

**PHÂN LẬP VÀ ĐỊNH DANH VI KHUẨN PHÁT SÁNG
GÂY BỆNH TRÊN CÁ NGỰA ĐEN (*Hippocampus kuda*)**

**ISOLATION, IDENTIFICATION OF LUMINOUS VIBRIO IN
DESEASED CULTURED COMMON SEAHORSE (*Hippocampus kuda*)**

Văn Hồng Cẩm^(), Phan Thị Thảo, Đặng Thúy Bình*

Institute of Biotechnology and Environment, Nha Trang University, Vietnam

E-mail address: vanhongcam.bio@gmail.com

ABSTRACT

Seahorse (*Hippocampus* spp.) are economically valuable species and are used in traditional medicine. In Vietnam, seahorse cultivation has been recently developed in some regions namely Khanh Hoa, Ninh Thuan, Hue, Da Nang and Vung Tau. Three seahorse small-scale farms in Khanh Hoa are now facing problems with unknown disease occurring in common seahorses (*Hippocampus kuda* Bleekers 1852). In the present study, luminous bacteria were isolated from a total of 35 *Hippocampus kuda*, which had ulcerations. Physiological and biochemical testing as well as 16S rDNA sequencing confirmed that the photobacterium (named TNX-X1) was closely related to *Vibrio harveyi*. Infectivity studies (challenge test) were conducted directly in *Hippocampus kuda* showed that this *Vibrio* isolate caused a disease with symptoms including white changing, viscous skin and ulceration. LD50 (Lethal dose 50%) for fish with an average body weight of 1 – 2g was 5×10^6 CFUxfish⁻¹. The isolate, in addition, was resistant to certain antibiotics including ampicillin 10µg/disc (A10), cefadroxil 30µg (CD30), amoxicilin 25µg (AMC25) and cefalexin 30µg (CL30) (in total 9 antibiotics).

Key word: Hippocampus kuda, Vibrio, photobacteria

ĐẶT VẤN ĐỀ

Cá ngựa (*Hippocampus* spp.) là nhóm các loài động vật thủy sản có giá trị kinh tế cao, từ lâu đã được dân gian dùng làm thuốc chữa bệnh (Lourie và cs. 1999). Hàng năm, trên thế giới có khoảng 20 triệu cá ngựa được thu thập từ tự nhiên (Vincent 1996) để sử dụng cho các mục đích như: điều trị nhức mỏi, viêm nhiễm, yếu sinh lý hoặc khó sinh nở (Ryu và cs. 2010). Ngoài ra, theo Zhang và cs. (2003), cá ngựa còn có tác dụng làm giảm kích thích của tế bào ung thư, thúc đẩy quá trình tạo bạch cầu hoặc hóa lỏng các khối u ở người. Là loài động vật có giá trị, gần đây cá ngựa đã trở thành đối tượng nuôi của một số quốc gia trên thế giới như: Australia (*H. abdominalis*), Sri Lanka (*H. kuda*), Indonesia (*H. kuda*), Brazil (*H. reidi*), Mexico (*H. erectus*), Ireland (*H. hippocampus*) và New Zealand (*H. abdominalis*). Nghề nuôi cá ở Việt Nam được phát triển ở nhiều nơi như: Huế, Đà Nẵng, Khánh Hòa, Ninh Thuận, Vũng Tàu ... (Trương Sĩ Kỳ 2000). Hiện tại, các trại nuôi chủ yếu tập trung vào cá ngựa đen (*H. kuda*) - còn có tên gọi khác là cá ngựa vàng (yellow seahorse hoặc common seahorse) (Trương Sĩ Kỳ 2000). Một trong những thách thức lớn cho nghề nuôi cá ngựa là sức đề kháng của loài động vật này tương đối yếu. Cá ngựa rất dễ nhiễm bệnh do các tác nhân như ký sinh trùng, vi khuẩn và nấm (Vincent và Clifton-Hadley 1989). Trong đó, bệnh do vi khuẩn xuất hiện quanh năm và gây thiệt hại lớn nhất (Austin và Austin 1993; Alcaide và cs. 2001).

