

ẢNH HƯỞNG CỦA MÔI TRƯỜNG NUÔI BIOFLOC LÊN SINH TRƯỞNG VÀ HOẠT TÍNH ENZYME TIÊU HÓA CỦA TÔM THẺ CHÂN TRẮNG (*Litopenaeus vannamei*) GIAI ĐOẠN ƯƠNG GIỒNG

Võ Thị Linh¹, Lê Thị Thu Suong¹, Trần Đăng Dương¹, Phạm Thị Ái Niệm²,
Huỳnh Văn Vỹ¹, Nguyễn Văn Huy¹, Nguyễn Tử Minh^{1*}

¹Trường Đại học Nông Lâm, Đại học Huế;

²Trung tâm Công nghệ sinh học, Thành phố Hồ Chí Minh.

*Tác giả liên hệ: nguyentuminh@huaf.edu.vn

Nhận bài: 09/09/2021 Hoàn thành phản biện: 20/10/2021 Chấp nhận bài: 29/10/2021

TÓM TẮT

Nghiên cứu được thực hiện tại Phòng thí nghiệm Wet Lab, Khoa Thủy sản, Trường Đại học Nông Lâm, Đại học Huế nhằm đánh giá khả năng sinh trưởng và hoạt tính enzyme tiêu hóa của tôm thẻ chân trắng *Litopenaeus vannamei* ương nuôi trong môi trường biofloc với mật độ cao đạt 5.000 con/m³. Tôm giống PL₁₀ được bố trí theo 2 nghiệm thức môi trường ương nuôi khác nhau gồm (i) không có biofloc (ii) có biofloc trong bể ương thể tích 1 m³ với nguồn nước biển có độ mặn 15‰ và thời gian ương nuôi thí nghiệm trong 30 ngày. Nguồn carbohydrate từ ri đường được sử dụng để tạo và duy trì biofloc với tỉ lệ C/N = 15. Kết quả nghiên cứu cho thấy biofloc có tác động tăng cường hoạt tính của enzyme tiêu hóa bao gồm amylase và cellulase ở tôm ương nuôi. Nghiệm thức ương nuôi theo công nghệ biofloc tôm đạt giá trị cao hơn về chiều dài (47,20 ± 1,52 mm/con), trọng lượng (0,71 ± 0,08 g/con), tổng số tế bào máu (7,29 ± 0,15 x 10⁶ tế bào/mL) và tỷ lệ sống (85,61 ± 0,61%) so với nghiệm thức ương nuôi không biofloc với các giá trị tương ứng lần lượt là 40,64 ± 2,62 mm/con, 0,52 ± 0,05 g/con, 6,12 ± 0,51 x 10⁶ tế bào/mL, 73,54 ± 0,65% (p < 0,05). Tôm sau ương nuôi trong môi trường biofloc có khả năng chống chịu stress do biến động môi trường về yếu tố pH, nhiệt độ và độ mặn tốt hơn so với nghiệm thức đối chứng. Kết quả nghiên cứu cho thấy tính khả thi trong ương nuôi tôm thẻ chân trắng với mật độ cao trong môi trường biofloc đáp ứng nhu cầu phát triển đối tượng nuôi này hiện nay.

Từ khóa: Biofloc, Enzyme tiêu hóa, Ương tôm mật độ cao, Tôm thẻ chân trắng, Stress môi trường

EFFECTS OF BIOFLOC ON GROWTH AND DIGESTIVE ENZYMES OF WHITELEG SHRIMP (*Litopenaeus vannamei*) POSTLARVAE AT NUSERY STAGE

Vo Thi Linh¹, Le Thi Thu Suong¹, Tran Dang Duong¹, Pham Thi Ai Niem²,
Huynh Van Vy¹, Nguyen Van Huy¹, Nguyen Tu Minh^{1*}

¹University of Agriculture and Forestry, Hue University;

²Division of Microbial Biotechnology, Biotech Center of Ho Chi Minh City.

ABSTRACT

The study was conducted at Wet Lab, Faculty of Fisheries, Hue University of Agriculture and Forestry to determine the performance of growth and digestive enzyme of whiteleg shrimp postlarvae (PL) in biofloc environment at a high stocking density of 5.000 PL₁₀/m³. The 30-day experiment consisted of two treatments under the different rearing conditions including (i) non-biofloc (ii) biofloc in indoor nursery tanks of 1 m³ with the salinity at 15‰. Molasses, as a source of carbohydrate, was employed to facilitate biofloc formation and maintain the C/N ratio at 15. The results showed that digestive enzymes including amylase and cellulase of shrimp were affected by biofloc in the way of enhancement. Shrimp of biofloc treatment achieved significantly higher values (p<0,05) of length (47,20 ± 1,52 mm), weight (0,71 ± 0,08 g), total hemocyte count (7,29 ± 0,15 x 10⁶ cells/mL) and survival (73,54 ± 0,65%) than those of shrimp in non-biofloc treatment, (40,64 ± 2,62 mm, 0,52 ± 0,05 g, 6,12 ± 0,51 x 10⁶ cells/mL, 85,61 ± 0,61%, respectively). It was reported that rearing whiteleg shrimp postlarvae under the biofloc condition resulted in a greater ability of environmental stress tolerance concerning pH, temperature and salinity. Our findings shed a light on feasibility in nursing whiteleg shrimp postlarvae with high stocking density in biofloc environment, answering to the demand for the development of this shrimp industry at present.

Keywords: Biofloc, Digestive enzyme, Environmental stress, High stocking density, Whiteleg shrimp

1. MỞ ĐẦU

Tôm thẻ chân trắng (*Litopenaeus vannamei*) đã và đang là một trong những đối tượng nuôi có tốc độ phát triển nhanh ở nước ta cả về diện tích, mức độ thâm canh và sản lượng thu hoạch. Theo thống kê mới nhất của Tổng cục Thủy sản (2020), tính đến nay diện tích thả nuôi tôm thẻ chân trắng là 85 nghìn ha (bằng 90,3% so với cùng kỳ năm 2019) với sản lượng thu hoạch đạt 366 nghìn tấn (bằng 104,6% so với cùng kỳ năm 2019). Để đáp ứng được nhu cầu của nghề nuôi hiện nay rút ngắn thời gian nuôi tôm thương phẩm để giảm nguy cơ dịch bệnh do thời gian nuôi kéo dài. Việc nghiên cứu ứng dụng mô hình ương nuôi tôm theo công nghệ biofloc dựa trên các tác nhân sinh học được xem là giải pháp mới có khả năng giải quyết được vấn đề này.

