韓家衛誌 第20卷 1號
*Korean J Vet Serv*(1997) 20(1) : 11~18

# 양식넙치(*Paralichthys olivaceus*)의 복수증에 관한 연구

## -*Edwardsiella tarda*의 일부 특성과 병원성 및 대책-

한재철 · 김영진 · 서형석 · 김영길* · 이근광* · 안병목

전라북도 가축위생시험소 정읍지소, 군산대학교 해양산업대학 수족병리과*

# Studies on the Edwardsiellosis of cultured flounder, *Paralichthys olivaceus*

## -Characteristics, pathgenicity and control of *Edwardsiella tarda*-

Jae-Cheol Han, Young-Jin Kim, Heyng-Seok Seo, Young-Gill Kim*, Keun-Kwang Lee*, Pyoung-Mok Ahn

*Chong Up Branch of Chunbuk Veterinary Service Laboratory*
*Department of Fish Pathology, Kun San National University**

## Abstract

Characteristics, pathogenicity and control of the causative organisms isolated from diseased cultured flounder, *Paralichthys olivaceus* were studied. The causative organisms were identified as *E tarda* by biochemical and biophysical characteristics. Also, it strains were named as *E tarda* KBF-1 and *E tarda* KMF-1, and optimal pH of *E tarda* KBF-1 and *E tarda* KMF-1 were 8.0, and optimal concentration of NaCl. *E tarda* KBF-1 was 0% and *E tarda* KMF-1 was 1%.

In the pathogenicity test, 0~10 of the flounders of artificially infected group(*E tarda* KBF-1) with $1.0\times10^7$cfu/fish were died within 60 hrs, but 0~9 flounders infected group with $1.0\times10^6$ cfu/fish were died within 60 hrs. Also, 0~10 flounders infected group(*E tarda* KMF-1) with $1.0\times10^7$cfu/fish were died within 36 hrs, while 0~7 flounders infected with $1.0\times10^6$cfu/fish were died within 60 hrs.

Drug sensitivity of *E tarda* KBF-1 strain was resistant to AM, CF and N, and intermediate to E, K and S, and sensitivity to C, G, SxT and FF. But *E tarda* KMF-1 strain was resistant to CF, E and V, and intermediate to AM, C, N and SxT, and sensitivity to GM and FF.

Key words : Flounder(*Paralichthys olivaceus*), *Edwardsiella tarda,* Pathgenicity, Motality

## 서 론

우리나라에서 넙치양식은 1984년에 시작되어 육상양식 시설과 해상 가두리에서 대량 성행되고 있으나, 사료 찌꺼기와 배설물 등에 의한 수질 오염과 더불어 각종 스트레스로 인해 많은 질병이 유발되고 있다.

넙치의 세균성 질병은 주로 활주세균증, 비브리오병, 연쇄구균증, 에드워드병을 들 수 있는데, Mizuno[15]는 에드워드병은 5월에 시작하여 10월까지 유행된다고 했다.

넙치의 질병에 대한 보고는 지금까지 세균성 질병[2,9,10,13,22], 영양성 질병[11] 및 바이러스성 질병[7,17,18] 등에 관하여 많은 연구가 이루어져 있다. 한편 양식 넙치에서 에드워드병에 대한 연구는 Nakatsugawa[16]가 양식 넙치 치어에서 *E tarda*를 분리 보고하였고, Miyazaki와 Kaige[14]는 에드워드병에 걸린 넙치의 조직상을, Kanai[5]는 넙치의 에드워드증에 대하여 연구하였을 뿐 아니라 또한 Kanai 등[6]은 넙치 양식장에 *E tarda*의 분포에 관하여 연구하였고, Rashid 등[20]은 넙치에서 분리한 *E tarda*에 대한 혈청학적인 특성에 관하여 연구하였고, Rashid 등[19]은 2곳의 일본 넙치 양식장에서 *E tarda*의 생태학적인 연구를 한 바 있다.