Vibrio là vi khuẩn thường xuất hiện trên động vật thủy sản. Một số loài *Vibrio* là tác nhân gây bệnh trên các loài thủy sản nước mặn như: *Vibrio anguillarum*, *V. ordalii*, *V. harveyi*, *V. splendida*, *V. orientalis*, *V. fischeri*. Đã có một số công trình nghiên cứu công bố *Vibrio* là nguyên nhân gây bệnh trên cá ngựa, với các dấu hiệu đầu tiên là biếng ăn, bơi lờ đờ, bạc vây đuôi, lở loét (Alcaide và cs. 2001; Tendencia 2002; Bombardini và cs. 2006; Martins và cs. 2010; Balcázar và cs. 2011).

Gần đây, tại một số trại nuôi cá ngựa trong khu vực thành phố Nha Trang, tình trạng cá ngựa chết đã được ghi nhận. Cá bệnh thường có các triệu chứng ban đầu là da nhợt nhạt, cá cong

đuôi, biếng ăn, bơi lơ dờ; sau đó xuất hiện các vết lở loét trên da, cổ, mõm; bạc vảy lưng, trắng da đuôi (Hình 1).



Hình 1: Cá ngựa đen (*Hippocampus kuda*) bị bệnh lở loét tại trại nuôi Ba Làng – Nha Trang

VẬT LIỆU – PHƯƠNG PHÁP

Phân lập vi khuẩn *Vibrio* phát sáng

35 mẫu cá ngựa bệnh có dấu hiệu lơ dờ, lở loét trên da được vận chuyển từ các trại nuôi ở Sông Lô và Ba Làng (Khánh Hòa) về phòng thí nghiệm. Tiến hành phân lập *Vibrio* trên môi trường TCBS (Thiosulphate Citrate Bilesalt Sucrose) Agar, môi trường NA (Nutrient agar) có bổ sung 3% NaCl và môi trường Marine agar (MA) theo phương pháp của (Tendencia 2004; Raj và cs. 2010). Ủ ở 28⁰C trong 24±2 giờ. Các khuẩn lạc khác nhau trên đĩa TCBS và các khuẩn lạc phát sáng trên môi trường NA hoặc MA sẽ được làm thuần và kiểm tra các đặc tính sinh hóa, sinh lý và hình thái học.

Phương pháp xác định các chỉ tiêu về sinh hóa, sinh lý và hình thái

Các chỉ tiêu hình thái, sinh lý và sinh hóa được chọn để định danh vi khuẩn phát sáng (Bảng 2) dựa theo các chỉ tiêu chẩn đoán vi khuẩn *Vibrio* gây bệnh ở thủy sản của (Pedersen và cs. 1999). Hình dạng của vi khuẩn được xác định bằng phương pháp nhuộm Gram (Barrow và Feltham 2004). Khả năng di động của vi khuẩn được kiểm tra bằng cách sử dụng trường thạch mềm chứa 0.5% agar có bổ sung Triphenyltetrazolium chloride (TTC), khả năng phát triển của vi khuẩn ở các nồng độ NaCl khác nhau (0%, 1%, 3%, 6%, 8%, 10%) cũng được kiểm tra. Sử dụng Kit API-20E (Biomerieux, Pháp) để danh dựa vào đặc điểm sinh hóa.

Định danh bằng 16S

DNA của vi khuẩn được tách chiết bằng Chelex (Biorad, USA) theo quy trình của nhà sản xuất. Đoạn gen 16S DNA của vi khuẩn được khuếch đại bằng kỹ thuật PCR sử dụng cặp mồi: 27 F (5'AGATTTGATCCTGGCTCAG3') và 1492 R (5'GGTTACCTTGTACGACTT3') (Weisburg và cs. 1991). Phản ứng PCR được tiến hành trong tổng thể tích 25µl với các thành phần như sau : Buffer có MgCl₂-10x (2,5µl), DNA (2-20ng), mỗi mồi (0,1µM), dNTP (0,1mM mỗi loại), Dream Taq Polymerase (1,25U). Chu kỳ nhiệt của phản ứng được thực hiện theo chu trình của nhà sản xuất Taq polymerase và nhiệt độ bắt cặp 50⁰C trong 1 phút. Giải trình tự gen 16S và hiệu chỉnh bằng phần mềm Sequencher 4.1.4. Kết quả được giống hàng trình tự để so sánh với các trình tự trên Genbank bằng chương trình BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/).

