

ELIZABETH PEREIRA DOS SANTOS

**QUANTIFICAÇÃO DA CONTRIBUIÇÃO DA MICROALGA *Navicula* sp.
NO CULTIVO DE *Litopenaeus vannamei* (BOONE, 1931) EM SISTEMA DE
BIOFLOCOS USANDO ISÓTOPOS ESTÁVEIS**

**Recife,
Setembro/2023**



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRO-REITORIA DE POS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE POS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS PESQUEIROS E
AQUICULTURA**

**QUANTIFICAÇÃO DA CONTRIBUIÇÃO DA MICROALGA *Navicula* sp. NO
CULTIVO DE *Litopenaeus vannamei* (BOONE, 1931) EM SISTEMA DE BIOFLOCOS
USANDO ISÓTOPOS ESTÁVEIS**

Elizabeth Pereira dos Santos

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Pesqueiros e Aquicultura da Universidade Federal Rural de Pernambuco como exigência para obtenção do título de Doutora.

Prof. Dr. Alfredo Olivera Galvez
Orientador

Prof Dr. Gilvan Takeshi Yogui
Coorientador

Prof Dr. Humber Agrelli de Andrade
Coorientador

**Recife,
Setembro/ 2023**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal Rural de Pernambuco
Sistema Integrado de Bibliotecas
Gerada automaticamente, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

S237q

Santos, Elizabeth

QUANTIFICAÇÃO DA CONTRIBUIÇÃO DA MICROALGA *Navicula* sp. NO CULTIVO DE *Litopenaeus vannamei* (BOONE, 1931) EM SISTEMA DE BIOFLOCOS USANDO ISÓTOPOS ESTÁVEIS / Elizabeth Santos. - 2023.
78 f. : il.

Orientador: Alfredo Olivera Galvez.

Coorientador: Gilvan Takeshi Yogui; Humber Agrelli de Andrade.

Inclui referências.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Recursos Pesqueiros e Aquicultura, Recife, 2024.

1. Bibliometrix; . 2. Biblioshyne; . 3. VosViewer; . 4. Modelo de mistura. I. Galvez, Alfredo Olivera, orient. II. Andrade, Gilvan Takeshi Yogui; Humber Agrelli de, coorient. III. Título

CDD 639.3

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRO-REITORIA DE POS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE POS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS PESQUEIROS E
AQUICULTURA

QUANTIFICAÇÃO DA CONTRIBUIÇÃO DA MICROALGA *Navicula* sp. NO
CULTIVO DE *Litopenaeus vannamei* (BOONE, 1931) EM SISTEMA DE BIOFLOCOS
USANDO ISÓTOPOS ESTÁVEIS

Elizabeth Pereira dos Santos

Tese julgada adequada para obtenção
do título de doutor em Recursos
Pesqueiros e Aquicultura. Defendida e
aprovada em 29/10/2023 pela seguinte
banca examinadora.

Prof. Dr. Alfredo Olivera Galvez

Orientador - Presidente

Departamento de Pesca e Aquicultura - DEPAq
Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE

Profa. Dra. Gelcirene de Albuquerque costa

Membro externo

Departamento de Pesca e Aquicultura - DEPAq
Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE

Profa. Dra. Danielli Matias de Macêdo Dantas

Membro externo

Departamento de Pesca e Aquicultura - DEPAq
Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE

Prof. Dr. Luis Otavio Brito da Silva

Membro interno

Departamento de Pesca e Aquicultura - DEPAq
Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE

Prof. Dr. Ranilson de Souza Bezerra

Membro interno

Departamento de Pesca e Aquicultura - DEPAq
Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE

Dedicatória

A eterna busca pelo equilíbrio entre ser mãe, filha, irmã, mulher e amiga, durante a construção de uma carreira científica é uma tarefa árdua e desafiadora compartilhada por muitas pesquisadoras. Nessa jornada, aprendi que é necessário manter a serenidade frente às adversidades que corriqueiramente surgem, ser resiliente para superá-las, cultivar a paixão pela ciência, pelo aprendizado e pelo conhecimento, ser atrevida. Pois, vivendo em uma sociedade que não valoriza o ensino e a pesquisa, não abrir mão do sonho de ser uma professora e pesquisadora brilhante, mantendo a gentileza, humildade e empatia com o próximo é um ato não só de atrevimento, mas também de rebeldia e teimosia. E acima de tudo, aprendi que essa seria uma jornada impossível se eu não tivesse uma rede de apoio. Por isso, dedico esta tese aos meus filhos (Túlio e Maria Helena), mães (Josefa dos Santos [in memoriam], Maria do Carmo e Maria de Fatima), pais (Severino Moraes e Djalma Martins) e irmãos (Alexandra, Rafael e Rodrigo), que sempre estiveram ao meu lado, apoiando-me em cada passo, e me lembrando da importância de nunca desistir dos meus sonhos. Vocês são minha fonte de inspiração e motivação, e sou grata por tê-los em minha vida.

Elizabeth Pereira dos Santos

Agradecimentos

"Nas palavras de Maya Angelou, 'Eu aprendi que as pessoas vão esquecer o que você disse, as pessoas vão esquecer o que você fez, mas as pessoas nunca esquecerão como você as fez sentir.' É com esse sentimento em mente que começo meus agradecimentos, expressando minha mais profunda gratidão às pessoas que me apoiaram e inspiraram ao longo da minha jornada acadêmica."

Em primeiro lugar quero agradecer a Deus, criador do universo por estabelecer leis naturais que governam o mundo e permitir a sua evolução e por me conceder o dom de questionar, a ciência evolui diariamente a partir de questionamentos que buscam entender e explicar essas leis, observando e experimentando o mundo ao nosso redor.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida durante o período de curso e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela incrível experiência de conhecer e atuar com o grupo de pesquisa da Profa. Dra. Giuliana Parisi ao longo de seis meses.

À todos os professores da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) e da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), em especial a meu orientador e coorientadores, Prof. Dr. Alfredo Galvez, Prof. Dr. Gilvan Takeshi e Prof. Dr. Humber Andrade, assim como a Profa. Dra. Maria Moura, Prof. Dr. Luis Otavio, Prof. Dr. William Severi, Profa. Dra. Gelcirene Costa, Profa. Dra. Danielli Dantas, Prof. Dr. Ranilson Bezerra, Prof. Dr. José Carlos Pacheco e Profa. Dra. Juliana Ferreira, pela paciência com meus questionamentos e por contribuírem para a minha formação. Assim como a todos os professores, técnicos e terceirizados que compõem a UFRPE, esse trabalho não poderia ter sido realizado sem a colaboração de vocês, muito obrigada pela ajuda, pela amizade, pela prestatividade e pela alegria de vocês.

À meus familiares de sangue e de coração e ao meu namorado, por me apoiar e por compreender as minhas ausências em função da realização deste trabalho e do meu amor pela pesquisa. A todos os meus amigos dos laboratórios de maricultura sustentável e laboratório de alimento vivo, amigos de graduação e da pós-graduação, amigos do café ou da Coca-Cola, amigos do chá ou do shake, amigos de congressos, amigos de vida e aos meus novos amigos de Firenze, gostaria de agradecer imensamente por toda ajuda, companheirismo, descontração, consultas científicas, aconselhamentos pessoais e acolhimento de cada um de vocês. Aprendi muito com cada um de vocês, algumas vezes o que fazer, outras o que não fazer, muito obrigada.

Eduardo Galeano certa vez disse: "Os cientistas dizem que somos feitos de átomos, mas um passarinho me contou que somos feitos de histórias". E hoje, olhando para trás, vejo que essa afirmação se aplica perfeitamente a cada um dos personagens desta história. Vocês foram a força, a inspiração, os heróis anônimos que dedicaram seu tempo e esforço para tornar possível este projeto. Então, a cada um de vocês, meu profundo agradecimento.

Resumo

O presente projeto teve como base a realização de dois estudos: um estudo bibliométrico e um experimento de cultivo. A aquicultura desempenha um papel fundamental em escala global como fonte de alimentos e subsistência. A análise de isótopos estáveis, especialmente carbono e nitrogênio, é uma ferramenta poderosa na compreensão das fontes alimentares dos organismos aquáticos, na rastreabilidade de produtos da pesca, na compreensão das interações nas cadeias alimentares aquáticas e em estudos ambientais. O estudo bibliométrico abordou cinco questões relacionadas ao uso de isótopos estáveis na aquicultura e revelou um aumento constante no número de publicações ao longo do tempo, com a Europa, Ásia e América do Norte liderando a pesquisa. Instituições como a Ocean University of China e pesquisadores como Shuang-Lin Dong e Antonio Mazzola destacaram-se na área. Os principais tópicos incluíram aquicultura, efluentes, isótopos estáveis, nitrogênio e dieta. Essa pesquisa ressaltou a crescente importância dos isótopos estáveis na aquicultura, abrangendo aspectos nutricionais, rastreabilidade e impacto ambiental. Por outro lado, o experimento de cultivo avaliou o impacto da adição da diatomácea *Navicula* sp. em sistemas de berçário de camarões *Penaeus vannamei* em bioflocos. O estudo buscou entender se a microalga faz parte do floculante microbiano ou é diretamente consumida pelos camarões, analisando sua contribuição nutricional para o crescimento dos camarões. Durante 35 dias, os camarões foram criados em sistemas de bioflocos a uma densidade de estocagem de 3000 pós-larvas por metro cúbico, com a adição de *Navicula* sp. em diferentes frequências. Os resultados demonstraram que a sobrevivência foi semelhante em todos os tratamentos (~93%), mas houve diferença significativa no ganho de peso e na taxa de conversão alimentar. O tratamento N10 ($0,50 \pm 0,05$ g, $0,99 \pm 0,01$) apresentou melhores parâmetros de crescimento em comparação com o tratamento WN ($0,33 \pm 0,07$ g, $11,46 \pm 0,30$), que não recebeu adição de *Navicula* sp. A análise isotópica indicou que o bioflocos foi a fonte alimentar mais assimilada pelos camarões, seguido por *Navicula* sp. e ração comercial. A contribuição de *Navicula* sp. foi maior no tratamento N5. Além disso, os resultados revelaram uma correlação inversa entre as contribuições relativas de bioflocos e *Navicula* sp. nos tratamentos com adição da diatomácea, indicando que *Navicula* sp. não faz parte da composição do bioflocos e é diretamente consumida pelas pós-larvas de *P. vannamei*. Em resumo, o bioflocos e *Navicula* sp. desempenharam papéis significativos no crescimento dos camarões, enfatizando a importância das fontes alimentares naturais na aquicultura de pós-larvas de *P. vannamei*.

Palavras-chave: Bibliometrix; Biblioshyne; VosViewer; Modelo de mistura.

Abstract

The present project was based on the completion of two studies: a bibliometric study and a cultivation experiment. Aquaculture plays a fundamental role globally as a source of food and sustenance. Stable isotope analysis, especially of carbon and nitrogen, is a powerful tool for understanding the food sources of aquatic organisms, tracing fishery products, comprehending interactions in aquatic food chains, and conducting environmental studies. The bibliometric study addressed five questions related to the use of stable isotopes in aquaculture and revealed a steady increase in the number of publications over time, with Europe, Asia, and North America leading the research. Institutions such as the Ocean University of China and researchers like Shuang-Lin Dong and Antonio Mazzola stood out in this field. The main topics included aquaculture, effluents, stable isotopes, nitrogen, and diet. This research highlighted the growing importance of stable isotopes in aquaculture, encompassing nutritional aspects, traceability, and environmental impact. On the other hand, the cultivation experiment assessed the impact of adding the diatom *Navicula* sp. to biofloc nursery systems of *Penaeus vannamei* shrimp. The study aimed to understand whether the microalga is part of the microbial floc or is directly consumed by the shrimp, analyzing its nutritional contribution to shrimp growth. Over 35 days, shrimp were reared in biofloc systems at a stocking density of 3000 post-larvae per cubic meter, with the addition of *Navicula* sp. at different frequencies. The results showed similar survival rates in all treatments (~93%), but there was a significant difference in weight gain and feed conversion ratio. The N10 treatment (0.50 ± 0.05 g, 0.99 ± 0.01) exhibited better growth parameters compared to the WN treatment (0.33 ± 0.07 g, 11.46 ± 0.30), which did not receive *Navicula* sp. addition. Isotopic analysis indicated that biofloc was the most assimilated food source by the shrimp, followed by *Navicula* sp. and commercial feed. *Navicula* sp. contributed more in the N5 treatment. Furthermore, the results revealed an inverse correlation between the relative contributions of biofloc and *Navicula* sp. in treatments with diatom addition, suggesting that *Navicula* sp. is not part of the biofloc composition and is directly consumed by *P. vannamei* post-larvae. In summary, biofloc and *Navicula* sp. played significant roles in shrimp growth, emphasizing the importance of natural food sources in the aquaculture of *P. vannamei* post-larvae.

Keywords: Bibliometrix; Biblioshybe; VosViewer; Mix model.

Lista de figuras

| | |
|---|----|
| Figura 01. Fluxograma da metodologia de construção do banco de dados e análises bibliométricas utilizadas no presente estudo..... | 20 |
| Figura 02. Variação anual da aplicação da análise de isótopos estáveis em estudos de aquicultura..... | 22 |
| Figura 03. Distribuição global das pesquisas aplicando isótopos estáveis na aquicultura de 1983 a 2023..... | 23 |
| Figura 04. Rede de colaboração entre as instituições que realizam pesquisas utilizando a análise de isótopos estáveis em pesquisas de aquicultura..... | 25 |
| Figura 05. As 10 fontes mais citadas de pesquisas aplicando a análise de isótopos estáveis na aquicultura..... | 26 |
| Figura 06. Interconexões entre Periódicos na Pesquisa de Isótopos Estáveis em Aquicultura | 27 |
| Figura 07. Pesquisadores mais influentes no desenvolvimento de estudos aplicando a análise de isótopos estáveis na aquicultura. A) Top 10 autores com maior produtividade; B) Top 10 autores com maior cocitação; C) Perfil de produção e citação anual de 10 autores com maior com periodicidade de atuação. | 29 |
| Figura 08. Mapeamento temático das pesquisas que aplicam isótopos estáveis na aquicultura..... | 30 |
| Figure 1. Correlation between the contribution of food sources (bioflocs, <i>Navicula</i> sp. and commercial feed) on the development of <i>Penaeus vannamei</i> reared in biofloc system with different frequencies of addition of the diatom <i>Navicula</i> sp..... | 55 |
| Figure 2. Correlation between the contribution of food sources (bioflocs, <i>Navicula</i> sp. and commercial feed) on the development of <i>P. vannamei</i> reared in bioflocs system with different inoculation frequencies of the microalgae <i>Navicula</i> sp | 56 |

Lista de tabelas

| | |
|---|----|
| Tabela 01. As 10 principais instituições que contribuem para a utilização da análise de isótopos estáveis na aquicultura | 24 |
| Tabela 02. Os 10 principais periódicos para publicação de pesquisas aplicando a análise de isótopos estáveis na aquicultura | 26 |
| Tabela 03. Top10 palavras chaves por agrupamento de correlação entre si | 31 |
| Table 1. Zootechnical performance of <i>Penaeus vannamei</i> after 35 days of culture in a biofloc nursery system submitted to different frequencies of addition of the microalgae <i>Navicula</i> sp..... | 50 |
| Table 2. Isotopic composition ($\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$) and isotopic discrimination factor ($\Delta^{13}\text{C}$ and $\Delta^{15}\text{N}$) of marine shrimp <i>Penaeus vannamei</i> fed solely with commercial feed, <i>Navicula</i> sp. and biofloc | 51 |
| Table 3. Values of $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ from food sources (<i>Navicula</i> sp., commercial feed and biofloc) and <i>Penaeus vannamei</i> shrimp after 35 days of rearing in biofloc system with different frequencies of addition of <i>Navicula</i> sp..... | 52 |
| Table 4. Relative contribution (%) of food sources (<i>Navicula</i> sp., commercial feed and biofloc) in the development of post-larvae <i>Penaeus vannamei</i> reared in biofloc nursery under different frequencies of addition of <i>Navicula</i> sp..... | 54 |

Sommario

| | |
|---|----|
| 1. Introdução | 11 |
| 1.1. Contextualização da pesquisa | 11 |
| 1.3. Hipótese | 13 |
| 2. Isótopos Estáveis na Aquicultura: Uma avaliação Cienciométrica de uma Ferramenta em Ascensão | 14 |
| Isótopos Estáveis na Aquicultura: Uma avaliação Cienciométrica de uma Ferramenta em Ascensão | 15 |
| Resumo | 16 |
| Introdução | 17 |
| Materiais e métodos | 19 |
| Resultados e Discussão | 22 |
| Conclusão | 35 |
| Referencias | 36 |
| 1. Contribution of the diatom <i>Navicula</i> sp. to the growth of <i>Penaeus vannamei</i> post-larvae in biofloc system: a quantitative stable isotope assessment | 38 |
| Abstract..... | 40 |
| Introduction..... | 41 |
| Materials and methods | 43 |
| Results..... | 50 |
| Discussion..... | 57 |
| Conclusion | 63 |
| References..... | 64 |
| 2. Considerações finais | 72 |
| 3. Referencias | 73 |

1. Introdução

1.1. Contextualização da pesquisa

A pesca marinha e a aquicultura desempenham um papel crucial como fontes de alimentos e meios de subsistência em escala global (BRANDER et al., 2017; FAO, 2022). De acordo com os dados mais recentes do The State of World Fisheries and Aquaculture 2022, a produção global de pesca e aquicultura atingiu aproximadamente 177,8 milhões de toneladas em 2020, destacando sua importância para o abastecimento alimentar e a nutrição global (FAO, 2022).

Com a crescente relevância da aquicultura, torna-se essencial aprofundar nosso entendimento dos fatores que afetam a produção de pescado, sendo a dieta dos organismos aquáticos um desses fatores críticos (GAMBOA-DELGADO, 2020). Nesse contexto, a análise de isótopos estáveis, especialmente carbono ($\delta^{13}\text{C}$) e nitrogênio ($\delta^{15}\text{N}$), emergiu como uma ferramenta poderosa para investigar as fontes alimentares dos organismos aquáticos e compreender as interações nas cadeias alimentares aquáticas (LI et al., 2016; UCHIDA et al., 2023; MORTILLARO et al., 2022). Além disso, outros isótopos, como oxigênio, hidrogênio e enxofre, encontram aplicação em estudos ambientais (MICHENER e LAJTHA, 2008).

