

# 틸라피아에서 分離한 *Edwardsiella tarda*의 性狀과 抗原性에 대하여

吳 明 柱 · 田 世 圭

釜山水産大學 水族病理學科

## Characteristics and Antigenicity of *Edwardsiella tarda* Isolated from Tilapia (*Oreochromis niloticus*)

Myung-Joo OH · Seh-Kyu CHUN

Department of Fish Pathology,

National Fisheries University of Pusan, Pusan, 608-023, Korea

In March 1987, a bacterial disease occurred among cultured tilapia (*Oreochromis niloticus*), in the aquarium of Fish Pathology Laboratory of National Fisheries University of Pusan. The diseased fish showed abdominal inflammation of ascites.

The causative organisms isolated from the kidney were Gram negative rods. On SS agar colonies developed within 48 hours at 25°C.

On the basis of the morphological and biochemical characteristics, the organisms were identified as *Edwardsiella tarda*.

They were sensitive to chloramphenicol, ampicilline and oxytetracycline. The pathogenicity was proved positive by intraperitoneal injection.

Three kinds of antigen were prepared with *E. tarda* for the immune response in tilapia : i.e., by inactivating the strain with 0.4% formalin for 24 hrs at 25°C, ultrasonicing it 3 times with 5 watts for 30 seconds each time and filtrating it through millipore filter.

The formalin killed antigen showed good efficacy at the injection concentration of over 10<sup>7</sup> cells per fish of 50g.

All the immunized tilapia showed only a little agglutination titer to the three antigens.

The highest survival rate was recorded in challenged tilapia immunized with formalin killed cells.

### 緒 論

*Edwardsiella tarda*는 뱀장어 *Anguilla japonica*에 있어서 “기적병 Red disease”의 原因菌으로 *Paracolobacte-*

*rum anguillimortiferum* (Hoshina, 1962)으로 發表된 이후 1965년 國際裁定委員會에서 *E. tarda*로 정하여져 불리워지는 균이다.

*E. tarda*는 다른 細菌과 마찬가지로 養殖環境水 中에

存在한다. (Ishihara *et al.*, 1982 ; Minagawa *et al.*, 1983 ; Wyatt *et al.*, 1979 ; Yasunaga *et al.*, 1982 ; Wakabayashi *et al.*, 1977).

養殖魚類에서 각 魚種別로 *E. tarda*에 感染된 예를 보면, 뱀장어(Aoki *et al.*, 1977 ; Kanai *et al.*, 1977 ; Ishihara and Kusuda, 1981), 차널메기 *Ictalurus punctatus* (Miyazaki *et al.*, 1985), 메기 (Wyatt *et al.*, 1979), 숭어 *Mugil sephalus* (Kusuda *et al.*, 1976), Chinook salmon(Amandi, 1982), 광어 *Paralichthys olivaceus* (Miyazaki *et al.*, 1985 ; Nakatsugawa, 1983 ; Yasunaga *et al.*, 1982), 틸라피아 (Miyashita, 1984 ; Kaige *et al.*, 1986), 비단잉어 (Sae-Oui *et al.*, 1984) 등이 있다.

1980年代에 들어 養殖魚種이 다양해지고 技術이 발전됨에 따라 魚類養殖에서는 비닐하우스를 이용한 加溫式 高密度 養殖方法이 널리 補給되어 여러가지 魚類를 年中 養殖하고 있다. 이러한 곳으로부터 일어나는 細菌性疾病에 관한 보고가 있다(田等, 1985).

틸라피아는 現在 우리나라에서 가온식 고밀도 사육 방법으로 널리 養殖되고 있는 主要魚種이다. 에드워드병에 대한 예방대책의 일환으로 vaccine에 대한 研究가 보고 되고 있는데, Song and Kou(1981)는 뱀장어에 있어서 本菌의 침적방법에 대한 면역응답에 대하여, Ullah等(1983)은 本菌의 침입에 의하여 생산되는 외독소성 물질에 대하여 보고하였고, Salati等은 *E. tarda*에 대한 면역을 위해 백신의 제조 및 뱀장어에 대한 *E. tarda*의 LPS의 免疫効果에 대하여 보고하고 있다 (1984,1985,1986,1987).