Xác định độc lực của TNX-X1

Thí nghiệm được thực hiện trong các bể thủy tinh (10L) có sục khí. Cá được cảm nhiễm có trọng lượng khoảng 1-2 g.con⁻¹, màu sắc tươi sáng, phản ứng linh hoạt. Bố trí ngẫu nhiên 20 conx^{bể}⁻¹ và để cá thích nghi dần với môi trường trong bể khoảng 1 tuần. Thí nghiệm được bố trí gồm 4 nghiệm thức: (1) đối chứng tiêm nước muối sinh lý; (2 - 4) tiêm vi khuẩn ở các dãy mật độ khác nhau. Tiêm 0,05 ml dung dịch vi khuẩn với các nồng độ khác nhau từ 2.5x10⁸

đến 10^5 CFU.ml⁻¹ vào phần vây ngực cá. Mật độ vi khuẩn được xác định bằng máy đo độ đục để đạt 0.5McFarland và pha loãng, kiểm chứng tổng số vi khuẩn bằng phương pháp đếm đĩa. Theo dõi liên tục biểu hiện của cá ngựa trong khoảng 15 ngày. Các nghiệm thức được lặp lại 2 lần.

Kháng sinh đồ

Tính nhạy của vi khuẩn với các loại thuốc kháng sinh được xác định theo phương pháp khuếch tán đĩa thạch trên môi trường MHA (Mueller-Hinton agar) (Bauer và cs. 1966; Huys và cs. 2002). *E. coli* ATCC 25922 được dùng làm chủng tham chiếu. Dịch vi khuẩn có độ đục 0,5 McFarland tương đương với $2-2,5 \times 10^8$ CFU.ml⁻¹ được sử dụng để xác định tính nhạy cảm của vi khuẩn đối với các loại kháng sinh (McFarland 1907; Murray và cs. 2007). 9 loại đĩa kháng sinh bao gồm tetracycline 30µg (TE30), ampicillin 10µg (AM10), chloramphenicol 30µg (C30), amoxicillin 25µg (AMC25), cefadroxil 30µg (CD30), doxycycline 30µg (D30), cefalexin 30µg (CL30), rifampin 5µg (RA5), cefaclor 25µg (CEC25) được đặt lên trên môi trường MHA, ủ 24 giờ ở 28°C. Đường kính vòng vô trùng được đo bằng mm. Chủng vi khuẩn trên đĩa MHA tương ứng sẽ được xác định là kháng (R), nhạy (S) hay trung gian (I) với kháng sinh thử nghiệm dựa theo hướng dẫn của Ủy Ban Quốc gia về Tiêu chuẩn phòng thí nghiệm lâm sàng - National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS 2000).

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Phân lập và định danh vi khuẩn bằng đặc điểm sinh hóa và hình thái

Trên các mẫu cá *H. kuda* thu về phòng thí nghiệm, chủng TNX-X1, chiếm đa số trong các mẫu cá bệnh và các chủng vi khuẩn được phân lập từ cá.

Đặc điểm sinh hóa, sinh lý và hình thái của TNX-X1 được trình bày ở Bảng 1. Một số đặc điểm của TNX-X1 như sau: Gram âm, hình que ngắn, di động, oxidase, catalase và phản ứng lên men glucose, galactose, mannitol đều dương tính... có khuẩn lạc màu xanh trên môi trường TCBS, đường kính 2 – 2,5mm sau 18 – 24h nuôi cấy. TNX-X1 có khả năng phát sáng, tuy nhiên khả năng phát sáng chỉ quan sát được sau 8h – 18h nuôi cấy. Kéo dài thời gian nuôi cấy, khả năng phát sáng yếu dần. Ngoài ra, trên môi trường NA có bổ sung 1% hoặc 3% NaCl, khả năng phát sáng mạnh hơn so với trên môi trường Marine Agar.

Bảng 1: Đặc điểm sinh lý, sinh hoá của chủng TNX-X1

Đặc điểm		Đặc điểm	
Nhuộm Gram	Âm	Glucose	+
Hình dạng	Que ngắn	Mannitol	+
Di động	+	Inositol	-
Lactose	-	Sorbitol	-
Catalase	+	Rhamnose	-
Oxidase	+	Sucrose	-
<u>Tính chịu muối</u>		Melibiose	-
0% NaCl	-	Amygdaline	-
3% NaCl	+	Arabinose	-
6% NaCl	+	O129 (0.5µg)	S
8% NaCl	-	Polymyxin (3000IU)	S
10% NaCl	-		
Khả năng sinh hơi	-		
TCBS agar	G		
Phát sáng	+		
ONPG,	-		
ADH	-		
LDC	-		
ODC	-		
Citrate	-		
H ₂ S	-		