Apesar da crescente importância dessa abordagem na pesquisa aquática, pouco se sabe sobre sua trajetória acadêmica na aquicultura, tornando a análise bibliométrica uma ferramenta valiosa para mapear o conhecimento científico acumulado (DONTHU et al., 2021). Com base nessas análises será possível identificar tendências de pesquisas, autores e instituições mais relevantes, os tópicos que apresentam maior interesse na temática, identificação de redes de colaboração e identificação de lacunas de conhecimento na literatura científica sobre a utilização da análise de isótopos estáveis como uma ferramenta analítica da aquicultura. A partir de avaliações como esta é possível determinar quais futuras pesquisas devem ou precisam ser desenvolvidas direcionando os investimentos para as lacunas mapeadas (MINGERS e LEYDESDORFF, 2015). Dessa forma, as análises bibliométricas são ferramentas valiosas para avaliar a trajetória e o estado da pesquisa em uma determinada área e pode fornecer informações valiosas para a comunidade acadêmica e para a indústria.

No contexto da aquicultura, um aspecto relevante é o uso da tecnologia de bioflocos no cultivo comercial do camarão branco do Pacífico, *Penaeus vannamei*, uma prática

consolidada globalmente (EMERENCIANO et al., 2021). Os bioflocos, compostos por microorganismos e resíduos no sistema de cultivo, têm um perfil nutricional variado e podem atuar como fonte alimentar adicional para os animais (RAY E LOTZ, 2014; SAMOCHA et al., 2019). No entanto, estudos anteriores relataram deficiências em aminoácidos essenciais na dieta dos camarões quando alimentados com bioflocos (EKASARI et al., 2014; GAMBOA-DELGADO et al., 2017).

Além disso, a adição de microalgas, como diatomáceas, tem sido considerada como uma estratégia para suprir deficiências nutricionais em camarões cultivados em sistemas de bioflocos (KHATOON et al., 2009; FERREIRA MARINHO et al., 2014; 2017; ABREU et al., 2019; OLIVEIRA et al., 2022). No entanto, ainda não está claro a interação entre essas microalgas e os animais, uma vez que apesar dos benefícios relacionados ao desempenho zootécnico dos animais, a inoculação poderá estar contribuindo não apenas através de seu consumo, mas atuando como núcleo para formação de bioflocos ou contribuindo na qualidade de água. Estudos com isótopos estáveis têm sido sugeridos como uma abordagem para avaliar quantitativamente o consumo de diferentes fontes alimentares na produção de *P. vannamei* (GAMBOA-DELGADO, 2022).

Portanto, este estudo tem como objetivo avaliar o estado da arte de trabalhos de aquicultura nos quais foi aplicada a análise de isótopos estáveis como uma ferramenta, além disso aplicar esta ferramenta para quantificar a contribuição de diferentes fontes alimentares (ração, bioflocos e diatomáceas *Navicula* sp.) para o desempenho de crescimento de *P. vannamei* cultivados em sistema de berçário de bioflocos, variando as frequências de adição de microalgas.

1.2.OBJETIVOS

1.2.1. Objetivo Geral

Quantificar a contribuição da microalga *Navicula* sp. no desenvolvimento do camarão marinho *Litopenaeus vannamei* cultivado em sistema de bioflocos.

1.2.2. Objetivo Específico

- Avaliar a assinatura isotópica das diferentes fontes alimentares, bioflocos, ração e microalga *Navicula* sp., presentes no cultivo na fase de berçário do camarão marinho *L. vannamei* em sistema de bioflocos com inoculação de *Navicula* sp.

- Estimar a discriminação isotópica do carbono e nitrogênio da *Navicula* sp., bioflocos e ração comercial em pós larvas de camarão marinho *L. vannamei*.
- Estimar a contribuição das diferentes fontes alimentares para no desenvolvimento do *L. vannamei* cultivado na fase de berçário em sistema de bioflocos com inoculação da microalga *Navicula* sp.

1.3.Hipótese

A inoculação da microalga *Navicula* sp. em berçários para o cultivo de *Litopenaeus vannamei* em sistema de bioflocos contribuirá significativamente no desenvolvimento dos camarões proporcionando melhores índices de desempenho zootécnico ao final desta fase de cultivo.

2. Isótopos Estáveis na Aquicultura: Uma avaliação Cienciométrica de uma Ferramenta em Ascensão

Isótopos Estáveis na Aquicultura: Uma avaliação Cienciométrica de uma Ferramenta em Ascensão

Elizabeth Pereira dos Santos ^{a*}

^a Departamento de Pesca e Aquicultura, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, Brasil; santos.e.p.26@gmail.com

* Autor correspondente: Elizabeth Pereira dos Santos, Departamento de Pesca e Aquicultura, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Dois Irmãos, Recife, Pernambuco, Brasil. Código postal: 52171-900. E-mail: santos.e.p.26@gmail.com

Resumo

A aquicultura desempenha um papel fundamental em escala global como fonte de alimentos e subsistência. A análise de isótopos estáveis, especialmente carbono e nitrogênio, é uma ferramenta poderosa na compreensão das fontes alimentares dos organismos aquáticos, na rastreabilidade de produtos da pesca, na compreensão das interações nas cadeias alimentares aquáticas e em estudos ambientais. Apesar disso, sua trajetória acadêmica na aquicultura é pouco conhecida, tornando a análise bibliométrica uma ferramenta valiosa para mapear o conhecimento científico neste campo. Este estudo realizou análises bibliométricas abordando cinco questões relacionadas ao uso de isótopos estáveis na aquicultura. Foi identificado um aumento constante no número de publicações ao longo do tempo, com a Europa, Ásia e América do Norte liderando a pesquisa. Instituições como a Ocean University of China e pesquisadores como Shuang-Lin Dong e Antonio Mazzola destacam-se na área. Os principais tópicos incluem aquicultura, efluentes, isótopos estáveis, nitrogênio e dieta. Essa pesquisa ressalta a crescente importância dos isótopos estáveis na aquicultura, abrangendo aspectos nutricionais, rastreabilidade e impacto ambiental. No entanto, há oportunidades não exploradas que requerem colaboração entre pesquisadores, instituições e regiões para promover o compartilhamento de conhecimento e acelerar seu desenvolvimento na aquicultura, destacando sua importância contínua na pesquisa aquática e a necessidade de explorar seu potencial para promover práticas sustentáveis e inovação na aquicultura.

Palavras-chave: Bibliometria; Bibliometrix; Biblioshyne; VosViewer.

Introdução

A pesca marinha e a aquicultura desempenham um papel crucial como fontes de alimentos e meios de subsistência em escala global (BRANDER et al., 2017). De acordo com os dados mais recentes do *The State of World Fisheries and Aquaculture 2022*, a produção total global de pesca e aquicultura alcançou aproximadamente 177,8 milhões de toneladas em 2020, com 157,4 milhões de toneladas destinadas ao consumo humano e cerca de 20,4 milhões de toneladas direcionadas para fins não alimentares, principalmente na fabricação de farinha e óleo de peixe (FAO, 2022). A FAO também projeta que a produção total de pescado atingirá 202 milhões de toneladas até 2030, impulsionada pelas práticas sustentáveis na aquicultura e uma gestão mais eficiente dos recursos pesqueiros, enfatizando assim a relevância desse setor para o abastecimento alimentar, a nutrição global e o comércio.

Com o aumento constante da demanda e a crescente importância da aquicultura, surge a necessidade premente de aprofundar nosso conhecimento sobre os fatores que limitam o aumento da produção de pescado, sendo a dieta dos organismos aquáticos um dos principais fatores críticos. Os aspectos nutricionais desempenham um papel fundamental na produção animal, influenciando tanto o desempenho biológico quanto a viabilidade econômica (GAMBOA-DALGADO, 2022). Devido à diversidade de espécies e habitats, as estratégias alimentares e a plasticidade trófica são altamente variáveis, o que torna necessário o desenvolvimento de abordagens analíticas inovadoras para identificar a contribuição de diferentes fontes alimentares nas dietas desses animais. Nesse contexto, a análise de isótopos estáveis tem emergido como uma ferramenta poderosa para estudos relacionados à fisiologia, uma vez que a composição isotópica dos tecidos dos organismos reflete diretamente suas fontes alimentares (DUCATTI, 2007).

Os estudos tróficos baseados na análise de isótopos estáveis levam em consideração a composição isotópica de diversos materiais, incluindo tecidos de organismos, que funcionam como biomarcadores naturais (ALBRECHT et al., 2021). As razões isotópicas estáveis de carbono ($\delta^{13}\text{C}$) e nitrogênio ($\delta^{15}\text{N}$) são amplamente utilizadas na rastreabilidade de produtos da pesca e aquicultura, bem como na caracterização e compreensão das interações nas cadeias alimentares aquáticas (LI et al., 2016; MORTILLARO et al., 2022). Além do carbono e nitrogênio, os isótopos de oxigênio, hidrogênio e enxofre, devido à sua abundância natural, têm encontrado aplicação em estudos ambientais (FERREIRA et al., 2021).

Apesar da ampla aplicação da análise de isótopos estáveis em pesquisas científicas, pouco se sabe sobre a trajetória acadêmica dessa ferramenta específica na aquicultura. A análise bibliométrica se destaca como uma ferramenta valiosa para desvendar e mapear o conhecimento científico acumulado e suas tendências em campos bem estabelecidos, permitindo a interpretação de grandes volumes de dados não estruturados de maneira rigorosa, possibilitando identificar tendências de produção, foco de temática e lacunas (DONTU et al., 2021). Portanto, este estudo busca analisar a produção científica global relacionada ao uso da análise de isótopos estáveis em pesquisas dentro do campo da aquicultura por meio de uma abordagem cienciométrica.

Materiais e métodos

O presente estudo buscou através da aplicação de análises bibliométricas, elucidar as seguintes questões:

- 1) Como a incorporação de isótopos estáveis tem progredido em estudos de aquicultura ao longo do tempo?
- 2) Onde estão localizadas as pesquisas que buscam se envolver no uso de isótopos estáveis na aquicultura?
- 3) Quem são os cientistas de destaque que têm desempenhado um papel significativo na promoção e na colaboração relacionadas à utilização da análise de isótopos estáveis na aquicultura?
- 4) Quais áreas temáticas na aquicultura estão mais proeminentes em relação à incorporação da análise de isótopos estáveis?
- 5) O que podemos esperar em termos de evolução e expansão do uso da análise de isótopos estáveis na aquicultura nos próximos dez anos?

Para isso, foi construído um banco de dados inicialmente, individualizado, contendo informações de documentos obtidos através de pesquisas nas bases de dados bibliográficos Web of Science (WoS) e Elsevier Scopus. A escolha das bases foi motivada pela relevância de ambas para aquicultura (PETRESCU-MAG E OROIAN, 2013), ademais, estão presentes na coleção de ambas bases as categorias temáticas como: Ciência da vida, ciências aquáticas, ciência animal, zoologia, ciências agrárias, biológicas, química geral, química analítica, química (diversos), espectroscopia, oceanografia e química ambiental, tendo em vista que a abordagem deste estudo se baseia na aplicação da análise de isótopos estáveis na aquicultura.

Os principais estágios da metodologia utilizada, incluindo a coleta de dados, a organização e estruturação do banco de dados, bem como as análises bibliométricas subsequentes estão representados no fluxograma (**Figura 01**) a seguir. Cada etapa é identificada por meio de caixas e setas, proporcionando uma visão geral do processo de pesquisa adotado.

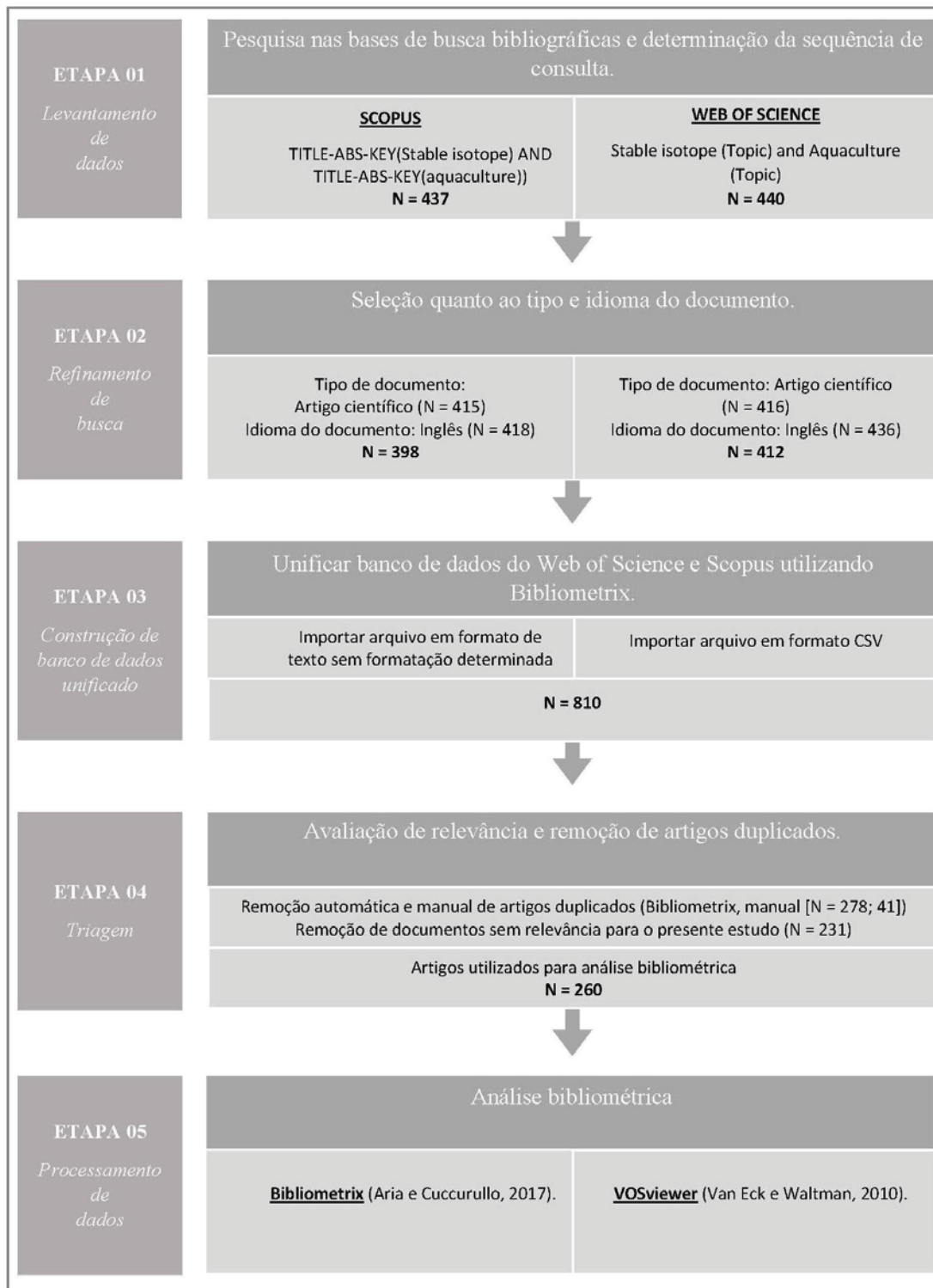


Figura 01. Fluxograma da metodologia de construção do banco de dados e análises bibliométricas utilizadas no presente estudo.

Construção do banco de Dados

O banco de dados foi construído a partir da unificação dos resultados obtidos através de pesquisas nas bases de dados bibliográficos. A busca foi realizada sem restrição de tempo em 22 de agosto de 2023, utilizando a sequência de consulta [(stable isotope)AND(aquaculture)] resultando em 877 documentos nos quais foram mencionados de forma combinada em seu título, resumo e nas palavras-chave dos autores e palavras-chave adicional (gerada pela WoS) os termos *stable isotope* e *aquaculture*. Em seguida os documentos foram classificados em função do tipo e idioma do documento e exportados no formato Texto sem formatação definida e CSV, para compor um banco de dados unificado. Os 810 artigos que compunham o banco de dados unificados passaram por uma triagem, inicialmente foram removidos os artigos em duplicata automaticamente utilizando o pacote *bibliometrix* (ARIA e CUCCURULLO, 2017) nos softwares R (R CORE TEAM, 2022) e R studio (RSTUDIO TEAM, 2022), em seguida o banco de dados foi exportado e de forma manual foram removidos os arquivos duplicados remanescentes e os artigos que não apresentavam relevância para o presente estudo, a relevância desses artigos foi avaliada através de seus títulos, quando estes não apresentavam informação suficientemente clara para determinação, foram avaliados os resumos e/ou metodologias empregadas.

Análises bibliométricas

O banco de dados foi submetido a análise de duplicatas e a partir da verificação do título e resumo, os artigos que não abordavam a utilização de isótopos estáveis na aquicultura foram removidos. As características da literatura sobre isótopos estáveis aplicados a aquicultura foram avaliadas em termos quantitativos e qualitativos. Os principais elementos avaliados foram: a evolução no número de documentos publicados por ano e por país, as palavras-chave, os principais periódicos e seus respectivos índices de avaliação e a integração entre pesquisas e pesquisadores, essas análises foram realizadas utilizando o pacote *bibliometrix* (ARIA e CUCCURULLO, 2017) nos softwares R (R CORE TEAM, 2022) e R studio (RSTUDIO TEAM, 2022).

Para pesquisas de correlação, torna-se necessária a avaliação do banco de dados como um todo e suas interconexões. Para tal, utilizou-se do software de acesso livre VosViewer (VAN ECK e WALTMAN, 2010), uma vez que este permite a criação de redes interligadas, onde cada nó representa a colaboração entre as categorias avaliadas (OLIVEIRA et al. 2020). Através dessa avaliação gráfica foram avaliadas as correlações entre: coautoria, palavras-chave e instituições, citações.

Resultados e Discussão

Evolução da Aplicação de Isótopos em Pesquisas Aquícolas

O presente estudo identificou 260 artigos científicos nos quais a análise de isótopos estáveis foi empregada como uma ferramenta de pesquisa no contexto da aquicultura. Esses artigos abrangem o período de 1983 a setembro de 2023, conforme ilustrado na Figura 02, que retrata uma tendência crescente no número de publicações ao longo desse período, com uma taxa de crescimento anual de 4,99%. Notavelmente, embora o primeiro artigo tenha surgido em 1983, ocorreu um período de mais de uma década (16 anos) sem publicações nesse contexto, sendo retomadas de forma consistente em 2001.

A crescente importância dos isótopos estáveis nas pesquisas em aquicultura é evidente ao analisar a média anual de publicações. Entre 2000 e 2010, a média anual foi de 5 artigos, enquanto na década subsequente (2011-2021), a média saltou para 16,9 artigos anuais. Nos últimos três anos (2020-2022), essa média aumentou ainda mais, atingindo 24,33 publicações anuais. Essa evolução demonstra claramente a crescente relevância dos isótopos estáveis como uma ferramenta de investigação na área da aquicultura.

