

文章编号: 1674 - 5566(2011)03 - 0392 - 07

## 聚 $\beta$ -羟基丁酸酯对卤虫幼体的强化作用

孙慧贤, 隋丽英

(天津科技大学 海洋科学与工程学院, 天津市海洋资源与化学重点实验室, 天津 300457)

**摘要:** 通过投喂实验,探讨了不同浓度聚  $\beta$ -羟基丁酸酯 PHB(0,50,100,150,200,400 和 800 mg/L) 和不同强化培养时间(24 h,48 h 和 72 h) 对卤虫生长和存活的影响。实验采用超声波处理方法将不溶于水的 PHB 粉末分散成颗粒较小的均匀悬浮液(直径为 10 ~ 50  $\mu\text{m}$ ),并按上述浓度投喂初孵卤虫。卤虫无节幼体初始密度为 100 个/200 mL。结果表明,当 PHB 浓度为 100 mg/L 时,卤虫成活率显著高于其它组,且成活率随 PHB 浓度的增加而明显降低,24 h 卤虫成活率明显高于 48 h 和 72 h ( $P < 0.05$ ),同时 72 h 卤虫的体长也显著高于其它实验组( $P < 0.05$ )。定量测定结果表明,24 h 内卤虫体内 PHB 含量随强化时间的延长而增加,强化 24 h 卤虫体内 PHB 含量最高,达到卤虫干重的 10.73%。综上所述,我们提出利用卤虫生物包裹的方法将 PHB 应用于水产育苗,以 100 mg/L PHB 浓度强化卤虫幼体 24 h 效果最佳。

**研究亮点:**  $\beta$ -羟基丁酸酯(PHB)是具有广泛应用前景的可替代抗生素的生物控制剂,目前针对其在水产养殖中应用的研究在国际上尚处于起步阶段,国内尚属首次。本文研究了不同浓度 PHB 和不同强化培养时间对卤虫成活率和生长的影响,得出以 100 mg/L PHB 浓度强化卤虫幼体 24 h 效果最佳的结论。该结论对 PHB 在水产育苗中的应用研究具有很好的指导意义。在营养繁殖学研究方面,本文是国内较早关注生物饵料作为活性物质载体的作用,有一定的价值。

**关键词:** 卤虫;聚  $\beta$ -羟基丁酸酯;强化;生长;成活

**中图分类号:** S 963.1

**文献标志码:** A

抗生素在一定程度上可以预防和控制水产动物细菌病的流行,但不加选择地滥用抗生素不仅可使细菌产生多重抗药性,而且还会造成水产动物免疫机能下降、体内微生物菌群失调和药物残留等问题<sup>[1]</sup>。短链脂肪酸具有抑菌、降低动物肠道 pH 和促进营养物质吸收利用等广泛的生理功能,是一种具有应用前景的生物活性物质和饲料添加剂<sup>[2-3]</sup>。聚  $\beta$ -羟基丁酸酯(Poly- $\beta$ -hydroxybutyrate, PHB)是短链脂肪酸  $\beta$ -羟基丁酸的聚合体,为一定粒度的脂溶性颗粒(直径 0.2 ~ 0.5  $\mu\text{m}$ )。一些细菌在碳过量和氮缺乏等营养胁迫时,可大量积累 PHB 作为碳源和能量储备<sup>[4]</sup>。PHB 在动物肠道内可通过酶解和化学水解的方

式,降解为  $\beta$ -羟基丁酸单体<sup>[5]</sup>。PHB 的疏水特性可减少挥发性 SCFA 对水质的破坏作用,适于在水产育苗和养殖中的应用。研究表明,在养殖水体中加入 PHB 颗粒或者积累 PHB 的细菌,可完全保护感染发光弧菌(*Vibrio campbellii*)的卤虫<sup>[6-7]</sup>。最近发现饲料中添加 PHB 具有促进欧洲鲈鱼(*Dicentrarchus labrax*)生长的作用<sup>[8]</sup>。目前还没有将 PHB 应用于水产经济动物育苗的报道。本研究采用卤虫强化手段,探索 PHB 是否可以被包裹于卤虫消化道,以及 PHB 对卤虫无节幼体强化的最佳条件,以期 PHB 在水产育苗中的应用提供基础数据和方法借鉴。