Urease	+
TDA	-
Indole	+
VP	-
Gelatine	+

+ dương tính; - âm tính G = xanh ; S = nhạy cảm

Dựa vào đặc điểm sinh hóa, chủng TNX-X1 là *Vibrio* sp. Kết quả định danh dựa trên đặc điểm hóa sinh bằng kit API-20E cho kết quả: TNX-X1 có khả năng là *V. harveyi*, *V. vulnificus*, *V. parahaemolyticus*. Kết hợp dữ liệu sinh hóa của kit API-20E và các test sinh hóa, sinh lý khác nhập dữ liệu vào http://www.tgw1916.net/bacteria_logare.html được kết quả *V. harveyi* (89%), *V. vulnificus* (88%), *V. parahaemolyticus* (86%), *V. campbelli* (88%);

Định danh bằng gen 16S ribosome (16S rRNA gene – 16S rDNA)

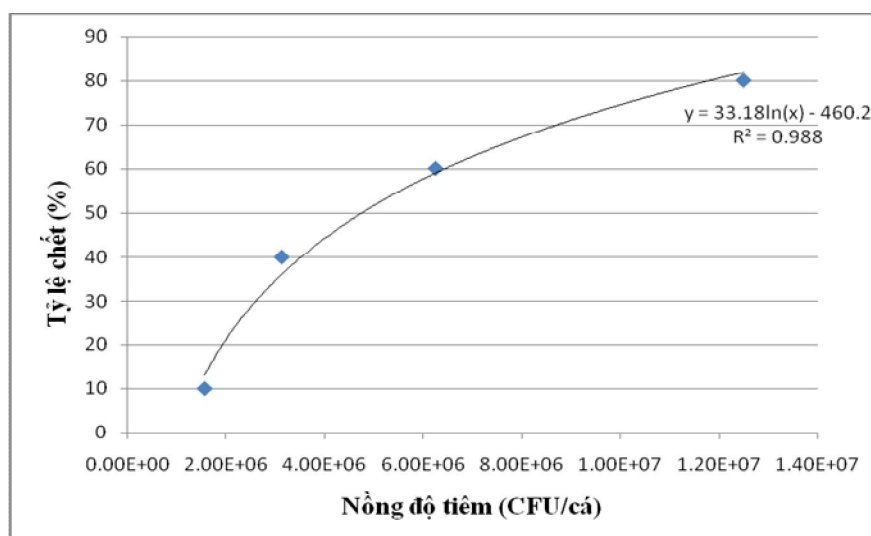
Kết quả so sánh trình tự 16S của chủng vi khuẩn gây bệnh với các trình tự trên Genbank cho thấy TNX-X1 tương đồng với các chủng *Vibrio harveyi*, *V. rotiferianus*, *V. campbelli* (Max ident = 99% ; E value = 0 ; Query cover = 100%),.

Xác định độc lực của các chủng vi khuẩn phân lập được

Ở cá ngựa nhỏ (1-2g), liều gây chết 50% (LD50) của chủng TNX-X1 được xác định là 5×10^6 CFU.cá⁻¹. Cá sau khi cảm nhiễm có biểu hiện tương tự cá bệnh nhận từ các trại cá ngựa: cá xuất hiện các triệu chứng bệnh như da nhợt nhạt, đặc biệt da cá bị ăn mòn tại vị trí tiêm và có nhớt trên vùng tiêm hoặc toàn thân. Ở mật độ vi khuẩn quá cao cá gần như không có biểu hiện và chết trong vòng 1-2 ngày. Với mật độ thấp hơn, biểu hiện bệnh rõ ràng và thời gian chết từ 1 – 12 ngày. Kết quả cảm nhiễm trên cá ngựa đen (*Hippocampus kuda*) được thể hiện ở bảng 2 và hình 2,

Bảng 2: Kết quả cảm nhiễm chủng X1 trên cá ngựa đen *H.kuda*

Nồng độ tiêm (CFU.ml ⁻¹)	Nồng độ tiêm (CFU.cá thể ⁻¹)	% cá chết		
		Lần 1	Lần 2	Trung bình
2.5×10^8	1.25×10^7	80%	80%	80%
1.25×10^8	6.25×10^6	70%	50%	60%
6.25×10^7	3.13×10^6	35%	45%	40%
3.13×10^7	1.56×10^6	15%	5%	10%



