas proporcionando resultados positivos quanto a pigmentação da pele da espécie, dentre elas, as algas *Chlorella vulgaris* (GOUVEIA et al. 2003; GOUVEIA; REMA, 2005), *Haematococcus pluvialis* (GOUVEIA et al. 2003), *Nostoc ellipsosporum*, *Navicula mínima* (KHATOON et al., 2010), a cianobactéria *Arthrospira máxima* (GOUVEIA et al. 2003), a alfafa (*Medicago sativa*) (YANAR et al., 2008), pétalas de hibisco (SINHA; ASIMI, 2007), farelo de urucum (*Bixa orellana*) (FRIES et al., 2014), flor de calêndula (VILLAR-MARTÍNEZ et al., 2013), o amaranto e a farinha da folha de moringa (JEBARAJA; SIVAKUMAR; VASAGAM, 2012) entre outros.

Nos últimos anos, a tecnologia do sistema BFT começa a ser transferida para a produção de algumas espécies de peixes ornamentais apresentando resultados promissores. O kinguio (*Carassius auratus*) é a espécie ornamental com mais estudos em sistema de bioflocos até o momento (FAIZULLAH et al., 2015, 2017; WANG et al., 2015; CASTRO et al., 2016; YU et al., 2020). O sistema BFT proporcionou melhor qualidade da água e melhor crescimento dos kinguios em comparação aos sistemas tradicionais (FAIZULLAH et al., 2015, 2017; WANG et al., 2015; CASTRO et al., 2016). Recentemente foi demonstrado que o sistema BFT também pode aumentar a atividade das enzimas digestivas e dos sistemas imunológico e antioxidante

dos kinguios (YU et al., 2020). Diante desses resultados, pode-se concluir que o sistema BFT é um sistema promissor e eficiente para produção de kinguios, trazendo benefícios ao crescimento e saúde dessa espécie. Por isso essa espécie foi escolhida como modelo biológico dos estudos que compõem esta tese.

REFERÊNCIAS

- AHIRE, J. J.; MOKASHE, N. U.; CHAUDHARI, B. L. Effect of dietary probiotic *Lactobacillus helveticus* on growth performance, antioxidant levels, and absorption of essential trace elements in goldfish (*Carassius auratus*). **Probiotics and antimicrobial proteins**, v. 11, n. 2, p. 559-568, 2019.
- AHMAD, I. et al. Growth, non-specific immunity and disease resistance of *Labeo rohita* against *Aeromonas hydrophila* in biofloc systems using different carbon sources. **Aquaculture**, v. 457, p. 61-67, 2016.
- AHMAD, I. et al. Carbon sources affect water quality and haemato-biochemical responses of *Labeo rohita* in zero-water exchange biofloc system. **Aquaculture Research**, v. 50, n. 10, p. 2879-2887, 2019.
- ALISHAHI, M. et al. Hemato-immunological responses of *Heros severus* fed diets supplemented with different levels of *Dunaliella salina*. **Fish physiology and biochemistry**, v. 40, n. 10, p. 57-65, 2014.
- ALISHAHI, M.; KARAMIFAR, M.; MESBAH, M. Effects of astaxanthin and *Dunaliella salina* on skin carotenoids, growth performance and immune response of *Astronotus ocellatus*. **Aquaculture international**, v. 23, n. 5, p. 1239-1248, 2015.
- AMBRÓSIO, C. L. B. et al. Carotenoides como alternativa contra a hipovitaminose A. **Revista de Nutrição**, v. 19, n. 2, p. 233-243, 2006.
- ASADUZZAMAN, M. et al. C/N ratio control and substrate addition for periphyton development jointly enhance freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* production in ponds. **Aquaculture**, v. 280, n. 1-4, p. 117-123, 2008.
- ASADUZZAMAN, M. et al. Effects of C/N ratio and substrate addition on natural food communities in freshwater prawn monoculture ponds. **Aquaculture**, v. 306, n. 1-4, p. 127-136, 2010.
- ASANO, L. et al. Limited water exchange production systems for freshwater ornamental fish. **Aquaculture research**, v. 34, n. 11, p. 937-941, 2003.
- AVNIMELECH, Y. Carbon/nitrogen ratio as a control element in aquaculture systems. **Aquaculture**, v. 176, n. 3-4, p. 227-235, 1999.
- AVNIMELECH, Y. Bio-filters: the need for a new comprehensive approach. **Aquacultural engineering**, v. 34, n. 3, p. 172-178, 2006.
- AVNIMELECH, Y. Feeding with microbial flocs by tilapia in minimal discharge bio-flocs technology ponds. **Aquaculture**, v. 264, n. 1-4, p. 140-147, 2007.
- AVNIMELECH, Y. **Biofloc Technology – A Practical Guide Book**. The World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, United States. 182pp. 2009.

- AZARM, H. M.; LEE, S. Effects of partial substitution of dietary fish meal by fermented soybean meal on growth performance, amino acid and biochemical parameters of juvenile black sea bream *Acanthopagrus schlegeli*. **Aquaculture Research**, v. 45, p. 994-1003, 2014.
- AZIM, M. E; LITTLE D. C. The biofloc technology (BFT) in indoor tanks: Water quality, biofloc composition, and growth and welfare of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Aquaculture**, v. 283, n. 1-4, p. 29–35, 2008.
- BAKAR, N. S. A. et al. Optimization of C/N ratios for nutrient removal in aquaculture system culturing African catfish, (*Clarias gariepinus*) utilizing Bioflocs Technology. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 102, p. 100-106, 2015.
- BALLESTER, E. L. C. et al. Effect of practical diets with different protein levels on the performance of *Farfantepenaeus paulensis* juveniles nursed in a zero exchange suspended microbial flocs intensive system. **Aquaculture Nutrition**, v. 16, n. 2, p. 163-172, 2010.
- BATTISTI, E. K. et al. Effect of stocking density on growth, hematological and biochemical parameters and antioxidant status of silver catfish (*Rhamdia quelen*) cultured in a biofloc system. **Aquaculture**, v. 524, p. 735213, 2020.
- BERCHIELLI-MORAIS, F. A.; FERNANDES, J. B. K.; SIPAÚBA-TAVARES, L. H. Diets supplemented with microalgal biomass: effects on growth, survival and colouration of ornamental fish *Hyphessobrycon eques* (Steindacher 1882). **Aquaculture Research**, v. 47, n. 10, p. 3061-3069, 2016.
- BESSEN, K.P. et al. Lutein as a natural carotenoid source: Effect on growth, survival and skin pigmentation of goldfish juveniles (*Carassius auratus*). **Aquaculture Research**, v. 50, n. 8, p. 2200– 2206, 2019.
- BOSMA, R. H.; VERDEGEM, M. C. Sustainable aquaculture in ponds: principles, practices and limits. **Livestock science**, v. 139, n. 1, p. 58-68, 2011.
- BOSSIER, P. et al. Microbial community management in aquaculture. **Procedia food science**, v. 6, p. 37-39, 2016.
- BURFORD, M. A. et al. The contribution of flocculated material to shrimp (*Litopenaeus vannamei*) nutrition in a high-intensity, zero-exchange system. **Aquaculture**, v. 232, n. 1, p. 525-537, 2004.
- CASTRO, M. G. et al. Length, weight and condition factor comparison of *Carassius auratus* (Linnaeus, 1758) juveniles cultured in biofloc system. **International Journal of Fisheries and Aquatic Studies**, v. 4, n. 6, p. 345-350, 2016.
- CHI, C.; CHO, S. Improvement of bioactivity of soybean meal by solid-state fermentation with *Bacillus amyloliquefaciens* versus *Lactobacillus* spp. and *Saccharomyces cerevisiae*. **LWT-Food Science and Technology**, v. 68, p. 619-625, 2016.
- CHOI, D. G. et al. Replacement of fish meal with two fermented soybean meals in diets for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture Nutrition**, v. 26, n. 1, p. 37-46, 2020.

- CORREIA, E. S. et al. Intensive nursery production of the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* using two commercial feeds with high and low protein content in a biofloc-dominated system. **Aquacultural Engineering**, v. 59, p. 48-54, 2014.
- CRAB, R. et al. The effect of diferente carbon sources on the nutritional value of bioflocs, a feed for *Macrobrachium rosenbergii* postlarvae. **Aquaculture Research**, v. 41, n. 4, p. 559-567, 2010.
- CRAB, R. et al. Biofloc technology in aquaculture: beneficial effects and future challenges. **Aquaculture**, v. 356, p. 351-356, 2012.
- DAS, A. P.; BISWAS, S. P. Carotenoids and pigmentation in ornamental fish. **Journal of Aquaculture and Marine Biology**, v. 4, n. 5, p. 1-3, 2016.
- DAWOOD, M. A. et al. Probiotic application for sustainable aquaculture. **Reviews in Aquaculture**, v. 11, n. 3, p. 907-924, 2019.
- DAWOOD, M. A. O; KOSHIO, S. Application of fermentation strategy in aquafeed for sustainable aquaculture. **Reviews in Aquaculture**, v. 12, n. 2, p. 1-16, 2019.
- DAWOOD, M. A. et al. *Saccharomyces cerevisiae* increases the acceptability of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) to date palm seed meal. **Aquaculture Reports**, v. 17, p. 100314, 2020.
- DENG, Y. et al. Effect of stock density on the microbial community in biofloc water and Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) gut microbiota. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 103, n. 10, p. 4241-4252, 2019.
- DEY, V. K. The global trade in ornamental fish. **Infofish International**, v. 4, n. 16, p. 23-29, 2016.
- DOAN, H. V. et al. Dietary inclusion of Orange peels derived pectin and *Lactobacillus plantarum* for Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) cultured under indoor biofloc systems. **Aquaculture**, v. 508, p. 98-105, 2019.
- EATON, L. et al. The behavioural effects of supplementing diets with synthetic and naturally sourced astaxanthin in an ornamental fish (*Puntius titteya*). **Applied Animal Behaviour Science**, v. 182, p. 94-100, 2016.
- EKASARI, J. et l. Biofloc technology positively affects Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) larvae performance. **Aquaculture**, v. 441, p. 72-77, 2015.
- EKASARI, J. et al. Biofloc technology application in African catfish fingerling production: the effects on the reproductive performance of broodstock and the quality of eggs and larvae. **Aquaculture**, v. 464, p. 349-356, 2016.
- ELALOUF, H. et al. Optimal operation policy for a sustainable recirculation aquaculture system for ornamental fish: Simulation and response surface methodology. **Computers & Operations Research**, v. 89, p. 230-240, 2018.

EMERENCIANO M. et al. Floc contribution on spawning performance of blue shrimp *Litopenaeus stylirostris*. **Aquaculture Research**, v. 44, p. 75–85, 2013.

FAIZULLAH, M. et al. Impact of Biofloc Technology on the Growth of Goldfish Young Ones. **Indian Journal of Science and Technology**, v. 8, n. 13, p. 1-8, 2015.

FAIZULLAH, M. M. et al. Length weight relationship of goldfish, *Carassius auratus* (Linnaeus, 1758) young ones reared in biofloc system. **Journal of Experimental Zoology, India**, v. 20, p. 1043-1047, 2017.

FELIX, S.; SUDHA, M. Mass Rearing of Rosy Barb, *Puntius Conchoni* in Inland Raceway System Using Aerobic Microbial Flocculent Technology (AMFT). **Indian Veterinary Journal**, v. 90, n. 8, p. 102-104, 2013.

FISCHER, H. et al. The potential of rearing juveniles of bluegill, *Lepomis macrochirus*, in a biofloc system. **Aquaculture Reports**, v. 17, p. 100398, 2020.

FRIES, E. et al. Urucum em dietas para alevinos de kinguios *Carassius auratus*: desempenho produtivo e pigmentação da pele. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 35, p. 3401-3414, 2014.

FRÓES, C. et al. Fertilização orgânica com carbono no cultivo intensivo em viveiros com sistema de bioflocos do camarão branco *Litopenaeus vannamei*. **Atlântica (Rio Grande)**, v. 34, n. 1, p. 31-39, 2012.

FUGIMURA, M. M. S. et al. Criação do camarão *Litopenaeus schmitti* com diferentes salinidades e níveis de proteína na dieta em sistema de bioflocos. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 41, n. 4, p. 865-876, 2015.

GOUVEIA, L. et al. Colouring ornamental fish (*Cyprinus carpio* and *Carassius auratus*) with microalgal biomass. **Aquaculture Nutrition**, v.9, n. 2, p.123-129, 2003.

GOUVEIA, L.; REMA, P. Effect of microalgal biomass concentration and temperature on ornamental goldfish (*Carassius auratus*) skin pigmentation. **Aquaculture Nutrition**, v. 11, n. 1, p. 19-23, 2005.

GREEN, B. W. et al. Comparison of unused water and year-old used water for production of channel catfish in the biofloc technology system. **Aquaculture**, v. 519, p. 734739, 2020.

GUPTA, S. K. et al. Use of natural carotenoids for pigmentation in fishes. **Natural Product Radiance**, v. 6, n. 1, p. 46-49, 2007.

HAGHPARAST, M. M. et al. Evaluation of hemato-immunological parameters and stress indicators of common carp (*Cyprinus carpio*) in different C/N ratio of biofloc system. **Aquaculture International**, v. 28, n. 6, p. 2191-2206, 2020.

HALACHMI, I. Systems engineering for ornamental fish production in a recirculating aquaculture system. **Aquaculture**, v. 259, p. 300-314, 2006.

HARGREAVES, J. A. Photosynthetic suspended-growth systems in aquaculture. **Aquacultural engineering**, v. 34, n. 3, p. 344-363, 2006.

HARINI, C. et al. Role of Biofloc in the Growth and Survival of Blue morph, *Pseudotropheus saulosi*. **Indian Journal of Science and Technology**, v. 9, n. 8, p. 1-7, 2016.

HASSAAN, M. S.; SOLTAN, M. A.; ABDEL-MOEZ, A. M. Nutritive value of soybean meal after solid state fermentation with *Saccharomyces cerevisiae* for Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Animal Feed Science and Technology**, v. 201, p. 89-98, 2015.

HASSAAN, M. S. et al. Growth and physiological responses of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* fed dietary fermented sunflower meal inoculated with *Saccharomyces cerevisiae* and *Bacillus subtilis*. **Aquaculture**, v. 495, p. 592-601, 2018.

HAYES, M; GARCÍA-VAQUERO, M. **Bioactive compounds from fermented food products**. In: Novel Food Fermentation Technologies. Springer, Cham, p. 293-310, 2016.

HE, M. et al. Effects of fish meal replaced by fermented soybean meal on growth performance, intestinal histology and microbiota of largemouth bass (*Micropterus salmoides*). **Aquaculture Nutrition**, v. 26, n. 4, p. 1058-1071, 2020.

HOPKINS, J. S.; SANDIFER, P. A.; BROWDY, C. L. Effect of two feed protein levels and feed rate combinations on water quality and production of intensive shrimp ponds operated without water exchange. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 26, n. 1, p. 93-97, 1995.

HOSTINS, B. et al. Efficacy and variations in bacterial density in the gut of *Litopenaeus vannamei* reared in a BFT system and in clear water supplemented with a commercial probiotic mixture. **Aquaculture**, v. 480, p. 58-64, 2017.

JAGRUTHI, C. et al. Effect of dietary astaxanthin against *Aeromonas hydrophila* infection in common carp, *Cyprinus carpio*. **Fish & shellfish immunology**, v.41, n. 2, p. 674-680, 2014.

JEBARAJA, K. J.; SIVAKUMAR, V.; VASAGAM, K. K.P. Vegetable Products as Dietary Pigment Sources for Juvenile Goldfish, *Carassius auratus*. **The Israeli Journal of Aquaculture**, v. 65, p. 1-6, 2012.

JIANG, Y. et al. Partial substitution of soybean meal with fermented soybean residue in diets for juvenile largemouth bass, *Micropterus salmoides*. **Aquaculture Nutrition**, v. 24, n. 4, p. 1213-1222, 2018.

JU, Z. Y. et al. Determination of microbial community structures of shrimp floc cultures by biomarkers and analysis of floc amino acid profiles. **Aquaculture Research**, v. 39, n. 2, p. 118-133, 2008.

KAISER, H.; PAULET, T. G.; ENDEMANN, F. Water quality fluctuations in a closed recirculating system for the intensive culture of the guppy, *Poecilia reticulata* (Peters). **Aquaculture research**, v. 29, p. 611-615, 1998.

KATHIA, C. M. et al. Effect of two probiotics on bacterial community composition from biofloc system and their impact on survival and growth of tilapia (*Oreochromis niloticus*). **International Journal of Fisheries and Aquatic Studies**, v. 6, n. 2, p. 525-533, 2018.

KAUR, R.; SHAH, T. K. Role of feed additives in pigmentation of ornamental fishes. **International Journal of Fisheries and Aquatic Studies**, v. 5, n. 5, p. 684-686, 2017.

KHATOON, N. et al. Evaluation of algae based feed in Goldfish (*Carassius auratus*) nutrition. **Proceedings of the Zoological Society**, v. 63, p. 109-114, 2010.

KRUMMENAUER, D. et al. Cultivo de camarões marinhos em sistema de bioflocos: análise da reutilização da água. **Atlântica**, v. 34, n. 2, p. 103-111, 2012.

KRUMMENAUER, D. et al. The reuse of water on the culture of Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, in BFT system. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 45, n. 1, p. 3-14, 2014.

KUHN, D. D. et al. Microbial floc meal as a replacement ingredient for fish meal and soybean protein in shrimp feed. **Aquaculture**, v. 296, n. 1, p. 51-57, 2009.

LEE, S. M.; AZARM, H. M.; CHANG, K. H. Effects of dietary inclusion of fermented soybean meal on growth, body composition, antioxidant enzyme activity and disease resistance of rockfish (*Sebastes schlegeli*). **Aquaculture**, v. 459, p. 110-116, 2016.