1987年 3月 水大 魚病學 實驗室에서 飼育되고 있던 틸라피아에서 에드워드병이 발생하였으므로 그 原因菌을 분리하여 분리菌의 性狀을 알아보고 試驗抗原의 抗原성을 檢討하여 여기에 報告하는 바이다.

## 材料 및 方法

### 1. 原因菌의 分離와 同定

原因菌의 분리에는 體長 13.5cm(13~15cm), 體重 45g(42~51g)의 틸라피아 5마리를 사용하였다.

分離 部位는 腎臟, 肝臟, 脾臟에 나타난 結核과 腸管의 壞死性 部位로서 Wyatt *et al.*(1979)의 方法에 準하여 SS(Salmonella-Shigella) 한천평판 배지에 도말하

여 25°C, 48시간 배양하여서 發育 되어진 集락중 周邊部가 無色 투명하고 중심부가 黑色의 消化수소를 생산하는 전형적인 *E. tarda* 集락을 따서 原因菌을 분리하였다.

生化學的 性狀 實驗은 Bergey's manual of Systematic Bacteriology(1984)와 Cowan and Steel manual(1974)에 準하여 Mac-Faddin(1980)의 方法으로 하였다.

이상의 과정을 간단히 하면 그림1과 같다.

### 2. 病原性 試驗

分離菌株를 TSA배지에서 25°C, 48시간 培養한 後 集菌하여 滅菌生理食鹽水(0.85% NaCl)로 일정 菌數가 되게 菌 浮遊액을 만들었다. 이 액을 病感染의 經驗이 없는 平均體重 50g(45~53g)의 틸라피아 腹腔內에 菌의 농도가  $10^2 \sim 10^6$  cells/fish가 되게 0.1ml씩을 주사하였다. 주사후 20일간에 걸쳐 觀察하였으며 이때 各區의 주사 개체수는 10마리씩이었다.

實驗 기간중 死亡魚의 死亡率 및 死亡魚로부터 集菌의 再分離實驗을 하였다. Behrens-Käber의 法則에 의해 48-LD50을 구했으며, 實驗 기간중 水温은 24°C(23~25°C)로 조정하였고, 비닐과판 濾過槽를 各試驗 區別로 各各 사용하였다.

### 3. 藥劑感受性 및 MIC

TSA평판 배지를 이용한 Disc法으로 藥劑 感受性 조사를 하였고, 液體 배지 희석법으로 MIC를 구하였다.

### 4. 免疫學的 實驗

試驗魚는 未感染이 確認된 동일 수조의 平均體重 50g(45~53g)의 틸라피어를 사용하였다.

濾過槽가 부착된 水槽(60ℓ)에 수용하여 1週日間 馴致시킨 후 健康한 개체만 선별하여 各 試驗區당 50마리씩 사용하였다. 飼育水로는 地下水를 사용했으며 1日 1/3씩 環水하였고, 水温은  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 로 하였으며, *E. tarda*에 대한 事前 免疫獲得과 感染 여부를 確認하기 위해 試驗魚로부터 血清을 分離하여 本 實驗에 사용한 *E. tarda*와의 슬라이드 凝集反應을 조사하였다.