收稿日期: 2010-09-15      修回日期: 2010-10-27

基金项目: 天津市应用基础及前沿技术研究计划项目(10JCYBJC08800);教育部回国留学人员启动科研基金(200908);天津科技大学人才引进科研启动基金(20080425)

作者简介: 孙慧贤(1983—),女,硕士,研究方向为水产动物营养学。E-mail: hxsunxj@163.com

通讯作者: 隋丽英, E-mail: suily@hotmail.com

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 试验设计

本研究分两个步骤进行。实验 1 中 PHB 浓度分别设定为 0, 50, 100, 200, 400 和 800 mg/L, 探索 PHB 强化卤虫的最佳浓度范围;在此基础上,实验 2 中 PHB 浓度分别设定为 50, 100, 150 和 200 mg/L, 试验 PHB 强化卤虫的最佳浓度。小球藻( $5 \times 10^6$  个/mL)投喂作为对照组。每组设置 3 个平行样。

PHB 悬浮母液的配制:称取一定量的 PHB 粉末(GoodFellow, UK)于 50 mL 塑料离心管中,加入 45 mL 海水(盐度为 30)。将离心管置于超声波处理器中处理 5 min,使其中的 PHB 分散均匀,颗粒直径为 10 ~ 50  $\mu\text{m}$ 。

### 1.2 卤虫幼体的孵化和 PHB 强化

试验用卤虫卵来源于我国新疆艾比湖。卤虫卵的孵化条件如下:海水(盐度为 30),pH 为 8 ~ 9,温度为 28  $^{\circ}\text{C}$ ,水表面光强为 2 000 lux,连续充气。孵化 24 h 后,分离并收集无节幼体。将 100 个初孵卤虫无节幼体转入装有 200 mL 海水的锥形玻璃管中,向其中加入不同剂量 PHB 悬浮母液,使锥形管中 PHB 达到试验设计浓度,连续培养 72 h。强化培养条件同卤虫卵孵化条件。试验期间每天换水 100%,pH 维持在 8.30 ~ 8.45,溶解氧(DO) > 6 mg/L。

### 1.3 卤虫成活率和体长的测定

每天换水的同时,分别记录 24 h, 48 h 和 72 h 各组卤虫的成活率。试验结束时(72 h),每组取 10 ~ 20 只卤虫,在立体解剖镜(Nikon SMZ645)下测定卤虫体长,并计算平均值。数据处理采用 CCD 图像采集系统和 Imganaly 计算机图像处理软件。

### 1.4 强化卤虫体内 PHB 积累的荧光显微观察

尼罗蓝 A 是一种碱性嗟类染料,溶于水和乙醇。经过尼罗蓝 A 染色的 PHB 颗粒在荧光显微镜下呈现亮橘黄色光斑,而细胞膜和其它脂类物质由于不能与染料有效结合,仅呈现较暗的红色<sup>[9]</sup>。本试验参照细菌中 PHB 颗粒的荧光染色法,经 PHB 强化培养 48 h 的卤虫经过 1% 尼罗蓝 A 染色 1 h,将卤虫取出固定,在 543 nm 波长的荧光激发下,在显微镜下(Nikon Eclipse Ti)观察强化卤虫体内的 PHB 积累情况。

### 1.5 强化卤虫体内 PHB 含量的测定

卤虫体内 PHB 含量参照细菌中 PHB 的紫外光谱测定方法<sup>[10-11]</sup>。PHB 在浓硫酸溶液中加热可以定量转化为巴豆酸,后者在 235 nm 处有一吸收峰值。该测定方法排除了其它脂类的干扰,与细胞内的总脂含量无关。

