

ẢNH HƯỞNG CỦA POLY β -HYDROXYBUTYRATE (PHB) LÊN ƯƠNG NUÔI TÔM CÀNG XANH (*Macrobrachium rosenbergii*)

Dinh The Nhan^{1,2}, Mathieu Wille¹, Patrick Sorgeloos¹

¹ Laboratory of Aquaculture & Artemia Reference Center, Ghent University, Belgium

² Faculty of Fisheries, Nong Lam University, HCM City, Vietnam

ABSTRACT

In this study, we investigated the effect of poly β -hydroxybutyrate (PHB) on the culture performance of larvae of the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* and on the bacterial levels inside the larval gut. Instar II *Artemia* nauplii were cultured with or without PHB (5 g/L) and/or a lipid emulsion rich in highly unsaturated fatty acids (HUFA) for 24 hours. The effect of feeding PHB and/or HUFA enriched *Artemia* nauplii on the performance of *Macrobrachium* larvae was investigated. Feeding larvae of the giant freshwater prawn with PHB-containing *Artemia* nauplii significantly increased survival and growth of the larvae. Moreover, total bacterial counts and *Vibrio* counts were found to be significantly lower in PHB-fed larvae when compared to control larvae, indicating that the PHB addition had a growth-inhibitory effect towards these potentially pathogenic microorganisms. Finally, a combination of PHB addition and lipid enrichment resulted in the best overall culture performance since it synergistically improved larval survival. The optimal PHB concentration and formulation for bio-encapsulation into *Artemia* should be investigated further to increase the economical efficiency of *Macrobrachium* larval production.

ĐẶT VẤN ĐỀ

Tôm càng xanh *Macrobrachium rosenbergii* (De Man 1879) là một đối tượng thủy sản nuôi quan trọng. Trong những năm gần đây, việc nuôi tôm đã mở rộng nhanh chóng không những ở châu Á mà cả ở những nơi không phải là vùng phân bố tự nhiên của loài này (FAO, 2000). Tuy nhiên, việc thiếu hụt tôm giống có chất lượng là một trong những rào cản chính của việc mở rộng nuôi loài tôm này. Trong sản xuất giống, ấu trùng tôm càng xanh thường có tỷ lệ sống thấp, sản lượng thấp do ấu trùng thường dễ mắc bệnh. Những bệnh thường gặp trên ấu trùng tôm càng xanh thường là bệnh do vi khuẩn (Sung và ctv., 2000; Phatarpekar và ctv., 2002; Al-Harbi, 2003). Tỷ lệ chết cao làm cản trở việc sản xuất con giống có chất lượng. Tỷ lệ chết này được cho là do những bệnh do vi khuẩn cơ hội (Skjermo và Vadstein, 1999). *Vibrio* được cho là nhóm vi khuẩn gây nên nhiều bệnh (Alavandi và ctv., 2004; Kennedy và ctv., 2006) và là vấn đề chính trong sản xuất giống tôm càng xanh (Nayak và Mukherjee, 1997; Jayaprakash và ctv., 2006). Kháng sinh và chất sát trùng là biện pháp phổ biến để khống chế mầm bệnh vi khuẩn trong trại giống. Tuy nhiên, việc sử dụng kháng sinh và chất sát trùng bị hạn chế ở một số nước do những lo ngại về mặt sức khỏe và môi trường (Schneider và ctv., 2003). Ngoài ra, việc sử dụng kháng sinh ở liều thấp để phòng bệnh có thể tạo ra những dòng vi khuẩn kháng kháng sinh (Teo và ctv., 2000; 2002), khiến cho việc điều trị bằng kháng sinh không còn hiệu quả (Karunasagar và ctv., 1994). Do đó, cần phải sớm tìm ra những biện pháp khống chế bệnh hiệu quả, lâu dài và thân thiện với môi trường.

Nhận thức được rằng kháng sinh không nên được sử dụng như là chất kích thích sinh trưởng, đã có nhiều sự quan tâm đến những acid béo mạch ngắn (short chain fatty acids-SCFAs) như là các chất ức chế vi sinh (Defoirdt và ctv., 2006). Nhiều nghiên cứu đã chỉ ra rằng SCFAs ức chế sự phát triển của nấm men và vi khuẩn đường ruột như *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli* và *Shigella flexneri* (Bergeim, 1940; Wolin, 1969; Cherrington, 1991; Bearson và ctv., 1997; Sun và ctv., 1998; Van Immerseel và ctv., 2003). SCFAs trước đây cũng được chứng minh là có khả năng ức chế sự phát triển của *Salmonella*

trên gà (Waldroup và ctv., 1995; Van Der Wielen và ctv., 2000; Van Immerseel và ctv., 2005) và *Vibrio* gây bệnh phát sáng trong điều kiện *in vitro* (Defoirdt và ctv., 2006). Ngoài ra, SCFAs cũng đã cho thấy khả năng làm tăng tỷ lệ sống của Nauplius *Artemia*. Ngoài khả năng tĩnh khuẩn, SCFAs cũng được cho rằng nó cũng cung cấp năng lượng cho thú (Topping và Clifton, 2001) và cũng có thể cả cho tôm (Defoirdt và ctv., 2006). SCFAs không thể được sử dụng trực tiếp trong môi trường nước vì rất tốn kém, không kinh tế. Ngoài ra, khi sử dụng SCFAs trực tiếp sẽ làm xấu môi trường nước vì làm tăng lượng hữu cơ trong môi trường kích thích sự phát triển của vi sinh vật và kết quả là làm giảm oxy hòa tan trong nước.

Polyhydroxyalkanoates (PHAs) là polymer của những acid béo mạch ngắn, không tan, dạng β -hydroxy, được tổng hợp và dự trữ ở nhiều vi khuẩn khác nhau (Anderson và Dawes, 1990). Thú vị là nhiều nghiên cứu cho thấy bằng chứng rằng PHAs có thể được cắt nhỏ ra trong suốt quá trình tiêu hóa trong ống tiêu hóa và do đó cuối cùng cũng có tác dụng như SCFAs (Defoirdt và ctv., 2009). Defoirdt (2007) báo cáo rằng SCFA β -hydroxybutyrate có khả năng khống chế sự phát triển của dòng vi khuẩn có độc lực *Vibrio campbellii* trong điều kiện *in vitro*. Dựa trên kết quả này, những tác giả trên tiếp tục nghiên cứu xem dạng polymer của SCFAs là poly- β -hydroxybutyrate (PHB) có thể khống chế các mầm bệnh vi khuẩn hay không. PHB thương mại dạng hạt có đường kính 30 μm , sử dụng ở nồng độ 1000mg/L trong nước cho hiệu quả bảo vệ hoàn toàn trên *Artemia* đối với mầm bệnh *V. campbellii* (Defoirdt và ctv., 2007).