이에 비해 한국에서는 Bang 등[1]이 동해, 남해안 및 제주도에 위치해 있는 양식장에서 에드워드병의 원인균인 *E tarda*를 분리하고 이들의 생화학적·혈청학적 특성을 연구한 바 있다.

이에 본 연구에서는 서해안 넙치 양식장에서 자주 발병되어 피해가 큰 질병 중의 하나인 넙치의 복수증 예방 및 치료대책을 수립하고자 전북 고창지역의 넙치 양식장에서 사육 중에 복수증이 유발되어 폐사되어 가는 병어로 부터 원인균을 분리하고, 그들의 일부특성 및 병원성과 대책을 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 병 어

전라북도 고창 일원의 넙치 양식장에서 사육 중에 복수가 차고 탈장되어 힘없이 유영하다가 폐사되어 가는 병어(200g)를 원인균 분리를 위해 사용하였다.

### 2. 원인균의 분리동정 및 성상 조사

병어의 복수와 장기에서 균체를 분리하였으며, 분리균 배지는 Nutrient agar와 BHI agar, SS배지(Difco)를 사용하였고, 균의 동정은 MacFaddin[12]과 Cowan과 Steel's[4]의 방법에 준하였다.

분리균의 배양은 BHI broth(Difco) 5ml에 1백금이를 접종한 후, 28℃에서 18시간 진탕배양한 다음, 다시 BHI broth 100ml에 1/100로 접종하여 배양한 후, 균체수를 확인하였다. pH 및 염분 농도별 발육 상태 등을 조사하기 위해서는 BHI broth를 사용하여 28℃에서 24시간 배양한 후 증식 정도를 spectrophotometer (UV-120-2 Shimadzu, Japan)를 사용하여 OD 540nm에서 측정하였다.

### 3. 병원성 시험

넙치 양식장으로부터 분양 받은 건강한 넙치(약 10－15g)를 실험실(실온 21－24℃)의 수조(1×0.45×0.40m)에 1주일간 적응시킨 후 개체당 $1.0\times10^7$, $1.0\times10^6$cfu/fish 복강주사하였고, 대조군은 0.65% 멸균 생리식염수를 동일한 방법으로 주사하여 감염일부터 발병시까지 병증을 계속 관찰하였다.

### 4. 약제 감수성 시험

항생제 감수성시험은 Kim과 Lee[8]의 방법에 의하였다.

## 결과 및 고찰

### 1. 병어의 병리학적 소견

병어는 외관상의 체색이 흑화되었으며, 복부는 복수로 인해 팽만되었고, 장은 항문 밖으로 탈장되어 있었다. 일부 병어는 두부와 아가미 연골 부분에서 약간의 충혈이 보였다. 해부학적 소견으로는 간장, 비장, 신장에 농창이 형성되어 악취가 났으며, 비장과 신장은 퇴색되어 작은

백색 결절이 형성되었고, 장관에는 심한 염증을 나타내었다. 이와 같은 외부적 병증은 Kanai[5]가 보고한 에드워드증에 걸린 넙치는 복부가 팽만되고, 복수로 인해 항문으로 장이 탈장된다는 보고와 Miyazaki와 Kaige[14]가 보고한 결과와 유사하였다.

## 2. 원인균의 분리 및 동정

병어의 복수 및 장기로부터 우점으로 분리된 균들을 다시 건강한 넙치에 재감염을 실시한 결과 동일한 증상이 유발되고, 병어로부터 재분리 되었기에 이를 원인균으로 간주하고, 이의 생화학적 생물학적 특성을 조사한 결과 Bergy's Manual of Determinative Bacteriology[3]에 기재된 *E tarda*와 일치하였다. 따라서 고창 지역에서 넙치 복수증을 유발시킨 원인균은 *E tarda*였으며, 이의 결과는 Nakatsugawa[16]가 넙치 치어의 복수증 원인균이 *E tarda*라고 밝힌 것과 일치된 결과이다. 또한 이들 분리균을 본 연구에서는 각각 *E tarda* KBF-1과 *E tarda* KMF-1으로 명명하여 사용하였다.