Theo Crab và cs. (2007) sự hiện diện đa dạng và hoạt động tốt của hệ vi sinh vật hiếu khí trong hệ thống biofloc dẫn đến khả năng kiểm soát hiệu quả trong (i) ổn định chất lượng nước thông qua sự đồng hóa các hợp chất nitơ đồng thời tạo ra protein vi khuẩn “tại chỗ” (ii) cải thiện hệ số chuyển hóa thức ăn (iii) nâng cao mật độ ương nuôi. Các nghiên cứu ương giống tôm chân trắng trong môi trường biofloc gần đây đã chỉ ra rằng, rỉ đường là nguồn carbon thích hợp cho sự hình thành và duy trì biofloc (Vũ Thị Ngọc Nhung và cs., 2017) nên có khả năng ương ở mật độ cao (Châu Tài Tảo và cs., 2015). Vì vậy, để tạo ra con giống chất lượng cao với số lượng lớn nhằm đáp ứng yêu cầu tăng hiệu quả và năng suất của quá trình nuôi thương phẩm, nghiên cứu này được thực hiện với mục tiêu đánh giá khả năng ương nuôi tôm thẻ chân trắng ở mật độ cao (5.000 con/m^3) ứng dụng công nghệ biofloc.

2. NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Thời gian và địa điểm nghiên cứu

Thí nghiệm được thực hiện từ tháng 01 đến tháng 03 năm 2020, tại Phòng thí nghiệm Wet Lab, Khoa Thủy sản, Trường Đại học Nông Lâm, Đại học Huế.

2.2. Vật liệu nghiên cứu

Nước biển có độ mặn 30 ppt được pha với nước máy để đạt độ mặn 15 ppt trước khi xử lý bằng BKC 80% (1 mL/m^3) trong điều kiện sục khí liên tục (48h). Nước sau xử lý được cấp vào bể nuôi tôm qua túi lọc $1 \mu\text{m}$.

Sinh khối biofloc được thu bằng lưới lọc có kích thước lỗ lọc $10 \mu\text{m}$ trước khi cấy thẳng trực tiếp biofloc thu được vào các bể nuôi thí nghiệm để đạt thể tích biofloc trong bể là 0.5 mL/L . Biofloc sau đó được duy trì trong bể ương nuôi bằng nguồn carbohydrate từ rỉ đường có hàm lượng carbon 50,1%.

Tôm chân trắng giống (PL₁₀) chất lượng tốt, sạch bệnh được mua từ Công ty Giống Thủy Sản Hisenor, Việt Nam. Tôm giống được nuôi dưỡng trong thời gian 2 ngày trước khi được bố trí vào các bể thí nghiệm. Khối lượng và chiều dài tôm ban đầu đạt giá trị lần lượt là $0,005 \pm 0,001 \text{ g}$ và $10,622 \pm 1,451 \text{ mm}$.

2.3. Phương pháp nghiên cứu

2.3.1. Bố trí thí nghiệm

Thí nghiệm ương nuôi tôm chân trắng ở mật độ 5.000 con/m^3 được bố trí trong các bể 1 m^3 , sục khí liên tục với thời gian ương nuôi 30 ngày. Thí nghiệm được tiến hành với 2 nghiệm thức (1) nghiệm thức thí nghiệm (BF) nuôi theo công nghệ biofloc không thay nước, (2) nghiệm thức đối chứng (ĐC) nuôi không biofloc có siphong cấp bù nước (10%/ngày). Mỗi nghiệm thức được lặp lại 3 lần và được bố trí ngẫu nhiên hoàn toàn.

Trong suốt quá trình ương nuôi, tôm được cho ăn 4 lần/ngày (vào lúc 7, 12, 17 và 21h) bằng thức ăn công nghiệp hiệu Grobest có hàm lượng protein 36,53 %. Lượng thức ăn cho hàng ngày được xác định bằng 10% trọng lượng tôm. Thành phần protein trong thức ăn (AOAC, 2005-981.10) và tổng carbon trong mật đường (TCVN 9294: 2012) được phân tích tại Trung tâm Công nghệ sinh học, Thành phố Hồ Chí Minh. Tỷ lệ C/N = 15 trong môi trường nước ương nghiệm thức BF Avnimelech (2015) được duy trì bằng cách bổ sung ri đường với lượng bổ sung được tính dựa vào hàm lượng protein trong thức ăn và lượng thức ăn cho tôm ăn mỗi ngày (Crab và cs., 2012) theo công thức sau:

$$\text{Mật đường (g)} = (\text{lượng thức ăn (g)} \times \text{tỷ lệ protein thức ăn (\%)} \times 0,16 \times 0,75 \times \text{tỷ lệ C/N}) \div \text{tỷ lệ carbon mật đường (\%)}$$

Hệ thống bể ương nuôi được cung cấp khí liên tục bằng máy thổi khí Veratti Blower (GB1100 1.1KW 220V, China) thông qua vòng sủi oxy nano (Công ty TNHH

. **Bảng 1.** Chỉ tiêu theo dõi và phương pháp phân tích mẫu trong thí nghiệm

| Chỉ tiêu | Đơn vị | Tần suất thu mẫu | Phương pháp phân tích |
|------------------------------|----------------------------|------------------|-----------------------|
| Nhiệt độ | $^{\circ}\text{C}$ | 1 lần/ngày | Temp/pH meter (Adwa |
| pH | | 1 lần/ngày | 112, Romania) |
| Độ kiềm | mgCaCO_3/L | 3 ngày/lần | APHA, 1995 |
| TAN | mg/L | 3 ngày/lần | APHA, 1995 |
| $\text{NO}_2\text{-N}$ | mg/L | 3 ngày/lần | APHA, 1995 |
| SS (Settleable solids) | ml/L | 6 ngày/lần | Phễu Imhoff, Italia |
| TSS (total suspended solids) | mg/L | 6 ngày/lần | APHA, 1995 |

2.3.3. Phương pháp xác định các chỉ tiêu sinh trưởng của tôm thẻ chân trắng

Tôm ương nuôi thí nghiệm được thu mẫu ngẫu nhiên (45 cá thể/nghiệm thức) định kỳ 6 ngày/lần và thẩm bớt nước qua giấy lọc (Whatman No1, Anh) trước khi xác định chiều dài tính từ đầu chùy đến cuối đốt đuôi bằng thước đo chia vạch (mm) và khối lượng bằng cân có độ chia 0.001 g. Các chỉ tiêu về tốc độ tăng trưởng và tỷ lệ sống, của

Maxaquastore, Đà Nẵng) đặt tại vị trí giữa đáy bể nhằm đảm bảo biofloc luôn được duy trì ở trạng thái lơ lửng trong môi trường suốt quá trình thí nghiệm. Chế độ chiếu sáng được duy trì theo nhịp 12h ngày/đêm bằng hệ thống đèn huỳnh quang với cường độ ánh sáng đạt 1200 lux (Hioki FT3424 Lux Meter, Japan).