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đánh giá hiệu quả của PHB (cấp qua thức ăn) trên tỷ lệ sống và sự phát triển của ấu trùng tôm càng xanh *Macrobrachium rosenbergii* trên hệ vi sinh vật của ấu trùng. Để chứng minh khả năng ứng dụng của PHB, việc cấp PHB cho Nauplius *Artemia* được thực hiện kết hợp với việc làm giàu *Artemia*.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Ấu trùng tôm

Nghiên cứu bao gồm hai thí nghiệm trên ấu trùng tôm càng xanh (*Macrobrachium rosenbergii*) được nuôi trong các cốc thủy tinh dung tích 1L. Tôm bố mẹ được nhập từ Thái Lan. Các yếu tố về chất lượng nước, ánh sáng, nhiệt độ, thức ăn được điều chỉnh theo hướng dẫn về kỹ thuật nuôi tôm của New (2003). Ấu trùng chỉ nên được thu từ một tôm mẹ duy nhất (Cavalli và ctv., 1999, 2000; Baruah và ctv., 2009). Ấu trùng mới nở sẽ được nuôi trong 10 ngày rồi mới dùng cho thí nghiệm. 24 giờ sau khi nở, ấu trùng sẽ được chuyển sang những bể tròn dung tích 19L, có kết nối với hệ thống nước tuần hoàn được mô tả bởi Cavalli và ctv. (2001). *Artemia* được dùng trong thí nghiệm là *Artemia franciscana* (dòng Great salt Lake), được sử dụng làm thức ăn tươi sống cho ấu trùng.

Thiết kế thí nghiệm

Thí nghiệm được thực hiện trên các cốc thủy tinh có dung tích 1L. Cốc được đặt vào trong các bể nước để ổn định nhiệt độ ở 29 ± 1 °C, có sử dụng thiết bị ổn nhiệt (thermostatic heater). Cốc thủy tinh được sục khí nhẹ để đảm bảo oxy hòa tan trong nước đạt trên 5 mg/L, mỗi ngày thay 50% lượng nước. Trong quá trình thay nước, *Artemia* dư của ngày hôm trước sẽ được loại bỏ bằng việc xi phông. Việc này được thực hiện kỹ, nhẹ nhàng để tránh làm thất thoát ấu trùng. Sau khi thay nước, ấu trùng được cho ăn *Artemia* dòng Great Salt Lake ở mức độ dư (*ad libitum*), ngày cho ăn hai lần lúc 9 giờ và 17 giờ cho đến hết thí nghiệm.

Tùy vào thí nghiệm, instar II nauplius *Artemia* được làm giàu hoặc không với PHB (dạng hạt có đường kính 30 μm , Lot: S68924-488, Sigma-Aldrich, Bornem, Belgium) ở nồng độ 5g/L và nhũ tương chất béo (có chứa 30% chất béo dạng n-3 HUFA và tỷ lệ DHA/EPA là 0.6) với nồng độ là 0,6g/L trong 24 giờ trước khi cho ấu trùng ăn. Ở nghiệm thức đối chứng, ấu trùng tôm cũng được cho ăn và chăm sóc tương tự nhưng *Artemia* không được làm giàu.

Thí nghiệm I bao gồm 2 nghiệm thức với *Artemia* được làm giàu và không được làm giàu. Thí nghiệm tiến hành với ấu trùng tôm 10 ngày tuổi được nuôi ở mật độ 50 con/L. Thí nghiệm này kéo dài trong 15 ngày

Thí nghiệm II bao gồm 4 nghiệm thức có bổ sung hoặc không bổ sung PHB và chất béo. Thí nghiệm này bắt đầu với ấu trùng 4 ngày tuổi được nuôi ở mật độ 100con/L. Thí nghiệm này kéo dài trong 28 ngày.

Phân tích

Phát hiện PHB trong Artemia nauplius

Sau khi *Artemia* được làm giàu, chúng tôi tiến hành kiểm tra sự hiện diện của PHB bằng phương pháp được mô tả bởi Defoirdt và ctv, (2007). Theo phương pháp này, 10 nauplius *Artemia* sẽ bị giết bằng ethanol và được nhuộm huỳnh quang Nile Blue A (Ostle và Holt, 1982). Sau đó, quan sát dưới kính hiển vi Axioskop II (Carl Zeiss, Jena, Germany) có trang bị máy quay phim kỹ thuật số kết nối với máy vi tính.

Chỉ số giai đoạn ấu trùng

Vào ngày thứ 10 và 15, sự phát triển của ấu trùng tôm được kiểm tra bằng cách xác định chỉ số giai đoạn ấu trùng (LSI: Larval Stage Index) theo phương pháp của Maddox và Manzi (1976). Giai đoạn phát triển của ấu trùng được xác định theo mô tả của Uno và Kwon (1969).

Tỷ lệ sống của ấu trùng

Tỷ lệ sống của ấu trùng được kiểm tra vào ngày 5, 10 và 15 trong thí nghiệm 1, và các ngày 10, 15, 20 và 28 trong thí nghiệm 2. Việc đếm ấu trùng được thực hiện hết sức cẩn thận nhằm tránh làm stress ấu trùng.

Vi khuẩn trong đường ruột ấu trùng tôm

Mẫu ấu trùng tôm được kiểm tra vi khuẩn vào đầu và kết thúc thí nghiệm. Mẫu ấu trùng được làm sạch vi khuẩn bên ngoài bằng benzal konium chloride phương pháp được mô tả bởi Huys và ctv, (2001). Sau đó ấu trùng được nghiền và pha loãng trong dung dịch nước muối sinh lý và được cấy trang lần lượt trên môi trường thạch Marine Agar và TCBS (Thiosulphate-Citrate-Bile Salt-sucrose) để đếm tổng vi khuẩn cũng như vi khuẩn nhóm *Vibrio* sau 48 giờ ủ ở 28 °C.