Table 1. Biochemical and biophygical characteristics of the present strains, compared with those of *Edwardsiella tarda* described by Kanai(1993)

| Characteristics | | Present strains | | Kanai(1993) |
|---|---|---|---|---|
| | | *E tarda* KBF-1 | *E tarda* KMF-1 | (7 strains) |
| Gram stain | | − | − | |
| Motility | | + | + | + |
| Indol production | | + | + | + |
| $H_2S$ production(SIM) | | + | + | + |
| O−F test | | F | F | |
| Methyl red | | + | + | + |
| V−P reaction | | − | − | − |
| Catalase | | + | + | + |
| Citrate utilization(Simmon's) | | − | − | − |
| Malonate utilization | | − | − | − |
| Acid from | Adonitol | − | − | − |
| | Arabinose | d | + | − |
| | Cellobiose | − | − | − |
| | Dulcitol | − | − | − |
| | Esculin | − | − | − |
| | Glucose | + | + | + |
| | Inocitol | − | − | |
| | Maltose | + | + | + |
| | Mannose | + | + | + |
| | Mannitol | − | − | − |
| | Raffinose | − | − | − |
| | Rhamnose | − | − | − |
| | Salicin | − | − | − |
| | Solbitol | − | − | − |
| | Trehalose | − | − | |
| | Xylose | − | − | − |

F : fermentation, d : diverse

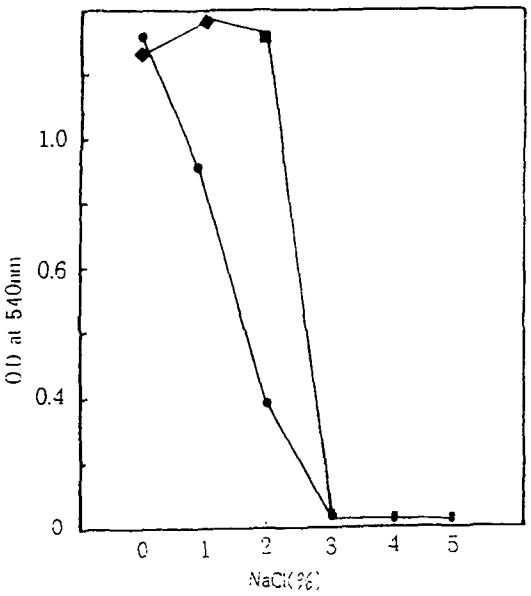



Fig 1. Effect of NaCl concentration on the growth of *E tarda*(KBF-1 : ●−●, KMF-1 : ◆−◆).
The cell growth was determined after culture for 24 hrs in BHI broth.

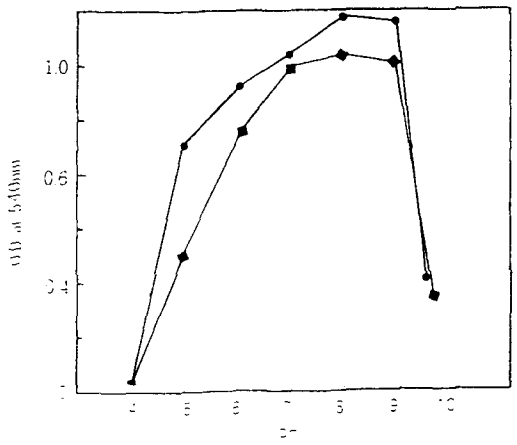



Fig 2. Effect of pH on the growth of *E tarda* (KBF-1 : ●−●, KMF-1 : ◆−◆).
The cell growth was determined after culture for 24 hrs in BHI broth.

