

**MỘT SỐ ĐẶC ĐIỂM SINH HỌC CỦA VI KHUẨN *Vibrio harveyi*
GÂY BỆNH XUẤT HUYẾT LỖ LOÉT Ở CÁ CHỀM NUÔI TẠI KHÁNH HÒA**
**BIOLOGICAL CHARACTERISTICS OF *Vibrio harveyi* CAUSING HEMORRHAGIC AND
ULCERATIVE DISEASE IN BARRAMUNDI CULTURED IN KHANH HOA**

**Trần Vĩ Hích¹, Trang Sĩ Trung², Nguyễn Công Minh³,
Nguyễn Thị Hải Dương³ Nguyễn Thị Kim Cúc³**

¹ Trung tâm nghiên cứu Giống và Dịch bệnh, Trường Đại học Nha Trang

² Khoa Công nghệ thực phẩm, Trường Đại học Nha Trang

³ Viện Công nghệ Sinh học và Môi trường, Trường Đại học Nha Trang

Tác giả liên hệ: Trần Vĩ Hích (Email: tranhich@gmail.com)

Ngày nhận bài: 13/07/2022; Ngày phản biện thông qua: 22/09/2022; Ngày duyệt đăng: 28/09/2022

TÓM TẮT

Bệnh xuất huyết lỗ loét là một bệnh phổ biến ở cá chẽm trong đó vibrio được xem là một trong những tác nhân gây ra bệnh này. Khi nghiên cứu về tác nhân gây bệnh lỗ loét ở lồng nuôi cá chẽm tại Vạn Ninh, Khánh Hòa, chúng tôi đã sàng lọc các tác nhân gây bệnh tiềm ẩn và cuối cùng phân lập được chủng *Aus K0917* từ thận của cá chẽm lỗ loét. Kết quả kiểm tra đặc điểm hình thái và sinh hóa của chủng *Aus K0917* đã xác định chủng *Aus K0917* là vi khuẩn *Vibrio harveyi*. Kết quả giải trình tự gen 16S rDNA của chủng phân lập cũng cho thấy sự tương đồng đến 100% với trình tự chủng vi khuẩn *Vibrio harveyi* LS8 mã định danh FJ937878.1. Độ lực của chủng *Aus K0917* khá cao, Liều gây chết 50% quần đàn cá chẽm khi công cường độc vào xoang bụng được xác định là $10^{4.25}$ cfu/cá sau 7 ngày. Mười bốn ngày sau khi công cường độc, không thể phân lập được vi khuẩn *V. harveyi* từ những cá thí nghiệm còn lại

Từ khóa: Xuất huyết, lỗ loét, bệnh, *V. harveyi*

ABSTRACT

Hemorrhagic and ulcerative disease is a common disease in barramundi in which vibrio is considered as one of the main causative agents. During the study on the causative agent of ulcer disease in barramundi cultured in cages at Vạn Ninh, Khanh Hoa, we screened potential pathogens and finally isolated *Aus K0917* strain from the kidney of fish with ulcerated skin. This isolated strain was identified as *V. harveyi* by morphological characteristics and biochemical tests. The results of 16S rDNA gene sequencing of the isolate also showed 100% similarity with the sequence of *Vibrio harveyi* LS8 (accession FJ937878.1). The virulence of the *Aus K0917* strain is quite high. The lethal dose of 50% of the barramundi population via intraperitoneal injection was determined to be $10^{4.25}$ cfu/fish within 8 days. Fourteen days after inoculation, *V. harveyi* could not be isolated from the surviving barramundi.