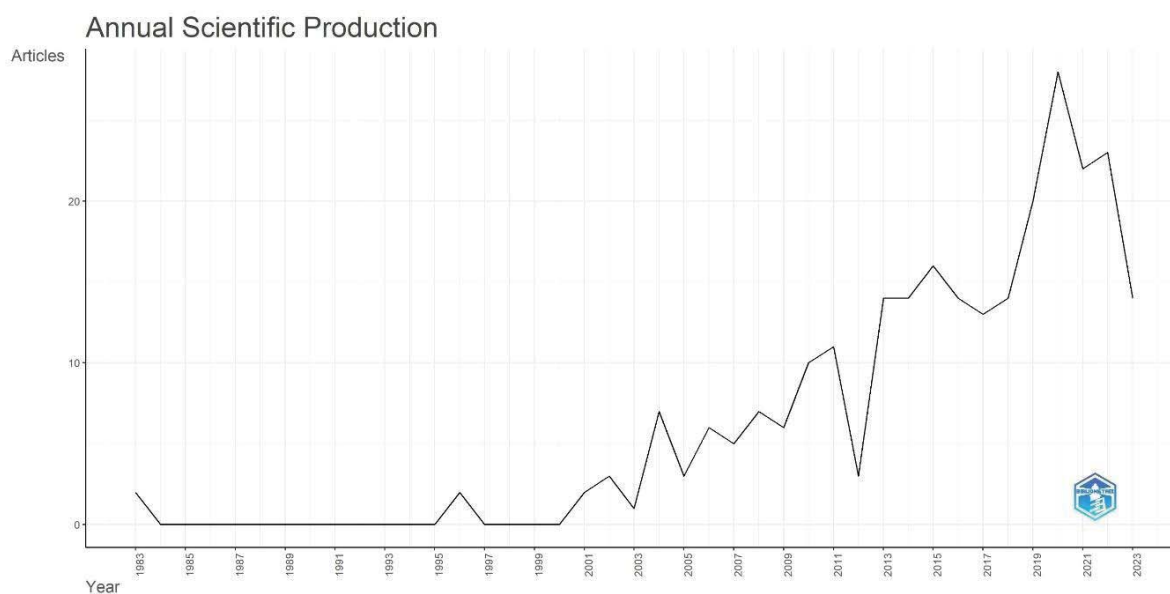


Figura 02. Variação anual da aplicação da análise de isótopos estáveis em estudos de aquicultura.

Diante disso, a tendência de crescimento na utilização da análise de isótopos estáveis na aquicultura observada ao longo do tempo pode estar relacionada a diversos fatores, dentre eles a versatilidade de utilização desta ferramenta e os avanços nas técnicas analíticas têm

desempenhado um papel fundamental, tornando a análise de isótopos estáveis mais difundida ao longo do tempo (GAMBOA-DELGADO, 2022).

Popularidade global da análise de isótopos estáveis na aquicultura

Foram consideradas as regiões: América do Norte, América Central, América do Sul, Europa, Ásia, Oriente Médio, África, Austrália e Oceania, para avaliar a distribuição das publicações nas quais a análise de isótopos estáveis foi empregada como uma ferramenta no contexto da aquicultura, observa-se que as regiões Europa (29,2%), Ásia (25,8%) e América do Norte (18,8%) lideram em termos de publicações relacionadas a essa temática. Estas regiões são seguidas no ranking por América do Sul (3,8%), Austrália e Oceania (1,9%), Oriente Médio (0,8%) e África (0%). É relevante salientar que os artigos publicados refletem a contribuição de 37 países, como demonstrado na Figura 03, que ilustra o número de publicações por país. Apenas 13 países registram mais de 10 publicações no tema. Destaca-se que a China, os Estados Unidos, o Canadá e a Espanha despontam como líderes, contribuindo de forma significativa para a literatura científica sobre a temática em questão, totalizando 158 artigos.

Country Scientific Production

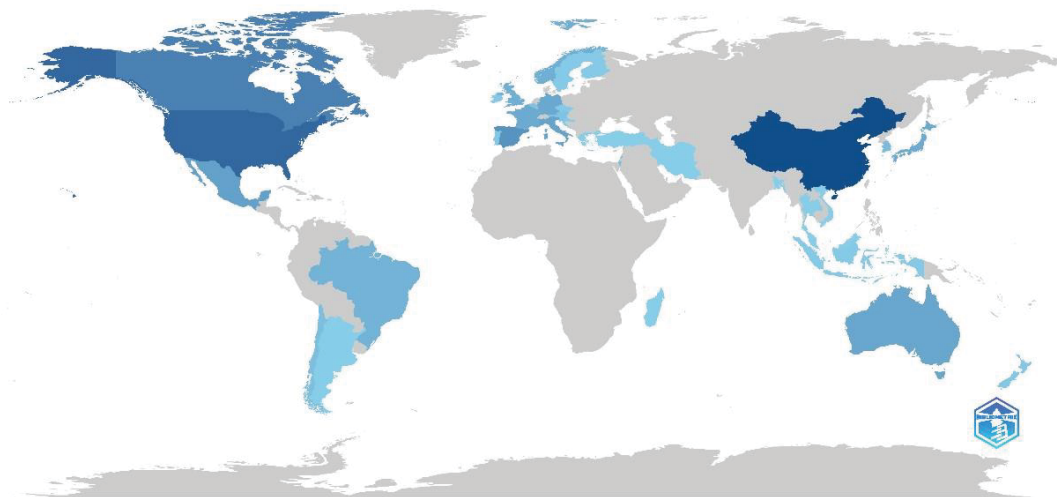


Figura 03. Distribuição global das pesquisas aplicando isótopos estáveis na aquicultura de 1983 a 2023.

Os artigos avaliados estão associados a 26 instituições distintas. Com um total de 57 artigos, a Ocean University of China emergiu como a instituição com maior relevância nas publicações de artigos que incorporam a análise de isótopos estáveis na aquicultura. Em seguida, destacam-se a Universidad Autónoma de Nuevo León, o Institute of Oceanography

and Fisheries e o Institute of Marine Research. Conforme demonstrado na Tabela 01, as dez principais instituições listadas contribuíram com um total de 181 artigos, representando 69,6% das publicações produzidas no período de 1983 a 2023.

Tabela 01. As 10 principais instituições que contribuem para a utilização da análise de isótopos estáveis na aquicultura.

| INSTITUIÇÃO | PAÍS | NÚMERO DE PUBLICAÇÕES |
|--|---------|-----------------------|
| Ocean university of China | China | 57 |
| Universidad Autónoma de Nuevo León | México | 21 |
| Institute of oceanography and fisheries | Croácia | 18 |
| Institute of marine research | Noruega | 17 |
| Ehime university | Japão | 12 |
| National research institute of aquaculture | Japão | 12 |
| University of Palermo | Itália | 12 |
| Hunan university of humanities | China | 11 |
| Nanchang university | China | 11 |
| University of Stirling | Escócia | 10 |

Com base na Figura 04, é possível identificar a presença de cinco grupos de colaboração entre instituições envolvidas na análise de isótopos estáveis na aquicultura. Dois desses grupos consistem em instituições chinesas, demonstrando uma colaboração ativa entre si, representados por círculos nas cores rosa e laranja, respectivamente. O grupo representado pela cor azul é composto por instituições italianas, enquanto o grupo de cor roxa inclui instituições canadenses, e o grupo verde engloba instituições japonesas. O distanciamento entre esses grupos sugere que as colaborações internacionais nesse campo de pesquisa ainda não estão plenamente consolidadas.

período de 1983 a 2023. O maior volume de artigos foi registrado na revista Aquaculture (n = 42), seguida pela Marine Pollution Bulletin (n = 19) e pela Aquaculture Research (n =13).

Tabela 02. Os 10 principais periódicos para publicação de pesquisas aplicando a análise de isótopos estáveis na aquicultura.

| PERIÓDICO | ARTIGOS |
|--|---------|
| AQUACULTURE | 42 |
| MARINE POLLUTION BULLETIN | 19 |
| AQUACULTURE RESEARCH | 13 |
| AQUACULTURE ENVIRONMENT INTERACTIONS | 11 |
| MARINE ENVIRONMENTAL RESEARCH | 10 |
| SCIENCE OF THE TOTAL ENVIRONMENT | 9 |
| AQUACULTURE INTERNATIONAL | 7 |
| MARINE ECOLOGY PROGRESS SERIES | 7 |
| CANADIAN JOURNAL OF FISHERIES AND AQUATIC SCIENCES | 6 |
| JOURNAL OF THE WORLD AQUACULTURE SOCIETY | 6 |

Ao analisar o número de citações nos artigos publicados, verificou-se que a média global de citações por documento atingiu 18,76. O periódico Aquaculture destacou-se com o maior volume de citações (n = 373), seguido da Marine Ecology Progress Series (n = 151) e da Marine Pollution Bulletin (n = 120). A soma das citações provenientes das 10 fontes de maior relevância nas pesquisas que empregam a análise de isótopos estáveis na aquicultura totaliza 1023 citações, conforme ilustrado na Figura 05.

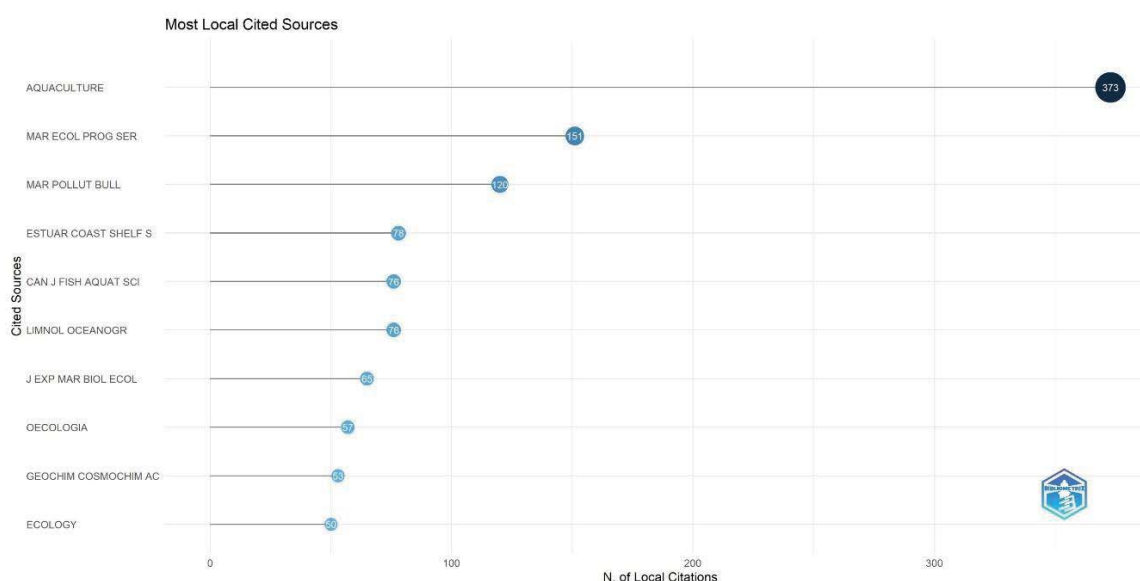


Figura 05. As 10 fontes mais citadas de pesquisas aplicando a análise de isótopos estáveis na aquicultura.

Adicionalmente, é possível observar a estrutura da rede de cocitação através da avaliação do cluster apresentado na Figura 06, é possível constatar que os periódicos predominantes na publicação de pesquisas que empregam a análise de isótopos estáveis na aquicultura estão claramente identificados. O periódico Aquaculture destaca-se mais uma vez, não apenas devido ao volume significativo de cocitações, mas também por sua influência como ponto de conexão entre diferentes grupos de periódicos.

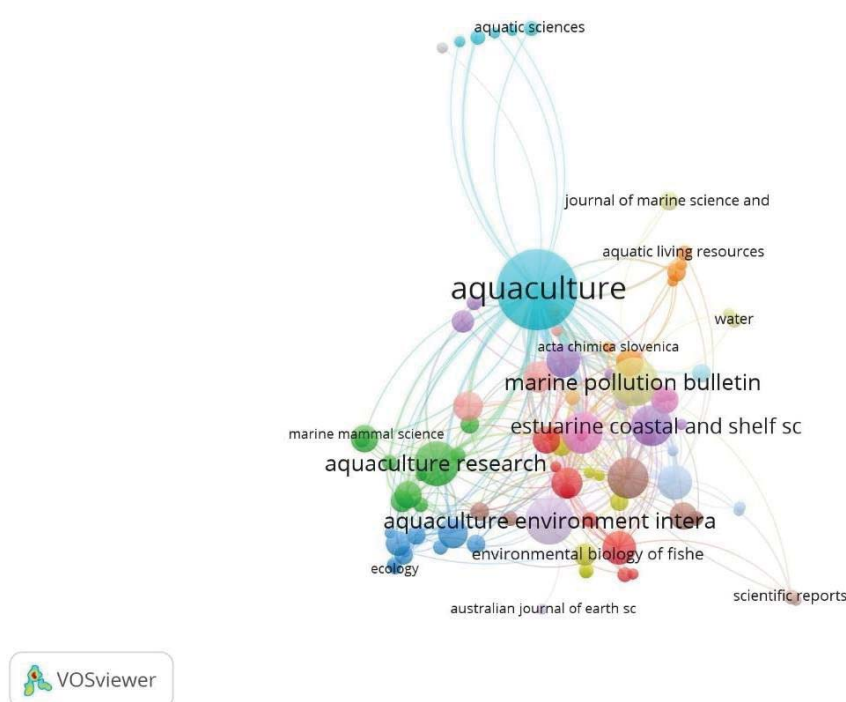


Figura 06. Interconexões entre Periódicos na Pesquisa de Isótopos Estáveis em Aquicultura.

Dentre os periódicos que se destacam quanto ao número de publicações e citações, a Aquaculture, Marine Pollution Bulletin, Aquaculture Research e a Marine Ecology Progress Series, surgem devido a elevada contribuição na temática avaliada. Essas revistas, estão em circulação divulgando resultado de pesquisas desde os anos 70, apresentam uma notória importância na área de aquicultura, ecologia marinha e poluição marinha.

Mapeamento da contribuição dos pesquisadores

Dos 260 artigos que empregaram a análise de isótopos estáveis como uma ferramenta nas pesquisas de aquicultura, esses estudos envolveram 1030 autores distintos, e apenas 3 destas publicações tiveram autoria individual. A média de coautores por artigo publicado é de 5,08.

Através da análise do número de publicações, cocitações, média anual de cocitações e frequência de publicação, foi possível identificar o grupo de pesquisadores mais influentes na área. Na Figura 07 A, são destacados os 10 autores mais proeminentes nessa temática, com base no número de publicações, que variam de 12 a 5 artigos publicados na área.

Com base no número de publicações, Shuang-Lin Dong emerge como o pesquisador mais relevante, destacando-se pela sua alta produtividade ao longo do período de 2013 a 2022. O Dr. Shuang-Lin é afiliado ao Key Laboratory of Mariculture da Ocean University of China e ao Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes do Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, ambas instituições de destaque na China. De acordo com a Springer, suas pesquisas abrangem diversas subáreas, incluindo oceanografia, ecologia marinha e continental, zoologia e fisiologia animal.

No mesmo contexto, a Figura 07 B apresenta os 10 autores mais frequentemente cocitados, com um intervalo de variação entre 19 e 6 cocitações. No que se refere ao número de cocitações ao longo do período compreendido entre 2013 e 2022, o pesquisador de destaque é Dr. Antonio Mazzola. Ele está afiliado ao Laboratório de Biologia e Recursos Marinhos da Università di Palermo, na Itália. O foco principal das pesquisas do Dr. Mazzola reside na aplicação da análise de isótopos estáveis para avaliar o impacto ambiental da aquicultura nos ecossistemas aquáticos.

Além disso, conforme observado na Figura 07 C, ao avaliar o período de contribuição desses autores para a temática abordada, percebe-se que uma consistência nas publicações começou a partir de 2002. A citação anual desses artigos variou de 13,6 a 0,4, sendo 2 o maior número de artigos publicados em um único ano.

Destaca-se que o artigo com o maior número de cocitações por ano foi publicado em 2004, sendo de autoria do pesquisador Antonio Mazzola, no qual a análise de isótopos estáveis foi empregada para avaliar a dispersão de resíduos de cultivos em gaiolas no Mediterrâneo Ocidental.

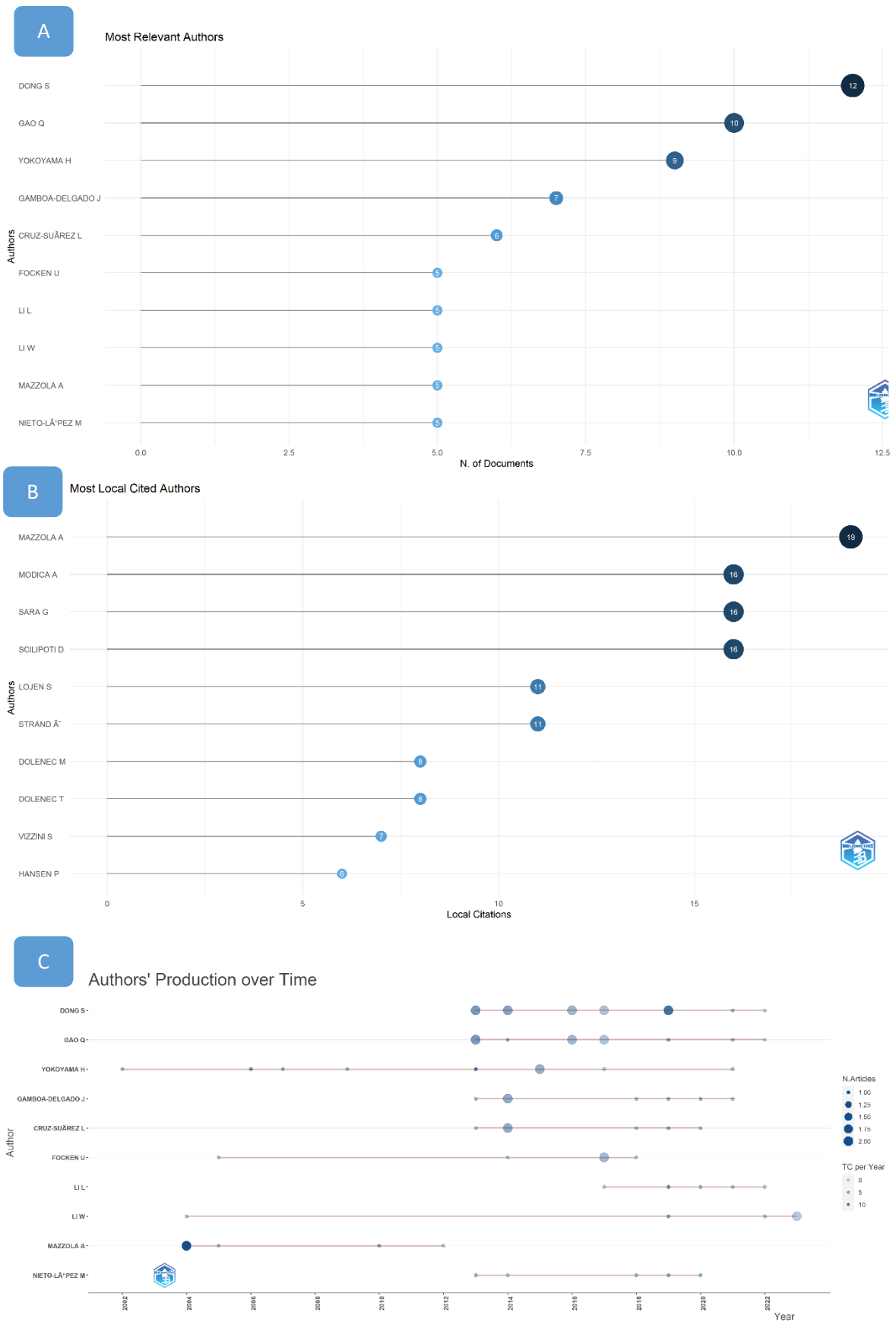


Figura 07. Pesquisadores mais influentes no desenvolvimento de estudos aplicando a análise de isótopos estáveis na aquicultura. A) Top 10 autores com maior produtividade; B) Top 10

autores com maior cocitação; C) Perfil de produção e citação anual de 10 autores com maior com periodicidade de atuação.