### 3. 세균학적 성상

*E tarda* KBF-1과 *E tarda* KMF-1의 생화학적 성상은 Table 1과 같다. Gram 음성 간균으로 운동성이 있고, indol을 생산하였으며, 탄소원으로 citrate를 이용하지 못하였고, SIM 상에서 $H_2S$를 생산하였다. 또한 VP음성, MR시험에서 양성 반응을 나타내었고, catalase 양성반응을 나타냈다. 당분해능은 *E tarda* KBF-1이 arabinose에서 diverse했고, *E tarda* KMF-1이 arabinose를 분해하여 약간의 차이는 있었지만 이외의 당분해능은 *E tarda* KBF-1과 *E tarda* KMF-1은 glucose, maltose, mannose을 분해하였으며, adonitol, dulcitol, inocitol, manitol, raffinose, rhamnose, salicin, solbitol, trehalose, xylose는 분해하지 못하였다.

이러한 특성은 Nakatsugawa[16]가 분리한 *E tarda*와 Kanai[5]가 분리한 *E tarda*의 성상과는 거의 같았으나, 다만 당분해능에서 이들이 분리한 균주는 arbinose를 분해하지 못하였으나 *E tarda* KBF-1은 arbinose에서 diverse했고, *E tarda* KMF-1은 분해한 것으로 나타나 약간의 다른 특성을 보였다.

또한 원인균인 *E tarda*(KBF-1, KMF-1)의 발육가능 염분농도는 0~2%로서, *E tarda* KBF-1의 최적염분농도는 0% 였으며, *E tarda* KMF-1은 1%였다(Fig 1). 이는 Rashid 등[20]이 보고한 *E tarda*의 발육가능 염분농도가 3%까지인 것에 비해 약간 낮은 것으로 나타났고, 한편 이들 두균주의 발육가능 pH는 5.0~10.0이었으나, 최적 pH는 모두 8.0이었다(Fig 2). 또한 두균주 모두 Nutrient agar, BHI배지와 TSI배지에서는 잘 성장하였으나, MacConkey 배지에서는 발육이 빈약하였다.

### 4. 병원성

분리균 *E tarda*(KBF-1, KMF-1)의 병원성을 조사하기 위해서 각각 $1\times10^7$, $10\times10^6$cfu/fish로 감염시킨 결과는 Table 2와 같다.

*E tarda* KBF-1을 $1\times10^7$cfu/fish 감염시킨 그룹에서는 감염 24시간 후에 머리 부분에 충혈이 나타났으며, 이어 에드워드증의 전형적인 증상인 복수가 형성되었고(Photo 1 ; C, D, E), 감염 36시간 후에는 복수량이 많아져 항문 부분이 팽만되어 장액이 흘러나왔고, 장이 항문으로 탈장되어 1마리가 폐사되었다. 감염 48시