Phân tích thống kê

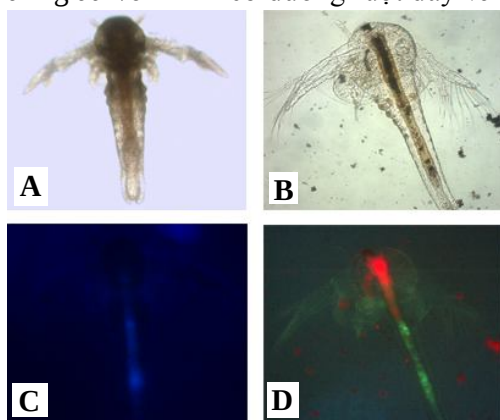
Chỉ số giai đoạn của ấu trùng, tỷ lệ sống và mật độ vi khuẩn được phân tích bằng phân tích phương sai (one-way ANOVA). Khi có sự sai biệt có ý nghĩa, trắc nghiệm DUNCAN sẽ được sử dụng để phân tích kết quả (SPSS phiên bản 13.0). Các giá trị phần trăm sẽ được

chuyển sang dạng qui đổi arcsin để thống kê. Phân tích two-way ANOVA được sử dụng để xác định sự tương tác của những yếu tố thí nghiệm trong thí nghiệm 2.

KẾT QUẢ

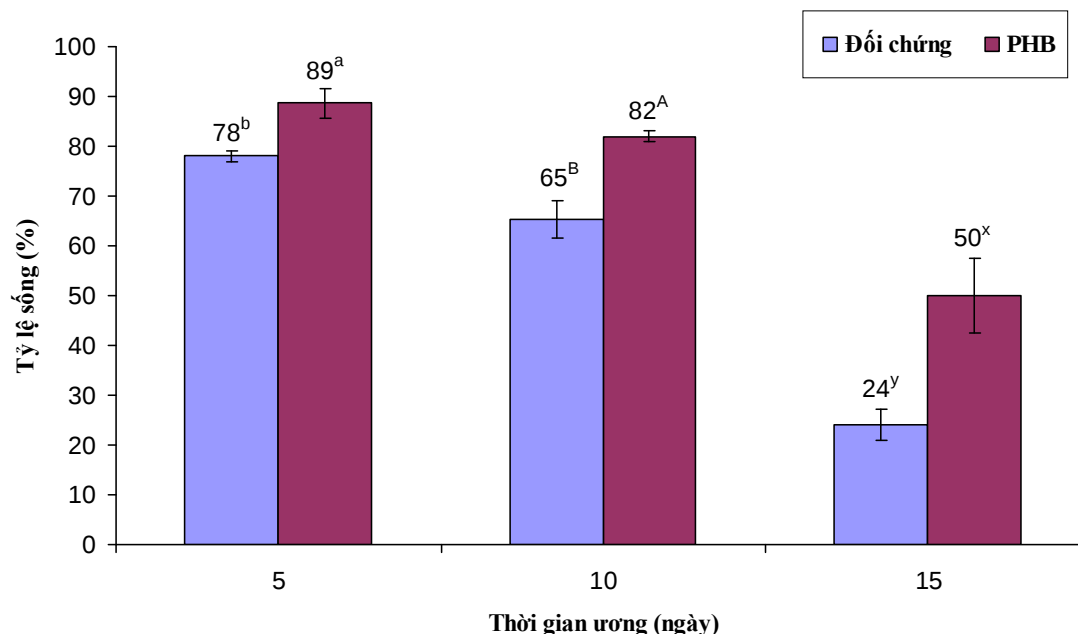
Thí nghiệm 1

Trong thí nghiệm 1, tác dụng của PHB bổ sung cho *Artemia* trên ấu trùng tôm càng xanh được đánh giá. Phân tích hình ảnh của *Artemia* và ấu trùng tôm cho thấy *Artemia* được làm giàu với PHB có đường ruột đầy và ấu trùng tôm của nghiệm thức được cho ăn *Artemia*



làm giàu (có nhuộm Nile Blue A) bắt màu huỳnh quang, chứng tỏ *Artemia* đã hấp thu PHB (Hình 1). Tác dụng của PHB được đánh giá trên các chỉ tiêu như tỷ lệ sống và sự phát triển trong 15 ngày. Sự phát triển của ấu trùng (chỉ tiêu chỉ số giai đoạn ấu trùng) sau 10 ngày của nghiệm thức có bổ sung PHB tốt hơn nghiệm thức đối chứng (không PHB) rõ rệt ($P < 0.05$). Tỷ lệ sống của ấu trùng sau 5, 10 và 15 ngày của nghiệm thức có bổ sung PHB cũng tốt hơn nghiệm thức không bổ sung PHB rõ rệt ($P < 0.05$). Sự khác biệt này càng về cuối thí nghiệm càng rõ ràng.

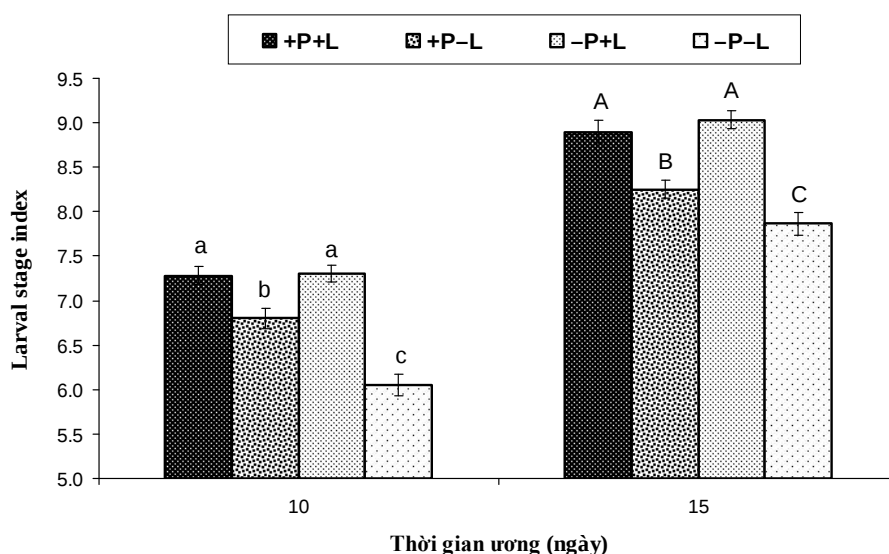
Hình. 1 Màu tự nhiên (hàng trên) và màu dưới đèn huỳnh quang (hàng dưới) của *Artemia* được nhuộm Nile Blue A của nhóm không được bổ sung PHB (hình A và C) và được bổ sung PHB (hình B và D).