LI, H. D. et al. Effect of biofloc technology on water quality and feed utilization in the cultivation of gibel carp (*Carassius auratus gibelio* var. CAS III). **Aquaculture Research**, v. 49, n. 8, p. 2852-2860, 2018.

LI, C. et al. Effects of dietary raw or *Enterococcus faecium* fermented soybean meal on growth, antioxidant status, intestinal microbiota, morphology, and inflammatory responses in turbot (*Scophthalmus maximus* L.). **Fish & Shellfish Immunology**, v. 100, p. 261–271, 2020.

LIANG, X. F. et al. Substitution of fish meal by fermented soybean meal affects the growth performance and flesh quality of Japanese seabass (*Lateolabrax japonicus*). **Animal Feed Science and Technology**, v. 229, p. 1-12, 2017.

LIMA, A. O.; BERNARDINO, G.; PROENÇA, C. E. M. de. Agronegócio de peixes ornamentais. **Revista Panorama da Aquicultura**, v. 11, n. 65, p. 14-24, 2001.

LIMA, E. C. R. D. et al. Cultivo da tilápia do Nilo *Oreochromis niloticus* em sistema de bioflocos com diferentes densidades de estocagem. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 16, n. 4, p. 948-957, 2015.

LONG, L. et al. Effect of biofloc technology on growth, digestive enzyme activity, hematology, and immune response of genetically improved farmed tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Aquaculture**, v. 448, p. 135-141, 2015.

LOPES, D. L. D. A. et al. Determinação da densidade de estocagem ótima do camarão rosa *Farfantepenaeus brasiliensis* produzindo em tecnologia de bioflocos durante a fase de berçário. **Atlântica, Rio Grande**, v. 34, n. 2, p. 113-120, 2012.

LUO, G. et al. Growth, digestive activity, welfare, and partial cost-effectiveness of genetically improved farmed tilapia (*Oreochromis niloticus*) cultured in a recirculating aquaculture system and an indoor biofloc system. **Aquaculture**, v. 422-423, p. 1-7, 2014.

MAHANAND, S. S.; MOULICK, S.; RAO, P. S. Optimum formulation of feed for rohu, *Labeo rohita* (Hamilton), with biofloc as a component. **Aquaculture international**, v. 21, n. 2, p. 347-360, 2013.

MIAO, S. et al. Effects of C/N ratio control combined with probiotics on the immune response, disease resistance, intestinal microbiota and morphology of giant freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*). **Aquaculture**, v. 476, p. 125-133, 2017.

MOHAMMADI, G.; RAFIEE, G.; ABDELRAHMAN, H. A. Effects of dietary *Lactobacillus plantarum* (KC426951) in biofloc and stagnant-renewal culture systems on growth performance, mucosal parameters, and serum innate responses of Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 46, p. 1167–1181, 2020.

MOHAPATRA, S. et al. Aquaculture and stress management: a review of probiotic intervention. **Journal of animal physiology and animal nutrition**, v. 97, n. 3, p. 405-430, 2013.

MONROY-DOSTA, M. D. C. et al. Composición y abundancia de comunidades microbianas asociadas al biofloc en un cultivo de tilapia. **Revista de Biología Marina y Oceanografía**, v.48, n. 3, p.511-520, 2013.

MORENO-ARIAS, A. et al. Replacement of fishmeal by vegetable meal mix in the diets of *Litopenaeus vannamei* reared in low-salinity biofloc system: effect on digestive enzymatic activity. **Aquaculture Nutrition**, v. 23, n. 2, p. 236-245, 2016.

MUKHERJEE R., CHAKRABORTY R., DUTTA A. Role of Fermentation in Improving Nutritional Quality of Soybean Meal - A Review. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences (AJAS)**, v. 29, n. 11, p. 1523-1529, 2016.

NAJDEGERAMI, E. H.; BAKHSHI, F.; LAKANI, F. B. Effects of biofloc on growth performance, digestive enzyme activities and liver histology of common carp (*Cyprinus carpio* L.) fingerlings in zero-water exchange system. **Fish physiology and biochemistry**, v. 42, p. 457-465, 2016.

NHI, N. H. Y. et al. Comparative evaluation of Brewer's yeast as a replacement for fishmeal in diets for tilapia (*Oreochromis niloticus*), reared in clear water or biofloc environments. **Aquaculture**, v. 495, p. 654-660, 2018.

NOVRIADI, R. et al. Effects of soybean meal replacement with fermented soybean meal on growth, serum biochemistry and morphological condition of liver and distal intestine of Florida pompano *Trachinotus carolinus*. **Aquaculture Nutrition**, v. 24, n. 3, p. 1066-1075, 2018.

NWACHUKWU, U. et al. Assessment of probiotic potentials of *Lactobacillus plantarum* CS and *Micrococcus luteus* CS from fermented milled corn-soybean waste-meal. **Scientific African**, v. 6, p. e00183, 2019.

OECD-FAO. OECD/Food and Agriculture Organization of the United Nations, **OECD-FAO Agricultural Outlook 2015-2024**, Paris, 2015.

OLMOS, A. R.; BRU, E.; GARRO, M. S. Optimization of fermentation parameters to study the behavior of selected lactic cultures on soy solid state fermentation. **International journal of food microbiology**, v. 196, p. 16-23, 2015.

PAIXÃO, P. E. G. et al. Autochthonous bacterium *Lactobacillus plantarum* as probiotic supplementation for productive performance and sanitary improvements on clownfish *Amphiprion ocellaris*. **Aquaculture**, v. 526, p. 735395, 2020.

PAN, C. H.; CHIEN, Y. H. Effects of dietary supplementation of alga *Haematococcus pluvialis* (Flotow), synthetic astaxanthin and β -carotene on survival, growth, and pigment distribution of red devil, *Cichlasoma citrinellum* (Günther). **Aquaculture Research**, v. 40, n. 8, p. 871-879, 2009.

PARIPATANANONT, T. et al. Effect of astaxanthin on the pigmentation of goldfish *Carassius auratus*. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 30, p. 454-460, 1999.

PENTTINEN, O. P.; HOLOPAINEN, I. J. Seasonal feeding activity and ontogenetic dietary shifts in crucian carp, *Carassius carassius*. **Environmental Biology of Fishes**, v. 33, p. 215-221, 1992.

PÉREZ-FUENTES, J. A. et al. C: N ratios affect nitrogen removal and production of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* raised in a biofloc system under high density cultivation. **Aquaculture**, v. 452, p. 247-251, 2016.

QIAO, G. et al. Biofloc technology (BFT): An alternative aquaculture system for prevention of Cyprinid herpesvirus 2 infection in gibel carp (*Carassius auratus gibelio*). **Fish & shellfish immunology**, v. 83, p. 140-147, 2018.

RAHIMNEJAD, S. et al. Replacement of fish meal with *Bacillus pumillus* SE5 and *Pseudozyma aphidis* ZR1 fermented soybean meal in diets for Japanese seabass (*Lateolabrax japonicus*). **Fish & shellfish immunology**, v. 84, p. 987-997, 2019.

RAY, A. J. et al. Characterization of microbial communities in minimal-exchange, intensive aquaculture systems and the effects of suspended solids management. **Aquaculture**, v. 310, n. 1-2, p. 130-138, 2010.

REFSTIE, S. et al. Lactic acid fermentation eliminates indigestible carbohydrates and antinutritional factors in soybean meal for Atlantic salmon (*Salmo salar*). **Aquaculture**, v. 246, n. 1-4, p. 331-345, 2005.

REZENDE, F. P. **Intensificação da coloração em peixes ornamentais com uso de rações enriquecidas com pigmentos naturais**. TESE (Doutorado). Universidade Federal de Viçosa, MG. 128f. 2010.

RIBEIRO, F. A. S.; PRETO, Bruno L.; FERNANDES, J. B. K. Sistemas de criação para o acará-bandeira (*Pterophyllum scalare*). **Acta Scientiarum. Animal sciences**, v. 30, n. 4, p. 459-466, 2008.

ROCHA, A. F. D. et al. Avaliação da formação de bioflocos na criação de juvenis de tainha *Mugil cf. hospes* sem renovação de água. **Atlântica**, v. 34, n. 1, p. 63-74, 2012.

ROMANO, N. et al. Fermenting rice bran as a carbon source for biofloc technology improved the water quality, growth, feeding efficiencies, and biochemical composition of African catfish *Clarias gariepinus* juveniles. **Aquaculture Research**, v. 49, n. 12, p. 3691-3701, 2018.

ROMANO, N. et al. Assessing the feasibility of biofloc technology to largemouth bass *Micropterus salmoides* juveniles: Insights into their welfare and physiology. **Aquaculture**, v. 520, p. 735008, 2020.

ROSTIKA, R.; SUDARYONO, A. Vaname shrimp (*Litopenaeus vannamei*) juvenile growth at reducing feeding level in the bioflock culture system in karawang regency, west java, indonesia. **Lucrări Științifice - Seria Zootehnie**, v.62, p. 135-138, 2014.

SAFARI, R. et al. Combined Administration of the White Button Mushroom *Agaricus bisporus* (Agaricomycetes) and *Lactobacillus casei* Modulated Immune-Related Gene Expression and Mucosal and Serum Immune Parameters in a Goldfish (*Carassius auratus*) Model. **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v. 21, n. 5, p. 503–513, 2019.

SALES, J.; JANSSENS, G.P.J. Nutrient requirements of ornamental fish. **Aquatic Living Resources**, v. 16, n. 6, p. 533-540, 2003.

SAMOCHA, T. M. et al. Use of molasses as carbon source in limited discharge nursery and grow-out systems for *Litopenaeus vannamei*. **Aquaculture Engineering**, v. 36, n. 2, p. 184-191, 2007.

SANJUKTA, S.; RAI, A. K. Production of bioactive peptides during soybean fermentation and their potential health benefits. **Trends in Food Science & Technology**, v. 50, p. 1-10, 2016.

SARBAHI, D. S. Studies of the digestive tracts and the digestive enzymes of the goldfish, *Carassius auratus* (Linnaeus) and the largemouth black bass, *Micropterus salmoides* (Lacépède). **The Biological Bulletin**, v. 100, n. 3, p. 244-257, 1951.

SCHRADER, K. K.; GREEN, B. W.; PERSCHBACHER, P. W. Development of phytoplankton communities and common off-flavors in a biofloc technology system used for the culture of channel catfish (*Ictalurus punctatus*). **Aquacultural engineering**, v. 45, n. 3, p. 118-126, 2011.

SEFC, K. M.; BROWN, A. C.; CLOTFELTER, E. D. Carotenoid-based coloration in cichlid fishes. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 173, p. 42-51, 2014.

SGNAULIN, T. et al. Biofloc technology (BFT): An alternative aquaculture system for piracanjuba *Brycon orbignyanus*? **Aquaculture**, v. 485, p. 119-123, 2018.

SHINDO, K. et al. Rare carotenoids, (3R)-saproxanthin and (3R,2'S)-myxol, isolated from novel marine bacteria (*Flavobacteriaceae*) and their antioxidative activities. **Applied microbiology and biotechnology**, v.74, p.1350-1357, 2007.

SHIU, Y. L. et al. Increase in the plant protein ratio in the diet of white shrimp, *Litopenaeus vannamei* (Boone), using *Bacillus subtilis* E20-fermented soybean meal as a replacement. **Aquaculture Research**, v. 46, n. 2, p. 382-394, 2015.

SILVA, A. S. T.; SCHULZ, U. H. Crescimento de *Carassius auratus* (*Actinopterygii: Cypriniformes*) em tanques com e sem abrigo. **Acta biológica**, v. 28, n.1, p. 42-45, 2006.

SILVA, C. F. et al. Contribution of microorganisms to the biofilm nutritional quality: protein and lipid contents. **Aquaculture Nutrition**, v. 14, n. 6, p. 507-514, 2008.

SILVA, U. L. et al. Efeito da adição do melaço na relação carbono/nitrogênio no cultivo de camarão *Litopenaeus vannamei* na fase berçário. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 31, n. 4, p. 337-343, 2009.

SINGH, B. P.; VIJ, S.; HATI, S. Functional significance of bioactive peptides derived from soybean. **Peptides**, v. 54, p. 171-179, 2014.

SINHA, A.; ASIMI, O. A. China rose (*Hibiscus rosasinensis*) petals: a potent natural carotenoid source for goldfish (*Carassius auratus* L.). **Aquaculture Research**, v. 38, n. 11, p. 1123-1128, 2007.

SKREDE, G. et al. Lactic acid fermentation of wheat and barley whole meal flours improves digestibility of nutrients and energy in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) diets. **Aquaculture**, v. 210, n. 1-4, p. 305-321, 2002.

SORNSUPHARP, B. et al. Effects of dried fairy shrimp *Streptocephalus sirindhornae* meal on pigmentation and carotenoid deposition in flowerhorn cichlid; *Amphilophus citrinellus* (Günther, 1864) × *Cichlasoma trimaculatum* (Günther, 1867). **Aquaculture Research**, v. 46, p. 173-184, 2015.

SOTOUDEH, E. et al. Effect of dietary Gamma-irradiated and fermented soybean meal on the growth performance, body composition, and digestive enzymes activity of Caspian brown trout, *Salmo trutta caspius*, juvenile. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 47, n. 6, p. 830-842, 2016.

SUBHARANJANI, S. et al. Potential influence of probiotic bacteria on the growth gut microflora of *Carassius auratus*. **International Journal of Fisheries and Aquatic Studies**, v. 2, p. 319-323, 2015.

SUN, X. et al. The effect of dietary pigments on the coloration of Japanese ornamental carp (koi, *Cyprinus carpio* L.). **Aquaculture**, v. 342, p. 62-68, 2012.

VADHEL, N. et al. Comparative study on the performance of genetically improved rohu “Jayanti” and native rohu, *Labeo rohita* fingerlings reared in biofloc system. **Aquaculture**, v. 523, p. 735201, 2020.

VALDUGA, E. et al. Produção de carotenoides: microrganismos como fonte de pigmentos naturais. **Química Nova**, v. 32, n. 9, p. 2429-2436, 2009.

VILLAR-MARTÍNEZ, A. A. et al. The effect of marigold (*Tagetes erecta*) as natural carotenoid source for the pigmentation of goldfish (*Carassius auratus* L.). **Research Journal of Fisheries and Hydrobiology**, v. 8, n. 2, p. 31-37, 2013.

WANG, G. et al. Effect of C/N ratio on water quality in zero-water exchange tanks and the biofloc supplementation in feed on the growth performance of crucian carp, *Carassius auratus*. **Aquaculture**, v. 443, p. 98-104, 2015.

WANG, L. et al. Effects of soybean meal fermentation by *Lactobacillus plantarum* P8 on growth, immune responses, and intestinal morphology in juvenile turbot (*Scophthalmus maximus* L.). **Aquaculture**, v. 464, p. 87-94, 2016.

WASIELESKY, W.J. et al. Effect of natural production in brown water super-intensive culture system for white shrimp *Litopenaeus vannamei*. **Aquaculture**, 258: 396-403, 2006.

XU, W. J.; PAN, L. Q. Evaluation of dietary protein level on selected parameters of immune and antioxidant systems, and growth performance of juvenile *Litopenaeus vannamei* reared in zero-water exchange biofloc-based culture tanks. **Aquaculture**, v. 426, p. 181-188, 2014.

YAMAMOTO, T. et al. Influence of fermentation conditions for soybean meal in a non-fish meal diet on the growth performance and physiological condition of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. **Aquaculture**, v. 309, n. 1-4, p. 173-180, 2010.

YANAR, M. The use of alfalfa, *Medicago sativa* as a natural carotenoid source in diets of goldfish, *Carassius auratus*. **Aquaculture**, v. 284, n. 1-4, p.196-200, 2008.

YANG, G. et al. Dietary supplementation of *Bacillus cereus* as probiotics in Pengze crucian carp (*Carassius auratus* var. Pengze): Effects on growth performance, fillet quality, serum biochemical parameters and intestinal histology. **Aquaculture Research**, v. 50, n. 8, p. 2207-2217, 2019.

YASIR, I.; QIN, J. G. Effect of dietary carotenoids on skin color and pigments of false clownfish, *Amphiprion ocellaris*, Cuvier. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 41, n. 3, p. 308-318, 2010.

YEDIER, S. et al. The relationship between carotenoid type and skin color in the ornamental red zebra cichlid *Maylandia estherae*. **Aquaculture, Aquarium, Conservation & Legislation**, v. 7, n. 3, p. 207-216, 2014.

YESILAYER, N. et al. The effects of different carotenoid sources on skin pigmentation of Goldfish (*Carassius auratus*). **The Israeli Journal Aquaculture**, v. 63, p. 1-9, 2010.

YU, Z. et al. Monitoring of growth, digestive enzyme activity, immune response and water quality parameters of Golden crucian carp (*Carassius auratus*) in zero-water exchange tanks of biofloc systems. **Aquaculture Reports**, v. 16, p. 100283, 2020.

YUANGSOI, B. et al. The pigmenting effect of different carotenoids on fancy carp (*Cyprinus carpio*). **Aquaculture Nutrition**, v. 17, n. 2, p. e306-e316, 2011.

YUN, H. et al. Evaluation of dietary soybean meal as fish meal replacer for juvenile whiteleg shrimp, *Litopenaeus vannamei* reared in biofloc system. **International Aquatic Research**, v. 9, p. 11–24, 2017.

ZHANG, S. T. et al. Whole soybean as probiotic lactic acid bacteria carrier food in solid-state fermentation. **Food Control**, v. 41, p. 1-6, 2014.

ZHANG, K. et al. Effect of using sodium bicarbonate to adjust the pH to different levels on water quality, the growth and the immune response of shrimp *Litopenaeus vannamei* reared in zero-water exchange biofloc-based culture tanks. **Aquaculture Research**, v. 48, n. 3, p. 1194-1208, 2015.