간 후에는 장이 항문 밖으로 탈장되어 7마리가 폐사되었고, 감염 60시간 후에는 2마리가 폐사됨으로서 100%의 폐사율을 나타냈다. 또한 1×$10^6$cfu/fish를 감염시킨 그룹에서는 감염 48시간 후에 2마리가 폐사하였고, 감염 60시간 후에는 7마리가 폐사되어 90%의 폐사율을 나타내었다 (Table 2). 한편 *E tarda* KMF-1을 감염시킨 그룹에서는 감염 24시간 후에 머리 부분에 *E tarda* KBF-1을 접종시킨 그룹과 마찬가지로 약간의 충혈이 형성되었고, 항문 주변에서 장액이 흘러나오는 것을 관찰할 수 있었다. 1×$10^7$ cfu/fish 감염시킨 그룹에서는 감염 24시간만에 6마리가 폐사되었고, 36시간만에 4마리가 폐사되어 폐사율 100%를 나타내었으며, 1×$10^6$cfu /fish를 감염시킨 그룹에서는 감염 48시간 후에 2마리가 폐사하였고, 감염 60시간 후에는 5마리가 폐사되어 70%의 폐사율을 나타내었다. 이러한 결과로 볼 때 넙치는 1×$10^7$cfu/fish에서 감염 60시간 내에 100% 폐사율에 이르며, 1×$10^6$cfu/fish에서도 감염 60시간 내에 70% 이상이 폐사됨을 확인할 수 있었다. 이와 같은 결과는 Nakatsugawa[16]가 어체중 11.4~37.5g의 넙치에 *E tarda* 1.5×$10^8$cfu/fish를 복강과 근육에 접종한 후 2일만에 복강에 접종한 그룹에서 2마리가, 근육에 접종한 그룹에서 1마리가 폐사되었으며, 폐사된 병어는 안구가 백탁되고, 복강벽이 출혈되었으며, 간장괴사, 신장출혈, 장관발적, 위발적 증상을 보였다고 보고하였으나, 반면 근육에 접종한 그룹에서는 접종 부위의 충혈, 팽윤, 두부의 충혈, 비장의 퇴색, 괴사, 신장의 괴사가 인정되었고, 감염 3일 후에는 복강 접종한 그룹의 2마리중 1마리에서, 근육 접종한 그룹의 3마리중 2마리에서 복수가 생겨 이들 병어로부터 접종한 균체가 재분리되었다고 보고한 결과와 유사하였다. 또한 Kanai[5]는 수온 24~28℃의 수조에서 넙치(30~50g)에 *E tarda*를 ml당 7.4×$10^7$cfu에 15분 침적한 결과 침적 3일 후부터 폐사되기 시작하여, 침적 5일만에 100% 폐사하였고, 7.4×$10^5$cfu/ml에 침적한 그룹에서는 침적 후 5일 후부터 폐사되기 시작하여 17일이 경과된 후에 100% 폐사되었으며, 7.4×$10^3$cfu/ml에 침적한 그룹에서는 침적 13일 후부터 폐사되어 20%의 폐사율을 나타내었다고 하였다. 또한 먹이에 7.5×$10^8$cfu/ 10 g를 혼합해서 급이한 그룹에서는 급이 후 3일 후에 폐사되기 시작하여, 16일 후에 100% 폐사하였으며, 7.5×$10^6$cfu/10g을 급이한 그룹에서는 급이 7일 후부터 폐사되기 시작하여 16일 후에 100% 폐사되었고, 7.5×$10^4$cfu/10g을 급이한 그룹에서는 9일 후부터 폐사되기 시작하여 24일 후에는 50% 가량 폐사되었다고 보고한 경우와 비교해 볼 때, 병원균의 접종량과 접종방법에 따라 폐사 일수가 달라질 뿐만 아니라 병원성의 정도도 다르게 나타나며, 또한 병원성은 실험어의 크기 및 수온에서도 상당히 밀접한 관계가 있는 것으로 보이며, 이러한 결과

Table 2. Pathgenicity of the flounder infected with the present strains *E tarda*(KBF-1 and KMF-1) by intraperitoneal injection

| Strain | Temp (℃) | Challenge dose (cfu/fish) | Mean body weight(g) | No of tested fish | No of dead fish | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | Hours after injection | | | | |
| | | | | | 24 | 36 | 48 | 60 | 72 |
| | 21~24 | Saline | 10~15 | 10 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| *E tarda* KBF-1 | | 1.0×$10^7$ | 10~15 | 10 | 0 | 1 | 7 | 2 | 0 |
| | | 1.0×$10^6$ | 10~15 | 10 | 0 | 0 | 2 | 7 | 0 |
| *E tarda* KMF-1 | | 1.0×$10^7$ | 10~15 | 10 | 6 | 4 | 0 | 0 | 0 |
| | | 1.0×$10^6$ | 10~15 | 10 | 0 | 0 | 2 | 5 | 0 |

The motality calculated one week after intraperitoneal injection.

