

HIỆU QUẢ CỦA VI KHUẨN *BACILLUS* PHÂN LẬP TỪ HẠT BIOFLOC TRONG CẢI THIẾN SINH TRƯỞNG CỦA TÔM THẺ CHÂN TRẮNG (*Litopenaeus vannamei*)

Tạ Văn Phương*, Phạm Thị Mỹ Xuân,
Cao Chí Cường và Châu Mạnh Thường
Trường Đại học Tây Đô
(*Email: tvphuong@tdu.edu.vn)

Ngày nhận: 21/11/2024

Ngày phản biện: 27/11/2024

Ngày duyệt đăng: 10/3/2025

TÓM TẮT

Nghiên cứu được thực hiện nhằm tuyển chọn các chủng vi khuẩn *Bacillus* từ hạt Biofloc có khả năng thủy phân tinh bột, N và khả năng kháng vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* cải thiện hiệu quả của hệ thống nuôi tôm thẻ chân trắng. Thí nghiệm được thực hiện tại trại thực nghiệm Khoa Sinh học Ứng dụng - Trường Đại học Tây Đô, sử dụng với năm nguồn carbohydrate khác nhau: Thức ăn (Đối chứng), Bột gạo, Bột mì, Rong và Rỉ đường. Kết quả xác định được dòng vi khuẩn *Bacillus* màu trắng đục từ hạt Biofloc với nguồn carbohydrate là Bột gạo và được định danh là vi khuẩn *Bacillus subtilis*. Dòng *Bacillus subtilis* này được ứng dụng thử nghiệm trong nuôi tôm thẻ chân trắng trong bể ở các mật độ vi khuẩn khác nhau: Đối chứng (không bổ sung vi khuẩn), và các nghiệm thức bổ sung 10^5 CFU/ml; 10^7 CFU/ml và 10^9 CFU/ml. Thí nghiệm trong 60 ngày, thực hiện trong bể composite 500 lít với mật độ nuôi 150 con/m³ và tôm giống có kích thước ban đầu $0,45 \pm 0,09$ g/con. Kết quả cho thấy bổ sung mật độ vi khuẩn 10^9 CFU/ml giúp tôm tăng tỷ lệ sống, chiều dài, trọng lượng, sinh khối, và có hệ số chuyển đổi thức ăn (FCR) hiệu quả nhất, khác biệt ($p < 0,05$) so với các nghiệm thức còn lại. Kết quả nghiên cứu có triển vọng tốt và là cơ sở cho việc thử nghiệm vào thực tế ao nuôi tôm thẻ chân trắng thâm canh.

Từ khóa: *Bacillus*, Biofloc, tôm thẻ chân trắng, *Vibrio parahaemolyticus*, vòng kháng khuẩn, vòng thủy phân.

Trích dẫn: Tạ Văn Phương, Phạm Thị Mỹ Xuân, Cao Chí Cường và Châu Mạnh Thường, 2025. Hiệu quả của vi khuẩn *Bacillus* phân lập từ hạt Biofloc trong cải thiện sinh trưởng của tôm thẻ chân trắng (*Litopenaeus vannamei*). Tạp chí Nghiên cứu khoa học và Phát triển kinh tế Trường Đại học Tây Đô. 22: 67-82.

*TS. Tạ Văn Phương – Giảng viên Khoa Sinh học ứng dụng, Trường Đại học Tây Đô

1. GIỚI THIỆU

Đồng bằng Sông Cửu Long (ĐBSCL) là khu vực có điều kiện tự nhiên thuận lợi để phát triển ngành nuôi trồng thủy sản, ngành đóng vai trò quan trọng trong nền kinh tế Việt Nam. Nghề nuôi tôm nước lợ, đặc biệt là tôm thẻ chân trắng (*Litopenaeus vannamei*), đã trở thành ngành kinh tế mũi nhọn nhờ vào giá trị kinh tế cao, tốc độ tăng trưởng nhanh và khả năng thích nghi tốt với điều kiện nuôi thâm canh. Theo Cục Thủy sản (2023), diện tích nuôi tôm thẻ chân trắng tại ĐBSCL đạt khoảng 93.804 ha với sản lượng lên tới 628.203 tấn vào năm 2022. Tuy nhiên, mô hình thâm canh với mật độ nuôi cao đã dẫn đến nhiều vấn đề môi trường nghiêm trọng, đặc biệt là tích lũy độc tố vô cơ như NH_3 , NO_2^- và lượng thức ăn dư thừa, tạo điều kiện cho các loại vi khuẩn gây bệnh phát triển, ảnh hưởng bất lợi đến sinh trưởng của tôm.

Trước bối cảnh đó, công nghệ Biofloc phát triển như một giải pháp bền vững để cải thiện chất lượng nước, giảm thiểu khí độc và kiểm soát vi sinh vật gây bệnh. Biofloc là tập hợp của vi sinh vật, bao gồm vi khuẩn, tảo đơn bào, các chất hữu cơ lơ lửng trong nước, chúng có khả năng chuyển hóa chất thải hữu cơ thành nguồn thức ăn bổ sung cho tôm, giúp giảm hệ số chuyển đổi thức ăn (FCR) và cải thiện hiệu quả nuôi (Avnimelech, 1999; Emerenciano et al., 2011). Đặc biệt, hạt Biofloc là nơi lý tưởng cho sự phát triển của các vi khuẩn có lợi, trong đó vi khuẩn thuộc giống *Bacillus* đóng vai trò quan trọng. Vi khuẩn *Bacillus* có khả năng chuyển hóa các chất hợp chất N độc hại như NH_3 và NO_2^- thành các hợp chất

không độc, đồng thời ức chế sự phát triển của các vi khuẩn gây bệnh như *Vibrio parahaemolyticus*. Đây là tác nhân gây nhiều bệnh nguy hiểm trên tôm, bao gồm bệnh hoại tử gan tụy. Theo Moriarty (1998), việc bổ sung *Bacillus* không chỉ kiểm soát mật độ vi khuẩn *Vibrio* spp. mà còn cải thiện tỷ lệ sống và sức khỏe của tôm. Các cơ chế kháng khuẩn của *Bacillus* bao gồm cạnh tranh dinh dưỡng, sản xuất enzyme ngoại bào và tiết các chất kháng khuẩn tự nhiên (Nguyễn Thị Bích Đào và ctv., 2015).

Với vai trò quan trọng của vi khuẩn *Bacillus* trong hệ thống Biofloc, nghiên cứu được thực hiện nhằm phân lập và tuyển chọn các dòng *Bacillus* từ hạt Biofloc tạo ra bằng nhiều nguồn carbohydrate khác nhau. Ứng dụng các dòng *Bacillus* được tuyển chọn có thể là giải pháp hiệu quả góp phần kiểm soát chất lượng nước, ức chế mầm bệnh và nâng cao năng suất tôm trong nuôi tôm thẻ chân trắng tại ĐBSCL.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Tạo hạt Biofloc từ các nguồn Carbohydrate khác nhau

Quá trình tạo hạt Biofloc được tiến hành trong hệ thống bể nhựa dung tích 60 lít (chứa nước 50 lít), dưới các điều kiện kiểm soát nhằm thúc đẩy sự hình thành và phát triển của Biofloc. Năm nguồn carbohydrate khác nhau (Bảng 1): (i) Thức ăn (Đối chứng); (ii) Bột gạo; (iii) Bột mì; (iv) Rong biển và (v) Rỉ đường được sử dụng làm nguồn carbon để kích thích sự hình thành Biofloc (Avnimelech, 2006). Mỗi nghiệm thức được lặp lại ba lần.