Keywords: Hemorrhagic, ulcerative, disease, *V. harveyi*

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Trong những năm gần đây, nghề nuôi cá biển ở Khánh Hòa nói riêng và Việt Nam nói chung ngày càng phát triển. Tính đến năm 2020, diện tích nuôi cá biển lên đến 8700 ha và 3,8 triệu mét khối lồng, đạt sản lượng 38000 tấn. Trong đó cùng với cá mú, cá chim và cá bóp, cá chẽm là một đối tượng nuôi phổ biến bởi tốc độ tăng trưởng cao và khả năng chống chịu tốt với những biến động lớn của các yếu tố môi trường đặc biệt là độ mặn. Tuy nhiên nghề nuôi cá chẽm

đang phải đối mặt với thách thức lớn về vấn đề dịch bệnh. Hai virus thường gặp ở cá chẽm là nodavirus thuộc họ Nodaviridae gây bệnh hoại tử thần kinh ở cá chẽm giống (Ransangan và Manin 2010) và iridovirus (Girisha và cộng sự 2019). Nhiều nhóm kí sinh trùng được tìm thấy ở cá chẽm như nhóm nguyên sinh động vật (trùng quả dưa, trùng bánh xe, trùng loa kèn...), sán lá đơn chủ, sán lá song chủ... gây ảnh hưởng trực tiếp hoặc gián tiếp đến sức khỏe của cá (Wendover 2010).

Nhiều nghiên cứu đã chỉ ra rằng bệnh do vi khuẩn ngày càng gia tăng ở cá biển nói chung và cá chẻm nói riêng. Ba nhóm bệnh do vi khuẩn gây ra thường xuyên được nhắc đến là Streptococcosis, Tenacibaculosis và Vibriosis (Wendover 2010). Vibriosis được xem là mối nguy hại thường trực cho các đối tượng nuôi biển nói chung và cá chẻm nói riêng. Trong đó *Vibrio harveyi* là một trong những tác nhân phổ biến. Nghiên cứu của Vũ Khắc Hùng năm 2021 cho biết đã phân lập được 175 chủng vibrio từ 191 mẫu cá chẻm, Trong đó *V. harveyi* chiếm tỉ lệ cao nhất (45,71%). Tuy nhiên đã có nhiều nghiên cứu cho thấy độc lực của các chủng *V. harveyi* mạnh hay yếu tùy thuộc vào sự có mặt của các gen độc lực ở chủng vi khuẩn này.

Nghiên cứu này được thực hiện nhằm đánh giá độc tính của chủng *V. harveyi* gây dịch bệnh lở loét ở cá chẻm nuôi lồng tại Vạn Ninh, Khánh Hòa tạo cơ sở cho việc kiểm soát và phòng ngừa bệnh có hiệu quả sau này.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Chuẩn bị cá

Cá thí nghiệm được mua từ trại sản xuất giống sau khi kiểm tra khẳng định đàn cá giống không bị nhiễm *V. harveyi* và đưa về Trung tâm nghiên cứu Giống và Dịch bệnh thủy sản lưu giữ ít nhất 2 tuần trước khi bắt đầu thí nghiệm. Cá được nuôi trong bể 2000L với các thông số môi trường cơ bản được duy trì ở mức 28-32ppt, pH: 7,9 – 8,3, DO >5ppm. Cá được cho ăn thức ăn công nghiệp 2 lần/ngày và thay nước 2 ngày/lần.

Chuẩn bị vi khuẩn

Vi khuẩn *V. harveyi* (Aus K0917) phân lập từ thận cá chẻm bị bệnh xuất huyết, lở loét thu tại lồng nuôi cá chẻm ở Vạn Ninh vào tháng 9/2017 được lưu giữ tại Trung tâm nghiên cứu Giống và Dịch bệnh thủy sản. Việc định danh chủng vi khuẩn trước khi sử dụng cho thí nghiệm dựa trên các đặc điểm sinh hóa theo mô tả của Bergey, 1994 và được giám định lại bằng phương pháp giải trình tự gen tại Công ty Nam Khoa, Tp Hồ Chí Minh. Chủng vi khuẩn này được hoạt hóa trong môi trường TSB (tryptic soy broth, Merck) bổ sung 1,5% NaCl ở 30°C trong 24h trước khi cấy lại trên môi trường

