

DOI:10.22144/ctu.jvn.2022.176

ẢNH HƯỞNG CỦA VI KHUẨN *Bacillus* CM3.1 LÊN CHẤT LƯỢNG NƯỚC VÀ TĂNG TRƯỞNG CỦA TÔM THẺ CHÂN TRẮNG (*Litopenaeus vannamei*)

Phạm Thị Tuyết Ngân*, Vũ Hùng Hải, Vũ Ngọc Út và Huỳnh Trường Giang

Khoa Thủy sản, Trường Đại học Cần Thơ

*Người chịu trách nhiệm về bài viết: Phạm Thị Tuyết Ngân (email: pttngan@ctu.edu.vn)

Thông tin chung:

Ngày nhận bài: 08/03/2022

Ngày nhận bài sửa: 12/04/2022

Ngày duyệt đăng: 13/06/2022

Title:

Effects of bacteria *Bacillus* CM3.1 on water quality and growth of whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*)

Từ khóa:

Bacillus CM3.1, chất lượng nước, *Litopenaeus vannamei*, tăng trưởng

Keywords:

Bacillus CM3.1, growth performance, *Litopenaeus vannamei*, water quality

ABSTRACT

The study was conducted to determine the optimal concentration of *Bacillus* CM3.1 on water quality and growth of whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei*. The study was designed in two trials. Trial 1 evaluated the decomposition of the organic matter in shrimp pond effluent by using *Bacillus* CM3.1 at different doses (10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 and 10^6 CFU/mL) during 48 h. Trial 2 assessed the effects of *Bacillus* CM3.1 on water quality and growth of whiteleg shrimp. Shrimp were randomly distributed in 500L composite tanks with a density of 100 individuals/tank. The tanks were designed with 4 treatments including (i) control (without bacteria) and groups added *Bacillus* CM3.1 into rearing water to reach final doses of (ii) 10^2 , (iii) 10^3 , and (iv) 10^4 CFU/mL. Each group was set in 3 replicates and lasted in 60 days. The results showed that addition of *Bacillus* at different doses accelerated organic decomposition of shrimp effluent resulting in an increasing concentration of TAN, and simultaneously a significant decrease in COD, TSS and OSS concentration after 48h. Administration of *Bacillus* CM3.1 into rearing water at a dose of 10^4 CFU/mL improved significantly water quality parameters such as TAN, N-NO₂, BOD₅, COD and total *Bacillus* count. A significant decrease in total *Vibrio* count was recorded in groups added bacteria. Growth performance parameters of shrimp including specific growth rate (SGR), survival rate and biomass significantly increased in all groups added *Bacillus*, especially at a dose of 10^4 CFU/mL.

TÓM TẮT

Nghiên cứu được thực hiện nhằm xác định mật độ tối ưu của *Bacillus* CM3.1 lên chất lượng nước và tăng trưởng của tôm thẻ chân trắng *Litopenaeus vannamei*. Nghiên cứu bao gồm 2 thí nghiệm. Thí nghiệm 1 đánh giá khả năng phân hủy vật chất hữu cơ của chủng *Bacillus* CM3.1 ở các mật độ khác nhau (10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 và 10^6 CFU/mL) trong 48 giờ. Thí nghiệm 2 đánh giá ảnh hưởng của *Bacillus* CM3.1 lên chất lượng nước và tăng trưởng của tôm. Tôm được bố trí ngẫu nhiên vào bể composite 500L với mật độ 100 con/bể gồm 4 nghiệm thức (đối chứng và 3 nghiệm thức bổ sung với mật độ *Bacillus* 10^2 , 10^3 , 10^4 CFU/mL), mỗi nghiệm thức được lặp lại 3 lần và thời gian nuôi 60 ngày. Kết quả cho thấy việc bổ sung *Bacillus* CM3.1 ở các nồng độ khác nhau thúc đẩy quá trình phân hủy vật chất hữu cơ dẫn đến gia tăng hàm lượng TAN trong nước thải, đồng thời giảm đáng kể hàm lượng COD, TSS và OSS sau 48 giờ. Khi bổ sung chủng *Bacillus* CM3.1 vào nước ương tôm ở mật độ 10^4 CFU/mL giúp cải thiện đáng kể các thông số TAN, N-NO₂, BOD₅, COD và mật độ *Bacillus*. Mật độ tổng *Vibrio* trong nước giảm đáng kể ở các nghiệm thức bổ sung vi khuẩn. Các thông số tăng trưởng như tốc độ tăng trưởng tương đối về khối lượng (SGR), tỉ lệ sống và sinh khối tôm tăng đáng kể ở các nghiệm thức bổ sung *Bacillus*, đặc biệt là nghiệm thức 10^4 CFU/mL.

1. GIỚI THIỆU

Sử dụng vi sinh vật hữu ích là một giải pháp tích cực, có nhiều triển vọng để quản lý vi sinh trong ao nuôi thủy sản thâm canh, hạn chế đáng kể lượng chất hữu cơ thải ra môi trường góp phần phát triển nghề nuôi thủy sản bền vững. Theo Bao and Shen (2005) thì nuôi trồng thủy sản bền vững đòi hỏi phải thiết lập các mô hình nuôi sạch bằng việc sử dụng vi sinh vật hữu ích không có độc tố, không có phản ứng phụ, không có dư lượng kháng sinh và không có sự kháng thuốc, đồng thời có hiệu quả trong việc cải thiện môi trường và gia tăng sức đề kháng cho vật nuôi trong việc giảm bệnh và duy trì cân bằng sinh thái.

Giống *Bacillus* phân bố rất rộng trong tự nhiên nhất là trong bùn đất, chúng tham gia tích cực vào sự phân hủy vật chất hữu cơ nhờ vào khả năng sinh nhiều loại enzyme ngoại bào (Kuebutornye et al., 2019). Do sự đa dạng sinh thái và loài nên các hoạt chất sinh học của chúng cũng rất phong phú. Triển vọng ứng dụng *Bacillus* trong nhiều lĩnh vực đời sống, đặc biệt là trong nuôi trồng thủy sản là rất to lớn. Một số loài thuộc nhóm vi khuẩn *Bacillus* đã được ứng dụng trong nuôi trồng thủy sản với những đặc tính như tạo ra các enzyme phân hủy hợp chất hữu cơ và kiểm soát sự phát triển quá mức của vi sinh vật gây bệnh, giữ cho môi trường luôn ở trạng thái cân bằng là đặc tính nổi trội của nhóm vi khuẩn này (Soltani et al., 2019). Tại Khoa Thủy sản, Trường Đại học Cần Thơ, trong khuôn khổ dự án ODA, một số nghiên cứu phân lập và chọn lọc vi khuẩn hữu ích để phục vụ cho nuôi trồng thủy sản đã được thực hiện trong đó có *Bacillus* sp. Nhóm nghiên cứu đã chọn lọc được chủng *Bacillus* sp. CM3.1 (phân lập từ bùn đáy ao nuôi tôm quảng canh ở Cà Mau), có khả năng ức chế vi khuẩn gây bệnh (*V. parahaemolyticus*) với đường kính kháng khuẩn 13,05 mm và phân hủy vật chất hữu cơ với hoạt tính enzyme α -amylase, protease, cellulose cao (Ngân và ctv., 2021). Nghiên cứu này được thực hiện nhằm xác định nồng độ bổ sung *Bacillus* sp. CM3.1 tối ưu để cải thiện chất lượng nước và cải thiện tăng trưởng của tôm thẻ chân trắng.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Thời gian và địa điểm nghiên cứu

Nghiên cứu được tiến hành từ tháng 3/2021 đến tháng 6/2021 tại Bộ môn Thủy sinh học ứng dụng, Khoa Thủy sản, Trường Đại học Cần Thơ.