Hình 2: Tỷ lệ cá ngựa đen (*Hippocampus kuda*) chết sau khi cảm nhiễm chủng X1

Kháng sinh đồ

Kết quả thử nghiệm khả năng miễn cảm với một số loại kháng sinh của chủng TNX-X1 được thể hiện ở bảng 3.3

Bảng 3.3 : Khả năng miễn cảm của TNX-X1 đối với các loại kháng sinh

	C30	AM10	D30	TE30	CD30	AMC25	CL30	RA5	CEC25
TNX-X1	S	R	S	S	R	R	R	I	I
<i>Chú thích:</i>									
<i>C30: Chloramphenicol 30µg/đĩa;</i>				<i>AM10: Ampicillin 10µg/đĩa;</i>					
<i>D30: Doxycycline 30µg/đĩa;</i>				<i>TE30: Tetracycline 30µg/đĩa;</i>					
<i>CD30: Cefadroxil 30µg/đĩa;</i>				<i>AMC25: Amoxicillin 25µg/đĩa;</i>					
<i>CL30: Cefalexin 30µg/đĩa;</i>				<i>RA5: Rifampin 5µg/đĩa;</i>					
<i>CEC25: Cefaclor 25µg/đĩa.</i>									
R: Kháng		S: Nhạy cảm			I: Trung bình				

Vibrio spp. có tính đa hình cao, hệ thống định danh khá phức tạp. Sử dụng đặc điểm sinh hóa khó có thể định danh chính xác đến mức loài, đặc biệt đối với *V. harveyi* (Chatterjee và Haldar 2012). Gen 16S rRNA và các housekeeping gene khác được sử dụng rộng rãi trong định danh *Vibrio* ở mức độ sinh học phân tử (Wiik và cs. 1995). Tuy nhiên công trình nghiên cứu của Wiik và cs. (1995) cho thấy rằng 16S rRNA không định danh được tất cả các loài *Vibrio* khác nhau. Kết quả định danh dựa trên đặc tính sinh hóa cho thấy chủng TNX-X1 có khả năng là *V. harveyi* (89%), *V. vulnificus* (88%), *V. parahaemolyticus* (86%), *V. campbelli* (88%). Tuy nhiên, trong 4 vi khuẩn nói trên, cho đến nay hiện chỉ có *V. harveyi* và *V. vulnificus* được biết đến có khả năng phát sáng (FDA 1998). Dựa trên gene 16S rRNA, chủng TNX-X1 tương đồng với các chủng *Vibrio harveyi*, *V. rotiferianus*, *V. campbelli*. Tổng hợp các thông tin nói trên, mặc dù TNX-X1 có khả năng là *Vibrio harveyi*, cần tiến hành thêm một số kỹ thuật khác để định danh được chính xác và tin cậy hơn.

Hiện nay đã có một số công bố về *Vibrio harveyi* gây bệnh trên cá ngựa ở Tây Ban Nha (Alcaide và cs. 2001), Philippines (Tendencia 2004) và Ấn Độ (Raj và cs. 2010). Alcaide và cs. (2001) đã chứng minh chủng *V. harveyi* là tác nhân gây bệnh chính trên cá ngựa *Hippocampus* sp., đồng thời xác định LD50 của *V. harveyi* là 10^4 CFU.cá⁻¹ (cá thí nghiệm có trọng lượng trung bình 4g). Cá có biểu hiện bệnh trong thời gian từ 1-7 ngày. Raj và cs. (2010) công bố chủng *V. harveyi* phân lập từ cá ngựa nuôi có liều gây chết 50% trên cá ngựa đen *H. kuda* là 4×10^4 CFU.cá⁻¹ (cá thí nghiệm có trọng lượng trung bình 4.41 -6g). Trong nghiên cứu của chúng tôi, TNX-X1 gây ra trên cá ngựa với LD50 5×10^6 CFU.cá⁻¹, cá cảm nhiễm có kích thước nhỏ, trọng lượng trung bình 1-2g, cá biểu hiện bệnh trong thời gian 1 - 12 ngày. Như vậy độc lực của chủng TNX-X1 thấp hơn so với chủng *V. harveyi* được Alcaide và cs. (2001); Raj và cs. (2010) phân lập từ cá ngựa bệnh tại Tây Ban Nha và Ấn Độ.

