

以乳酸菌防治巴斯德桿菌

刑辰馥¹、方宜鈞¹、齊肖琪^{1,2,3}

¹ 國立臺灣大學動物學研究所

² 國立臺灣大學生命科學系

³ 國立臺灣大學漁業推廣委員會

一、前言

1. 海鱸 (*Rachycentron cancadum*)

海鱸 (*Rachycentron cancadum*, *Cobia*) 廣泛分佈於熱帶及亞熱帶海域，屬於鱸亞目，以甲殼類和魚類為主食，成長速度快，一年可成長 6~10 公斤，最大體長可至 2 公尺，體重可達近 70 公斤，是非常具有養殖潛力的魚種。臺灣的海鱸養殖，從民國 79 年開始，於 86 年人工繁殖成功後已可完全養殖，主要在春、秋兩季產卵，養殖兩年即可達性成熟，產卵溫度為 23~27°C。由於養殖區域集中及單位密度放養量提高，使得養殖環境惡化，增加海鱸罹病的機會。目前養殖海鱸常見的細菌性病原包括弧菌 (*Vibrio* spp.)、鏈球菌 (*Streptococcus* sp.) 和巴斯德桿菌 (*Photobacterium damsela* subsp. *Piscicida*)，一般以紅黴素、氯黴素及歐索林酸 (oxolinic acid) 等藥劑治療 (古等, 2000; Liu *et al.*, 2003)。臺灣養殖海鱸最易發病大量死亡的階段，是幼魚自陸上養殖池送至海上箱網養殖的階段，一方面起因於輸送過程緊迫造成免疫力下降，另一方面則是適應新環境的壓力 (劉等, 2005)。

2. 巴斯德桿菌症 (Pasteurellosis)

巴斯德桿菌症是一種廣泛發生於野生海水魚及養殖魚種中的疾病，這種細菌性敗血症又稱為假結核症 (pseudotuberculosis)。感染此病的魚隻外觀病徵不明顯，少數魚隻會有體色變黑、頭部和鰓部輕微出血等症狀 (Tung *et al.*, 1985; Toranzo *et al.*, 1991)，其臨床病徵分為急性和慢性，急性的內部病徵為病魚的肝、腎、脾會有多處組織壞死，微血管跟腸腔的吞噬細胞有細菌菌體聚集的現象 (Tung *et al.*, 1985)；慢性的內部病徵則會在上述器官出現肉芽腫和直徑 0.5~3.5 mm 的白色結節 (Noya *et al.*, 1995)，產生肉芽腫的地方會發現有細菌聚集和壞死的吞噬細胞，表示 *Pdp* 會存活在宿主細胞中而沒被分解。此病在 1963 年首次發現於美國 Calveston Bay 的野生白鱸 (*Morone americanus*) 和條紋鱸 (*Morone saxatilis*) (Snieszko *et al.*, 1964)，當時依據其型態將此分離到的病原菌分在 *Pasteurella* 屬；後來在 1968 年 Janssen 和 Surgalla 認為此菌株之生理及血清特性有別於其他 *Pasteurella* 屬的細菌而將巴斯德桿菌症的病原菌命名為 *Pasteurella piscicida* (Janssen *et al.*, 1968)。巴斯德桿菌症好發於夏季、高水溫 (>23°C)、鹽度 20~30 ppt 和水質不佳的環境。臺灣最早是在淡水養殖鱧魚 (*Ophiocephalus maculatus*, snakehead) 發現巴斯德桿菌症 (Tung *et al.*, 1985)，並在夏季水溫偏高時期易流行於養殖海鱺 (Liu *et al.*, 2003) 與金頭鯛 (gilthead seabream) (Magarinos *et al.*, 2002)。

巴斯德桿菌症的病原體是 *Photobacterium damsela* subsp. *Piscicida* (簡稱 *Pdp*) 是一革蘭氏陰性菌，不具有運動性，可從病魚的肝、腎、脾中分離到，在不同培養條件下其型態呈類球狀 (coccoidal) 或雙極長桿狀，對 oxidase、catalase、arginine dihydrolase 呈陽性反應，而對 indole、urease、gelatinase、amylase