2.2. Phương pháp chuẩn bị vi khuẩn

Chủng vi khuẩn *Bacillus* sp. CM3.1 được phục hồi và nuôi tăng sinh trong môi trường TSB (HiMedia, Mumbai, India) có bổ sung 1% NaCl ở

30°C trong 24 giờ. Dung dịch vi khuẩn được ly tâm để loại bỏ phần dịch nổi và rửa vi khuẩn với nước muối sinh lý 0,9% và ly tâm ở tốc độ 3.000 vòng/phút trong 15 phút ở 4°C. Huyền phù tế bào được điều chỉnh bằng nước muối sinh lý để đạt giá trị OD bằng 0,5 tại bước sóng 600 nm, tương ứng với mật độ vi khuẩn 10^9 CFU/mL (Biesta-Peters et al., 2010).

2.3. Phương pháp thí nghiệm

2.3.1. Bố trí thí nghiệm

– Thí nghiệm 1: Đánh giá khả năng phân hủy vật chất hữu cơ của *Bacillus* sp. CM3.1 ở các mật độ khác nhau trong điều kiện *in vitro*

Thí nghiệm gồm 6 nghiệm thức được bố trí trong chai Duran 250 mL chứa 200 mL nước thải ao nuôi tôm thẻ chân trắng. Các nghiệm thức thí nghiệm được bổ sung 1% huyền phù tế bào *Bacillus* CM3.1 vào bình Duran để đạt mật độ vi khuẩn lần lượt là 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 CFU/mL trong khi ở nghiệm thức đối chứng thêm 1% nước muối sinh lý 0,9%. Mỗi nghiệm thức được bố trí lặp lại 3 lần. Các chỉ tiêu theo dõi bao gồm nhiệt độ, pH, tổng đạm amôn (TAN), vật chất hữu cơ lơ lửng (OSS), tổng vật chất lơ lửng (TSS), nhu cầu oxy hóa học (COD) được xác định ở thời điểm 0 giờ (trước khi bổ sung vi khuẩn) và sau 48 giờ bổ sung vi khuẩn.

– Thí nghiệm 2: Ảnh hưởng của *Bacillus* lên chất lượng nước và tăng trưởng của tôm thẻ chân trắng nuôi trong bể

Bố trí thí nghiệm: Tôm thẻ (khối lượng trung bình $0,5 \pm 0,05$ g) được chọn để bố trí vào bể (500 L) với mật độ nuôi là 100 con/bể. Thê tích nước trong bể nuôi duy trì ở mức 400 L và mỗi bể được che bằng lưới lan để tránh tôm thất thoát trong quá trình thí nghiệm. Thí nghiệm được thiết kế gồm 4 nghiệm thức với 3 lần lặp lại gồm nghiệm thức đối chứng (không bổ sung vi khuẩn) và 3 nghiệm thức bổ sung huyền phù tế bào *Bacillus* CM3.1 trực tiếp vào nước để đạt mật độ lần lượt là 10^2 , 10^3 và 10^4 CFU/mL nước nuôi. Bổ sung vi khuẩn với chu kỳ là 7 ngày/lần.

Chăm sóc quản lý: Tôm được cho ăn 3 lần mỗi ngày bằng thức ăn viên công nghiệp (40% đạm) với khẩu phần ăn là 3 - 4% khối lượng thân; lượng thức ăn được theo dõi và điều chỉnh mỗi ngày để phù hợp với nhu cầu của tôm. Bể được sục khí nhằm duy trì ổn định hàm lượng oxy hoà tan (DO) > 4 mg/L. Hoạt động của tôm được theo dõi thường xuyên. Trong quá trình nuôi không thay nước mà chỉ cấp thêm nước để bù lại lượng nước do hút cạn bể ra (5 ngày hút cạn đáy bể 1 lần).

Thu thập số liệu: các thông số nhiệt độ, pH, độ mặn, DO được theo dõi mỗi ngày (8:00 và 16:00). Mẫu nước được thu định kỳ 7 ngày/lần để phân tích hàm lượng BOD₅, COD, TAN, N-NO₂, TSS, độ kiềm và các chỉ tiêu vi sinh là tổng *Vibrio* spp. và *Bacillus* spp. Sau 60 ngày nuôi, tôm được thu để xác định khối lượng, đánh giá tăng trọng (WG), tốc độ tăng trưởng tuyệt đối (DWG), tốc độ tăng trưởng tương đối (SGR), tỉ lệ sống (SR) và sinh khối tôm (B) theo công thức sau:

- WG (g): $WG = W_2 - W_1$
- DWG (g/ngày) = $(W_2 - W_1) / T$
- SGR (%/ngày) = $100 \times (\ln W_2 - \ln W_1) / T$
- SR (%) = $(\text{số tôm thu} / \text{số tôm ban đầu}) \times 100$
- B (kg/m³) = khối lượng tôm thu được mỗi bể/thể tích bể (0,4 m³).

Trong đó: W₁ là khối lượng đầu (g); W₂ là khối lượng lúc thu (g) và T là số ngày nuôi.

2.4. Xử lý số liệu

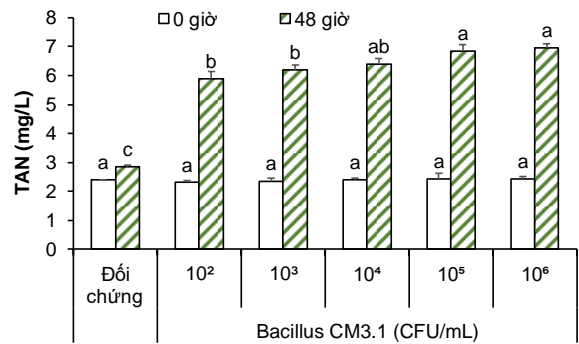
Số liệu được thu thập và trình bày dưới dạng giá trị trung bình và sai số chuẩn (Mean±SEM). Phân tích ANOVA một nhân tố bằng phần mềm SPSS phiên bản 20.0 (SPSS Inc. Chicago, Illinois, USA) để so sánh thống kê các giá trị trung bình giữa các nghiệm thức ở mức p<0,05 bằng phép thử Tukey.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Đánh giá khả năng phân hủy vật chất hữu cơ của vi khuẩn *Bacillus* sp. CM3.1 ở các mật độ khác nhau trong điều kiện *in vitro*

Kết quả cho thấy nhiệt độ giữa các nghiệm thức trong thí nghiệm ít biến động (27,5-28,1°C) và khác biệt không có ý nghĩa giữa các nghiệm thức (p>0,05). Giá trị pH ở các nghiệm thức bổ sung *Bacillus* sp. có xu hướng giảm mạnh từ 8,0 xuống 6,8 sau 48 giờ và khác biệt có ý nghĩa so với đối chứng (p<0,05). Hàm lượng TAN sau 48 giờ ở các nghiệm thức bổ sung *Bacillus* sp. có chiều hướng tăng cao, cao hơn có ý nghĩa so với đối chứng (Hình 1).