Theo nhiều báo cáo cho thấy rằng *V. harveyi* còn là tác nhân gây bệnh cho các trại sản xuất tôm giống và phát triển ra khỏi ao. *V. harveyi* được xác định là tác nhân gây bệnh phát sáng ở trai ngọc (*Pinctada maxima*), tôm sú (*Penaeus monodon*) và tôm he Nhật Bản (*Penaeus japonicus*). Jiravanichpaisal và cs. (1994) đã phân lập được chủng *V. harveyi* trên tôm sú (*Penaeus monodon*) ở Thái Lan và xác định LD50 trên tôm thí nghiệm là 10^6 CFU.tôm⁻¹. Ở các nghiên cứu khác, giá trị LD50 của chủng *V. harveyi* được xác định là 10^7 CFU.tôm⁻¹ (Dureza và Tendencia 1997); $1,4 \times 10^6$ đến $2,8 \times 10^7$ CFU.tôm⁻¹ (Otta và Karunasagar 1999). Kết quả thí nghiệm của chúng tôi, một lần nữa khẳng định *Vibrio* có khả năng gây bệnh không những trên tôm mà còn ảnh hưởng đến sức sống của cá ngựa..

Tại các trại nuôi trong khu vực thành phố đều có các biện pháp xử lý bể, xử lý nguồn nước đầu vào, chọn con giống khỏe mạnh; có chế độ thay nước và vệ sinh phù hợp nhưng vẫn xảy ra tình trạng nhiễm bệnh. Được biết thức ăn chính của cá ngựa nuôi là tép *Mysidaceae*, *Artemia*, *Copepoda* thu thập ngoài tự nhiên. Do vậy, thức ăn có thể là nguồn gốc của tác nhân

gây bệnh trên cá ngựa. Báo cáo của Tendencia (2004) cũng đã công bố trong nguồn thức ăn chính của cá ngựa tại Philippines (các nhóm *Ascetes* spp.) có lượng lớn vi khuẩn phát sáng.

KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

Kết quả nghiên cứu cho thấy tác nhân gây bệnh lở loét trên cá ngựa tại các trại cá ngựa trong khu vực thành phố Nha Trang – tỉnh Khánh Hòa là vi khuẩn *Vibrio* sp. Có khả năng là *Vibrio harveyi*, tuy nhiên để kết quả định danh chính xác hơn, cần tiến hành thêm một số kỹ thuật khác.

Các trại nuôi nên quan tâm đến tính ổn định của thức ăn cho cá, vì hiện tại đây là nguồn thức ăn tươi sống (khẩu phần ưa thích của cá ngựa) không được kiểm soát và có khả năng chứa các nguy cơ mầm bệnh cao.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Trương Sĩ Kỳ, 2000. Kỹ thuật nuôi cá ngựa ở biển Việt Nam. *Nhà xuất bản Nông nghiệp - Hà Nội*.

Alcaide, E., Gil-saz, C., Sanjuán, E., Esteve, D., Amaro, C., Silveira, L., 2001. *Vibrio harveyi* causes disease in seahorse, *Hippocampus* sp. *Journal of Fish Diseases* 24, pp 311-313.

Austin, B.B., Austin, D.A., 1993. Bacterial fish pathogens: Disease of farmed and wild fish, 3rd edition. *Ellis Horwood*.

Balcázar, J.L., Planas, M., Pintado, J., 2011. Novel *Mycobacterium* species in seahorses with tail rot. *Emerging Infectious Diseases* 1770-1772.

Barrow, G.I., Feltham, R.K.A., 2004. Cowan and Steel's Manual for the Identification of Medical Bacteria. *Cambridge University Press*.

Bauer, A.W., Kirby, W.M., Sherris, J.C., Turck, M., 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am J Clin Pathol* 45, pp 493–496.

Bombardini, C., Florio, D., Fichtel, L., Fioravanti, M.L., 2006. The main disease of *Syngnathidae* in captivity. *Ittiopatologia* 3, pp 205-211.

Chatterjee, S., Halder, S., 2012. *Vibrio* related diseases in aquaculture and development of rapid and accurate identification methods. *J Marine Sci Res Dev* S1.

Dureza, H.A., Tendencia, E.A., 1997. Isolation of *Vibrio* sp. from *Penaeus monodon* (Fabricius) with red disease syndrome. *Aquaculture* 154, pp 107 - 114.

FDA, 1998. "Glowing" seafood? . *U.S. Food and Drug Administration - Seafood Products Research Center*.