呈陰性反應，具有 lipase 和 phospholipase 活性 (Magariños *et al.*, 1996)，最適生長溫度在 22.5~30°C (Magariños *et al.*, 1992)。Bonet *et al.* (1994) 指出 *Pdp* 可產生莢膜性物質，此物質是由 99.6% 醣類和 0.4% 蛋白質所組成，但 *Pdp* 多醣類的莢膜和其他 *Pasteurella species* 不相似。巴斯德桿菌的宿主範圍很廣泛，包含多種海水魚，自 1990 年代起，開始蔓延地中海區域的養殖魚類和野生魚類，如海鱸、比目魚類及鯛類，其中以法國、義大利、希臘和西班牙等國最為嚴重 (Romalde, 2002)，也造成日本養殖青鮫 (yellowtail) 的大量死亡 (Egusa, 1983)。感染實驗證明對巴斯德桿菌有感受性的魚種有很多，其半致死劑量 LD₅₀ 為 10³-10⁶ cfu/g fish body weight (Magariños *et al.*, 1992b)。有研究指出 gilthead seabream 在不同魚齡時對巴斯德桿菌的感受性不同，小於 5 g 的魚對此菌有感受性，但大於 50 g 時因為免疫系統的成熟，嗜中性球和吞噬細胞能有效吞噬細菌，對 *Pdp* 的感受性降低 (Noya *et al.*, 1995)。Magariños 等 (1992) 以實驗證明，浸泡方式可使 gilthead seabream 和 hybrid striped bass 被感染，因此水是其傳染媒介之一；其它實驗數據則顯示，*Pdp* 可由口、鰓、腸胃道和皮膚感染宿主。

巴斯德桿菌症可使用 chloramphenicol 和 ampicillin 來加以控制；florfenicol、bicozamycin 及 phosphomycin 等藥對此病症亦有不錯的療效。雖然抗生素有良好的治療效果，但是卻無法長期使用，因為菌株一旦產生抗藥性後，不但正常藥量無法控制疾病，且更容易增加流行病學控制上的困難；另一方面抗生素採用口服法常難以達到效果，因為罹病後的魚隻通常食慾不振或是不攝餌，而藥浴法對於廣大的養殖水體或是箱網養殖的水浴場又難以實施。目前 *Pdp* 已對多種抗生素產生抗藥性，如 ampicillin、tetracycline、oxytetracycline 等 (Magarino *et al.*, 1992)，因此使用新藥物 florfenicol 和 phosphomycin 來控制。

魚類在感染巴斯德桿菌期間，巴斯德桿菌會短暫寄生在吞噬細胞內（Kusuda and Salati, 1993），這可解釋為何抗生素治療會產生無效的情形。

近年來有許多關於巴斯德桿菌疫苗的研究，多數以加熱或經福馬林去活化方式製成死毒疫苗（Kusuda and Hamaguchi, 1987; Kusuda and Hamaguchi, 1988），雖然有達到保護效果，但這些實驗結果的再現性並不穩定（Kusuda and Salati, 1993）。另外，使用巴斯德桿菌的脂多醣（LPS）和核酸片段製成的疫苗，其保護效果較好（Fukuda and Kusuda, 1985; Kusuda *et al.*, 1988），但也同樣有再現性不穩定與大量生產上的困難。

3. 乳酸菌

許多報告指出，乳酸菌（Lactic acid bacteria, LAB）可以當作益生菌（probiotics），乳酸菌所產生的有機酸（organic acid）與殺菌素（bacteriocin）能直接抑制或殺死很多種細菌（Mathur *et al.*, 2005）。乳酸菌能耐胃酸與膽鹽而安全進入餵食動物的消化道中（Irianto *et al.*, 2002）。消化道菌叢中約有 1~10% 的細菌具有益生菌的潛力（Sugita *et al.*, 2002）。有些乳酸菌會在動物體內與其他腸內菌競爭宿主消化道的附著空間，或直接抑制一些機會病原菌（opportunistic pathogens）（Balcázar, 2007）。有的益生菌可以促進宿主生理或免疫機能，例如透過其胞外酵素來促進宿主的消化功能（Prieur *et al.*, 1990）。有的益生菌加入養殖池中則能改善水質（Dalmin *et al.*, 2001）。