들로 볼 때 일단 *E tarda*에 감염되면 폐사율이 높은 것으로 나타났다.

## 5. 약제 감수성

원인균의 약제 감수성시험 결과는 Table 3과 같다. *E tarda* KBF-1은 C, G, FF, SxT, Te에 감수성을 나타냈으며, E, K, S에는 중등도 였고, AM, C, N에는 저항성을 나타냈다. 또한 *E tarda* KMF-1은 GM, FF, Te에 감수성을 나타내었으나 AM, C, N, SxT에는 중등도 였고, CF, E, V에는 저항성을 나타내어 약제 감수성에 있어서 KBF-1과 KMF-1은 약간의 차이를 보였다. 이러한 결과로 분리균은 C, GM, FF, SxT, Te의 약제를 투여하여 초기에 치료할 수 있으나 이는 다른 양식장에서 매 분리된 병원균에 적용할 경우 모두 동일한 결과를 나타낼지는 알 수 없다.

다만 양식장에서 매 분리균마다 약제 감수성 시험을 통하여 적절한 약제를 선택하는 것이 치료에 효과적이라 할 수 있는데, 이는 빈번한 약제의 사용으로 인해 다제내성균의 출현 때문이라 생각된다.

## 6. 치료 및 대책

에드워드증(복수증)에 걸린 넙치는 장기에 농창이나 육아종을 형성하기 때문에 각종 약제를 투여해도 쉽게 치료되지 않지만 치료 시에는 조기에 약제 감수성 시험을 통하여 선택된 약제를 투여하는 것이 바람직하다. 또한 약제의 선택은 각각의 양식장에 따라 이미 투여된 약제의 종류에 따라 병원균의 약제 내성으로 인한 약제의 감수성이 달라질 수 있으므로 통상적인 치료제로 알려진 약제를 무분별하게 사용해서는 안된다. 특히 약제의 투여 시에는 투여 후 잔류 약물이 환경수에 유출되어 초래될 결과에 대해 유념하여야 한다. Mizuno[15]는 어체중이 평균 210~250g의 넙치에(64톤 수조, 매 24회 환수) 어체중 Kg당 50mg의 oxytetracycline을 5일간 경구 투여하여 폐사율을 조사한 결과 일간 폐사율이 0.6%로 높았던 그룹에 투약 종료 후 폐사율은 0.5% 전후로 낮아졌다고 보고하였고, 또한 폐사율이 0.2% 전후로 낮은 그룹에 투약 종료 후 하루만에 0.1% 이하로 저하되어 명확한 투약 효과가 나타났다는 보고도 있다. 이와 같이

Table 3. Antimicrobial resistance types of the present strains *E tarda*(KBF-1 and KMF-1)