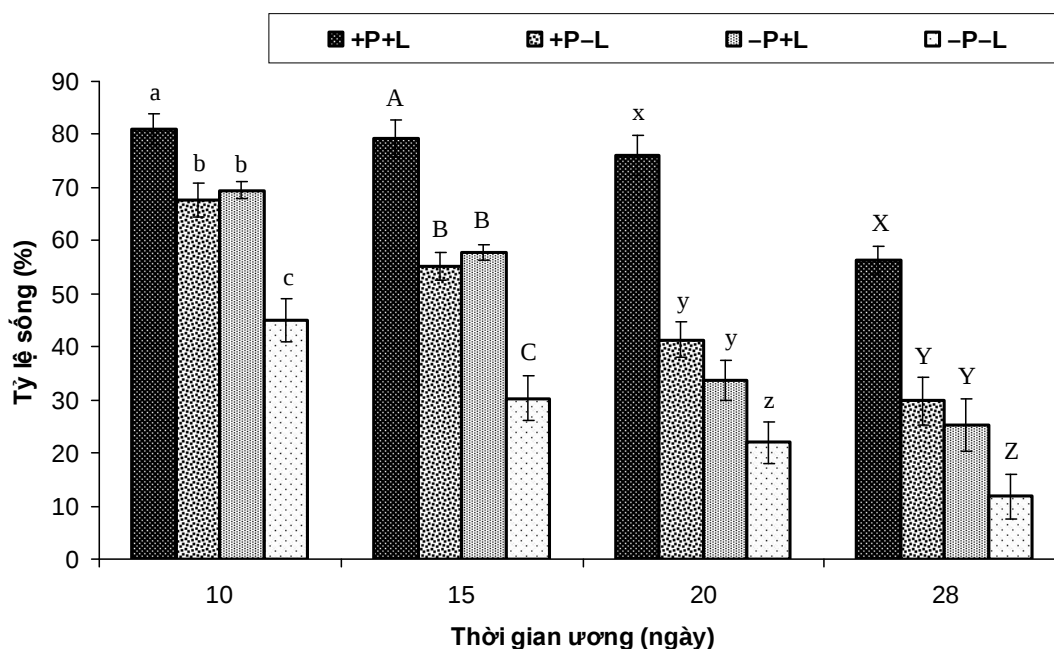
Biểu đồ 1. Tỷ lệ sống của ấu trùng *Macrobrachium rosenbergii* cho ăn *Artemia* được làm giàu hay không bằng PHB sau 5, 10 và 15 ngày thí nghiệm. Các giá trị bao gồm số trung bình $\pm$ sai số chuẩn. Chữ cái khác nhau thể hiện sự sai biệt có ý nghĩa thống kê ($P < 0.05$).

Thí nghiệm 2

Trong thí nghiệm này, tác dụng của việc kết hợp PHB và nhũ tương chất béo (đều cấp cho ấu trùng tôm thông qua thức ăn tươi sống là *Artemia*) được nghiên cứu. Nghiệm thức có bổ sung chất béo cho chỉ số giai đoạn của ấu trùng – LSI cao nhất trong khi ấu trùng nghiệm thức đối chứng có LSI thấp nhất. Nghiệm thức có bổ sung PHB cho ấu trùng có LSI cao hơn nghiệm thức đối chứng nhưng thấp hơn nghiệm thức bổ sung chất béo. Tỷ lệ sống của ấu trùng được kiểm tra vào 4 thời điểm thí nghiệm vào ngày 10, 15, 20 và 28 (kết thúc thí nghiệm). Có sự tương tác ở nghiệm thức kết hợp PHB và chất béo trên LSI ở ngày thứ 10 và 15 ($P < 0,05$). Nghiệm thức kết hợp PHB và chất béo cho tỷ lệ sống cao nhất (56%) cao hơn nghiệm thức đối chứng (12%) lúc kết thúc thí nghiệm. Nghiệm thức chỉ bổ sung PHB hoặc chất béo không có sự khác biệt về tỷ lệ sống so với nhau. Sau 28 ngày thí nghiệm (32 ngày sau khi trứng nở), 90% ấu trùng của nghiệm thức có bổ sung chất béo chuyển sang giai đoạn hậu ấu trùng, trong khi nghiệm thức chỉ bổ sung PHB là khoảng 50% và nghiệm thức đối chứng là 10%.



Biểu đồ 2. Chỉ số giai đoạn ấu trùng tôm càng xanh ở ngày 10 và 15 được cho ăn *Artemia* có làm giàu với hoặc không PHB và chất béo. Các giá trị bao gồm số trung bình $\pm$ sai số chuẩn. Chữ cái khác nhau thể hiện sự sai biệt có ý nghĩa thống kê ($P < 0,05$).



Biểu đồ 3. Tỷ lệ sống của ấu trùng của tôm càng xanh được cho ăn *Artemia* có làm giàu với hoặc không PHB và chất béo. Các giá trị bao gồm số trung bình $\pm$ sai số chuẩn. Chữ cái khác nhau thể hiện sự sai biệt có ý nghĩa thống kê ($P < 0,05$).

Tổng số vi khuẩn trong ruột ấu trùng tôm được kiểm tra vào trước và sau thí nghiệm, bằng cách cấy trang dịch nghiền ấu trùng tôm lần lượt trên môi trường Marine Agar và TCBS và đếm số khuẩn lạc. Khi kết thúc thí nghiệm, tổng số vi khuẩn trong ruột ấu trùng của nghiệm thức chỉ bổ sung chất béo cao hơn hẳn các nghiệm thức khác ($2,8 \times 10^5$ CFU/ấu trùng). Các nghiệm thức không bổ sung PHB có tổng số vi khuẩn *Vibrio* cao hơn hẳn nghiệm thức có bổ sung PHB. Tổng số *Vibrio* trong ruột ấu trùng tôm tăng từ 21 ± 6 CFU/ ấu trùng lên $1,3 - 2,2 \times 10^3$ CFU/ấu trùng khi kết thúc thí nghiệm ở nghiệm thức không bổ sung PHB (Bảng 1). Có sự tương tác mạnh mẽ ở nghiệm thức kết hợp PHB và chất béo trên mật độ vi khuẩn đường ruột của ấu trùng tôm ($P < 0,05$) cho thấy rằng tác dụng của PHB mạnh hơn khi được kết hợp làm giàu cùng chất béo.

