

내수면 양식 어류에서 분리된 *Edwardsiella* 속 균주들의 유전학적 동정 및 생화학적 특성

장문희* · 김근용** · 이유희* · 오윤경* · 이정호* · 송준영*†

*국립수산과학원 내수면양식연구센터, **아쿠아젠텍㈜

Genetic Identification and Biochemical Characteristics of *Edwardsiella* Strains Isolated from Freshwater Fishes Cultured in Korea

Mun Hee Jang*, Keun-Yong Kim**, Yu Hee Lee*, Yun Kyung Oh*,
Jeong-Ho Lee* and Jun-Young Song*†

*Inland Aquaculture Research Center, National Institute of Fisheries Science,
Changwon 51688, Republic of Korea

**Department of Genetic Analysis, AquaGenTech Co., Ltd, Busan 48300, Republic of Korea

The genus *Edwardsiella* belonging to the family *Enterobacteriaceae* is a member of Gram-negative rod-shaped bacteria that cause disease in diverse aquatic organisms such as fish, amphibians and reptiles as well as avians and mammals including human throughout the world. This genus had been composed of three species, *E. hoshinae*, *E. ictaluri* and *E. tarda*, but recent researches erected two novel species, *E. anguillarum* and *E. piscicida* that were conventionally identified as *E. tarda*. In this study, we isolated seven strains belonging to the genus *Edwardsiella* from freshwater fishes that had been reared at inland fish farms in South Korea and investigated their biochemical characteristics and molecular phylogenetic relationships. The seven strains showed typical characteristics of four *Edwardsiella* species, *E. anguillarum*, *E. ictaluri*, *E. piscicida* and *E. tarda*, by biochemical analyses of Gram staining, indole and hydrogen sulfide (H₂S) production, and API (Analytic Profile Index) 20E test. Molecular phylogenetic analyses inferred from DNA sequence data of both 16S ribosomal RNA (rRNA) and DNA gyrase subunit B (gyrB) genes were congruent with the biochemical characteristics. As a result, both biochemical and molecular phylogenetic analyses identified four strains isolated from three *Anguilla* species as *E. anguillarum*, *E. piscicida* and *E. tarda*, two strains from *Pelteobagrus fulvidraco* and *Silurus asotus* as *E. ictaluri*, and one strain from *Moroco oxycephalus* as *E. piscicida*. In this study, we isolated and successfully identified recently newly erected species, *E. anguillarum* and *E. piscicida* in addition to historically notorious pathogenic species, *E. ictaluri* and *E. tarda*. In the future study, systematic and comprehensive monitoring of the four *Edwardsiella* species are required for studying differences in pathogenicity among freshwater fishes.

Key words: *Edwardsiella*, *E. tarda*, *E. piscicida*, *E. anguillarum*, *E. ictaluri*, freshwater fish

†Corresponding author: Jun-Young Song
Tel: +82- 55-540-2784, Fax: +82-55-546-6292
E-mail: jysong2012@korea.kr

서 론

Edwardsiella 속은 *Enterobacteriaceae* 과에 속하며 *Edwardsiella tarda*, *Edwardsiella ictaluri* 및 *Edwardsiella hoshinae*의 3종으로 구성되는 것으로 알려져 왔다(Ewing et al. 1965). 그중 *E. ictaluri*는 주로 차널메기(*Ictalurus punctatus*)에서 enteric septicemia exclusively in channel catfish (ESC)를 유발하는 것으로 알려져 있으며(Hawake 1979; Hawake et al. 1981; Shotts et al. 1986), *E. hoshinae*는 대부분 파충류, 조류, 물 등으로부터 분리되었으나 사람이나 동물에 대한 병원성에 관해서는 알려져 있지 않다(Grimont et al. 1980; Farmer et al. 1984; Singh et al. 2004; Singh et al. 2013). 한편 *E. tarda*는 자연에 널리 서식하고 호수, 개울, 해수, 진흙 및 일반적인 수생 동물의 내장에서 분리되었으며(White et al. 1973; Mohanty and Sahoo 2007), 전 세계에 걸쳐 사람을 포함한 어류, 양서류, 파충류, 조류, 포유류 등 다양한 척추동물에 질병을 유발하는 것으로 알려져 있다(Mohanty and Sahoo 2007; Park et al. 2012).