2.3.2. Phương pháp theo dõi chất lượng nước

Chỉ tiêu môi trường và biofloc được theo dõi thường xuyên trong quá trình thí nghiệm vào lúc 9h hàng ngày. Các thông số nhiệt độ và pH được đo trực tiếp tại bể. Trong khi đó, mẫu nước được thu tại vị trí giữa của bể ương nuôi và cách đáy bể 30 cm (chiều cao mức nước nuôi trong bể đạt 70cm) bằng thiết bị lấy mẫu nước nằm ngang, sau đó lọc qua đầu lọc 0.45 μm (Whatman® Puradisc 30, Anh) trước khi được sử dụng cho các phân tích xác định các thông số chất lượng nước còn lại. Thời gian thu mẫu và phương pháp phân tích được trình bày ở Bảng 1

tôm được xác định theo các công thức sau (Châu Tài Tảo và cs., 2021):

$$\text{Tốc độ tăng trưởng khối lượng tuyệt đối: DWG (g/ngày)} = (W_t - W_0) \div t$$

$$\text{Tốc độ tăng trưởng khối lượng tương đối:}$$

$$\text{SGRW (\%/ngày)} = 100 \times (\text{Ln}W_t - \text{Ln}W_0) \div t$$

$$\text{Tốc độ tăng trưởng chiều dài tuyệt đối: DLG (cm/ngày)} = (L_t - L_0) \div t$$

Tốc độ tăng trưởng chiều dài tương đối:

$$SGRL (\%/ngày) = 100 \times (\ln Lt - \ln L0) \div t$$

Tỷ lệ sống:

$$SR (\%) = (\text{số tôm thu hoạch} \div \text{số tôm thả ban đầu}) \times 100$$

Trong đó Wt, W0, Lt, L0, t lần lượt là trọng lượng tại thời điểm xác định (g), trọng lượng ban đầu (g), chiều dài tại thời điểm xác định (mm), chiều dài ban đầu (mm), và thời gian nuôi (ngày).

Tổng số tế bào máu: Tôm thẻ chân trắng sau ương nuôi (15 cá thể/bể tương ứng với 3 lần lại) được sử dụng cho thí nghiệm xác định tổng số tế bào máu từ hướng chân bò số 4. 100µl máu tôm được thu bằng cách dùng ống tiêm 1ml vô trùng (27G×13 mm) có chứa 100 µl dung dịch chống đông (450 mM sodium chloride, 100 mM glucose, 30 mM trisodium citrate, 26 mM citric acid, 10 mM EDTA, and at pH 5.4) (Phuoc và cs., 2016) đâm thẳng trực tiếp vào tim từ đôi chân bò số 4. Tổng số tế bào máu tôm sau khi nhuộm bằng 100 µl trypan blue (0.5% trypan blue trong dung dịch 2.6% NaCl) nhằm dễ dàng quan sát dưới kính hiển vi được xác định theo phương pháp của Akshaya và cs. (2018). Công thức tính toán tổng số tế bào được áp dụng như sau:

$$\begin{aligned} & \text{Tổng số tế bào máu} \left(\text{tế} \frac{\text{bào}}{\text{mL}} \right) \\ &= (\text{Tổng tế bào đếm được} \\ & \times \text{hệ số pha loãng} \times 10^4) \\ & \div \text{Tổng số ô đếm} \end{aligned}$$

Hoạt tính enzyme tiêu hóa được xác định bằng cách thu ngẫu nhiên từ 15 mẫu tôm/nghiệm thức (tôm có ruột đầy và không bị đứt khúc) sau khi kết thúc thí nghiệm. Giải phẫu, tách khối gan tụy tạng cho vào 1 ống eppendorf lạnh có chứa đệm phosphate (50 mM, pH 7,5) theo tỉ lệ 10% (w/v). Mẫu được nghiền rồi ly tâm ở tốc độ 5.000 g

trong 20 phút ở 4°C. Thu dịch enzyme nổi phía trên để tiến hành cho các nghiên cứu xác định hoạt tính enzyme (Zheng và cs., 2017).

Hoạt tính enzyme amylase và cellulase được xác định bằng phương pháp khuếch tán đĩa thạch được mô tả bởi Trịnh Đình Khá (2015) và Nguyễn Thị Hồng Nhung và cs. (2019) với cơ chất môi trường tương ứng bao gồm tinh bột 2% và carboxymethyl cellulose 0.5% (CMC). Hoạt tính enzyme được xác định theo Quách Văn Toàn Em và Võ Thị Kim Yến (2015) thông qua kích thước vòng phân giải cơ chất hình thành trên bề mặt thạch với ba mức hoạt tính bao gồm rất mạnh (≥ 25 mm); mạnh (20 - 24,5 mm); trung bình (10 - 19,5 mm); yếu (≤ 10 mm).

2.3.4. Phương pháp xác định thông số vi sinh môi trường

Các chỉ tiêu vi sinh trong môi trường nước ương nuôi được đánh giá định kỳ 10 ngày/lần theo phương pháp của Panigrahi và cs. (2018). Mẫu nước từ các bể nuôi được thu và lọc qua giấy lọc định tính 103 GB/T1914-2007 (Trung quốc) với kích thước lỗ lọc 10 µm. Sau đó, 50 µL mẫu nước lọc được cấy trải trên môi trường thạch đĩa Zobell Marine Agar (ZMA, HiMedia, India) và Thiosulphate citrate bile salt agar (TCBS, HiMedia, India) tương ứng với mục đích xác định mật độ vi khuẩn dị dưỡng tổng số và vibrio tổng số. Đĩa thạch được ủ ở 30°C trong 24h trước khi xác định số lượng hình thành khuẩn lạc trên bề mặt thạch. Mật độ vi khuẩn được tính dựa vào công thức:

$$\text{Mật độ vi khuẩn (CFU/mL)} = \text{số vi khuẩn đếm được/thể tích cấy} \times \text{độ pha loãng}$$

2.3.5. Phương pháp đánh giá khả năng chống chịu stress môi trường của tôm thẻ chân trắng

Sau khi kết thúc thí nghiệm, đánh giá khả năng chống chịu stress môi trường của tôm thông qua thời gian chịu đựng của chúng trong các điều kiện môi trường biến động. Tôm khỏe mạnh (15 cá thể/nghiệm thức) với đặc điểm bơi lội tốt; phản xạ ánh sáng nhanh; không bị mòn râu, chân và đuôi; vỏ cứng cáp, không có các tổn thương trên vỏ; ruột đầy không đứt khúc được lựa chọn tham gia vào thử nghiệm chống chịu các ngưỡng môi trường thay đổi về giá trị pH (giá trị pH được điều chỉnh và duy trì bằng dung dịch NaOH 0,01N và HCl 0,01N), nhiệt độ và độ mặn trong bể thể tích 500 mL.

Khả năng chống chịu stress môi trường được đánh giá dựa trên giá trị thời gian được ghi nhận sau khi tôm bỏ trí trong các thí nghiệm chống chịu stress chết hoàn toàn (Sudong Xia và cs., 2010).