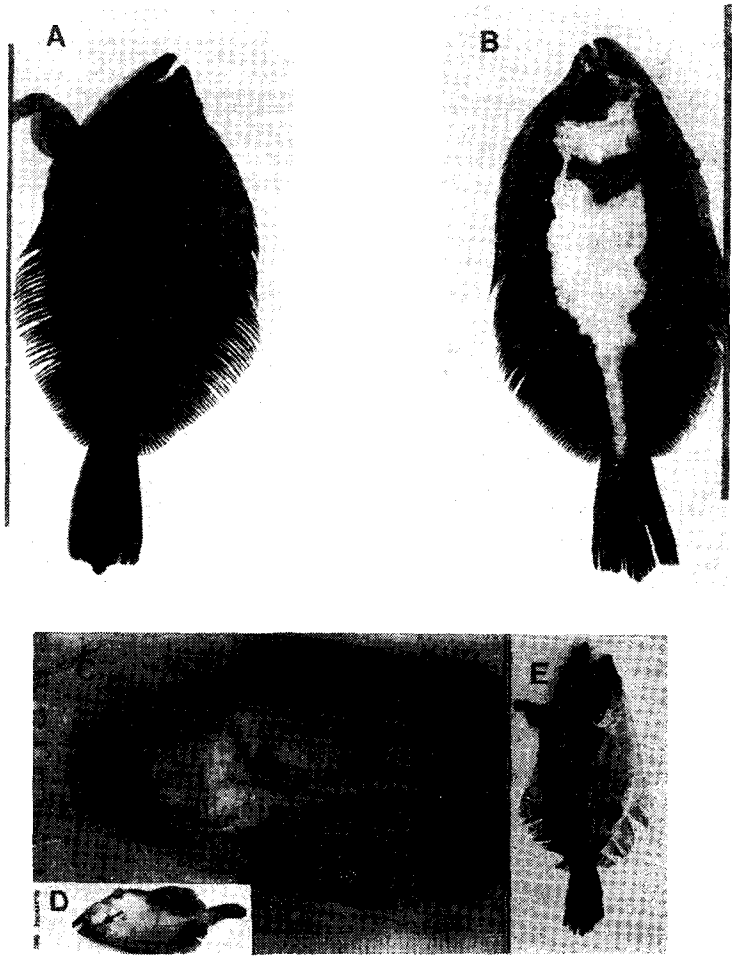
| Antibiotics (Concentration) | Resistance types | |
|---|---|---|
| | KBF-1 | KMF-1 |
| Ampicillin(AM 10μg) | R (0) | I(12) |
| Cephalothin(CF 30μg) | R(12) | R(11) |
| Chloramphenicol(C 30μg) | S(22) | I(16) |
| Erythromycin(E 15μg) | I(17) | R (9) |
| Gentamycin(GM 10μg) | S(18) | S(15) |
| Kanamycin(K 10μg) | I(17) | R(10) |
| Neomycin(N 30μg) | R(10) | I(13) |
| Streptomycin(S 10μg) | I(10) | R(10) |
| Sulfamethoxazole/Trimethoprim (SxT 23.75μg/1.245ug) | S(21) | I(15) |
| Tetracycline(Te 30μg) | S(25) | S(28) |
| Vancomycin(V 30μg) | R (0) | R (0) |
| Pefloxin(FF 100μg) | S(30) | S(27) |

R : Resistant, I : Intermediate, S : Sensitivity
Arabic numbers are inhibition zone diameter(mm).

본 병에 대한 투약은 발병 초기에 실시하는 것이 치료 효과가 나타나기 쉬운 경향이 있는 것으로 사료되며, 또한 무엇보다도 중요한 것은 질병의 예방으로서 우선 사육 밀도를 줄여서 어체에 가해지는 스트레스를 최소화하고 될 수 있으면 물 회전을 자주 하는 것이 좋다. 만약 사육어가 스트레스를 받게 되면 내병력이 약해져 양식장(A양식장 : 물 86%, 침적물 44%, 장내 14% ; B양식장 : 물 22%, 침적물 0%, 장내 2%)과 장내(10~50%)에 항상 존재하고, 해수에서 약 5일간 생존하며, 최소한 30일을 생존하고 있는 병원균[21]에 대한 저항력이 약해지기 때문이다 (Masmura Rashid et al, 1994 ; Kanai et al, 1988). 따라서 수온이 높아지는 5~10월 사이에 질병이 유행되기 때문에 이 시기에는 특히 사육수의 관리에 주의해야 한다.