또한, *E. tarda*는 전 세계 담수어류 및 해산어류의 주요 병원체 중 하나로 복수, 탈장, 안구돌출, 뇌 및 내부 장기의 심한 병변을 주요 증상으로 하는 에드워드병(edwardsiellosis)의 주요 원인체이다. 극동산 뱀장어(*Anguilla japonica*), 차널메기(*I. punctatus*), 참돔(*Pagrus major*), 방어(*Seriola quinqueradiata*), 넙치(*Paralichthys olivaceus*), 잉어(*Cyprinus carpio*), 무지개송어(*Oncorhynchus mykiss*) 등 20종 이상의 주요 양식 어류에 발생하여 막대한 경제적 손실을 초래하였으며, 우리나라에서는 뱀장어와 넙치에 중요한 세균성 병원체 중 하나로 알려져 있다(Wakabayashi and Egusa 1972; Bang et al. 1992; Mohanty and Sahoo 2007; Park et al. 2012).

Edwardsiella 속은 2013년까지 3종(*E. hoshinae*, *E. ictaluri* 및 *E. tarda*)이 보고되어왔으나, 최근의 연구에서 표현형 및 유전자형 변이에 근거하여 기존에 *E. tarda*로 동정되었던 균주들이 *Edwardsiella piscicida* 및 *Edwardsiella anguillarum*이라는 새로운 종으로 분류되었다(Yang et al. 2012; Abayneh et al. 2013; Griffin et al. 2013; Shao et al. 2015; Griffin

et al. 2017). 또한, 내수면 주요 양식인 뱀장어로부터 분리된 세균이 *E. anguillarum*으로 동정됨(Reichley et al. 2017)에 따라 우리나라의 내수면 양식 어류에서 분리되는 *Edwardsiella* 속 균주에 대한 새로운 분류학적 위치에 관한 조사의 필요성이 대두되었다. 따라서 이번 연구에서는 우리나라 내수면 양식 어류에서 분리된 *Edwardsiella* 속 균주에 대한 유전학적 동정 및 생화학적 특성을 분석하여 이들의 분류학적 위치를 명확하게 하고자 하였다.

재료 및 방법

세균의 분리

2018~2019년 동안 국내 내수면 양식 어류로부터 세균을 분리하였으며 대부분의 시료는 양식장으로부터 질병검사를 위해 의뢰한 어류를 사용하였다. 양식장으로부터 산소 포장되어 실험실로 운반된 어류를 MS-222 (Ethyl 3-aminobenzoate methanesulfonate salt, Sigma-Aldrich, USA)로 마취하여 비장과 신장을 무균적으로 적출하였으며 brain heart infusion (BHI) agar (Becton Dickinson GmbH, USA) 배지에 도말 후 25°C에 36~48시간 동안 배양하였다. 배양된 세균은 집락의 색깔, 모양, 크기 등을 육안으로 확인하여 우점하는 균주를 순수 분리하였다.

16S rRNA 및 gyrB 유전자의 DNA 염기서열 해독

순수 분리된 세균을 BHIA에 다시 도말하여 배양한 후 그로부터 자라난 단일 집락을 멸균 팁으로 채취하여 1.5 mL 튜브에 옮긴 후 Chelex 100[®] and Chelex 20 Chelating Ion Exchange Resin (Bio-Rad, USA)을 이용하여 genomic DNA를 추출하였다. DNA 염기서열 분석을 위해 DiaStar[™] EF-Taq DNA polymerase (Solgent, Korea)를 이용하여 genomic DNA 1µl, forward primer (10 pmol) 1 µl, reverse primer (10 pmol) 1 µl를 포함하는 총 25 µl 용량의 반응액을 제조하여 PCR을 실시하였다. 16S rRNA 유전자의 증폭을 위해 27F (5'-AGAGTTT GATCCTGGCTCAG-3') (Lane 1991) 및 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') (Turner et al. 1999)