2.4. Phương pháp thu thập số liệu

Số liệu thu thập được tính toán về giá trị trung bình, độ lệch chuẩn bằng phần mềm Excel của Microsoft Office 2016. Sau đó, phân tích thống kê bằng kiểm định T-test cho 2 biến độc lập để tìm ra sự khác biệt giữa 2 nghiệm thức về các chỉ tiêu thí nghiệm thu thập được bằng phần mềm SPSS 20.0 ở mức ý nghĩa $p < 0,05$.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

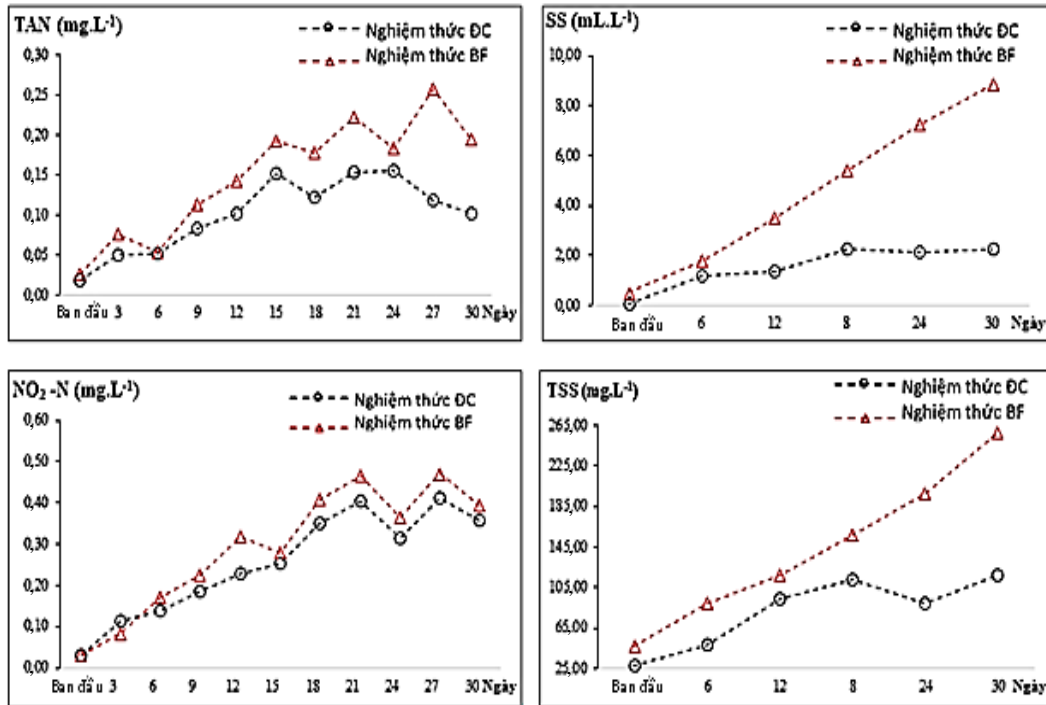
3.1. Biến động yếu tố môi trường trong quá trình ương nuôi thí nghiệm

Kết quả theo dõi biến động môi trường được trình bày ở Bảng 2. Biến động về nhiệt độ, pH và độ kiềm không có sự khác biệt giữa các nghiệm thức thí nghiệm. Giá trị pH luôn dao động trong khoảng thích hợp cho sự sinh trưởng của tôm ương theo Whetstone và cs. (2002) là từ 7,5 đến 8,5. Nhiệt độ và độ kiềm được ghi nhận trong suốt quá trình ương nằm trong ngưỡng cho phép đối với tôm chân trắng. Nhìn chung, chất lượng nước được ghi nhận trong suốt quá trình thí nghiệm không ảnh hưởng đến sinh trưởng của tôm thẻ chân trắng ương nuôi.

Bảng 2. Giá trị chất lượng nước trong quá trình thí nghiệm

| Chỉ tiêu | Nghiệm thức thí nghiệm | |
|----------------------------------|---------------------------|---------------------------|
| | Đối chứng (ĐC) | Biofloc (BF) |
| Nhiệt độ (°C) | 25,36 ± 1,00 ^a | 25,34 ± 1,17 ^a |
| | 22,3 – 27,0 | 22,1 – 27,0 |
| pH | 7,73 ± 0,12 ^a | 7,75 ± 0,14 ^a |
| | 7,5 – 8,1 | 7,35 – 8,25 |
| Độ kiềm (mgCaCO ₃ /L) | 91,48 ± 5,78 ^a | 93,33 ± 5,91 ^a |
| | 85,00 – 110,00 | 85,00 – 110,00 |

Các số liệu trong bảng được biểu thị dưới dạng trung bình ± độ lệch chuẩn; ^a: Các số liệu trên cùng hàng có chữ cái khác nhau là sai khác có ý nghĩa về mặt thống kê ($p < 0,05$)



Hình 1. Biến động của chất lượng nước trong các bể ương thí nghiệm

Hàm lượng tổng amonia (TAN), nitrite (NO₂-N) thể hiện khuynh hướng tăng dần theo thời gian thí nghiệm. Điều này được giải thích là do sự gia tăng của lượng thức ăn và các hoạt động bài tiết của tôm trong quá trình tăng trưởng. Sau 30 ngày thí nghiệm, cả giá trị TAN lẫn NO₂-N môi trường nước ương ở nghiệm thức BF (không thay nước theo công nghệ biofloc) cao hơn so với nghiệm thức ĐC (có thay nước hàng ngày). Tuy nhiên, ở cả hai nghiệm thức, hàm lượng TAN và NO₂-N luôn nằm trong khoảng chịu đựng của tôm thể chân trắng lần lượt là < 2 mg/L và 0,2 - 2 mg/L (Boyd, 1998).

Sự tăng dần về cuối vụ nuôi cũng được ghi nhận đối với hàm lượng chất rắn lơ lửng (SS) và tổng chất rắn lơ lửng (TSS) ở các nghiệm thức thí nghiệm. Trong đó, ở nghiệm thức BF, giá trị SS và TSS sau 30 ngày ương nuôi (8,83 ± 0,50 mL/L và 257,78 ± 6,67 mg/L) được ghi nhận cao hơn rất nhiều so với nghiệm thức ĐC (2,27 ± 0,51 mL/L và 117,78 ± 8,33 mg/L). Như vậy, các giá trị nồng độ/hàm lượng biofloc

trong hệ thống nuôi trồng thủy sản hoàn toàn phù hợp với ngưỡng thích hợp (SS < 15 mL/L và TSS trong khoảng 200 – 1.000 mg/L) được đề nghị bởi De Schryver và cs. (2008) và Hargreaves (2013).

