AGU International Journal of Sciences – 2022, Vol. 30 (1), 62 – 70

Tạp chí Khoa học Quốc tế AGU

ISSN 0866 - 8086

NGHIÊN CỨU KHẢ NĂNG SỬ DỤNG THẢO DƯỢC ĐỂ PHÒNG TRỊ BỆNH GAN TỤY CẤP TRÊN TÔM THẺ CHÂN TRẮNG (*Litopenaeus vannamei* boone, 1931)

Tạ Văn Phương[1]

[1]*Trường Đại học Tây Đô*

Thông tin chung:
Ngày nhận bài: 15/07/2020
Ngày nhận kết quả bình duyệt: 25/02/2021
Ngày chấp nhận đăng: 03/2022

Title:
Study on application herbs to prevention and treatment acute hepatopancreas disease in white leg shrimp (Litopenaeus vannamei boone, 1931)

Keywords:
Vibrio parahaemolyticus, acute hepatopancreas, whiteleg shrimp; herbals

Từ khóa:
Vibrio parahaemolyticus,gan tụy cấp, tôm thẻ chân trắng, dịch chiết thảo dược

ABSTRACT

This paper investigate some herbs to find out herbal extracts that can be applied to prevent and treat acute hepatopancreatic disease in white leg shrimp caused by Vibrio parahaemolyticus. Research contents include: (1) To select herbs against Vibrio parahaemolyticus from Plumbago zeylanica; Muntingia calabura; Areca catechu; Physalis angulata; Psidium guajava; Raphanus sativus; Allium cepa; Allium ascalonicum; Allium sativum and; (2) To evaluate abilities to prevent acute hepatopancreatic necrosis disease in white leg shrimp with: (i) control treatment (negative); (ii) control treatment (positive); (iii) the feeding mixed herbal treatment; (iv) pathogenic shrimp before treating; (v)treating with herbs before releasing pathogenic shrimp. Results found that antimicrobial Vibrio parahaemolyticus is highest in extract Allium sativum with antimicrobial circle 24,3mm and the highest effectiveness and survival rate of shrimp was at 93.3% when mixing Allium sativum to feeding.

TÓM TẮT

Khảo sát một số loại thảo dược nhằm tìm ra dịch chiết thảo dược có thể ứng dụng phòng trị bệnh gan tụy cấp trên tôm thẻ chân trắng do Vibrio parahaemolyticus gây ra. Nội dung nghiên cứu gồm: (1) Lựa chọn dịch chiết thảo dược kháng Vibrio parahaemolyticus từ lá bạch hoa xà, lá cây trứng cá, ruột trái cau, cây thù lù, lá ổi, củ cải trắng, củ hành tây, củ hành tím và củ tỏi. (2) Đánh giá khả năng phòng trị bệnh gan tụy cấp: (i) tôm không gây cảm nhiễm; (ii) tôm gây cảm nhiễm; (iii) thức ăn có trộn dịch chiết thảo dược; (iv) tôm gây cảm nhiễm và dịch chiết thảo dược tạt vào bể sau; (v) tạt dịch chiết thảo dược trước khi gây cảm nhiễm. Kết quả nghiên cứu lựa chọn được dịch chiết tỏi có khả năng kháng kháng vi khuẩn Vibrio parahaemolyticus mạnh nhất với vòng kháng khuẩn 24,3 mm và phương thức trộn dịch chiết tỏi vào thức ăn cho kết quả tốt nhất với tỉ lệ tôm sống là 93,3%.

1. GIỚI THIỆU

Tôm thẻ chân trắng là đối tượng có giá trị kinh tế cao, thị trường tiêu thụ rộng, thời gian nuôi ngắn, năng suất cao nuôi tôm thâm canh có thể đạt đến 20 tấn/ha. Nhờ có giá trị dinh dưỡng cao mà hiện nay tôm thẻ chân trắng đang được người tiêu dùng ưa chuộng. Diện tích nuôi tôm thẻ chân trắng 10 tháng đầu năm 2019 là 105.000 ha và sản lượng thu hoạch tôm thẻ chân trắng là 434.848 tấn (Tổng cục Thủy sản, 2019). Nghề nuôi tôm thẻ chân trắng phát triển nhanh trong khi nguồn vốn và kỹ thuật nuôi còn hạn chế, dẫn đến sự ô nhiễm về môi trường nuôi, tạo điều kiện cho sự phát triển và lây lan của dịch bệnh. Theo Cục Thú y (2014) dịch bệnh gan tụy cấp tác nhân chính là do vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus*, với sự hiểu biết của người nuôi còn hạn chế và sử dụng thuốc kháng sinh không đúng đã tạo ra các chủng vi khuẩn có khả năng kháng thuốc và làm giảm hiệu quả điều trị bệnh.