primer 조합을 사용하였으며, DNA gyrase subunit B (gyrB) 유전자의 증폭을 위해 본 연구에서 새롭게 설계한 EDW-GyrB-0001f (5'-ATGTCAAATACGTATGACTCCT-3') 및 EDW-GyrB-2368r (5'-GCR TTCTCTTCRATAAAGGC-3') primer 조합을 사용하였다. PCR 반응은 95°C에서 15분 1 cycle, 95°C에서 20초와 55°C에서 40초에서 35 cycles 수행하였으며, Solg™ Gel & PCR Purification Kit (SolGent, Korea)의 사용자 설명서에 따라 PCR 증폭 산물을 정제하였다. 정제된 PCR 증폭 산물의 염기서열 해독은 솔젠트(Solgent Co., Korea)에 의뢰하여 분석을 수행하였다. 이번 연구에서 해독한 16S rRNA와 gyrB 유전자의 DNA 염기서열은 미국 국립생물정보센터(National Center for Biotechnology Information, NCBI)에 각각 GenBank 등록번호 MW237208-MW 237214와 MW246839-MW246845로 등록하였다.

계통발생학적 분석

Edwardsiella 속 종들의 분류학적 위치를 조사하기 위하여 본 연구에서 분리된 균주들과 함께, NCBI GenBank 데이터베이스에 등록된 *Edwardsiella* 속 균주들의 16S rRNA 및 gyrB 유전자 영역의 DNA 염기서열을 내려받아 BioEdit 7.2 (Hall 1999)의 Clustal W를 이용하여 비교하였다. 정렬된 DNA 염기서열 매트릭스의 길이는 각각 1,549 bp와 2,415 bp이었으며, 이들 매트릭스를 대상으로 MEGA 7 (<https://www.megasoftware.net/>) (Kumar et al. 2016)를 사용하여 근린 접합 (Neighbor-Joining, NJ) 분자계통수를 작성하였다. 이때, Kimura 2-parameter 모델을 적용하였으며 부트스트래핑 (bootstrapping)을 총 1,000회 수행하여 각 분지의 지지도를 구하였다.

생화학적 특성 분석

이번 연구에서 분리된 *Edwardsiella* 속 균주의 배양 특성 및 생화학적 특성을 조사하였다. 배양 특성 조사를 위해 Salmonella-Shigella (SS) agar (Becton Dickinson GmbH, USA), MacConkey's agar (Becton Dickinson GmbH, USA) 및 thiosulphate-citrate-bile salts-sucrose (TCBS) agar (Becton Dickin-

son GmbH, USA)에서 24~48 시간 동안 배양한 후 집락 형성 여부를 확인하였다. 생화학적 특성 분석을 위해 API 20 E (BIOMÉRIEUX, France)의 사용자 설명서에 따라 이들의 특성을 분석하였으며, BHIA에 24~48시간 동안 배양한 후 권장 광학 밀도가 될 때까지 인산염 완충 식염수에 희석하여 Gram stain (YD Diagnostics, Korea), indole 및 H₂S 생산 능력을 조사하였다. 모든 실험은 2회 이상 반복 수행하였다.

결과 및 고찰

내수면 양식 어류로부터 *Edwardsiella* 속 균주의 분리

2018년~2019년 동안 뱀장어, 메기, 동자개 등 12종의 내수면 양식 어류로부터 세균을 분리 한 결과 극동산 뱀장어(*Anguilla japonica*), 무태장어(*Anguilla marmorata*), 동남아산 뱀장어(*Anguilla bicolor*), 동자개(*Pelteobagrus fulvidraco*), 메기(*Silurus asotus*), 버들치(*Moroco oxycephalus*)로부터 *Edwardsiella* 속 균주 7개가 분리되었다(Table 1). 신장 또는 비장으로 부터 *Edwardsiella* 속 세균이 분리된 어류는 특이적 임상증상이 관찰되는 경우도 있었지만 그렇지 않은 경우도 있었다. 극동산 뱀장어의 경우 체표, 지느러미, 항문 등에서 발적 및 출혈이 관찰되었으며, 동자개의 경우 두부, 안구, 체표 등의 백탁과 체표의 출혈 반점 및 발적이 관찰되었다. 또한, 메기의 경우 외부 증상은 나타나지 않았으나 간장에 백색 반점이 관찰되었다. 무태장어, 동남아산 뱀장어, 버들치에서는 특이적 임상증상이 관찰되지 않았다.