Tópicos-Chave e relevância temáticas em estudos com isótopos estáveis na aquicultura

Um total de 823 palavras-chave foi registrado, todas elas mostrando correlações entre si. Ao organizar essas palavras-chave em um mapa temático (Figura 08), identificamos a formação de 7 grupos distintos: Aquicultura, efluentes, matéria orgânica, isótopos estáveis, nitrogênio, dieta e isótopo estável. No mapa temático, observa-se que o cluster "dieta" está posicionado centralmente entre os quadrantes que indicam as tendências temáticas. Não foram obtidos clusters classificados como temas básicos ou especializados.

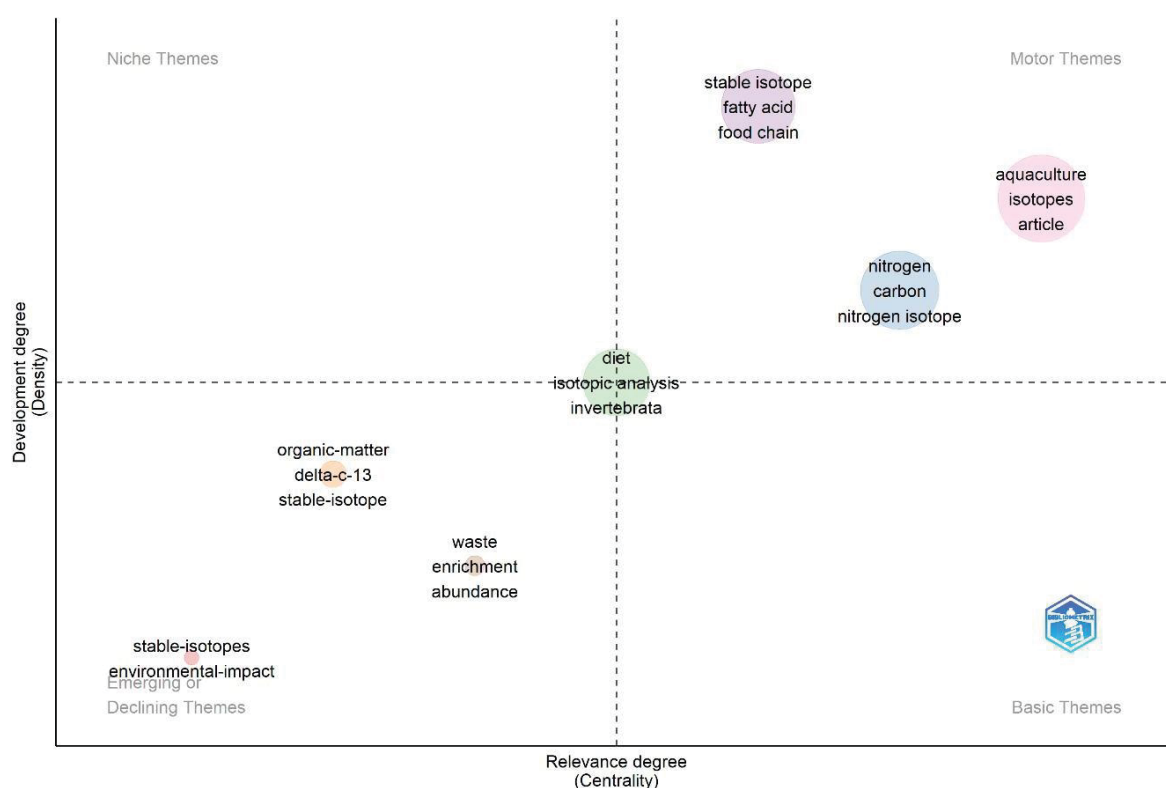


Figura 08. Mapeamento temático das pesquisas que aplicam isótopos estáveis na aquicultura.

Os clusters "aquicultura", "isótopos estáveis" (associados à cadeia alimentar) e "nitrogênio" emergem como as principais temáticas, sugerindo que esses grupos contêm palavras-chave de elevada relevância e que têm desempenhado um papel crucial nos estudos que aplicam a análise de isótopos estáveis na aquicultura. Por outro lado, os clusters "matéria orgânica", "efluente" e "isótopos estáveis" (associados ao impacto ambiental) agrupam palavras-chave classificadas como temas emergentes ou declinantes. O agrupamento "isótopo estável" consiste apenas nas palavras-chave que dão nome ao grupo e "impacto

ambiental". O agrupamento "matéria orgânica" inclui 4 palavras-chave correlacionadas entre si, além da palavra-chave que nomeia o grupo (delta C-13, teia alimentar e delta N-15). Enquanto isso, o agrupamento "efluentes" abrange 2 palavras-chave correlacionadas entre si, além da palavra-chave que nomeia o grupo (abundância e enriquecimento).

As dez palavras-chave mais frequentes nos demais clusters (excluindo os termos utilizados na pesquisa, o título do grupo e os grupos "Isótopo estável", "Matéria orgânica" e "Efluentes" devido ao baixo número de palavras-chave correlacionadas entre si) estão detalhadas na Tabela 03.

Tabela 03. Top10 palavras chaves por agrupamento de correlação entre si.

| AGRUPAMENTO | AQUICULTURA | NITROGÊNIO | ISÓTOPO ESTÁVEL | DIETA |
|-----------------------|-------------------------|------------------------|------------------------|-------------------------------|
| PALAVRAS-CHAVE | Não humanos | Carbono | Ácidos graxos | Invertebrados |
| | Animais | Isótopo de carbono | Cadeia alimentar | Taxa de crescimento |
| | Peixe | Decapoda (crustácea) | Nível trófico | Salmonídeos |
| | Estudos controlados | Teia alimentar | Tecido animal | Bivalves |
| | Monitoramento ambiental | Sistema de aquicultura | “Shellfish” | Holothuridea |
| | Matéria orgânica | Cultivo de peixes | Bioacumulação | <i>Litopenaeus vannamei</i> |
| | Nitrogênio 15 | Cultivo de camarões | Metabolismo | Ostreidae |
| | Isótopo de nitrogênio | Ecosystemas | Bivalves | Animalia |
| | Isótopo de carbono | Lagos | Moluscos | Disponibilidade de alimento |
| | Carbono 13 | Sedimentos | Fisiologia | <i>Apostichopus japonicus</i> |

Com base nos resultados obtidos, é possível constatar a ampla aplicabilidade da análise de isótopos estáveis em estudos relacionados à aquicultura. Essa versatilidade decorre do papel crucial desempenhado por essa ferramenta na avaliação do impacto ambiental da aquicultura. No âmbito nutricional, a análise de isótopos estáveis viabiliza a avaliação da qualidade de alimentos e ingredientes, bem como a identificação de fontes alternativas. Essa avaliação não se limita à abordagem qualitativa, mas também permite uma análise quantitativa, possibilitando a determinação da assimilação e da contribuição

percentual de cada nutriente no desenvolvimento dos organismos aquáticos (WIRTZ et al., 2022).

Além disso, no contexto da rastreabilidade, a análise de isótopos estáveis desempenha um papel fundamental na garantia da autenticidade e segurança dos produtos provenientes da aquicultura. Essa análise possibilita a identificação da origem dos produtos, diferenciando entre origem pesqueira e aquícola. Além disso, é possível utilizar a assinatura isotópica dos animais para verificar se eles provêm de criatórios específicos, ampliando, assim, as possibilidades de controle de qualidade na indústria da aquicultura (DELATTRE et al., 2020).

Tendências de novas pesquisas usando o Chat GTP

ChatGPT:> A aplicação da análise de isótopos estáveis em pesquisas científicas na área de aquicultura está repleta de perspectivas e tendências promissoras para a próxima década. Aqui estão algumas delas:

- 1. Sustentabilidade Avançada: A crescente preocupação com a sustentabilidade na produção de alimentos marinhos impulsionará a pesquisa na utilização de isótopos estáveis para otimizar práticas de aquicultura, minimizar o desperdício de recursos e mitigar impactos ambientais.*
- 2. Melhoria na Qualidade dos Alimentos: A análise de isótopos estáveis pode ser usada para avaliar a qualidade nutricional e a segurança dos alimentos produzidos em fazendas aquáticas, garantindo que os produtos sejam saudáveis e seguros para o consumo.*
- 3. Monitoramento Ambiental: Os isótopos estáveis podem servir como indicadores valiosos para o monitoramento de mudanças ambientais em ecossistemas aquáticos, ajudando a compreender e mitigar os efeitos das mudanças climáticas e da poluição.*
- 4. Rastreabilidade e Autenticidade: A demanda por produtos do mar autênticos e rastreáveis deve impulsionar a pesquisa para desenvolver métodos precisos baseados em isótopos estáveis que ajudem a verificar a origem e a autenticidade dos produtos aquáticos.*
- 5. Integração Multidisciplinar: A tendência de integrar dados de isótopos estáveis com informações de genômica, oceanografia, ecologia e outras disciplinas fortalecerá a compreensão dos sistemas aquáticos e o desenvolvimento de estratégias de manejo mais eficazes.*

6. *Desenvolvimento Tecnológico: Novas tecnologias e técnicas analíticas podem surgir, tornando a análise de isótopos estáveis mais acessível e eficiente, permitindo um maior volume de pesquisas.*
7. *Cooperação Internacional: A colaboração entre cientistas e instituições de diferentes partes do mundo pode levar a uma abordagem global para questões relacionadas à aquicultura, facilitando o compartilhamento de conhecimento e recursos.*
8. *Regulamentações e Normatização: À medida que a aplicação de isótopos estáveis se expande, pode haver um aumento na necessidade de regulamentações e normas para garantir a consistência e a confiabilidade dos resultados.*
9. *Formação Especializada: A capacitação de cientistas e profissionais em técnicas de análise de isótopos estáveis será fundamental para o avanço das pesquisas e sua aplicação prática na aquicultura.*
10. *Ética e Responsabilidade: Com a crescente conscientização sobre o bem-estar animal e a sustentabilidade, a pesquisa deve abordar questões éticas relacionadas ao uso de isótopos estáveis em experimentos e práticas de aquicultura.*

Essas perspectivas e tendências sugerem que a aplicação da análise de isótopos estáveis na aquicultura continuará a ser uma ferramenta valiosa para promover a produção de alimentos marinhos de forma sustentável, além de proporcionar insights cruciais sobre os ecossistemas aquáticos. A próxima década promete inovações e avanços significativos na pesquisa em aquicultura com base em isótopos estáveis.

Reflexões Finais: Implicações, Lacunas e Horizontes de Pesquisa

O presente estudo empregou diversas técnicas de avaliação (como a análise do número de publicações, citações e cocitações) e técnicas de relacionamento (incluindo a análise de coautoria, concorrência de palavras-chave e afinidade temática) para uma análise da qualidade e impacto das publicações (DONTU et al., 2021). Esse enfoque proporcionou uma compreensão abrangente do panorama atual e da trajetória de desenvolvimento da aplicação da análise de isótopos estáveis em pesquisas aquícolas. Essa análise permitiu a identificação de padrões, tendências e lacunas de pesquisa relacionadas a essa área temática.

Embora o uso da análise de isótopos estáveis na aquicultura esteja exibindo um aumento constante, com o presente estudo foi possível notar que o número de publicações

que se utilizam dessa abordagem na aquicultura seja relativamente baixo. Isso é evidenciado quando realizamos uma pesquisa ampla de artigos científicos na Web of Science (considerando artigos em inglês e excluindo revisões) usando o termo "stable isotope", que resultou em 42,339 artigos identificados. No entanto, ao utilizar os mesmos critérios de pesquisa, mas desta vez com o termo "Aquaculture", encontramos 46,585 artigos. Esses números demonstram que, apesar do crescente uso da análise de isótopos estáveis como uma ferramenta na aquicultura, sua representação nas publicações ainda é proporcionalmente pequena em relação ao amplo campo da aquicultura. Isso ressalta o potencial não explorado dessa técnica, que tem a capacidade de gerar resultados significativos e abordar questões relevantes em um grau muito maior do que o observado até o momento.

A aplicação da análise de isótopos estáveis na aquicultura é objeto de considerável interesse científico, devido à sua versatilidade e relevância nas investigações neste campo. Esta metodologia oferece uma avaliação objetiva e quantitativa da qualidade dos ingredientes e da dieta dos organismos aquícolas, possibilitando a descoberta de fontes alternativas de nutrientes (TRAN et al., 2021). Essa avaliação, por sua vez, tem o potencial de impactar significativamente parâmetros de produção, como o Fator de Conversão Alimentar (FCA), contribuindo diretamente para a redução da carga de nutrientes nos efluentes, com implicações positivas na sustentabilidade da atividade.

Adicionalmente, a análise de isótopos estáveis possibilita uma caracterização mais precisa do fluxo de nutrientes em sistemas aquícolas, permitindo uma melhor compreensão da dinâmica de ciclagem de elementos fundamentais, tais como nitrogênio, carbono e fósforo, ao longo do ciclo de cultivo. A capacidade de identificar a composição e a origem da matéria orgânica em ambientes naturais empregados na aquicultura oferece uma base sólida para uma gestão mais eficaz dos recursos naturais (MAYOR et al., 2017).

Por fim, a análise de isótopos estáveis é uma ferramenta fundamental para a rastreabilidade de produção, possibilitando não apenas a identificação da procedência do pescado, mas também a diferenciação entre diferentes espécies de peixes (GAMBOA-DELGADO et al., 2014), atendendo às exigências de autenticidade e qualidade no comércio de produtos aquícolas.

Em síntese, a análise de isótopos estáveis emerge como uma abordagem científica essencial na aquicultura, cujo potencial de aplicação ainda não foi completamente explorado.

À medida que esta técnica continua a ser aprimorada e incorporada em estudos mais amplos, sua relevância para a eficiência, sustentabilidade e transparência da aquicultura é inegável.

Conclusão

A análise cienciométrica evidencia um aumento significativo na adoção da análise de isótopos estáveis na aquicultura, resultado de sua versatilidade e valiosa contribuição para a pesquisa e práticas sustentáveis no campo. No entanto, é importante notar que ainda existem vastas oportunidades não exploradas no âmbito da aquicultura, onde a análise de isótopos estáveis pode ser aplicada de maneiras ainda mais abrangentes e inovadoras. Para potencializar o progresso e a disseminação dessa ferramenta na aquicultura, é essencial fortalecer as redes de cooperação entre pesquisadores, instituições e regiões. Essa colaboração intensificada pode promover o compartilhamento de conhecimentos, recursos e experiências, acelerando assim o desenvolvimento e a popularização da análise de isótopos estáveis na aquicultura. Concluindo, a análise cienciométrica destaca a importância contínua dessa abordagem na pesquisa aquática, enquanto ressalta a necessidade de uma maior exploração e colaboração para aproveitar todo o seu potencial na promoção de práticas sustentáveis e inovações na aquicultura.

Referencias

- Aria, M., Cuccurullo, C., 2017. bibliometrix : An R-tool for comprehensive science mapping analysis. *J. Informetr.* 11, 959–975. <https://doi.org/10.1016/j.joi.2017.08.007>
- Brander, K., Cochrane, K., Barange, M., Soto, D., 2017. Climate Change Implications for Fisheries and Aquaculture. *Climate Change Impacts on Fisheries and Aquaculture*. <https://doi.org/10.1002/9781119154051.ch3>.
- Delattre, E., Techer, I., Reneaud, B., Thireau, V., Verdoux, P., Prohin, P., 2020. Sr isotope discrimination of multi species aquaculture productions at a worldwide scale and contribution of the water reservoir in Sr plant input. *Heliyon* 6, e03075. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e03075>
- Derviř, H., 2020. Bibliometric Analysis using Bibliometrix an R Package. *J. Sci. Res.* 8, 156–160. <https://doi.org/10.5530/jscires.8.3.32>
- Donthu, N., Kumar, S., Mukherjee, D., Pandey, N., Lim, W.M., 2021. How to conduct a bibliometric analysis: An overview and guidelines. *J. Bus. Res.* 133, 285–296. <https://doi.org/10.1016/j.jbusres.2021.04.070>
- Ducatti, C., 2007. Aplicaço dos isótopos estáveis em aquicultura. *Rev. Bras. Zootec.* 36, 1–10. <https://doi.org/10.1590/s1516-35982007001000001>.
- Food and Agriculture Organization, 2022. The state of world fisheries and aquaculture 2022 (SOFIA): Towards blue transformation. Food & Agriculture Organization of the United Nations (FAO), Roma, Italy.
- Gamboa-Delgado, J., 2022. Isotopic techniques in aquaculture nutrition: State of the art and future perspectives. *Rev. Aquac.* 14, 456–476. <https://doi.org/10.1111/raq.12609>
- Gamboa-Delgado Julián, Molina-Poveda César, Enrique, G.-S., Villarreal-Cavazos David, Ricque-Marie Denis, Elizabeth, C.-S., 2014. Application of stable isotope analysis to differentiate shrimp extracted by industrial fishing or produced through aquaculture practices. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. <https://doi.org/10.1139/cjfas-2014-0005>.

Gosmann, A., 2021. OECD Main Science and Technology Indicators - Highlights on R&D expenditure.