3.2. Tổng số vi khuẩn dị dưỡng và *Vibrio* spp. trong môi trường ương nuôi

Bảng 3 cho thấy, ngay tại thời điểm trước khi bố trí tôm vào bể ương (ngày ương 0) thì mật độ vi khuẩn ở hai nghiệm thức thí nghiệm đã thể hiện sự khác nhau theo xu hướng giá trị mật độ vi khuẩn cao hơn với sự hiện diện của biofloc trong môi trường nước ương nuôi của nghiệm thức BF. Càng về cuối vụ ương thì mật độ vi khuẩn dị dưỡng tổng số tăng mạnh, đặc biệt ở nghiệm thức BF. Kết thúc 30 ngày ương nuôi, giá trị tổng vi khuẩn ghi nhận được ở nghiệm thức BF là 15,51 ± 1,43 x10⁵ CFU/mL, cao gấp 2 lần so nghiệm thức ĐC (6,62 ± 0,64 x10⁵ CFU/mL). Sự gia tăng dần theo thời gian ương cũng được ghi nhận đối với mật độ *Vibrio* tổng số trong môi trường với các giá trị lần lượt là 3,85 ± 0,14 x10² CFU/mL ở

thực nghiệm BF và $0,54 \pm 0,09 \times 10^2$ CFU/mL ở thực nghiệm ĐC. Sự về biến động các chỉ tiêu vi sinh trong môi trường

nước bể nuôi theo thời gian giữa các thực nghiệm thí nghiệm có sự khác biệt ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).

Bảng 3. Biến động các chỉ tiêu vi sinh của môi trường nước nuôi trong quá trình thí nghiệm

| Ngày ương | Tổng vi khuẩn dị dưỡng ($\times 10^5$ CFU/mL) | | Tổng <i>Vibrio</i> ($\times 10^2$ CFU/mL) | |
|-----------|--|---------------------|--|---------------------|
| | Nghiệm thức đối chứng | Nghiệm thức biofloc | Nghiệm thức đối chứng | Nghiệm thức biofloc |
| 0 | $0,63 \pm 0,09^a$ | $1,23 \pm 0,09^b$ | $0,00 \pm 0,00^a$ | $0,00 \pm 0,00^a$ |
| 1 | $0,90 \pm 0,04^a$ | $1,98 \pm 0,11^b$ | $0,03 \pm 0,00^a$ | $0,05 \pm 0,00^a$ |
| 10 | $1,49 \pm 0,07^a$ | $2,70 \pm 0,62^b$ | $0,08 \pm 0,01^a$ | $0,17 \pm 0,01^b$ |
| 20 | $2,98 \pm 0,42^a$ | $6,76 \pm 0,83^b$ | $0,20 \pm 0,02^a$ | $2,04 \pm 0,14^b$ |
| 30 | $6,62 \pm 0,64^a$ | $15,51 \pm 1,43^b$ | $0,54 \pm 0,09^a$ | $3,85 \pm 0,14^b$ |

Các số liệu trong bảng được biểu thị dưới dạng trung bình \pm độ lệch chuẩn; a, b : Các số liệu trên cùng hàng có chữ cái khác nhau là sai khác có ý nghĩa về mặt thống kê ($p < 0,05$)

Như vậy, trong môi trường biofloc các chỉ tiêu vi sinh ghi nhận được đạt giá trị tối ưu hơn cho quá trình sinh trưởng của tôm thẻ chân trắng với mật độ vi khuẩn dị dưỡng tổng số $< 10^7$ CFU/mL (Anderson, 1993) và *Vibrio* $< 6,5 \times 10^3$ CFU/mL (Phạm Thị Tuyết Ngân và cs., 2008). Trong đó, mật độ tổng vi khuẩn dị dưỡng cao hơn ở thực nghiệm BF là do sự hiện diện của biofloc cùng với tỷ lệ C/N=15 luôn được duy trì trong suốt quá trình ương thúc đẩy quá trình tăng sinh của hệ vi khuẩn “tại chỗ”. Ngoài ra, kết quả nghiên cứu chỉ ra rằng trong môi trường ương nuôi có biofloc, sự ưu thế của vi khuẩn dị dưỡng so với vi khuẩn *Vibrio* trong hệ thống ương cũng đã được ghi nhận bởi Châu Tài Tảo và cs. (2015). Điều này có thể được giải thích bởi vì sự hiện diện của lượng lớn vi khuẩn dị dưỡng có khả năng tạo chất kháng khuẩn poly- β -hydroxybutyrate và kháng sinh dẫn đến sự ức chế lên hệ vi khuẩn *Vibrio* trong môi trường nước bể nuôi (Avnimelech, 2006). Trong khi đó, các chỉ tiêu tổng số vi khuẩn dị dưỡng và *Vibrio* ở thực nghiệm ĐC đạt giá trị thấp hơn thực nghiệm BF là do quá trình siphon và

cấp nước mới bù hàng ngày được thực hiện. Điều này dẫn đến sự giảm tải của mật độ vi khuẩn trong môi trường nước ương nuôi ở thực nghiệm ĐC (kết quả về chỉ số SS và TSS ở thực nghiệm thức này cũng đạt giá trị thấp hơn so với thực nghiệm BF).

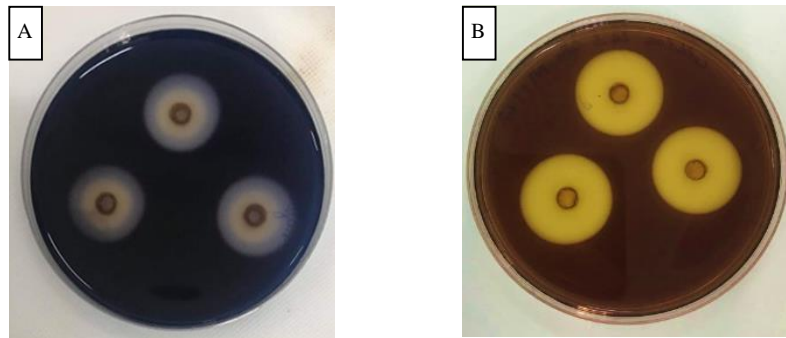
3.3. Hoạt tính enzyme tiêu hóa của tôm ương nuôi

Bảng 4 và Hình 2 cho thấy, biofloc có ảnh hưởng lên enzyme tiêu hóa của tôm thẻ chân trắng bao gồm amylase và cellulase trong quá trình sinh trưởng, với hoạt tính mạnh hơn được ghi nhận ở tôm ương nuôi trong thực nghiệm BF. Cụ thể, tôm thẻ chân trắng nuôi trong môi trường biofloc (thực nghiệm BF) có hoạt tính amylase và cellulase mạnh (20 - 24,5mm), thể hiện thông qua giá trị đường kính phân giải cơ chất môi trường đạt được lần lượt là $20,07 \pm 0,67$ mm và $21,11 \pm 0,51$ mm. Trong khi đó, hoạt tính của các loại enzyme này chỉ đạt mức trung bình (10 - 19,5mm) đối với tôm ương nuôi trong thực nghiệm ĐC, các giá trị tương ứng đạt được là $15,63 \pm 0,26$ mm và $17,85 \pm 0,55$ mm.