Bảng 1. Bố trí thí nghiệm tạo hạt Biofloc

Nghiệm thức	C:N	V (Lít)
Đối chứng	7,68:1	60
Bột gạo	15:1	60
Rỉ đường	15:1	60
Bột mì	15:1	60
Rong mền	15:1	60

Thí nghiệm tạo hạt Biofloc

Hệ thống bể nuôi được sục khí liên tục để duy trì hạt Biofloc lơ lửng, tạo điều kiện tối ưu cho sự phát triển của các vi sinh vật trong Biofloc (Hình 1). Các hạt

Biofloc sau khi hình thành được thu thập, sấy khô ở nhiệt độ từ 60 - 80°C trong vòng 24 giờ nhằm giữ nguyên lượng vi khuẩn có lợi theo nghiên cứu về bảo quản vi sinh vật (Emerenciano et al., 2011).



Hình 1. Hạt Biofloc từ các nguồn carbon khi được phơi khô

2.2. Phân lập, tuyển chọn vi khuẩn *Bacillus* từ các nguồn carbon khác nhau

Việc phân lập vi khuẩn *Bacillus* từ các hạt Biofloc thông qua quy trình chọn lọc trên môi trường thạch TSA (Tryptic Soy Agar), tuân theo quy trình phân lập và nhận diện vi khuẩn đã được chuẩn hóa (Schillinger et al., 1989). Các mẫu Biofloc từ từng nguồn carbohydrate được nuôi cấy trên môi trường thạch TSA và phân lập dựa trên kích thước, màu sắc, hình dạng khuẩn lạc được thực hiện theo

các bước:

2.2.1. Chuẩn bị mẫu: Cân 1g hạt Biofloc đã được sấy khô (105°C) từ mỗi nguồn carbohydrate và hòa tan vào ống nghiệm chứa 9 ml nước muối sinh lý. Mẫu được đun ở nhiệt độ 80°C trong 15 phút nhằm tiêu diệt vi khuẩn sinh dưỡng và chỉ giữ lại nhóm vi khuẩn sinh bào tử (Jan Hudzicki, 2009).

2.2.2. Nuôi cấy trên môi trường TSA: Mẫu Biofloc được cấy lên đĩa Petri chứa môi trường TSA vô trùng. Sau khi ủ 24 giờ

ở 37°C, các khuẩn lạc phát triển được phân lập theo hình thái để tạo dòng thuần chủng bằng phương pháp cấy ria. Các dòng vi khuẩn được làm thuần chủng và nuôi tăng sinh trong môi trường NB (Nutrient Broth) để chuẩn bị tiến hành thí nghiệm tiếp theo.

2.3. Phương pháp tạo giếng và đánh giá khả năng thủy phân và kháng vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus*

Các dòng *Bacillus* được tuyển chọn thông qua đánh giá về khả năng thủy phân tinh bột và N cũng như khả năng kháng vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* thông qua phương pháp tạo giếng khuếch tán trên môi trường TSA (Tạ Văn Phương, 2022).

2.3.1. Khả năng thủy phân tinh bột

Dung dịch tinh bột 1% được nhỏ lên bề mặt môi trường TSA và tạo giếng bằng đầu col 8mm. Dung dịch chứa vi khuẩn *Bacillus* (10^9 CFU/ml) được ly tâm với vận tốc 4.000 vòng/phút, sau đó nhỏ vào 100μL dịch trong vào mỗi giếng. Mẫu được ủ ở 37°C trong 24 giờ, sau đó đo đường kính vòng thủy phân bằng thước đo nhựa (Jan Hudzicki, 2009).

2.3.2. Khả năng phân giải N

Thực hiện quy trình tương tự như trên nhưng sử dụng dung dịch NH_4Cl 0,5%. Đường kính vòng thủy phân N được đo để đánh giá khả năng chuyển hóa của vi khuẩn.

2.3.3. Khả năng kháng khuẩn *Vibrio parahaemolyticus*

Huyền phù chứa *Vibrio parahaemolyticus* (10^6 CFU/ml) được tán đều lên bề mặt môi trường TSA. Sau khi tạo giếng và bổ sung

dịch *Bacillus*, mẫu được ủ và đo đường kính vòng kháng khuẩn để xác định mức độ ức chế *Vibrio* (Moriarty, 1998).

2.4. Ứng dụng vào nuôi tôm thẻ chân trắng

Nghiên cứu sử dụng vi khuẩn *Bacillus* nuôi tôm thẻ chân trắng được thực hiện trong bể composite 500 lít với mật độ nuôi là 150 con/m³. Nước ót có độ mặn là 90‰ được pha với nước máy sinh hoạt thành nước lợ 15‰, xử lý chlorine 30ppm và sục khí mạnh cho đến khi hết lượng Chlorine trong nước. Tôm giống được ương trong 30 ngày và tôm đạt trọng lượng $0,45 \pm 0,09$ g/con, chiều dài là 3,92 cm.

Thí nghiệm được bố trí với các nghiệm thức: Đối chứng (không bổ sung *Bacillus*) và các nghiệm thức bổ sung vi khuẩn *Bacillus* với mật độ 10^5 , 10^7 và 10^9 CFU/ml. Các thông số môi trường nước như TAN, NO_2^- và mật độ vi khuẩn được phân tích định kỳ (Boyd et al., 2002). Các chỉ tiêu về tăng trưởng, tỷ lệ sống và hệ số tiêu tốn thức ăn (FCR) của tôm được ghi nhận để đánh giá hiệu quả của việc bổ sung vi khuẩn *Bacillus*.

2.4.1. Bố trí thí nghiệm

Tôm được bố trí vào bể nuôi, mỗi lần cho 5 con/bể/lượt, các lần còn lại tương tự cho đến khi đủ số lượng tôm thẻ chân trắng cần bố trí thí nghiệm là 60 con/bể. (Hình 2) Bể thí nghiệm được sục khí liên tục, mẫu nước và vi khuẩn được thu và phân tích định kỳ 7 ngày/lần.