## Legends for photos

Photo 1. External symptoms of flounder naturally(A, B), and experimentally(C, D, E) induced by infected with isolated strain, *Edwardsiella tarda* (KBF-1 and KMF-1)
Haemorrhagic ulcer was marked by arrows(↖)



## 참고문헌


1. Bang JD, Chun SK, Park SI et al. 1992. Studies on the biochemical and serological chracteristics of *E tarda* isolated from cultured flounders, *P olivaceus. J Fish Pathol* 5(1) : 29~35.
2. Baxa D, Kawai K, Kusuda R. 1986. Characteristics of gilding bacteria isolated form diseased cultured flounder, *P olivaceus. Fish Pathol* 21(4) : 251~258.
3. Buchnan RE, Gibbons NE. 1974. *Bergy's manual of determinative bacteriology*. 8 ed. The Williams & Wilkins Company.
4. Cowan and Stell's. 1974. *Manual for the identification of medical bacteria.* Cambrdge Univ Press
5. Kanai K. 1993. Bacterial diseases of flouder, *P olivaceus. Kor J Fish Pathl 6(2) : 197*~204.
6. Kanai K, Tawaki S, Uchida Y. 1988. An ecological study of *Edwardsiella tarda* in flounder farm. *Fish Pathol* 23(1) : 41~47.
7. Kimura T, Yoshimizu M, Gori S. 1986. A new rhabdovirus isolated in Japan from cultured hirame and ayu. *Dis Aquat Org* 1 : 209~217.
8. Kim YG, Lee KK. 1993. Studies on disease of catfish in Korea. II. Patholgy on vibrosis. *J Fish Pathol* 6(1) : 1~10.
9. Kim YG, Lee KK. 1994. Isolation, characterization and pathgenicity of a *Streptococcus* strain in the flounder(*P olivaceus*) cultured in Korea. *Bull Eur Ass Fish Pathol* 14(1) : 8~11.
10. Kim YG, Lee KK. 1995. Chracteristics and pathgenicity of a gilding bacterium isolated from flounder(*P olivaceus*) fry in Korea. *Bull Eur Ass Fish Pathol* 15(4) : 125~128.
11. Lee CH. 1993. The development ceroidsis in cultured flounder, *P olivaceus. J Fish Pathol* 6(2) : 143~161.
12. MacFaddin JF. 1980. *Biochemical tests for identification of medical bacteria* Williams and Wilkins. Baltimore/London.
13. Masmura K, Yasunobu H, Okada N et al. 1989. Isolation of a *Vibrio* sp, the causative bacterium of intestinal necrosis of Japanese flounder larvae. *Fish Pathol* 24(3) : 135~141.
14. Myazaki T, Kaige N. 1985. Comparative histology of Edwardsiellosis in fishes. *Fish Pathol* 20(2/3) : 219~227.
15. Mizuno Y. 1993. Control methods of diseased Japanese flounder, *P olivaceus,* used in fish farms in Japan. *J Fish Pathol* 6(2) : 219~231
16. Nakatsugawa T. 1983. *Edwardsiella tarda* isolated from cultured young flounder. *Fish Pathol* 18(2) : 99~101.
17. Oseko N, Yoshimizu M, Kimura T. 1988a. Effect of water temperature on artificial infection of *Rhabdovirus olivaceus* to hirame. *Fish Pathol* 23(2) : 125~132.
18. Oseko N, Yoshimizu M, Gori G. et al. 1988 b. Histopathological study on diseased hirame infected with *Rhabdovirus olivaceus. Fish Pathol* 23(2) : 117~123.
19. Rashid M, Honda K, Nakai T. et al. 1994a. An ecological study on *E tarda* in flounder farms. *Fish Pathol* 29(4) : 221~227.
20. Rashid M, Mekuchi T, Nakai T. et al. 1994 b. A serological study on *E tarda* strains isolated from diseased Japanese flounder (*P olivaceus*). *Fish Pathol* 29(4) : 227.
21. Sakai M, Atsuta S, Kobayashi M. 1994. Survival of fish pathogen *E tarda* in sea water and fresh water. *Bull Eur Ass Fish Pathol* 14(6) : 188~190.
22. Tanasomwang V, Muroga K. 1988. Intestinal microflora of larval and juvenile stages in Japanese flounder. *Fish Pathol* 23(2) : 77~83.