Việc nghiên cứu các thảo dược chứa hoạt sinh học kháng khuẩn có thể sử dụng trong phòng trị bệnh, thân thiện với môi trường và đảm bảo an toàn thực phẩm (Cos và cs., 2006). Theo Venketramalingam và cs. (2007) các loại thảo dược giống như chất bổ sung hương liệu kích thích sự thèm ăn, giúp tôm tăng trưởng nhanh. Bùi Quang Tề và cs. (2006) đã nghiên cứu thành công hai loại chế phẩm thảo dược VTS1-C, VTS1-T phối chế từ dịch chiết tỏi và sài đất để phòng bệnh trên tôm cá. Nguyễn Ngọc Phước và cs. (2007) đã thử nghiệm thành công khả năng kháng nấm trên tôm từ dịch chiết lá trầu. Qua các nghiên cứu trên cho thấy các dịch chiết từ thảo dược có khả năng tiêu diệt các loại nấm và vi khuẩn gây bệnh trên tôm nước lợ, mặn. Từ cơ sở đó đề tài: "**Nghiên cứu khả năng sử dụng thảo dược để phòng trị bệnh gan tụy cấp trên tôm thẻ chân trắng (*Litopenaeus vannamei* Boone, 1931)**" được thực hiện.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Vật liệu nghiên cứu

(1) Nguồn vi khuẩn: *Vibrio parahaemolyticus* được cung cấp bởi phòng thí nghiệm Thủy sản thuộc tập đoàn Việt Úc – Bạc Liêu; (2) Chín loại thảo dược được khảo khảo sát (Bảng 1) và (3) Tôm thẻ chân trắng kích cỡ 1,5 ± 0,23g/con; (4) Thức ăn: thức ăn viên dành cho tôm thẻ với độ đạm 40%, độ ẩm 11%, tro tối đa 14%, lipid tổng trong khoảng 6-8%.

2.2 Một số loại thảo dược được khảo sát dịch chiết xuất trong nghiên cứu

Hình 1. Dạng dịch chiết (1) và một số loại thảo dược (2-bạch hoa xà; 3-lá trứng là; 4-ruột trái cau; 5-thù lù; 6-lá ổi; 7-củ cải trắng; 8-củ hành tây; 9- củ tỏi) được khảo sát tính kháng khuẩn *Vibrio parahaemolyticus*

Các thảo dược chọn để khảo sát: thu hái vào buổi sáng (8-10 giờ), chuyển ngay đến phòng thí nghiệm trong ngày, được rửa sạch (Nguyễn Thị Vân Thái, 2004). Thảo dược được rửa sạch, để ráo tự nhiên, thái nhỏ, xay nhuyễn với các tỷ lệ nước cất là 1:1 (1g thảo dược : 1mL nước cất) và được đun ở 105 ºC trong 3 giờ, sau đó được vắt lọc qua vải mịn lấy dịch chiết.

2.3 Khảo sát và lựa chọn thảo dược có tính kháng Vibrio parahaemolyticus

Dùng pipet lấy 100µl mẫu vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* với mật độ 10^6 CFU/mL trải đều trên môi trường NA^+, sau khi đã trải vi khuẩn trên đĩa, tiến hành tạo giếng bằng đầu tip với đường kính giếng 8mm. Lấy 50µl dịch chiết thảo dược cho vào giếng và đánh dấu ghi tên thảo dược. Mỗi đĩa petri tạo 3-5 giếng, mỗi dược liệu thực hiện lặp lại 3 đĩa và cho vào tủ ấm 37 ^oC. Sau khi ủ ấm 24 giờ tiến hành đo vòng kháng khuẩn để chọn ra dịch chiết có vòng kháng khuẩn mạnh nhất để thực hiện thí nghiệm trực tiếp trên tôm thẻ chân trắng.