TSB (tryptic soy agar, Merck) . Khuẩn lạc từ môi trường TSA sẽ được nuôi trong TSB bổ sung 1,5% NaCl ở 30°C trong 18h. Thu vi khuẩn bằng cách ly tâm ở 1000g trong 15 phút, rửa 2 lần bằng dung dịch nước muối sinh lý đệm phosphate (phosphate buffered saline – PBS, pH 7,4) trước khi pha loãng trở lại trong dung dịch PBS để đạt được mật độ 10^8 cfu/mL

Xác định độc lực vi khuẩn *V. harveyi*

Thí nghiệm xác định liều gây chết 50% (LD50) của vi khuẩn *V. harveyi* được tiến hành với 6 nghiệm thức. Mỗi nghiệm thức gồm 40 cá chẻm ($9,1 \pm 0,2$ cm) nuôi trong bể 250L chứa 200L nước biển với các thông số môi trường cơ bản được duy trì ở mức 28-32ppt, pH: 7,9 – 8,3, DO >5ppm. Tất cả cá đều được tiêm 0,1 mL dịch huyền phù vi khuẩn *V. harveyi* ở nồng độ 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 , và 10^7 cfu/cá, cá đối chứng được tiêm 0,1mL PBS

Liều gây chết 50% quần đàn cá thí nghiệm được xác định dựa vào tỉ lệ chết tích lũy của cá ở các nghiệm thức thí nghiệm tại thời điểm sau 7 ngày mà không có cá chết ở bất kì nghiệm thức nào. Các số liệu thu thập được phân tích bằng hàm probit trên phần mềm SPSS statistics 22.0

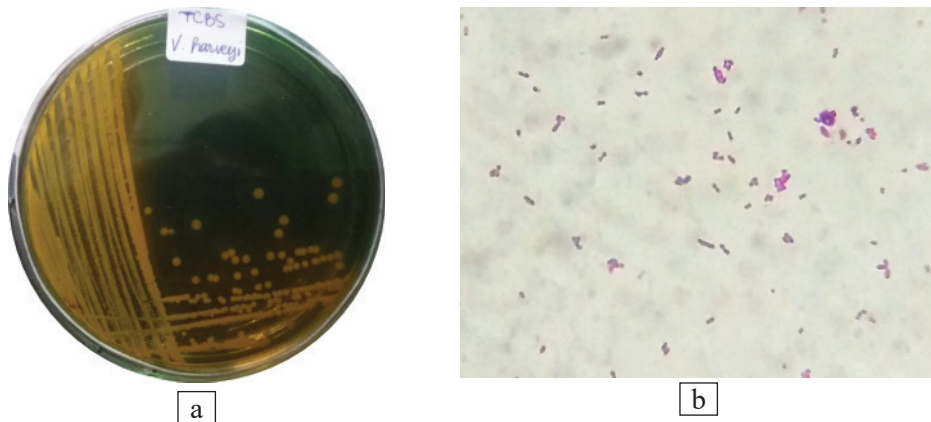
III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN.

1. Một số đặc điểm sinh học của chủng *Vibrio harveyi*

1.1. Đặc điểm hình thái, sinh hóa của chủng *V. harveyi*.

Kết quả phân lập vi khuẩn cho thấy khuẩn lạc chủng Aus K0917 trên môi trường TCBS có màu vàng, tròn đều, nhẵn bóng, đường kính khuẩn lạc khoảng 2-3mm sau 24h nuôi cấy ở 30°C. Vi khuẩn bắt màu gram âm, hình que ngắn, thẳng hoặc hơi cong, không hình thành bào tử và có khả năng chuyển động (hình 1)

Kết quả xác định các đặc điểm sinh hóa của chủng Aus K0917 bằng KIT API20E cho thấy hầu hết các phản ứng sinh hóa của chủng vi khuẩn này trùng khớp với mô tả về chủng *V. harveyi* do Bergey's mô tả năm 1994 (bảng 1). Chỉ có 2 điểm khác biệt về đặc điểm sinh hóa ở các chủng này so với mô tả của Bergey's là phản ứng Voges-Proskauer (VP) và D-sorbitol (SOR). Tuy nhiên, sự khác biệt về hai phản ứng



Hình 1. Hình dạng khuẩn lạc (a) và tế bào nhuộm gram của *V. harveyi* (b).

này cũng được chính Bergey’s cho biết sẽ có khoảng 10% chủng vi khuẩn xảy ra khác biệt và điều này cũng đã thể hiện ở các nghiên cứu của Pretto, 2020 và Katarina, 2005. Vì thế kết quả này cho thấy chủng Aus K0917 được phân lập từ thận cá chêm bệnh là vi khuẩn *V. harveyi*.