Bảng 1. Mật độ vi khuẩn trong ruột ấu trùng tôm được cho ăn *Artemia* có hoặc không có PHB và chất béo làm giàu trong thí nghiệm 2.

Nghiệm thức	Vi khuẩn tổng số (10^4 larva ⁻¹)		Vibrio tổng số	
	Ban đầu	Kết thúc	Ban đầu (CFU/ấu trùng)	Kết thúc (10^2 CFU/ấu trùng)
+P+L	3.2±0.2	5.6±1.1 ^a	21±6	0.3±0.1 ^a
+P-L		5.4±0.8 ^a		1.6±0.7 ^a
-P+L		28.0±2.5 ^b		22.0±5.3 ^b
-P-L		6.8±1.0 ^a		13.3±1.8 ^b
Sự tương tác giữa PHB và chất béo làm giàu		P=0.002		P=0.008

THẢO LUẬN

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đánh giá hiệu quả của việc bổ sung PHB lên sự phát triển và hệ vi sinh vật trong ruột ấu trùng tôm càng xanh. Chúng tôi cung cấp PHB và chất béo cho ấu trùng tôm thông qua *Artemia* vì *Artemia* được sử dụng như thức ăn tươi sống thông dụng nhất khi ương ấu trùng tôm (Lavens và ctv, 2000), mặt khác PHB có thể được tích lũy trong *Artemia* khi làm giàu (Defoirdt và ctv, 2007). Sự tích lũy các hạt PHB trong ruột *Artemia* được khẳng định qua hình ảnh huỳnh quang. Tuy nhiên, ta không thể thấy PHB trong ruột ấu trùng tôm vì ấu trùng tôm không đủ trong suốt để thấy ánh sáng huỳnh quang và cũng có thể do hàm lượng PHB trong ấu trùng tôm không đủ lớn. Kết quả thí nghiệm cũng cho thấy PHB làm tăng tỷ lệ sống của ấu trùng tôm đáng kể. Trong thí nghiệm 2, hiệu quả của việc kết hợp PHB và chất béo thiết yếu được nghiên cứu thì nghiệm thức kết hợp cho tỷ lệ sống của ấu trùng tôm cao nhất. Nghiệm thức chỉ bổ sung PHB hoặc chất béo cũng làm tăng tỷ lệ sống của ấu trùng tôm tuy nhiên không cao bằng nghiệm thức kết hợp. Kết quả này cũng phù hợp với nghiên cứu của Defoirdt và ctv (2007) khi tác giả này nhận thấy PHB làm tăng tỷ lệ sống của *Artemia* trước các mầm bệnh *Vibrio*. Tỷ lệ sống của ấu trùng ở nghiệm thức đối chứng thấp có lẽ do nguyên nhân bởi vi khuẩn cơ hội gây hại cho ấu trùng (Baruah và ctv, 2009). Trong nghiên cứu này, chúng tôi nhận thấy số lượng vi khuẩn *Vibrio*, là nguyên nhân của nhiều bệnh thủy sản (Lightner, 1996; Otta và ctv., 2001), giảm rõ rệt ở nghiệm thức có bổ sung PHB (Bảng 1). Trong nghiên cứu này, tổng số vi khuẩn và tổng số *Vibrio* dao động lần lượt trong khoảng $15.9\text{--}28.0 \times 10^4$ và $0.4\text{--}22.0 \times 10^2$ CFU/ấu trùng. Trong khi đó, ở nghiệm thức có bổ sung PHB tổng số vi khuẩn và tổng số vi khuẩn *Vibrio* dao động lần lượt chỉ từ $1.7\text{--}5.6 \times 10^4$ và $0.3\text{--}1.6 \times 10^2$ CFU/ấu trùng.

Defoirdt và ctv, (2007) nhận thấy rằng PHB bảo vệ *Artemia* trước sự tấn công của mầm bệnh *Vibrio campbelli* và đặt giả thuyết rằng các hạt PHB sẽ bị phân cắt thành β -hydroxybutyrate trong đường ruột của *Artemia* và sẽ phóng thích ra các acid béo để bảo vệ vật chủ trước mầm bệnh. PHB có thể có hai tác dụng: một là cung cấp năng lượng cho đường ruột và do đó làm cho biểu mô ruột tăng khả năng kháng mầm bệnh, hai là ức chế sự phát triển của mầm bệnh. Điều này giải thích kết quả PHB bổ sung rõ ràng làm tăng tỷ lệ sống và sự phát triển của ấu trùng. Ngoài ra, các acid béo thiết yếu cũng đóng vai trò hết sức quan trọng đối với ấu trùng của giáp xác (Teshima 1972, 1997; Middleditch và ctv., 1980; Teshima và Kanazawa, 1983; Harrison, 1990). Những acid béo phóng thích từ PHB là những acid béo mạch ngắn và có thể đóng vai trò như một nguồn cung cấp thêm năng lượng cho ấu trùng tôm chứ PHB không cung cấp các acid béo mạch dài (HUFA). Có nhiều nghiên cứu về sự biến dưỡng của các acid béo thiết yếu của ấu trùng và ấu niên tôm nước ngọt (Devresse và ctv., 1990; Sheen và D'Abramo, 1991; Teshima và ctv., 1992, 1997; D'Abramo và Sheen, 1993; Querijero và ctv., 1997; Roustaian và ctv., 1999). Lipid làm cho ấu trùng giàu HUFA nên cung cấp nhiều năng lượng (Tidwell và ctv, 1998) và cũng là thành phần cần thiết cho sự phát triển mô cũng như sự tổng hợp hormone dẫn đến tăng sức tăng trưởng của vật nuôi. Kết quả của nghiên cứu này phù hợp với kết quả của những nghiên cứu trước đây. Romdhane và ctv, (1995) khi chứng minh rằng khi tăng thời gian cho ấu trùng tôm ăn *Artemia* làm giàu với HUFA sẽ cho ấu trùng có tỷ lệ sống, sức tăng trưởng, sức chống chịu với stress và tỷ lệ biến thái tốt hơn. Tương tự, Sorgeloos và Leger (1992) và Alam và ctv, (1995) báo cáo rằng thức ăn tươi sống được làm giàu với dầu giàu acid béo n-3 làm tăng sức tăng trưởng ấu trùng tôm càng xanh.