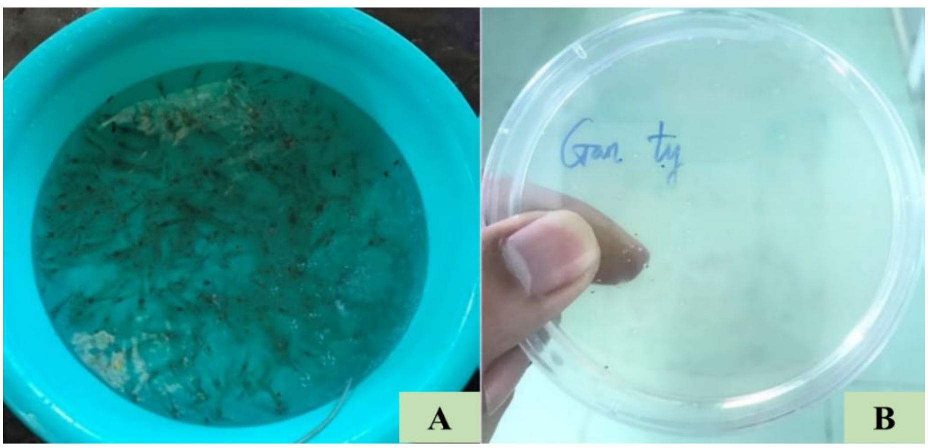
Bảng 1. Các loại thảo dược, tỷ lệ dịch chiết và mật độ *Vibrio parahaemolyticus*

Dịch chiết thảo dược	Tỷ lệ dịch chiết Thảo dược : Nước	Mật độ vi khuẩn (CFU/mL)
1. Lá bạch hoa xà (*Plumbago zeylanica*)	1:1	10^6
2. Lá cây trứng cá (*Muntingia calabura*)	1:1	10^6
3. Ruột trái cau (*Areca catechu*)	1:1	10^6
4. Cây thù lù (*Physalis angulata*)	1:1	10^6
5. Lá ổi (*Psidium guajava*)	1:1	10^6
6. Củ cải trắng (*Raphanus sativus*)	1:1	10^6
7. Củ hành tây (*Allium cepa*)	1:1	10^6
8. Củ hành tím (*Allium ascalonicum*)	1:1	10^6
9. Củ tỏi (*Allium sativum*)	1:1	10^6

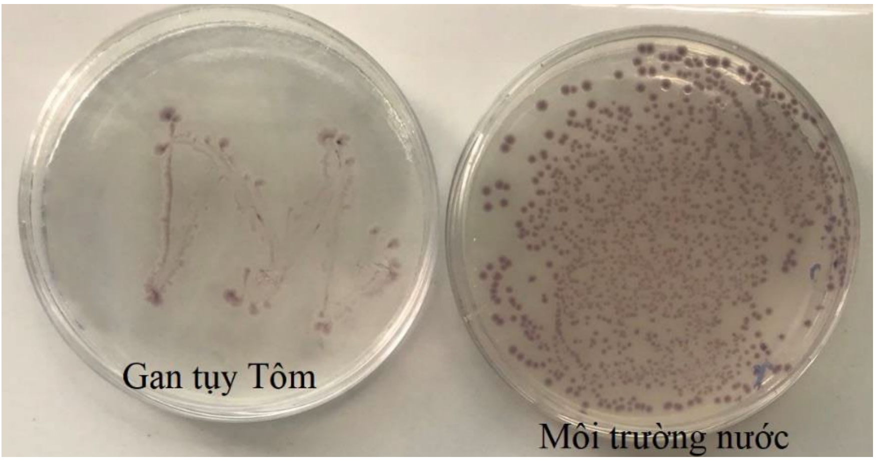
2.4 Đánh giá khả năng phòng trị bệnh gan tụy cấp bằng dịch chiết được chọn trong tôm thẻ chân trắng

2.4.1 Chuẩn bị tôm bố trí thí nghiệm

Tôm được chọn gây cảm nhiễm là tôm khỏe mạnh, màu sắc sáng, phản ứng nhanh, gan tụy khỏe, ruột đầy. Tôm được tắm nước ngọt 30 phút, giúp tôm thải loại vi khuẩn và thức ăn, tôm giống được xét nghiệm PCR và cấy vi khuẩn trên CHROM_agar, nhằm đảm bảo tôm mang cảm nhiễm không mang mầm bệnh gan tụy cấp.