澎湖海域是海鱷放養箱網養殖的主要地區，近年來分離到的 *Pdp* 菌株已對多種抗生素具有抗藥性，又根據本實驗室對海鱷專一性免疫力的測試，發現接種不活化 *Pdp* 疫苗雖對海鱷苗能產保護效果，但保護期限與追加注射後的免疫反應強度並

不理想，且魚苗一旦下了箱網，就很難進行追加免疫，因此本實驗想在抗生素與疫苗之外，再找一種防治巴斯德桿菌症的方法。自養殖海鱺消化道分離到的三株乳酸菌，經實驗分析，發現三株菌的分泌物皆有抑制巴斯德桿菌生長的能力，再經由活體餵食試驗與 *Pdp* 攻毒試驗，證實其中一株代號為 0409 的乳酸菌，具有防治海鱺巴斯德桿菌症的潛力。

二、海鱺消化道分離之乳酸菌對抗 *Pdp* 之測試

1. 乳酸菌代謝物能抑制 *Pdp* 的生長

本試驗所用之巴斯德桿菌 *Pdp*-P40 是由澎湖科技大學古鎮鈞教授提供，以 brain heart infusion (BHI) 培養液添加 2‰ 鹽度，在 28°C 培養。三株乳酸菌 (0409, 9-33 及 O-3-P) 由澎湖科技大學胡宏熙教授自海鱺消化道分離與鑑定，並經生合生物科技股份有限公司同意後提供，以 MRS 培養液在 37°C 中培養。經 16S RNA 定序鑑菌法 (Weisburg *et al.*, 1991)，確認菌株 0409 分類上屬於 *Pediococcus pentosaceus*，而 9-33 和 O-3-P 菌株分類上則同屬 *Lactobacillus fermentum*。

為了瞭解三株乳酸菌的胞外分泌物，是否對 *Pdp* 的生長有抑制作用，先將三株乳酸菌培養至菌液吸光值 (OD₆₀₀) 為 2，離心去菌體，把三株菌的 MRS 上清液 (pH 5.2)，分別以 1:4 的比例和新鮮 BHI 培養液混合。因為乳酸菌經培養後，菌液的酸鹼值會下降至 5.2，為了瞭解酸鹼值下降是否足以讓 *Pdp* 生長受抑制，因此設計兩個對照組，第一組將無乳酸菌的 MRS 培養液酸鹼值調至 6.2，第二對照組則將無乳酸菌的 MRS 培養液酸鹼值調降至 5.2，再分別以 1:4 的比例和 BHI 培養液混合。之後，將這五組混合好的培養液 (每組 5 ml) 分別加入等量的 *Pdp* (OD₆₀₀ = 1, 100 μl)，然後測量 *Pdp* 在各組培養液中的生長曲線。

結果顯示，只改變酸鹼值 (pH 5.2) 和不改變酸鹼值 (pH 6.2) 之不含乳酸菌分泌物之培養液相比較，對 *Pdp* 生長曲線的影響不大。然而分別含三株乳酸菌分泌物之培養液，對 *Pdp* 的生長曲線則有明顯的抑制效果，其中又以菌株 LAB0409 的抑制效果最大。乳酸菌上清液酸鹼度偏酸 (pH 5.2)，顯示代謝物中含乳酸，但能抑制 *Pdp* 生長不只有 pH 值的改變，還有其他因子在其中。