Bảng 2: Bố trí thí nghiệm ứng dụng vi khuẩn Bacillus được phân lập từ hạt Biofloc

	Đối chứng	D10⁵	D10⁷	D10⁹
Số tôm/ bể	60	60	60	60
Mật số vi khuẩn (CFU/ml)	0	10 ⁵	10 ⁷	10 ⁹
Thời gian nuôi (ngày)	60	60	60	60
Nhịp bổ sung vi khuẩn (ngày/lần)	0	7	7	7



Hình 2. Thí nghiệm bổ sung vi khuẩn Bacillus vào bể nuôi tôm

2.4.2. Các chỉ tiêu được theo dõi

Bảng 3. Các chỉ tiêu được ghi nhận trong thí nghiệm

Chỉ tiêu	Phương pháp bảo quản	Nhịp thu	Phương pháp phân tích
Mẫu nước			
Nhiệt độ, pH		2 lần/ngày	Nhiệt kế và pH kế
TAN	Trữ lạnh < 4°C	7 ngày/lần	Indophenol blue
NO ₂ ⁻	Trữ lạnh < 4°C	7 ngày/lần	Diazonium
Mẫu sinh vật			
Vi khuẩn <i>Vibrio</i>	Trữ lạnh < 4°C	7 ngày/lần	Môi trường TCBS
Tổng Vi khuẩn	Trữ lạnh < 4°C	7 ngày/lần	Môi trường NA ⁺
Mẫu tôm			
Tăng trọng (g)		7 ngày/lần	Tôm thu hoạch/tôm thả.
Tỷ lệ sống (%)		Thu hoạch	Trọng lượng tổng cá thể
Sinh khối		Thu hoạch	thu hoạch (kg/m ³)

2.4.3. Chăm sóc và quản lý

Nhiệt độ và pH được ghi nhận 2 lần/ngày vào lúc 7h sáng và 14h chiều. Tôm được cho ăn 4 lần/ngày (7 giờ, 11 giờ, 15 giờ và 19 giờ) hàng ngày theo công thức của Wyk et al. (2001) và chỉ cần cung cấp 80% theo nghiên cứu điều

chỉnh của Tạ Văn Phương và ctv. (2014). Cân trọng lượng tôm nuôi 7 ngày/lần để điều chỉnh lượng thức ăn cho phù hợp.

2.4.4. Phương pháp xử lý số liệu

Các số liệu thu thập được tính toán bằng phần mềm Microsoft Excel 2013 xử lý thống kê bằng ANOVA một nhân tố và

phép thử DUNCAN bằng SPSS 20.0.

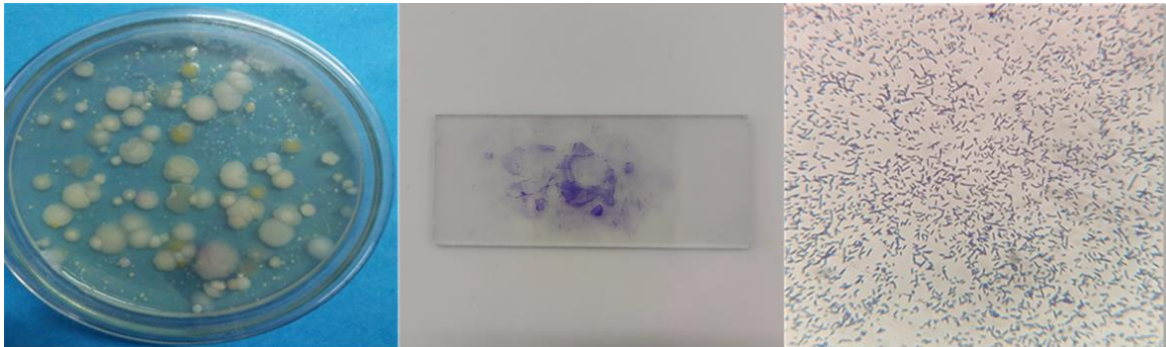
3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Phân lập và tuyển chọn loại *Bacillus*

3.1.1. Đặc điểm hình thái khuẩn lạc được phân lập

Quá trình phân lập vi khuẩn *Bacillus* từ các nguồn carbohydrate khác nhau gồm thức ăn tôm, Bột gạo, Bột mì, Rong biển và Rỉ đường, cho thấy sự xuất hiện của các dòng vi khuẩn có đặc điểm hình thái khác

biệt (Hình 3). Cụ thể, các dòng vi khuẩn *Bacillus* có bề mặt khuẩn lạc nhẵn hoặc hơi nhẵn, màu trắng đục, trắng trong và màu vàng được ghi nhận. Việc xác định đặc tính hình thái này là bước đầu trong việc phân loại và đánh giá tiềm năng ứng dụng của các dòng *Bacillus* được phân lập (Schillinger et al., 1989). Kết quả cho thấy các vi khuẩn có hình thái giống với *Bacillus* là những trực khuẩn Gram dương, hình que, đôi khi các tế bào nối lại với nhau tạo thành chuỗi dài, ngắn khác nhau hoặc các tế bào đứng riêng lẻ.



Hình 3. Hình dạng khuẩn lạc (trái) và hình dạng vi khuẩn được nhuộm Gram (phải)

3.1.2. Đánh giá khả năng phân giải tinh bột, *N* và kháng vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus*

- Vòng thủy phân tinh bột

Vi khuẩn được phân lập từ Bột gạo có màu trắng đục, Bột mì màu trắng trong có vòng thủy phân tinh bột cao nhất tương đương với vi khuẩn *Bacillus* ở Rỉ đường có màu trắng đục, khác biệt có ý

nghĩa thống kê ($p < 0,05$) với các nghiệm thức còn lại (Bảng 4). Dòng *Bacillus* được phân lập từ nguồn carbohydrate Bột gạo có màu trắng đục có khả năng vượt trội trong việc thủy phân tinh bột, so với các nguồn khác (Bảng 4). Như vậy, vi khuẩn được phân lập từ Bột gạo có màu trắng đục, có khả năng thủy phân tinh bột tốt nhất.

Bảng 4. Vòng thủy phân tinh bột của các dòng vi khuẩn từ các nguồn carbon

Nghiệm thức	Vi Khuẩn	Vòng thủy phân tinh bột (mm)
Đối chứng	Vàng	38,33 ± 2,89 ^{de}
	Trắng trong	37,67 ± 5,86 ^{de}
	Trắng đục	22,33 ± 1,15 ^a
Bột Gạo	Vàng	44,33 ± 1,15^f
	Trắng trong	21,00 ± 2,00 ^a
	Trắng đục	47,33 ± 2,52^f
Bột Mi	Vàng	35,00 ± 0,00 ^{cd}
	Trắng trong	44,67 ± 5,03^f
	Trắng đục	25,67 ± 1,15 ^{ab}
Rong	Vàng	33,67 ± 3,21 ^{cd}
	Trắng trong	32,67 ± 2,08 ^{cd}
	Trắng đục	35,00 ± 5,00 ^{cd}
Rỉ Đường	Vàng	35,67 ± 1,15 ^{cd}
	Trắng trong	35,33 ± 4,51 ^{cd}
	Trắng đục	42,00 ± 4,36 ^{ef}

Các giá trị trên cùng một cột có kí tự giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$)

- Vòng thủy phân N

Kết quả từ Bảng 5 cho thấy, vi khuẩn từ nguồn carbohydrate Rỉ đường có màu trắng trong, Đối chứng màu vàng, Rong màu trắng trong và Bột gạo trắng đục có vòng thủy phân N cao hơn so với các

nghiệm thức còn lại có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$). Như vậy, vi khuẩn ở các nghiệm thức Đối chứng (màu vàng), Bột gạo (trắng đục), Rong (trắng trong) và Rỉ đường (trắng trong) đều có khả năng thủy phân nitơ rất tốt.