免疫試驗用 抗原은 3가지로 製作하였다. TE-8703 菌株를 TSA평판배지에서 25°C, 72시간 培養하고 이것

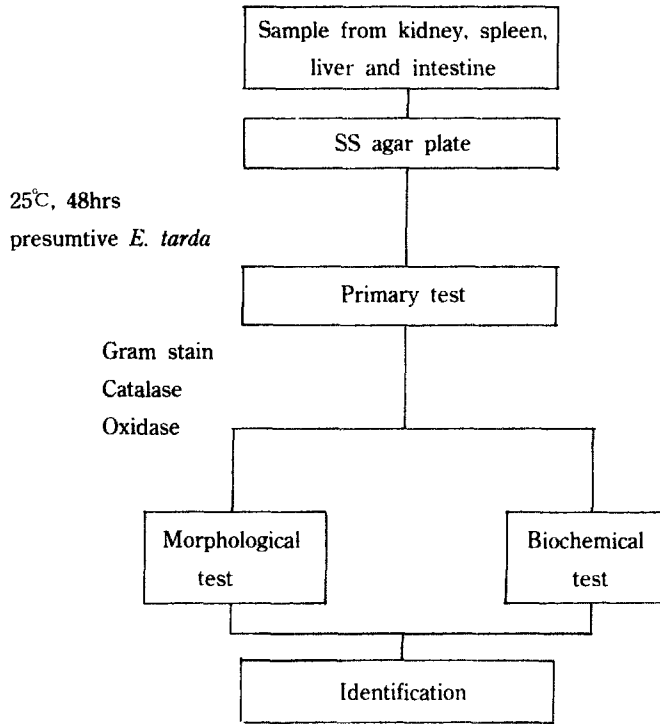


Figure 1. Scheme for detection of *Edwardsiella tarda* from diseased tilapia.

을 항원제작용 菌液으로 사용하였다. 항원제작은 첫째 포르말린 死菌항원으로, 배양된 菌液에 최종농도가 0.4% 되도록 포르말린을 添加하여 24시간 동안 室温에서 방치하여 不活化한 後 10,000rpm, 10분간 遠心分離하여 上등液을 버리고, 남은것을 PBS(phosphate buffers saline)로 3회 세척하여서 포르말린 死菌抗原으로 하였다. 두번째로 초음파 처리抗原은 菌을 원심분리(10,000rpm, 10분)로 集菌한 後 초음파처리(5watts, 30secs, 3회)하여 10mg/ml로 희석시켜 제작했다. 그리고 세번째로 액체배지에 배양된 液을 원심분리하여 상등액을 millipore filter(pore size : 0.45µm)로 여과한 후 PEG(polyethylenglycol)2000,1500으로 농축시키고 다시 PBS로 총량이 5ml가 되도록 재투석하여 菌여과액 항원을 제작하였다. 이러한 세가지 항원의 제작을 간단히 하면 그림2와 같다.

이렇게 하여 제작된 3종의 항원을 각각 1週에서 5週까지 1週 간격으로 1마리당 0.1ml씩 각각 복강내에 주사하였으며 各 週마다 접종후 5일뒤에 세가지의 試

驗抗原 접종구 및 대조구의 試驗魚에서 血清을 분리하여 Salati *et al.*(1987)의 방법에 準하여 포르말린 死菌과의 응집역가를 Microtiter법으로 비교하였다. 5회째까지 면역 접종된 세가지 구의 鰓라피아 각 10마리씩에 TE-8703菌株  $1 \times 10^6$  Cells로 복강주사하고, 免疫效果를 조사하였다.

### 結 果

1. 原因菌의 分離 : 試驗魚로 사용한 5마리의 鰓라피아 腎臟에서 같은 形態의 集락을 얻을 수 있었으며 그것의 形態는 Gram음성의 運動性 短桿菌으로서 鞭毛를 지니고 있으며 細菌의 크기는  $0.7 \times 2.5 \mu\text{m}$  정도였고, 일반적인 TSA 평판 배지에서 자라고 SS배지에서 選擇적으로 성장하였다. 表1은 25°C에서 48시간 동안 SS한천배지에서 자란 集락의 形態의 特徵을 표시한 것이다.