분자계통발생학적 분석

이번 연구에서 7개 균주의 16S rRNA 및 gyrB 유전자 영역의 DNA 염기서열을 분석한 결과, *Edwardsiella* 속의 세균 중 4개의 종이 동정되었다. 특히, 기존에는 *E. tarda*로 잘못 동정되어오다가 최근의 분류학 기술의 발달에 따라 새로운 종으로 알려진 *E. anguillarum* (Shao et al. 2015)과 *E. piscicida* (Abayneh et al. 2013)를 우리나라 내수면 양식 어류에서 성공적으로 분리 및 동정하였으며,

Edwardsiella 속의 분자계통학적 동정을 위해 16S rRNA와 *gyrB* 유전자의 마커로서의 가능성을 확인하였다.

16S rRNA 유전자의 DNA 염기서열을 기반으로 작성한 근린 집합 분자계통수 분석 결과 모든 *Edwardsiella* 속의 균주들은 100%의 부트스트래핑 값으로 강하게 지지되는 단계통군을 형성하였다 (Fig. 1). 이후 이들은 5개 종으로 나뉘며 분기하였으며, 이들 중 *E. anguillarum*와 *E. piscicida* (*E. tarda*로 동정된 일부 균주 포함)가 가장 가까운 분자계통학적 관계를 가지며 함께 분기하였다. 또한 *E. tarda*와 *E. hoshinae*도 가장 가까운 관계를 가지며 함께 분기하였다. 그러나 *E. ictaluri*는 다른 종들과의 관계가 뚜렷하지 않았다. 한편 이번 연구에서 분리된 AJ190305와 MO181100은 *E. piscicida* 균주들과, AJ190301은 *E. anguillarum* 균주들과, PF190900와 SA190400은 *E. ictaluri* 균주들과, AM180400과 AB180400은 *E. tarda* 균주들과 함께 분기하였다. 이러한 16S rRNA를 기반으로 한 분자계통수 분석 결과로부터, 이번 연구로부터 분리된 7개 균주들은 *Edwardsiella* 속의 5개 종들 중 4개 종들과 69~93%의 부트스트래핑 값으로 지지되는 단계통군들을 형성함을 확인하였다.

GryB 유전자의 DNA 염기서열을 기반으로 작성

한 근린 집합 분자계통수 분석 결과 모든 *Edwardsiella* 속의 균주가 100%의 부트스트래핑 값으로 강하게 지지되는 단계통군을 형성하였다(Fig. 2). 이후 이들은 5개 종들로 나뉘며 분기하였다. 이들 중 *E. anguillarum*와 *E. ictaluri*가 가장 가까운 분자계통학적 관계를 가지며 함께 분기하였으며, 이 두 종은 또한 *E. piscicida* (*E. tarda*로 동정된 일부 균주들을 포함)와 함께 분기하며 단계통군을 형성하였다. 이 세 종들은 나머지 두 종들, *E. tarda*와 *E. hoshinae*와 분자계통학적으로 잘 분리되었으며 이 두 종들도 함께 분기하며 단계통군을 형성하였다. 본 연구로부터 분리한 균주 AJ190305와 MO181100은 *E. piscicida* 균주들과, AJ190301은 *E. anguillarum* 균주와, PF190900와 SA190400은 *E. ictaluri* 균주들과, AM180400과 AB180400은 *E. tarda* 균주들과 함께 분기하였다. 이러한 *gyrB* 유전자 기반 분자계통수 분석 결과로부터, 이번 연구에서 분리된 7개 균주는 *Edwardsiella* 속의 5개 종들 중 4개 종들과 74~100%의 비교적 높은 부트스트래핑 값으로 지지되는 단계통군들을 형성하는 것을 확인하였다.

한편 16S rRNA 유전자를 사용하여 분자계통수를 작성한 결과 *E. ictaluri*의 분자계통학적 관계가 명확하게 밝혀지지 않았지만, *gyrB* 유전자를 사용



Fig. 1. Neighbor-joining tree reconstructed with Kimura 2-parameter model with 16S ribosomal RNA (rRNA) gene for *Edwardsiella* strains isolated from inland fish farms in Korea. The strains newly analyzed in this study are indicated in bold.