Li, L., Boyd, C.E., Sun, Z., 2016. Authentication of fishery and aquaculture products by multi-element and stable isotope analysis. *Food Chem.* 194, 1238–1244. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.08.123>

Mayor, D.J., Gray, N.B., Hattich, G.S.I., Thornton, B., 2017. Detecting the presence of fish farm-derived organic matter at the seafloor using stable isotope analysis of phospholipid fatty acids. *Sci. Rep.* 7, 5146. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-05252-w>

Mortillaro, J.-M., Dabbadie, L., Raminoharisoa, A.E., Paradis, A., Martel, P., Andriamarolaza, R., Raliniaina, M., Mikolasek, O., Aubin, J., 2022. Trophic functioning of integrated rice-fish farming in Madagascar: Insights from stable isotopes ($\delta^{13}\text{C}$ & $\delta^{15}\text{N}$). *Aquaculture* 555, 738240. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2022.738240>

Tran, H.Q., Kiljunen, M., Van Doan, H., Stejskal, V., 2021. European perch (*Perca fluviatilis*) fed dietary insect meal (*Tenebrio molitor*): From a stable isotope perspective. *Aquaculture* 545, 737265. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.737265>

UNESCO, 2020. “Global Investments in R&D”. Fact Sheet 59.

van Eck, N.J., Waltman, L., 2010. Software survey: VOSviewer, a computer program for bibliometric mapping. *Scientometrics* 84, 523–538. <https://doi.org/10.1007/s11192-009-0146-3>

Wirtz, A., Mazumder, D., Carter, C.G., Codabaccus, M.B., Fitzgibbon, Q.P., Smith, G.G., 2022. Application of stable isotope analysis to evaluate the assimilation of protein sources in juvenile slipper lobsters (*Thenus australiensis*). *Aquaculture* 560, 738570. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2022.738570>

1. Contribution of the diatom *Navicula* sp. to the growth of *Penaeus vannamei* post-larvae in biofloc system: a quantitative stable isotope assessment

Contribution of the diatom *Navicula* sp. to the growth of *Penaeus vannamei* post-larvae in biofloc system: a quantitative stable isotope assessment

Elizabeth Pereira dos Santos ^{a*}

^a Departamento de Pesca e Aquicultura, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, Brazil; santos.e.p.26@gmail.com

* Corresponding author: Elizabeth Pereira dos Santos, Departamento de Pesca e Aquicultura, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Dois Irmãos, Recife, Pernambuco, Brazil. Postal code: 52171-900. E-mail: santos.e.p.26@gmail.com

Abstract

Previous studies have shown that addition of the diatom *Navicula* sp. to shrimp nurseries can improve the growth of *Penaeus vannamei* reared in biofloc systems. However, it is not known if the microalgae is part of the microbial floc or is directly consumed by shrimps. In this study, *Navicula* sp. was added to biofloc nursery systems of *P. vannamei* at distinct time frequencies for evaluating its nutritional contribution to shrimps growth. Nursery rearing was carried out in bioflocs for 35 days at a stocking density of 3000 post-larvae m⁻³. An entirely randomized experimental design was set with four treatments (three replicates for each): no addition of *Navicula* sp. (WN) and addition of 10 x 10⁴ cells mL⁻¹ of the diatom every 5, 10 and 15 days (N5, N10 and N15, respectively). Food sources relative contribution to *P. vannamei* development was estimated using a Bayesian mixture model. The isotopic discrimination factor ($\Delta^{15}\text{N}$ and $\Delta^{13}\text{C}$) for each food source was determined experimentally. After 35 days of culture, survival (~93%) was similar across all treatments but there was a significant difference in weight gain and feed conversion ratio. The N10 treatment (0.50 ± 0.05 g, 0.99 ± 0.01) exhibited better growth parameters when compared to the WN treatment (0.33 ± 0.07 g, 11.46 ± 0.30). Biofloc was the food source most assimilated by shrimps followed by *Navicula* sp. and commercial feed. Contribution of *Navicula* sp. was higher in the N5 treatment. In the treatments with diatom addition, an inverse correlation was observed between the relative contributions of biofloc and *Navicula* sp., indicating that *Navicula* sp. is not in the biofloc composition but it is directly consumed by *P. vannamei* post-larvae. Biofloc and *Navicula* sp. exhibited larger contributions to the growth of shrimps, reinforcing the importance of natural food sources to the aquaculture of *P. vannamei* post-larvae.

Keywords: Bayesian mixture model; live feed; $\delta^{13}\text{C}$; $\delta^{15}\text{N}$

Introduction

The use of biofloc technology for commercial culture of the Pacific white shrimp *Penaeus vannamei* is a consolidated practice worldwide (Emerenciano et al., 2021). Biofloc system is characterized by reduced water management and is based on manipulation of the carbon to nitrogen ratio (C:N) through application of organic and inorganic fertilizers that facilitate development of bacterial communities. Besides having an important role in maintaining water quality, bacteria contribute to the formation of microbial flocs (Samocha, 2019).

In addition to cycling dissolved nitrogen in the system, microbial flocs act as a supplemental food source for animals (Ray and Lotz, 2014; Samocha et al., 2019) and have a varied nutritional profile. These particles are formed by waste and microorganisms present in the culture system such as uneaten feed, exuviae, feces, microalgae, fungi, and zooplankton (De Stryver et al., 2008; Samocha et al., 2019), resulting in a source of macronutrients, proteins (20 - 48% [Abreu et al., 2019; Mansour et al., 2022]) and carbohydrates (28% [Lunda et al., 2020]) that meet dietary requirement of *P. vannamei* juveniles (Colvin and Brand, 1977; Kureshy and Davis, 2002; Zainuddin and Aslamyah, 2014). In contrast, studies have reported that microbial flocs can be considered deficient in essential amino acids required for the suitable growth of *P. vannamei*, including arginine, cysteine and methionine (Ekasari et al., 2014; Gamboa-Delgado et al., 2017).

Microalgae are considered a high nutritional quality food due to the presence of high levels of essential amino acids and polyunsaturated fatty acids such as eicosapentanoic (EPA) and decosahexanoic (DHA) acids (Oliveira et al., 2022). Therefore, addition of microalgae in *P. vannamei* nurseries in biofloc system has been used as a strategy to supply nutritional deficiencies. Some studies have reported that addition of diatoms to *P. vannamei* nursery in biofloc system contributes to the improvement of zootechnical performance

including average final weight, specific growth rate and yield (Khattoon et al. 2009, Marinho et al. 2014; 2017; Abreu et al. 2019; Oliveira et al., 2021). These studies attribute the productive increment to the consumption of microalgae although they do not prove that shrimps are actually feeding on diatoms.

Facing this scenario, stable isotope studies have been highlighted as a strategy for assessing consumption and absorption of different food sources in the growth of *P. vannamei* (Gamboa-Delgado, 2022). Nevertheless, to date, there are no studies showing that the diatom *Navicula* sp. is consumed by *P. vannamei* when inoculated in ponds using the biofloc system. This study addressed this issue and quantified the contribution of different food sources (feed, microbial flocs, and *Navicula* sp.) to the growth performance of *P. vannamei* reared in biofloc nursery system using different addition frequencies of microalgae.

Materials and methods

This study was carried out at the *Laboratório de Maricultura Sustentável* (LAMARSU [Sustainable Mariculture Laboratory]) of the *Departamento de Pesca e Aquicultura* (DEPAq [Fisheries and Aquaculture]) of the *Universidade Federal Rural de Pernambuco* (UFRPE [Federal Rural University of Pernambuco]).

Experimental design

The experimental culture was carried out for evaluating the contribution of different food sources (commercial feed, biofloc, and *Navicula* sp.) to the growth of *P. vannamei* reared over 35 days in a biofloc nursery system. A completely randomized experimental design, with four treatments and three replicates, was tested. The four scenarios regarding addition of microalgae *Navicula* sp. were: (1) no addition of *Navicula* sp. (WN); (2) addition of *Navicula* sp. every 5 days (N5); (3) addition of *Navicula* sp. every 10 days (N10); and (4) addition of *Navicula* sp. every 15 days (N15).

Navicula sp. culture

The *Navicula* sp. strain was obtained from the Live Food Production Laboratory (LAPAVI) at UFRPE. Microalgae cultures were performed in seawater (at 35 g L⁻¹ of salinity) enriched with Conway medium (WALNE, 1970) at pH 8.0, temperature 25 ± 1 °C, and light intensity of 37 μE m⁻² s⁻¹ (12 h of photoperiod). Seawater used in cultures was previously submitted to filtration (30 μm), chlorination (30 mg L⁻¹ of active chlorine for 24 h), dechlorination (constant aeration) and autoclaving (21 min at 121 °C). Algal concentration in the cultures was verified using an optical microscope (400× of magnification) and a Neubauer chamber. Thus, the volume of inoculum necessary to reach a density of 10 × 10⁴ cells mL⁻¹ in each experimental unit was determined. *Navicula* sp. was

added to the experimental units (except WN treatment) on the first day of culture followed by the planned frequencies for each treatment.

Biofloc maturation

Maturation of the biofloc inoculum was carried out in a matrix tank (3 m³) supplied with seawater (salinity 35 g L⁻¹), being done in two stages. Initially, inorganic fertilization of the system was performed with addition of urea (2 g m⁻³ N), triple superphosphate (0.1 g m⁻³ P) and sodium metasilicate (3 g m⁻³ Si). Then, organic fertilization was performed based on the methodology described by Ebeling et al. (2006). This method uses commercial feed (40% crude protein) and sugar cane molasses (30% organic carbon) for maintaining the carbon to nitrogen ratio at 4.8:1 (C:N). At the end of 40 days of maturation, water in the biofloc matrix tank presented the following characteristics: 0.24 mg L⁻¹ (total ammonia nitrogen), 0.83 mg L⁻¹ (N-nitrite), 49.70 mg L⁻¹ (nitrate), 4.20 mg L⁻¹ (orthophosphate), settleable solids (4.63 mL L⁻¹) and 165 CaCO₃ mg L⁻¹ (total alkalinity).

Experimental management

The post-larvae (5.00 ± 0.03 mg) of *P. vannamei* were obtained from a commercial larviculture (Aquatec, RN, Brazil) and stocked at a density of 3000 shrimp m⁻³. The shrimp culture was carried out in rectangular polyethylene tanks (0.05 m³) supplied with 50% biofloc inoculum from the matrix tank and 50% seawater at the same salinity. The experimental units were covered with nylon mesh and kept under constant aeration. A natural photoperiod (10 h light) was used, with a light intensity of approximately 23 μE m⁻² s⁻¹.

The shrimp were fed four times a day (8:00 am, 11:00 am, 2:00 pm and 5:00 pm) with a commercial feed (0.4-1.0 mm diameter; 45% crude protein; In vivo Animal Nutrition

and Health). Feed amount adjustments were performed weekly based on the data obtained from the growth analysis, following the methodology described by Van Wyk et al. (1999).

Water quality

Dissolved oxygen (DO [mg L^{-1}]), temperature (T [$^{\circ}\text{C}$]), pH and salinity (g L^{-1}) were monitored daily in the morning with a multiparameter meter (YSI MODEL 556 MPS, yellow springs, OHIO, USA). Settleable solids (SS [mg L^{-1}]), total ammonia nitrogen (TAN [mg L^{-1}]), nitrite nitrogen ($\text{NO}_2^{-}\text{-N}$ [mg L^{-1}]) and total alkalinity (TA [$\text{mg of CaCO}_3 \text{ L}^{-1}$]) were measured weekly following the methods described by Avnimelech (2009), APHA (2017), Fries (1971) and APHA (2017), respectively. For nitrogen control, daily applications of sugarcane molasses in a C:N ratio of 4.8:1 and calcium hydroxide were used to maintain pH and total alkalinity levels higher than 7.5 and 100 $\text{mg of CaCO}_3 \text{ L}^{-1}$, respectively. Sedimentation was used when settleable solids were high ($\text{SS} > 14 \text{ mL L}^{-1}$).

Zootechnical performance

After the harvest, the following zootechnical parameters were determined: weight gain ($\text{Wg [g]} = \text{Final weight [g]} - \text{Initial weight [g]}$), feed conversion ratio ($\text{FCR} = \text{Feed offered [g]} / \text{Biomass gain [g]}$), and survival ($\text{S [\%]} = \text{Final population} / \text{Initial population} \times 100$).

Sampling for isotopic analysis

Navicula sp. and biofloc

Prior to the inoculation of the microalgae *Navicula sp.*, a 500 mL sample of the microalgae culture was collected for stable isotope analysis. Sampling of microbial flocs for the same analysis was carried out by filtering a volume of each experimental unit. Microalgae and biofloc samples were collected weekly and filtered using a vacuum pump

and a glass fiber filter with porosity of 0.7 μm (Machery-Nagel GF-1), previously combusted in an furnace at 500 °C for 4 h.

P. vannamei and commercial feed

Weekly, *P. vannamei* specimens were collected from each experimental unit (20 post-larvae - 3 juveniles). The animals were individually submitted to depuration for 24 h for cleaning digestive contents. After this procedure, shrimps were sacrificed for further analysis. A single sample was collected from the commercial feed, referring to the batch of feed used during the experiment.

Sample preparation for stable isotope analysis

Analysis of stable isotopes was performed at *Laboratório de Compostos Orgânicos em Ecossistemas Costeiros e Marinhos da Universidade Federal de Pernambuco* – (OrganoMAR/UFPE [Organic Compounds in Coastal and Marine Ecosystems laboratory at Federal University of Pernambuco]).

All food sources (*Navicula* sp., biofloc and commercial feed) and consumers (post-larvae and juveniles of *P. vannamei*) were oven-dried at 50 °C for 48 h. Dry samples of *Navicula* sp. and biofloc (filter + sample) were weighed on a micro analytical balance (precision of 0.1 μg) and wrapped up in a tin disk. Dry shrimp and commercial feed samples were powdered, weighed on a micro analytical balance, and wrapped up in tin capsules. The encapsulated samples were placed individually in 96-well microplates and stored in a desiccator until further analysis.

Analysis of stable isotopes

The encapsulated samples were introduced into an elemental analyzer (EA, EuroVector model EA3000 Single) coupled to an isotope ratio mass spectrometer (IRMS, Thermo Scientific model Delta V Advantage). The EA combustion reactor was packed with

the following reagents (from bottom to top): silvered cobaltous/cobaltic oxide (20 mm), copper (70 mm) and chromium oxide (55 mm). Furnace temperature was set at 980 °C while helium (99.999% purity) was used as carrier gas at a flow rate of 93 mL min⁻¹. A 15 mL O₂ (99.9999% purity) pulse was injected into the reactor for facilitating sample combustion. CO₂ and N₂ generated upon combustion were separated in a packed chromatographic column (2 m long) at 70 °C. The IRMS was routinely calibrated with reference gases (CO₂ and N₂) traceable to international isotopic standards: Vienna Pee Dee Belemnite (VPDB) for δ¹³C and atmospheric N₂ (AIR) for δ¹⁵N. Results are expressed in parts per thousand (‰) using the delta notation (δ) (Fry, 2006):

$$\delta^{13}\text{C or } \delta^{15}\text{N} = \left(\frac{R_{\text{Sample}}}{R_{\text{Standard}}} - 1 \right) \times 1000$$

where R is the ratio of ¹³C/¹²C or ¹⁵N/¹⁴N.

Determination of the isotopic discrimination factor

In parallel to the present study, another experimental culture was carried out for four weeks (28 days) in order to determine the carbon (Δ¹³C) and nitrogen (Δ¹⁵N) isotopic discrimination factors from food to shrimps, according to Pearson et al. (2003). Three experimental units were used, referring to each food source: *Navicula* sp., biofloc and commercial feed. *P. vannamei* post-larvae (5.00 ± 0.03 mg) were stocked under the same conditions of stocking density and water quality, and fed daily with the food source proposed in each experimental unit (i.e., animals fed with *Navicula* sp., commercial feed, and biofloc). Weekly samples of food sources and shrimps from the experimental units were collected and submitted to stable isotope analysis. Results of the relative isotopic enrichment (δ¹³C and δ¹⁵N) were applied to the following equation:

$$\Delta^{13}\text{C or } \Delta^{15}\text{N (‰)} = \delta_{\text{Consumer}} - \delta_{\text{Source}}$$

Contribution of food sources

Estimation of the relative contribution of food sources to the growth of *P. vannamei* farmed in biofloc system were obtained from a Bayesian mixture model, using three sources (*Navicula* sp., biofloc and commercial feed) and two stable isotopes (Philips and Koch, 2002). The MixSIAR (Stock et al., 2018) computational package, developed by R software (R Core Team, 2022 [version 4.1.3]), was used for this analysis, using the Monte Carlo simulation method via Markov Chain Monte Carlo (Gamerman, 2006 [MCMC]), according to Stock and Semmens (2016). Individual $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ data of the consumers and the mean values with their respective standard deviations were used for the data corresponding to the food sources and isotopic discrimination factors. The diagnosis of the convergence of Markov chains was performed by evaluating the potential scale reduction (R) of the Gelman and Rubin (1992) test.

Statistical Analysis

Data on zootechnical performance, water quality and mean contributions were checked for normality and homogeneity of variances using the Shapiro-Wilk and Cochran tests, respectively. After FCR transformation with box-cox $\left(\frac{FCR^{-4.124543} - 1}{-4.124543}\right)$, the zootechnical performance data (FCR and WG) and the average contributions of the food sources (bioflocs, commercial feed and *Navicula* sp.) were submitted to one-way analysis of variance (ANOVA - one way), while for the water quality data (N-NO₂) repeated measures ANOVA was performed. When significant differences were observed, the data were submitted to the Tukey's mean comparison test. For the data that presented free distribution, the non-parametric test of Kruskal Wallis (S) and Friedman test (salinity, pH, SS, temperature, TAN,

DO, TA) were applied. The analyses were performed with Statistica 12 software, adopting a significance level (α) of 0.05.

Results

Water quality

No significant differences in water quality variables were observed between treatments throughout the experiment. The mean values of dissolved oxygen, temperature, pH, salinity, settleable solids, total ammonia nitrogen, nitrite nitrogen and total alkalinity were 4.49 mg L⁻¹, 27.70 °C, 8.02, 33.78 g L⁻¹, 6.76 mL L⁻¹, 1.05 mg L⁻¹, 0.97 mg L⁻¹ and 148.33 mg of CaCO₃ L⁻¹, respectively.

Zootechnical performance

The frequency of inoculation of the microalgae *Navicula* sp. significantly influenced the weight gain and feed conversion ratio (FCR) at the end of 35 days of culture. Treatments N10 and N5 showed a higher ($p < 0.05$) weight gain than the WN treatment. Moreover, FCR in the N10 treatment is lower than those observed in the WN and N15 treatments. However, survival was not significantly influenced by the frequency of inoculation of *Navicula* sp., showing an average value higher than 92.0% in the treatments at the end of the experimental culture. The zootechnical performance data are summarized in Table 1.