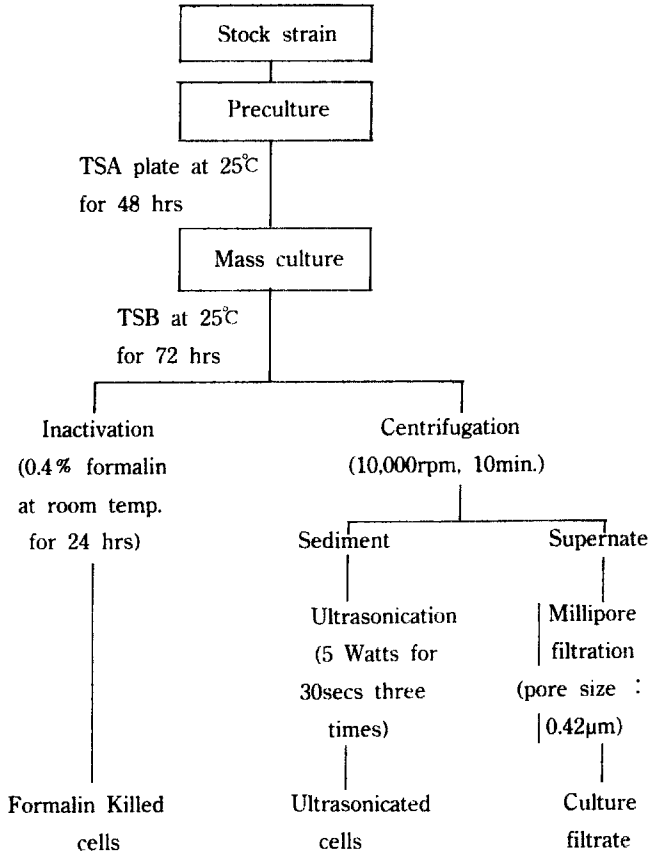


Figure 2. Preparation of Immunogen

Table 1. Morphological Characteristics of the strain isolated from infected tilapia

Colony form	Circular Convex Entire
Colony pigment	TSA : Whitish gray SS agar : Central black
Colony size	1.5-2mm
Cell form	Rod
Cell size	0.7×2.5µm
Flagella	Peritrichous
Motility	Positive
Gram Stain	Negative

2. 生化學的 性狀 : 腎臟에서 分離한 原因菌 TE-8703의 生化學的인 性狀 實驗 結果는 表2에 表示하였다. 分離菌의 主要한 性狀은 catalase 陽性, oxidase 陰性, TSI에서 H<sub>2</sub>S를 生成하며, 窒酸鹽을 還元시키고, methylred試驗 陽性이었으나, citrate利用과 gelatin液化는 陰性이었고, 炭水化物 中에서 mannitol, sucrose, lactose, salicin 등은 酸이 生成되지 않았다.

以上의 結果는 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology(1984)에서의 *E. tarda*의 定義와 Cowans and Steel manual(1974)의 定義와 일치하고, Wakabayashi et al.(1973), Miyasita(1984)와 比較하여 本 實驗에서 分離한 原因菌 TE-8703은 *Edwardsiella tarda*로 同定 된다.

Table 2. Biochemical characteristics of the present strain, compared with those of *Edwardsiella tarda* described by Wakabayashi and Egusa, 1973(from eels), and Miyashita, 1984(from tilapia)

Characteristics	Present strain	Bergey's manual('84)	<i>E. tarda</i> from eels	<i>E. tarda</i> from tilapia
Catalase test	+	+	+	+
Oxidase test	-	-	-	-
Nitrate reduction	+	+	+	+
Simons' citrate	-	-	-	-
MR test	+	+	+	+
VP test	-	-	-	-
OF test	F	F	F	F
Starch hydrolysis	-	-	-	-
Decarboxylation of :				
lysine	+	+	+	+
arginine	-	-	-	-
ornithine	+	+	+	+
Gelatin hydrolysis	-	-	-	-
H <sub>2</sub> S from TSI	+	+	+	+
Indole	+	+	+	+
Urea hydrolysis	-	-	-	-
Acid from :				
glucose	+	+	+	+
xyluse	d	-	-	-
sucrose	-	-	-	-
lactose	-	-	-	-
maltose	+	+	+	+
mannitol.	-	-	-	-
salicin	-	-	-	-