Sự phân cắt PHB thành các thành phần nhỏ hơn có thể xảy ra dưới tác động của nhiều cơ chế bao gồm sự phân giải hóa học, phản ứng thủy giải cũng như sự thủy giải có xúc tác của enzyme (Defoirdt và ctv, 2009). Tuy nhiên, cơ chế chính xác của sự phân giải polymer PHB thành các thành phần nhỏ trong đường ruột vẫn chưa được xác định. Defoirdt và ctv, (2007)

báo cáo rằng sự phân giải PHB trong đường ruột của *Artemia* rất có thể do các cơ chế lý-hóa học hoặc có sự xúc tác của enzyme trong điều kiện *Artemia* không có vi sinh vật cộng sinh (axenic). Ngược lại, ấu trùng tôm càng xanh được sử dụng trong nghiên cứu này có hệ vi sinh vật cộng sinh nên do đó vi sinh vật cũng có thể đóng vai trò trong sự phân giải PHB. Quả thực, sự phân giải PHB bởi enzyme-depolymerase sản xuất bởi vi sinh vật được báo cáo bởi nhiều tác giả (Doi và ctv, 1990; Yoshie và ctv., 1999; Quinteros và ctv., 1999; Choi và ctv., 2004; Khanna và Srivastava, 2004; Jendrossek và Handrick, 2002), tuy nhiên, đến nay chưa có báo cáo về sự hiện diện của vi sinh vật phân giải PHB trong đường ruột ấu trùng tôm *Macrobrachium*.

Việc ứng dụng PHB trong nuôi thủy sản, đặc biệt là trong ương nuôi ấu trùng tôm bị hạn chế bởi giá của các sản phẩm PHB thương mại vẫn còn cao. Tuy nhiên, PHB có thể được sản xuất tương đối dễ bằng vi khuẩn nhóm *Bacillus* và *Lactobacillus* spp. (Anderson và Dawes, 1990; Aslim và ctv., 1998; Yilmaz và ctv., 2005) với các nguyên liệu rẻ tiền như mật đường (Kim, 2000) đây là điều kiện để có thể ứng dụng PHB với giá thành hạ và bền vững.

Qua kết quả của nghiên cứu, chúng tôi kết luận rằng ấu trùng tôm càng xanh (*Macrobrachium rosenbergii*) được cho ăn *Artemia* làm giàu với PHB sẽ tăng khả năng tăng trưởng và tỷ lệ sống. Ngoài ra, vi khuẩn tổng số và vi khuẩn *Vibrio* trong đường ruột ấu trùng tôm được ăn bổ sung PHB sẽ giảm đáng kể. Điều này cho thấy PHB có tác dụng ức chế sự phát triển của vi sinh vật cũng như các vi sinh vật có khả năng gây bệnh. Cuối cùng, sự kết hợp PHB và lipid làm giàu cho *Artemia* cho kết quả tốt nhất đối với ấu trùng tôm. Nồng độ PHB và công thức cho dạng nang PHB để làm giàu *Artemia* nên được nghiên cứu thêm để tăng hiệu quả kinh tế khi ứng dụng trong ương nuôi ấu trùng tôm.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Alam, M.J., Ang, K.J., Begum, M., 1995. Use of egg custard augmented with cod liver oil and *Moina micrura* on production of freshwater prawn postlarvae. *Aquaculture International* 3, 249–259.
- Alavandi, S.V., Vijayan, K.K., Santiago, T.C., Poornima, M., Jithendran, K.P., Ali, S.A., Rajan, J.J.S., 2004. Evaluation of *Pseudomonas* sp. PM 11 and *Vibrio fluvialis* PM 17 on immune indices of tiger shrimp, *Penaeus monodon*. *Fish Shellfish Immunology* 17, 115–120.
- Al-Harbi, A.H., 2003. Bacterial flora of freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (de Man), cultured in concrete tanks in Saudi Arabia. *Applied Aquaculture* 14, 113–124.
- Anderson, A.J., Dawes, E.A., 1990. Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Microbiology Reviews* 54, 450–472.
- Aslim, B., Caliskan, F., Beyatli, Y., Gündüz, U., 1998. Poly- β -hydroxybutyrate production by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Letter* 159, 293–297.
- Baruah, K., Cam, D.T.V., Dierckens, K., Wille, M., Defoirdt, T., Sorgeloos, P., Bossier, P., 2009. *In vivo* effects of single or combined N-acyl homoserine lactone quorum sensing signals on the performance of *Macrobrachium rosenbergii* larvae. *Aquaculture* 288, 233–238.
- Bearson, S., Bearson, B., Foster, J.W., 1997. Acid stress responses in enterobacteria. *FEMS Microbiology Letter* 147, 173–180.
- Bergeim, O., 1940. Toxicity of intestinal volatile fatty acids for yeast and *Esch. coli*. *Journal of Infection Diseases* 66, 222–234.