Table 1. Zootechnical performance of *Penaeus vannamei* after 35 days of culture in a biofloc nursery system submitted to different frequencies of addition of the microalgae *Navicula* sp.

| Variables | Treatments | | | |
|-----------|--------------------------|---------------------------|--------------------------|---------------------------|
| | WN | N5 | N10 | N15 |
| WG (g) | 0.33 ± 0.07 ^a | 0.46 ± 0.04 ^b | 0.50 ± 0.05 ^b | 0.40 ± 0.02 ^{ab} |
| FCR | 1.46 ± 0.30 ^a | 1.07 ± 0.10 ^{ab} | 0.99 ± 0.01 ^b | 1.24 ± 0.06 ^a |
| S (%) | 92.00 ± 2.00 | 93.33 ± 0.58 | 92.89 ± 0.77 | 92.89 ± 0.76 |

Data correspond to mean (n = 3) ± standard deviation. Different letters correspond to significant differences according to the one-way ANOVA (WG and FCR) followed by Tukey's test ($\alpha < 0.05$) or Kruskal Wallis test (S). Legend: WN (no addition of *Navicula* sp.); N5 (addition of *Navicula* sp. every 5 days); N10 (addition of *Navicula* sp. every 10 days); N15 (addition of *Navicula* sp. every 15 days); WG (weight gain); FCR (feed conversion ratio) and S (survival).

Isotopic discrimination factor

The data for $\delta^{15}\text{N}$ and $\delta^{13}\text{C}$ of the commercial feed, *Navicula* sp. and biofloc are presented in Table 2. Mean values of $\delta^{15}\text{N}$ of food sources ranged from -0.61 to 4.36‰, while the same values for $\delta^{13}\text{C}$ ranged from -21.26 to -18.10‰. Shrimp that fed *Navicula* sp. and commercial feed exhibited enriched $\delta^{15}\text{N}$ and $\delta^{13}\text{C}$ in comparison to the food source.

Table 2. Isotopic composition ($\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$) and isotopic discrimination factor ($\Delta^{13}\text{C}$ and $\Delta^{15}\text{N}$) of marine shrimp *Penaeus vannamei* fed solely with commercial feed, *Navicula* sp. and biofloc.

| Samples | Isotopic composition (‰) | | Isotopic discrimination factor (‰) | |
|--------------------------|--------------------------|-----------------------|------------------------------------|-----------------------|
| | $\delta^{13}\text{C}$ | $\delta^{15}\text{N}$ | $\Delta^{13}\text{C}$ | $\Delta^{15}\text{N}$ |
| Shrimp - <i>Navicula</i> | -18.89 ± 1.18 | 7.58 ± 1.01 | | |
| <i>Navicula</i> sp. | -19.55 ± 0.16 | -0.61 ± 1.64 | 0.67 ± 1.04 | 8.19 ± 1.67 |
| Shrimp - Biofloc | -19.06 ± 0.11 | 4.91 ± 1.98 | | |
| Biofloc | -18.10 ± 0.04 | 4.36 ± 2.45 | -0.96 ± 0.10 | 0.55 ± 2.78 |
| Shrimp - Feed | -20.20 ± 0.06 | 3.50 ± 0.24 | | |
| Feed | -21.26 ± 0.40 | 2.59 ± 1.04 | 1.06 ± 0.35 | 0.91 ± 0.92 |

Data presented as mean (n = 3) ± standard deviation. Shrimp - *Navicula* sp. (post-larvae of *P. vannamei* fed only with *Navicula* sp.); Shrimp - Biofloc (post-larvae of *P. vannamei* fed only with biofloc); Shrimp - Feed (post-larvae of *P. vannamei* fed only with commercial feed).

Isotopic composition

Values of $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ of the marine shrimp *P. vannamei* cultivated for 35 days under different inoculation frequencies of *Navicula* sp. and its food sources are summarized in Table 3. Results showed that the biofloc samples collected from the four treatments (WN, N5, N10 and N15) did not present significant differences in $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ values ($p > 0.05$). So, their mean value was used for comparison with other food sources which differed significantly between them (Table 3). This distinction of isotope values between commercial feed, *Navicula* sp. and biofloc is suitable for development of a food contribution model for *P. vannamei*.

Table 3. Values of $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ from food sources (*Navicula* sp., commercial feed and biofloc) and *Penaeus vannamei* shrimp after 35 days of rearing in biofloc system with different frequencies of addition of *Navicula* sp.

| Samples | Isotopic composition (‰) | |
|---------------------|-------------------------------|-----------------------------|
| | $\delta^{13}\text{C}$ | $\delta^{15}\text{N}$ |
| <i>Food sources</i> | | |
| Commercial Feed | $-21.26 \pm 0.40^{\text{A}}$ | $2.59 \pm 1.04^{\text{A}}$ |
| <i>Navicula</i> sp. | $-19.55 \pm 0.16^{\text{B}}$ | $-0.61 \pm 1.64^{\text{B}}$ |
| Biofloc – WN | $-17.08 \pm 0.47^{\text{C}}$ | $5.55 \pm 0.31^{\text{C}}$ |
| Biofloc – N5 | $-17.14 \pm 0.56^{\text{C}}$ | $5.32 \pm 0.37^{\text{C}}$ |
| Biofloc – N10 | $-16.56 \pm 0.03^{\text{C}}$ | $6.18 \pm 0.31^{\text{C}}$ |
| Biofloc – N15 | $-16.70 \pm 0.33^{\text{C}}$ | $5.70 \pm 0.57^{\text{C}}$ |
| <i>Consumers</i> | | |
| Shrimp – WN | $-18.71 \pm 0.62^{\text{a}}$ | 6.89 ± 0.93 |
| Shrimp – N5 | $-18.11 \pm 0.03^{\text{ab}}$ | 6.74 ± 0.25 |
| Shrimp – N10 | $-17.80 \pm 0.12^{\text{b}}$ | 6.41 ± 0.14 |
| Shrimp – N15 | $-18.08 \pm 0.02^{\text{ab}}$ | 6.66 ± 0.24 |

Data presented as mean (n = 3) \pm standard deviation. In each column, different letters denote significant differences according to the one-way analysis of variance (ANOVA - one way) followed by Tukey's test at 5% significance level. Uppercase letters correspond to comparison between food sources and lowercase letters correspond to comparison between treatments. Legend: WN = post-larvae of *P. vannamei* reared in biofloc nursery with no addition of *Navicula* sp.; Shrimp - N5 = post-larvae of *P. vannamei* reared in biofloc nursery with addition of *Navicula* sp. every 5 days; Shrimp - N10 = post-larvae of *P. vannamei* reared in a biofloc nursery with addition of *Navicula* sp. every 10 days; Shrimp - N15 = post-larvae of *P. vannamei* reared in a biofloc nursery with addition of *Navicula* sp. every 15 days.

Contribution of food sources

The data concerning the relative contribution of food sources to the development of *P. vannamei* at the end of the culture period are presented in Table 4. Significant differences were observed between food sources in the treatments. Bioflocs showed the highest relative contribution than other sources in all treatments, while the lowest contribution came from commercial feed. The relative contribution of commercial feed in the WN treatment was significantly higher than those observed in the treatments with addition of *Navicula* sp. When evaluating the treatments with addition of microalgae, it is possible to observe the significant effect of the frequency of microalgae inoculation to the growth of *P. vannamei*.

The highest contribution was observed in the treatment with the highest frequency of microalgae addition, exhibiting an average of 35.83%.

Table 4. Relative contribution (%) of food sources (*Navicula* sp., commercial feed and biofloc) in the development of post-larvae *Penaeus vannamei* reared in biofloc nursery under different frequencies of addition of *Navicula* sp.

| Food sources | Treatments | | | |
|---------------------|---|--|---|--|
| | WN | N5 | N10 | N15 |
| <i>Navicula</i> sp. | - | 35.83 ± 0.55 ^{Ab} (1.3 ± 0.7 – 87.2 ± 5.4) | 17.83 ± 1.71 ^{Cb} (0.4 ± 0.3 – 68.8 ± 5.9) | 32.07 ± 0.45 ^{Bb} (1.2 ± 0.7 – 84.5 ± 6.0) |
| Feed | 28.07 ± 1.50 ^{Ab} (1.1 ± 0.6 – 76.4 ± 8.2) | 14.63 ± 1.11 ^{Bc} (0.4 ± 0.2 – 51.3 ± 4.0) | 9.17 ± 1.95 ^{Cc} (0.2 ± 0.2 – 34.2 ± 1.9) | 14.80 ± 1.04 ^{Bc} (0.4 ± 0.2 – 49.1 ± 2.5) |
| Biofloc | 71.93 ± 1.50 ^{Aa} (23.6 ± 8.2 – 98.9 ± 0.6) | 49.67 ± 1.30 ^{Ba} (4.0 ± 2.0 – 92.3 ± 3.9) | 73.00 ± 3.64 ^{Aa} (18.6 ± 4.2 – 96.5 ± 2.5) | 53.17 ± 1.46 ^{Ba} (5.8 ± 2.8 – 92.5 ± 4.4) |

3 Data presented as mean (n = 3) ± standard deviation (mean minimum contribution ± standard deviation - mean maximum contribution ± standard deviation, 95% confidence interval). Different letters indicate significant differences according to the Student's t-test (WN) and one-way analysis of variance (ANOVA - one way) followed by the Tukey's test (5N, 10N and 15N) at 5% significance level. Uppercase letters correspond to the evaluation of source contribution as a function of treatments (source alone [row analysis]). Lowercase letters indicate significant difference between contribution of the sources in each treatment (isolated treatment [column analysis]).

SANTOS, E. P. Quantificação da contribuição da microalga *Navicula* sp. No cultivo de *Litopenaeus* ...

When evaluating correlation between the contribution of food sources (Figure 1) generated by the model, it is possible to observe a strong inverse correlation between the contribution of bioflocs in the treatments with addition of *Navicula* sp. (-0.84 to -0.82). Similarly, the relative contribution between the commercial feed and the other food sources exhibited weak to moderate inverse relationships (-0.15 to -0.41).

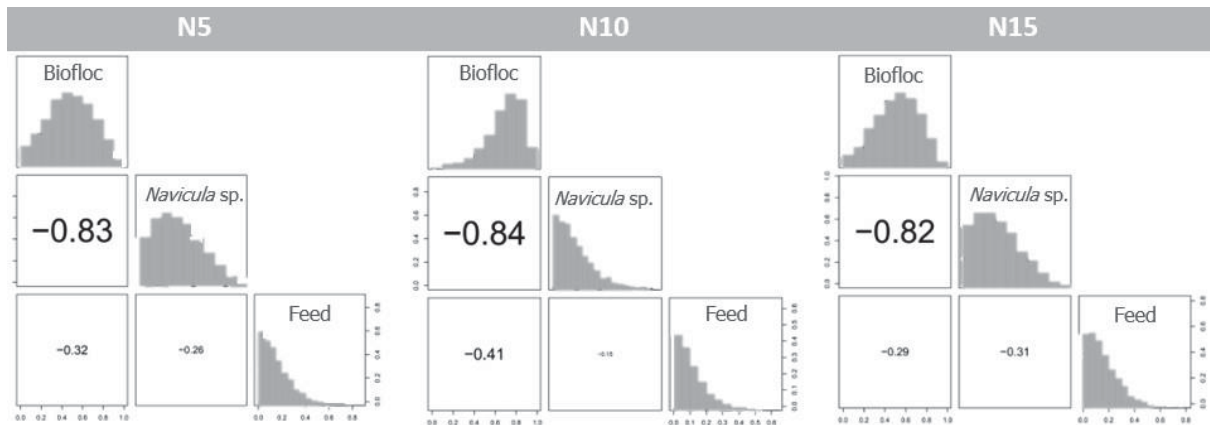


Figure 1. Correlation between the contribution of food sources (bioflocs, *Navicula* sp. and commercial feed) on the development of *Penaeus vannamei* reared in biofloc system with different frequencies of addition of the diatom *Navicula* sp.

Graphical evaluation of food sources contribution to *P. vannamei* growth in biofloc system submitted to different frequencies of addition of the microalgae *Navicula* sp. shows overlapping contributions in all treatments (Figure 2).

SANTOS, E. P. Quantificação da contribuição da microalga *Navicula* sp. No cultivo de *Litopenaeus* ...

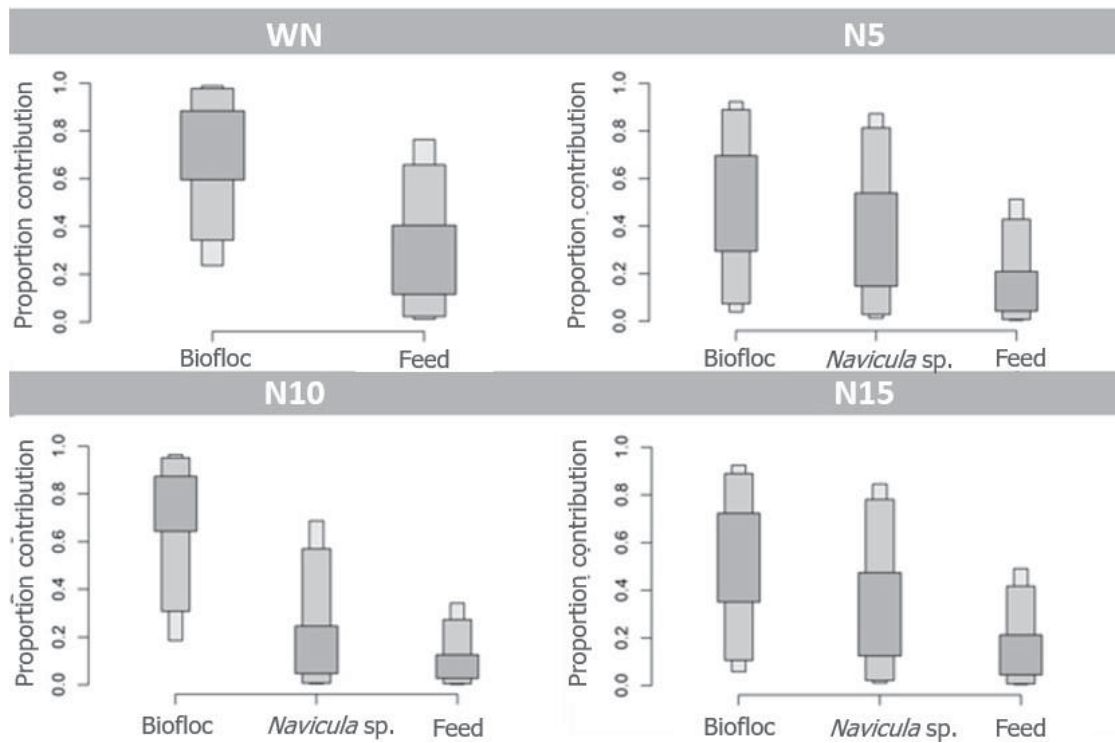


Figure 2. Correlation between the contribution of food sources (bioflocs, *Navicula* sp. and commercial feed) on the development of *P. vannamei* reared in bioflocs system with different inoculation frequencies of the microalgae *Navicula* sp.

Discussion

Throughout the experimental cultures, water quality variables (dissolved oxygen, temperature, pH, salinity, settleable solids, total ammonia nitrogen, nitrite nitrogen, and total alkalinity) remained within the recommended ranges for *P. vannamei* culture in biofloc systems (Samocha, 2019). According to Ebeling et al. (2006), it is possible to control nitrogenous compounds through their metabolization by heterotrophic bacteria, autotrophic bacteria or by algae. However, these microorganisms compete among themselves for nutrients when present in the same system. Microalgae have a very small contribution in water quality of mature biofloc systems due to dominance of the bacterial community that grows at higher rates (Samocha, 2019). Thus, addition of *Navicula* sp. every 5, 10 or 15 days do not affect stability of the biofloc system.

In super-intensive culture systems, survival rates should be higher than 80% for the culture to be considered successful (Jiménez-Ordaz et al., 2021). It is common to report nursery cultures with high survival rates using biofloc systems (Brito et al., 2014; Brito et al., 2016 b; Brito et al., 2018; Andrade et al., 2021), just like those observed in this study (over 90%). The high survival rate may be related to the culture system implemented in the nurseries since the use of bioflocs facilitate management of abiotic variables, feed control and water quality in addition to reducing contamination by pathogens. Food supplementation with enzymes and nutrients present in the bacterial flakes also favor immunity of the animals. All these factors contribute to achievement of high survival rates in the culture.

Weight gain in treatments with higher frequency of microalgae addition stood out when compared to weight gain of animals reared in a system without inoculation of *Navicula* sp. The benefit of inoculating *Navicula* sp. can also be observed when evaluating the feed conversion ratio. Lower results were obtained in cultures with higher frequency of microalgae addition (treatments N5 and N10). Indeed, the benefits of microalgae on zootechnical performance of *P. vannamei* nursery in

SANTOS, E. P. Quantificação da contribuição da microalga *Navicula* sp. No cultivo de *Litopenaeus* ...

biofloc system were also observed in other studies (Marinho et al., 2014; Brito et al., 2016; Marinho et al., 2017 and Abreu et al., 2019).

Marine microalgae may have high contents of protein, lipid and vitamins in their composition (Kang et al., 2012). The diatom *Navicula* sp. is known to have proteins and lipids mainly composed by essential amino acids and fatty acids, respectively (Pinandoyo et al., 2021). Thus, it is possible that improvements in zootechnical indices observed in this study are due to the contribution of *Navicula* sp. as a food source for *P. vannamei* post-larvae in biofloc system nursery.

The isotopic signature ($\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$) of food sources used in this study does not resemble those described by other authors (Gamboa-Delgado et al., 2011; Cardona, et al., 2015; Krummenauer et al., 2020) that used commercial feed and bioflocs for feeding *P. vannamei*. However, $\delta^{13}\text{C}$ values of *Navicula* sp. are similar to those reported by Parker et al. (1989). Variation in the isotopic composition of food sources as well as the animals can be explained through the statement used by Parker et al. (1989): "you are what you eat". In other words, the isotopic signature of an animal will reflect the signature of its food sources that, in turn, will reflect their origins. Thus, the isotopic values of the feed will result from the signature and proportion of ingredients used in its constitution (Gamboa-Delgado et al, 2011). The signature of biofloc may vary depending on the carbon and nitrogen sources used in its formation as well as on its microorganism composition. Similarly, microalgae isotopic values is influenced not only by taxonomy but also growth stage and culture media composition (Brutemark et al., 2009). In photosynthetic organisms, $\delta^{15}\text{N}$ values can be influenced by sources of nitrogen in the environment and manipulation of fertilizers in aquaculture ponds. In contrast, $\delta^{13}\text{C}$ values are strongly linked to photosynthetic pathways during carbon fixation (Gamboa-Delgado et al., 2013).

In this study, values of $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ of bioflocs showed no significant effect using different inoculation frequencies of the microalgae *Navicula* sp. added to a culture of *P. vannamei*. Abreu et al. (2019) observed an increase in the concentration of fatty acids in biofloc systems cultured with

SANTOS, E. P. Quantificação da contribuição da microalga *Navicula* sp. No cultivo de *Litopenaeus* ...