ZHANG, M. et al. Effect of different water biofloc contents on the growth and immune response of gibel carp cultured in zero water exchange and no feed addition system. **Aquaculture Research**, v. 49, n. 4, p. 1647-1656, 2018.

ZHAO, Z. et al. Effect of feed C/N ratio promoted bioflocs on water quality and production performance of bottom and filter feeder carp in minimum-water exchanged pond polyculture system. **Aquaculture**, v. 434, p. 442-448, 2014.

ZHAO, D. et al. Effects of Different Carbon Sources on Bioactive Compound Production of Biofloc, Immune Response, Antioxidant Level, and Growth Performance of *Litopenaeus vannamei* in Zero-water Exchange Culture Tanks. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 47, n. 4, p. 566-576, 2016.

ZUANON, J. A. S.; SALARO, A. L.; FURUYA, W. M. Produção e nutrição de peixes ornamentais. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 40, p. 165-174, 2011.

CAPÍTULO 2 – Biofloc technology (BFT) improves skin pigmentation of goldfish (*Carassius auratus*)

Larissa da Cunha^a, Kayane Pereira Besen^a, Natalia Ha^a, Juliano Uczay^b, Everton Skoronski^a,
Thiago El Hadi Perez Fabregat^{a,*}

***Corresponding author at:** Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC, Avenida Luiz de Camões, 2090, CEP 88520-000, Lages, Santa Catarina, Brazil. thiagofabregat@hotmail.com

^a Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC. Avenida Luiz de Camões 2090, CEP 88520-000, Lages, Santa Catarina, Brazil. laridacunha@gmail.com; kakabesen@hotmail.com; ha.natalia@yahoo.com.br; everton.skoronski@udesc.br; thiagofabregat@hotmail.com*

^b Universidade Federal de Santa Maria – UFSM. Avenida Independência 3751, CEP 98300-000, Palmeira das Missões, Rio Grande do Sul, Brazil. uczay@ufsm.br

Abstract

This study evaluated the effect of biofloc technology (BFT) system and the astaxanthin supplementation on the productive performance and skin pigmentation of goldfish (*Carassius auratus*). The effects of two production systems (clear water and BFT) and two diets (with and without astaxanthin supplementation) were evaluated in a completely randomized 2X2 factorial design. A total of 120 goldfish juveniles (average weight 12.18 ± 0.27 g) were individually weighted and distributed into 24 glass aquariums (15 liters of useful volume). Two isoproteic (40% of crude protein) and isoenergetic (4250 kcal of gross energy kg^{-1}) diets were formulated according to requirements established for goldfish. A control diet without carotenoid supplementation was compared with a diet supplemented with 80 mg kg^{-1} of astaxanthin. After 56 days, fish growth and skin pigmentation parameters were evaluated. No interaction (system x diet) was observed for any of the evaluated variables. Production systems and astaxanthin dietary supplementation had no effects on weight gain (4.00 g), specific growth rate (0.51 % day^{-1}), survival (98.33 %) and apparent feed conversion (3.78) of fish. Redness (*a*) and yellowness (*b*) values were higher in the fish reared in BFT system (*a* 7.71, *b* 40.47) when compared to clear water (*a* 3.49, *b* 37.63), and in fish fed with the diet containing astaxanthin (*a* 6.46, *b* 40.72) in relation to control diet (*a* 4.74, *b* 37.38). Skin carotenoid concentration was also higher in fish produced in the BFT system (50.36 mg kg^{-1}) when compared to clear water

(35.63 mg kg⁻¹) and fish fed with the astaxanthin diet (49.33 mg kg⁻¹) in relation to the diet with no supplementation (36.66 mg kg⁻¹). These results demonstrate that the BFT system is an effective and promising technology for goldfish (*Carassius auratus*) production. The BFT system promotes pigmentation, but this effect can be intensified with exogenous sources of carotenoids.

Keywords: Astaxanthin, carotenoids, ornamental fish, production system, skin color.

1 Introduction

Potential impacts on ecosystem biodiversity limit expansion of aquaculture activities (OECD-FAO, 2015). Inadequate food management results in the accumulation of toxic compounds in intensive systems, especially ammonia and nitrite. Several strategies are used to address problems associated with the accumulation of ammonia in aquaculture systems (Avnimelech, 2006; Elalouf et al., 2018). The biofloc technology (BFT) system is one such method that has shown advantages over traditional continuous flow-through systems (Azim and Little, 2008; Krummenauer et al., 2014; Li et al., 2018). The BFT system is characterized by the production of aquatic organisms with low or no water renewal and with intensive aeration. Microorganisms are used to maintain water quality and serve as a food supplement for animals (Crab et al., 2012).

Bioflocs are formed by manipulating the carbon/nitrogen ratio (C/N ratio) (Avnimelech, 2007). The system is fertilized with sources rich in organic carbon that stimulates the formation of a predominantly heterotrophic biota consisted of bacteria, microalgae, flagellates, ciliates, rotifers, nematodes among other microorganisms (Ballester et al., 2010; Schrader et al., 2011; Bakar et al., 2015). The bacteria in the system assimilate nitrogen compounds in the water to form microbial biomass, which can be used as a supplementary food source for the target species (Najdegerami et al., 2016; Li et al., 2018).

Bioflocs are also composed of bacteria and photosynthetic microorganisms that can synthesize carotenoid pigments (Ju et al., 2008; Ray et al., 2010; Schrader et al., 2011; Bakar et al., 2015). Carotenoids are bioactive components that have high antioxidant activity (Shindo et al., 2007; Alishahi et al., 2014; Jagruthi et al., 2014) and are also the main source of pigments for aquatic animals (Das and Biswas, 2016). Exogenous sources are added in fish feeds to intensify the pigmentation of skin and meat tissue (Khatoon et al., 2010; Sornsupharp et al., 2015; Besen et al., 2019). Ornamental fish species have been successfully produced in BFT systems with positive results in animal growth, but skin coloration was not considered in prior analyses (Felix and Sudha, 2013; Faizullah et al., 2015; Wang et al., 2015; Harini et al., 2016).

The presence of carotenoids in the bioflocs indicates that its ingestion may improve the pigmentation of the animals and thus, would eliminate supplementation with exogenous sources and reduce production costs.

The goldfish (*Carassius auratus*) is one of the most popular and produced ornamental species worldwide. It is highly valued for its attractive skin coloration (Sinha and Asimi, 2007; Villar-Martínez et al., 2013). The goldfish is considered an omnivorous fish (Sales and Janssens, 2003), feeding mainly on debris, benthic organisms, microalgae and zooplankton (Castro et al., 2016). Goldfish have already been produced successfully in BFT systems, but results focused on the productive performance of the animals (Faizullah et al., 2015; Wang et al., 2015; Castro et al., 2016). The supplementation of carotenoids has also yet to be evaluated for these systems. Thus, the objective of the present study was to evaluate the effect of BFT system and the astaxanthin supplementation on the productive performance and skin pigmentation of goldfish (*Carassius auratus*).

2 Material and methods

2.1 Experimental design

The present study was carried out over a period of 56 days at the Fish Aquaculture Laboratory of the Santa Catarina State University, Lages, SC, Brazil. Two production systems (clear water and BFT) and two diets (with and without astaxanthin supplementation) were evaluated in a completely randomized 2X2 factorial design. For the growth variables, each aquarium was considered as a repetition, totaling six replicates per treatment. For the skin pigmentation parameters each fish was considered a repetition. The experiment was approved by the Ethics Committee of the Santa Catarina State University (protocol number 9993291117).

2.2 Animals, facilities and system management

A total of 120 goldfish juveniles (average weight 12.18 ± 0.27 g) were obtained from broodstock of the laboratory. The animals were acclimated to experimental conditions for 14 days. During this period the fish were kept in polyethylene water tanks (100 liters of useful volume; 10 fish per tank), connected to a water recirculation system equipped with a mechanical and biological filter. Fish were fed twice daily (10 a.m. and 4 p.m.) until apparent satiation with the control diet used for the experiment. At the end of the acclimation period, the fish were individually weighted and distributed into 24 glass aquariums (15 liters of useful volume). Constant temperature was maintained using heaters with thermostats, and the water was oxygenated using air stones connected to an air compressor. The photoperiod was 12h of light.

The experimental units of the clear water treatments were equipped with a biological foam filter and 70% of the aquarium water was renewed daily. For the experimental units of the BFT system, three silicone hoses with 4 mm diameter were glued to the bottom of the aquariums to prevent sedimentation of the bioflocs using aeration. No water renewal was carried out for the BFT treatments and water was added only to replace losses from evaporation.

At the beginning of the experiment, an inoculum of 150 ml of water from a previous culture of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) in a BFT system was added in each BFT experimental unit of the present study. Molasses (38% carbon) was added daily (2 p.m.) as an additional carbon source in each BFT aquarium to maintain a C/N ratio of 20:1 (Wang et al., 2015). This methodology is based on the assumption that fish assimilate approximately 25% of the nitrogen from feed and that the remaining 75% is converted to total ammonia nitrogen (TAN) in water (Schryver et al., 2008).

2.3 Food management and experimental diets

The fish were fed twice daily (10 a.m. and 4 p.m.) at a proportion of 2% body weight per day. Biometric analyses were performed at the beginning of the experiment and at 28 days to adjust the amount of feed supplied. Two isoproteic (40% of crude protein) and isoenergetic (about 4250 kcal of gross energy kg⁻¹) diets were formulated (Table 1) according to the recommended requirements for goldfish described in Bandyopadhyay et al. (2005). A control diet without carotenoid supplementation was compared to a diet with 80 mg kg⁻¹ astaxanthin (Gouveia et al., 2003). The microalgae *Haematococcus pluviialis* (3.5% astaxanthin) (Xi'an Tonking Biotech Co.) was used as a natural source of astaxanthin. Diets were formulated using fishmeal and soybean meal as protein sources, and soybean oil and corn meal as energy sources. The marine fishmeal was purchased from Agroforte® (Laguna, Santa Catarina, Brazil) and the other ingredients were acquired from local suppliers.

All ingredients were finely ground using a blender and then sieved to obtain only particles of less than 0.71 mm. The ingredients were then mixed, pelletized with the addition of water (30%), and dried at 45°C in a forced air convection oven for 48 h. After this period, the feed was ground and sieved to obtain the desired feed particle size of about 1.5 mm and were stored in a freezer (-20°C) until the beginning of the experimental period. The bromatologic composition of the diets were analyzed using methods described in AOAC (2000). The total carotenoid concentration of the diets was determined using a methodology modified from Moriel et al. (2005).

Table 1. Composition of the experimental diets.

Ingredients (%)	Control diet	Astaxanthin diet
Soybean meal	40.50	40.50
Wheat meal	10.00	10.00
Corn meal	7.50	7.27
Fish meal	36.00	36.00
Soybean oil	5.00	5.00
Astaxanthin	-	0.23
Premix ¹	1.00	1.00
Analyzed composition		
Dry matter (%)	84.48	84.28
Crude protein (%)	40.12	40.10
Gross energy (kcal.kg ⁻¹)	4273.40	4264.34
Crude lipid (%)	8.97	8.97
Crude fiber (%)	4.51	4.50
Ash (%)	11.11	11.11
Carotenoid concentration (mg kg ⁻¹)	9.20±2.55	84.56±11.63

¹ Folic acid – 2400 mg, nicotinic acid – 48 g, pantothenic acid – 24 g, biotin – 96 mg, vit. A – 2400,000 IU, vit. D3–400,000 IU, vit. E – 24,000 IU, vit. B1–9600 mg, vit. B2–9600 mg, vit. B6–9600 mg, vit. B12–9600 mg, vit. K3–4800 mg, vit. C – 96 g, iron – 100 g, manganese – 40 g, zinc – 6000 mg, cobalt – 20 mg, iodine – 200 mg, selenium – 200 mg, antioxidant – 19.6 g.

2.4 Water quality

Dissolved oxygen (Hanna instruments HI9147-10), temperature and pH (Hanna instruments HI98130) were monitored daily. Total ammonia nitrogen (TAN), nitrite, nitrate, total suspended solids (TSS) (Rice et al., 2012) and turbidity (Hanna instruments HI93703C) were monitored weekly. TSS was monitored only in the BFT treatments. Salinity was maintained at approximately 4 g l⁻¹ (Luz et al., 2008) throughout the experimental period in all aquariums.

Water quality parameters (Table 2) remained within ranges recommended for fish farming with the exception of nitrite (Boyd, 1998). Nitrite increased in the first weeks of the experiment in the treatments with the BFT system and the maximum value was recorded in the second week, but no negative effects from the nitrite were apparent with the productive performance of the animals.

Table 2. Water quality parameters (mean $\pm$ standard deviation) in clear water and BFT systems, with and without astaxanthin supplementation in the diet for 56 days.

	System (S)		Diet (D)	
	Clear water	BFT	Control	Astaxanthin
Temperature ($^{\circ}\text{C}$)	26.02 $\pm$ 0.35	25.96 $\pm$ 0.35	26.03 $\pm$ 0.37	25.95 $\pm$ 0.33
DO (mg l^{-1})	6.27 $\pm$ 0.49	6.38 $\pm$ 0.58	6.33 $\pm$ 0.54	6.32 $\pm$ 0.54
pH	7.91 $\pm$ 0.59	7.96 $\pm$ 0.35	7.95 $\pm$ 0.48	7.92 $\pm$ 0.49
Turbidity (NTU)	1.14 $\pm$ 1.37	97.06 $\pm$ 62.44	57.93 $\pm$ 65.31	53.97 $\pm$ 68.93
TAN (mg l^{-1})	0.39 $\pm$ 0.28	0.37 $\pm$ 0.41	0.37 $\pm$ 0.35	0.40 $\pm$ 0.36
Nitrite (mg l^{-1})	0.04 $\pm$ 0.05	3.26 $\pm$ 6.48	2.04 $\pm$ 5.58	1.72 $\pm$ 4.68
Nitrate (mg l^{-1})	25.17 $\pm$ 13.45	102.92 $\pm$ 34.93	69.76 $\pm$ 48.45	69.04 $\pm$ 46.88
TSS (mg l^{-1})*	-	212.95 $\pm$ 132.49	-	-

Dissolved oxygen (DO), Total ammonia nitrogen (TAN), Total suspended solids (TSS). * TSS was monitored only in BFT treatments.

At the end of the experiment, samples of the bioflocs were decanted in Imhoff cones, collected and dried in a forced-air convection oven at 45°C for 48 hours. Dry samples of bioflocs were stored in a freezer (-20°C) and subsequently analyzed for total carotenoids concentration using a methodology adapted from Moriel et al. (2005). Carotenoids concentration in the dry bioflocs of BFT treatment with the control diet was $18.37 \pm 3.38 \text{ mg kg}^{-1}$ and in BFT treatment with astaxanthin in the diet was $41.28 \pm 5.19 \text{ mg kg}^{-1}$.

2.5 Productive performance and sample collection

At the end of the experiment the fish were fasted for 24 hours, anesthetized with eugenol (50 mg l^{-1}) (Bittencourt et al., 2012) and weighed individually. The productive performance was analyzed based on the following parameters: weight gain (WG, $\text{g} = \text{final mean weight} - \text{initial mean weight}$), specific growth rate ($\text{SGR, \% day}^{-1} = [(\ln \text{ final weight} - \ln \text{ initial weight}) / \text{experimental period}] * 100$) and apparent feed conversion rate ($\text{FCR} = \text{feed intake} / \text{total weight gain}$). Mortalities were recorded daily to assess survival rate ($\text{SR, \%} = [\text{total animals harvested} / \text{total animals stocked}] * 100$).

2.6 Skin color measurement

At the end of the experimental period the skin color measurement was measured in three fish from each aquarium. Fish were anesthetized with eugenol solution (50 mg l⁻¹) (Bittencourt et al., 2012) and a portable colorimeter (Konica Minolta CR 410) was used to evaluate color at three different points on the fish: (1) close to the operculum; (2) near the dorsal fin (3) in the abdomen, near the pelvic fin. These points were analyzed on the left side of the animal. Reported values are means of the three locations. The parameters used to evaluate color were *L* for lightness (-100 black, +100 white), *a* for redness or greenness (-100 green, +100 red), and *b* for yellowness or blueness (-100 blue, +100 yellow), respectively (CIE, 1977).

2.7 Skin carotenoid concentration

One fish per aquarium was anaesthetized, euthanized by medullar sectioning, packed in aluminum foil and stored in a deep-freezer (-80°C) to analyze the skin carotenoid concentration. For analysis, fish were thawed for 30 minutes at room temperature. The carotenoid concentration was determined using methods adapted from Moriel et al. (2005). The skin with scales and the fins of the fish were removed with scalpel and forceps. The samples were then cut into small pieces, frozen in liquid nitrogen and macerated to obtain homogeneous samples of skin, scales and fins of approximately 0.5 g.

The samples were then transferred to a Falcon tube, where 2 ml of dimethylsulfoxide (DMSO) was added and the tube was held in the absence of light for 30 minutes. Then, 6 ml of acetone was added to this solution and the sample was centrifuged (T150 Janetzki) at 4000 rpm for 5 minutes. The supernatant was separated and the centrifugation procedure with acetone was repeated with the precipitate until the extractive solvent showed a translucent coloration. The supernatants were combined in a separation funnel, where 10 ml solution of aqueous sodium chloride (NaCl) (200 g l⁻¹) and 10 ml of petroleum ether were added. The ether layer was separated, dried by filtration on a Buchner funnel via anhydrous sodium sulfate (Na₂SO₄). The final solution was subjected to UV spectrophotometer reading (Shimadzu UV-1800). The absorbance was measured at 474 nm and the carotenoid concentration was calculated using the absorbance coefficient $A_{1\% 1\text{cm}} = 1600$.