绘制 PHB 标准曲线:精确称取 0.010 0 g PHB 溶于适量的氯仿中(Mettler, AL204),60  $^{\circ}\text{C}$  水浴 1 h 后,100  $^{\circ}\text{C}$  下蒸去氯仿,加入 10 mL 浓硫酸配成 PHB 母液。分别精确移取 10, 20, 30, 40 和 50  $\mu\text{L}$  PHB 母液于比色管中,加入 10 mL 浓硫酸,使浓硫酸溶液中 PHB 含量分别为 1, 2, 3, 4 和 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。将比色管置于 100  $^{\circ}\text{C}$  水浴 10 min,冷却后,用紫外分光光度计(Pgeneral T6)于 235 nm 下测定吸光值,浓硫酸为空白对照。所得标准曲线如图 1 所示,回归方程为  $y = 0.128x + 0.019$  ( $R^2 = 0.984$ )。

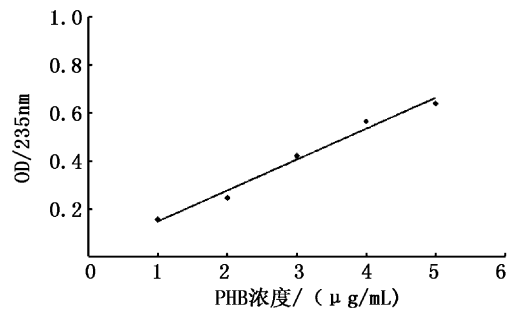


图 1 PHB 浓度标准曲线

Fig. 1 Standard curve of PHB concentration

卤虫卵孵化 24 h 后,收集卤虫无节幼体。将一定量的幼体迅速转入装有 1 000 mL 海水的锥形玻璃管中。幼体密度为 300 个/mL,以 100 mg/L PHB 浓度进行强化,强化条件同前。分别于 6 h, 12 h, 21 h 和 24 h 时取出 200 mL 强化培养液,终止强化。用 100 目筛绢收集卤虫,并用自来水反复冲洗,以去除卤虫体外附着的 PHB 颗粒,于 -18  $^{\circ}\text{C}$  冰箱中冷冻保存。未经 PHB 强化的卤虫(0 h)作为对照。待全部样品收集完成后,将样品于 60  $^{\circ}\text{C}$  烘箱中干燥 3 h,得到卤虫干品。

精确称取 0.010 0 g 卤虫干品于比色管中,向比色管中加入 5 mL 氯仿,60  $^{\circ}\text{C}$  下水浴抽提 1 h,在 100  $^{\circ}\text{C}$  下蒸去氯仿。再向比色管中加入 5 mL 氯仿,取 30  $\mu\text{L}$  PHB 氯仿溶液于干净比色管中,

蒸干氯仿后,加入 5 mL 浓硫酸,100 °C 水浴 10 min,冷却,于 235 nm 下测定吸光值,浓硫酸为空白对照。根据标准曲线,计算出卤虫中 PHB 的含量(占干重):

$$W = \frac{5 \times a \times 5 \times 10^3 \times 10^{-6}}{30 \times 0.0100 \text{ g}} \times 100\% \quad (1)$$