Navicula sp. and attributed such an increase to the presence of microalgae in the biofloc formation. However, results of this study indicate that *Navicula* sp. does not contribute directly to the biofloc composition which would explain the similarity between $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ values of biofloc in treatments with and without *Navicula* sp. addition. According to Jiménez-Ordez et al. (2021), microalgae may indirectly contribute to the formation and nutritional value of bioflocs since they serve as a food source for other organisms (ciliates, rotifers and nematodes) that compose the biofloc.

Knowledge of the isotopic composition ($\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$) of food sources and consumers allows the use of mixture models for estimating contribution of different foods to shrimp growth. However, it is necessary to use appropriate isotopic discrimination factors for more accurate estimates of food source contributions (Phillips, 2012; Suita et al., 2016). Carbon isotopic discrimination factors used in this study were close to the limits suggested by Peterson and Fry (1987), Dittel et al. (1997) and Vanderklift and Ponsard (2003) who suggested $\Delta^{13}\text{C}$ values between 0.4 and 1.0‰ for aquatic organisms. However, the same authors suggest nitrogen isotopic discrimination factors between 2.5 and 4.0‰, differing from values observed in this study. Gamboa-Delgado et al. (2013) obtained $\Delta^{13}\text{C}$ ranging from -0.1 to 2.7‰ and $\Delta^{15}\text{N}$ from 0.3 to 5.8‰ when estimating the nutritional contribution of three protein sources to *P. vannamei* growth. Tierney and Ray (2018) reported $\Delta^{13}\text{C}$ of -0.2‰ and $\Delta^{15}\text{N}$ of 0.4‰ when evaluating clearwater nursery and biofloc system for *P. vannamei* shrimp production. The isotopic discrimination rate can vary depending on several factors, including consumer class, environment and isotopic signature of the diet, so it is necessary to consider the controlled estimation of the discrimination factor according to the diets that will be offered (Caut et al., 2009).

In this study, it was observed a significant effect of the frequency of addition of *Navicula* sp. to the relative contribution of food sources for the development of *P. vannamei* reared in biofloc system. Furthermore, there is an overlap on the contribution of different food sources regardless of experimental treatment. This indicates that *P. vannamei* juveniles do not show a food preference

SANTOS, E. P. Quantificação da contribuição da microalga *Navicula* sp. No cultivo de *Litopenaeus* ...

among the investigated sources, and all of them are important for its growth. Such a fact is related to its omnivorous feeding habit which allows shrimps to feed on organic matter, exhibiting food plasticity. Overlaps of food sources contribution to the development of *P. vannamei* was also observed by Suita et al. (2016).

The average commercial feed contribution to the growth of *P. vannamei* varied between 9.17 and 28.07%. The highest contribution rate was observed in the treatment with no microalgae inoculation, while the lowest was observed in the treatment with *Navicula* sp. inoculation every 10 days. Such a disparity was expected since the models estimate relative contributions adopting absolute sources in the system. Thus, the number of sources is reflected in the relativization of the proportion of contribution to the animal's development. Contribution ranges of commercial feed (1.1 - 76.4% without *Navicula* sp. addition) observed in this study are similar to those reported by Suita et al. (2016). These authors evaluated three commercial feeds (Flake-Inve, Stresspak and PL40-Guabi) in a nursery culture of *P. vannamei*, observing relative contributions ranging from 0-51% for Flake-Inve feed, 0-45% for Stresspak feed and 13-68% for PL40-Guabi feed. These ranges are similar to those found in this study.

Commercial feed plays an important role in providing protein to the culture of aquatic organisms. Although most nutrients present in commercial feed are not directly assimilated by *P. vannamei*, they contribute to the biofloc system indirectly since 50-80% of them are available for development of plankton as well as heterotrophic or autotrophic bacteria. Feed quality is also a factor that affects the composition of the microbial community. Although feed represents the smallest contribution to shrimp nutrition, it is indispensable to the system and for supplying certain essential nutrients (Avnimelech, 1999; Burford and Williams, 2001; Burford et al., 2003; Emerenciano et al., 2017). In turn, plankton and bacterial communities in the system are important elements to the formation of bioflocs, They can act as a supplementary food source to shrimps (Samocha et al., 2019; Castro et al., 2021), providing a new chance for assimilation of commercial feed nutrients that were

SANTOS, E. P. Quantificação da contribuição da microalga *Navicula* sp. No cultivo de *Litopenaeus* ...

not initially absorbed by the animals. Furthermore, bioflocs can represent an extracellular source of digestive enzymes such as protease, amylase, lipase and cellulase (Wang et al., 2016) that can assist in the breakdown of nutrients, increasing digestibility and absorption of nutrients by shrimps (Xu and Pan, 2012; Xu et al., 2013; Wang et al., 2016).

Biofloc showed average contribution between 49.67 and 73.00% for the development of *P. vannamei* in the experiment. It was the most important food source in all treatments. The one with no addition of *Navicula* sp. showed higher biofloc assimilation rates than those found in treatments with diatom addition every 5 and 15 days. In contrast, the highest biofloc assimilation was observed in the treatment with addition of microalgae every 10 days. It is possible that such a finding is due to alteration of the nutritional composition of the biofloc as a consequence of the frequency of addition of *Navicula* sp. to the culture media. Further studies should be carried out for evaluating such an effect on the composition of nutrients and microorganisms in the biofloc.

Other authors also argue that biofloc is a relevant food source to the growth of *P. vannamei*. For instance, Ray et al. (2017) observed that biofloc contributed up to 60% of carbon to shrimp growth while Ray and Lotz (2017) reported a biofloc contribution of 59% of nitrogen to the species' growth. Suita et al. (2016) provided *Artemia* sp., *Chaetoceros muelleri*, three different commercial feeds and biofloc as food sources to *P. vannamei* post-larvae. The authors observed that the range of biofloc assimilation (0 to 54%) is the most important for post-larval growth. The high proportion of biofloc contribution as a food source to *P. vannamei* juveniles may be related to its high nutritional value. In addition to being considered a natural source of extracellular digestive enzymes, these flocs are rich in bacterial biomass which in turn have nutritional characteristics that allow their use as a substitute for fishmeal in diets of reared aquatic organisms (Gamboa-Delgado et al., 2020). Moreover, juveniles of *P. vannamei* feed continuously over the day (Reis et al., 2020; Xu et al., 2020). Thus, constant availability of biofloc particles in the culture may facilitate their use as a food item for consumption.

SANTOS, E. P. Quantificação da contribuição da microalga *Navicula* sp. No cultivo de *Litopenaeus* ...

The highest average relative contribution of *Navicula* sp. to the development of *P. vannamei* was observed in the treatment with microalgae addition every 5 days. In contrast, the lowest contribution was found in the treatment with *Navicula* sp. inoculation every 10 days. It is important to note that although microalgae were made available at intervals of 5, 10 or 15 days, their average contribution ranged from 17.83 to 35.83%, which makes *Navicula* sp. as the second most important food for juveniles of *P. vannamei* in all treatments with *Navicula* sp. Diatom addition every 10 days reduced the shrimp demand for commercial feed. This can be attributed to the fact that *Navicula* sp. possibly improves the biofloc nutritional quality, reducing the need for commercial feed (Abreu et al. 2019).

Conclusion

Frequency of addition of the diatom *Navicula* sp. at each 10 days to biofloc nursery system of *Penaeus vannamei* do not affect the post-larvae weight gain and feed conversion ratio, but can reduce the demand for feed. In addition, we prove that biofloc and *Navicula* sp. have a significant contribution in the feeding of shrimp. This is related to the nutritional value and high digestibility of natural foods as well as their availability in the system.

References

- Abreu, J.L., Brito, L.O., Lima, P.C.M., Silva, S.M.B.C. da, Severi, W., Gálvez, A.O., 2019. Effects of addition of *Navicula* sp. (diatom) in different densities to postlarvae of shrimp *Litopenaeus vannamei* reared in a BFT system: Growth, survival, productivity and fatty acid profile. *Aquac. Res.* 50, 2231–2239. <https://doi.org/10.1111/are.14104>
- Andrade, R.J.V., Santos, E.P., de Almeida Costa, G.K., Campos, C.V.F. da S., da Silva, S.M.B.C., Gálvez, A.O., Brito, L.O., 2021. Effect of different frequencies of the addition of *Brachionus plicatilis* on the performance of *Litopenaeus vannamei* in a nursery biofloc system with rice bran (anaerobic and aerobic) as an organic carbon source. *Aquaculture* 540, 736669. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.736669>
- APHA - American Public Health Association, 2017. Standard methods for the examination of water and wastewater, 23o ed. American Water Works Association.
- Avnimelech, Y., 2009. Biofloc technology: A practical guide book. World Aquaculture Society.
- Avnimelech, Y., 1999. Carbon/nitrogen ratio as a control element in aquaculture systems. *Aquaculture* 176, 227–235. [https://doi.org/10.1016/s0044-8486\(99\)00085-x](https://doi.org/10.1016/s0044-8486(99)00085-x)
- Brito, L.O., Arantes, R., Magnotti, C., Derner, R., Pchara, F., Olivera, A., Vinatea, L., 2014. Water quality and growth of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone) in co-culture with green seaweed *Ulva lactuca* (Linnaeus) in intensive system. *Aquac. Int.* 22, 497–508. <https://doi.org/10.1007/s10499-013-9659-0>
- Brito, L.O., Chagas, A.M., da Silva, E.P., Soares, R.B., Severi, W., Gálvez, A.O., 2016a. Water quality, *Vibrio* density and growth of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone) in an integrated biofloc system with red seaweed *Gracilaria birdae* (Greville). *Aquac. Res.* 47, 940–950. <https://doi.org/10.1111/are.12552>
- Brito, L.O., dos Santos, I.G.S., de Abreu, J.L., de Araújo, M.T., Severi, W., Gálvez, A.O., 2016b. Effect of the addition of diatoms (*Navicula* spp.) and rotifers (*Brachionus plicatilis*) on water quality and growth of the *Litopenaeus vannamei* postlarvae reared in a biofloc system. *Aquac. Res.* 47, 3990–3997. <https://doi.org/10.1111/are.12849>

SANTOS, E. P. Quantificação da contribuição da microalga *Navicula* sp. No cultivo de *Litopenaeus* ...

Brito, L.O., Junior, L.C., Abreu, J.L., Severi, W., Moraes, L.B.S., Galvez, A.O., 2018. Effects of two commercial feeds with high and low crude protein content on the performance of white shrimp *Litopenaeus vannamei* raised in an integrated biofloc system with the seaweed *Gracilaria birdiae*. Span. J. Agric. Res. 16, e0603. <https://doi.org/10.5424/sjar/2018161-11451>

Brutemark, A., Lindehoff, E., Granéli, E., Granéli, W., 2009. Carbon isotope signature variability among cultured microalgae: Influence of species, nutrients and growth. J. Exp. Mar. Bio. Ecol. 372, 98–105. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2009.02.013>

Burford, M.A., Thompson, P.J., McIntosh, R.P., Bauman, R.H., Pearson, D.C., 2003. Nutrient and microbial dynamics in high-intensity, zero-exchange shrimp ponds in Belize. Aquaculture 219, 393–411. [https://doi.org/10.1016/s0044-8486\(02\)00575-6](https://doi.org/10.1016/s0044-8486(02)00575-6)

Burford, M.A., Williams, K.C., 2001. The fate of nitrogenous waste from shrimp feeding. Aquaculture 198, 79–93. [https://doi.org/10.1016/s0044-8486\(00\)00589-5](https://doi.org/10.1016/s0044-8486(00)00589-5)

Cardona, E., Lorgeoux, B., Geffroy, C., Richard, P., Saulnier, D., Gueguen, Y., Guillou, G., Chim, L., 2015. Relative contribution of natural productivity and compound feed to tissue growth in blue shrimp (*Litopenaeus stylirostris*) reared in biofloc: Assessment by C and N stable isotope ratios and effect on key digestive enzymes. Aquaculture 448, 288–297. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.05.035>

Castro, L.F., Pinto, R.C.C., Nunes, A.J.P., 2021. Nutrient value and contribution of microbial floc to the growth performance of juvenile shrimp, *Litopenaeus vannamei*, fed fatty acid and amino acid-restrained diets under a zero-water exchange intensive system. Aquaculture 531, 735789. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735789>

Caut, S., Angulo, E., Courchamp, F., 2009. Variation in discrimination factors ($\Delta^{15}\text{N}$ and $\Delta^{13}\text{C}$): the effect of diet isotopic values and applications for diet reconstruction. J. Appl. Ecol. 46, 443–453. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2664.2009.01620.x>

Colvin, L.B., Brand, C.W., 1977. The protein requirement of penaeid shrimp at various life-cycle stages in controlled environment systems. Proc. Annu. Meet. 8, 821–840. <https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.1977.tb00164.x>

Costa, B.V.M., Yogui, G.T., 2017. Elaboração de lote analítico, edição de método e processamento de amostra no software Isodat. Procedimento Operacional Padrão OrganoMAR-2017-03,

SANTOS, E. P. Quantificação da contribuição da microalga *Navicula* sp. No cultivo de *Litopenaeus* ...

Revisão no 1. Laboratório de Compostos Orgânicos em Ecossistemas Costeiros e Marinheiros, Departamento de Oceanografia, Universidade Federal de Pernambuco.

Dall, W., Hill, B.L., Rothlisburg, P.C., Staples, D.J., 1990. The biology of the Penaeidae. *Adv. Mar. Biol.* 27: 167–170

De 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>

Dittel, A.I., Epifanio, C.E., Cifuentes, L.A., Kirchman, D.L., 1997. Carbon and nitrogen sources for shrimp postlarvae fed natural diets from a tropical mangrove system. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 45, 629–637. <https://doi.org/10.1006/ecss.1996.0228>

Ebeling, J.M., Timmons, M.B., Bisogni, J.J., 2006. Engineering analysis of the stoichiometry of photoautotrophic, autotrophic, and heterotrophic removal of ammonia–nitrogen in aquaculture systems. *Aquaculture* 257, 346–358. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.03.019>

Ekasari, J., Angela, D., Waluyo, S.H., Bachtiar, T., Surawidjaja, E.H., Bossier, P., De Schryver, P., 2014. The size of biofloc determines the nutritional composition and the nitrogen recovery by aquaculture animals. *Aquaculture* 426–427, 105–111. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.01.023>

Emerenciano, M.G.C., Martínez-Córdova, L.R., Martínez-Porchas, M., Miranda-Baeza, A., 2017. Biofloc technology (BFT): A tool for water quality management in aquaculture, em: *Water Quality*. InTech.

Emerenciano, M.G.C., Miranda-Baeza, A., Martínez-Porchas, M., Poli, M.A., Vieira, F. do N., 2021. Biofloc technology (BFT) in shrimp farming: Past and present shaping the future. *Front. Mar. Sci.* 8. <https://doi.org/10.3389/fmars.2021.813091>

Fries, J., 1971. *Análisis de Trazas. Métodos fotométricos comprobados*. E. Merck.

Fry, B., 2006. *Stable Isotope Ecology*, 3 rd. ed. Springer, Nova Iorque, NY, USA.

SANTOS, E. P. Quantificação da contribuição da microalga *Navicula* sp. No cultivo de *Litopenaeus* ...

Gamboa-Delgado, J., 2022. Isotopic techniques in aquaculture nutrition: State of the art and future perspectives. *Rev. Aquac.* 14, 456–476. <https://doi.org/10.1111/raq.12609>

Gamboa-Delgado, J., Peña-Rodríguez, A., Ricque-Marie, D., Cruz-Suárez, L.E., 2011. Assessment of nutrient allocation and metabolic turnover rate in pacific white Shrimp *Litopenaeus vannamei* Co-fed live Macroalgae *Ulva clathrata* and inert feed: Dual stable isotope analysis. *J. Shellfish Res.* 30, 969–978. <https://doi.org/10.2983/035.030.0340>

Gamboa-Delgado, J., Rodríguez Montes de Oca, G.A., Román Reyes, J.C., Villarreal-Cavazos, D.A., Nieto-López, M., Cruz-Suárez, L.E., 2017. Assessment of the relative contribution of dietary nitrogen from fish meal and biofloc meal to the growth of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Aquac. Res.* 48, 2963–2972. <https://doi.org/10.1111/are.13129>

Gamboa-Delgado, J., Rojas-Casas, M.G., Nieto-López, M.G., Cruz-Suárez, L.E., 2013. Simultaneous estimation of the nutritional contribution of fish meal, soy protein isolate and corn gluten to the growth of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) using dual stable isotope analysis. *Aquaculture* 380–383, 33–40. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.11.028>

Gamboa-Delgado, J., Nieto-López, M.G., Maldonado-Muñiz, M., Villarreal-Cavazos, D., Tapia-Salazar, M., Cruz-Suárez, L. E., 2020. Comparing the assimilation of dietary nitrogen supplied by animal-, plant-and microbial-derived ingredients in Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*: A stable isotope study. *Aquaculture reports*, 17, 100294. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2020.100294>

Gamerman, D., Lopes, H.F., 2006. Markov chain Monte Carlo: Stochastic simulation for Bayesian inference, second edition, 2o ed. Chapman & Hall/CRC, Filadélfia, PA, USA.

Gelman, A., Rubin, D.B., 1992. Inference from iterative simulation using multiple sequences. *Stat. Sci.* 7, 457–472. <https://doi.org/10.1214/ss/1177011136>

Jiménez-Ordaz, F.J., Cadena-Roa, M.A., Pacheco-Vega, J.M., Rojas-Contreras, M., Tovar-Ramírez, D., Arce-Amezquita, P.M., 2021. Microalgae and probiotic bacteria as biofloc inducers in a hyper-intensive Pacific white shrimp (*Penaeus vannamei*) culture. *Lat. Am. J. Aquat. Res.* 49, 155–168. <https://doi.org/10.3856/vol49-issue1-fulltext-2442>

SANTOS, E. P. Quantificação da contribuição da microalga *Navicula* sp. No cultivo de *Litopenaeus* ...