Hình 2. Tôm giống được tắm trong nước ngọt (A) và kết quả kiểm tra gan tụy (B) trước khi gây cảm nhiễm



Hình 3. Gan tụy tôm (trái) và môi trường nước (phải) sau khi được gây cảm nhiễm với vi khuẩn Vibrio parahaemolyticus

2.4.2 Bố trí thí nghiệm

Thí nghiệm gồm 5 nghiệm thức, lặp lại 3 lần, được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên trong 15 bể 20 lít cho đến khi tôm trong nghiệm thức ĐC (+) chết 100% thì dừng lại. Thí nghiệm được tiến hành sau khi nuôi tôm trong bể 2 ngày nhằm giúp cho tôm thích nghi với môi trường trong bể. Tôm được gây cảm nhiễm bằng cách cho tạt trực tiếp vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* với mật độ vi khuẩn đạt là 10^6 CFU/mL nước trong bể.

Bảng 1. Phương thức bổ sung dịch chiết Tỏi trong phòng trị *Vibrio parahaemoltyticus*

Nghiệm thức	Ký hiệu	Mật độ tôm (con)	Vi khuẩn (CFU/mL)	Lượng dịch chiết (mL)
Đối chứng âm	ĐC (-)	10	-	-
Đối chứng dương	ĐC (+)	10	10^6	-
Trộn dịch chiết tỏi vào thức ăn	NT_TA	10	10^6	27
Dịch chiết tỏi tạt sau khi bổ sung vi khuẩn	NT_TS	10	10^6	27
Dịch chiết tỏi tạt trước khi bổ sung vi khuẩn	NT_TT	10	10^6	27

ĐC (-): không bổ sung vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus*; ĐC (+): có bổ sung vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus*

Hình 4. Hệ thống bể bố trí thí nghiệm

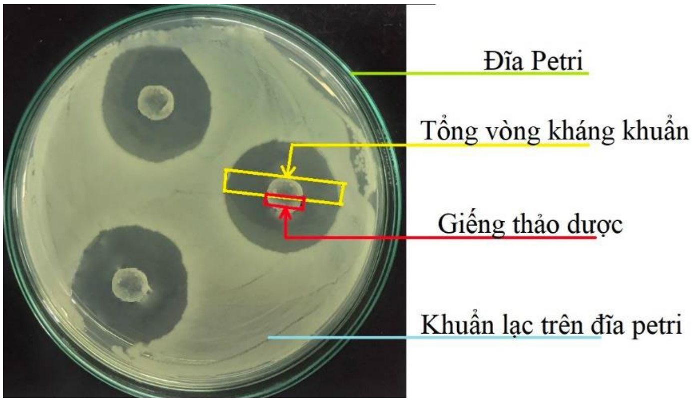
Phương thức gây nhiễm: Nghiệm thức 1 gây cảm nhiễm cho tôm bằng cách bổ sung trực tiếp vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* vào bể, sau 6 giờ cho tôm ăn bằng thức ăn có trộn thảo dược; Nghiệm thức 2 gây cảm nhiễm cho tôm bằng cách bổ sung trực tiếp vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* vào bể, sau 6 giờ tạt thảo dược vào bể; Nghiệm thức 3 cho trực tiếp thảo dược vào bể trước, sau 6 giờ bổ sung vi khuẩn Vibrio parahaemolyticus vào gây cảm nhiễm; Nghiệm thức đối chứng (+) bổ sung vi khuẩn vào nhưng không tạt thảo dược; Nghiệm thức đối chứng (-) không bổ sung vi khuẩn và thảo dược.

2.4.3 Chăm sóc và quản lý

Tôm được cho ăn 5% trọng lượng thân, ngày 4 lần trong ngày vào lúc: 7h, 11h, 15h, 19h và được sục khí liên tục. Quan sát khả năng bắt mồi, biểu hiện của tôm mỗi ngày sau khi gây cảm nhiễm, các biểu hiện của bệnh tôm như: tôm bỏ ăn, màu sắc cơ thể, gan tụy và ruột.