Bảng 4. Đường kính vòng phân giải cơ chất của enzyme tiêu hóa ở cơ quan gan và tụy tạng từ tôm thẻ chân trắng ương nuôi thí nghiệm

| Enzyme tiêu hóa | Cơ chất môi trường | Đường kính vòng phân giải cơ chất (mm) | |
|-----------------|--------------------|--|---------------------|
| | | Nghiệm thức đối chứng | Nghiệm thức biofloc |
| Amylase | Tinh bột | $15,63 \pm 0,26^b$ | $20,07 \pm 0,67^a$ |
| Cellulase | CMC | $17,85 \pm 0,55^b$ | $21,11 \pm 0,51^a$ |

Các số liệu trong bảng được biểu thị dưới dạng trung bình \pm độ lệch chuẩn; a, b : Các số liệu trên cùng hàng có chữ cái khác nhau là sai khác có ý nghĩa về mặt thống kê ($p < 0,05$)



Hình 2. Đường kính vòng phân giải cơ chất môi trường của enzyme amylase (A) và cellulase (B) thu được từ cơ quan gan và tụy tạng tôm ương nuôi thí nghiệm

Hoạt tính mạnh hơn của enzyme amylase và cellulase thu được từ hệ tiêu hóa của tôm ương nuôi trong môi trường biofloc (thí nghiệm BF) so với môi trường không có biofloc (thí nghiệm ĐC) cũng được ghi nhận trong nghiên cứu của Xu và cs. (2012). Kết quả này được giải thích là do sự bổ sung (1) một lượng enzyme ngoại bào được tiết ra từ hệ vi khuẩn cấu tạo nên biofloc, (2) các hợp chất sinh học tồn tại sẵn trong cấu trúc biofloc có khả năng góp phần tăng cường hoạt tính của các enzyme tiêu hóa. Từ đó, việc sử dụng biofloc như một nguồn dinh dưỡng trong quá trình sinh trưởng của tôm dẫn đến sự gia tăng hoạt tính enzyme tiêu hóa trong hệ tiêu hóa. Kết quả ghi nhận được về sự sai khác của hoạt tính enzyme amylase và cellulase của tôm trong hai

thí nghiệm có ý nghĩa về mặt thống kê ($p < 0,05$).

3.4. Khả năng tăng trưởng của tôm thẻ chân trắng thí nghiệm

3.4.1. Tăng trưởng về chiều dài và khối lượng

Bảng 5 cho thấy, tại thời điểm ban đầu thí nghiệm, tôm thẻ chân trắng giống có kích thước nhỏ và tương đối đồng đều. Do đó, giá trị chiều dài tôm ghi nhận được giữa các thí nghiệm không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$). Tuy nhiên, tốc độ tăng trưởng tương đối và tuyệt đối ở thí nghiệm BF lần lượt là $4,99 \pm 0,14$ %/ngày và $1,22 \pm 0,02$ cm/ngày cao hơn so với thí nghiệm đối chứng khi đạt giá trị tương ứng là $4,47 \pm 0,012$ %/ngày và $1,00 \pm 0,00$ cm/ngày ($p < 0,05$).

Bảng 5. Tốc độ tăng trưởng về chiều dài tôm thẻ chân trắng sau 30 ngày ương nuôi

| Chỉ tiêu | Nghiệm thức đối chứng | Nghiệm thức biofloc |
|--|-----------------------|----------------------|
| Chiều dài tôm ban đầu (mm/con) | $10,62 \pm 1,45^a$ | $10,58 \pm 1,48^a$ |
| Chiều dài tôm 30 ngày (mm/con) | $40,64 \pm 2,62^a$ | $47,20 \pm 1,52^b$ |
| Tốc độ tăng trưởng chiều dài tương đối (%/ngày) | $4,47 \pm 0,01^a$ | $4,99 \pm 0,14^b$ |
| Tốc độ tăng trưởng chiều dài tuyệt đối (cm/ngày) | $1,00 \pm 0,00^a$ | $1,22 \pm 0,02^b$ |
| Trọng lượng tôm ban đầu (g/con) | $0,005 \pm 0,001^a$ | $0,005 \pm 0,001^a$ |
| Trọng lượng tôm 30 ngày (g/con) | $0,516 \pm 0,055^a$ | $0,713 \pm 0,080^b$ |
| Tốc độ tăng trưởng khối lượng tương đối (%/ngày) | $15,532 \pm 0,247^a$ | $15,638 \pm 0,182^b$ |
| Tốc độ tăng trưởng khối lượng tuyệt đối (g/ngày) | $0,017 \pm 0,000^a$ | $0,024 \pm 0,000^b$ |

Các số liệu trong bảng được biểu thị dưới dạng trung bình \pm độ lệch chuẩn; ^{a, b}: Các số liệu trên cùng hàng có chữ cái khác nhau là sai khác có ý nghĩa về mặt thống kê ($p < 0,05$)

Tốc độ tăng trưởng khối lượng thu được từ Bảng 5 cho thấy, sau 30 ngày ương, ở nghiệm thức BF đạt khối lượng cao hơn so với nghiệm thức ĐC ($p < 0,05$). Tốc độ tăng trưởng tương đối và tuyệt đối về khối lượng ở nghiệm thức BF cũng được ghi nhận cao hơn so với nghiệm thức ĐC ($p < 0,05$).

Sự khác biệt về tốc độ tăng trưởng của tôm ương ở hai nghiệm thức thí nghiệm được giải thích là bởi vì trong môi trường biofloc ở nghiệm thức BF tôm được cung cấp thêm nguồn dinh dưỡng protein, acid amin thiết yếu, vitamin và khoáng vi lượng từ nguồn floc có sẵn (Avnimelech, 2006). Đồng thời các giá trị ghi nhận được về enzyme tiêu hóa của tôm ở nghiệm thức BF cũng thể hiện hoạt tính mạnh hơn so với nghiệm thức ĐC. Chính điều này dẫn đến

khả năng sinh trưởng tốt hơn ở nghiệm thức BF, Widanarni và cs. (2010) khi ương tôm thẻ chân trắng trong 25 ngày theo công nghệ biofloc với tỷ lệ C/N = 15 thì tốc độ tăng trưởng tương đối đạt được giá trị 20,07%/ngày. Tuy nhiên, mật độ ương ban đầu chỉ là 24 con/m³, thấp hơn rất nhiều so với mật độ trong nghiên cứu này. Ngược lại, tăng trưởng chiều dài và khối lượng của tôm ở nghiệm thức thí nghiệm trong nghiên cứu này cao hơn so với kết quả công bố của Châu Tài Tảo và cs. (2015).

3.4.2. Tổng số tế bào máu và tỷ lệ sống

Bảng 6 cho thấy, tỷ lệ sống của tôm sau 30 ngày ương ở nghiệm thức BF ($85,61 \pm 0,61\%$) cao hơn so với nghiệm thức ĐC ($73,54 \pm 0,65\%$) và sự khác biệt này có ý nghĩa về mặt thống kê ($p < 0,05$).