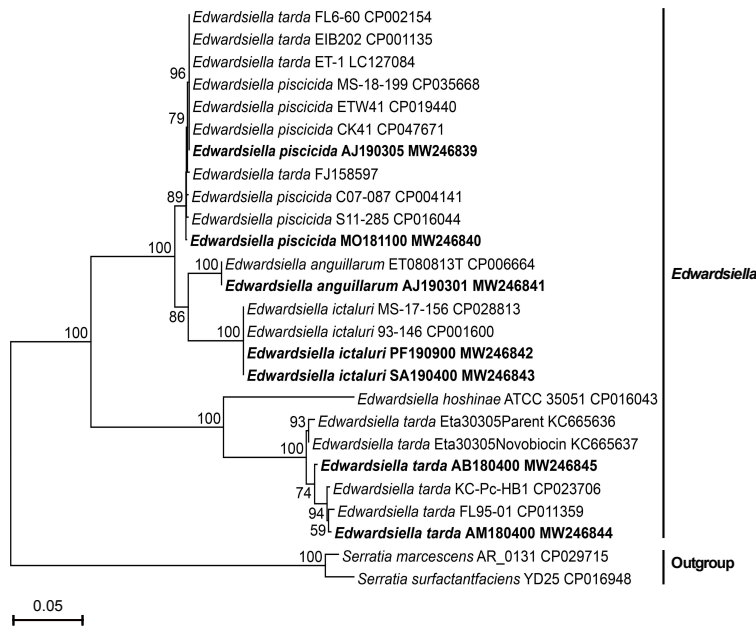


Fig. 2. Neighbor-joining tree reconstructed with Kimura 2-parameter model with DNA gyrase subunit B (*gyrB*) gene for *Edwardsiella* strains isolated from inland fish farms in Korea. The strains newly analyzed in this study are indicated in bold.

했을 때는 *E. ictaluri*가 *E. piscicida*와 *E. anguillarum*이 함께 형성하는 계통과 함께 분지하였고 이들 3종은 *E. hoshineae*와 *E. tarda*가 함께 형성하는 계통과는 명확하게 구분되는 분자계통학적 관계를 보였다. 따라서 *Edwardsiella* 속 종들의 분자계통학적 관계를 분석할 때 16S rRNA 유전자와 더불어 *gyrB* 유전자를 함께 분석함으로써 그 분자계통학적 관계를 보다 정확하게 파악할 수 있음을 확인하여, 이 두 유전자에 대해 *Edwardsiella* 속 종들의 체계적 분류를 위한 분자 마커로서의 사용 가능성을 제시한다.

생화학적 특성 분석

이번 연구에서 분리한 *Edwardsiella* 속 7개 균주들은 그람 음성의 간균, catalase 양성 및 oxidase 음성으로 전형적인 *Edwardsiella*의 생화학적 특성을 보였다. 또한 SS 및 MacConkey 배지에서는 집락이 형성되었으나 TCBS에서는 자라지 않았다. API 20 E를 통한 생화학적 분석을 수행한 결과(Table 1) *E. anguillarum*으로 분류된 균주(AJ190301)와 *E. piscicida*로 분류된 2개 균주(MO181100, AJ190305)는 대부분 LDC, ODC, indole 생성, glucose 발효