Đặc biệt nghiệm thức 10⁵ và 10⁶ đạt hàm lượng TAN cao nhất (lần lượt là 6,85± 0,21 và 6,95±0,15 mg/L), khác biệt có ý nghĩa (p<0,05) so với nghiệm thức 10² và 10³ CFU/mL (5,89±0,26 và 6,21±0,16 mg/L), nhưng khác biệt không có ý nghĩa (p>0,05) so với nghiệm thức 10⁴ CFU/mL (6,4±0,19 mg/L).



Hình 1. Hàm lượng TAN trong nước thải sau 48 giờ bổ sung *Bacillus* CM3.1 ở các mật độ khác nhau

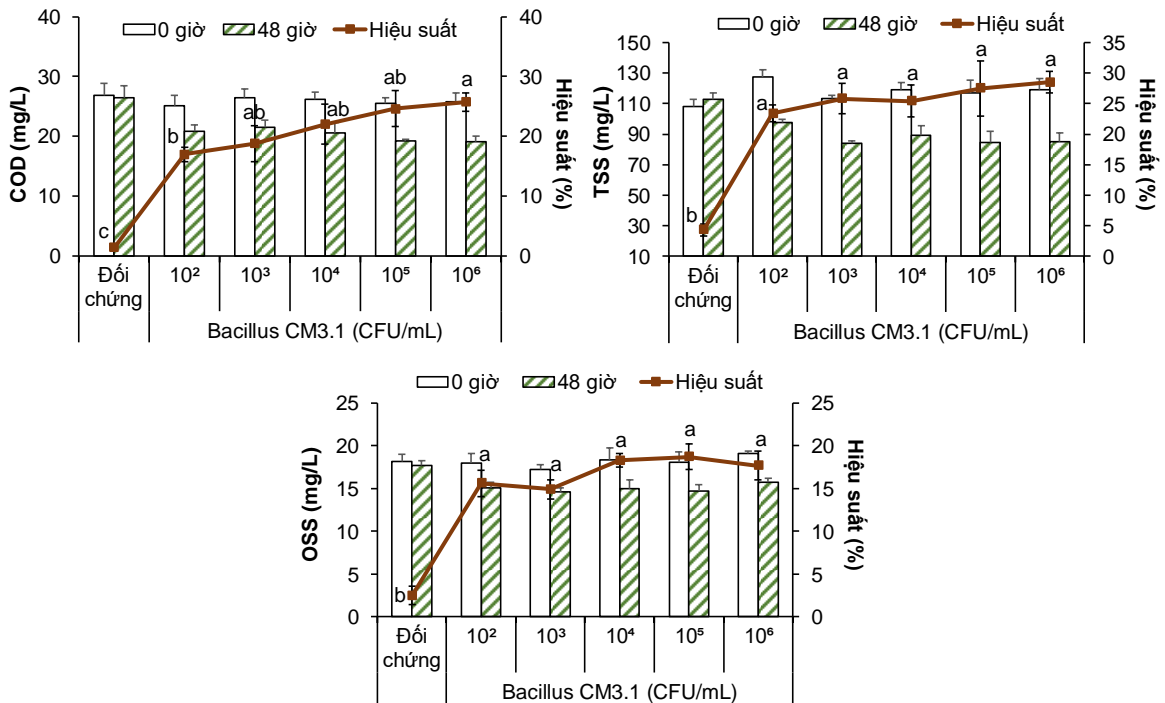
Các ký tự khác nhau (a,b,c) ở cùng thời điểm thì khác biệt có ý nghĩa (p<0,05).

Hàm lượng COD sau 48 giờ có sự khác biệt giữa các nghiệm thức bổ sung *Bacillus* sp. và đối chứng (Hình 2). So với trước khi bổ sung vi khuẩn (0 giờ) thì hàm lượng COD sau 48 giờ ở đối chứng thay đổi không đáng kể (26,4±2,01 mg/L), trong khi các nghiệm thức bổ sung vi khuẩn có xu hướng giảm mạnh (25,82±0,25 đến 20,22±0,47 mg/L). COD ở nghiệm thức 10⁶ CFU/mL giảm nhiều nhất (25,7%), khác biệt có ý nghĩa (p<0,05) so với nghiệm thức 10² CFU/mL (17%) và khác biệt không ý nghĩa (p>0,05) so với các nghiệm thức bổ sung còn lại (18,8-24,6%).

Tương tự, hàm lượng TSS và OSS giảm đáng kể sau 48 giờ bổ sung *Bacillus* sp.. Hàm lượng TSS và OSS ở đối chứng (lần lượt là 113±4 và 17,7±0,6 mg/L) cao hơn so với các nghiệm thức bổ sung vi khuẩn (lần lượt là 88,2±2,5 và 15±0,2 mg/L). Nếu tính theo phần trăm, hàm lượng TSS ở các nghiệm thức bổ sung *Bacillus* sp., giảm từ 23,4-28,5% và hàm lượng OSS giảm từ 14,9-18,7%, cao hơn có ý nghĩa (p<0,05) so với nghiệm thức đối chứng. Tuy nhiên, giữa các nghiệm thức bổ sung vi khuẩn khác biệt không có ý nghĩa (p>0,05). Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Ngân (2012), tác giả cho thấy hàm lượng COD, TSS và OSS giảm có ý nghĩa thống kê khi bổ sung vi khuẩn *Bacillus* sp. ở mật độ 10⁵ CFU/mL so với đối chứng. Nguyên nhân là do nhóm vi khuẩn *Bacillus* sp. tham gia vào quá trình amôn hóa giúp chuyển hóa các dạng đạm hữu cơ này thành dạng vô cơ làm giảm ô nhiễm hữu cơ trong môi trường nước và bùn đáy (Hlorldzi et al., 2020). Ngoài khả năng phân hủy hữu cơ vừa nêu, *Bacillus* được chứng minh là nhóm vi khuẩn dị dưỡng có khả năng khử một số dạng đạm trong điều kiện yếm khí. Theo Hui et al., (2019) và Ma & He (2020) thì *Bacillus amyloliquefaciens* chủng DT chuyển hóa

các thành phần hữu cơ thành NH_4^+ , trong khi *Bacillus subtilis* M7-1 có khả năng xử lý $N-NO_2^-$ trong môi trường. Trong nghiên cứu hiện tại, pH ở các nghiệm thức bổ sung *Bacillus* sp. CM3.1 giảm đáng kể sau 48 giờ thí nghiệm, nguyên nhân có thể là do vi khuẩn đã hấp thụ trực tiếp NH_3 dẫn đến sự

khác biệt về nồng độ ion H^+ trong nước. *Bacillus* spp. có khả năng sử dụng đa dạng các nguồn đạm khác nhau như NH_3 và NH_4^+ cho quá trình dị hóa protein (Donohue & Bernlohr, 1981 được trích dẫn bởi Zink et al., 2011).



Hình 2. Hàm lượng COD, TSS và OSS trong nước thải sau 48 giờ bổ sung *Bacillus* CM3.1 ở các mật độ khác nhau

Các ký tự (a,b,c) khác nhau trên cùng thời điểm thì khác biệt có ý nghĩa ($p < 0,05$).