Bảng 6. Tổng số tế bào máu và tỷ lệ sống của tôm thẻ chân trắng sau 30 ngày ương

| Chỉ tiêu | Nghiệm thức đối chứng | Nghiệm thức biofloc |
|--------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| Tổng số tế bào máu (tế bào/mL) | $6,12 \times 10^6 \pm 0,51^a$ | $7,29 \times 10^6 \pm 0,15^b$ |
| Tỷ lệ sống (%) | $73,54 \pm 0,65^a$ | $85,61 \pm 0,61^b$ |

Các số liệu trong bảng được biểu thị dưới dạng trung bình \pm độ lệch chuẩn; ^{a, b}: Các số liệu trên cùng hàng có chữ cái khác nhau là sai khác có ý nghĩa về mặt thống kê ($p < 0,05$)

Sự chênh lệch về tỷ lệ sống của tôm khi kết thúc thí nghiệm giữa các nghiệm thức được giải thích có thể là do tôm nuôi trong điều kiện biofloc (nghiệm thức BF) có tổng số tế bào máu ($7,29 \times 10^6 \pm 0,15$ tế bào/mL), cao hơn so với tôm ương trong môi trường không biofloc ($6,12 \times 10^6 \pm 0,51$ tế bào/mL), điều này ảnh hưởng đến quá trình vận chuyển oxy cũng như trao đổi chất dinh dưỡng, nên đáp ứng miễn dịch tốt hơn. Ngoài ra, ở nghiệm thức ĐC việc thay nước thường xuyên trong suốt quá trình ương có thể làm cho môi trường biến động hơn so với nghiệm thức BF. Hơn nữa thay nước thường xuyên có thể là tác nhân kích thích lột xác của tôm trong khi chưa tích lũy đủ về chất làm cho vỏ tôm bị mềm, dễ bị tấn công bởi tác nhân gây bệnh. Cũng có thể sự biến động liên tục về môi trường cũng là nguyên nhân gây stress tác động bất lợi lên

sinh trưởng của tôm, dẫn đến giá trị ghi nhận được của tỷ lệ sống của tôm ở nghiệm thức ĐC thấp hơn.

3.5. Khả năng chống chịu stress môi trường

Bảng 7 cho thấy, tôm thẻ chân trắng ương theo công nghệ biofloc có khả năng chịu đựng với những biến động môi trường tốt hơn so với tôm ương không có biofloc. Thời gian ghi nhận cho đến khi tất cả tôm đều chết sau khi sốc pH, nhiệt độ (°C) và độ mặn (ppt) ở nghiệm thức BF dài hơn so với tôm ương ở nghiệm thức ĐC ($p < 0,05$). Trong môi trường gây stress với độ mặn 35 ppt, tôm sau ương nuôi thể hiện khả năng chống chịu lâu hơn nhưng sự sai khác này không có ý nghĩa thống kê giữa các nghiệm thức thí nghiệm ($p > 0,05$).

Bảng 7. Khả năng chống chịu stress môi trường tôm sau ương nuôi thí nghiệm

| Yếu tố gây stress | Giá trị | Thời gian chịu đựng của tôm thẻ chân trắng (phút) | |
|-------------------|---------|---|------------------------------|
| | | Nghiệm thức đối chứng | Nghiệm thức biofloc |
| pH | 3 | 85,50 ± 18,93 ^a | 126,80 ± 10,69 ^b |
| | 9 | 446,00 ± 8,62 ^a | 479,30 ± 13,22 ^b |
| Nhiệt độ (°C) | 5 | 45,60 ± 9,30 ^a | 64,20 ± 12,86 ^b |
| | 35 | 587,80 ± 57,72 ^a | 593,50 ± 21,27 ^a |
| Độ mặn (ppt) | 5 | 599,40 ± 29,74 ^a | 723,90 ± 26,02 ^b |
| | 35 | 1110,00 ± 41,46 ^a | 1155,20 ± 46,11 ^a |

Các số liệu trong bảng được biểu thị dưới dạng trung bình ± độ lệch chuẩn; ^{a, b}: Các số liệu trên cùng hàng có chữ cái khác nhau là sai khác có ý nghĩa về mặt thống kê ($p < 0,05$)

Tôm ương nuôi trong điều kiện môi trường có biofloc thể hiện khả năng chống chịu biến động bất lợi của yếu tố môi trường tốt hơn so với khi ương nuôi trong điều kiện bình thường không có biofloc phù hợp với nhận định từ các nghiên cứu trước đó của Liu và cs. (2005) và Sudong Xia và cs. (2010). Kết quả ghi nhận được giải thích là do trong môi trường nuôi có biofloc, tôm được cung cấp đầy đủ nguồn dinh dưỡng acid béo, vitamin, khoáng và đặc biệt amino acid đa dạng hơn đồng thời từ thức ăn và biofloc (Hargreaves, 2013). Bên cạnh đó, kết quả nghiên cứu cũng cho thấy rằng chỉ số tổng tế bào máu của tôm ương trong môi trường biofloc cao hơn so với môi trường không biofloc. Chính các giá trị ưu thế này có thể đã góp phần vào quá trình chuyển hóa và xây dựng cấu trúc cơ thể tôm tốt hơn, dẫn đến sự tăng cường khả năng chống chịu stress với điều kiện môi trường bất lợi (Sudong Xia và cs., 2010).

4. KẾT LUẬN

4.1. Kết luận

Tốc độ tăng trưởng về khối lượng, chiều dài, tổng số tế bào máu, tỷ lệ sống của tôm ương theo công nghệ BF cao hơn so với nghiệm thức ĐC. Ương tôm thẻ chân trắng trong môi trường biofloc có mật độ vi khuẩn tổng số và *Vibrio* cao hơn so với môi trường không có biofloc.

Hoạt tính sinh học của enzyme tiêu hóa (amylase và cellulase) ở tôm ương

trong môi trường biofloc tốt hơn so với tôm ương trong môi trường không có biofloc.

Tôm thẻ chân trắng ương trong môi trường biofloc có khả năng chống chịu stress môi trường với các biến động pH, nhiệt độ (°C) và độ mặn (ppt) tốt hơn so với nghiệm thức ĐC.

4.2. Kiến nghị

Cần nghiên cứu và đánh giá thêm hoạt tính sinh học của các loại enzyme tiêu hóa khác như protease và lipase ở tôm thẻ chân trắng ương nuôi trong môi trường biofloc.

Mở rộng nghiên cứu tiếp theo về nuôi tôm thẻ chân trắng ở những giai đoạn và quy mô khác nhau trong môi trường Biofloc.