및 nitrate 환원이 양성으로 나타났으며, 이들 중 *E. piscicida*로 분류된 2개 균주는 H₂S 생성 양성을 제외하고 이전에 보고되었던 *E. piscicida*의 생화학적 특징들과 유사하였다(Castro et al. 2006; Abayneh et al. 2013; Griffin et al. 2013; Buján et al. 2018). 한편 *E. tarda*로 분류된 2개 균주(AM180400, AB180400)는 indole 생성, glucose 발효 양성으로 나타났으며, 무태장어에서 보고되었던 *E. tarda* (Mo et al. 2015)와 유사하였으나, 이들 중 AM180400는 H₂S을 추가로 생성하여 차이를 보였다. 마지막으로 메기와 동자개로부터 분리된 *E. ictaluri*로 분류된 2개 균주(SA190400, PF190900)는 ODC, indole 음성 및 Vogas-Proskauer 양성으로 나타나 선행 연구에서 보고된 *E. ictaluri*와는 생화학적으로 조금 다른 양상을 보였지만, 나머지 특성들은 이전의 보고와 유사하게 나타났다(Yu et al. 2009; Kim and Park 2015). 이러한 결과로부터, *E. anguillarum*, *E. piscicida*, *E. ictaluri* 및 *E. tarda*에 속하는 각 균주의 통상적인 생화학적 특징은 분자계통학적 분석을 통한 종 동정 결과와 대체로 일치하는 것을 확인하였으며, 감염되는 어종 및 사육 환경에 따라 균주의 특성이 조금씩 달라지는 것으로 사료되었다.

Table 1. Results obtained from the classic biochemical and the API 20 E tests of *Edwardsiella* strains isolated from inland fish farms in Korea in this study

Bacteria	<i>Edwardsiella anguillarum</i>	<i>Edwardsiella piscicida</i>		<i>Edwardsiella tarda</i>		<i>Edwardsiella ictaluri</i>	
Host species	<i>Anguilla japonica</i>	<i>Moroco oxycephalus</i>	<i>Anguilla japonica</i>	<i>Anguilla marmorata</i>	<i>Anguilla bicolor</i>	<i>Silurus asotus</i>	<i>Pelteobagrus fulvidraco</i>
Strain	AJ190301	MO181100	AJ190305	AM180400	AB180400	SA190400	PF190900
SS	+	+	+	+	+	+	+
TCBS	-	-	-	-	-	-	-
MacConkey	+	+	+	+	+	+	+
Oxidase	-	-	-	-	-	-	-
Catalase	+	+	+	+	+	+	+
ONPG	-	-	-	-	-	-	-
ADH	-	-	-	-	-	-	-
LDC	+	+	+	+	+	+	+
ODC	+	+	+	+	+	-	-
Citrate	-	-	-	-	-	-	-
H ₂ S production	-	-	-	+	-	-	-
Urease	-	-	-	-	-	-	-
TDA	-	-	-	-	-	-	-
Indole	+	+	+	+	+	-	-
VP	-	-	-	-	-	+	+
Gelatinase	-	-	-	-	-	-	-
Glucose	+	+	+	+	+	+	+
Mannose	-	-	-	-	-	-	-
Inositol	-	-	-	-	-	-	-
Sorbitol	-	-	-	-	-	-	-
Rhamnose	-	-	-	-	-	-	-
Sucrose	-	-	-	-	-	-	-
Melibiose	-	-	-	-	-	-	-
Amygdalin	-	-	-	-	-	-	-
Arabinose	-	-	-	-	-	-	-
Nitrites (NO ₂)	+	+	+	+	+	-	-
Nitrogen (N ₂)	N*	N	N	N	N	+	+

*N: not detected

요 약

우리나라 내수면 양식 어류로부터 *Edwardsiella* 속 세균 7개 균주를 분리하여 이들의 생화학적 특성 및 유전학적 특성을 조사하였다. 그 결과, 기존의 어류 병원성 세균으로 알려진 *E. tarda* 와 *E. ictaluri* 뿐 아니라, 최근 새로운 종으로 보고된 *E. anguillarum*과 *E. piscicida*를 성공적으로 분리 및 동정하여 우리나라 내수면 양식 어류에서 *Edward-*

siella 속의 다양한 종이 분리되는 것을 확인하였다. 뱀장어류에서 분리된 4개 균주는 *E. anguillarum*, *E. piscicida* 및 *E. tarda*로, 메기와 동자개로부터 분리된 2개 균주는 *E. ictaluri*로, 버들치로부터 분리된 1개 균주는 *E. piscicida*로 동정되었다. 또한, 이들의 생화학적 특성의 조사 결과, 이들은 대부분 *E. anguillarum*, *E. ictaluri*, *E. piscicida* 및 *E. tarda*의 각 종에 해당하는 전형적인 생화학적 특성을 나타내었으며, 유전자를 이용한 분자계통발생