2.8 Statistical analyzes

All the data were submitted to tests to verify the normality (Shapiro-Wilk test) and homoscedasticity (Levene test). All variables were analyzed using parametric analysis of variance (2x2 factorial ANOVA). Since no interaction effects were shown for any variables,

the factors (systems and diets) were compared ($P < 0.05$) separately (system 1 x system 2, diet 1 x diet 2).

3 Results

3.1. Productive performance

There was no interaction between the systems and the diets ($P > 0.05$) for any of the productive performance variables (Table 3). The dietary supplementation of astaxanthin and production systems did not affect ($P > 0.05$) the weight gain (4.00 g), specific growth rate ($0.51\% \text{ day}^{-1}$), survival rate (98.33%) and apparent feed conversion rate (3.78).

Table 3. Productive performance parameters of goldfish (mean $\pm$ standard deviation: $n = 12$) produced in clear water and BFT systems, with and without astaxanthin supplementation in the diet (2x2 factorial ANOVA) for 56 days.

	System (S)		Diet (D)		P value		
	Clear water	BFT	Control	Astaxanthin	S	D	S x D
WG	3.96 $\pm$ 0.50	4.03 $\pm$ 0.51	4.05 $\pm$ 0.39	3.94 $\pm$ 0.59	0.7385	0.6092	0.1134
SGR	0.50 $\pm$ 0.06	0.51 $\pm$ 0.05	0.51 $\pm$ 0.04	0.49 $\pm$ 0.07	0.6926	0.4820	0.0895
SR	98.33 $\pm$ 5.77	98.33 $\pm$ 5.77	100 $\pm$ 0.00	96.66 $\pm$ 7.78	1.0000	0.1727	1.0000
FCR	3.79 $\pm$ 0.42	3.76 $\pm$ 0.42	3.72 $\pm$ 0.35	3.83 $\pm$ 0.48	0.8564	0.5336	0.1185

Means do not differ by the ANOVA test ($P > 0.05$). WG (g): weight gain, SGR ($\% \text{ day}^{-1}$): specific growth rate, SR (%): survival rate and FCR: apparent feed conversion rate.

3.2 Skin color and carotenoid concentration

No interaction was shown between the systems and the diets ($P > 0.05$) for any of the skin color parameters (Table 4). Redness (a) and yellowness (b) values were higher ($P < 0.05$) in the fish reared in BFT system and in fish fed the diet containing astaxanthin. Lightness (L) value was lower ($P < 0.05$) in the biofloc system. Dietary supplementation with astaxanthin did not affect ($P > 0.05$) the lightness (L) value.

Table 4. Skin color parameters (*L a b*) of goldfish (mean $\pm$ standard deviation: $n = 36$) produced in clear water and BFT systems, with and without astaxanthin supplementation in the diet (2x2 factorial ANOVA) for 56 days.

	System (S)		Diet (D)		P value		
	Clear water	Biofloc	Control	Astaxanthin	S	D	S x D
<i>L</i>	73.89 $\pm$ 2.43a	68.97 $\pm$ 2.74b	71.73 $\pm$ 3.97	71.13 $\pm$ 3.26	0.0002*	0.58902	0.5665
<i>a</i>	3.49 $\pm$ 1.85b	7.71 $\pm$ 1.72a	4.74 $\pm$ 2.49b	6.46 $\pm$ 2.88a	<.0001*	0.0170*	0.7065
<i>b</i>	37.63 $\pm$ 3.24b	40.47 $\pm$ 3.58a	37.38 $\pm$ 2.44b	40.72 $\pm$ 3.96a	0.0349*	0.0148*	0.6712

Different letters in the lines represent statistical difference ($P < 0.05$). *: $P < 0.05$, *L*: lightness, *a*: redness, *b*: yellowness.

There was also no interaction shown for the total carotenoid concentration of the skin ($P > 0.05$). Carotenoid concentration was higher ($P < 0.05$) in the skin of the fish produced in the BFT system and fed with the diet supplemented with astaxanthin (Fig. 1).

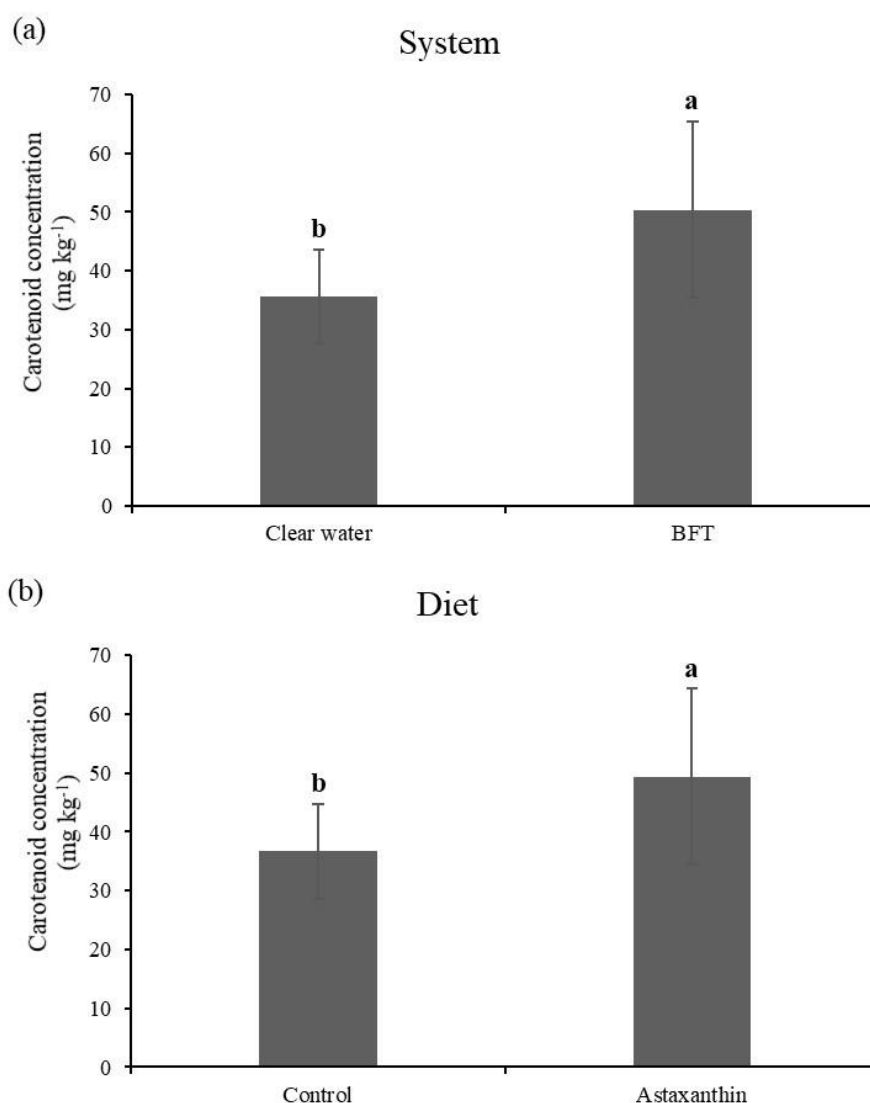


Fig. 1. Total carotenoid concentration in goldfish skin (mean $\pm$ standard deviation: $n = 12$) produced in clear water and BFT systems (a), with and without astaxanthin supplementation in the diet (b) for 56 days. There was no interaction ($P > 0.05$) between the factors systems and diets. Means with different letters represent statistical difference ($P < 0.05$).

4 Discussion

In the present study, the production system did not affect the performance and survival of goldfish. Previous studies reported a positive influence of the BFT system on the productive performance of goldfish when compared to their production in clear water system (Faizullah et al., 2015; Wang et al., 2015; Castro et al., 2016). The absence of effects on performance may be a result of fish size and stocking density. The fish used in the aforementioned studies were smaller (1.48 to 5.01 g) than those used in the current study (12.18 g). In addition, the stocking densities used by Faizullah et al. (2015), Wang et al. (2015) and Castro et al. (2016) were

smaller (0.05, 0.17 and 2.00 g fish per liter) than that of the present study (4.06 g fish per liter). Studies with lower densities and longer duration are needed to further confirm results of the performance.

The production of goldfish in the BFT system intensified the red and yellow pigmentation of fish skin. This result was confirmed by the higher carotenoids concentration in the skin when compared to fish produced in a clear water system. The pigmentation of fish in the BFT system is an unprecedented result and confirms the bioflocs potential as a source of carotenoids. Consumption of the bioflocs was not measured, but the goldfish were frequently observed feeding on it. Microorganisms capable of synthesizing carotenoids are present in bioflocs (Ju et al., 2008; Ray et al., 2010; Schrader et al., 2011; Bakar et al., 2015), which explains the capacity of the bioflocs to contribute to pigmentation. In addition, feed remains and carbon sources serve as a substrate for the microorganisms and may have contributed to increased carotenoid levels. This hypothesis is demonstrated by the increased carotenoids concentration in bioflocs of tanks that received the diet with astaxanthin when compared to the control diet. The relationship between diet and carbon sources with the concentration of carotenoids in bioflocs has yet to be evaluated.

In the present study, the carotenoid concentration in the bioflocs reached 41 mg kg⁻¹ in tanks supplemented with astaxanthin. This value is close to the reference levels of carotenoid supplementation required to promote goldfish skin pigmentation (Paripatananont et al., 1999; Sinha and Asimi et al., 2007). In tanks without supplementation, the concentration of carotenoids was lower (18 mg kg⁻¹), but the pigmentation was still effective. Since fish can selectively ingest bioflocs particles (Avnimelech, 2007), there may have been a selection of carotenoid-rich particles. It is still necessary to identify and characterize microorganisms capable of synthesizing carotenoid pigments in BFT systems, as well as evaluate ways to intensify their carotenoid production. Future research should also evaluate the fish pigmentation dynamics in the BFT system.

Skin lightness was lower in fish produced in the BFT system compared to the fish produced in the clear water system. Colour patterns of adult fish are produced by several types of pigment cells (chromatophores) (Frohnhofer et al., 2013). These cells have the ability to adjust the animal color in different situations (Grempel and Visconti, 2014). Environmental factors, such as background color and lighting from sunlight, can affect the lightness of fish skin (Matsui et al., 1992; Eslamloo et al., 2015; Ninwichian et al., 2018). The darker coloration of the BFT system water (high turbidity) may have reduced the lightness of the goldfish skin. Snakeskin gourami (*Trichogaster pectoralis*) production in white tanks provided pale skin (high

lightness) while the fish produced in black tanks had darker skin (low lightness) (Ninwichian et al., 2018).

Astaxanthin dietary supplementation did not affected goldfish productive performance. In general, carotenoid supplementation did not affect goldfish growth (Gouveia et al., 2003; Gouveia and Rema, 2005; Xu et al., 2006; Villar-Martínez et al., 2013). Some studies show that several carotenoids such as astaxanthin (Paripatananont et al., 1999), canthaxanthin (Yesilayer et al., 2010) and lutein (Besen et al., 2019) can increase survival of goldfish. Improvement in survival may be related to the high antioxidant activity of carotenoids (Shindo et al., 2007; Alishahi et al., 2014; Jagruthi et al., 2014). In addition, some carotenoids such as lutein can be metabolized to vitamin A (Davies and Davies, 1986; Del Tito, 1983; Matsuno, 1991), which can also benefit fish health (Besen et al., 2019). In the present study survival was high in all treatments which may have masked possible effects on survival.

Dietary supplementation with astaxanthin increased the concentration of carotenoids and the intensity of the red and yellow coloration of the goldfish skin. The color parameters *a* and *b* are considered indicators of the carotenoid concentration in fish skin and muscle (Bjerkeng et al., 1997; Ingle de la Mora et al., 2006; Yi et al., 2014). Different sources of carotenoids can be used to increase the carotenoids concentration and intensify the red coloration in goldfish skin, such as microalgae *Chlorella vulgaris* and *Haematococcus pluvialis*, natural bixin, oleoresin paprika, canthaxanthin and astaxanthin (Gouveia et al., 2003; Gouveia and Rema, 2005; Yesilayer et al., 2010; Dananjaya et al., 2015). The intensity of yellow may also increase depending on the goldfish strain and the pigment source, as was shown when fish were supplemented with astaxanthin, oleoresin paprika, *Arthrospira maxima* (*Spirulina*), *Chlorella vulgaris* and *Haematococcus pluvialis* (Gouveia et al., 2003; Yesilayer et al., 2010).

In the present study there was no effect of diet on the lightness of goldfish skin. In general, dietary supplementation with carotenoids does not alter the lightness of fish skin and muscle (Gouveia et al., 2003; Ingle de la Mora et al., 2006; Yungsoi et al., 2010; Pham et al., 2014; Yi et al., 2014; Sornsupharph et al., 2015). Dietary supplementation with *Chlorella vulgaris*, *Haematococcus pluvialis* and *Arthrospira maxima* (*Spirulina*) also had no effects on the lightness of goldfish skin (Gouveia et al., 2003). On the other hand, other studies have found a decrease in skin lightness of goldfish fed diets with carotenoids such as natural bixin, astaxanthin, canthaxanthin and oleoresin paprika (Yesilayer et al., 2010; Dananjaya et al., 2015).

Dietary supplementation with 80 mg kg⁻¹ astaxanthin was effective to promote goldfish skin pigmentation regardless of the rearing system used. Astaxanthin has been extensively studied as a dietary supplement for goldfish in clear water systems. The recommended range to include synthetic astaxanthin is from 36 to 200 mg kg⁻¹ (Paripatananont et al., 1999; Yesilayer et al., 2010; Dananjaya et al., 2015) and from 45 to 80 mg kg⁻¹ for astaxanthin obtained from natural sources of carotenoids such as microalgae *Haematococcus pluvialis*, *Chlorella vulgaris* and red yeast *Xanthophyllomyces dendrorhous* (Gouveia et al., 2003; Gouveia and Rema, 2005; Xu et al., 2006; Besen et al., 2019). This was the first study to evaluate the need for supplementing carotenoids in the BFT system. The BFT system is effective in promoting pigmentation, but exogenous sources of pigments can be used to complement the carotenoids present in the system. Further studies are needed to determine the optimal level of carotenoid supplementation in the BFT system.

5 Conclusion

Cultivation in the BFT system improves the pigmentation of goldfish skin when compared to the clear water system. No effect was observed of the cultivation system on goldfish performance. These results demonstrate that the BFT system is an effective and promising technology for goldfish (*Carassius auratus*) production.

Carotenoid supplementation intensified fish pigmentation regardless of the culture system used. The BFT system promotes pigmentation and this effect can be intensified with exogenous sources. The goldfish performance was unaffected by carotenoid supplementation.

Acknowledgements

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001 and by the Fundação de Apoio à Pesquisa Científica e Tecnológica do Estado de Santa Catarina (FAPESC).

Declarations of interest

None.

References

Alishahi, M., Karamifar, M., Mesbah, M., Zarei, M., 2014. Hemato-immunological responses of *Heros severus* fed diets supplemented with different levels of *Dunaliella salina*. Fish Physiol. Biochem. 40, 57-65. <https://doi.org/10.1007/s10695-013-9823-5>.

- Association of Official Analytical Chemists (AOAC), 2000. Official Methods of Analysis, 17th ed. Gaithersburg, MD, USA.
- Avnimelech, Y., 2006. Bio-filters: the need for an new comprehensive approach. *Aquacult. Eng.* 34, 172-178. <https://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2005.04.001>.
- Avnimelech, Y., 2007. Feeding with microbial flocs by tilapia in minimal discharge bio-flocs technology ponds. *Aquaculture* 264, 140-147. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.11.025>.
- Azim, M.E., Little, D.C., 2008. The biofloc technology (BFT) in indoor tanks: Water quality, biofloc composition, and growth and welfare of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture* 283, 29–35. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.06.036>.
- Bakar, N.S.A., Nasir, N.M., Lananan, F., Hamid, S.H.A., Lam, S.S., Jusoh, A., 2015. Optimization of C/N ratios for nutrient removal in aquaculture system culturing African catfish, (*Clarias gariepinus*) utilizing Bioflocs Technology. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 102, 100-106. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2015.04.001>.
- Ballester, E.L.C., Abreu, P.C., Cavalli, R.O., Emerenciano, M., Abreu, L. de, Wasielesky Jr, W., 2010. Effect of practical diets with different protein levels on the performance of *Farfantepenaeus paulensis* juveniles nursed in a zero exchange suspended microbial flocs intensive system. *Aquac. Nutr.* 16, 163-172. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2009.00648.x>.
- Bandyopadhyay, P., Swain, S., Mishra, S., 2005. Growth and dietary utilisation in goldfish (*Carassius auratus* Linn.) fed diets formulated with various local agro-produces. *Bioresour. Technol.* 96, 731-740. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2004.06.018>.
- Besen, K.P., Melim, E.W.H., da Cunha, L., Favaretto, E.D., Moreira, M., Fabregat, T.E.H.P., 2019. Lutein as a natural carotenoid source: Effect on growth, survival and skin pigmentation of goldfish juveniles (*Carassius auratus*). *Aquac. Res.* 50, 2200– 2206. <https://doi.org/10.1111/are.14101>.
- Bittencourt, F., Souza, B.E., Boscolo, W.R., Rorato, R.R., Feiden, A., Neu, D.H., 2012. Benzocaine and eugenol as anesthetics for golden fish (*Carassius auratus*). *Arq. Bras. Med. Vet. Zoo.* 64, 1597-1602. <https://doi.org/10.1590/S0102-09352012000600028>.
- Bjerkeng, B., Følling, M., Lagocki, S., Storebakken, T., Olli, J.J., Alsted, N., 1997. Bioavailability of all-E-astaxanthin and Z-isomers of astaxanthin in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 157, 63-82. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(97\)00146-4](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(97)00146-4).