2.5 Phương pháp đo đường kính vòng kháng khuẩn (X)

Khả năng kháng khuẩn *Vibrio parahaemolyticus*của dịch chiết thảo dược được thể hiện qua vòng kháng khuẩn. Sau khi xác định được vòng kháng khuẩn bằng thước nhựa 20 cm theo phương của Jan Hudzicki, (2009). Nếu đường kính vòng kháng đạt từ mức trung bình (5-10 mm) trở lên thì được xem là có khả năng ức chế được vi khuẩn (Schillinger và Lucke, 1989).



X=0: Không kháng;

X<5: Kháng yếu

5<X<10: Kháng trung bình;

X>=10: Kháng mạnh;

$$\mathbf{X\ (mm) = d1 - d2}$$

d1: Tổng vòng kháng khuẩn

d2: Giếng thảo dược

Hình 5. Cách xác định vòng kháng khuẩn

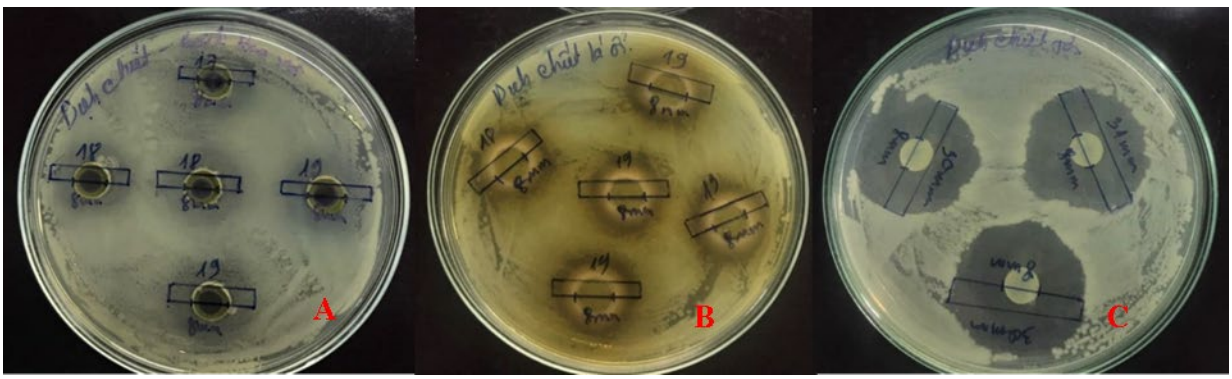
2.6 Phương pháp xử lý số liệu

Số liệu thu được xử lý bằng phần mềm Microsoft Excel 2013 và xử lý thống kê Anova một nhân tố bằng phần mềm SPSS 22.0 với phép thử DUNCAN.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

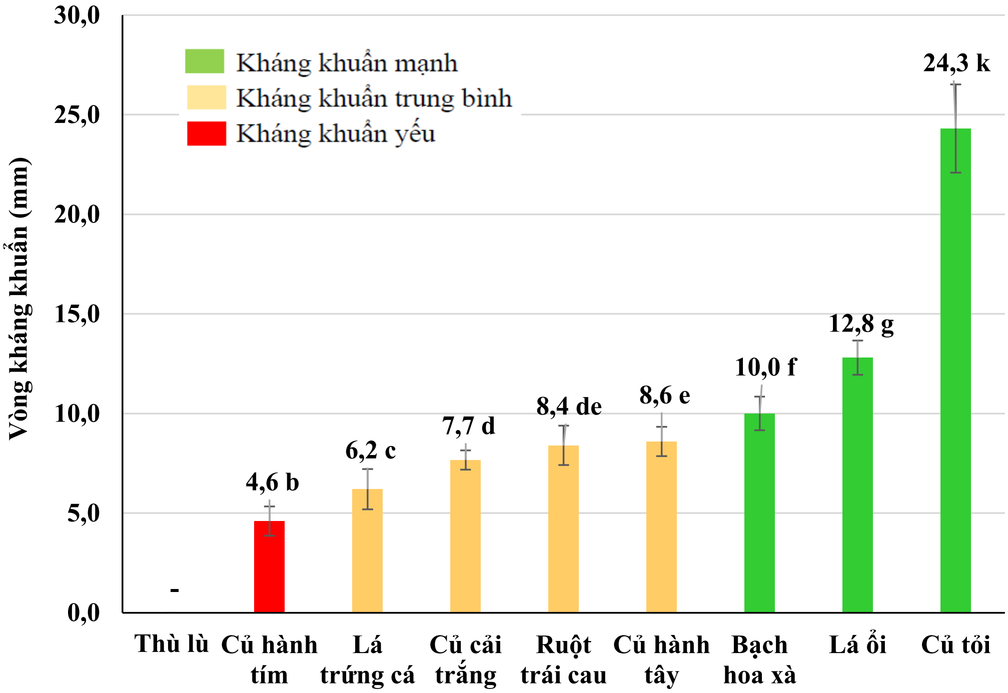
3.1 Khả năng kháng vi khuẩn Vibrio paraheamolyticus của các loại thảo dược