학적 분석 결과와도 일치하였다. 특히, 16S rRNA 및 *gyrB* 유전자를 이용하여 *Edwardsiella* 속 종의 명확한 분류가 가능함을 확인함으로써, *Edwardsiella* 속 세균의 분류학적 동정을 위한 마커로서의 가능성을 제시하였다. 본 연구의 결과, 우리나라 내수면 양식 어류로부터 다양한 *Edwardsiella* 속 종들이 분리되는 것을 확인하였으며, 이들 종들에 대한 체계적인 모니터링 및 숙주에 따른 병원성의 차이에 관한 연구가 필요함을 제안한다.

감사의 글

이 논문은 2020년도 국립수산물과학원 수산과학 연구사업 수산생물 질병 특성 연구(R2020057)의 지원으로 수행된 연구입니다.

References

Abayneh T, Colquhoun DJ and Sørum H.: *Edwardsiella piscicida* sp. nov., a novel species pathogenic to fish. *J Appl Microbiol* 114, 644-654, 2013.

Bang JD, Chun SK, Park SI and Choi YJ.: Studies on the biochemical and serological characteristics of *Edwardsiella tarda* isolated from cultured flounder, *Paralichthys olivaceus*. *J. Fish Pathol* 5, 29-35, 1992.

Buján N, Alicia E, Toranzo B and Magariños B.: *Edwardsiella piscicida*: a significant bacterial pathogen of cultured fish. *Dis Aquat Org* 135, 59-71, 2018.

Castro N, Toranzo AE, Barja JL, Núñez S and Magariños B.: Characterization of *Edwardsiella tarda* strains isolated from turbot. *J Fish Dis* 29, 541-547, 2006.

Ewing WH, McWhorter AC, Escobar MR and Lubin AH.: *Edwardsiella*, a new genus of *Enterobacteriaceae* based on a new species, *E. tarda*. *Int J Syst Evol Microbiol* 15, 33-38, 1965.

Farmer JJ and McWhorter AC.: Genus X. *Edwardsiella*, "In Bergey's manual of systematic bacteriology, vol. 1", The Williams & Wilkins Co., Baltimore, pp. 486-491, 1984.

Griffin MJ, Quiniou SM, Cody T, Tabuchi M, Ware C, Cipriano RC, Mauel MJ and Sota E.: Comparative analysis of *Edwardsiella* isolates from fish in the eastern United States identifies two distinct genetic taxa amongst organisms phenotypically classified as *E. tarda*. *Vet Microbiol* 16, 358-372, 2013.

Griffin MJ, Greenway TE and Wise DJ.: *Edwardsiella* spp. Woo PTK and Cipriano RC (ed), *Fish viruses and bacteria: pathobiology and protection*. CABI, Wallingford, UK, pp. 190-210, 2017.

Grimont PAD, Grimont F, Richard C and Sakazaki R.: *Edwardsiella hoshinae*, a new species of *Enterobacteriaceae*. *Curr Microbiol* 4, 347-351, 1980.

Hall TA.: BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acids Symp* 41, 95-98, 1999.

Hawke JP.: A bacterium associated with disease of pond-cultured channel catfish, *Ictalurus punctatus*. *J Fish Res Board Can* 36, 1580-1512, 1979.

Hawake JP, McWhorter AC, Steigerwalt AG and Brenner DJ.: *Edwardsiella ictaluri* sp. nov., the causative agent of enteric septicemia of catfish. *Int J Syst Bacteriol* 31, 396-400, 1981.

Hoshina T.: On a new bacterium, *Paracolobactrum anguillimortiferum* n. sp. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.*, 28, 162-164, 1962.

Kim JD and Park SW.: *Edwardsiella ictaluri* infection in cultured yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco* fingerlings in Korea. *Korean J Fish Aquat Sci* 48(5), 725-730, 2015.

Kumar S, Stecher G, Tamura K.: MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol Biol Evol*, 33, 1870, 2016.

Lane DJ.: 16S/23S rRNA sequencing. In: *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systemics* (Stackebrandt, E. and Goodfellow, M., Eds.), John Wiley and Sons, Chichester, pp. 115-147, 1991.