Kang, K.-H., Qian, Z.-J., Ryu, B., Kim, D., Kim, S.-K., 2012. Protective effects of protein hydrolysate from marine microalgae *Navicula incerta* on ethanol-induced toxicity in HepG2/CYP2E1 cells. *Food Chem.* 132, 677–685. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.10.031>

Khatoon, H., Banerjee, S., Yusoff, F.M., Shariff, M., 2009. Evaluation of indigenous marine periphytic *Amphora*, *Navicula* and *Cymbella* grown on substrate as feed supplement in *Penaeus monodon* postlarval hatchery system. *Aquac. Nutr.* 15, 186–193. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2008.00582.x>

Krummenauer, D., Abreu, P.C., Poersch, L., Reis, P.A.C.P., Suita, S.M., dos Reis, W.G., Wasielesky, W., Jr, 2020. The relationship between shrimp (*Litopenaeus vannamei*) size and biofloc consumption determined by the stable isotope technique. *Aquaculture* 529, 735635. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735635>

Kureshy, N., Davis, D.A., 2002. Protein requirement for maintenance and maximum weight gain for the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture* 204, 125–143. [https://doi.org/10.1016/s0044-8486\(01\)00649-4](https://doi.org/10.1016/s0044-8486(01)00649-4)

Lunda, R., Roy, K., Dvorak, P., Kouba, A., Mraz, J., 2020. Recycling biofloc waste as novel protein source for crayfish with special reference to crayfish nutritional standards and growth trajectory. *Sci. Rep.* 10, 19607. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-76692-0>

Mansour, A.T., Ashry, O.A., Ashour, M., Alsaqufi, A.S., Ramadan, K.M.A., Sharawy, Z.Z., 2022. The optimization of dietary protein level and carbon sources on biofloc nutritive values, bacterial abundance, and growth performances of whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) juveniles. *Life (Basel)* 12, 888. <https://doi.org/10.3390/life12060888>

Marinho, Y.F., Brito, L.O., Figueiredo da Silva, C.V., Sobral dos Santos, I.G., Olivera Galvez, A., 2014. Effect of addition of *Navicula* sp. on plankton composition and postlarvae growth of *Litopenaeus vannamei* reared in culture tanks with zero water exchange. *Lat. Am. J. Aquat. Res.* 42, 427–437. <https://doi.org/10.3856/vol42-issue3-fulltext-4>

Marinho, Y.F., Brito, L.O., Silva Campos, C.V.F. da, Severi, W., Andrade, H.A., Galvez, A.O., 2017. Effect of the addition of *Chaetoceros calcitrans*, *Navicula* sp. and *Phaeodactylum tricornutum* (diatoms) on phytoplankton composition and growth of *Litopenaeus vannamei*

SANTOS, E. P. Quantificação da contribuição da microalga *Navicula* sp. No cultivo de *Litopenaeus* ...

(Boone) postlarvae reared in a biofloc system. *Aquac. Res.* 48, 4155–4164.
<https://doi.org/10.1111/are.13235>

Oliveira, C. Y. B., Oliveira, C. D. L., Prasad, R., Ong, H. C., Araujo, E. S., Shabnam, N., Gálvez, A. O., 2021. A multidisciplinary review of *Tetradesmus obliquus*: a microalga suitable for large-scale biomass production and emerging environmental applications. *Rev. Aquac.* 13(3): 1594–1618. <https://doi.org/10.1111/raq.12536>

Oliveira, C. Y. B., Jacob, A., Nader, C., Oliveira, C. D. L., Matos, Â. P., Araújo, E. S., Shabnam, N., Ashok, B., Gálvez, A. O., 2022. An overview on microalgae as renewable resources for meeting sustainable development goals. *J. Environ. Manag.* 320: 115897. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2022.115897>

Parker, P.L., Anderson, R.K., Lawrence, A., 1989. A $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ Tracer Study of Nutrition in Aquaculture: *Penaeus vannamei* in a Pond Growout System. Springer-Verlag, New York.

Pearson, S.F., Levey, D.J., Greenberg, C.H., Martínez Del Rio, C., 2003. Effects of elemental composition on the incorporation of dietary nitrogen and carbon isotopic signatures in an omnivorous songbird. *Oecologia* 135, 516–523. <https://doi.org/10.1007/s00442-003-1221-8>

Peterson, B.J., Fry, B., 1987. Stable isotopes in ecosystem studies. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 18, 293–320. <https://doi.org/10.1146/annurev.es.18.110187.001453>

Phillips, D.L., 2012. Converting isotope values to diet composition: the use of mixing models. *J. Mammal.* 93, 342–352. <https://doi.org/10.1644/11-mamm-s-158.1>

Phillips, D.L., Koch, P.L., 2002. Incorporating concentration dependence in stable isotope mixing models. *Oecologia* 130, 114–125. <https://doi.org/10.1007/s004420100786>

Pinandoyo, P., Elfitasari, T., Windarto S., Herawati, V.E., 2021. Growth Performance and Nutrient Value of *Nereis virens* Fed by *Thalassiosira* sp. and *Navicula* sp. *Journal of Hunan University (Natural Sciences)* 256–265.

R Core Team, 2022. R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.

SANTOS, E. P. Quantificação da contribuição da microalga *Navicula* sp. No cultivo de *Litopenaeus* ...

Ray, A.J., Drury, T.H., Cecil, A., 2017. Comparing clear-water RAS and biofloc systems: Shrimp (*Litopenaeus vannamei*) production, water quality, and biofloc nutritional contributions estimated using stable isotopes. *Aquacult. Eng.* 77, 9–14.

<https://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2017.02.002>

Ray, A.J., Lotz, J.M., 2017. Shrimp (*Litopenaeus vannamei*) production and stable isotope dynamics in clear-water recirculating aquaculture systems versus biofloc systems. *Aquac. Res.* 48, 4390–4398. <https://doi.org/10.1111/are.13262>

Ray, A.J., Lotz, J.M., 2014. Comparing a chemoautotrophic-based biofloc system and three heterotrophic-based systems receiving different carbohydrate sources. *Aquacult. Eng.* 63, 54–61. <https://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2014.10.001>

Reis, J., Novriadi, R., Swanepoel, A., Jingping, G., Rhodes, M., Davis, D.A., 2020. Optimizing feed automation: improving timer-feeders and on demand systems in semi-intensive pond culture of shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*, 519, 734759. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734759>

Samocha, T.M., 2019. Sustainable Biofloc Systems for Marine Shrimp. Academic Press, San Diego, CA, USA.

Stock, B.C., Jackson, A.L., Ward, E.J., Parnell, A.C., Phillips, D.L., Semmens, B.X., 2018. Analyzing mixing systems using a new generation of Bayesian tracer mixing models. *PeerJ* 6, e5096. <https://doi.org/10.7717/peerj.5096>

Suita, S.M., Braga, A., Ballester, E., Cardozo, A.P., Abreu, P.C., Wasielesky, W., Jr, 2016. Contribution of bioflocs to the culture of *Litopenaeus vannamei* post-larvae determined using stable isotopes. *Aquac. Int.* 24, 1473–1487. <https://doi.org/10.1007/s10499-016-0006-0>

Tierney, T.W., Ray, A.J., 2018. Comparing biofloc, clear-water, and hybrid nursery systems (Part I): Shrimp (*Litopenaeus vannamei*) production, water quality, and stable isotope dynamics. *Aquacult. Eng.* 82, 73–79. <https://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2018.06.002>

Van Wyk, P., 1999. Farming marine shrimp in recirculating freshwater systems.

Vanderklift, M.A., Ponsard, S., 2003. Sources of variation in consumer-diet delta 15N enrichment: a meta-analysis. *Oecologia* 136, 169–182. <https://doi.org/10.1007/s00442-003-1270-z>

SANTOS, E. P. Quantificação da contribuição da microalga *Navicula* sp. No cultivo de *Litopenaeus* ...

Walne, P.R., 1970. Present problems in the culture of the larvae of *Ostrea edulis*. Helgolander Wiss. Meeresunters 20, 514–525. <https://doi.org/10.1007/bf01609926>

Wang, C., Pan, L., Zhang, K., Xu, W., Zhao, D., Mei, L., 2016. Effects of different carbon sources addition on nutrition composition and extracellular enzymes activity of bioflocs, and digestive enzymes activity and growth performance of *Litopenaeus vannamei* in zero-exchange culture tanks. Aquac. Res. 47, 3307–3318. <https://doi.org/10.1111/are.12784>

Xu, W.-J., Pan, L.-Q., 2012. Effects of bioflocs on growth performance, digestive enzyme activity and body composition of juvenile *Litopenaeus vannamei* in zero-water exchange tanks manipulating C/N ratio in feed. Aquaculture 356–357, 147–152. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.05.022>

Xu, W.J., Pan, L.Q., Sun, X.H., Huang, J., 2013. Effects of bioflocs on water quality, and survival, growth and digestive enzyme activities of *Litopenaeus vannamei* (Boone) in zero-water exchange culture tanks. Aquac. Res. 44, 1093–1102. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2012.03115.x>

Zainuddin, H., Aslamyah, S., 2014. Effect of dietary carbohydrate levels and feeding frequencies on growth and carbohydrate digestibility by white shrimp *Litopenaeus vannamei* under laboratory conditions. J. Aquac. Res. Dev. 05. <https://doi.org/10.4172/2155-9546.1000274>

2. Considerações finais

A análise cienciométrica da utilização da análise de isótopos estáveis como uma ferramenta no desenvolvimento da aquicultura, aponta para uma crescente adoção desta estratégia em função de sua versatilidade e contribuição valiosa para pesquisas e práticas sustentáveis no setor. No entanto, salienta a existência de vastas oportunidades ainda não exploradas nesse campo, enfatizando a importância da colaboração entre pesquisadores, instituições e regiões para ampliar o uso dessas técnicas. Por outro lado, a utilização desta técnica para avaliar a contribuição de diferentes fontes alimentares em um berçário de *P. vannamei* revela duas importantes conclusões no campo da aquicultura. Primeiramente, demonstra que a utilização de biofloco e da diatomácea *Navicula* sp. como uma possibilidade de redução significativamente a demanda por ração em sistemas de berçário de *Penaeus vannamei* ou para a sua implementação com o objetivo de obtenção de animais com maior peso médio final para o setor produtivo ou redução do tempo de cultivo para se obter o peso médio comercial, realçando sua relevância na alimentação de camarões devido à alta qualidade nutricional e digestibilidade desses recursos naturais. Em conjunto, essas descobertas ressaltam a importância contínua da pesquisa e desenvolvimento no setor aquícola, fornecendo um direcionamento claro para futuras investigações com o objetivo de aprimorar a aquicultura e promover o uso sustentável dos recursos aquáticos.

3. Referencias

Abreu, J.L., Brito, L.O., Lima, P.C.M., Silva, S.M.B.C. da, Severi, W., Gálvez, A.O., 2019. Effects of addition of *Navicula* sp. (diatom) in different densities to postlarvae of shrimp *Litopenaeus vannamei* reared in a BFT system: Growth, survival, productivity and fatty acid profile. *Aquac. Res.* 50, 2231–2239. <https://doi.org/10.1111/are.14104>

Amy Burke, Okrent, A., Hale, K., [s.d.]. The State of U.S. Science and Engineering 2022 [WWW Document]. Nsf.gov. URL <https://ncses.nsf.gov/pubs/nsb20221/u-s-and-global-research-and-development> (acesso em 9.19.23).

Brander, K., Cochrane, K., Barange, M., Soto, D., 2017. Climate Change Implications for Fisheries and Aquaculture. *Climate Change Impacts on Fisheries and Aquaculture.* <https://doi.org/10.1002/9781119154051.ch3>

Colombo, S.M., Parrish, C.C., Whiticar, M.J., 2016. Fatty acid stable isotope signatures of molluscs exposed to finfish farming outputs. *Aquac. Environ. Interact.* 8, 611–617. <https://doi.org/10.3354/aei00202>

Cutajar, K., Falconer, L., Massa-Gallucci, A., Cox, R.E., Schenke, L., Bardócz, T., Andolina, C., Signa, G., Vizzini, S., Sprague, M., Telfer, T.C., 2022. Stable isotope and fatty acid analysis reveal the ability of sea cucumbers to use fish farm waste in integrated multi-trophic aquaculture. *J. Environ. Manage.* 318, 115511. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2022.115511>

de Moraes, L.B.S., Santos, R.F.B., Gonçalves Junior, G.F., Mota, G.C.P., Dantas, D.M. de M., de Souza Bezerra, R., Olivera Gálvez, A., 2022. Microalgae for feeding of penaeid shrimp larvae: an overview. *Aquac. Int.* 30, 1295–1313. <https://doi.org/10.1007/s10499-022-00857-z>

Delattre, E., Techer, I., Reneaud, B., Thireau, V., Verdoux, P., Prohin, P., 2020. Sr isotope discrimination of multi species aquaculture productions at a worldwide scale and contribution of the water reservoir in Sr plant input. *Heliyon* 6, e03075. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e03075>

Donthu, N., Kumar, S., Mukherjee, D., Pandey, N., Lim, W.M., 2021. How to conduct a bibliometric analysis: An overview and guidelines. *J. Bus. Res.* 133, 285–296. <https://doi.org/10.1016/j.jbusres.2021.04.070>

Ekasari, J., Angela, D., Waluyo, S.H., Bachtiar, T., Surawidjaja, E.H., Bossier, P., De Schryver, P., 2014. The size of biofloc determines the nutritional composition and the nitrogen recovery by

SANTOS, E. P. Quantificação da contribuição da microalga *Navicula* sp. No cultivo de *Litopenaeus* ...
 aquaculture animals. Aquaculture 426–427, 105–111.
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.01.023>

Emerenciano, M.G.C., Miranda-Baeza, A., Martínez-Porchas, M., Poli, M.A., Vieira, F. do N., 2021. Biofloc technology (BFT) in shrimp farming: Past and present shaping the future. *Front. Mar. Sci.* 8. <https://doi.org/10.3389/fmars.2021.813091>

Ferreira Marinho, Y., Brito, L.O., Figueiredo da Silva, C.V., Sobral dos Santos, I.G., Olivera Galvez, A., 2014. Effect of addition of *Navicula* sp. on plankton composition and postlarvae growth of *Litopenaeus vannamei* reared in culture tanks with zero water exchange. *Lat. Am. J. Aquat. Res.* 42, 427–437. <https://doi.org/10.3856/vol42-issue3-fulltext-4>

Food and Agriculture Organization, 2022. The state of world fisheries and aquaculture 2022 (SOFIA): Towards blue transformation. Food & Agriculture Organization of the United Nations (FAO), Roma, Italy.

Gamboa-Delgado, J., 2022. Isotopic techniques in aquaculture nutrition: State of the art and future perspectives. *Rev. Aquac.* 14, 456–476. <https://doi.org/10.1111/raq.12609>

Gamboa-Delgado, J., Nieto-López, M.G., Maldonado-Muñiz, M., Villarreal-Cavazos, D., Tapia-Salazar, M., Cruz-Suárez, L.E., 2020. Comparing the assimilation of dietary nitrogen supplied by animal-, plant- and microbial-derived ingredients in Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*: A stable isotope study. *Aquac. Rep.* 17, 100294. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2020.100294>

Gamboa-Delgado, J., Rodríguez Montes de Oca, G.A., Román Reyes, J.C., Villarreal-Cavazos, D.A., Nieto-López, M., Cruz-Suárez, L.E., 2017. Assessment of the relative contribution of dietary nitrogen from fish meal and biofloc meal to the growth of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Aquac. Res.* 48, 2963–2972. <https://doi.org/10.1111/are.13129>

Gamboa-Delgado Julián, Molina-Poveda César, Enrique, G.-S., Villarreal-Cavazos David, Ricque-Marie Denis, Elizabeth, C.-S., 2014. Application of stable isotope analysis to differentiate shrimp extracted by industrial fishing or produced through aquaculture practices. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences.* <https://doi.org/10.1139/cjfas-2014-0005>

Gosmann, A., 2021. OECD Main Science and Technology Indicators - Highlights on R&D expenditure.

Khatoon, H., Banerjee, S., Yusoff, F.M., Shariff, M., 2009. Evaluation of indigenous marine periphytic *Amphora*, *Navicula* and *Cymbella* grown on substrate as feed supplement in *Penaeus* monodon postlarval hatchery system. *Aquac. Nutr.* 15, 186–193. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2008.00582.x>

Li, L., Boyd, C.E., Sun, Z., 2016. Authentication of fishery and aquaculture products by multi-element and stable isotope analysis. *Food Chem.* 194, 1238–1244. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.08.123>

Mayor, D.J., Gray, N.B., Hattich, G.S.I., Thornton, B., 2017. Detecting the presence of fish farm-derived organic matter at the seafloor using stable isotope analysis of phospholipid fatty acids. *Sci. Rep.* 7, 5146. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-05252-w>

Michener, R., Lajtha, K., 2008. *Stable Isotopes in Ecology and Environmental Science*, 2o ed. Wiley-Blackwell, Hoboken, NJ, USA.

Mingers, J., Leydesdorff, L., 2015. A review of theory and practice in scientometrics. *Eur. J. Oper. Res.* 246, 1–19. <https://doi.org/10.1016/j.ejor.2015.04.002>

Mortillaro, J.-M., Dabbadie, L., Raminoharisoa, A.E., Paradis, A., Martel, P., Andriamarolaza, R., Raliniaina, M., Mikolasek, O., Aubin, J., 2022. Trophic functioning of integrated rice-fish farming in Madagascar: Insights from stable isotopes ($\delta^{13}\text{C}$ & $\delta^{15}\text{N}$). *Aquaculture* 555, 738240. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2022.738240>

Oliveira, C.Y.B., Jacob, A., Nader, C., Oliveira, C.D.L., Matos, Â.P., Araújo, E.S., Shabnam, N., Ashok, B., Gálvez, A.O., 2022. An overview on microalgae as renewable resources for meeting sustainable development goals. *J. Environ. Manage.* 320, 115897. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2022.115897>

Ray, A.J., Lotz, J.M., 2014. Comparing a chemoautotrophic-based biofloc system and three heterotrophic-based systems receiving different carbohydrate sources. *Aquacult. Eng.* 63, 54–61. <https://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2014.10.001>

Samocha, T.M., 2019. *Sustainable Biofloc Systems for Marine Shrimp*. Academic Press, San Diego, CA.

SANTOS, E. P. Quantificação da contribuição da microalga *Navicula* sp. No cultivo de *Litopenaeus* ...

Tran, H.Q., Kiljunen, M., Van Doan, H., Stejskal, V., 2021. European perch (*Perca fluviatilis*) fed dietary insect meal (*Tenebrio molitor*): From a stable isotope perspective. *Aquaculture* 545, 737265. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.737265>

Uchida, M., Ishihi, Y., Watanabe, S., Tsujino, M., Tezuka, N., Takada, Y., Niwa, K., 2023. Trophic state-dependent distribution of asari clam *Ruditapes philippinarum* in Japanese coastal waters: possible utilization of asari stable isotope ratios as a production indicator. *Fish. Sci.* 89, 203–214. <https://doi.org/10.1007/s12562-022-01663-5>

UNESCO, 2020. “Global Investments in R&D”. Fact Sheet 59.

Wirtz, A., Mazumder, D., Carter, C.G., Codabaccus, M.B., Fitzgibbon, Q.P., Smith, G.G., 2022. Application of stable isotope analysis to evaluate the assimilation of protein sources in juvenile slipper lobsters (*Thenus australiensis*). *Aquaculture* 560, 738570. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2022.738570>