- Boyd, C.E., 1998. Water quality for pond aquaculture. Ala. Agr. Exp. Sta. Auburn Univer. Ala. 43, 2–17 39 pp.
- Castro, M.G., Castro, M.J., De Lara, A.R., Monroy, D.M.C., Ocampo, C.J.A., Davila, F.S., 2016. Length, weight and condition factor comparison of *Carassius auratus* (Linnaeus, 1758) juveniles cultured in biofloc system. Int. J. Fish. Aquat. Stud. 4, 345-350.
- CIE, 1977 CIE Recommendations on Uniform Color Spaces, Color-Difference Equations, and Metric Color Terms. Color Research & Application, 2: 5-6. <https://doi.org/10.1002/j.1520-6378.1977.tb00102.x>.
- Crab, R., Defoirdt, T., Bossier, P., Verstraete, W., 2012. Biofloc technology in aquaculture: beneficial effects and future challenges. Aquaculture 356-357, 351-356. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.04.046>.
- Dananjaya, S.H.S., Munasinghe, M., Ariyaratne, H.B.S., Lee, J., Zoysa, M.D., 2015. Natural bixin as a potential carotenoid for enhancing pigmentation and color in goldfish *Carassius auratus*. Aquac. Nutr. 23, 255-263. <https://doi.org/10.1111/anu.12387>.
- Das, A.P., Biswas, S.P., 2016. Carotenoids and Pigmentation in Ornamental Fish. J. Aquac. Mar. Biol. 4, 00093. <https://doi.org/10.15406/jamb.2016.04.00093>.
- Davies, B.W., Davies, B.H., 1986. Retinol and 3, 4-dehydroretinol formation from xanthophylls in the goldfish, *Carassius auratus*. Biochem. Soc. Trans. 14, 952. <https://doi.org/10.1042/bst0140952>.
- Del Tito Jr, B.J., 1983. Role of beta-carotene and lutein in the synthesis of vitamin A in goldfish. Prog. Fish-Cult. 45, 94–97. [https://doi.org/10.1577/1548-8659\(1983\)45\[94:ROBALI\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1577/1548-8659(1983)45[94:ROBALI]2.0.CO;2).
- Elalouf, H., Kaspi, M., Elalouf, A., Halachmi, I., 2018. Optimal operation policy for a sustainable recirculation aquaculture system for ornamental fish: Simulation and response surface methodology. Comput. Oper. Res. 89, 230-240. <https://doi.org/10.1016/j.cor.2017.05.002>.
- Eslamloo, K., Akhavan, S., Eslamifar, A., Henry, M., 2015. Effects of background colour on growth performance, skin pigmentation, physiological condition and innate immune responses of goldfish, *Carassius auratus*. Aquac. Res. 46, 202–215. <https://doi.org/10.1111/are.12177>.
- Faizullah, M., Rajagopalsamy, C.B.T., Ahilan, B., Francis, T., 2015. Impact of Biofloc Technology on the Growth of Goldfish Young Ones. Indian J. Sci. Technol. 8, 1-8. <https://doi.org/10.17485/ijst/2015/v8i13/54060>.

- Felix, S., Sudha, M., 2013. Mass rearing of rosy barb, *Puntius conchoni* in inland raceway system using Aerobic Microbial Flocculent Technology (AMFT). Indian Vet. J. 90, 102-104.
- Frohnhofer, H.G., Krauss, J., Maischein, H.-M., Nüsslein-Volhard, C., 2013. Iridophores and their interactions with other chromatophores are required for stripe formation in zebrafish. Development 140, 2997–3007. <https://doi.org/10.1242/dev.096719>.
- Gouveia, L., Rema, P., 2005. Effect of microalgal biomass concentration and temperature on ornamental goldfish (*Carassius auratus*) skin pigmentation. Aquac. Nutr. 11, 19-23. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2004.00319.x>.
- Gouveia, L., Rema, P., Pereira, O., Empis, J., 2003. Colouring ornamental fish (*Cyprinus carpio* and *Carassius auratus*) with microalgal biomass. Aquac. Nutr. 9, 123-129. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2095.2003.00233.x>.
- Grepel, R.G., Visconti, M.A., 2014. Coloração e fisiologia da pigmentação, in: Baldisserotto, B., Cyrino, J.E.P., Urbinati, E.C., Biologia e fisiologia de peixes neotropicais de água doce. Funep, Jaboticabal, pp.141-155.
- Harini, C., Rajagopalasamy, C.B.T., Kumar, J.S.S., Santhakumar, R., 2016. Role of biofloc in the growth and survival of blue morph, *Pseudotropheus saulosi*. Indian J. Sci. Technol. 9, 1-7. <https://doi.org/10.17485/ijst/2016/v9i8/75237>.
- Ingle de la Mora, G., Arredondo-Figueroa, J.L., Ponce-Palafox, J.T., Barriga-Soca, I.A., Vernon-Carter, J.E., 2006. Comparison of red chilli (*Capsicum annuum*) oleoresin and astaxanthin on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fillet pigmentation. Aquaculture 258, 487–495. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.04.005>.
- Jagruthi, C., Yogeshwari, G., Anbazahan, S.M., Mari, L.S.S., Arockiaraj, J., Mariappan, P., Harikrishnan, R., 2014. Effect of dietary astaxanthin against *Aeromonas hydrophila* infection in common carp, *Cyprinus carpio*. Fish Shellfish Immunol. 41, 674-680. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2014.10.010>.
- Ju, Z.Y., Forster, I., Conquest, L., Dominy, W., Kuo, W.C., David Horgen, F., 2008. Determination of microbial community structures of shrimp floc cultures by biomarkers and analysis of floc amino acid profiles. Aquac. Res. 39, 118-133. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2007.01856.x>.
- Khatoon, N., Sengupta, P., Homechaudhuri, S., Pal, R., 2010. Evaluation of algae based feed in Goldfish (*Carassius auratus*) nutrition. Proc. Zool. Soc. 63, 109-114. <https://doi.org/10.1007/s12595-010-0015-3>.

- Krummenauer, D., Samocha, T., Poersch, L., Lara, G., Wasielesky, W., 2014. The reuse of water on the culture of Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, in BFT system. J. World Aquacult. Soc. 45, 3-14. <https://doi.org/10.1111/jwas.12093>
- Li, H.D., Han, D., Zhu, X.M., Yang, Y.X., Jin, J.Y., Xie, S.Q., Liu, H.K., 2018. Effect of biofloc technology on water quality and feed utilization in the cultivation of gibel carp (*Carassius auratus gibelio* var. CAS III). Aquac. Res. 49, 2852-2860. <https://doi.org/10.1111/are.13748>.
- Luz, R.K., Martínez-Álvarez, R.M., De Pedro, N., Delgado, M.J., 2008. Growth, food intake regulation and metabolic adaptations in goldfish (*Carassius auratus*) exposed to different salinities. Aquaculture 276, 171-178. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.01.042>.
- Matsui, S., Tanabe, T., Furuichi, M., Yoshimatsu, T., Kitajima, C., 1992. Reduction of black lines in the muscle of cultured red seabream and improvement of the body colour. Nippon Suisan Gakk. 58, 1459–1464. <https://doi.org/10.2331/suisan.58.1459>.
- Matsuno, T., 1991. Xanthophylls as precursors of retinoids. Pure Appl. Chem. 63, 81–88. <https://doi.org/10.1351/pac199163010081>.
- Moriel, D.G., Chociai, M.B., Machado, I.M.P., Fontana, J.D., Bonfim, T.M.B., 2005. Effect of feeding methods on the astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma* in fed-batch process. Braz. Arch. Biol. Technol. 48, 397-401. <http://doi.org/10.1590/S1516-89132005000300010>.
- Najdegerami, E.H., Bakhshi, F., Lakani, F.B., 2016. Effects of biofloc on growth performance, digestive enzyme activities and liver histology of common carp (*Cyprinus carpio* L.) fingerlings in zero-water exchange system. Fish Physiol. Biochem. 42, 457-465. <http://doi.org/10.1007/s10695-015-0151-9>.
- Ninwichian, P., Phuwan, N., Jakpim, K., Sae-Lim, P., 2018. Effects of tank color on the growth, stress responses, and skin color of snakeskin gourami (*Trichogaster pectoralis*). Aquac. Int. 26, 659-672. <https://doi.org/10.1007/s10499-018-0242-6>.
- OECD/Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2015. OECD–FAO Agricultural Outlook 2015–2024. OECD Publishing, Paris. http://doi.org/10.1787/agr_outlook-2015-en.
- Paripatananont, T., Tangtrongpaioj, J., Sailasuta, A., Chansue, N., 1999. Effect of astaxanthin on the pigmentation of goldfish *Carassius auratus*. J. World Aquacult. Soc. 30, 454-460. <https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.1999.tb00993.x>.
- Pham, M.A., Byun, H.G., Kim, K.D., Lee, S.M., 2014. Effects of dietary carotenoid source and level on growth, skin pigmentation, antioxidant activity and chemical composition of

- juvenile olive flounder *Paralichthys olivaceus*. Aquaculture 431, 65-72.
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.04.019>.
- Ray, A.J., Seaborn, G., Leffler, J.W., Wilde, S.B., Lawson, A., Browdy, C.L., 2010. Characterization of microbial communities in minimal-exchange, intensive aquaculture systems and the effects of suspended solids management. Aquaculture 310, 130-138.
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.10.019>.
- Rice, E.W., Baird, R.B., Eaton, A.D., Clesceri, L.S., 2012. Standard methods for the examination of water and wastewater. 22nd Edition, American Public Health Association, American Water Works, Water Environment Federation, Washington, DC.
- Sales, J., Janssens, G.P.J., 2003. Nutrient requirements of ornamental fish. Aquat. Living Resour. 16, 533-540. <https://doi.org/10.1016/j.aquiliv.2003.06.001>.
- Schrader, K.K., Green, B.W., Perschbacher, P.W., 2011. Development of phytoplankton communities and common off-flavors in a biofloc technology system used for the culture of channel catfish (*Ictalurus punctatus*). Aquacult. Eng. 45, 118-126.
<https://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2011.08.004>.
- Schryver, P., Crab, R., Defoirdt, T., Boon, N., Verstraete, W., 2008. The basics of bio-flocs technology: the added value for aquaculture. Aquaculture 277, 125-137.
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.02.019>.
- Shindo, K., Kikuta, K., Suzuki, A., Katsuta, A., Kasai, H., Yasumoto-Hirose, M., Takaichi, S., 2007. Rare carotenoids, (3R)-saproxanthin and (3R,2'S)-myxol, isolated from novel marine bacteria (*Flavobacteriaceae*) and their antioxidative activities. Appl. Microbiol. Biotechnol. 74, 1350-1357. <https://doi.org/10.1007/s00253-006-0774-y>.
- Sinha, A., Asimi, O.A., 2007. China rose (*Hibiscus rosasinensis*) petals: a potent natural carotenoid source for goldfish (*Carassius auratus* L.). Aquac. Res. 38, 1123-1128.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2007.01767.x>.
- Sornsupharp, B., Lomthaisong, K., Dahms, H.U., Sanoamuang, L.O., 2015. Effects of dried fairy shrimp *Streptocephalus sirindhornae* meal on pigmentation and carotenoid deposition in flowerhorn cichlid; *Amphilophus citrinellus* (Günther, 1864) × *Cichlasoma trimaculatum* (Günther, 1867). Aquac. Res. 46, 173-184.
<https://doi.org/10.1111/are.12172>.
- Villar-Martínez, A.A., Orbe-Rogel, J.C., Vanegas-Espinoza, P.E., Quinterogutiérrez, A.G., Lara-Flores, M., 2013. The effect of marigold (*Tagetes erecta*) as natural carotenoid source for the pigmentation of goldfish (*Carassius auratus* L.). Res. J. Fish. Hydrobiol. 8, 31-37.

- Wang, G., Yu, E., Xie, J., Yu, D., Li, Z., Luo, W., Qiu, L., Zheng, Z., 2015. Effect of C/N ratio on water quality in zero-water exchange tanks and the biofloc supplementation in feed on the growth performance of crucian carp, *Carassius auratus*. *Aquaculture* 443, 98-104. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.03.015>.
- Xu, X., Jin, Z., Wang, H., Chen, X., Wang, C., Yu, S., 2006. Effect of astaxanthin from *Xanthophyllomyces dendrorhous* on the pigmentation of goldfish, *Carassius auratus*. *J. World Aquacult. Soc.* 37, 282-288. <https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.2006.00038.x>.
- Yesilayer, N., Aral, O., Karsli, Z., Öz, M., Karaçuha, A., Yağci, F., 2010. The effects of different carotenoid sources on skin pigmentation of Goldfish (*Carassius auratus*). *Isr. J. Aquacult.* 63, 1-9.
- Yi, X., Xu, W., Zhou, H., Zhang, Y., Luo, Y., Zhang, W., Mai, K., 2014. Effects of dietary astaxanthin and xanthophylls on the growth and skin pigmentation of large yellow croaker *Larimichthys croceus*. *Aquaculture* 433, 377-383. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.06.038>.
- Yuangsoi, B., Jintasataporn, O., Areechon, N., Tabthipwon, P., 2010. The use of natural carotenoids and growth performance, skin pigmentation, and immune response in fancy carp (*Cyprinus carpio*). *J. Appl. Aquaculture* 22, 267-283. <http://doi.org/10.1080/10454438.2010.500602>.
- Zhang, K., Pan, L., Chen, W., Wang, C., 2015. Effect of using sodium bicarbonate to adjust the pH to different levels on water quality, the growth and the immune response of shrimp *Litopenaeus vannamei* reared in zero-water exchange biofloc-based culture tanks. *Aquac. Res.* 48, 1194-1208. <https://doi.org/10.1111/are.12961>.
- Zhao, D., Pan, L., Huang, F., Wang, C., Xu, W., 2016. Effects of different carbon sources on bioactive compound production of biofloc, immune response, antioxidant level, and growth performance of *Litopenaeus vannamei* in zero-water exchange culture tanks. *J. World Aquacult. Soc.* 47, 566-576. <https://doi.org/10.1111/jwas.12292>.

CAPÍTULO 3 – O farelo de soja fermentado pode afetar o desempenho produtivo e a saúde intestinal de kinguios (*Carassius auratus*) produzidos em sistema de bioflocos?

Larissa da Cunha^a, Kayane Pereira Besen^a, Nandara Soares de Oliveira^a, Fernanda Regina Delziovo^a, Rafaela Gomes^a, Júlia Montibeller da Cruz^a, Everton Skoronski^a, Thiago El Hadi Perez Fabregat^{a,*}

***Autor correspondente:** Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC, Avenida Luiz de Camões, 2090, CEP 88520-000, Lages, Santa Catarina, Brasil. thiagofabregat@hotmail.com

^a Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC. Avenida Luiz de Camões 2090, CEP 88520-000, Lages, Santa Catarina, Brasil. laridacunha@gmail.com; kakabesen@hotmail.com; nandara.soares@hotmail.com; fernandadelziovo@gmail.com; rafaelagomes99@hotmail.com; jumontibeller@gmail.com; everton.skoronski@udesc.br; thiagofabregat@hotmail.com*

Resumo

Este estudo avaliou os efeitos de diferentes níveis de inclusão de farelo de soja fermentado (FSFM) nas dietas sobre o desempenho produtivo e a saúde intestinal de kinguios (*Carassius auratus*) produzidos em sistema de bioflocos (BFT). Foram formuladas cinco dietas isoprotéicas (39,5% de proteína bruta) e isoenergéticas (4250 kcal kg⁻¹ de energia bruta) com a inclusão de 0, 7, 14, 21 e 28% de FSFM. Quatrocentos kinguios (0,25 ± 0,02g) foram pesados e distribuídos em 20 aquários de vidro (15 litros). Os peixes foram alimentados duas vezes ao dia, durante 56 dias. A dieta com inclusão de 28% de FSFM reduziu o ganho de peso e a taxa de crescimento específico e piorou a conversão alimentar dos kinguios. As dietas com inclusão de 21% e 28% de FSFM aumentaram a atividade da amilase no intestino dos peixes. A dieta com inclusão de 21% de FSFM aumentou a altura e a altura total das vilosidades intestinais dos kinguios. Em conclusão, até 21% de FSFM pode ser incluído nas dietas de kinguios produzidos em sistema BFT. A suplementação da dieta com 21% de FSFM melhorou a saúde intestinal de kinguios.

Palavras-chave: Enzimas digestivas, fermentação, microbiota intestinal, peixe ornamental.

1. Introdução

O sistema de tecnologia bioflocos (BFT) é um ambiente de criação intensivo com baixa renovação de água, empregado com sucesso na produção de peixes e camarões (Crab et al.,

2012). Nesse sistema, a aplicação de fontes ricas em carbono orgânico estimula a proliferação de microrganismos heterotróficos (Avnimelech, 2007). As bactérias heterotróficas possuem a capacidade de transformar os compostos nitrogenados presentes na água do cultivo em biomassa microbiana (Avnimelech, 1999), que pode servir como fonte suplementar de alimento para as espécies cultivadas (Azim & Little, 2008; Najdegerami; Bakhshi; Lakani, 2016; Li et al., 2018).

A intensificação dos sistemas de produção aquícolas pode levar a condições estressantes para os animais. O estresse põe em risco a saúde, podendo causar surtos de doenças e mortalidades (Mohapatra et al., 2013). Assim como em todo sistema intensivo, no sistema BFT existem condições que podem causar estresse aos organismos cultivados, como picos de compostos nitrogenados (Serra et al., 2015; Fischer et al., 2020), quedas de oxigênio dissolvido (Fischer et al., 2020) e excesso de sólidos suspensos (Ray et al., 2010; Long et al., 2015; Romano et al., 2020). Neste cenário, a indústria de alimentos aquícolas demanda por aditivos alimentares e/ou alimentos funcionais que possam mitigar os efeitos nocivos do estresse (Dawood et al., 2019). Uma alternativa que ainda não foi avaliada no sistema BFT é a inclusão de alimentos fermentados nas dietas. Essa é uma alternativa recente que tem apresentado resultados promissores relacionados à saúde dos peixes (Azarm & Lee, 2014; Sotoudeh et al., 2016; Novriadi et al., 2018; Dawood et al., 2020).