Kết quả giải trình tự gen 16s rDNA của

chủng vi khuẩn Aus K0917 với độ dài 508 bp cũng cho thấy sự tương đồng đến 100% về trình tự gen khi so sánh với các trình tự gen của vi khuẩn *V. harveyi* LS8 mã định danh FJ937878.1 do Li và các cộng sự công bố năm 2011 trên Genbank (NCBI) (hình 2)

TGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGAAAC-GAGTTATCTGAACCTTCGGGGGACGATAACGGCGTCGAGCGGCGGACGGGTGAG-TAATGCCTAGGAAATTGCCCTGATGTGGGGGATAACCATTGGAAACGATGGCTA-ATACCGCATAATGCCTACGGGCCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTCGCGTCAG-GATATGCCTAGGTGGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGAC-GATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAAGTCTGAGACACGGTC-CAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATG-CAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTCAGTCGTGAG-GAAGGTGGTGTAGTTAATAGCTGCATTACTTGACGTTAGCGACAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTG

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Vibrio sp. VibC-Qc-005 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	939	939	100%	0.0	100%	KF577010.1
Vibrio harveyi strain LS8 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	939	939	100%	0.0	100%	FJ937878.1

Hình 2. Kết quả định danh bằng phương pháp giải trình tự gen 16S rDNA của chủng Aus K0719.

3. Xác định độc lực vi khuẩn *V.harveyi* phân lập từ cá bệnh

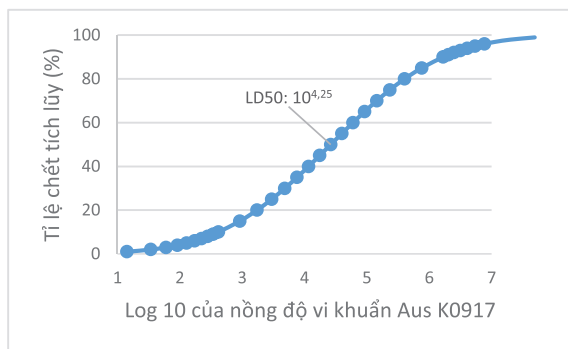
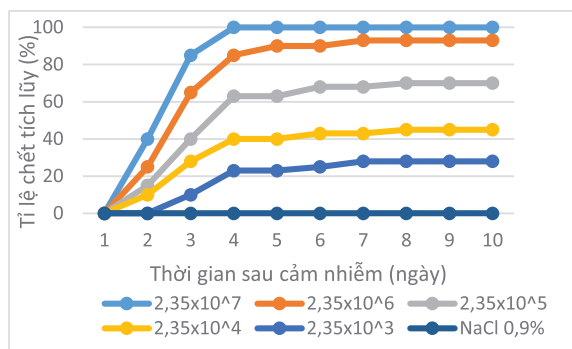
Kết quả thu được từ thí nghiệm xác định liều gây chết 50% quần đàn (LD50) cho thấy cá bắt đầu chết sau khi tiêm vi khuẩn *V. harveyi* vào xoang bụng 2 ngày và tăng mạnh ở ngày thứ 3 sau đó giảm dần. Đến ngày thứ 8 không còn xảy ra hiện tượng cá chết ở tất cả các nghiệm thức và kết quả kiểm tra phân lập vi khuẩn vibrio ở thận của cá thí nghiệm ở ngày

thứ 14 cho thấy thận cá hoàn toàn khỏe mạnh và không nhiễm vibrio. Ở nhóm đối chứng không có bất kì hiện tượng chết nào xảy ra, cá khỏe mạnh và hoạt động bơi lội bình thường cho đến khi kết thúc thí nghiệm. Liều gây chết 50% quần đàn cá chêm khi tiêm vi khuẩn Aus K0917 vào xoang bụng là 10^{4.25} (hình 3).