Bảng 5. Vòng thủy phân nitơ của các dòng vi khuẩn từ các nguồn carbon khác nhau

Nghiệm thức	Vi Khuẩn	Vòng thủy phân nitơ (mm)
Đối chứng	Vàng	43,33 ± 2,89^e
	Trắng trong	38,33 ± 2,89 ^{de}
	Trắng đục	35,67 ± 1,15 ^d
Bột Gạo	Vàng	39,67 ± 1,53 ^{de}
	Trắng trong	25,00 ± 3,00 ^b
	Trắng đục	40,00 ± 5,00^{de}
Bột Mi	Vàng	39,00 ± 1,73 ^{de}
	Trắng trong	38,33 ± 2,89 ^{de}
	Trắng đục	30,67 ± 1,15 ^c
Rong	Vàng	39,00 ± 1,00 ^{de}
	Trắng trong	42,33 ± 2,52^e
	Trắng đục	40,67 ± 1,15 ^{de}
Rỉ Đường	Vàng	18,33 ± 2,89 ^a
	Trắng trong	44,00 ± 2,56^e
	Trắng đục	40,00 ± 0,00 ^{de}

Các giá trị trên cùng một cột có kí tự giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

- Vòng kháng khuẩn *Vibrio parahaemolyticus*

Vi khuẩn được phân lập từ Bột gạo có màu vàng, trắng đục và trắng trong, Đối chứng màu vàng và trắng trong có vòng kháng khuẩn *Vibrio* cao nhất và khác biệt

có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) với các nghiệm thức còn lại (Bảng 6). Như vậy, vi khuẩn *Bacillus* ở Bột gạo có màu vàng, trắng đục và trắng trong, Đối chứng màu vàng và Trắng trong có khả năng vòng kháng khuẩn *Vibrio* tốt nhất.

Bảng 6. Vòng kháng khuẩn *V. parahaemolyticus* của các dòng vi khuẩn được phân lập

Nghiệm thức	Vi Khuẩn	Vòng kháng khuẩn <i>Vibrio</i> (mm)
Đối chứng	Vàng	38,67 ± 2,89 ^d
	Trắng trong	40,67 ± 2,08 ^d
	Trắng đục	22,33 ± 2,08 ^a
Bột Gạo	Vàng	41,33 ± 2,08 ^d
	Trắng trong	41,33 ± 2,52 ^d
	Trắng đục	39,33 ± 2,08 ^d
Bột Mì	Vàng	31,67 ± 7,64 ^c
	Trắng trong	25,33 ± 2,31 ^{ab}
	Trắng đục	27,00 ± 1,73 ^{abc}
Rong	Vàng	28,67 ± 2,52 ^{bc}
	Trắng trong	27,33 ± 4,04 ^{abc}
	Trắng đục	27,33 ± 1,15 ^{abc}
Rỉ Đường	Vàng	26,67 ± 1,53 ^{abc}
	Trắng trong	31,00 ± 2,65 ^{bc}
	Trắng đục	28,33 ± 6,93 ^{bc}

Các giá trị trên cùng một cột có kí tự giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$)

Tổng hợp từ kết quả Bảng 4, Bảng 5 và Bảng 6 ghi nhận được vòng thủy phân tinh bột, N và vòng kháng khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* là rất cao theo Jan

Hudzicki, (2009) và Schillinger et al. (1989). Vi khuẩn màu trắng đục được chọn lọc từ nghiệm thức bột gạo là phù hợp nhất.

- Định danh vi khuẩn

CCCATTGCGGCGTGCTAATACATGCAAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCC
TGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACTGCCTGTAAGACTGGGAT
AACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGGTTGTTTGAACCGCATGGTTCAAACAT
AAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTG
AGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCAC
ACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGC
AATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTA
AAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACCGTTTCAATAGGGCGGTACCTTGACGGTA
CCTAACCGAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGC
AAGCGTTGTCCGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATG
TGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGGAACCTGAGTGCAGA
AGAGGAGAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACAC
CAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGA
GCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCGGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTA

GGGGGTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTAC
GGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCAT
GTGGTTTAATTTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAATC
CTAGAGATAGGACGTCCCCTTCGGGGGCAGAGTGACAGGTGTGCATGGGTTGTCGTCA
GCTCGTGTCGTGAGATGTTT.

Kết quả định danh vi khuẩn trắng đục từ nguồn carbohydrate bột gạo bằng phương pháp giải trình tự 16S ribosomal RNA gene, partial sequence, là vi khuẩn *Bacillus subtilis* trên ngân hàng gen NCBI <https://www.ncbi.nlm.nih.gov> với mức độ tương đồng là 99,81%.

3.2. Ứng dụng vi khuẩn *Bacillus subtilis* được tuyển chọn vào nuôi tôm thẻ chân trắng

3.2.1. Biến động các yếu tố thủy lý thủy hóa

- Nhiệt độ và pH

Kết quả từ Bảng 7 cho thấy trong suốt quá trình thí nghiệm nhiệt độ sáng chiều dao động từ 24,4 - 26,2°C. Nhiệt độ thấp nhất buổi sáng là 23,5°C và thấp nhất buổi chiều là 25°C. Nguyên nhân do những ngày này trời mưa to trong thời gian dài và nhiều ngày, dẫn đến nhiệt độ nước thấp. pH trong suốt quá trình thí nghiệm luôn nằm trong khoảng từ 7,81 – 7,83 thích hợp để tôm thẻ chân trắng tăng trưởng và phát triển.

Bảng 7. Sự biến động của nhiệt độ và pH giữa các nghiệm thức

Nghiệm thức	Nhiệt độ (°C)		pH	
	Sáng	Chiều	Sáng	Chiều
Đối chứng	24,4 ± 0,73	26,2 ± 0,79	7,82 ± 0,20	7,81 ± 0,21
10⁵ CFU/ml	24,4 ± 0,72	26,2 ± 0,79	7,82 ± 0,18	7,81 ± 0,20
10⁷ CFU/ml	24,4 ± 0,72	26,2 ± 0,80	7,83 ± 0,18	7,82 ± 0,20
10⁹ CFU/ml	24,4 ± 0,73	26,2 ± 0,79	7,83 ± 0,18	7,82 ± 0,20

- Tổng lượng N Amonia

Hàm lượng tổng N Amonia (TAN) trong thí nghiệm dao động từ 0,15-2,3 mg/l tăng cao nhất ở ngày 14 và có khuynh hướng giảm dần đến cuối đợt nuôi. Hàm lượng TAN thấp nhất ở nghiệm thức 10⁹ CFU/ml khác biệt có ý nghĩa thống kê (p<0,05) so với các nghiệm thức khác. Theo Whetstone et al. (2002) cho rằng tôm có thể phát triển ở hàm lượng TAN từ 0,02-2 mg/l. Theo

Boyd et al. (2002) thì hàm lượng TAN trong ao nuôi phải nhỏ hơn 3 mg/l. Điều này cho thấy hàm lượng TAN trong suốt quá trình thí nghiệm là thấp nằm trong ngưỡng phù hợp. Như vậy, khi bổ sung vi khuẩn *Bacillus subtilis* từ Bột gạo giúp làm giảm hàm lượng TAN trong nước. Bởi theo Moriay, (1998) cho rằng vi khuẩn *Bacillus subtilis* có khả năng sản xuất các enzyme ngoại bào chuyển hóa TAN và NO₂⁻ thành NO₃⁻ giúp giảm hàm lượng TAN và NO₂⁻ trong nước.