+ : positive reaction

- : negative reaction

F : fermentative reaction

d : diverse reaction

3. 藥劑感受性 및 MIC : Disc法에 의해 測定한 藥劑感受性的 結果는 表3에 表示한 바와같이 chloramphenicol, ampicillin 및 oxitetracycline에 높은 感受性을 나타냈으며, 이 세가지 藥劑의 MIC는 各各 8.2 $\mu$ g./ml, 8.3 $\mu$ g./ml, 6.9 $\mu$ g./ml 였다.

4. 病原性 및 48-LD50 : 水温 24 $^{\circ}$ C에서 *E. tarda* TE-8703菌株의 틸라피아에 대한 病原性 實驗에서 接种后 2일이 지난뒤의 死亡率을 表4에 나타내었다. 接种量이 10<sup>6</sup>cells/fish에서는 100% 치사되었고, 10<sup>3</sup>cells/fish와 대조구에서는 치사생체가 없었다. 그러나 4일후에 10<sup>6</sup>에서 10<sup>8</sup>cells/fish의 구에 살아 남아있던

Table 3. Sensitivity to chemotherapeutic agents and MIC of *E. tarda* isolated from diseased tilapia

Chemotherapeutical agents	Concentration( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )							MIC( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	
	300	150	50	30	10	5	2		0.5
Tetracycline				+	+	-			
Chloramphenicol				+++	++	+			8.2
Amoxicillin				+	+	+			
Erythromycin					+		-	-	
Kanamycin				+	+	-			
Sulfisoxazole	+++	++	+						
Sulfisomezole	+++	++	+						
Gentamycin					+	+	-		
Oleandomycin					-	-	-		
Ampicillin					++				8.3
Oxytetracycline				+++					6.9

+++ : strongly sensitive  
 ++ : mediately sensitive  
 + : weekly sensitive  
 - : insensitive

魚類가 모두 죽었으며, 7일째에  $10^5$ ,  $10^4$  cells/fish의 구간 死亡率이 80%에 이르렀으나 그 이후 20일까지의 觀察에서는 더 이상의 死亡魚는 나오지 않았다.

實驗始作 20일까지의 폐사개체는 전체적으로 内外部的인 증상이 菌分離魚의 것과 동일하게 나타났으며, 接種菌의 再分離가 可能했다.

Behrens-Käber의 방법에 따라 2일간의 반수 치사

농도인 48LD50을 계산한 결과  $10^{6.4}$  cells/fish로 나타났다.

5. 免疫學的 實驗 : 5주간에 걸쳐 각 週마다 얻어진 抗體價의 變化는 表5와 같이 나타났다. 포르말린 死菌抗原과 菌濾過液抗原의 항체가 초음파처리에 비해 높게 나타났으며 接種 4주후부터는 抗體價의 變化가 없었다.

공격시험의 결과 포르말린사균區는 死亡魚가 없었으나, 菌濾過液區는 10%의 死亡率을 보인 반면, 초음파처리區는 50%가 死亡하였다(表6).

Table 4. Pathogenicity for tilapia of *E. tarda* TE-8703

Injected cell number/fish	No. of fish died/tested
$10^9$	10/10
$10^8$	9/10
$10^7$	5/10
$10^6$	4/10
$10^5$	2/10
$10^4$	1/10
$10^3$	0/10
Control	0/10

### 考 察

Bergey's Manual of Systematic Bacteriology(1984)와 Cowan and Steel manual(1974)에서는 *Edwardsiella tarda*에 대하여 周毛性的 桿菌으로 莖膜을 가지고 있지 않으며, mannitol, arabinose, sucrose를 이용하지 않고, TSI에서  $\text{H}_2\text{S}$ 를 生成하며, indol을 생산하고 lysin 및 ornithin을 脱炭酸시킨다. 또한 catalase陽性, oxidase陰性이며, 運動性이 있고, Gram陰性的 好氣性 및 通