Kết quả quá trình theo dõi dấu hiệu bệnh lý bên ngoài của cá thí nghiệm cho thấy cá bệnh thường chuyển màu đen sậm và hay bơi

Bảng 1. Một số đặc điểm hình thái, sinh hóa của các chủng vi khuẩn Aus K0917

Đặc điểm	Aus K0917	Preto, 2020	Katarina, 2005 (02/001)	Katarina, 2005 01/022	Bergey
Nhuộm Gram	-	-	-	-	-
ONPG	-	-	-	-	-
L-arginine (ADH)	-	-	-	-	-
L-lysine (LDC)	+	+	+	+	+
L-ornithine (ODC)	-	+	-	+	-
Trisodium citrate (CIT)	-	+	-	+	-
H ₂ S production	-	-	-	-	-
Urea (URE)	-	-	-	-	-
L-tryptophane (TDA)	-	-	+	+	ND
Indole (IND)	+	+	+	+	+
Voges Proskauer (VP)	-	-	-	-	+
Gelatin (GEL)	-	-	+	+	-
D-glucose (GLU)	+	+	+	+	+
D-manitol (MAN)	+	+	+	+	+
Inositol (INO)	-	-	-	-	-
D-sorbitol (SOR)	+	-	-	+	-
L-rhamnose (RHA)	-	-	-	-	-
D-sucrose (SAC)	+	+	-	+	+
D-melibiose (MEL)	-	-	-	-	-
Amygdalin (AMY)	+	+	+	+	ND
L-arabinose (ARA)	-	-	-	-	-
Oxidase (OX)	+	+	+	+	+



Hình 3. Tỉ lệ chết tích lũy của cá chêm sau khi tiêm vi khuẩn *V. harveyi*.

lòng vòng gần mặt nước. Các dấu hiệu bệnh lý bên ngoài như mù mắt, xơ đuôi, rụng vảy, xuất huyết ngoài da, lở loét cũng được ghi nhận trong quá trình thí nghiệm. Giải phẫu bên trong nội quan của cá cho thấy có hiện tượng tích dịch ở xoang bụng, xuất huyết gan, sưng thận và dịch lỏng ở ruột (hình 4)

Vibrio harveyi được xem là một trong những tác nhân gây bệnh nghiêm trọng cho nhiều loài động vật thủy sản. Vi khuẩn này là tác nhân gây

các bệnh hoại tử gan tụy cấp, phát sáng, trắng đuôi, đốm đen ở vỏ tôm he (Muthukrishnan và cộng sự, 2019; Prayitno and Latchford 1995, Zhou và cộng sự, 2012, Selvin và cộng sự, 2005), bệnh lở loét ở hải sâm *Holothuria scabra* (Becket và cộng sự, 2010), bệnh mụn mủ ở bào ngư *Haliotis discus hannai* (Wang và cộng sự, 2018)... *V. harveyi* cũng là tác nhân gây mù mắt ở cá măng sữa (Ishimaru and Muroga, 1997), gây rụng vảy, lở loét, hoại



Hình 4: Dấu hiệu bệnh lý cá chẽm nhiễm *V. harveyi*. (a) mù mắt; (b) xơ đuôi; (c) xuất huyết trên da; (d) sưng thận, gan xuất huyết; (e) tích dịch ruột gây sưng ruột.