Bảng 8. Sự biến động TAN (mg/l) giữa các nghiệm thức trong suốt quá trình nuôi

Nghiem thức	Đối chứng	10 ⁵ CFU/ml	10 ⁷ CFU/ml	10 ⁹ CFU/ml
Ngày 1	2,30	2,30	2,30	2,30
Ngày 7	0,57±0,46 ^a	0,85±0,04 ^a	0,80±0,19 ^a	0,64±0,02 ^a
Ngày 14	0,53±0,59 ^a	0,77±0,74 ^a	1,55±0,38 ^a	1,21±1,14 ^a
Ngày 21	0,31±0,15 ^a	0,33±0,10 ^a	0,39±0,16 ^a	0,33±0,09 ^a
Ngày 28	0,28±0,03 ^a	0,33±0,13 ^a	0,34±0,04 ^a	0,36±0,02 ^a
Ngày 35	0,09±0,09 ^a	0,07±0,03 ^a	0,13±0,03 ^a	0,32±0,47 ^a
Ngày 42	0,23±0,13 ^a	0,15±0,03 ^a	0,22±0,03 ^a	0,26±0,03 ^a
Ngày 49	0,35±0,04 ^a	0,36±0,04 ^a	0,49±0,05 ^a	0,56±0,27 ^a
Ngày 56	0,24±0,06 ^b	0,20±0,06 ^{ab}	0,21±0,06 ^{ab}	0,15±0,04^a

Các giá trị trên cùng một hàng có ký tự giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($p>0,05$)

- Nitrite

Sự hiện diện của *Bacillus subtilis* mật số cao làm tăng tốc độ sản xuất enzyme xúc tác quá trình chuyển hóa NO₂⁻ thành NO₃⁻ dẫn đến hàm lượng NO₂⁻ giảm (Nguyễn Thị Bích Đào và ctv., 2015). Kết quả sau 60 ngày nuôi, ở nghiệm thức bổ sung vi khuẩn *Bacillus subtilis* mật độ 10⁹ CFU/ml có hàm lượng NO₂⁻ thấp khác biệt có ý

nghĩa ($p<0,05$) đối với nghiệm thức Đối chứng (Bảng 9). Theo Whetston et al. (2002) nồng độ NO₂⁻ trong ao nuôi tôm nhỏ hơn 0,23 mg/l được xem là an toàn. Nhìn chung, hàm lượng NO₂⁻ ở tất cả các nghiệm thức cao hơn mức thích hợp, tuy nhiên tôm được nuôi trong môi trường nước lợ có hàm lượng Ca²⁺ và Cl⁻ và sục khí nên đã làm giảm tính độc của NO₂⁻ (Boyd, 1990).

Bảng 9. Sự biến động NO₂⁻ (mg/l) giữa các nghiệm thức trong suốt quá trình nuôi

Nghiem thức	Đối chứng	10 ⁵ CFU/ml	10 ⁷ CFU/ml	10 ⁹ CFU/ml
Ngày 1	0,01	0,01	0,01	0,01
Ngày 7	0,51±0,34 ^a	0,28±0,14 ^a	0,40±0,36 ^a	0,35±0,19 ^a
Ngày 14	15,4±5,10 ^a	16,5±9,23 ^a	10,9±5,63 ^a	15,3±9,82 ^a
Ngày 21	15,7±4,96 ^a	20,6±4,67 ^{ab}	29,6±3,18 ^{bc}	30,2±6,02 ^c
Ngày 28	7,98±2,46 ^a	7,78±1,62 ^a	10,2±1,73 ^a	6,90±2,65 ^a
Ngày 35	2,54±1,92 ^a	3,55±2,05 ^a	4,03±1,32 ^a	4,70±2,40 ^a
Ngày 42	5,33±0,54 ^b	2,13±1,51 ^a	1,24±0,77 ^a	0,82±0,40 ^a
Ngày 49	2,36±0,44 ^b	1,11±0,33 ^a	2,06±0,31 ^b	0,71±0,24 ^a
Ngày 56	2,40±0,25 ^b	1,02±0,53 ^a	1,89±0,44 ^{ab}	0,49±0,29 ^a

Các giá trị trên cùng một hàng có ký tự giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($p>0,05$)

3.2.2. Biến động của mật độ vi khuẩn

- Biến động của mật độ tổng vi khuẩn

Kết quả từ Bảng 10 cho thấy mật độ tổng vi khuẩn tăng cao dần về cuối thí nghiệm, nghiệm thức 10⁹ CFU/ml có tổng vi khuẩn cao nhất (3,53*10¹¹ CFU/ml), nhưng không khác biệt có ý nghĩa ($p>0,05$)

so với các nghiệm thức khác. Tổng vi khuẩn ở nghiệm thức 10⁹ CFU/ml cao nhất, có thể là do việc bổ sung vi khuẩn *Bacillus* với mật độ 10⁹ CFU/ml hằng tuần và với nguồn dinh dưỡng từ vật chất hữu cơ được tích lũy đã làm tăng nhanh mật số các vi khuẩn trong môi trường nuôi.