Nhìn chung, việc bổ sung *Bacillus* sp. CM3.1 giúp cải thiện chất lượng nước thải từ ao nuôi tôm nhưng sự khác biệt không đáng kể giữa các nồng độ bổ sung. Theo kết quả này thì thí nghiệm tiếp theo được thực hiện với ba nồng độ bổ sung thấp (10^2 , 10^3 và 10^4 CFU/mL).

3.2. Đánh giá ảnh hưởng của *Bacillus* sp. CM3.1 lên chất lượng nước và tăng trưởng của tôm thẻ chân trắng

3.2.1. Biến động của các chỉ tiêu chất lượng nước

Nhiệt độ, pH và oxy hoà tan (DO)

Nhiệt độ ở các nghiệm thức chênh lệch không đáng kể, trung bình từ 28,7 – 28,9°C và dao động giữa ngày và đêm không quá 1°C. pH ở các nghiệm thức dao động trung bình từ 7,87 đến 7,91 và không quá 0,5 đơn vị trong ngày. Hàm lượng DO duy trì ổn định lớn hơn 4 mg/L, trung bình từ 4,71 đến 4,84

mg/L. Nhìn chung, các thông số nhiệt độ, pH, hàm lượng DO đều nằm trong ngưỡng thích hợp cho tôm và khác biệt không có ý nghĩa giữa các nghiệm thức ($p > 0,05$).

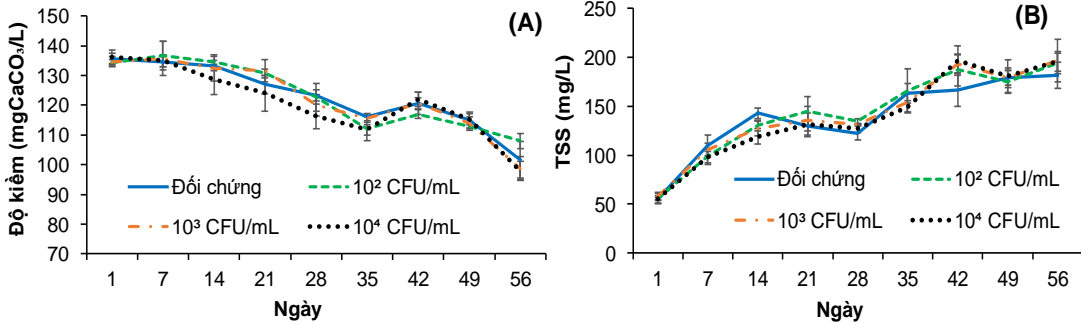
Độ kiềm và tổng chất rắn lơ lửng (TSS)

Độ kiềm ghi nhận ở các nghiệm thức có xu hướng giảm nhiều trong thí nghiệm (Hình 3A). Trong 35 ngày đầu, độ kiềm có xu hướng giảm nhẹ ở các nghiệm thức (135 - 114 mgCaCO₃/mL), sau đó có xu hướng tăng vào ngày 42 (117–122 mgCaCO₃/L). Cuối thí nghiệm thì độ kiềm có xu hướng giảm và đạt giá trị trung bình 102±2 mgCaCO₃/L vào ngày 56. Kết quả phân tích thống kê cho thấy giữa các nghiệm thức khác biệt không có ý nghĩa ($p > 0,05$) và trong ngưỡng khuyến cáo phù hợp cho sự sinh trưởng của tôm nuôi. Theo Ebeling et al. (2006), độ kiềm trong khoảng 100-150 mg/L được xem là thích hợp đối với các hệ thống

nuôi không thay nước, đồng thời cũng là ngưỡng lý tưởng cho quá trình nitrate hóa diễn ra.

Ngược lại, tổng chất rắn lơ lửng (TSS) có xu hướng tăng theo thời gian thí nghiệm (Hình 3B). Trong 21 ngày đầu, TSS tăng cao ở các nghiệm thức và đạt giá trị $135,5 \pm 3,5$ mg/L và duy trì tương đối ổn định trong khoảng 119-143 mg/L đến ngày 28 trước khi TSS có xu hướng tăng mạnh về cuối giai đoạn nuôi. Sau 56 ngày nuôi thì TSS trung bình là

$192,2 \pm 3,5$ mg/L và khác biệt không có ý nghĩa ($p > 0,05$) giữa các nghiệm thức. Kết quả này ngược lại với thí nghiệm đánh giá khả năng phân hủy vật chất hữu cơ bởi chủng khuẩn *Bacillus* CM3.1 trong *in vitro*, nguyên nhân có thể do trong bể nuôi tôm có sự tích tụ và hoạt động bắt mồi của tôm làm tăng vật chất lơ lửng cũng như thức ăn thừa, phân tôm,... Tuy nhiên hàm lượng TSS vẫn nằm trong ngưỡng lý tưởng (100-300 mg/L) đối với các hệ thống nuôi tôm thể *Litopenaeus vannamei* (Gaona et al, 2017).



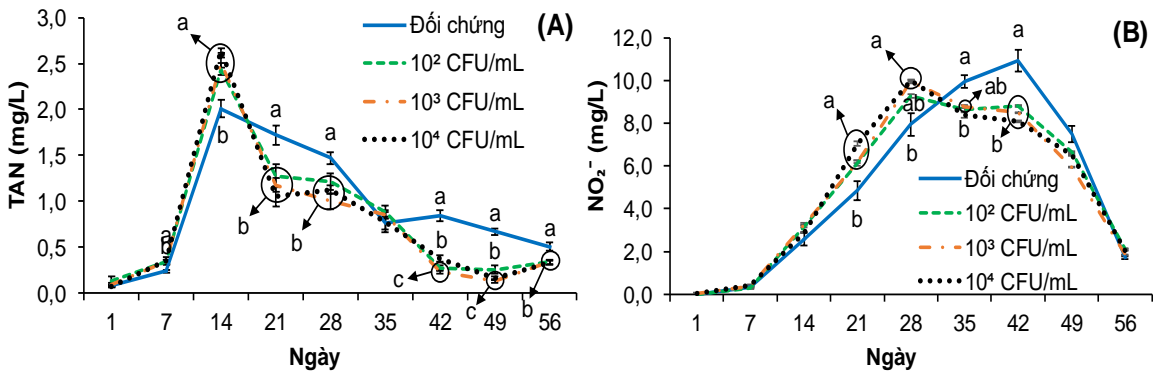
Hình 3. Biến động độ kiềm (A) và TSS (B) trong 56 ngày nuôi

Các ký tự khác nhau (a, b) trên cùng thời điểm thì khác biệt có ý nghĩa ($p < 0,05$).