Table 5. Agglutination titer in tilapia which were immunized with formalin killed cells, sonicated cells and culture filtrate from *E. tarda* TE-8703

Immunogen *	Agglutination titer				
	1st	2nd	3rd	4th	5th
Formalin killed cells	32	32	64	128	128
Sonicated cells	4	8	16	32	32
Culture filtrate	16	16	32	128	128
Control	-	-	-	-	4

\* Injection dose : 0.1ml( $1 \times 10^8$  cells/ml)/fish

Table 6. Protective immunogenicity of formalin killed cells, sonicated cells and culture filtrate prepared from *E. tarda* TE-8703 in tilapia

Immunogen	Number of fish immunized and challenged	Number of viable cells injected *	Mortality (10 days after)
Formalin killed cells	10	$1 \times 10^8$ cells/fish	0/10
Sonicated cells	10	$1 \times 10^8$ cells/fish	5/10
Culture filtrate	10	$1 \times 10^8$ cells/fish	1/10
Control	10	$1 \times 10^8$ cells/fish	10/10

\* Tilapia were injected intraperitoneally with *E. tarda* TE-8703 viable cells after five injections at one week intervals to boost immunogenicity

性嫌氣性的細菌이다 라고 定義하고 있다. 本 實驗의 結果 이러한 것들이 일치하며, 또한 Wakabayashi(1973)가 뱀장어에서 분리한 菌과 Miyashita(1984)가 튀라피아에서 분리한 *E. tarda*와 그 生化學的 性狀이 일치하므로 本 實驗에서 분리한 原因菌 TE-8703은 *E. tarda*로 동정함이 타당하다고 본다. *E. tarda*의 分離를 위해 Amandi *et al.*(1982), Kusuda(1977), Ishihara(1981), Yasunaga(1982)는 BHI한천배지를 사용했으며, Wyatt *et al.*(1979)는 환경수중에 있는 *E. tarda*의 분리 및 메기에서의 同菌分離에 DSSS(double strength salmonella shigella)액체 배지를 사용하였고 더불어 SS agar에서의 細菌分離를 행했다. 또한 Minagawa *et al.*(1983)도 DSSS를 前培養배지로 사용하였고, 배양된 菌을 SS한천평판 배지에 도말하여 菌同定에 사용하였다.

本 實驗에서는 TSA와 SS한천 배지를 混用하였는데 選擇 배지로서 SS한천 배지는 순수한 집락을 얻을 수

있었다. Aoki *et al.*(1981,1976)에 의하면 뱀장어 양식에 있어 *E. tarda*를 구제하기 위해 여러가지 항생제를 사용하였을때 약제 내성의 증가로 인해 菌에 影響을 주지 못하고 더욱더 높은 농도의 약제사용을 必要로 하게 되는데, 이는 R-plasmid의 자체생성으로 인하여 이것이 藥劑의 내성에 관계하기 때문이다라고 했다. 本 藥劑感受性 實驗에서도 약제의 감수성에는 차이가 나타났는데 이는 약품에 대한 내성의 관계가 원인으로 생각된다. Amandi *et al.*(1982)는 연어과 魚類에서 분리한 *E. tarda*를 메기, 무지개송어 등에서 병원성실험을 행하였는데 18°C에서 복강주사법으로 實驗하여 그 반수 치사농도가  $4.0 \times 10^5$ 에서  $5.6 \times 10^6$ 이었고 그보다 낮은 12°C에서의 치사농도는  $1.7 \times 10^6$ 에서  $6.4 \times 10^7$ 까지 높게 나타났다고 했으며, Nakatsugawa(1983)는 광어에서 *E. tarda*를 분리하여 분리균을 광어와 방어에 대해 병원성 실험을 행해 높은 병원성을 確認했다. 本 實驗에서