- Cavalli, R.O., Berghe, E.V., Lavens, P., Thuy, N.T.T., Mathieu, W., Sorgeloos, P., 2000. Ammonia toxicity as a criterion for the evaluation of larvae quality in the prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *Comparative Biochemistry and Physiology* 125, 333–343.
- Cavalli, R.O., Lavens, P., Sorgeloos, P., 1999. Performance of *Macrobrachium rosenbergii* broodstock fed diets with different fatty acid composition. *Aquaculture* 179, 387–402.
- Cavalli, R.O., Lavens, P., Sorgeloos, P., 2001. Reproductive performance of *Macrobrachium rosenbergii* female in captivity. *Journal of the World Aquaculture Society* 32 (1), 60–67.
- Cherrington, C.A., Hinton, M., Pearson, G.R., Chopra, I., 1991. Short-chain organic acids at pH 5.0 kill *Escherichia coli* and *Salmonella* spp without causing membrane perturbation. *Journal of Applied Bacteriology* 70, 161–165.
- Choi, G.G., Kim, H.W., Rhee, Y.H., 2004. Enzymatic and non-enzymatic degradation of poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) copolyesters produced by *Alcaligenes* sp MT-16. *Journal of Microbiology* 42, 346–352.
- D'Abramo, L.R., Sheen, S.S., 1993. Polyunsaturated fatty acid nutrition in juvenile freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *Aquaculture* 115, 63–86.
- De Man, J. G., 1879. On some species of the genus *Palaemon* Fabr. with descriptions of two new forms. *Notes from the Royal Zoological Museum of the Netherlands at Leiden* 1 (41), 165–184.
- Defoirdt, T., Boon, N., Sorgeloos, P., Verstraete, W., Bossier, P., 2009. Short-chain fatty acids and poly- β -hydroxyalkanoates: (new) biocontrol agents for a sustainable animal production (review). *Biotechnology Advances*, in press.
- Defoirdt, T., Halet, D., Sorgeloos, P., Bossier, P., Verstraete, W., 2006. Short chain fatty acids protect gnotobiotic *Artemia franciscana* from pathogenic *Vibrio campbellii*. *Aquaculture* 261, 804–808.
- Defoirdt, T., Halet, D., Vervaeren, H., Boon, N., Wiele, T.V., Sorgeloos, P., Bossier, P., Verstraete, W., 2007. The bacterial storage compound poly- β -hydroxybutyrate protects *Artemia franciscana* from pathogenic *Vibrio campbellii*. *Environmental Microbiology* 9, 445–452.
- Devresse, B., Romdhane, M., Buzzi, M., Rasowo, J., Léger, P., Brown, J., Sorgeloos, P., 1990. Improved larviculture outputs in the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* fed a diet of *Artemia* enriched with n-3 HUFA and phospholipids. *World Aquaculture* 21, 123–125.
- Doi, Y., Kanesawa, Y., Kunioka, M., Saito, T., 1990. Biodegradation of microbial copolyesters: poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) and poly (3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate). *Macromolecules* 23, 26–31.
- FAO, 2000. *Aquaculture Production Statistics 1989–1998*. FAO Fisheries Circular, 815 (Rev. 12). FAO, Rome.
- Han, K., Geurden, I., Sorgeloos, P., 2000. Enrichment strategies for *Artemia* using emulsions providing different levels of n-3 highly unsaturated fatty acids. *Aquaculture* 183, 335–347.
- Harrison, K.E., 1990. The role of nutrition in maturation, reproduction and embryonic development of decapod crustaceans: a review. *Journal of Shellfish Research* 9, 1–28.
- Huys, L., Dhert, P., Robles, R., Ollevier, F., Sorgeloos, P., Swings, J., 2001. Search for beneficial bacterial strains for turbot (*Scophthalmus maximus* L.) larviculture. *Aquaculture* 193, 25–37.

- Jayaprakash, N.S., Rejish K.V.J., Philip, R., Bright S.I.S., 2006. *Vibrios* associated with *Macrobrachium rosenbergii* (De Man, 1879) larvae from three hatcheries on the Indian southwest coast. *Aquaculture Research* 37, 351–358.
- Jendrossek, D., Handrick, R., 2002. Microbial degradation of polyhydroxyalkanoates. *Annual Review of Microbiology* 56, 403–432.
- Karunasagar, I., Pai, R., Malathi, G.R., Karunasagar, I., 1994. Mass mortality of *Penaeus monodon* larvae due to antibiotic resistant *Vibrio harveyi* infection. *Aquaculture* 128, 203–209.
- Kennedy, B., Venugopal, M.N., Karunasagar, I., 2006. Bacterial flora associated with the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* in the hatchery system. *Aquaculture* 216, 1156–1167.
- Khanna, S., Srivastava, A.K., 2004. Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates. *Process Biochemistry* 40, 607–619.
- Kim, B.S., 2000. Production of poly (3-hydroxybutyrate) from inexpensive substrates. *Enzyme and Microbial Technology* 27, 774–777.
- Lightner, D.V., 1996. Disease of culture penaeid shrimp. In “Handbook of Mariculture: Crustacean Aquaculture” (J. P. McVey, Ed.), 2nd ed. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Maddox, M.B., Manzi, J.J., 1976. The effects of algal supplements on static system culture of *Macrobrachium rosenbergii* (de Man) larvae. *Proceedings of the World Mariculture Society* 7, 677–698.
- Middleditch, B.S., Missler, S.R., Hines, H.B., McVey, J.P., Brown, A., Ward, D.J., Lawrence, A.L., 1980. Metabolic profiles of *penaeid* shrimp: dietary lipids and ovarian maturation. *Journal of Chromatography* 195, 359–368.
- Nayak, S.K., Mukherjee, S.C., 1997. Microbial pathogens involved in the coastal shrimp, *Penaeus monodon* farming in Orissa. *Fish Chimes* 17, 37–39.
- New, M.B., 2003. Farming freshwater prawns: a manual for the culture of the giant river prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. FAO Fisheries Technical Paper No. 428, FAO, Rome, Italy, pp.145–146.
- Olsson, J.H., Allan, W., Conway, P.L., Kjelleberg, S., 1992. Intestinal colonization potential of Turbot (*Scophthalmus maximus*) and Dab (*Limanda limanda*)–associated bacteria with inhibitory effects against *Vibrio anguillarum*. *Applied Environmental Microbiology* 58, 551–556.
- Ostle, A.G., Holt, J.G., 1982. Nile Blue A as a fluorescent stain for poly- β -hydroxybutyrate. *Applied Environmental Microbiology* 44, 238–241.
- Otta, S.K., Karunasagar, I., Karunasagar, I., 2001. Bacteriological study of shrimp, *Penaeus monodon* Fabricius, hatcheries in India. *Journal of Applied Ichthyology* 17, 59–63.
- Phatarpekar, P.V., Kenkre, V.D., Sreepada, R.A., Desai, U.M., Achuthankutty, C.T., 2002. Bacterial flora associated with larval rearing of the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *Aquaculture* 203, 279–291.
- Querijero, B.V.L., Teshima, S., Koshio, S., Ishikawa, M., 1997. Utilization of monounsaturated fatty acid (18:1n-9) by freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* (de Man) juveniles. *Aquaculture Nutrition* 3, 127–139.