LỜI CẢM ƠN

Để hoàn thành nghiên cứu của mình, nhóm tác giả xin chân thành cảm ơn nguồn kinh phí cấp cho nhóm sinh viên thực hiện đề tài nghiên cứu khoa học của Trường Đại học Nông Lâm, Đại học Huế năm 2021 (DHL2021-TS-SV-01). Đồng thời, nghiên cứu được thực hiện trên hệ thống thí nghiệm hỗ trợ từ Chương trình Dự án VLIR-IUC (2nd Phase, VN2019IUC26A103), Đại học Huế.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Tài liệu tiếng Việt

Châu Tài Tào, Hồ Ngọc Nga và Trần Ngọc Hải. (2015). Ảnh hưởng của mật độ lên tăng trưởng và tỷ lệ sống của tôm thẻ chân trắng (*Litopenaeus vannamei*) ương giống theo

- công nghệ bio-floc. *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, 37(1), 65-71.
- Châu Tài Tào, Nguyễn Văn Hòa và Trần Ngọc Hải. (2021). Ảnh hưởng của mật độ lên tăng trưởng và tỷ lệ sống của tôm càng xanh (*Macrobrachium rosebergii*) nuôi theo công nghệ biofloc. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Nông nghiệp Việt Nam*, 4(125), 139-145.
- Nguyễn Thị Hồng Nhung, Lê Thị Thương, Nguyễn Thị Thu Hằng và Nguyễn Thị Huyền. (2019). Tuyển chọn chủng vi khuẩn *Lactic* có tiềm năng ứng dụng tạo chế phẩm sinh học (probiotic) bổ sung vào thức ăn chăn nuôi. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Lâm nghiệp*, (2), 18-27.
- Phạm Thị Tuyết Ngân, Trần Thị Kiều Trang và Trương Quốc Phú. (2008). Biến động mật độ vi khuẩn trong ao nuôi tôm sú (*Penaeus monodon*) ghép với cá rô phi ở Sóc Trăng. *Tạp chí Khoa học Đại học Cần Thơ*, (1), 187-194.
- Quách Văn Toàn Em và Võ Thị Kim Yên. (2015). Phân lập và khảo sát một số chủng nấm sợi nội sinh từ cây cóc đỏ (*Lumnitzera littorea* (Jack) Voigt), cóc trắng (*Lumnitzera racemosa* Willd.) và đước bộp (*Rhizophora mucronata* Lam.) ở Cần Giờ. *Báo cáo Khoa học về Sinh thái và Tài nguyên sinh vật*. Nhà xuất bản Khoa học Tự nhiên và Công nghệ, 520-527.
- TCVN 9294. (2012). Phân bón - Xác định Cacbon hữu cơ tổng số bằng phương pháp Walley-Black.
- Tổng cục Thủy sản. (28/12/2020). Tổng sản lượng thủy sản 4 tháng đầu năm tăng 0,4% so với cùng kỳ. Khai thác từ <https://tongcucthuysan.gov.vn/tin-t%25E1%25BB%25A9c/-tin-v%25E1%25BA%25AFn/doc-tin/014483/2020-04>
- Trịnh Đình Khả. (2015). Tinh sạch và nghiên cứu đặc tính của cellulase tự nhiên và tạo cellulase tái tổ hợp. Luận án tiến sĩ sinh học. Trường Đại học Thái Nguyên.
- Vũ Thị Ngọc Nhung, Nguyễn Thị Loan và Tăng Minh Trí. (2017). Nghiên cứu một số nguồn carbohydrate tạo biofloc để nuôi tôm thẻ chân trắng (*Litopenaeus vannamei*). *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Sư Phạm Thành phố Hồ Chí Minh*, 14(12), 149-160.
- 2. Tài liệu tiếng nước ngoài**
- APHA. (1995). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation, Denver.
- Anderson. (1993). Fertilization soil and water quality management in small - scale ponds, Aquaculture Asia, Central institute of Freshwater Aquaculture.
- AOAC. (2005). *Official Methods of Analysis*, eighteenth ed. AOAC International (Association of Analytical Communities). Gaithersburg, Maryland 20877-2417, USA.
- Avnimelech, Y. (2006). Bio filters: The need for a new comprehensive approach. *Aquaculture Engineering*, 34, 172-178.
- Avnimelech, Y. (2015). *Biofloc Technology – A Practical Guide Book (3rd Edition)*. The World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, United States, 182 pages.
- Boyd, 1998. Pond water aeration systems. *Aquaculture Engineering*, 18, 9-40.
- Crab, R., Avnimelech, Y., Defoirdt, T., Bossier, P., & Verstraete, W. (2007). Nitrogen removal techniques in aquaculture for a sustainable production. *Aquaculture*, 270, 1 - 14.
- Crab, R., Defoirdt, T., Bossier, P., & Verstraete, W. (2012). Biofloc technology in aquaculture: Beneficial effects and future challenges. *Aquaculture*. 356, 351-356.
- De Schryver, Crab, P., R., Defroit, Boon T. N., & Verstraete, W. (2008). The basic of bio-flocs technology: The added value for aquaculture. *Aquaculture*, 277, 125-137.
- Hargreaves, J.A. (2013). Biofloc Production Systems for Aquaculture. Southern regional aquaculture center. SRAC Publication No.4503.
- Liu, D.H., He, J.G., Liu, Y.J., Zheng, S.X., & Tian, L.X. (2005). Effects of dietary protein levels on growth performance and immune condition of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* juveniles at very low salinity. *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni*, 44, 217-223.
- Panigrahi, A., Sundaram, M., Chakrapani, S., Rajasekar, S., Syama Dayal, J., & Chavali, G. (2018). Effect of carbon and nitrogen ratio (C:N) manipulation on the production performance and immunity of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) in a biofloc-based rearing system. *Aquaculture Research*, 50(1), 29-41.
- Phuoc, L.H., Hu, B., Wille, M., Hien, N.T., Phuong, V.H., Tinh, N.T.N., Loc, N.H.,

- Sorgeloos, P., & Bossier, P. (2016). Priming the immune system of Penaeid shrimp by bacterial HSP70 (DnaK). *Journal of Fish Diseases*, 39(5), 555-564.
- Sudong, X., Yong, L., Wenqi, W., Mayalagu, R., Kumaravel, P.K.V., & HuaW, W. (2010). Influence of dietary protein levels on growth, digestibility, digestive enzyme activity and stress tolerance in white-leg shrimp, *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931), reared in high-density tank trials. *Aquaculture Research*, 41, 1845 - 1854
- Whetstone, J.M., G. D. Treece, C. L. B., & Stokes, A. D. (2002). Opportunities and Contrains in Marine Shrim Farming. Southern Regional Aquaculture Center (SRAC) publication No. 2600 USDA.
- Widanarni, W., Deby, Y., Sukenda, M.I., & Julie, E., (2010). Nursery culture performance of *Litopenaeus vannamei* with Probiotics Addition and Different C/N ratio under laboratory condition. *HAYATI Journal of Biosciences*, 17, 115-119.
- 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, 147-152.
- Zheng, X., Duan, Y., Dong, H. & Zhang, J. (2017). Effects of dietary *Lactobacillus plantarum* on growth performance, digestive enzymes and gut morphology of *Litopenaeus vannamei*. Probiotics. *Antimicro*, 10(3), 504-510.