乳酸菌代謝物中直接或間接有抑菌效果的成份，包括乳酸 (lactic acid)，抗菌素 (bacteriocin)，蛋白酶 (protease)，溶菌酶 (lysozyme) 及過氧化氫 (hydrogen peroxide) 等 (Balcázar *et al.*, 2006)。抗菌素 (bacteriocin) 對 G(+) 菌有抑制效果，但只對外膜遭受破壞之 G(-) 菌才有抑菌效果。*Pdp* 是 G(-) 菌，但 LAB0409 菌液 pH 值會下降至 5.2，顯示其中有乳酸分泌，而乳酸會破壞 G(-) 外膜，所以 LAB0409 分泌之抗菌素有機會對 *Pdp* 產生抑菌效果。

2. 餵食乳酸菌對海鱺苗抗 *Pdp* 之影響

在體外的細菌培養系統中，我們發現三株乳酸菌的代謝物皆有抗 *Pdp* 生長的效果，進而測試餵食三株乳酸菌對提高海鱺苗抗 *Pdp* 之潛力。製備三株乳酸菌培養液，達到相同的菌液濃度後，噴灑在人工餌料上，飼料含菌量為 10^9 CFU/g，放 4°C 保存備用。將購自屏東的海鱺苗 (體重 10 g) 分三組，分別餵食三種乳酸菌株，每天餵食量為體重的 3%，餵食兩週後進行 *Pdp* 浸泡攻毒，然後計算各組攻毒 10 天後的累積死亡率，再計算各組的相對存活率 (Relative percentage of survival, RPS)， $RPS = 1 - [(實驗組的累積死亡率/對照組的累積死亡率)] \times 100$ 。結果顯示，菌株 0409 組的 RPS 值最高 (80)，菌株 LAB9-33 組及 LABO-3-P 組的 RPS 值都小於 20。

雖然三株乳酸菌的培養上清液對培養在試管中的 *Pdp* 生長皆有抑制效果，但活體餵食及 *Pdp* 攻毒試驗結果只有 LAB0409 有保護效果；檢查餵食兩週後魚苗消化道菌，只有餵食 LAB0409 組魚

苗有再分離到相同菌株，其他兩組魚苗消化道則分離不到餵食的菌株，顯示 LAB0409 能成功地在餵食魚苗消化道中吸附生長，然後發揮其抗 *Pdp* 效果，另外兩株或是不耐魚的胃酸或是對腸黏膜附着力較弱，因此不易駐留消化道內而無法發揮抗 *Pdp* 效果。水生生物消化道菌相變動較大，一旦停止餵食特定菌之後，該菌族群就會大幅滑落 (Panigrahi *et al.*, 2004)，在本實驗中，停餵 LAB0409 一週後，魚苗消化道就測不到 LAB0409，所以要持續餵，才有持續抗 *Pdp* 的保護效果。

為了再度確認餵食 LAB0409 能提高海鱸苗抗 *Pdp* 感染，將海鱸苗分兩組，實驗組餵食含 LAB0409 之人工餌料，對照組餵食正常餌料，兩週後兩組魚一起進行 *Pdp* 浸泡攻毒，計算攻毒 10 天之後的累積死亡率，結果顯示，餵食 LAB0409 組的死亡率 (80%) 比對照組 (20%) 低了 60%，再度證實餵食 LAB0409 兩週就有助於抗 *Pdp* 之感染。

3. 餵食乳酸菌 LAB0409 對海鱸生長與先天免力之影響

將體重 4.6 g 的海鱸苗分“實驗組”與“對照組”進行兩週之餵食試驗。實驗組魚苗餵食含有 LAB0409 菌株之人工餌料，對照組則餵食不含 LAB0409 之正常人工餌料，每天餵 5% 體重的飼料量，兩週後兩組魚分別稱重，結果顯示，餵食 LAB0409 組平均體重比對照組多了 12%。

在魚類，益生菌被報導有促進白血球吞噬作用 (phagocytosis)，白血球吞噬後的呼吸爆 (respiratory burst) 活性，活化補體系統 (complement system)，促進血清溶解酶活性 (serum lysozyme)，及提高前發炎反應細胞素 (proinflammatory cytokines) 的表現 (Aly *et al.*, 2008; Arijo *et al.*, 2008; Cammarota *et al.*, 2009; Balcázar *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2006; Nikoskelainen *et al.*, 2003; Panigrahi *et al.*,