Vòng kháng khuẩn *Vibrio paraheamolyticus*của các dược liệu đo được thể hiện qua Hình 6 có thể thấy được dịch chiết tỏi (24,3±2,21 mm), lá ổi (12,8±0,86 mm) và bạch hoa xà (10,0±0,05 mm) là ba dịch chiết có vòng kháng khuẩn mạnh (X≥10 mm). Dịch chiết lá trứng cá, củ cải trắng, ruột quả cau, củ hành tây là những dịch chiết có vòng kháng khuẩn trung bình (5<X<10 mm), hành tím là dịch chiết có vòng kháng khuẩn kém (X<5 mm) và dịch chiết cây thù lù không cho vòng kháng (X=0 mm).



Hình 6. Vòng kháng vi khuẩn của dịch chiết thảo dược bạch hoa xà (A), lá ổi (B) và củ tỏi (C)

Kết quả từ Hình 7 cho thấy dịch chiết củ tỏi có vòng kháng khuẩn 24,3±2,21 mm lớn nhất (p<0,05) so với tất cả các thảo dược còn lại. Khi so sánh vòng kháng khuẩn so sánh với kết quả nghiên cứu của Đặng Thị Lụa và cs.(2016) nghiên cứu dịch chiết hạt sim (*Rhodomyrtus tomentosa*) cho đường kính vòng kháng khuẩn đạt 17,7-18,0 mm. Nguyễn Thế Vương, (2009) dịch chiết tỏi nguyên chất cho vòng kháng khuẩn khác nhau theo từng loài vi khuẩn, đối với vi khuẩn *Vibrio alginolyticus* là 20,4 mm còn đối với vi khuẩn *Vibrio hervey* là 22,1 mm. Từ kết quả trên cho ta thấy tỏi có mức kháng khuẩn mạnh (Schillinger và Lucke, 1989).



Hình 7. Vòng kháng vi khuẩn Vibrio parahaemolitycus với một số loại thảo dược

Dịch chiết củ tỏi có vòng kháng khuẩn lớn hơn so với dịch chiết bạch hoa xà và lá ổi lần lượt là 2,48 lần và 2 lần tương ứng, nên dịch chiết củ tỏi được lựa chọn cho bố trí thí nghiệm phòng trị bệnh gan tụy cấp.

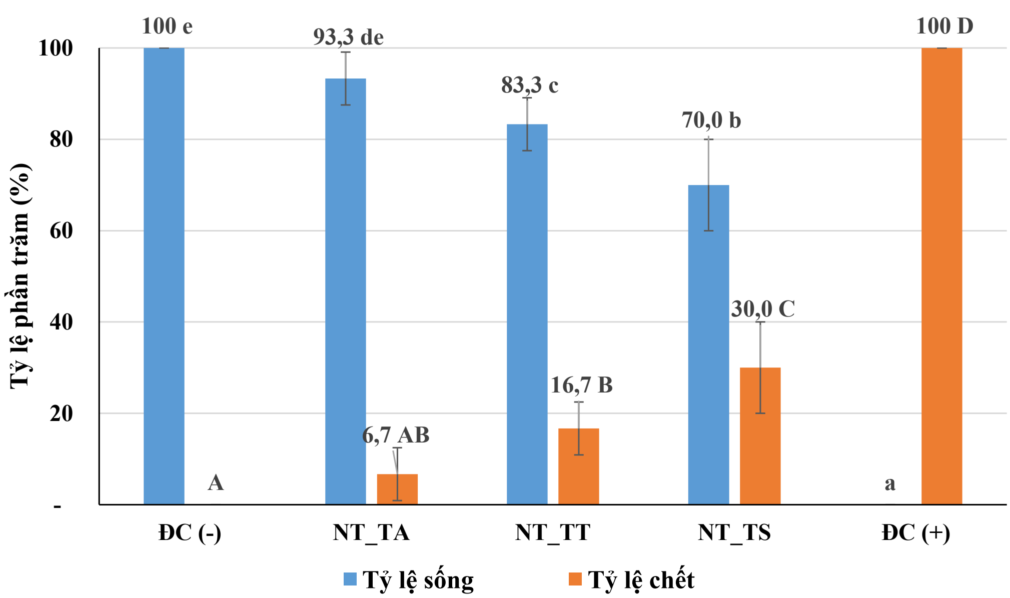
3.2 Đánh giá khả năng kháng bệnh hoại tử gan tụy cấp trên tôm thẻ chân trắng do vi khuẩn Vibrio parahaemolyticus gây ra bằng dịch chiết củ tỏi