분리한 TE-8703은  $10^6$  cells/fish의 농도로 복강 주사했을 때 2일내에 전체 死亡하며 그 반수치사농도가  $10^{6.4}$  cell로 나타나는 높은 병원성을 가진 균으로 인정된다. 魚類에 만연되는 細菌性疾病의 예방을 위한 방법으로 免疫의 方法을 Duft가 試驗한 이후, Fryer(1976)는 연어과 魚類에 나타나는 virus와 細菌의 感染豫防을 위하여 인위적으로 항원을 제작하여 實驗하였으며, Song and Kou(1981)는 浸漬方法으로 *E. tarda*에 대한 백장어의 免疫應答試驗을 했다.

Ullah(1983)는 *E. tarda*가 분비하는 외독소성 물질에 대하여 實驗하였는데 그에 따르면 외독소로서 두가지의 성질을 가지는 물질을 분비한다고 했다. Salati et al.(1984)는 *E. tarda*에서 LPS를 추출해내어 백장어에 대한 항체형성과 방어면역에 대하여 보고했다. 本 實驗에서는 세가지의 항원을 제작하여 복강주사에 의한 방법으로 면역을 시킨후 그 効果를 항체가로 나타내 보았으며, 그 항원성을 確認하기 위해 공격실험을 했는데, 실험 결과로 볼때 포르말린 사균항원과 세균여과액항원의 면역구에서 비교적 높은 응집가를 얻을 수 있었으며 4週째 까지의 응집가는 1주에 비해 2 order가 높아졌으나 4주이후에는 變化가 없었다. 또한 면역구에 대한 공격시험에서 LD50이  $10^{6.4}$ 인 생균  $10^6$  cells/fish를 주사하였을때 포르말린 사균 면역구가 가장 높은 生存率을 나타내었으나 초음파처리 항원으로 면역 시킨 구의 死亡率이 50%에 이르렀다. 이것으로 볼때 포르말린 사균항원과 균여과액항원은 시험어체에 항체를 형성시키는 항원성이 있다고 생각된다.

## 要 約

1987年 3月 釜山水産大學 魚病學 實驗室에서 飼育中이던 틸라피아 (*Oreochromis niloticus*)에 細菌性 疾病이 發生하여 慢性的으로 몇마리씩 斃死하였다.

本 研究는 이러한 疾病의 原因을 밝히기 위하여 原因菌을 分離하였으며, 型態的, 生化學的 性狀을 觀察하고 病原性, 藥劑感受性 實驗을 하였으며 試驗抗原을 制作하여 그 抗原성을 조사하였는바, 그 結果를 要約하면 다음과 같다.

1. 病魚에서 分離된 原因菌은 *Edwardsiella tarda*로 同定되었다.

2. 分離菌을 틸라피아에 접종하여 再現性實驗을 한 結果 전형적인 *E. tarda*의 감염증상을 나타내고 死亡했으며, 魚類로부터 同-菌을 얻을 수 있었다.
3. 分離菌은 oxytetracycline에서 感受性이 높았고, MIC는 6.9로 나타났다.
4. 分離菌은 病原性이 강한 菌이었으며, 48-LD50은  $10^{6.4}$  cell/fish 이었다.
5. 試驗抗原으로, 포르말린사균항원, 초음파처리항원, 균여과액항원을 사용하였으며, 이 세가지를 사용한 抗原性試驗 結果 포르말린사균항원의 시험구에서 높은 응집가와 방어력을 나타내었다.