Bảng 10. Biến động mật độ tổng vi khuẩn log₁₀ (CFU/ml)

Nghiệm thức	Đối chứng	10 ⁵ CFU/ml	10 ⁷ CFU/ml	10 ⁹ CFU/ml
Ngày 1	7,70	7,70	7,70	7,70
Ngày 7	7,55±0,07 ^a	7,49±0,16 ^a	7,48±0,16 ^a	7,58±0,13 ^a
Ngày 14	8,29±0,06 ^a	8,47±0,07 ^b	8,52±0,03 ^{ab}	8,58±0,03 ^b
Ngày 21	8,42±0,22 ^a	8,58±0,07 ^{ab}	8,63±0,03 ^{ab}	8,74±0,06 ^b
Ngày 28	10,53±0,09 ^a	10,58±0,04 ^{ab}	10,65±0,07 ^{ab}	10,67±0,05 ^b
Ngày 35	8,37±0,13 ^a	8,51±0,07 ^{ab}	8,61±0,08 ^b	8,65±0,09 ^b
Ngày 42	9,37±0,13 ^a	9,51±0,07 ^{ab}	9,62±0,08 ^b	9,66±0,09 ^b
Ngày 49	10,31±0,08 ^a	10,41±0,14 ^a	10,43±0,12 ^a	10,5±0,10 ^a
Ngày 56	11,35±0,08 ^a	11,45±0,14 ^a	11,47±0,12 ^a	11,54±0,10 ^a

Các giá trị trên cùng một hàng có kí tự giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($p>0,05$)

- Biến động mật độ vi khuẩn *Vibrio*

Trong thí nghiệm này, mật độ *Vibrio* ở nghiệm thức Đối chứng cao nhất ($1,2 \cdot 10^3$ CFU/ml) so với nghiệm thức Đối chứng, nghiệm thức 3, nghiệm thức 1 và nghiệm thức 2 lần lượt là $6,91 \cdot 10^2$ CFU/ml, $7,19 \cdot 10^2$ CFU/ml và $8,32 \cdot 10^2$ CFU/ml, tuy nhiên khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($p>0,05$). Kết quả Bảng 11 cho

thấy việc bổ sung vi khuẩn *Bacillus* định kì trong suốt quá trình thí nghiệm đã làm giảm mật độ vi khuẩn *Vibrio* trong hệ thống bể nuôi. Điều này phù hợp với nhận định của Moriarty (1998), bổ sung *Bacillus subtilis* có thể kiểm soát được *Vibrio parahaemolyticus*, tăng tỉ lệ sống, hạn chế được mầm bệnh do vi khuẩn *Vibrio* spp. trong nước.

Bảng 11. Biến động mật độ *Vibrio* log₁₀ (CFU/ml) trong thời gian thí nghiệm

Nghiệm thức	Đối chứng	10 ⁵ CFU/ml	10 ⁷ CFU/ml	10 ⁹ CFU/ml
Ngày 1	2,30	2,30	2,30	2,30
Ngày 7	2,86±0,05	2,77±0,03	2,77±0,08	2,78±0,05
Ngày 14	2,94±0,05	2,85±0,03	2,84±0,07	2,86±0,05
Ngày 21	3,33±0,19	3,40±0,10	3,38±0,12	3,36±0,07
Ngày 28	3,85±0,08	3,75±0,05	3,55±0,10	3,63±0,34
Ngày 35	2,83±0,22	2,81±0,15	2,88±0,08	2,82±0,10
Ngày 42	3,05±0,22	3,03±0,15	3,10±0,08	3,15±0,10
Ngày 49	2,74±0,22	2,73±0,15	2,80±0,08	2,84±0,10
Ngày 56	3,08±0,22	2,84±0,15	2,92±0,08	2,82±0,10

Các giá trị trên cùng một hàng khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($p>0,05$)

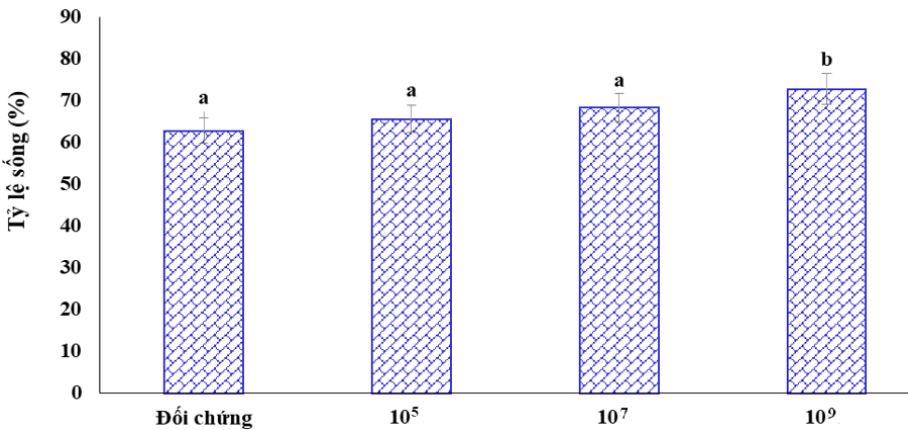
3.2.3. Hiệu quả cải thiện sự phát triển của tôm

- Tỉ lệ sống: Tỉ lệ sống của tôm sau 60 ngày nuôi cao nhất ở nghiệm thức có bổ sung vi khuẩn *Bacillus subtilis* 10⁹ CFU/ml (72,8%), khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p<0,05$) với các nghiệm thức

còn lại. Như vậy, khi bổ sung vi khuẩn *Bacillus subtilis* với mật độ 10⁹ CFU/ml giúp cải thiện được môi trường, giảm vi khuẩn *Vibrio* spp. giúp tăng tỉ lệ sống tôm thẻ chân trắng nuôi trong bể composite. Tỷ lệ tôm hao hụt ở các nghiệm thức được ghi nhận là do tôm ăn lẫn nhau khi tôm

lột xác vì tôm nuôi với mật độ cao. Theo Abdussamad and Thampy (1994), sự ăn

thịt lẫn nhau ở tôm nuôi bị ảnh hưởng trực tiếp bởi mật độ nuôi.

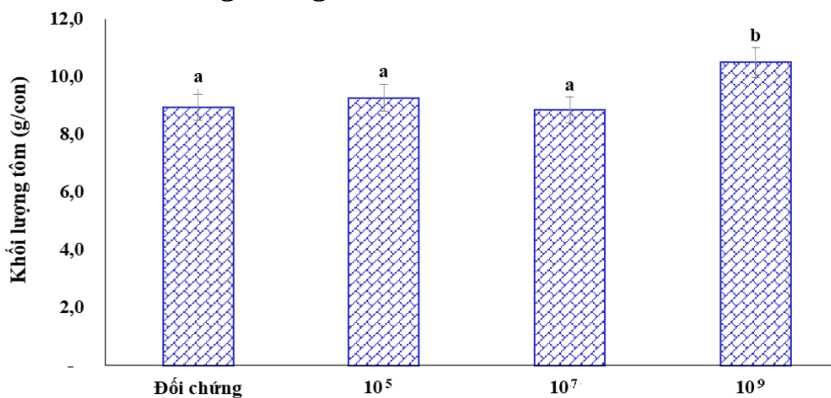


Hình 4. Tỷ lệ sống của tôm thẻ chân trắng theo các nghiệm thức

- Khối lượng tôm khi thu hoạch:

Sau 60 ngày nuôi, ở nghiệm thức bổ sung vi khuẩn *Bacillus* mật độ 10^9 CFU/ml tôm có khối lượng ($10,46 \pm 0,38$ g/con) cao nhất khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) so với nghiệm thức còn lại (Hình 5). Theo Lê Quốc Việt và ctv. (2015) nuôi tôm thẻ chân trắng mật độ 150 con/m³ kết hợp với cá rô phi sau 60 ngày nuôi, tôm đạt khối lượng 5,97 g/con.