- Quinteros, R., Goodwin, S., Lenz, R.W., Park, W.H., 1999. Extracellular degradation of medium chain length poly (β -hydroxyalkanoates) by *Comamonas* sp. *International Journal of Biological Macromolecules* 25, 135–143.
- Romdhane, M.S., Devresse, B., Léger, Ph., Sorgeloos, P., 2005. Effects of feeding (ω -3) HUFA-enriched *Artemia* during a progressively increasing period on the larviculture of freshwater prawns. *Aquaculture International* 3, 236–242.
- Roustaian, P., Kamarudin, M.S., Omar, H., Saad, C.R., Ahmad, M.H., 1999. Changes in fatty acid profile during larval development of freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* (de Man). *Aquaculture Research* 30, 815–824.
- Schneider, S.M., Roskopf, E.N., Leesch, J.G., Chellemi, D.O., Bull, C.T., Mazzola, M., 2003. Research on alternatives to methyl bromide: pre-plant and post-harvest. *Pest Management Science* 59, 814–826.
- Sheen, S.S., D'Abramo, L.R., 1991. Response of juvenile freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*, to different feeding levels of a cod liver oil/corn oil mixture in a semi-purified diet. *Aquaculture* 93, 121–134.
- Skjermo, J., Vadstein, O., 1999. Techniques for microbial control in the intensive rearing of marine larvae. *Aquaculture* 177, 333–343.
- Sorgeloos, P., Léger, P., 1992. Improved larviculture outputs of marine fish, shrimp and prawn. *Journal of World Aquaculture Society* 23, 251–264.
- Sun, C.Q., O'connor, C.J., Turner, S.J., Lewis, G.D., Stanley, R.A., Robertson, A.M., 1998. The effect of pH on the inhibition of bacterial growth by physiological concentrations of butyric acid: Implications for neonates fed on suckled milk. *Chemical–Biological Interactions* 113, 117–131.
- Sung, H.H., Hwang, S.F., Tasi, F.M., 2000. Responses of Giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* to challenge by two strain of *Aeromonas* spp. *Journal of Invertebrate Pathology* 76, 278–284.
- Teo, J.W.P., Suwanto, A., Laa Poh, C., 2000. Novel β -macatmase genes from two environmental isolates of *Vibrio harveyi*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 44, 1309–1314.
- Teo, J.W.P., Tan, T.M.C., Laa Poh, C., 2002. Genetic determinants of tetracycline resistance in *Vibrio harveyi*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 46, 1038–1045.
- Teshima, S., 1972. Sterol metabolism. *Mem. Fac. Fish., Kagoshima University* 21, 69–147.
- Teshima, S., 1997. Phospholipids and sterols. In: D'Abramo, L.R., Conklin, D.E., Akiyama, D.M. (Eds.), *Crustacean Nutrition*. World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA pp. 85–107.
- Teshima, S., Ishikawa, M., Koshio, S., Kanazawa, A., 1997. Necessity of dietary cholesterol for the freshwater prawn. *Fisheries Sciences* 63, 596–599.
- Teshima, S., Kanazawa, A., 1983. Variation in lipid composition during the ovarian maturation of the prawn. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*. 49, 957–962.
- Teshima, S., Kanazawa, A., Hitotsumatsu, K., Kim, K.S., Oshida, K., Koshio, S., 1992. Tissue uptake and bioconversion of eicosapentaenoic acid and phosphatidylcholine in prawns, *Penaeus* and *Macrobrachium*. *Comparative Biochemistry Physiology* 102B, 885–890.
- Tidwell, J.H., Webster, C.D., Coyle, S.D., Daniels, W.H., D'Abramo, L.R., 1998. Fatty acid and amino acid composition of eggs, muscle and mid gut glands of freshwater prawns,

Macrobrachium rosenbergii (de Man), raised in fertilized ponds, unfertilized ponds or fed prepared diets. Aquaculture Research 29, 37–45.

Topping, D.L., Clifton, P.M., 2001. Short-chain fatty acids and human colonic function: roles of resistant starch and non starch polysaccharides. Physiological Reviews 8, 1031–1064.

Uno, Y., Kwon, C.S., 1969. Larval development of *Macrobrachium rosenbergii* (de Man) reared in the laboratory. Journal of the Tokyo University of Fisheries 55, 179–190.

Van Der Wielen, P., Biesterveld, S., Notermans, S., Hofstra, H., Urlings, B.A.P., Van Knapen, F., 2000. Role of volatile fatty acids in development of the cecal microflora in broiler chickens during growth. Applied and Environmental Microbiology 66, 2536–2540.

Van Immerseel, F., Boyen, F., Gantois, I., Timbermont, L., Bohez, L., Pasmans, F., Haesebrouck, F., Ducatelle, R., 2005. Supplementation of coated butyric acid in the feed reduces colonization and shedding of *Salmonella* in poultry. Poultry Science 84, 1851–1856.

Van Immerseel, F., De Buck, J., Pasmans, F., Velge, P., Bottreau, E., Fievez, V., Haesebrouck, F., Ducatelle, R., 2003. Invasion of *Salmonella enteritidis* in avian intestinal epithelial cells *in vitro* is influenced by short-chain fatty acids. International Journal of Food Microbiology 85, 237–248.

Waldroup, A., Kaniawati, S., Mauromoustakos, A., 1995. Performance characteristics and microbiological aspects of broilers fed diets supplemented with organic acids. Journal of Food Protection 58, 482–489.

Wolin, M.J., 1969. Volatile fatty acids and the inhibition of *Escherichia coli* growth by rumen fluid. Applied Microbiology 17, 83–87.

Yilmaz, M., Soran, H., Beyatli, Y., 2005. Determination of poly- β -hydroxybutyrate (PHB) production by some *Bacillus* spp. World Journal of Microbiology and Biotechnology 21, 565–566.

Yoshie, N., Fujiwara, M., Kasuya, K.I., Abe, H.Y., Doi, Y., Inoue, Y., 1999. Effect of monomer composition and composition distribution on enzymatic degradation of poly (β -hydroxybutyrate-co- β -hydroxyvalerate). Macromolecular Chemistry and Physics 200, 977–982.