Meyer FP and Bullock GL.: *Edwardsiella tarda*, a new pathogen of channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Applied microbiology*, 25(1), 155, 1973.

Mo ZQ, Zhou L, Zhang X, Gan L, Liu L and Dan XM.: Outbreak of *Edwardsiella tarda* infection in farm-cultured giant mottled eel *Anguilla marmorata* in China. *Fish Sci* 81, 899-905, 2015.

Mohanty B and Sahoo P.: *Edwardsiellosis* in fish: a brief review. *J Biosci* 32, 1331-1344, 2007.

Nougayrede PH, Vuillaume A, Vigneulle M, Faivre B, Luengo S and Delprat J.: First isolation of *Edwardsiella tarda* from diseased turbot (*Scophthalmus maximus*) reared in a sea farm in the bay of biscay. *Bull Eur Fish Path* 14(4), 128-129, 1994.

Oh WT, Jun JW, Kim HJ, Giri SS, Yun SK, Kim SG, Kim SW, Kang JW, Han SJ, Kwon J and Park SC.: Characterization and pathological analysis of a virulent *Edwardsiella anguillarum* strain isolated from

- nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) in Korea. Front Vet Sci 7, 14, 2020.
- Park SB, Aoki T and Jung TS.: Pathogenesis of and strategies for preventing *Edwardsiella tarda* infection in fish. Vet Res 43, 1-11, 2012.
- Reichley SR, Ware C, Steadman J, Gaunt PS, García JC and Lafrentz BR.: Comparative phenotypic and genotypic analysis of *Edwardsiella* isolates from different hosts and geographic origins, with emphasis on isolates formerly classified as *E. tarda*, and evaluation of diagnostic methods. J Clin Microbiol 55, 3466-3491, 2017.
- Shao S, Lai Q, Liu Q, Wu H, Xiao J, Shao Z, Wang Q and Zhang Y.: Phylogenomics characterization of a highly virulent *Edwardsiella* strain ET080813^T encoding two distinct T3SS and three T6SS gene clusters: Propose a novel species as *Edwardsiella anguillarum* sp. nov. Syst Appl Microbiol 38, 36-47, 2015.
- Shotts EB, Blazer VS and Waltmat WD.: Pathogenesis of experimental *Edwardsiella ictaluri* infections in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). Can J Fish Aquat Sci 43, 36-42, 1986.
- Singh IM, Singh S, Mills-Robertson F, McMurphy MA, Applegate RD and Crupper SS.: Antibiotic susceptibility of *Edwardsiella hoshinae* isolated from northern bobwhite quail (*Colinus virginianus*). Vet Res 155, 29, 2004.
- Singh BR, Singh V, Ebibeni N and Singh RK.: Antimicrobial and herbal drug resistance in enteric bacteria isolated from faecal droppings of common house lizard/gecko (*Hemidactylus frenatus*). Int J Microbiol 2013, 340848, 2013.
- Turner S, Pryer KM, Miao VPW and Palmer JD.: Investigating deep phylogenetic relationships among cyanobacteria and plastids by small subunit rRNA sequence analysis. J Euk Microbiol 46, 327-338, 1999.
- Wakabayashi H and Egusa S.: *Edwardsiella tarda* (*Paracolobactrum anguillimortiferum*) associated with pond cultured eel disease. Bull Jap Soc Sci Fish 39, 931-936, 1972.
- White FH, Simpson CF and Williams LE.: Isolation of *Edwardsiella tarda* from aquatic animal species and surface waters in Florida. J Wildl Dis 9, 204-208, 1973.
- Yang M, Lv Y, Xiao J, Wu H, Zheng H, Liu Q, Zhang Y and Wang Q.: *Edwardsiella* comparative phylogenomics reveal the new intra/inter-species taxonomic relationships, virulence evolution and niche adaptation mechanisms. PLoS One 7, e36987, 2012.
- Yasunaga N.: Characteristics of the fish pathogen *Edwardsiella* isolated from several species of cultured marine fish. Bull Nagasaki Prefect Inst Fish, 8, 67-73, 1982.

Manuscript Received : Nov 7, 2020

Revised : Nov 24, 2020

Accepted : Nov 27, 2020