Tổng đạm amon (TAN) và Nitrite (NO_2^-)

Hàm lượng TAN có xu hướng tăng cao trong những ngày đầu thí nghiệm. TAN (ngày 14) ở các nghiệm thức bổ sung vi khuẩn ($2,53 \pm 0,06$ mg/L) cao hơn có ý nghĩa ($p < 0,05$) so với nghiệm thức đối chứng ($2,009 \pm 0,098$ mg/L). Sau đó TAN giảm nhiều ở hầu hết các nghiệm thức vào cuối thí nghiệm. Vào ngày 21 và 28, TAN ở các nghiệm thức bổ sung vi khuẩn (lần lượt là $1,168 \pm 0,065$ mg/L và $1,112 \pm 0,062$ mg/L), thấp hơn có ý nghĩa ($p < 0,05$) so

với đối chứng (lần lượt là $1,722 \pm 0,105$ mg/L và $1,470 \pm 0,067$ mg/L). Tuy nhiên, ngày 35 thì giữa các nghiệm thức khác biệt không có ý nghĩa ($p > 0,05$), dao động trung bình $0,757-0,879$ mg/L và tiếp tục giảm nhanh đến ngày 56. Trong đó, nghiệm thức đối chứng đạt giá trị cao nhất ($0,502 \pm 0,047$ mg/L) và các nghiệm thức bổ sung *Bacillus* CM3.1 đạt giá trị thấp nhất ($0,332 \pm 0,003$ mg/L). Nhìn chung, sự khác biệt không có ý nghĩa giữa các mật độ vi khuẩn bổ sung ($p > 0,05$).



Hình 4. Biến động hàm lượng TAN (A) và NO_2^- (B) trong 56 ngày nuôi

Các ký tự khác nhau (a, b) trên cùng thời điểm thì khác biệt có ý nghĩa ($p < 0,05$).

Hàm lượng NO_2^- có xu hướng tích lũy trong quá trình thí nghiệm (Hình 4B). NO_2^- tăng mạnh trong 28 ngày đầu thí nghiệm ở các nghiệm thức, đạt trung

bình $9,748 \pm 0,234$ mg/L, đặc biệt là nghiệm thức bổ sung vi khuẩn với mật độ 10^3 và 10^4 CFU/mL cao hơn có ý nghĩa ($p < 0,05$) so với đối chứng

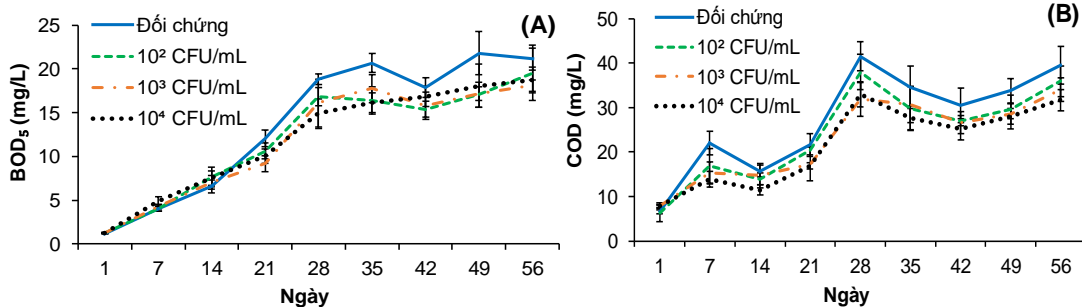
(7,947±0,523 mg/L). Tuy nhiên, NO₂⁻ ở các nghiệm thức bổ sung vi khuẩn giảm nhẹ đến ngày 42 (8,467±0,631 mg/L), trong khi đó ở đối chứng có xu hướng tăng cao (10,924±0,515 mg/L) và khác biệt có ý nghĩa (p<0,05) so với các nghiệm thức bổ sung vi khuẩn. Vào cuối giai đoạn thí nghiệm, NO₂⁻ giảm đáng kể ở các nghiệm thức, đạt giá trị trung bình 1,929±0,093 mg/L vào ngày 56 và khác biệt không có ý nghĩa (p>0,05) giữa các nghiệm thức.

Hàm lượng TAN và NO₂⁻ tăng theo quá trình thí nghiệm, đặc biệt là TAN ở các nghiệm thức tăng nhanh trong 14 ngày đầu, có thể là do quá trình khoáng hóa các vật chất hữu cơ diễn ra nhanh hơn ở các nghiệm thức bổ sung *Bacillus*, dẫn đến hình thành NH₄⁺/NH₃ trong nước. Nhưng sau đó giảm mạnh là do sự hiện diện của nhóm vi khuẩn chuyển hóa đạm ammonia (ammonia oxidizing bacteria, AOB) đã oxy hóa ammonia thành NO₂⁻ dẫn đến hàm lượng NO₂⁻ tăng cao đến ngày nuôi 28 trước khi giảm nhanh vào cuối giai đoạn thí nghiệm do hoạt động chuyển hóa nitrite thành nitrate diễn ra bởi nhóm vi khuẩn nitrate hóa (nitrite oxidizing bacteria, NOB). Trong nghiên cứu của Nimrat et al. (2012), bổ sung lợi khuẩn *Bacillus* từ các sản phẩm thương mại vào nước ương nuôi tôm thẻ chân trắng

đề đạt mật độ 10⁹ CFU/mL nước ương giúp giảm đáng kể hàm lượng NH₃ và NO₂⁻ trong nước so với đối chứng.

Tiêu hao oxy sinh học (BOD₅) và tiêu hao oxy hóa học (COD)

Tiêu hao oxy sinh học (BOD₅) có xu hướng tích lũy trong suốt thời gian thí nghiệm (Hình 5A). Ở giai đoạn đầu của thí nghiệm, hàm lượng BOD₅ có xu hướng tăng nhanh đến ngày 35 (17,73±1,04 mg/L) và duy trì tương đối ổn định (15,38-21,79 mg/L) ở giai đoạn cuối thí nghiệm. Nhìn chung, hàm lượng BOD₅ ở nghiệm thức đối chứng vào cuối thí nghiệm cao hơn so với các nghiệm thức bổ sung vi khuẩn, nhưng khác biệt không có ý nghĩa thống kê (p>0,05). Tương tự, tiêu hao oxy hóa học (COD) cũng có xu hướng tích lũy sau 56 ngày thí nghiệm (Hình 5B). Hàm lượng COD tăng đáng kể trong giai đoạn đầu thí nghiệm (36,1±2,25 mg/L) vào ngày 28 trước khi có xu hướng giảm nhẹ đến ngày thứ 42 (27,33±1,13 mg/L) và tăng trở lại vào ngày 56 (35,3±1,66 mg/L). Nhìn chung, COD ở các nghiệm thức bổ sung *Bacillus* CM3.1 luôn thấp hơn so với nghiệm thức đối chứng, nhưng sự khác biệt không có ý nghĩa giữa các mức độ bổ sung khác nhau (p>0,05).



Hình 5. Biến động hàm lượng BOD₅ (A) và COD (B) trong 56 ngày nuôi

Các ký tự khác nhau (a, b) trên cùng thời điểm thì khác biệt có ý nghĩa (p<0,05).