A fermentação microbiana dos alimentos produz compostos bioativos que oferecem diversos benefícios à saúde (Hayes e García-Vaquero, 2016). Durante o processo de fermentação, microrganismos degradam macromoléculas de proteínas em compostos solúveis de baixo peso molecular, que são mais facilmente digeridos e absorvidos (Azarm & Lee, 2014). Esses microrganismos quebram as cadeias proteicas, liberando pequenas cadeias de aminoácidos e peptídeos bioativos, que podem trazer benefícios à saúde (Sanjukta & Rai, 2016). Em suma, durante o processo fermentativo, ocorre a produção de metabólitos secundários com ação prebiótica e o incremento da população de microrganismos benéficos com função probiótica (Zhang et al., 2014; Mukherjee, Chakraborty, Dutta, 2016; Dawood & Koshio, 2019; Nwachukwu et al., 2019). O farelo de soja é um excelente substrato para a produção de alimentos funcionais pelo seu baixo custo e alto valor nutricional (Olmos, Bru, Garro, 2015).

O farelo de soja fermentado (FSFM) já foi avaliado como substituto da farinha de peixe e como ingrediente funcional em dietas para peixes (Wang et al., 2016; Rahimnejad et al., 2019; Li et al., 2020). Estudos mostram que a substituição parcial da farinha de peixe pelo FSFM não prejudica o crescimento dos peixes (Hassaan et al., 2015; Lee, Azarm & Chang et al., 2016; Liang et al., 2017; Jiang et al., 2018; Rahimnejad et al., 2019; Li et al., 2020). O FSFM apresenta

melhor digestibilidade e pode apresentar maior teor de proteína e maiores níveis de aminoácidos em comparação ao farelo de soja cru (Olmos, Bru & Garro, 2015; Shiu, Wong, Guei, Shin & Liu, 2015a; Li et al., 2019), o que pode resultar no melhor crescimento dos animais (Hassaan et al., 2015; Jiang et al., 2018). Além disso, já foram encontrados inúmeros efeitos benéficos da inclusão de FSFM em dietas sobre a saúde dos peixes, como: aumento da capacidade antioxidante (Azarm & Lee, 2014; Hassaan et al., 2015; Lee, Azarm & Chang, 2016; Wang et al., 2016; Jiang et al., 2018), modulação da microbiota, diminuição de inflamações e aumento das vilosidades intestinais (Refstie et al., 2005; Yamamoto et al., 2010; Novriadi et al., 2018; Rahimnejad et al., 2019; Li et al., 2020), assim como aumento da atividade das enzimas digestivas (Shiu et al., 2015b, Sotoudeh et al., 2016).

O kinguio (*Carassius auratus*) é um dos peixes ornamentais mais populares e produzidos do mundo. Trata-se de uma espécie onívora (Sales & Janssens, 2003) e sua alimentação é composta principalmente por materiais vegetais, detritos, organismos bentônicos, larvas de mosquitos, microalgas e zooplâncton (Sarbah, 1951; Penttinen & Holopainen, 1992). A produção do kinguio em sistema BFT proporcionou melhor controle da qualidade da água e maior crescimento dos animais quando comparado ao sistema de águas claras (Faizullah et al., 2015; Wang et al., 2015; Castro et al., 2016). Recentemente foi demonstrado que o sistema BFT pode melhorar a coloração da pele, aumentar a atividade das enzimas digestivas e dos sistemas imunológico e antioxidante dos kinguios (Cunha et al., 2020; Yu et al., 2020). O uso de alimentos fermentados para o kinguio em sistema BFT ainda precisa ser avaliado. Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos de diferentes níveis de inclusão de FSFM nas dietas sobre o desempenho produtivo e a saúde intestinal de kinguios (*Carassius auratus*) produzidos em sistema BFT.

2 Materiais e Métodos

O experimento foi realizado no Laboratório de Piscicultura da Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC), Lages, SC, Brasil. O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UDESC (protocolo número 8490131020). O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, com cinco tratamentos e quatro repetições. Os tratamentos corresponderam aos níveis de inclusão de FSFM nas dietas (0, 7, 14, 21 e 28%).

2.1 Farelo de soja fermentado

O farelo de soja foi fermentado utilizando a bactéria ácido láctica *Lactobacillus acidophilus* através da metodologia adaptada de Azarm & Lee (2014). O farelo de soja foi

adquirido de fornecedor local e a bactéria de estabelecimento comercial. Amostras autoclavadas (100 °C por 20 min) de farelo de soja foram umedecidas (50% de umidade) com água deionizada e inoculadas com a bactéria. As amostras foram misturadas e dispostas em bandejas, mantendo altura máxima de dois centímetros de amostra por bandeja. A fermentação do farelo de soja foi conduzida em estufa a 36 °C, durante 48h. A cada 12 horas a umidade foi corrigida e as amostras foram misturadas novamente. Após o tempo de fermentação, o fermentado foi seco em estufa (36 °C) até atingir peso constante e posteriormente mantido em freezer (-20 °C). Amostras de FSFM foram coletadas para analisar a composição nutricional através dos métodos descritos em AOAC (2000) e para quantificar as bactérias ácido lácticas totais (em meio MRS) (Tabela 1).

Tabela 1 - Composição do farelo de soja fermentado (FSFM).

	Farelo de soja cru	FSFM
Composição centesimal (%)		
Proteína bruta	46,50	41,77
Extrato etéreo	5,23	4,19
Matéria seca	88,35	90,64
Matéria mineral	7,42	7,09
Aminoácidos essenciais (%)		
Arginina	3,43	3,47
Histidina	1,23	1,31
Isoleucina	2,18	2,00
Leucina	3,59	3,84
Lisina	2,87	3,14
Metionina	0,62	0,60
Fenilalanina	2,39	2,73
Treonina	1,82	1,98
Valina	2,27	2,38
Aminoácidos não-essenciais (%)		
Cistina	0,68	0,72
Alanina	2,08	2,33
Prolina	2,37	2,63
Ácido Aspártico	3,30	5,86
Ácido glutâmico	4,55	9,12
Serina	2,52	2,70
Glicina	2,02	2,15
Tirosina	1,70	1,74
Soma dos aminoácidos	39,62	48,70
BAL (log UFC g ⁻¹)	0	5,81
pH	6,70	6,50
AE amilase (UA mg ⁻¹)	0	0,147
AE protease (UA mg ⁻¹)	0,008	0,011
PS (mg l ⁻¹)	24,38	33,49

BAL = bactérias ácido lácticas totais, AE = Atividade da enzima, PS = proteína solúvel.

2.2 Dietas experimentais

Cinco dietas isoprotéicas (39,5% de proteína bruta) e isoenergéticas (cerca de 4250 kcal de energia bruta kg^{-1}) foram formuladas (Tabela 2) de acordo com as exigências nutricionais do kinguio (Bandyopadhyay, Swain & Mishra, 2005). O FSFM foi adicionado nas dietas em substituição à farinha de peixe, nos seguintes níveis de inclusão: 0, 7, 14, 21 e 28%. Além do farelo de soja fermentado as dietas foram formuladas utilizando farinha de peixe e farelo de soja como fontes proteicas e o óleo de soja, farelo de milho e farinha de trigo como fontes energéticas. A farinha de peixe marinha foi adquirida da Agroforte® (Laguna, Santa Catarina, Brasil) e os outros ingredientes foram adquiridos de fornecedores locais. As dietas foram suplementadas com os aminoácidos arginina, lisina (Infinity Pharma®, Campinas, São Paulo, Brasil) e metionina (Florien Fitoativos, Piracicaba, São Paulo, Brasil), quando necessário, para atender as exigências de aminoácidos do kinguio (Gatlin, 1987) (Tabela 3).

Todos os ingredientes foram triturados em um liquidificador e peneirados para obter partículas menores que 0,71 mm. Os ingredientes foram misturados e peletizados com adição de água (30%) e secos a 36 °C em estufa por 48 h. Após esse período, as dietas foram trituradas e peneiradas para obter o tamanho de partícula desejado para alimentação, cerca de 1,5 mm, e foram armazenadas em freezer (-20 °C) até o momento da utilização. A composição bromatológica das dietas foi analisada usando os métodos descritos em AOAC (2000).

Tabela 2 - Formulação e composição centesimal das dietas experimentais.

Ingredientes (%)	Dietas experimentais				
	0%	7%	14%	21%	28%
FSFM	0	7	14	21	28
Farinha de peixe	65	58	51,5	45	39
Farinha de milho	7,7	7,7	8,1	8,1	8,4
Farinha de trigo	12	12	12	12	12
Farelo de soja	7	7	7	7	7
Óleo de soja	6,5	6,5	5,5	5	3,5
Premix ^a	1	1	1	1	1
Arginina	0,8	0,7	0,6	0,5	0,5
Lisina	0	0	0	0,1	0,2
Metionina	0	0,1	0,3	0,3	0,4
Total	100	100	100	100	100
Composição centesimal					
Proteína bruta (%)	40,76	39,97	39,59	39,08	38,97
Energia bruta (kcal kg^{-1})	4241,33	4280,60	4256,70	4266,15	4208,43
Extrato etéreo (%)	12,07	11,84	10,67	9,98	8,35

^a Folic acid – 2400 mg, nicotinic acid – 48 g, pantothenic acid – 24 g, biotin – 96 mg, vit. A – 2400,000 IU, vit. D3–400,000 IU, vit. E – 24,000 IU, vit. B1–9600 mg, vit. B2–9600 mg, vit. B6–9600 mg, vit. B12–9600 mg, vit. K3–4800 mg, vit. C – 96 g, iron – 100 g, manganese – 40 g, zinc – 6000 mg, cobalt – 20 mg, iodine – 200 mg, selenium – 200 mg, antioxidant – 19.6 g.

Tabela 3 - Composição de aminoácidos das dietas experimentais.

Aminoácidos (%)	Dietas experimentais					Exigência*
	0%	7%	14%	21%	28%	
Arginina	2,88	2,83	2,80	2,77	2,85	2,72
Histidina	1,17	1,15	1,14	1,13	1,12	1,04
Isoleucina	2,62	2,50	2,41	2,31	2,23	1,59
Leucina	3,74	3,65	3,60	3,54	3,50	2,99
Lisina	3,82	3,66	3,52	3,48	3,47	3,43
Metionina	1,25	1,26	1,39	1,31	1,34	1,23
Fenilalanina	2,02	2,02	2,04	2,06	2,09	1,64
Treonina	1,96	1,91	1,87	1,84	1,84	1,84
Valina	2,75	2,65	2,57	2,48	2,42	1,79

*Requisitos de aminoácidos para o kinguio (Gatlin, 1987).

2.3 Animais e instalações

Para realização do experimento foram utilizados 400 kinguios ($0,25 \pm 0,02$ g), provenientes da reprodução de matrizes do laboratório. Os animais foram aclimatados às condições experimentais durante 14 dias. Durante esse período os peixes foram mantidos em aquários (30 l de volume útil; 40 peixes por aquário), conectados a um sistema de recirculação de água equipado com um filtro mecânico e biológico. Os peixes foram alimentados duas vezes ao dia (10h e 16h), até a saciedade aparente, com a dieta controle formulada para o experimento.

No final do período de aclimação, os peixes foram pesados individualmente e distribuídos em 20 aquários de vidro (15 l de volume útil), na densidade de 20 peixes por aquário. Os peixes foram alimentados duas vezes ao dia (10h e 16h). Análises biométricas foram realizadas a cada duas semanas para ajustar a quantidade de alimento fornecido. A quantidade de ração fornecida foi de 10% do peso vivo por dia nas duas primeiras semanas, 8% do peso vivo por dia nas duas semanas seguintes e 6% do peso vivo por dia nas últimas semanas (Wang et al., 2015).

No início do experimento, 50% do volume útil dos aquários foi preenchido com a água de um cultivo anterior de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) em um sistema BFT, os outros 50% do volume foram preenchidos com água clara. O melaço (38% de carbono) foi adicionado a cada três dias (14h) em cada aquário como fonte adicional de carbono para manter a relação C/N de 20:1 (Wang et al., 2015), conforme o cálculo proposto por Schryver et al. (2008). Essa metodologia baseia-se no pressuposto de que os peixes assimilam aproximadamente 25% do nitrogênio dos alimentos e que os 75% restantes são convertidos em nitrogênio amoniacal total (NAT) na água (Schryver et al., 2008). Nenhuma renovação de água foi realizada, apenas a reposição das perdas por evaporação. A temperatura da água foi mantida constante usando

aquecedores com termostatos e a água foi oxigenada usando pedras porosas conectadas em mangueiras de silicone (4mm), de onde foi injetado o ar para manutenção do sistema através de um compressor de ar. As mangueiras foram coladas no fundo dos aquários, assim o ar foi injetado de baixo para cima, possibilitando uma maior movimentação da água. O fotoperíodo foi de 12 h de luz.

2.4 Qualidade da água

A temperatura, o pH (Hanna HI98130) e o oxigênio dissolvido (Hanna HI9147-10) foram monitorados diariamente. O nitrogênio amoniacal total (NAT), o nitrito, o nitrato, os sólidos suspensos totais (TSS) (Rice et al., 2012) e a turbidez (Hanna HI93703C) foram monitorados semanalmente. A salinidade foi mantida em torno de 4 g l⁻¹ (Luz et al., 2008) em todos os aquários durante todo o período experimental. Os parâmetros de qualidade da água permaneceram dentro dos limites recomendados para a piscicultura (Boyd, 1998; Avnimelech 2012). Os parâmetros de qualidade da água da última semana de experimento estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 - Parâmetros de qualidade da água (média ± desvio padrão).

	0%	7%	14%	21%	28%
Temp.	25,53±0,65	25,30±0,40	25,43±0,76	25,67±0,64	25,47±0,87
OD	7,16±,26	7,12±0,30	7,38±0,14	7,14±0,19	7,24±0,30
pH	8,34±0,03	8,29±0,06	8,40±0,09	8,36±0,04	8,37±0,06
NAT	0,13±0,19	0,08±0,11	0,19±0,20	0,31±0,32	0,13±0,11
NO ₂ ⁻	0,16±0,13	0,24±0,04	0,22±0,00	0,16±0,14	0,15±0,13
NO ₃ ⁻	474,39±55,82	471,46±62,26	460,61±100,71	437,95±83,24	489,50±77,44
Turb.	475,33±61,58	483,22±15,88	518, ±45,72	533,06±162,47	498,28±138,86
SST	1054,67±265,60	1070,00±12,49	1079,33±108,49	1010,00±200,33	1108,67±287,24

Temp. (°C)= temperatura, OD (mg l⁻¹) = oxigênio dissolvido, NAT (mg l⁻¹) = nitrogênio amoniacal total, NO₂⁻ (mg l⁻¹) = Nitrito, NO₃⁻ (mg l⁻¹) = Nitrato, Turb. (NTU) = turbidez, SST (mg l⁻¹) = sólidos suspensos totais.

2.5 Desempenho produtivo e coleta de amostras

No início do experimento e aos 56 dias, todos os peixes foram mantidos em jejum por 24 h, anestesiados com eugenol (50 mg l⁻¹) (Bittencourt et al., 2012) e pesados individualmente. O desempenho produtivo foi analisado com base nos seguintes parâmetros: ganho de peso (GP, g = peso médio final – peso médio inicial), taxa de crescimento específico (TCE, % dia⁻¹ = [(ln peso final – ln peso inicial) / período experimental] * 100) e conversão alimentar aparente (CA = consumo de ração / ganho de peso total). A mortalidade foi registrada para avaliar a taxa de sobrevivência (S, % = [total de animais no final / total de animais no início] * 100).

Aos 56 dias, após a pesagem, alguns animais foram anestesiados e depois submetidos à eutanásia por secção medular para coleta dos materiais biológicos para as análises descritas abaixo.

2.6 Avaliações microbiológicas

O trato digestivo de um peixe de cada aquário ($n = 4$ peixes por tratamento) foi amostrado para avaliar a microbiota intestinal. Os intestinos foram removidos, pesados, triturados, homogeneizados e diluídos serialmente (1:10) em tubos de ensaio contendo solução salina estéril (0,65%). Em seguida, os homogenatos intestinais foram semeados em placas de Petri com ágar MRS (Man Rogosa Sharpe) e ágar TSA (ágar triptona de soja) para quantificar bactérias ácido lácticas e heterotróficas totais, respectivamente. Os homogenatos intestinais semeados nas placas de Petri foram incubados em estufa a 35 °C. As unidades formadoras de colônias (log UFC) foram contadas após 24 h de incubação no meio TSA e após 48 h no meio MRS.

2.7 Morfometria intestinal

A análise histológica do intestino foi realizada em dois peixes de cada aquário ($n = 8$ peixes por tratamento). Porções de aproximadamente 3 cm de comprimento foram coletadas do intestino médio e cada amostra foi fixada em uma solução de formalina tamponada a 10% por 24 h, desidratada em uma série ascendente de álcoois, diafanizada em xileno, embebida em parafina e cortada em seções de 5 μm para preparação das lâminas. Esta amostra foi então corada de acordo com o método de coloração PAS (do inglês Periodic acid-reactive Schiff). As lâminas foram observadas sob microscópio óptico (OptiCam, 10 $\times$) e fotografadas usando uma câmera digital (Moticam 2300, 3 MP, resolução 3264 $\times$ 2448). Os valores de altura total, altura e largura das vilosidades foram medidos usando o software analisador de imagens ToupTek ToupView - x64, versões 2270/07/03.