2007)。因為 *Pdp* 被白血球吞噬後，不一定會被吞噬細胞殺死，有時 *Pdp* 會潛伏在吞噬細胞內，躲避專一性中和抗體的攻擊，並隨血球細胞散佈至身體其他內臟。因 *Pdp* 對細胞內的氧化物十分敏感 (Barnes *et al.*, 1999)，若吞噬細胞具有高的呼吸爆值，就代表破壞細胞內 *Pdp* 菌的能力高，因此本實驗選擇週邊白血球的呼吸爆值作為評估先天免疫力的指標。

將海鱺苗分餵食 LAB0409 組與對照組，兩週後取週邊白血球進行呼吸爆值測試，方法參考 Choudhury *et al.*, (2005) 的報告。結果顯示，餵食 LAB0409 組魚苗的週邊白血球呼吸爆值顯著比對照組多了 20%，表示餵食組白血球更能破壞所吞噬進來的病原菌。中和抗體只能攻擊自由狀態下的 *Pdp*，無法攻擊潛伏細胞內的 *Pdp*，但提高週邊白血球呼吸爆值卻能補中和抗體防禦之不足。

4. 餵食 LAB0409 菌株對海鱺專一性抗體反應之影響

接種疫苗雖然被當作防治 *Pdp* 感染的有效防治方法，海鱺若在 50 g 以前免疫，則一定要再追加免疫才能維持高免疫力。養殖戶基於購苗費用及運輸魚苗難度，通常都購買 10~30 g 的海鱺苗下箱網養殖，一旦魚苗下箱網，追加注射免疫就變得不可行，免疫效力不足的海鱺苗，在下箱網後的 2~6 個月，經常有感染 *Pdp* 的疫情爆發。有些報告指出，乳酸菌可以促進體液免疫反應 (humoral immune response)，為瞭解餵食 LAB0409 對提升免疫後專一性抗體反應有無促進功效，將魚苗分三組，對照組魚苗 (V-L-) 沒有接種疫苗也沒餵食 LAB0409，另兩組魚苗皆接種去活化之 *Pdp* 疫苗，免疫次日起，一組餵食含 LAB0409 的人工餌料 (V+L+)，另一組則餵正常餌料 (V+L-)。分別在免疫後第二、三、四週後採血，以 ELISA 方法測專一性抗體力價。結果免疫魚的專一性抗體力價會逐週上升，但餵食 0409 (V+L+) 組與沒餵 0409 (V+L-) 組相比較，各週的抗體力價沒有差異，因此說明，餵食 0409 對專一性抗體的提升沒有促進的效果。

5. 接種 *Pdp* 疫苗之海鱺餵食 LAB0409 後對抗 *Pdp* 感染有加成保護效果

雖然免疫 *Pdp* 去活化疫苗後之海鱺苗，經兩週餵食 LAB0409 並不能提高抗 *Pdp* 之抗體量，但餵食 LAB0409 能顯著提高白血球破壞所吞噬之病原菌的能力。因此將魚分三組，第一組沒有免疫也沒餵食 LAB0409 (V-LAB-)，第二組有免疫但沒餵 LAB0409 (V+L-)，第三組有免疫並餵 LAB0409 (V+L+) 兩週之後，三組魚苗進行 *Pdp* 浸泡攻毒，計算 10 天後的累積死亡率。結果單單接種去活化之 *Pdp* 疫苗組(V+L-)的死亡率(25%)比負對照組(V-L-)的累積死亡率(60%)低了 35%，接種疫苗後加餵 LAB0409 組(V+L+)的死亡率只有 5%，所以免疫並餵食 LAB0409 對抗 *Pdp* 感染有加成保護效果。因此，LAB0409 對海鱺而言是一株益生菌，能促進成長及提高抗 *Pdp* 的能力。雖然餵食乳酸菌不一定馬上能提高專一性抗體反應，但有報告指出乳酸菌仍能改進抗原表現細胞 (antigen presenting cells, 如 dendritic cells) 對病原菌的攝取，以及延後疫情的爆發 (Rescigno *et al.*, 2001; Singh *et al.*, 2009)。