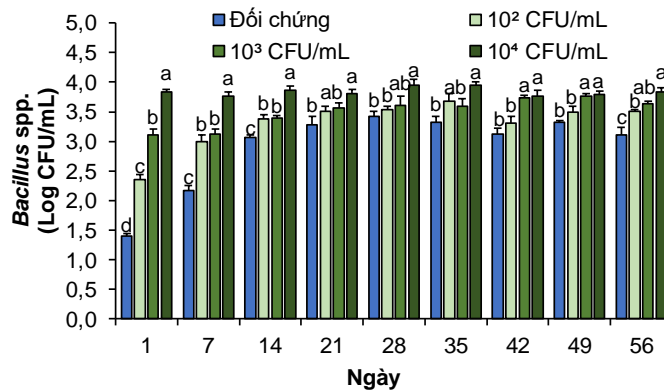
BOD₅ được sử dụng như một thông số đánh giá mức độ ô nhiễm chất hữu cơ trong nước (Rajan, 2015). Hàm lượng BOD₅ trong nước nhỏ hơn 4 mg/L biểu thị nước sạch, trong khi giá trị BOD lớn hơn 10 mg/L cho thấy mức độ ô nhiễm cao do sự hiện diện của các vật chất hữu cơ phân hủy trong nước cao (McNeely et al., 1979). Theo Boyd (1998), ao nuôi thủy sản điển hình có giá trị BOD₅ 5-20 mg/L. Bên cạnh, COD cũng được sử dụng để đánh giá mức độ dinh dưỡng của nước ao (Boyd, 1998). Nồng độ COD của nước ao có thể biến động từ 10-20 mg/L, thông thường thì dao động 40-80 mg/L. Hàm lượng BOD₅ và COD có xu hướng tích lũy trong suốt giai đoạn thí nghiệm. Hàm lượng

COD ở các nghiệm thức bổ sung vi khuẩn thấp hơn không đáng kể so với nghiệm thức đối chứng, nhưng vẫn vượt ngưỡng khuyến cáo (< 20 mg/L) đối với các hệ thống nuôi trồng thủy sản (Rath, 2011). Trong một báo cáo tổng hợp của Hlordzi et al. (2020) thì việc bổ sung *Bacillus* spp. giúp cải thiện chất lượng trong nuôi trồng thủy sản dẫn đến BOD₅ và COD thấp hơn so với nghiệm thức đối chứng. Điều này được cho là nhu cầu DO để phân hủy lượng vật chất giảm do khả năng sử dụng thức ăn của tôm tốt hơn và có thể do quá trình khoáng hóa các vật chất hữu cơ bởi nhóm *Bacillus* spp. ở mức DO thấp hơn. Việc bổ sung lợi khuẩn *Bacillus* sp. CM3.1 vào môi trường nước cho thấy sự khác biệt

về mật độ vi khuẩn trong môi trường nước, đặc biệt là mật độ khuẩn *Bacillus* spp. và mật độ *Vibrio* spp.. Các tác động kiểm soát quần thể vi khuẩn có lợi và giảm mật độ vi khuẩn có hại của chủng *Bacillus* sp. trong ao nuôi thủy sản đã được đề cập trong báo cáo của Soltani et al. (2019). Theo đó, nhóm tác giả cho rằng các chủng *Bacillus* spp. sinh các hợp chất có tính kháng khuẩn (bao gồm peptide, lipopeptide antibiotics, bacteriocins), thay đổi pH môi trường bằng cách tiết ra các hợp chất acid hữu cơ, cạnh tranh dinh dưỡng và đối kháng.

3.2.2. Biến động mật độ vi khuẩn *Bacillus* và *Vibrio* trong nước

Sau 56 ngày nuôi, mật độ khuẩn *Bacillus* spp. ở các nghiệm thức bổ sung vi khuẩn *Bacillus* sp. CM3.1 cao hơn có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) so với nghiệm thức đối chứng ($3,105 \pm 0,131$ Log CFU/mL). Tuy nhiên không tìm thấy sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$) giữa nghiệm thức bổ sung *Bacillus* ở nồng độ 10^3 và 10^4 CFU/mL (Hình 6).

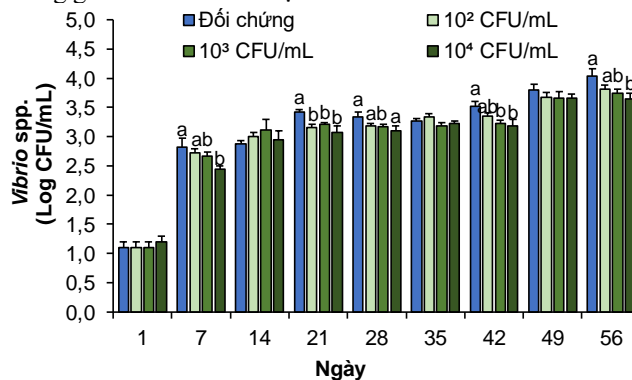


Hình 6. Biến động mật độ *Bacillus* spp. ở các nghiệm thức trong 56 ngày nuôi

Các ký tự khác nhau (a, b, c) trên cùng thời điểm thì khác biệt có ý nghĩa ($p < 0,05$).

Mật độ tổng *Vibrio* spp. trong nước ở nghiệm thức đối chứng luôn cao hơn có ý nghĩa ($p < 0,05$) so với các nghiệm thức bổ sung *Bacillus* sp. CM3.1 trong suốt thời gian thí nghiệm (Hình 7). Kết quả này giúp xác định *Bacillus* sp. CM3.1 có khả năng kháng *Vibrio* trong điều kiện bể nuôi. Trước đây trong nghiên cứu của Ngân và ctv. (2021) đã xác định được *Bacillus* sp. CM3.1 có khả năng kháng *V. parahaemolyticus* trong điều kiện *in vitro* với vòng kháng khuẩn là 13,05 mm bằng phương pháp cấy vết. Do vi khuẩn *Vibrio* là nhóm vi khuẩn dị dưỡng phát triển tốt trong môi trường giàu hữu cơ và ưa độ

mặn cao nên chúng có có xu hướng tăng nhanh về mật độ ở tất cả các nghiệm thức. Mật độ *Vibrio* spp. vào ngày 56 ở nghiệm thức đối chứng cao nhất ($4,043 \pm 0,117$ Log CFU/mL), và sai khác có ý nghĩa so với nghiệm thức bổ sung *Bacillus* sp. CM3.1 với nồng độ 10^4 CFU/mL (có mật độ *Vibrio* spp. thấp nhất $3,646 \pm 0,097$ Log CFU/mL). Nghiệm thức 10^2 và 10^3 CFU/mL đạt mật độ *Vibrio* spp. lần lượt $3,745 \pm 0,069$ và $3,812 \pm 0,064$ Log CFU/mL và khác biệt không có ý nghĩa ($p > 0,05$) so với các nghiệm thức còn lại (Hình 7).



Hình 7. Biến động mật độ *Vibrio* spp. trong thí nghiệm

Các ký tự khác nhau trên cùng thời điểm thì khác biệt có ý nghĩa ($p < 0,05$).

Do vậy bổ sung vi khuẩn *Bacillus* sp. CM3.1 vào môi trường nước dẫn đến sự khác biệt về mật độ vi khuẩn *Vibrio* spp.. Điều này đã được chứng minh trong nhiều báo cáo của các nhà khoa học, Soltani et al. (2019) báo cáo về các tác động điều chỉnh quần thể vi khuẩn có lợi và kiểm soát mật độ vi khuẩn có hại của chủng *Bacillus* trong ao nuôi thủy sản. Nhóm tác giả này cũng cho rằng các chủng *Bacillus* spp. sinh các hợp chất có tính kháng khuẩn (bao gồm peptide, lipopeptide antibiotics, bacteriocins...), thay đổi pH môi trường bằng cách tiết ra các hợp chất acid hữu cơ, cạnh tranh dinh dưỡng và đối kháng với vi khuẩn gây bệnh.