Kết quả nghiên cứu của Nguyễn Vĩnh Tiến và ctv. (2013) cho thấy rằng, nuôi tôm thẻ chân trắng 105 ngày kết hợp với hệ thống lọc sinh học thì tôm có trọng lượng từ 11- 12g/con. Kết quả nghiên cứu này tôm nuôi đạt khối lượng là $10,46 \pm 0,38$ g/con trong thời gian 60 ngày, cho thấy các nghiệm thức có bổ sung vi khuẩn *Bacillus subtilis* giúp tôm tăng trưởng nhanh hơn.



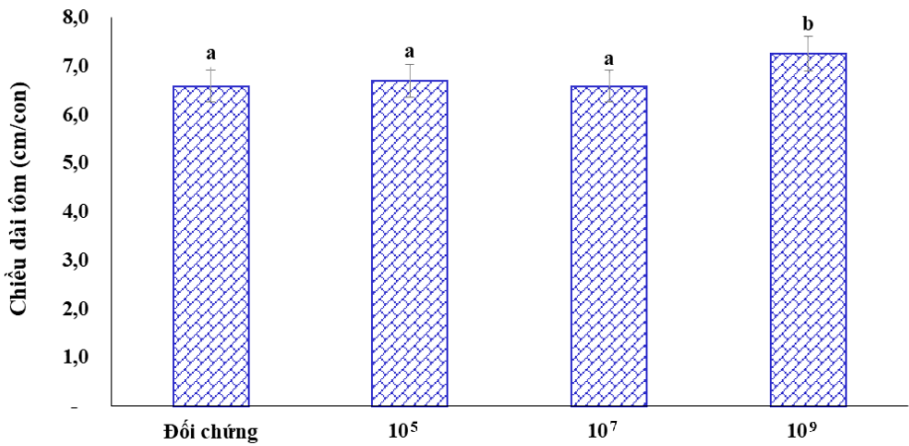
Hình 5. Khối lượng tôm thẻ chân trắng giữa các nghiệm thức

- Chiều dài phát triển của tôm

Tôm sau 60 ngày nuôi, ở nghiệm thức vi khuẩn *Bacillus subtilis* mật độ 10^9

CFU/ml, tôm có chiều dài $7,25 \pm 0,5$ cm/con, lớn nhất khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) so với nghiệm thức Đối chứng, Nghiệm thức bổ sung vi

khuẩn mật độ 10^5 CFU/ml và nghiệm thức có bổ sung vi khuẩn mật độ 10^7 CFU/ml (Hình 6).

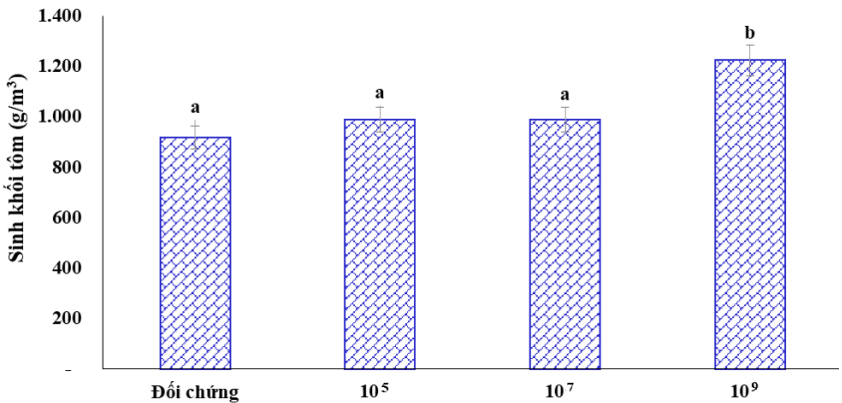


Hình 6. chiều dài phát triển của tôm thẻ chân trắng

- Sinh khối tôm

Kết quả Hình 7 cho thấy khối lượng tôm thu được từ 917 - 1.224 g/m³, trong

đó cao nhất là ở nghiệm thức bổ sung vi khuẩn *Bacillus subtilis* mật độ 10^9 CFU/ml (1.224 ± 113 g/m³) và khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).

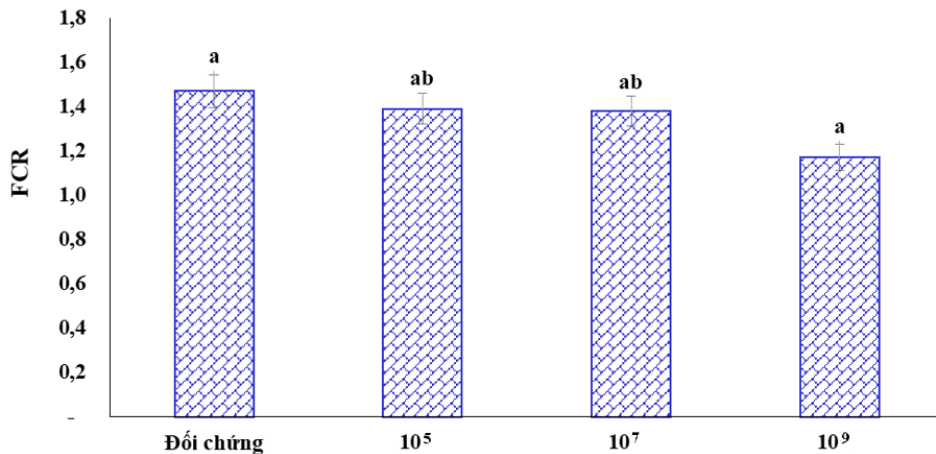


Hình 7. Sinh khối tôm thẻ chân trắng giữa các nghiệm thức

- Hệ số tiêu tốn thức ăn

Kết quả từ Hình 8 cho thấy hệ số tiêu tốn thức ăn của tôm thấp nhất là ở nghiệm thức bổ sung vi khuẩn *Bacillus* mật độ 10^9 CFU/ml ($1,17 \pm 0,06$) khác biệt ($p < 0,05$) so với nghiệm thức Đối chứng ($1,47 \pm 0,15$). Ngược lại, hệ số tiêu tốn thức ăn ở các nghiệm thức bổ sung vi

khuẩn *Bacillus subtilis* thấp còn lại, khác biệt không có ý nghĩa ($p > 0,05$) so với nghiệm thức Đối chứng. Theo Nguyễn Vĩnh Tiến và ctv. (2013) nuôi tôm thẻ chân trắng kết hợp với lọc sinh học có hệ số thức ăn là 1,66. Như vậy, ở nghiên cứu này, tỷ lệ sống và năng suất của tôm cao nên hệ số tiêu tốn thức ăn đạt thấp hơn.



Hình 8. Biểu đồ hệ số tiêu tốn thức ăn cho tôm nuôi ở các nghiệm thức

4. KẾT LUẬN

Kết quả tuyển chọn được vi khuẩn *Bacillus subtilis* (màu trắng đục) từ hạt biofloc có nguồn carbohydrate là Bột gạo, được định danh là *Bacillus subtilis*. Vi khuẩn này có khả năng thủy phân tinh bột, N và có vòng kháng khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* cao nhất.