式中:  $W$  为卤虫中 PHB 的含量;  $a$  为标准曲线中查到的 PHB 浓度( $\mu\text{g/mL}$ )。

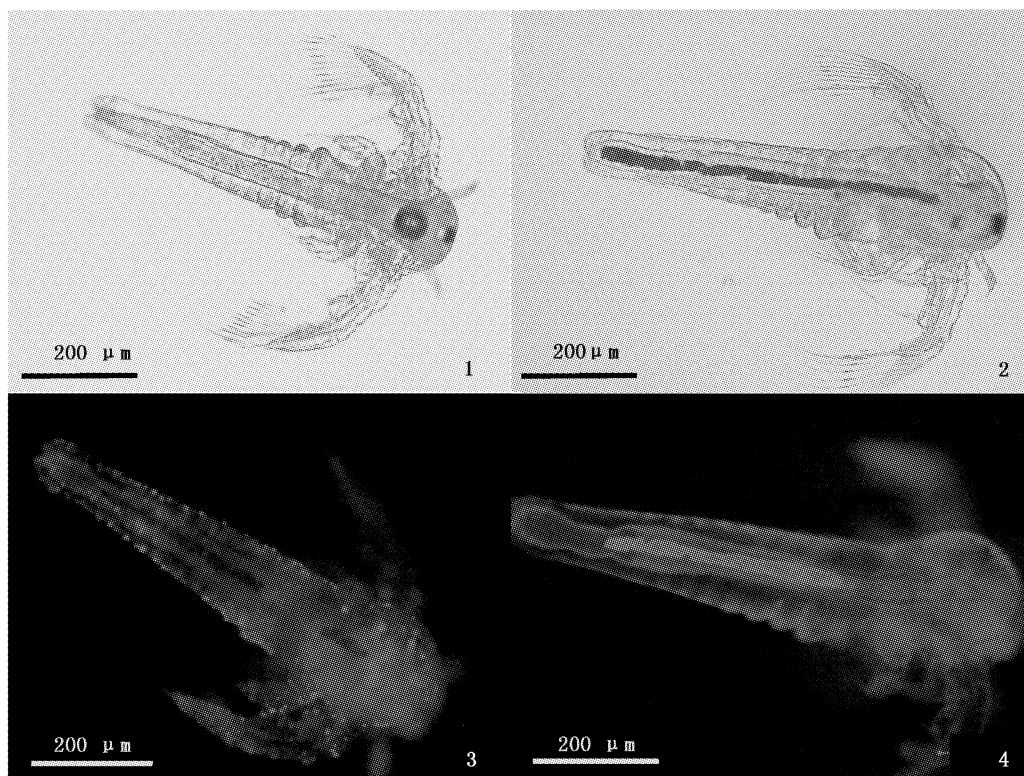
### 1.6 数据统计分析

采用 SPSS 17.0 软件对实验数据进行单因素方差分析(one-way ANOVA)。所有数据在进行显著性差异检验之前,用 Levene's 法检验均匀性,如果均匀性不好,则将数据转化成对数或平

方根后再进行分析。Tukey's multiple range test 用来检验显著性差异( $P < 0.05$ )。

## 2 结果

图版-1 和 2 表示,在可见光下,未经尼罗蓝 A 染色,饥饿 48 h 的卤虫幼体肠道透明,而 PHB 强化 48 h 的卤虫肠道饱满。由图版-3 和 4 可以看出,543 nm 波长绿色荧光激发下,经尼罗蓝 A 染色,48 h 饥饿卤虫的肠道呈暗黑色,而 PHB 强化 48 h 的卤虫肠道显示出亮橘黄色条带,说明卤虫能够对 PHB 进行有效的生物包裹。



图版 PHB 强化 48 h 卤虫和饥饿 48 h 卤虫的相差显微照片(1 和 2)和经过尼罗蓝 A 染色后的荧光显微照片(3 和 4)

Plate Light (1 and 2) and epifluorescence microscopy (3 and 4) images of Nile Blue A-stained *Artemia* after 48 h of starvation without (1 and 3) and with (2 and 4) PHB enrichment

实验 1 中分别以 0, 50, 100, 200, 400 和 800 mg/L PHB 浓度强化培养卤虫,探索 PHB 强化卤虫的最佳浓度范围,结果见图 2 和图 3。随着强化培养时间的延长,各组卤虫成活率明显下降,24 h, 48 h 和 72 h 成活率分别为 64% ~ 96%, 34% ~ 88% 和 10% ~ 66%。不同 PHB 浓度对卤

虫成活率影响显著,PHB 浓度为 100 mg/L 时,卤虫成活率最高(分别为 96%, 88% 和 66%),其它以 50, 200, 400 和 800 mg/L PHB 强化的卤虫成活率依次降低,而饥饿卤虫的成活率则介于 200 和 400 mg/L PHB 组之间( $P < 0.05$ )。强化培养 72 h 的卤虫体长范围为 909 ~ 1 117  $\mu\text{m}$ ,每组卤