2.8 Análises enzimáticas

As atividades das enzimas digestivas amilase e protease alcalina total foram realizadas no intestino de dois peixes de cada aquário ($n = 8$ peixes por tratamento). Após a eutanásia, os peixes foram imediatamente colocados em gelo e dissecados para separar o intestino. Os intestinos foram lavados com água destilada e imediatamente congelados a -80 °C até o momento das análises. No momento das análises, os intestinos foram cortados em pequenos pedaços e adicionados em tubos eppendorfs de 2 ml onde foram diluídos em água destilada

gelada (1:10, p/v). Os eppendorfs foram submetidos a banhos ultrassônicos durante 5 min (5 vezes de 1 min com intervalos de 1 min em banho de gelo) para rompimento das células intestinais e liberação das enzimas digestivas. Posteriormente, os homogenatos intestinais foram centrifugados a 7000 rpm por 10 min e os sobrenadantes foram separados e utilizados para determinar a atividade das enzimas digestivas.

A atividade da amilase foi medida a $\lambda = 580$ nm usando amido solúvel dissolvido (0,3%) em solução tampão de Na_2HPO_4 (pH 7,4) como substrato (Métais & Bieth, 1968). Uma unidade de atividade da amilase (U) foi definida como sendo a quantidade de enzima que catalisa a hidrólise de 1 mg de amido em 30 min a 37 °C por ml de extrato enzimático. A atividade da protease alcalina total foi determinada após 30 min de incubação a 25 °C, utilizando caseína a 0,5% (p/v) como substrato em Tris-HCl 50 mM (pH 8.0). A reação foi parada com ácido tricloroacético (20% p/v), o extrato foi centrifugado (5000 rpm, 20 min) e a absorbância do sobrenadante foi medida a $\lambda = 280$ nm à temperatura ambiente. Uma unidade de atividade da protease (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para catalisar a hidrólise de 1 μmol de caseína hidrolisada por min por ml de extrato enzimático (García-Carreño & Haard, 1993).

2.9 Análises estatísticas

Todos os dados foram submetidos a testes para verificar a normalidade dos erros (Shapiro-Wilk) e a homocedasticidade das variâncias (Levene). Os valores percentuais foram submetidos à transformação arco seno. Os resultados foram analisados pela análise de variância paramétrica (ANOVA) e por teste correspondente para comparação das médias ao nível de 5% de significância. Quando houve diferença significativa na ANOVA os parâmetros com distribuição normal e os níveis de FSFM na dieta foram analisados por regressão polinomial. Foram consideradas equações com confiabilidade maior que 90% ($R^2 > 0,90$).

3 Resultados

3.1 Desempenho zootécnico

A dieta com inclusão de 28% de FSFM reduziu ($P < 0,05$) o ganho de peso e a taxa de crescimento específico e aumentou ($P < 0,05$) a conversão alimentar dos kinguios quando comparado com a dieta controle (Tabela 5). A sobrevivência dos peixes foi acima de 95% e não diferiu ($P > 0,05$) entre os tratamentos.

Tabela 5 - Desempenho zootécnico de kinguios (média $\pm$ desvio padrão; n= 4) alimentados com dietas contendo diferentes níveis de inclusão de FSFM, em sistema BFT, durante 56 dias.

	0%	7%	14%	21%	28%	Valor de P
GP	1,58 $\pm$ 0,13a	1,51 $\pm$ 0,28ab	1,43 $\pm$ 0,10ab	1,35 $\pm$ 0,13ab	1,16 $\pm$ 0,13b	0,0272
TCE	3,65 $\pm$ 0,13a	3,59 $\pm$ 0,19a	3,52 $\pm$ 0,07ab	3,43 $\pm$ 0,18ab	3,21 $\pm$ 0,13b	0,0075
CAA	1,82 $\pm$ 0,09b	1,94 $\pm$ 0,11b	2,00 $\pm$ 0,07ab	2,00 $\pm$ 0,11ab	2,17 $\pm$ 0,08a	0,0019
S	98,75 $\pm$ 2,50	98,75 $\pm$ 2,50	97,50 $\pm$ 2,89	100,00 $\pm$ 0,00	96,25 $\pm$ 4,79	0,4735

Letras diferentes nas linhas representam diferença estatística ($P < 0,05$) pelo teste de Tukey. GP (g): ganho de peso ($y = -3,4985x^2 - 0,449x + 1,5717$; $R^2 = 0,9886$), TCE (% dia⁻¹): taxa de crescimento específico ($y = -4,9563x^2 - 0,098x + 3,6394$; $R^2 = 0,9866$), CAA: conversão alimentar aparente ($y = 0,5831x^2 + 0,9224x + 1,8397$; $R^2 = 0,9054$) e S (%): sobrevivência.

3.2 Microbiota intestinal

Na análise microbiológica do intestino (Tabela 6), a quantidade de bactérias ácido lácticas demonstrou uma tendência ($P = 0,1163$) de superioridade nos tratamentos com inclusão de FSFM. A inclusão de FSFM nas dietas não alterou ($P > 0,05$) a concentração de bactérias heterotróficas totais do intestino dos peixes.

Tabela 6 - Concentração de bactérias por grama de intestino (log UFC g⁻¹) (média $\pm$ desvio padrão; n= 4) de kinguios alimentados com dietas contendo diferentes níveis de inclusão de FSFM, em sistema BFT, durante 56 dias.

	0%	7%	14%	21%	28%	Valor de P
MRS*	1,50 $\pm$ 0,33	3,22 $\pm$ 1,03	2,78 $\pm$ 0,80	2,64 $\pm$ 0,76	2,40 $\pm$ 0,35	0,1163
TSA*	6,56 $\pm$ 0,34	6,83 $\pm$ 1,28	5,82 $\pm$ 0,52	5,93 $\pm$ 0,40	6,34 $\pm$ 0,51	0,4082

Médias não diferem pelo teste ANOVA ($P > 0,05$).

*Os intestinos foram cultivados em MRS para bactérias ácido lácticas totais e em TSA para bactérias heterotróficas totais.

3.3 Morfometria intestinal

A dieta com inclusão de 21% de FSFM aumentou ($P < 0,05$) a altura e a altura total das vilosidades intestinais dos kinguios (Tabela 7). A inclusão de FSFM nas dietas não alterou ($P > 0,05$) a largura das vilosidades intestinais dos peixes.

Tabela 7 - Morfometria do intestino médio (média $\pm$ desvio padrão; n= 8) de kinguios alimentados com dietas contendo diferentes níveis de inclusão de FSFM, em sistema BFT, durante 56 dias.

	0%	7%	14%	21%	28%	Valor de P
ALT	232,26 $\pm$ 25,97b	257,16 $\pm$ 41,28ab	256,54 $\pm$ 41,82ab	301,47 $\pm$ 64,45a	226,54 $\pm$ 33,81b	0,0473
AL	193,78 $\pm$ 25,13b	221,70 $\pm$ 41,23ab	215,26 $\pm$ 38,38b	263,36 $\pm$ 56,56a	195,45 $\pm$ 33,52b	0,0314
LAR	89,05 $\pm$ 8,41	91,17 $\pm$ 13,21	96,68 $\pm$ 13,90	89,61 $\pm$ 12,60	91,92 $\pm$ 10,46	0,7099

Letras diferentes nas linhas representam diferença estatística ($P < 0,05$) pelo teste de Duncan. ALT: Altura total, AL: Altura, LAR: Largura.

3.4 Enzimas digestivas

As dietas com inclusão de 21 e 28% de FSFM aumentaram ($P<0,05$) a atividade da amilase no intestino dos kinguios (Tabela 8). A inclusão de FSFM nas dietas não alterou ($P>0,05$) a atividade da protease no intestino dos peixes.

Tabela 8 - Atividade de enzimas digestivas (média $\pm$ desvio padrão; $n= 8$) no intestino de kinguios alimentados com dietas contendo diferentes níveis de inclusão de FSFM, em sistema BFT, durante 56 dias.

	0%	7%	14%	21%	28%	Valor de P
Amilase*	2,12 $\pm$ 0,65c	2,17 $\pm$ 0,40bc	2,13 $\pm$ 0,28c	2,65 $\pm$ 0,43ab	2,65 $\pm$ 0,43a	0,0358
PAT*	867,82 $\pm$ 294,05	791,59 $\pm$ 484,67	805,24 $\pm$ 275,17	758,13 $\pm$ 251,12	510,41 $\pm$ 177,78	0,2101

Letras diferentes nas linhas representam diferença estatística ($P<0,05$) pelo teste de Duncan. PAT: protease alcalina total.

4 Discussão

A inclusão de até 21% de FSFM nas dietas não afetou o desempenho e a conversão alimentar dos kinguios. Esse é o primeiro estudo com a avaliação do FSFM em dietas para o kingiuo. Em estudo anterior, a inclusão de 15% de farelo de soja cru na dieta piorou o desempenho e a conversão alimentar da carpa gibel (*Carassius auratus gibelio*) (Liu et al., 2016). Isso mostra que embora não tenha melhorado o desempenho, a fermentação possibilitou maiores níveis de inclusão do farelo de soja na dieta do kingiuo. Resultados semelhantes foram obtidos para outras espécies de peixe como a garoupa (*Epinephelus coioides*) (Shiu et al., 2015b) e o pregado (*Scophthalmus maximus*) (Wang et al., 2016; Li et al., 2020). Esse aumento dos níveis de inclusão do FSFM é possível porque a fermentação microbiana pode melhorar a qualidade nutricional do farelo de soja, remover fatores antinutricionais (FANs) e alérgenos, melhorar a digestibilidade e aumentar os níveis de aminoácidos e peptídeos de baixo peso molecular (Hassaan et al., 2015; Wang et al., 2016; Li et al., 2019). No presente estudo, os níveis de FANs não foram medidos, mas foi constatado aumento da proteína solúvel no FSFM em comparação ao farelo de soja cru, o que pode indicar a maior presença de peptídeos.

A dieta com o maior nível de inclusão de FSFM (28%) reduziu o desempenho e aumentou a conversão alimentar dos kinguios. Outros autores também observaram que dietas com níveis de inclusão de FSFM entre 21-39% resultaram em queda de desempenho e aumento da conversão alimentar de outras espécies de peixes como a garoupa (*E. coioides*) (Shiu et al., 2015b), o robalo japonês (*Lateolabrax japonicus*) (Rahimnejad et al., 2019), a truta-arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) (Choi et al., 2020) e o achigã (*Micropterus salmoides*) (He et al., 2020). A análise de composição mostrou que o aumento da inclusão do FSFM resultou em redução

dos níveis de proteína das dietas. Entretanto, não é possível atribuir a piora no desempenho a uma deficiência de aminoácidos, uma vez que foi feita a suplementação das dietas com aminoácidos cristalinos para suprir as exigências. O excesso de proteína solúvel da dieta, decorrente da maior inclusão de FSFM, pode ser a causa da diminuição do desempenho dos kinguios. A proteína solúvel é a fração correspondente aos peptídeos solúveis e aminoácidos. Inclusões elevadas desses compostos podem levar à saturação dos mecanismos de transporte do intestino (Cahu et al., 1999; Tonheim et al., 2005; Wei et al., 2020). Isso pode resultar em uma absorção desequilibrada de aminoácidos e consequente redução do aproveitamento de proteína da dieta (Kolkovski & Tandler, 2000; Aragão et al., 2004).

Os peixes alimentados com as dietas contendo FSFM apresentaram uma tendência de aumento na quantidade de *Lactobacillus* sp. no intestino em comparação ao tratamento controle. Estudos recentes demonstram que a suplementação das dietas com o FSFM pode melhorar a composição da microbiota intestinal de peixes (Catalán et al., 2018; He et al., 2020; Li et al., 2020). Embora a maioria das bactérias da fermentação sejam mortas durante o processo de secagem, os resíduos de bactérias mortas e os metabólitos produzidos pelas bactérias podem contribuir para a melhoria da microbiota intestinal dos peixes (Dawood & Koshio, 2019; He et al., 2020). A composição química dos *Lactobacillus* sp. mortos inclui diferentes polissacarídeos que podem ter efeitos prebióticos no intestino do hospedeiro. Os microrganismos benéficos podem utilizar esses oligossacarídeos e aumentar o número de bactérias benéficas no intestino do hospedeiro (Dawood & Koshio, 2019). Os resultados desse estudo podem ser considerados preliminares com a necessidade de validação adicional. O pequeno número de amostras (n = 4) pode ter influenciado a ausência de diferença significativa entre os tratamentos, exigindo mais estudos para uma conclusão mais sólida.

A dieta com inclusão de 21% de FSFM aumentou a altura das vilosidades intestinais dos kinguios. Esse é o primeiro estudo que observa o aumento na altura das vilosidades de peixes alimentados com o FSFM. O aumento da altura das vilosidades resulta em maior superfície de absorção e pode indicar melhora na integridade do epitélio intestinal dos peixes. Estudos anteriores comprovaram que a fermentação do farelo de soja protege os peixes de possíveis danos morfológicos no intestino que geralmente são induzidos por compostos antinutricionais e alérgenos presentes no farelo de soja cru (Wang et al., 2016; Choi et al., 2020; He et al., 2020). No nosso estudo, o processo de fermentação do farelo de soja não somente viabilizou a inclusão de níveis mais altos do FSFM nas dietas sem causar danos a morfologia intestinal dos peixes como também resultou no aumento da altura das vilosidades. Esse

363 resultado pode ser decorrente da possível presença de metabólitos com função prebiótica no
364 FSFM.

365 Os peixes alimentados com as dietas contendo 21 e 28% de FSFM apresentaram maior
366 atividade da amilase no intestino quando comparada à dieta controle. Na literatura já foi
367 apontado que a atividade das enzimas digestivas em peixes pode ser influenciada por vários
368 fatores, como hábitos e preferências alimentares, composição da dieta e presença de fatores
369 antinutricionais (Sarbah, 1951; Penttinen & Holopainen, 1992; Hidalgo; Urea & Sanz, 1999;
370 Li et al., 2019b). O farelo de soja cru contém fatores antinutricionais e alérgenos que podem
371 diminuir a atividade das enzimas digestivas em peixes (Shiu et al., 2015b; Liu et al., 2017;
372 Zhang et al., 2018; Li et al., 2019). A fermentação do farelo de soja pode diminuir esses
373 compostos e assim amenizar essas respostas negativas (Shiu et al., 2015b; Sotoudeh et al.,
374 2016). A fermentação parece ter sido capaz de inibir prejuízos e ainda proporcionar benefícios
375 sobre a saúde intestinal do kinguio, como foi demonstrado também nos resultados
376 microbiológicos e histológicos. Além disso, foi evidenciado aumento das atividades
377 enzimáticas no FSFM, o que também pode ter contribuído para essa resposta.

379 5 Conclusão

380 A inclusão de 21% de FSFM na dieta melhora a atividade enzimática e a morfometria
381 intestinal de kinguios cultivados em sistema BFT.

383 Agradecimentos

384 O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de
385 Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

387 Referências

- 388 Aragão, C., Conceição, L.E.C., Fyhn, H.J. & Dinis, M.T. (2004). Estimated amino acid
389 requirements during early ontogeny in fish with different life styles: gilthead seabream
390 (*Sparus aurata*) and Senegalese sole (*Solea senegalensis*). Aquaculture, 242, 589–605.
391 <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2004.09.015>
- 392 Association of Official Analytical Chemists - AOAC. (2000). Official Methods of Analysis,
393 17th ed. Gaithersburg, MD, USA.
- 394 Avnimelech, Y. (1999). Carbon/nitrogen ratio as a control element in aquaculture systems.
395 Aquaculture, 176, 227-235. [https://doi.org/10.1016/s0044-8486\(99\)00085-x](https://doi.org/10.1016/s0044-8486(99)00085-x)

- Avnimelech, Y. (2007). Feeding with microbial flocs by tilapia in minimal discharge bio-flocs technology ponds. *Aquaculture*, 264, 140-147. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.11.025>
- Avnimelech, Y. (2012). *Biofloc Technology – A Practical Guide Book*, 2nd edn. The World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA.
- Azarm, H. M., & Lee, S. (2014). Effects of partial substitution of dietary fish meal by fermented soybean meal on growth performance, amino acid and biochemical parameters of juvenile black sea bream *Acanthopagrus schlegeli*. *Aquaculture Research*, 45, 994-1003. <https://doi.org/10.1111/are.12040>
- Azim, M.E., & Little, D.C. (2008). The biofloc technology (BFT) in indoor tanks: Water quality, biofloc composition, and growth and welfare of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture*, 283, 29–35. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.06.036>
- Bandyopadhyay, P., Swain, S., & Mishra, S. (2005). Growth and dietary utilisation in goldfish (*Carassius auratus* Linn.) fed diets formulated with various local agro-produces. *Bioresource Technology*, 96, 731-740. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2004.06.018>
- Bittencourt, F., Souza, B.E., Boscolo, W.R., Rorato, R.R., Feiden, A., & Neu, D.H. (2012). Benzocaine and eugenol as anesthetics for golden fish (*Carassius auratus*). *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 64, 1597-1602. <https://doi.org/10.1590/S0102-09352012000600028>
- Boyd, C.E. (1998). Water quality for pond aquaculture. *Ala. Agr. Exp. Sta. Auburn Univer.* Ala. 43, 2–17 39 pp.
- Castro, M.G., Castro, M.J., De Lara, A.R., Monroy, D.M.C., Ocampo, C.J.A., & Davila, F.S. (2016). Length, weight and condition factor comparison of *Carassius auratus* (Linnaeus, 1758) juveniles cultured in biofloc system. *International Journal of Fisheries and Aquatic Studies*, 4, 345-350.
- Cahu, C. L., Infante, J. Z., Quazuguel, P., & Le Gall, M. M. (1999). Protein hydrolysate vs. fish meal in compound diets for 10-day old sea bass *Dicentrarchus labrax* larvae. *Aquaculture*, 171, 109-119. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(98\)00428-1](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(98)00428-1)
- Catalán, N., Villasante, A., Wacyk, J., Ramírez, C. & Romero, J. (2018). Fermented Soybean Meal Increases Lactic Acid Bacteria in Gut Microbiota of Atlantic Salmon (*Salmo salar*). *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 10, 566–576. <https://doi.org/10.1007/s12602-017-9366-7>