3.2.3. Tăng trưởng và tỉ lệ sống của tôm thẻ chân trắng

Sau 60 ngày nuôi, các thông số tăng trưởng của tôm như khối lượng, tăng trọng (WG) và tốc độ tăng trưởng tuyệt đối về khối lượng (DWG) khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$) (Bảng 1). Tốc độ tăng trưởng tương đối về khối lượng (SGR) cao nhất ở nghiệm thức 10^4 CFU/mL và thấp nhất ở nghiệm thức đối chứng nhưng khác biệt không có ý nghĩa thống kê. Tỉ lệ sống của tôm được cải thiện ở các nghiệm thức bổ sung *Bacillus* sp. CM3.1, trong đó cao nhất ở nghiệm thức 10^3 và 10^4 CFU/mL, khác biệt có ý nghĩa ($p < 0,05$) so với đối chứng. Kết quả thống kê ở nghiệm thức đối chứng có tỉ lệ sống thấp nhất, nhưng khác biệt không có ý nghĩa ($p > 0,05$) so với nghiệm thức 10^2 CFU/mL. Tương tự, sinh khối tôm nuôi ở các nghiệm thức bổ sung khuẩn cao hơn có ý nghĩa ($p < 0,05$) so với nghiệm thức đối chứng.

Kết quả nghiên cứu của Liu et al. (2010) cho thấy bổ sung *Bacillus subtilis* E20 ở nồng độ 10^8 và

10^9 CFU/mL giảm đáng kể mật độ *Vibrio* trong nước ao ương ấu trùng tôm *L. vannamei*. Trong đánh giá cảm nhiễm với *Vibrio harveyi* của Nimrat et al. (2019), các nghiệm thức bổ sung sản phẩm *Bacillus* (bao gồm *Bacillus thuringiensis*, *B. megaterium*, *B. licheniformis*, *B. polymyxa* và *B. subtilis*) vào thức ăn ở nồng độ 10^8 CFU/g trộn vào thức ăn và 10^7 CFU/mL nước ương cho tỉ lệ chết của tôm lần lượt là 43,24% và 45,05%, thấp hơn có ý nghĩa so với nghiệm thức đối chứng (63,06%). Kết quả của nghiên cứu này tương đồng với các báo cáo trước đây, mật độ *Vibrio* trong nước nuôi tôm giảm đáng kể khi bổ sung *Bacillus* ở nồng độ 10^3 và 10^4 CFU/mL. Từ các tác động tích cực của việc bổ sung vi khuẩn lên chất lượng nước tôm nuôi dẫn đến tăng trưởng, tỉ lệ sống và sinh khối tôm nuôi tăng đáng kể. Theo Chai et al. (2016), lợi khuẩn *Bacillus* PC465 giúp cải thiện khả năng sử dụng và chuyển hóa thức ăn trong ruột tôm *L. vannamei* nhờ khả năng sinh hoạt tính amylase, protease và lipase cao. Trong báo cáo khác cho rằng hệ số chuyển hóa thức ăn, tốc độ tăng trưởng tuyệt đối và năng suất nuôi trong ao có sử dụng hỗn hợp chế phẩm vi sinh gồm 5 loài *Bacillus* (*B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. polymyxa*, *B. laterosporus* và *B. circulans*) cao hơn đối chứng (Ziaei-Nejad et al., 2006). Trong nghiên cứu của Kim et al. (2021), việc bổ sung *B. subtilis*, *B. albus* SMG-1 hoặc *B. safensis* SMG-2 ở nồng độ $2,76 \times 10^8$ CFU/mL nước nuôi tôm cho thấy hiệu quả tích cực lên các thông số tăng trưởng của tôm *L. vannamei* như tăng trọng (WG), hiệu quả sử dụng thức ăn (FE) và tốc độ tăng trưởng tương đối về khối lượng (SGR). Nhìn chung, các tác động của vi khuẩn *Bacillus* trong nghiên cứu hiện tại khá tương đồng với các nghiên cứu trước đây.

Bảng 1. Thông số tăng trưởng và tỉ lệ sống của tôm sau 60 ngày nuôi

Thông số	Nghiệm thức (CFU/mL)			
	Đối chứng	10^2	10^3	10^4
Khối lượng tôm ban đầu (g)	0,59±0	0,59±0,01	0,58±0,01	0,57±0,01
Khối lượng tôm kết thúc TN (g)	6,22±0,07	6,58±0,1	6,56±0,18	6,59±0,08
WG (g)	5,64±0,07	6,00±0,1	5,99±0,18	6,02±0,08
DWG (g/day)	0,094±0,001	0,10±0,002	0,1±0,003	0,10±0,001
SGR (%/day)	3,94±0,02 ^b	4,03±0,05 ^{ab}	4,05±0,04 ^{ab}	4,08±0,03 ^a
Tỉ lệ sống (%)	57,70±2,80 ^b	67,00±3,20 ^{ab}	69,30±3,10 ^a	68,70±3,20 ^a
Sinh khối (kg/m ³)	0,90±0,06 ^b	1,10±0,06 ^a	1,14±0,06 ^a	1,13±0,06 ^a

Các ký tự (a, b, c) khác nhau trên cùng một hàng biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa ($p < 0,05$).

4. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ XUẤT

4.1. Kết luận

Ứng dụng *Bacillus* cải thiện tốc độ phân hủy vật chất hữu cơ trong in vitro dẫn đến hàm lượng TAN tăng cao và giảm hàm lượng TSS, OSS và COD

trong nước thải. Tuy nhiên, giữa các nồng độ bổ sung *Bacillus* CM3.1 khác biệt không đáng kể.

Bổ sung *Bacillus* với nồng độ 10^4 CFU/mL cải thiện các chỉ tiêu môi trường (TAN, NO₂⁻, tổng *Bacillus* và tổng *Vibrio*). Hàm lượng BOD₅, COD ở

các nghiệm thức bổ sung *Bacillus* có xu hướng giảm nhưng không đáng kể. Tăng trưởng của tôm (tốc độ tăng trưởng tương đối (SGR), tỉ lệ sống và sinh khối tôm) được cải thiện ở nghiệm thức bổ sung *Bacillus* CM3.1 với nồng độ 10^4 CFU/mL.