虫体长与成活率呈现相同的变化趋势。当 PHB 浓度为 100 mg/L 时,卤虫体长为 1 117 μm,明显高于 200,400 和 800 mg/L PHB 强化培养的卤虫体长( $P < 0.05$ )。

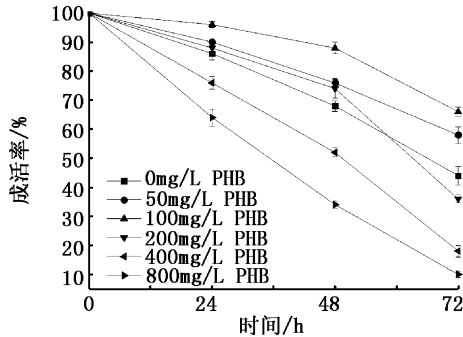


图 2 试验 1 中不同浓度 PHB 强化培养卤虫的成活率

Fig.2 Survival percentage of *Artemia* enriched with different concentrations of PHB in trial 1

的含量逐渐增多,强化 6 h,12 h,21 h 和 24 h 后,PHB 含量分别占卤虫干重的 3.56%,4.01%,8.40% 和 10.73%。

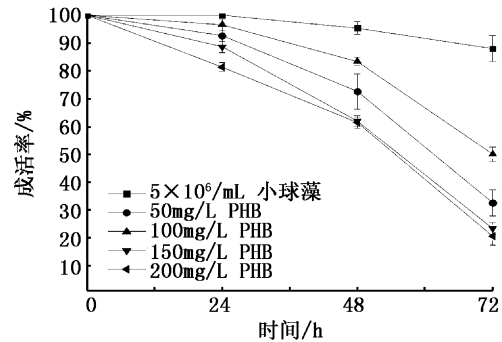


图 4 试验 2 中不同浓度 PHB 强化培养卤虫的成活率

Fig.4 Survival percentage of *Artemia* enriched with different concentrations of PHB in trial 2

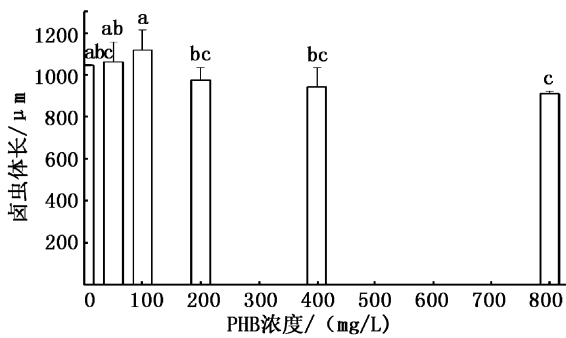


图 3 试验 1 中不同浓度 PHB 强化培养 72 h 的卤虫体长

Fig.3 Growth of *Artemia* enriched with different concentrations of PHB for 72 h in trial 1

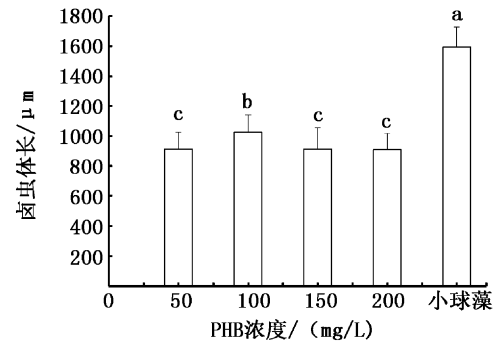


图 5 试验 2 中不同浓度 PHB 强化培养 72 h 的卤虫体长

Fig.5 Growth of *Artemia* enriched with different concentrations of PHB for 72 h in trial 2