Kết quả ghi nhận biểu hiện bệnh lý của các nghiệm thức cho thấy tôm ở nghiệm thức ĐC (-) có màu sắc sáng, di chuyển, bắt mồi nhanh nhẹn, đường ruột đầy, gan tụy màu đậm. Các nghiệm thức gây cảm nhiễm, tômcó màu sắc cơ thể nhợt nhạt, đường ruột bị đứt khúc hoặc không có thức ăn, phản ứng chậm, bơi lờ đờ hoặc ít bơi, mềm vỏ, phần đầu phình to, gan tụy bị lỏng, chảy nước không còn thành khối và một vài cá thể có biểu hiện đục thân (Hình 8).

Theo Nguyễn Trọng Nghĩa (2015), gây cảm nhiễm trên tôm thẻ chân trắng với vi khuẩn *Vibrio parahaemolitycus* bằng cách tiêm vi khuẩn có mật độ 10^4, 10^5 và 10^6 CFU/con, kết quả tôm bị gan tụy sau 9 ngày và 6 ngày tương ứng với mật độ vi khuẩn 10^5 CFU/con và 10^6 CFU/con. Suto-Rodriguez và cs. (2015) được trích dẫn bởi Hoàng Tùng và cs.(2017) với thí nghiệm đánh giá khả năng kháng bệnh hoại tử gan tụy cấp do *Vibrio parahaemolyticus* trên tôm thẻ chân trắng xuất hiện chỉ trong 24 giờ và tỷ lệ chết lên đến 100% chỉ sau vài ngày.

Hình 8. Biểu hiện bệnh lý ngoài của tôm ở các nghiệm thức khác nhau

Từ hình 9 bên dưới cho thấy nghiệm thức (NT_TA) trộn dịch chiết tỏi vào thức ăn, tôm có tỷ lệ sống 93,3% không có sự khác biệt (p>0,05) so với nghiệm thức ĐC (-) tỉ lệ sống 100%, nhưng có sự khác biệt mang ý nghĩa thống kê (p<0,05) so với nghiệm thức bổ sung dịch chiết tỏi sau khi gây nhiễm (NT_TS) có tỷ lệ sống là 70% và nghiệm thức bổ sung dịch chiết tỏi trước khi gây nhiễm (NT_TT) là 83,3%. Nghiệm thức NT_TA có tỉ lệ sống cao hơn 23,2% so với nghiệm thức NT_TT và cao hơn 10% so với nghiệm thức NT_TS.



Hình 9. Tỷ lệ sống và tỷ lệ chết của tôm ở các nghiệm thức khác nhau

Kết quả thí nghiệm cho thấy tỷ lệ tôm chết ở nghiệm thức ĐC (+) là 100%, trong khi đó nghiệm thức gây nhiễm trước mới bổ sung dịch chiết tỏi (NT_TS) tôm nuôi cho tỷ lệ chết 30%, đây là nghiệm thức cho tỷ lệ tôm chết cao nhất có ý nghĩa thống kê (p<0,05) so với nghiệm thức NT_TA và nghiệm thức NT_TT.

4. KẾT LUẬN

Kết quả khảo sát khả năng kháng vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* của 9 loại dịch chiết thảo dược cho thấy, dịch chiết tỏi có khả năng kháng vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* gây bệnh gan tụy cấp mạnh nhất với vòng kháng khuẩn đạt 24,3 mm.