4.2. Đề xuất

Tiếp tục thực hiện ở quy mô lớn hơn như các mô

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- APHA. (2017). *Standard methods for the examination of water and wastewater*, 23rd Edition. American public health association, American water works association, water environment federation, Denver. 1504 pp.
- Bao, X., & Shen, W. (2005). Manufacture and application of micro ecological agents. In: www.BIOX.CN 2005:4-16
- Biesta-Peters, E. G., Reij, M. W., Joosten, H., Gorris, L. G. M., & Zwietering, M. H. (2010). Comparison of two optical-density-based methods and a plate count method for estimation of growth parameters of *Bacillus cereus*. *Applied and environmental microbiology*, 76, 1399-1405.
- Boyd, C. E. (1998). *Water quality for pond aquaculture*. Alabama Agriculture Experiment Station, Auburn University, Alabama Research and Development Series, (Department of fisheries and Applied Aquacultures Auburn University, Alabama 36849 USA), 43, 37p.
- Boyd, C.E. 2010. Water temperature in aquaculture. *Global aquaculture advocate*, 28-30.
- Chai, P. C., Song, X. L., Chen, G. F., Xu, H., & Huang, J. (2016). Dietary supplementation of probiotic *Bacillus* PC465 isolated from the gut of *Fenneropenaeus chinensis* improves the health status and resistance of *Litopenaeus vannamei* against white spot syndrome virus. *Fish & Shellfish Immunology*, 54, 602-611.
- Chanratchakool, P. (2003). Problem in *Penaeus monodon* culture in low salinity areas. *Aquaculture Aisa*, 8, 54 - 55.
- Di, J., Chu, Z., Zhang, S., Huang, J., Du, H., & Wei, Q. (2019). Evaluation of the potential probiotic *Bacillus subtilis* isolated from two ancient sturgeons on growth performance, serum immunity and disease resistance of *Acipenser dabryanus*. *Fish & Shellfish Immunology*, 93, 711-719.
- Ebeling, J. M., Timmons, M. B., & Bisogni, J. J. (2006). Engineering analysis of the stoichiometry of photoautotrophic, autotrophic, and heterotrophic control of ammonia-nitrogen in aquaculture in aquaculture production systems. *Aquaculture*, 257, 346 – 358.
- Fidiastuti, H. R., Lathifah, A. S., Amin, M., & Utomo, Y. (2020). Studies of *Bacillus subtilis* NAP1 to degrade BOD, COD, TSS, and pH: The indigenous bacteria in Indonesia batik wastewater. *Journal of Physics: Conference Series*, 1511(1), 012060.
- Furtado, P. S., Poersch, L. H., & Wasielesky, W. (2011). Effect of calcium hydroxide, carbonate and sodium bicarbonate on water quality and zootechnical performance of shrimp *Litopenaeus vannamei* reared in bio-flocs technology (BFT) systems. *Aquaculture*, 321, 130 – 135.
- Gaona, C. A. P., de Almeida, M. S., Viau, V., Poersch, L. H., & Wasielesky Jr, W. (2015). Effect of different total suspended solids levels on a *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) BFT culture system during biofloc formation. *Aquaculture Research*, 48, 1070-1079.
- Hlrdzi, V., Kuebutornye, F. K. A., Afriyie, G., Abarike, E. D., Lu, Y., Chi, S., & Anokyewaa, M. A. (2020). The use of *Bacillus* species in maintenance of water quality in aquaculture: A review. *Aquaculture Reports*, 18, 100503.
- Hui, C., Wei, R., Jiang, H., Zhao, Y., & Xu, L. (2019). Characterization of the ammonification, the relevant protease production and activity in a high-efficiency ammonifier *Bacillus amyloliquefaciens* DT. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 142, 11-17.
- Kim, S., Jeon, H., Han, H., & Hur, J. W. (2021). Evaluation of *Bacillus albus* SMG-1 and *B. safensis* SMG-2 isolated from Saemangeum Lake as probiotics for aquaculture of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Aquaculture Reports*, 20, 100743
- Kuebutornye, F. K. A., Abarike, E. D., & Lu, Y. (2019). A review on the application of *Bacillus* as probiotics in aquaculture. *Fish and Shellfish Immunology*, 87, 820–828.
- Liu, K. F., Chiu, C. H., Shiu, Y. L., Cheng, W., & Liu, C. H. (2010). Effects of the probiotic, *Bacillus subtilis* E20, on the survival, development, stress tolerance, and immune status of white shrimp, *Litopenaeus vannamei* larvae. *Fish & Shellfish Immunology*, 28(5-6), 837–844.
- Luo, L., Zhao, Z., Huang, X., Du, X., Wang, C. a., Li, J. & Xu, Q. (2016). Isolation, Identification,

hình ao nuôi thâm canh và siêu thâm canh để có những kết quả thực tế.

LỜI CẢM ƠN

Đề tài này được tài trợ bởi Dự án Nâng cấp Trường Đại học Cần Thơ VN14-P6 bằng nguồn vốn vay ODA từ Chính phủ Nhật Bản.

- and Optimization of Culture Conditions of a Biofloculant-Producing Bacterium *Bacillus megaterium* SP1 and Its Application in Aquaculture Wastewater Treatment. *BioMed Research International*, 2758168.
- Ma, Q., & He, Z. (2020). Screening and characterization of nitrite-degrading bacterial isolates using a novel culture medium. *Journal of Ocean University of China*, 19(1), 241-248.
- McNeely, R., N., Neimanis, V., P., & Dwyer, L. (1979). *Water quality sources book*. A guide to water quality parameters, 112p.
- Ngân P. T.T. (2012). *Nghiên cứu quần thể vi khuẩn chuyển hóa đạm trong bùn đáy ao nuôi tôm sú (Penaeus monodon)*. Luận án tiến sĩ, khoa Thủy sản, trường Đại học Cần Thơ.
- Ngân, P.T.T., Hải V.H., Út, V.N. & Giang, H.T. (2021). Chọn lọc vi khuẩn *Bacillus* sp. từ ao nuôi tôm quảng canh có khả năng phân hủy hữu cơ và kháng *Vibrio parahaemolyticus* gây bệnh trên tôm thẻ. *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, 57(3), 191-199.
- Nimrat, S., Khaopong, W., Sangsong, J., Boonthai, T., & Vuthiphandchai, V. (2019). Improvement of growth performance, water quality and disease resistance against *Vibrio harveyi* of postlarval whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) by administration of mixed microencapsulated *Bacillus* probiotics. *Aquaculture Nutrition*, 26(5), 1407-1418.
- Nimrat, S., Suksawat, S., Boonthai, T., & Vuthiphandchai, V. (2012). Potential *Bacillus* probiotics enhance bacterial numbers, water quality and growth during early development of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Veterinary Microbiology*, 159(3-4), 443-450.
- Rajan, D., S. 2015. An Assessment of the biological oxygen demand of Thekkumbhagam creek of Ashtamudi estuary. *International Journal of Fisheries and Aquatic Studies*, 2, 395 - 397.
- Rho, T., Choi, S. H., Kim, E. S., Kang, N. Y., Cho, S. R., Khang, S. H., Kang, D. J. (2018). Optimization of chemical oxygen demand determination in seawater samples using the Alkaline Potassium Permanganate Method. *Ocean Science Journal*, 53, 611-619.
- Schveitzer, R., Arantes, R., Fóes, P., Espírito Santo, C., Vinatea, L., Seiffert, W., & Andreatta, E. (2013). Effect of different biofloc levels on microbial activity, water quality and performance of *Litopenaeus vannamei* in a tank system operated with no water exchange. *Aquacultural Engineering*, 56, 59-70.
- Soltani, M., Ghosh, K., Hoseinifar, S. H., Kumar, V., Lymbery, A. J., Roy, S., & Ringø, E. (2019). Genus *Bacillus*, promising probiotics in aquaculture: Aquatic animal origin, bio-active components, bioremediation and efficacy in fish and shellfish. *Reviews in Fisheries Science & Aquaculture*,
- Ziaei-Nejad, S., Rezaei, M. H., Takami, G. A., Lovett, D. L., Mirvaghefi, A. R., & Shakoun, M. (2006). The effect of *Bacillus* spp. Bacteria used as probiotics on digestive enzyme activity, survival and growth in the Indian white shrimp *Fenneropenaeus indicus*. *Aquaculture*, 252, 516-524.
- Zink, I. C., Benetti, D. D., Douillet, P. A., Margulies, D., & Scholey, V. P. (2011). Improvement of water chemistry with *Bacillus* probiotics inclusion during simulated transport of yellowfin Tuna Yolk Sac Larvae. *North American Journal of Aquaculture*, 73(1), 42-48.