- Choi, D. G., He, M., Fang, H., Wang, X. L., Li, X. Q., & Leng, X. J. (2020). Replacement of fish meal with two fermented soybean meals in diets for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture Nutrition*, 26, 37-46. <https://doi.org/10.1111/anu.12965>
- Crab, R., Defoirdt, T., Bossier, P., & Verstraete, W. (2012). Biofloc technology in aquaculture: beneficial effects and future challenges. *Aquaculture*, 356-357, 351-356. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.04.046>
- Cunha, L., Besen, K. P., Ha, N., Uczay, J., Skoronski, E., & Fabregat, T. E. H. P. (2020). Biofloc technology (BFT) improves skin pigmentation of goldfish (*Carassius auratus*). *Aquaculture*, 522, 735132. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735132>
- Dawood, M. A. O. & Koshio, S. (2019). Application of fermentation strategy in aquafeed for sustainable aquaculture. *Reviews in Aquaculture*, 12, 1-16. <https://doi.org/10.1111/raq.12368>
- Dawood, M. A., Koshio, S., Abdel-Daim, M. M., & Van Doan, H. (2019). Probiotic application for sustainable aquaculture. *Reviews in Aquaculture*, 11, 907-924. <https://doi.org/10.1111/raq.12272>
- Dawood, M. A., Eweedah, N. M., Khalafalla, M. M., Khalid, A., El Asely, A., Fadl, S. E., Amin A. A., Paray B. A., & Ahmed, H. A. (2020). *Saccharomyces cerevisiae* increases the acceptability of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) to date palm seed meal. *Aquaculture Reports*, 17, 100314. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2020.100314>
- Faizullah, M., Rajagopalsamy, C.B.T., Ahilan, B., & Francis, T. (2015). Impact of Biofloc Technology on the Growth of Goldfish Young Ones. *Indian Journal of Science and Technology*, 8 (13), 1-8. <https://doi.org/10.17485/ijst/2015/v8i13/54060>
- Fischer, H., Romano, N., Renukdas, N., Egnew, N., Sinha, A. K., & Ray, A. J. (2020). The potential of rearing juveniles of bluegill, *Lepomis macrochirus*, in a biofloc system. *Aquaculture Reports*, 17, 100398. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2020.100398>
- García-Careño F. L., & Haard N. F. (1993) Characterization of proteinase classes in langostilla (*Pleuroncodes planipes*) and crayfish (*Pacifastacus astacus*) extracts. *Journal of Food Biochemistry*, 17, 97–113. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4514.1993.tb00864.x>
- Gatlin III, D. M. (1987). Whole-body amino acid composition and comparative aspects of amino acid nutrition of the goldfish, golden shiner and fathead minnow. *Aquaculture*, 60, 223-229. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(87\)90289-4](https://doi.org/10.1016/0044-8486(87)90289-4)
- Hassaan, M. S., Soltan, M. A., & Abdel-Moez, A. M. (2015). Nutritive value of soybean meal after solid state fermentation with *Saccharomyces cerevisiae* for Nile tilapia, *Oreochromis*

niloticus. Animal Feed Science and Technology, 201, 89-98.
<https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2015.01.007>

Hayes, M., & García-Vaquero, M. (2016). Bioactive compounds from fermented food products. In: Ojha K. & Tiwari B. (eds), Novel Food Fermentation Technologies (p. 293-310). Food Engineering Series. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-42457-6_14

He, M., Li, X., Poolsawat, L., Guo, Z., Yao, W., Zhang, C., & Leng, X. (2020). Effects of fish meal replaced by fermented soybean meal on growth performance, intestinal histology and microbiota of largemouth bass (*Micropterus salmoides*). Aquaculture Nutrition, 26, 1058-1071. <https://doi.org/10.1111/anu.13064>

Hidalgo, M. C., Urea, E. & Sanz, A. (1999). Comparative study of digestive enzymes in fish with different nutritional habits. Proteolytic and amylase activities. Aquaculture, 170, 267-283. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(98\)00413-X](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(98)00413-X)

Jiang, Y., Zhao, P. F., Lin, S. M., Tang, R. J., Chen, Y. J., & Luo, L. (2018). Partial substitution of soybean meal with fermented soybean residue in diets for juvenile largemouth bass, *Micropterus salmoides*. Aquaculture Nutrition, 24, 1213-1222. <https://doi.org/10.1111/anu.12659>

Kolkovski, S., & Tandler, A. (2000). The use of squid protein hydrolysate as a protein source in microdiets for gilthead seabream *Sparus aurata* larvae. Aquaculture Nutrition, 6, 11-16. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2095.2000.00125.x>

Lee, S. M., Azarm, H. M., & Chang, K. H. (2016). Effects of dietary inclusion of fermented soybean meal on growth, body composition, antioxidant enzyme activity and disease resistance of rockfish (*Sebastes schlegeli*). Aquaculture, 459, 110-116. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.03.036>

Li, J., Zhou, R. L., Ren, Z. Q., Fan, Y. W., Hu, S. B., Zhuo, C. F., & Deng, Z. Y. (2019). Improvement of protein quality and degradation of allergen in soybean meal fermented by *Neurospora crassa*. LWT - Food Science and Technology, 101, 220-228. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.10.089>

Li, C., Zhang, B., Liu, C., Zhou, H., Wang, X., Mai, K., & He, G. (2020). Effects of dietary raw or *Enterococcus faecium* fermented soybean meal on growth, antioxidant status, intestinal microbiota, morphology, and inflammatory responses in turbot (*Scophthalmus maximus* L.). Fish & Shellfish Immunology, 100, 261-271. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2020.02.070>

Liang, X. F., Hu, L., Dong, Y. C., Wu, X. F., Qin, Y. C., Zheng, Y. H., ... & Xue, M. (2017). Substitution of fish meal by fermented soybean meal affects the growth performance and

- flesh quality of Japanese seabass (*Lateolabrax japonicus*). *Animal Feed Science and Technology*, 229, 1-12. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2017.03.006>
- Liu, H., Zhu, X., Yang, Y., Han, D., Jin, J., & Xie, S. (2016). Effect of substitution of dietary fishmeal by soya bean meal on different sizes of gibel carp (*Carassius auratus gibelio*): nutrient digestibility, growth performance, body composition and morphometry. *Aquaculture Nutrition*, 22, 142-157. <https://doi.org/10.1111/anu.12239>
- Liu, H., Jin, J., Zhu, X., Han, D., Yang, Y. & Xie, S. (2017). Effect of substitution of dietary fish meal by soybean meal on different sizes of gibel carp (*Carassius auratus gibelio*): digestive enzyme gene expressions and activities, and intestinal and hepatic histology. *Aquaculture Nutrition*, 23, 129-147. <https://doi.org/10.1111/anu.12375>
- Long, L., Yang, J., Li, Y., Guan, C., & Wu, F. (2015). Effect of biofloc technology on growth, digestive enzyme activity, hematology, and immune response of genetically improved farmed tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture*, 448, 135-141. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.05.017>
- Luz, R.K., Martínez-Álvarez, R.M., De Pedro, N., & Delgado, M.J. (2008). Growth, food intake regulation and metabolic adaptations in goldfish (*Carassius auratus*) exposed to different salinities. *Aquaculture*, 276, 171-178. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.01.042>
- Métais P., & Bieth J. (1968) Détermination de l'a-amylase. *Ann Biol Clin* 26:133–142.
- Mohapatra, S., Chakraborty, T., Kumar, V., DeBoeck, G., & Mohanta, K. N. (2013). Aquaculture and stress management: a review of probiotic intervention. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 97, 405-430. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0396.2012.01301.x>
- Mukherjee, R., Chakraborty, R. & Dutta, A. (2016). Role of Fermentation in Improving Nutritional Quality of Soybean Meal - A Review. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences (AJAS)*, 29, 1523-1529. <https://doi.org/10.5713/ajas.15.0627>
- Najdegerami, E.H., Bakhshi, F., & Lakani, F.B. (2016). Effects of biofloc on growth performance, digestive enzyme activities and liver histology of common carp (*Cyprinus carpio* L.) fingerlings in zero-water exchange system. *Fish Physiology and Biochemistry*, 42, 457-465. <http://doi.org/10.1007/s10695-015-0151-9>
- Novriadi, R., Rhodes, M., Powell, M., Hanson, T., & Davis, D. A. (2018). Effects of soybean meal replacement with fermented soybean meal on growth, serum biochemistry and morphological condition of liver and distal intestine of Florida pompano *Trachinotus carolinus*. *Aquaculture Nutrition*, 24, 1066-1075. <https://doi.org/10.1111/anu.12645>

- Nwachukwu, U., George-Okafor, U., Ozoani, U., & Ojiagu, N. (2019). Assessment of probiotic potentials of *Lactobacillus plantarum* CS and *Micrococcus luteus* CS from fermented milled corn-soybean waste-meal. *Scientific African*, 6, e00183. <https://doi.org/10.1016/j.sciaf.2019.e00183>
- Olmos, A. R., Bru E., & Garro, M. S. (2015). Optimization of fermentation parameters to study the behavior of selected lactic cultures on soy solid state fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 196: 16–23 <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.11.030>
- Penttinen, O. P., & Holopainen, I. J. (1992). Seasonal feeding activity and ontogenetic dietary shifts in crucian carp, *Carassius carassius*. *Environmental Biology of Fishes*, 33, 215-221. https://doi.org/10.1007/978-94-011-2544-4_19
- Rahimnejad, S., Lu, K., Wang, L., Song, K., Mai, K., Davis, D. A., & Zhang, C. (2019). Replacement of fish meal with *Bacillus pumillus* SE5 and *Pseudozyma aphidis* ZR1 fermented soybean meal in diets for Japanese seabass (*Lateolabrax japonicus*). *Fish & Shellfish Immunology*, 84, 987-997. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.11.009>
- Ray, A. J., Lewis, B. L., Browdy, C. L., & Leffler, J. W. (2010). Suspended solids removal to improve shrimp (*Litopenaeus vannamei*) production and an evaluation of a plant-based feed in minimal-exchange, superintensive culture systems. *Aquaculture*, 299, 89-98. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2009.11.021>
- Refstie, S., Sahlström, S., Bråthen, E., Baeverfjord, G., & Krogedal, P. (2005). Lactic acid fermentation eliminates indigestible carbohydrates and antinutritional factors in soybean meal for Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture*, 246, 331-345. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.01.001>
- Rice, E.W., Baird, R.B., Eaton, A.D., & Clesceri, L.S. (2012). Standard methods for the examination of water and wastewater. 22nd Edition, American Public Health Association, American Water Works, Water Environment Federation, Washington, DC.
- Romano, N., Surratt, A., Renukdas, N., Monico, J., Egnew, N., & Sinha, A. K. (2020). Assessing the feasibility of biofloc technology to largemouth bass *Micropterus salmoides* juveniles: Insights into their welfare and physiology. *Aquaculture*, 520, 735008. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735008>
- Sales, J. & Janssens, G.P.J. (2003). Nutrient requirements of ornamental fish. *Aquatic Living Resources*, 16, 533-540. <https://doi.org/10.1016/j.aquiliv.2003.06.001>
- Sanjukta, S. & Rai, A. K. (2016). Production of bioactive peptides during soybean fermentation and their potential health benefits. *Trends in Food Science & Technology*, 50, 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.01.010>

- Sarbahi, D. S. (1951). Studies of the digestive tracts and the digestive enzymes of the goldfish, *Carassius auratus* (Linnaeus) and the largemouth black bass, *Micropterus salmoides* (Lacépède). The Biological Bulletin, 100, 244-257. <https://doi.org/10.2307/1538534>
- Schryver, P., Crab, R., Defoirdt, T., Boon, N., & Verstraete, W. (2008). The basics of bio-flocs technology: the added value for aquaculture. Aquaculture, 277, 125-137. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.02.019>
- Serra, F. P., Gaona, C. A., Furtado, P. S., Poersch, L. H., & Wasielesky, W. (2015). Use of different carbon sources for the biofloc system adopted during the nursery and grow-out culture of *Litopenaeus vannamei*. Aquaculture International, 23, 1325-1339. <https://doi.org/10.1007/s10499-015-9887-6>
- Shiu, Y. L., Wong, S. L., Guei, W. C., Shin, Y. C., & Liu, C. H. (2015a). Increase in the plant protein ratio in the diet of white shrimp, *Litopenaeus vannamei* (Boone), using *Bacillus subtilis* E20-fermented soybean meal as a replacement. Aquaculture Research, 46(2), 382-394. <https://doi.org/10.1111/are.12186>
- Shiu, Y. L., Hsieh, S. L., Guei, W. C., Tsai, Y. T., Chiu, C. H., & Liu, C. H. (2015b). Using *Bacillus subtilis* E20-fermented soybean meal as replacement for fish meal in the diet of orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*, Hamilton). Aquaculture Research, 46, 1403-1416. <https://doi.org/10.1111/are.12294>
- Sotoudeh, E., Moghaddam, J. A., Shahhosseini, G., & Aramli, M. S. (2016). Effect of dietary Gamma-irradiated and fermented soybean meal on the growth performance, body composition, and digestive enzymes activity of Caspian brown trout, *Salmo trutta caspius*, juvenile. Journal of the World Aquaculture Society, 47, 830-842. <https://doi.org/10.1111/jwas.12297>
- Tonheim, S. K., Espe, M., Hamre, K., & Rønnestad, I. (2005). Pre-hydrolysis improves utilisation of dietary protein in the larval teleost Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.). Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 321, 19-34. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2004.12.036>
- Wang, G., Yu, E., Xie, J., Yu, D., Li, Z., Luo, W., Qiu, L., & Zheng, Z. (2015). Effect of C/N ratio on water quality in zero-water exchange tanks and the biofloc supplementation in feed on the growth performance of crucian carp, *Carassius auratus*. Aquaculture 443, 98-104. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.03.015>
- Wang, L., Zhou, H., He, R., Xu, W., Mai, K., & He, G. (2016). Effects of soybean meal fermentation by *Lactobacillus plantarum* P8 on growth, immune responses, and intestinal

- morphology in juvenile turbot (*Scophthalmus maximus* L.). *Aquaculture*, 464, 87-94.
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.06.026>
- Wei, Y., Liang, M., & Xu, H. (2020). Fish protein hydrolysate affected amino acid absorption and related gene expressions of IGF-1/AKT pathways in turbot (*Scophthalmus maximus*). *Aquaculture Nutrition*, 26, 145-155. <https://doi.org/10.1111/anu.12976>
- Yamamoto, T., Iwashita, Y., Matsunari, H., Sugita, T., Furuita, H., Akimoto, A., Okamatsu K., & Suzuki, N. (2010). Influence of fermentation conditions for soybean meal in a non-fish meal diet on the growth performance and physiological condition of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture*, 309, 173-180.
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.09.021>
- Yu, Z., Li, L., Zhu, R., Li, M., Duan, J., Wang, J. Y., Liu, Y. & Wu, L. F. (2020). Monitoring of growth, digestive enzyme activity, immune response and water quality parameters of Golden crucian carp (*Carassius auratus*) in zero-water exchange tanks of biofloc systems. *Aquaculture Reports*, 16, 100283. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2020.100283>
- Zhang, S., Shi, Y., Zhang, S., Shang, W., Gao, X., & Wang, H. (2014). Whole soybean as probiotic lactic acid bacteria carrier food in solid-state fermentation. *Food Control*, 41, 1-6. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.12.026>
- Zhang, C., Rahimnejad, S., Wang, Y. R., Lu, K., Song, K., Wang, L., & Mai, K. (2018). Substituting fish meal with soybean meal in diets for Japanese seabass (*Lateolabrax japonicus*): Effects on growth, digestive enzymes activity, gut histology, and expression of gut inflammatory and transporter genes. *Aquaculture*, 483, 173-182.
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.10.029>

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os estudos mostraram que o sistema BFT é uma tecnologia eficaz e promissora para criação do kinguio. No primeiro experimento, o sistema BFT melhorou a pigmentação da pele dos peixes. Esse é um resultado inédito e de grande importância para cadeia produtiva da espécie, visto que a coloração da pele é uma das principais características que afeta o preço de mercado dos peixes ornamentais. Também foi demonstrado que a pigmentação da pele dos kinguios criados no sistema BFT pode ser intensificada com fontes de carotenoides exógenas como a astaxantina. Experimentos futuros devem ser realizados para avaliar a suplementação de outras fontes de carotenoides e de diferentes níveis de inclusão delas em dietas para peixes ornamentais produzidos no sistema BFT. Outra questão que também precisa ser avaliada é quanto tempo a pigmentação da pele dos peixes se mantém após a retirada deles do sistema BFT.

No segundo experimento, a inclusão de 21% de FSFM na dieta não prejudicou o crescimento e melhorou a saúde intestinal dos kinguios produzidos no sistema BFT. Esse é o primeiro trabalho avaliando alimentos fermentados em dietas para peixes criados nesse sistema. Mais pesquisas são necessárias para avaliar diferentes tipos de fermentados, os melhores níveis de inclusão, assim como a influência dos mesmos sobre a saúde de peixes produzidos no sistema BFT. Estudos avaliando a influência de alimentos fermentados sobre a qualidade da água de sistemas BFT também podem trazer resultados promissores para cadeia produtiva. Por se tratar de alimentos com potencial probiótico, os alimentos fermentados poderiam melhorar a qualidade da água e a composição da microbiota aquática.