Trong phạm vi nghiên cứu này, phương thức trộn dịch chiết tỏi vào thức ăn cho hiệu quả kháng bệnh hoại tử gan tụy cấp ở tôm thẻ chân trắng cao nhất, với tỷ lệ sống của tôm đạt được sau thí nghiệm là 93,3%.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Bùi Quang Tề., & Lê Xuân Thành. (2006). Kết quả nghiên cứu chế phẩm (VTS1-C), (VTS1-T), tách chiết từ thảo dược phòng trị bệnh cho tôm sú và cá tra.

Cos P., Vlietinck A.J., Berghe D.V. &Maes L. (2006).Anti-infective potential of natural products: How to develop a stronger in vitro 'proof of concept'. *J. Ethnopharmacol, 106(3)*, 290 - 302.

Cục Thú y. (2014). Tổng kết nuôi tôm nước lợ năm 2014 và xây dựng kế hoạch năm 2015. Bến Tre.

Đặng Thị Lụa., Nguyễn Viết Khuê., &Phan Thị Vân. (2016). *Vibrio parahaemolyticus* gây bệnh hoại tử gan tụy cấp (AHPND) trên tôm nuôi. *Tạp chí Khoa học Nông nghiệp Việt Nam, 5*, 690-698

Hoàng Tùng., Trịnh Thị Trúc Ly., Nguyễn Giảng Thu Lan.& Nguyễn Hồng Phước. (2017). Khả năng kháng vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* gây bệnh hoại tử gan tụy cấp tính của tôm He Ấn Độ (Penaeus indicus). *Tạp chí Khoa học – Công nghệ Thủy sản, 4, 72-79.*

Hudzicki, J. (2009). Kirby-Bauer Disk Diffusion Susceptibility Test Protocol. American Society for Microbiology.

Marlina, E., Radu, S., Kqueen, C.Y., Napis, S., Zakaria, Z., Mutalib, S. A., &Nishibuchi, M. (2007). Detection of tdh and trh genes in *Vibrio parahaemolyticus* isolated from Corbicula moltkiana prime in West Sumatera, Indonesia. *Southeast Asian J Trop Med Public Health, 38(2)*, 349-355.

Nguyễn Ngọc Phước., Nguyễn Anh Tuấn., Nguyễn Quang Linh., Ngô Thị Hương Giang. &Nguyễn Nam Quang. (2007). *Sử dụng thảo dược và chế phẩm từ thảo dược trong điều trị bệnh vi khuẩn cho động vật thủy sản*. Bài viết được đăng trong Kỷ yếu Khoa học Công nghệ. Liên hiệp khoa học Kỹ thuật Việt Nam.

Nguyễn Thế Vương. (2009). Xác định tác nhân gây bệnh và nghiên cứu thử nghiệm một số loài thảo dược trong phòng trị bệnh vi khuẩn trên tôm thẻ chân trắng (*Penaeus vannamei*). (Luận văn tốt nghiệp Đại Học). Trường Đại Học Nông Lâm Huế, Huế, Việt Nam.

Nguyễn Thị Vân Thái. (Tháng 12, 2004). *Xây dựng bài thuốc y học cổ truyền ứng dụng trong phòng và chữa bệnh cho tôm cá*. Bài viết được trình bày tại Hội thảo toàn quốc về nghiên cứu và ứng dụng khoa học công nghệ trong NTTS tại Vũng Tàu, Việt Nam.

Nguyễn Trọng Nghĩa., Đặng Thị Hoàng Oanh., Trương Quốc Phú. &Phạm Anh Tuấn. (2015). Phân lập và xác định khả năng gây hoại tử gan tụy của vi khuẩn *Vibrio paraheamolyticus*phân lập từ tôm nuôi ở Bạc Liêu. *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ, 39*, 99-107.

Schillinger, U. & Lucke,F. K. (1989). Antibacterial activity of Lactobacillus sake isolated from meat. *Applied and Environmental Microbilogy, 55*,1901-1906.

Tổng cục Thủy sản. (2019). Hội nghị tổng kết công tác năm 2019 và triển khai nhiệm vụ năm 2020 của Tổng cục Thủy sản.

Venketramalingam, K., Christopher, J.G &Citarasu, T. (2007). Zingiber officinalis anherbal appetizer in the tiger shrimp *Penaeus monodon*(Fabricius) larviculture. *Aquac Nutr 13(6)*, 439–443.