三、結語

臺灣養殖的海鱷苗，自陸上養殖池剛移進箱網養殖的前兩個月，最易罹患巴斯德桿菌症而造成嚴重死亡。此症一般以抗生素做為治療方法，但近年來在澎湖地區的養殖魚已分離到許多抗藥性菌株。使用不同條件製備之巴斯德桿菌疫苗，以不同免疫策略皆能使海鱷苗產生免疫力，但疫苗的保護效果在田間試驗及養殖戶實際經驗中並不穩定。本研究自養殖海鱷消化道中所分離到一株代號為 0409 的乳酸菌，混合人工餌料餵海鱷苗兩週後，餵食組魚苗體重比對照組增加 12%，續以 *Pdp* 進行浸泡攻毒試驗，餵食組的相對存活率可高達 80%，又發現餵食組的白血球呼吸爆數值明顯高於對照組，具更高效率殺死可能潛伏在吞噬細胞內的 *Pdp*；海鱷苗接種不活化 *Pdp* 疫苗後再餵食乳酸菌株 LAB0409，對免疫後的魚有加成抗 *Pdp* 感染的效果，故證明乳酸菌株 LAB0409 有潛力成為防治巴斯德桿菌症的益生菌。因此建議，在海鱷苗下箱網前先進行 *Pdp* 疫苗接種，下箱網後則持續餵食含 LAB0409 飼料，對巴斯德桿菌症將有預防的效果。

參考資料

- 古鎮鈞、陳秀男 (2000) 台灣海鱺繁殖、養殖技術現況與評析。海鱺箱網養殖研討會, 39-49 頁。
- 劉秉忠、蔡俊男、李國誥 (2005) 箱網養殖海鱺細菌性疫苗開發及有效性研究。漁業署養殖特刊 9 魚病研究專輯 22, 41-50 頁。
- 方宜鈞 (2009) 巴斯德桿菌去活化疫苗不同免疫策略對海鱺專一性免疫反應之影響。國立臺灣大學動物學研究所碩士論文。
- 刑辰馥 (2010) 餵食乳酸菌對海鱺抗發光桿菌症之保護作用。國立臺灣大學動物學研究所碩士論文。
- Balcázar, J.L., Vendrell, D., de Blas, I., Ruiz-Zarzuela, I., Gironés, O. and Múzquiz, J.L. (2007) *In vitro* competitive adhesion and production of antagonistic compounds by lactic acid bacteria against fish pathogens. *Vet Microbiol* 122, 373-380.
- Bonet, R., Magarinos, B., Romalde, J.L., Simon-Pujol, M.D., Toranzo, A.E. and Congregado, F. (1994) Capsular polysaccharide expressed by *Pasteurella piscicida* grown *in vitro*. *FEMS Microbiology Letters* 124, 285-289.
- Dalmin, G., Kathiresan, K. and Purushothaman, A. (2001) Effect of probiotics on bacterial population and health status of shrimp in culture pond ecosystem. *Indian J Exp Biol* 39, 939-942.
- Egusa, S. (1983) Disease problems in cultured yellowtail, *Seriola quinqueradiata*, culture: a review. *Rapports et proces-verbaux des reunions Conseil International pour l'exploration de la mer* 182, 10-18.
- Fukuda, Y. and Kusuda, R. (1985) Vaccination of yellowtail against pseudotuberculosis. *Fish Pathol* 20:421-425.
- Irianto, A. and Austin, B. (2002) Probiotics in aquaculture. *J Fish Dis* 25, 633-642.