Bổ sung vi khuẩn *Bacillus subtilis* được tuyển chọn với mật số 10^9 CFU/ml

vào bể nuôi tôm đạt hiệu quả cao nhất, giúp gia tăng tỉ lệ sống, sinh trưởng phát triển về chiều dài, trọng lượng và sinh khối của tôm thẻ chân trắng nuôi và hệ số chuyển đổi thức ăn FCR hiệu quả nhất.

Nghiên cứu là cơ sở khoa học cho việc tiếp tục thực hiện trong thực tế ao nuôi để có thể khuyến cáo áp dụng kỹ thuật này vào nuôi tôm thẻ chân trắng thâm canh hiệu quả và bền vững.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Abdussamad, E.M. and D.M. Thampy., 1994. Cannibalism in the tiger shrimp *Penaeus monodon* in nursery rearing phase. Journal. Aquaculture in the Tropics 9: 67-75
- Avnimelech Y, 1999. Carbon and nitrogen ratio as a control element in aquaculture systems. Aquaculture 176: 227–235.
- Avnimelech, Y., 2006. Bio filters: The need for an new comprehensive approach. Aquaculture Engineering 34: 172 – 178.
- Avnimelech Y., 2009. Biofloc Technology – A Practical Guide Book. The World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, United State. 182 pp.
- Boyd, C.E., 1990. Water quality in ponds for aquaculture. Agriculture Experiment Station, Auburn University, Alabama, 482 pages.
- Boyd, C.E., J.A. Hargreave and J.W. Clay, 2002. Codes of Practice and Conduct of Marine Shrimp Aquaculture. Report prepared under the World Bank, NACA, WWF and FAO Consortium Programme on shrimp farming and the environment. Published by the Consortium. World Bank, Washington, DC, USA, 31 pp.
- Cục Thủy sản, 2023. Hội nghị tổng kết nuôi tôm nước lợ năm 2022 và triển khai kế hoạch năm 2023.

- Emerenciano Maurício, Gerard Cuzon, Korynthia López Aguiar, Elsa NoreñaBarroso, Maite Máscaro and Gabriela Gaxiola, 2011. Biofloc meal pellet and plant-based diet As AN alternative nutrition for shrimp under limited water exchange system. World Aquaculture 2011.
- Jan Hudzicki, 2009. “Kirby-Bauer Disk Diffusion Susceptibility Test Protocol”, American Society for Microbiology.
- Lê Quốc Việt, Trần Minh Nhứt, Lý Văn Khánh, Tạ Văn Phương và Trần Ngọc Hải., 2015. Ứng dụng biofloc nuôi tôm thẻ chân trắng (*Litopenaeus vannamei*) với mật độ khác nhau kết hợp với cá rô phi (*Oreochromis niloticus*). Tạp chí khoa học Đại học Cần Thơ. 38: 44-52.
- Moriarty, D.J.W., 1998. Control of luminous *Vibrio* species in Penaeid Aquaculture ponds. Aquaculture, 16: 351 – 358.
- Nguyễn Vĩnh Tiến, Nguyễn Chí, Lê Hoàng Phương, Võ Lê Thanh Trúc và Trần Ngọc Hải, 2013. Nghiên cứu nuôi tôm thẻ chân trắng siêu thâm canh trong hệ thống bể tuần hoàn. Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển nông thôn. 12: 259-265.
- Nguyễn Thị Bích Đào, Trần Quang Khánh Vân, Nguyễn Văn Khanh và Nguyễn Quang Linh, 2015. Phân lập và tuyển chọn các chủng *Bacillus* ức chế vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* gây bệnh tôm chế sớm ở tỉnh Thừa Thiên Huế. Tạp chí Khoa học Đại học Huế. 100(1): 15-28.
- Wyk, P. V., Samocha, T.M., A.D. David, A.L. Lawrence, C.R. Collins, 2001. Intensive and super-intensive production of the Pacific White *Litopenaeus vannamei* in greenhouse – enclose raceway system. In Book of abstracts, Aquaculture 2001, Lake Buena Vista, L, 573p.
- Schillinger U, Lücke FK, 1989. Identification of lactobacilli from meat and meat products. Food Microbiol 4:199-208.
- Tạ V. Phương, Nguyễn V. Hoa, Doan X. Diep, Van –Thanh Vo, Ma B. Nhu, 2023. Effects of combined rice flour and molasses use on the growth performance of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei* Boone, 1931) applied biofloc technology. Israeli Journal of Aquaculture – Bamidgeh. 75 (2): 1-18.
- Tạ Văn Phương, Nguyễn Văn Bá và Nguyễn Văn Hòa, 2014. Ảnh hưởng của thời gian thủy phân và phương thức bổ sung Bột gạo lên năng suất tôm thẻ chân trắng. Tạp chí khoa học trường Đại học Cần Thơ, số chuyên đề: Thủy sản tháng 8, trang 54-62. ISSN: 1859-2333. NXB ĐH Cần Thơ.
- Whestone, J.M., G.D. Treece and A.D. Stokes, 2002. Opportunities and constraints in marine shrimp farming. Southern Regional Aquaculture Center (SRAC) publication No. 2600 USDA.

EFFECT OF BACILLUS ISOLATED FROM BIOFLOC PARTICLES IN IMPROVING GROWTH OF WHITELEG SHRIMP (*Litopenaeus vannamei*)

Ta Van Phuong*, Pham Thi My Xuan,
Cao Chi Cuong and Chau Manh Thuong
Tay Do University
(*Email: tvphuong@tdu.edu.vn)

ABSTRACT

This study aimed to isolate and select Bacillus strains from biofloc particles capable of hydrolyzing starch and nitrogen, , antagonistic activity against Vibrio parahaemolyticus, to improve the performance of intensive whiteleg shrimp (Litopenaeus vannamei) in aquaculture systems. The experiment was conducted at the Experimental Facility of the Faculty of Applied Biology, Tay Do University, utilizing five carbohydrate sources: Pellets (control), rice flour, wheat flour, seaweed, and molasses. The results identified a Bacillus subtilis strain with opaque white colonies, originating from rice flour. This Bacillus strain was tested in a white leg shrimp culture with varying Bacillus subtilis densities: Control, 10^5 CFU/mL; 10^7 CFU/mL; and 10^9 CFU/mL. The experiment was conducted over 60 days in composite tanks with a capacity of 500 liters per tank. Shrimp stocking density was 150 individuals/m³, with an initial shrimp weight of 0.45 ± 0.09 g/individual. Results shown that supplementation with Bacillus subtilis at 10^9 CFU/mL significantly improved shrimp survival rate, length, weight, and biomass, while achieving the lowest feed conversion ratio (FCR), with differences ($p < 0.05$) compared to other treatments. These findings are promising and provide a foundation for further trials in practical scale of intensive shrimp farming systems.

Keywords: Antibacterial zone, Bacillus bacteria, Biofloc, Hydrolysis zone, Whiteleg shrimp, Vibrio parahaemolyticus.