在上述实验结果的基础上,试验 2 分别以 50,100,150 和 200 mg/L PHB 强化培养卤虫,并以投喂小球藻作对照组,试验最佳 PHB 强化浓度,结果见图 4 和图 5。除投喂小球藻卤虫的成活率和体长最高外(分别为 100%,95%,88% 和 1593 μm),在 PHB 强化培养组中,100 mg/L PHB 强化培养卤虫成活率和体长(分别为 97%,83%,50% 和 1025 μm)仍显著高于其它组( $P < 0.05$ ),其它以 50,150 和 200 mg/L PHB 强化培养的卤虫成活率和体长依次降低,得到与试验 1 一致的结论。

强化卤虫 PHB 含量的定量检测结果见图 6。在 24 h 内,随着强化时间的延长,卤虫体内 PHB

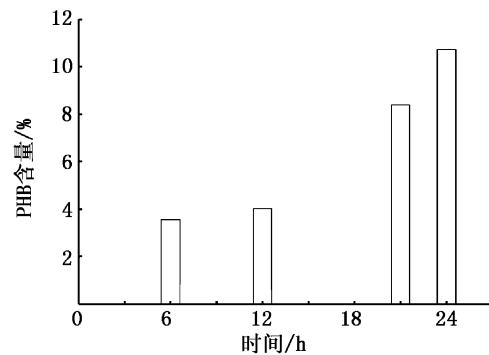


图 6 经过不同时间强化培养的卤虫体内 PHB 含量(占卤虫干重)

Fig.6 PHB content of *Artemia* at different enrichment time

### 3 讨论

卤虫强化是利用其非选择性滤食的特点,将一定大小的颗粒状物质包裹于卤虫消化道内,水产幼苗通过捕食卤虫而间接地将包裹物摄入体内,既达到输送营养物质的目的,又可避免这些物质直接加入水中所造成的浪费和水质污染<sup>[12]</sup>。卤虫的强化效果与强化剂浓度和颗粒大小,以及强化时间密切相关,本研究得出强化卤虫的最适 PHB 浓度和时间分别为 100 mg/L 和 24 h。DEFOIRDT 等<sup>[6]</sup>在研究 PHB 对感染发光弧菌(*V. campbellii*) 卤虫的保护作用时,使用 PHB 剂量为 1 g/L,是本研究最适剂量的 10 倍;而 HALET 等<sup>[7]</sup>应用积累 PHB 的脱氮细菌 *Brachymonas denitrificans* AS-P1 菌株(PHB 含量占细菌干重 32%)进行同样的试验,其 PHB 剂量相当于 10 mg/L,仅为本研究最适剂量的 1/10。造成这种差异的原因一方面可能与滤食性卤虫强化培养对颗粒的适口性要求有关,一般小于 50  $\mu\text{m}$  的颗粒物质才能被卤虫摄入<sup>[12]</sup>。我们在试验中发现,由于比重较轻,PHB 漂浮于水中且容易结块。尝试研磨 PHB 粉末和用高速搅拌机搅拌 PHB 悬浮液的方法消除结块现象,均未达到理想效果。本研究采用的超声波处理法可以很好地将 PHB 颗粒分散成均匀的、平均粒度 30  $\mu\text{m}$  (10 ~ 50  $\mu\text{m}$ ) 的悬浮液。而 DEFOIRDT 等<sup>[6]</sup>并没有对 PHB 悬浮液进行超声处理,HALET 等<sup>[7]</sup>使用的细菌颗粒则远小于 30  $\mu\text{m}$ 。另一方面,PHB 对于卤虫生长和抗病能力的促进作用主要表现为其在卤虫体内降解为水溶性  $\beta$ -羟基丁酸单体的程度<sup>[13]</sup>。脂溶性、非游离态的  $\beta$ -羟基丁酸可通过扩散和协助运输的方式穿过脂类物质含量较高的革兰氏阴性细菌( $G^-$ )的细胞膜,在偏碱性的细胞质中转变为游离状态并释放  $H^+$ , 较低的 pH 抑制了酶的活性,迫使微生物细胞利用能量来释放质子,从而抑制  $G^-$  的生长。同时  $\beta$ -羟基丁酸还可以通过增加肠系膜绒毛的大小和蛋白酶的活力,促进食物的消化和营养物质的吸收,提高食物蛋白质和矿物质的生物利用率,从而促进动物的生长<sup>[14]</sup>。