tử cơ ở cá mú (Shen và cộng sự, 2017, Zhu và cộng sự, 2018) bệnh mòn đuôi ở các vược *Lateolabrax japonicus*, cá tráp *Sparus aurata* (Wang và cộng sự, 2002, Halder và cộng sự, 2010). Vi khuẩn này cũng là tác nhân gây viêm ruột ở nhiều loài cá khác nhau như cá mú, cá đù đỏ (Yii và cộng sự, 1997, Liu và cộng sự, 2003). Kết quả nghiên cứu này cho thấy các dấu hiệu bệnh lý bên ngoài của cá chẽm nhiễm *V. harveyi* cũng tương tự với những dấu hiệu bệnh lý ở một số loài cá biển mắc nhiễm loại vi khuẩn này đã từng được báo cáo trước đây. Độc lực của các chủng *V. harveyi* rất khác nhau ở các nghiên cứu khác nhau. Nhiều báo cáo chỉ ra rằng độc lực của vi khuẩn *V. harveyi* phụ thuộc vào sự tồn tại của các gen độc lực luxR, toxRVh, chiA,,, trong bản thân của vi khuẩn.

Nghiên cứu của Iwamoto và cộng sự năm 1995 cho thấy liều tiêm $1,1 \times 10^7$ cfu/ml *V. harveyi* vào xoang bụng đã gây chết 50% quần

đàn cá sòng (*Trachurus japonicus*) sau 4 ngày. Liều gây chết 50% quần đàn của vi khuẩn *V. harveyi* đối với các loài cá mú đen (*Epinephelus coioides*), cá chẽm châu Âu (*Dicentrarchus labrax*), lươn Nhật Bản (*Praclithys olivaceus*) và cá rô biển (*Sebastes schlegeli*) lần lượt là $2,53 \times 10^7$, $1,5 \times 10^5$, $2,48 \times 10^5$ và 2×10^4 cfu/ml (Yii và cộng sự, 1997, Pujalte và cộng sự, 2003, Won and Park 2008). Đối chiếu với các kết quả nghiên cứu của các tác giả này thì rõ ràng độc lực của các chủng Aus K0917 phân lập ở thận cá chẽm nuôi ở Vạn Ninh, Khánh Hòa khá cao.

IV. KẾT LUẬN

Vi khuẩn *V. harveyi* là tác nhân gây bệnh xuất huyết lở loét ở cá chẽm nuôi tại Khánh Hòa. Độc lực của các chủng vi khuẩn phân lập được khá cao với liều vi khuẩn gây chết 50% quần đàn cá chẽm là $10^{4,25}$ CFU/cá khi cảm nhiễm vào xoang bụng.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Vũ Khắc Hùng (2021). Kết quả xác định loài *V. harveyi*, *V. vulnificus*, *V. parahaemolyticus* trên cá chẽm nuôi tại Khánh Hòa. Tạp chí Khoa học kỹ thuật Thú y tập XXVIII số 3. Trang 69-74