## Referance

- Amandi, A., S. E. Hiu, I. S. Rohovec and J. L. Fryer (1982) : Isolation and characterization of *Edwardsiella tarda* from fall chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). Appl. Environ. Microbiol. 1380-1384.
- Aoki, T., T. Arai, and S. Egusa (1977) : Detection of R-plasmids in naturally occurring fish pathogenic bacteria, *E. tarda*. Microbiol. Immunol. 21(2), 77-83.
- Aoki, T. and T. Kitao (1981) : Drug resistance and transferable R-plasmids in *E. tarda* from fish culture ponds. Fish Pathol. 15(3/4), 277-281.
- Buchanan, R. E. and N. E. Gibbons (1974) : Bergeys manual of systematic bacteriology, Williams and Wilkins, Co., Baltimore, 486-491.
- Bullock, G. L. and R. L. Herman (1985) : *Edwardsiella* infections of fishes, United States Dept. of the Interior, Washington, D.C., Fish Disease Leaflet 71.
- Cowan, S.T. (1974) : Manual for the identification of medical bacteria 2nd ed., Cambridge Univ. Press. Chap. 7.
- Chun, S. K., S. K. Shon, and J. W. Kim (1985) : Evaluation of a revolving plate-type biofilter for use in recirculating eel. Kor. Fish. Soc. 18(6), 563-570.



- Fryer, J. L., J. S. Rohovec, G. L. Tebbit, and J. S. McMichael (1976) : Vaccination for control of infectious diseases in pacific salmon. *Fish Pathol.* 10(2), 155-164.
- Hoshina, T. (1962) : On a new bacterium, *Paracolobacterium anguillimortiferum* n.sp., *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* 28, 162-164.
- Ishihara, S. and R. Kusuda (1981) : Experimental infection of elvers and anguillettes with *E. tarda* bacteria in environmental water. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* 42(3), 271-275.
- Kusuda, R., T. Itami, M. Munekiyo, and H. Nakajima (1977) : Characteristics of a *Edwardsiella* sp. from an epizootic of culture crimson sea breams. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* 43(2), 129-134
- Minagawa, T., T. Nakai, and K. Muroga (1983) : *E. tarda* in eel culture environment. *Fish Pathol.* 17(4), 243-250
- Miyashita, T. (1984) : *P. fluorescens* and *E. tarda* isolated from diseased tilapia. *Fish Pathol.* 19(1), 45-50.
- Salati, F., K. Kawai, and R. Kusuda (1983) : Immunoresponse of eel against *E. tarda* antigens. *Fish Pathol.* 18(3), 135-141.
- Salati, F., K. Kawai, and R. Kusuda (1984) : Immunoresponse of eel to *E. tarda* lipopolysaccharide. *Fish Pathol.* 19(3), 187-192.
- Salati, F. and R. Kusuda (1985) : Vaccine preparations used for immunization of eel against *E. tarda* infection. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* 52(8), 1233-1237.
- Song Y. I. and G. H. Kou (1981) : The immunoresponse of eel against *E. anguillimortifera* as studied by the immersion method. *Fish Pathol.* 15(3/4), 249-25.
- Ullah, M. A. and T. Arai (1983) : Pathological activities of the naturally occurring strains of *E. tarda*. *Fish Pathol.* 18(2), 65-70.
- Ullah, M. A. and T. Arai (1983) : Exotoxic substance produced by *E. tarda*. *Fish Pathol.* 18(3), 71-75.
- Wakabayashi, H. and S. Egusa (1973) : *E. tarda* associated with pond-cultured eel disease. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* 39(9), 931-936.
- Waltman, W. D., E. B. Shotts, and T. C. Hsu (1986) : Biochemical and enzymatic characterization of *E. tarda* from the United States and Taiwan. *Fish Pathol.* 21(1), 1-8.
- Wyatt, L. E., R. Nickelson, and C. Vanderzam (1979) : *E. tarda* in freshwater catfish and their environment. *Appl. Environ. Microbiol.* 38(4), 710-714.
- Yasunaga, N. S., S. Ogawa, and K. Hatai (1982) : Characteristics of the fish pathogen *Edwardsiella* isolated from several species of culture marine fish. *Bull. Nagasaki Prefect. Inst. of Fish.* 8, 57-65.