PHB 为含碳聚合物,本研究设置了饥饿卤虫为对照组,以探讨 PHB 能否为卤虫提供能量。实验中饥饿组成活率和体长显著低于 100 和 50

mg/L PHB 强化培养组,表明 PHB 可以为卤虫生长提供能量,这与 DEFOIRDT 等<sup>[6]</sup>和 WELTZIEN 等<sup>[15]</sup>研究结果一致。本研究同时设置了小球藻强化培养卤虫为另一对照组。小球藻强化培养的卤虫幼体的成活率和体长显著高于 PHB 强化组和饥饿组,这与小球藻丰富的蛋白质、脂类等营养组成有关<sup>[16]</sup>。小球藻细胞内含有大量蛋白质、脂肪和碳水化合物,以及各种维生素和矿物质元素,能够为卤虫提供各种营养物质。而 PHB 只能作为碳源和能源物质被利用,卤虫幼体在不均衡的营养条件下,存活和生长必然受到影响。

本研究中两次试验结果验证了 PHB 浓度高于 100 mg/L 时,不论是卤虫生长还是成活率都显著降低。我们推测这一方面是由于卤虫为鳃足纲甲壳动物,其躯干部长有许多游泳足,是主要运动器官,也有呼吸和将滤取食物送达口部的作用。PHB 浓度高于 100 mg/L 时,水的粘稠度增加,给游泳足的运动和呼吸造成一定的影响,导致活力较弱的卤虫死亡。另一方面,水中 PHB 浓度高于 100 mg/L,可能导致过多降解  $\beta$ -羟基丁酸,从而引起酮症酸中毒现象,导致卤虫死亡<sup>[15]</sup>。

综上所述,强化卤虫的最适 PHB 浓度和时间分别为 100 mg/L 和 24 h。较小的颗粒更有利于卤虫摄食,且更容易降解为水溶性  $\beta$ -羟基丁酸单体,从而被卤虫所利用。但 PHB 体内的吸收利用和代谢途径,以及过高 PHB 浓度对卤虫生长和成活所造成的负面影响,还有待进一步研究。

本文中卤虫体内 PHB 染色方法得到比利时根特大学(Gent University, Belgium) Peter De Schryver 博士的悉心指导;荧光显微照片由天津国际生物医药联合研究院舒特俊和王鹏博士协助拍摄;采用的卤虫卵由天津科技大学张波副教授提供,在此表示由衷地感谢。

### 参考文献:

- [1] SAPKOTA A, SAPKOTA A R, KUCHARSKI M, et al. Aquaculture practices and potential human health risks: Current knowledge and future priorities [J]. *Environment International*, 2008, 34(8): 1215 - 1226.
- [2] MATTHEW A G, FRANKLIN M A, UPCHURCH W G, et al. Effect of weaning on ideal short-chain fatty acid concentrations in pigs [J]. *Nutrition Research*, 1996, 16(10): 1689 - 1698.
- [3] ANTONGIOVANNI M, BUCCIONI A, PETACCHI F, et al. Butyric acid glycerides in the diet of broiler chickens: effects