Huys, G., D'Haene, K., Swings, J., 2002. Influence of the culture medium on antibiotic susceptibility testing of food-associated lactic acid bacteria with the agar overlay disc diffusion method. *Letters in Applied Microbiology* 34, pp 402-406.

Jiravanichpaisal, P., Myasaki, T., Limsuwan, C., 1994. Histopathology, biochemistry and pathogenicity of *Vibrio harveyi* infecting black tiger prawn *Penaeus monodon*. *J. Aqua. Anim. Health* 6, pp 27-35.

Lourie, S.A., Vincent, A.C.J., Hall, H.J., 1999. Seahorses: An identification guide to the world's species and their conservation. *Project seahorse, London, UK*, p. 214.

Martins, M.L., Mouriño, J.L.P., Fezer, G.F., Buglione Neto, C.C., Garcia, P., Silva, B.C., Jatobá, A.S., Vieira, F.N., 2010. Isolation and experimental infection with *Vibrio alginolyticus* in the sea horse, *Hippocampus reidi* Ginsburg, 1933 (Osteichthyes: *Syngnathidae*) in Brazil. *Brazilian Journal of Biology*, pp 205-209.

McFarland, J., 1907. The nephelometer: An instrument for estimating the number of bacteria in suspensions used for calculating the opsonic index and for vaccines. *Journal of the American Medical Association* XLIX, pp 1176-1178.

Murray, P.R., Baron, E.J., Jorgensen, J.H., Landry, M.L., Pfaller, M.A., 2007. Manual of Clinical Microbiology. *ASM Press, Washington DC. Man. Clin. Microbiol.* 9th Edition, p. 2260.

- NCCLS, 2000. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically: Approved Standard. *Clinical and Laboratory Standards Institute*, National Committee for Clinical Laboratory Standards.
- Otta, S.K., Karunasagar, I., 1999. Bacterial flora associated with shrimp culture ponds growing penaeus monodon in India. *J. Aqu. Trop* 14, pp 309 - 318.
- Pedersen, K., Austin, B., Austin, D.A., Larsen, J.L., 1999. *Vibriosis* associated with mortality in cultured plaice *Pleuronectes platessa* fry. *Acta Veterinaria Scandinavia* 40, pp 263-270.
- Raj, S.T., Lipton, A.P., Chauhan, G.S., 2010. Characterization and infectivity evaluation of *Vibrio harveyi* causing white patch disease among captive reared seahorses, *Hippocampus kuda*. *Journal of Marine Sciences* 39, pp 151-156.
- Ryu, B., Qian, Z.-J., Kim, S.-K., 2010. Purification of a peptide from seahorse, that inhibits TPA-induced MMP, iNOS and COX-2 expression through MAPK and NF- κ B activation, and induces human osteoblastic and chondrocytic differentiation. *Chemico-Biological Interactions* 184, pp 413-422.
- Tendencia, E.A., 2002. *Vibrio harveyi* isolated from cage-cultured seabass *Lates calcar* Jer Bloch in the Philippines. *Aquaculture Research* 33, pp 455-458.
- Tendencia, E.A., 2004. The first report of *Vibrio harveyi* infection in the sea horse *Hippocampus kuda* Bleekers 1852 in the Philippines. *Aquaculture Research* 35, pp 1292-1294.
- Vincent, A.C.J., 1996. The International Trade in Seahorses. *TRAFFIC International, Cambridge, UK*, p. 163.
- Vincent, A.C.J., Clifton-Hadley, R.S., 1989. Parasitic infection of the seahorse (*Hippocampus erectus*) – A case report. *J. Wildlife Diseases* 25, pp 404-406.
- Weisburg, W.G., Barns, S.M., Pelletier, D.A., Lane, D.J., 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol* 173, pp 697–703.
- Wiik, R., Stackebrandt, E., Valle, O., Daae, F.L., Rodseth, O.M., Andersen, K., 1995. Classification of fish-pathogenic vibrios based on comparative 16S rRNA analysis. *Int J Syst Bacteriol* 45, pp 421-428.
- Zhang, N., Xu, B., Mou, C., Yang, W., Wei, J., Lu, L., Zhu, J., Du, J., Wu, X., Ye, L., Fu, Z., Lu, Y., Lin, J., Sun, Z., Su, J., Dong, M., Xu, A., 2003. Molecular profile of the unique species of traditional Chinese medicine, Chinese seahorse (*Hippocampus kuda* Bleeker). *FEBS Letters* 550, pp 124-134.