- Janssen, W.A. and Surgalla, M.J. (1968) Morphology, Physiology, and Serology of a *Pasteurella* Species Pathogenic for White Perch (*Roccus americanus*). *J Bacteriol* 96, 1606-1610.
- Kusuda, R. and Hamaguchi, M. (1987) A comparative study on efficacy of immersion and combination of immersion and oral vaccination methods against pseudotuberculosis in yellowtail. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries* 53, 1005-1008.
- Kusuda, R. and Hamaguchi, M. (1988) The efficacy of attenuated live bacterin of *Pasteurella piscicida* against pseudotuberculosis in yellowtail. *Bull Eur Ass Fish Pathol* 8, 51-53.
- Kusuda, R. and Salati F. (1993) Major bacterial diseases affecting mariculture in Japan. In: Faisal M, Hetrick FM (eds) Annual review of fish diseases. Pergamon Press. New York, pp.69-85
- Kusuda, R., Ninomiya, M., Hamaguchi, M. and Muraoka, A. (1988) The efficacy of ribosomal vaccine prepared from *Pasteurella piscicida* against pseudotuberculosis in cultured yellowtail. *Fish Pathol* 23, 191-196.
- Liu, P.C., Lin, J.I.Y. and Lee, K.K. (2003) Virulence of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* in cultured cobia *Rachycentron canadum*. *Journal of Basic Microbiology* 43, 499-507.
- Magariños, B., Romalde, J.L., BANDIN, I., FOUZ, B. and Toranzo, A.E. (1992) Phenotypic, Antigenic, and Molecular Characterization of *Pasteurella piscicida* Strains Isolated from Fish. *Applied and Environmental Microbiology* 58, 3316-3322.
- Mathur, S. and Singh, R. (2005) Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria - a review. *Int J Food Microbiol* 105, 281-295.

- Morinigo, M.A., Romalde, J.L., Chabrillon, M., Magarinos, B., Arijo, S., Balebona, M.C. and Toranzo, A.E. (2002) Effectiveness of a divalent vaccine for gilt-head sea bream (*Sparus aurata*) against *Vibrio alginolyticus* and *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists* 22, 298-303.
- Noya, M., Magariños, B., Toranzo, A.E. and Lamas, J. (1995) Sequential pathology of experimental pasteurellosis in gilthead seabream *Sparus aurata*. A light- and electron-microscopic study. *Diseases of Aquatic Organisms* 21, 177-186.
- Prieur, G., Nicolas, J.L., Plusquellec, A. and Vigneulle, M. (1990) Interactions between bivalves molluscs and bacteria in the marine environment. *Oceanogr Mar Biol Annu Rev* 28, 227-352.
- Romalde, J.L. (2002) *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*: An integrated view of a bacterial fish pathogen. *International Microbiology* 5, 3-9.
- Singh, V., Singh, K., Amdekar, S., Singh, D.D., Tripathi, P., Sharma, G.L. and Yadav, H. (2009) Innate and specific gut-associated immunity and microbial interference. *FEMS Immunol Med Microbiol* 55, 6-12.
- Snieszko, S.F., Bullock, G.L., Hollis, E. and Boone, J.G. (1964) *Pasteurella* sp. from an epizootic of white perch (*Roccus americanus*) in Chesapeake Bay tidewater areas. *Journal of Bacteriology* 88, 1814-1815.
- Sugita, H., Okano, R., Suzuki, Y., Iwai, S., Mizukami, M., Akiyama, N. and Matsuura, S. (2002) Antibacterial abilities of intestinal bacteria from larval and juvenile Japanese flounder against fish pathogens. *Fisheries Sci* 68, 1004-1011.

- Toranzo, A.E., Barreiro, S., Casal, J.F., Figueras, A., Magariños, B. and Barja, J.L. (1991) Pasteurellosis in cultured gilthead seabream (*Sparus aurata*): first report in Spain. *Aquaculture* 99, 1-15.
- Tung, M.C., Tsai, S.S., Ho, L.F., Huang, S.T. and Chen, S.C. (1985) An acute septicemic infection of *Pasteurella* organism in pond-cultured Formosa snake-head fish (*Channa maculata Lacepede*) in Taiwan. *Fish Pathology* 20, 143-148.
- Weisburg, W., Barns, S., Pelletier, D. and Lane, D. (1991) 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J Bacteriol* 173, 697-703.