- on gut histology and carcass composition [J]. *Italian Journal of Animal Science*, 2007, 6(1): 19–25.
- [4] MADISON L L, HUISMAN G W. Metabolic engineering of poly (3-hydroxyalkanoates): from DNA to plastic [J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 1999, 63(1): 21–53.
- [5] YU J, PLACHETT D, CHEN L X L. Kinetics and mechanism of the monomeric products from abiotic hydrolysis of poly [(R)-3-hydroxybutyrate] under acidic and alkaline conditions [J]. *Polymer Degradation and Stability*, 2005, 89(2): 289–299.
- [6] DEFOIRD T, HALET D, VERVAREREN H, et al. The bacterial storage compound poly- $\beta$ -hydroxybutyrate protects *Artemia franciscana* from pathogenic *Vibrio campbellii* [J]. *Environmental Microbiology*, 2007, 9(2): 445–452.
- [7] HALET D, DEFOIRD T, VAN DAMME P, et al. Poly- $\beta$ -hydroxybutyrate accumulating bacteria protect gnotobiotic *Artemia franciscana* from pathogenic *Vibrio campbellii* [J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2007, 60(3): 363–369.
- [8] SINHA A K. The effect of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate (PHB) on the growth performance of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) [D]. Ghent: Ghent University, 2008: 154.
- [9] OSTLE A G, HOLT J G. Nile blue A as a fluorescent stain for poly- $\beta$ -hydroxybutyrate [J]. *Applied Environmental Microbiology*, 1982, 44(1): 238–241.
- [10] 陈玲, 李礼尧, 王武. 聚 $\beta$ -羟丁酸酯紫外检测方法的改进 [J]. *无锡轻工大学学报*, 1997, 16(2): 27–31.
- [11] KAYNAR P, BEYATLI Y. Determination of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate production by *Bacillus* spp. isolated from the intestines of various fishes [J]. *Fish Science*, 2009, 75(2): 439–443.
- [12] SORGELOOS P, LAVENS P, LEGER P, et al. Manual for the culture and use of brine shrimp *Artemia* in aquaculture [M]. Rome: FAO Fisheries Technical Paper, 1986.
- [13] DEFOIRD T, HALET D, SORGELOOS P, et al. Short-chain fatty acids protect gnotobiotic *Artemia franciscana* from pathogenic *Vibrio campbellii* [J]. *Aquaculture*, 2006, 261(2): 804–808.
- [14] PARTANEN K H, MROZ Z. Organic acids for performance enhancement in pig diets [J]. *Nutrition Research Reviews*, 1999, 12(1): 117–145.
- [15] WELTZIEN F A, HEMRE G I, EVJEMO J O, et al.  $\beta$ -hydroxybutyrate in developing nauplii of brine shrimp (*Artemia franciscana*) under feeding and non-feeding conditions [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology B*, 2000, 125(1): 63–69.
- [16] NORTHCOTE D H, GOULDING K J. The chemical composition and structure of the cell wall of *Chlorella pyrenoidosa* [J]. *Biochemistry Journal*, 1958, 70(3): 391–397.

## *Artemia* nauplii enrichment with poly- $\beta$ -hydroxybutyrate

SUN Hui-xian, SUI Li-ying

(Tianjin Key Laboratory of Marine Resources and Chemistry, College of Marine Science and Engineering, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China)

**Abstract:** Effect of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate (PHB) on survival and growth of *Artemia* was investigated. Various levels of PHB concentration (0, 50, 100, 150, 200, 400 and 800 mg/L, respectively) and different enrichment periods (24 h, 48 h and 72 h, respectively) were applied during *Artemia* enrichment in two separate trials. PHB suspension was prepared with ultrasonicator to make the particle size smaller (ranging from 10 to 50  $\mu\text{m}$ ) and fed to the newly-hatched *Artemia* nauplii according to the designed concentration. The initial density of *Artemia* nauplii was 100 ind/200 mL. The results showed that survival of *Artemia* enriched with 100 mg/L PHB for 24 h was significantly higher than that of other treatments, which was reduced remarkably when *Artemia* were enriched with other PHB concentrations and longer periods (48 h and 72 h) ( $P < 0.05$ ). And the 72 h-growth of *Artemia* enriched with 100 mg/L PHB was also significantly higher than that of other groups ( $P < 0.05$ ). The result of quantitative determination indicated that, within 24 h enrichment, PHB content in *Artemia* increased along with enrichment time and reached the highest at 24 h, accounting for 10.73% of *Artemia* dry weight. In conclusion, we proposed that PHB can be applied efficiently in larviculture through *Artemia* enrichment at a level of 100 mg/L PHB for 24 h.

**Key words:** *Artemia*; poly- $\beta$ -hydroxybutyrate (PHB); enrichment; growth; survival