2. Becket P, Gillan D, Lanterbecq D, Jangoux M, Rasolofonirina R, Rakotovo J, Eeckhaut I (2004). The skin ulceration disease in cultivated juveniles of *Holothuria scabra* (Holothuroidea, Echinodermata). *Aquaculture* 242:13–30
3. Girisha SK, Puneeth TG, Nithin MS, Naveen Kumar BT, Ajay SK, Vinay TN, Suresh T, Venugopal MN and Ramesh KS (2019). Red sea bream iridovirus disease (RSIVD) outbreak in Asian seabass (*Lates calcarifer*) cultured in open estuarine cages along the west coast of India: First report. *Aquaculture* <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734712>
4. Haldar S, Maharajan A, Chatterjee S, Hunter SA, Chowdhury N, Hinenoya A, Asakura M, Yamasaki S (2010) Identification of *Vibrio harveyi* as a causative bacterium for a tail rot disease of sea bream *Sparus aurata* from research hatchery in Malta. *Microbiol Res* 165:639–648
5. Ishimaru K, Muroga K (1997). Taxonomical re-evaluation of two pathogenic *Vibrio* species isolated from milkfish and swimming crab. *Fish Pathol* 32:59–64
6. Iwamoto Y, Suzuki Y, Kurital A, Watanabe Y, Shimizu T, Ohgami H and Yanagihara Y, 1995. *Vibrio trachuri* Sp. Nov., a New Species Isolated from Diseased Japanese Horse Mackerel. *Microbiology, immunology*. 39 (11) 831-837.
7. Katarina ST 2005. Detection and characterisation of *Vibrio harveyi* isolates. Thesis BSc Biomedical sciences. School of Biological sciences. Dublin institute of technology, Kenwin street, Dublin 8. 63pp
8. Li CQ, Liu WC, Zhu P, Yang JL, Cheng KD, 2011. Phylogenetic diversity of bacteria associated with the marine sponge *Gelliodes carnosa* collected from the Hainan Island coastal waters of the South China Sea. *Microb Ecol*. 2011 Nov;62(4):800-12. doi: 10.1007/s00248-011-9896-6.
9. Liu PC, Chuang WH, Lee KK (2003). Infectious gastroenteritis caused by *Vibrio harveyi* (*V. carchariae*) in cultured red drum (*Sciaenops ocellatus*). *J Appl Ichthyol* 19:59–61
10. Muthukrishnan S, Defoirdt T, Ina-Salwany MY, Yusoff FM, Shariff M, Ismail SI, Natrah I (2019). *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio harveyi* causing Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease (AHPND) in *Penaeus vannamei* (Boone, 1931) isolated from Malaysian shrimp ponds. *Aquaculture* 511:734227 Prayitno SB, Latchford JW (1995). Experimental infections of crustaceans with luminous bacteria related to *Photobacterium* and *Vibrio*—effect of salinity and pH on infectiosity. *Aquaculture* 132:105–112
11. Pujalte MJ, Sitjá-Bobadilla A, Macián MC, Belloch C, Álvarez-Pellitero P, Pérez-Sánchez J, Uruburu F, Garay E (2003). Virulence and molecular typing of *Vibrio harveyi* strains isolated from cultured dentex, gilthead sea bream and European sea bass. *Syst Appl Microbiol* 26:284–292
12. Ransangan J, & Manin BO (2010). Mass mortality of hatchery-produced larvae of Asian seabass, *Lates calcarifer* (Bloch), associated with viral nervous necrosis in Sabah, Malaysia. *Veterinary Microbiology*, 145, 153–157
13. Selvin J, Huxley AJ, Lipton AP (2005). Pathogenicity, antibiogram and biochemical characteristics of luminescent *Vibrio harveyi* associated with 'Black Shell Disease' of *Penaeus monodon*. *Fish Technol* 42:191–196
14. Shen GM, Shi CY, Fan C, Jia D, Wang SQ, Xie GS, Li GY, Mo ZL, Huang J (2017). Isolation, identification and pathogenicity of *Vibrio harveyi*, the causal agent of skin ulcer disease in juvenile hybrid groupers *Epinephelus fuscoguttatus* x *Epinephelus lanceolatus*. *J Fish Dis* 40:1351–1362
15. Wang BK, Yu JH, Li Y, Ji WS, Xu HS (2002). Isolation and identification of pathogen (*Vibrio harveyi*)

- from sea perch, *Lateolabrax japonicus*. J Fishery Sci 9:52–55
16. Wendover N (2010). Important disease of farmed barramundi in asia. Aquaculture asia pacific. 6(2). pp. 26-29.
 17. Won KM, Park S (2008). Pathogenicity of *V. harveyi* to cultured marine fishes in Korea. Aquaculture 285:8–13
 18. Yii K-C, Yang TI, Lee KK (1997). Isolation and characterization of *Vibrio carchariae*, a causative agent of gastroenteritis in the groupers, *Epinephelus coioides*. Curr Microbiol 35:109–115
 19. Zhou J, Fang W, Yang X, Zhou S, Hu L, Li X, Qi X, Su H, Xie L (2012). A nonluminescent and highly virulent *Vibrio harveyi* strain is associated with “Bacterial White Tail Disease” of *Litopenaeus vannamei* shrimp. PLoS ONE 7(2):e29961