

鰻魚 (*Anguilla japonica*) 在 *Edwardsiella tarda* 與 *Aeromonas hydrophila* 混合感染下之致病性研究

Experimental Studies on the Pathogenicity of *Edwardsiella tarda*
and *Aeromonas hydrophila*. in Eel, *Anguilla japonica*

黃旭田 · 劉正義

Shiuh-Tyan Huang and Cheng-I Liu

Abstract

By using various ways of artificial inoculation, studies on the pathogenicity of eels experimentally infected with bacteria (*E. tarda* and *A. hydrophila*), or immersed in water containing nitrogenous compounds (Ammonia-N, NO_2^- -N) under sublethal concentration levels were conducted.

The intraperitoneal inoculation group was mixed with *E. tarda* (10^6 CFU/ml) and an equal amount of *A. hydrophila* different concentrations as 10^6 , 10^2 CFU/ml. Mortality was presented as 100% (25/25) and 40% (24/60), respectively. Moribund or dead eels had lesions showing reddening and swelling of the anus, marked ecchymous haemorrhage of the ventral portion of the trunk, necrotic lesions of the parenchymous tissues, as well as in the kidney, spleen, and liver. The degree of necrotizing change was directly associated with the increased inoculation concentration of bacteria. Besides, when equal amounts of *E. tarda* (10^6 CFU/ml) and *A. hydrophila* (10^2 CFU/ml) were mixed and injected (I. P.) into eels and placed in water containing Ammonia-N (1.5 ppm) and NO_2^- -N (0.2 ppm), mortality reached 70% (35/50).

During an experimental period, skin incision group of eels (raised in water containing 10^6 CFU/ml of each *E. tarda* and *A. hydrophila*) did not have any deaths. Bacteria isolated from the internal organs and blood did not excel 10^4 CFU/g or ml in number. But during another experimental period when a skin incision group was immersed in water containing 10^6 CFU/ml of bacteria (*E. tarda* and *A. hydrophila*) and nitrogenous compounds (Ammonia-N and NO_2^- -N), they showed 16% (4/25) mortality. Moribund or dead eels showed reddening, increased secretion of mucus, or slight erosion of the gills.

Microscopically, with the exception of necrotic lesions in the parenchymous organs, hyperplasia of epithelial cells in the secondary lamellae of gill were seen.

Lesions were presented in the orally inoculated group of eels, in which the

mortality was 16% (8/50). Gross and histopathological findings were the same as the intraperitoneal inoculation group. But the gastrointestinal tract showed lesions of catarrhal inflammation.

緒 言

本省水產養殖事業發達，特別是鰻魚養殖已步入企業化經營方式；爲了增加單位面積生產量，往往採取高密度集約養殖。但是，高密度養殖方法，却增加傳染病流行的機會，使養殖業遭受魚病而引致經濟損失。據統計，本省由幼鰻至成鰻之養殖階段，平均疾病死亡率高達 52%，而病害死亡原因中則以感染 *Aeromonas hydrophila* 及 *Edwardsiella tarda* 等細菌性疾病佔多數。(林及蕭 1977、林等 1983) 林及蕭 (1977 年) 對本省養殖鰻疾病之統計分析報告中指出，愛德華氏病 (Edwardsiellosis) 單獨發生或與赤鰭病 (Red Fin Disease) 混合感染病例，佔發病死亡鰻魚疾病之 37%，高居首位。

簡與劉 (1986) 以不同路徑人工接種試驗，研討 *E. tarda* 感染鰻魚之致病機制。試驗發現 *E. tarda* 可經腹腔與肌肉注射以及經口感染而使鰻魚致病甚或死亡，其中僅經口組幼鰻有 25% 之發病率，但是中鰻並不發病。至於其他經由菌浴或體表割傷後菌浴組，都不能使試驗鰻發病。本試驗是該研究之延續，試圖觀察 *E. tarda* 在與 *A. hydrophila* 之混合感染情況下是否可能提高鰻魚之發病率，並使病徵更接近自然感染病例。

若林 (1973, 1975)、江草 (1978)、Flagg 及 Hinck (1978)、Plumb 等 (1976) 以及 Walter 及 Plumb (1980) 皆認爲許多環境因子諸如：水溫、季節更換、餌料、水質因子係疾病之素因 (predisposition factor)，並可能誘使水中常在病原菌感染魚類而發病。本試驗亦擬於行 *E. tarda* 與 *A. hydrophila* 之人工感染試驗時，另組採行在水中添加氨 (Ammonia-N) 及亞硝酸鹽 (NO_2^- -N) 之次致死濃度 (Sublethal concentration)，以瞭解不良水質是否能增強病原菌對鰻魚之致病性。

材 料 與 方 法

一、供試鰻魚

本試驗供試鰻係購自鹿港地區某養鰻場，每尾重量約 50~60 g 重。以 130 l 塑膠水槽爲試驗水槽，並裝置過濾器及打氧裝置。供試鰻於試驗前隨機取樣自尾靜脈抽血，依 Gibbs (1969) 等方法行快速平板凝集試驗，以證明未曾感染本試驗菌。鰻魚先行安置七天，並以 Gentamycin: 4 ppm 與 Formalin: 25 ppm 於第二、四天浸浴 24 小時。在整個試驗期間，所有供試鰻均無餵飼。

二、供試菌株

由中區魚病中心分離自野外感染病例之 *Aeromonas hydrophila* (CA 86-88 L) 與 *Edwardsiella tarda* (CA 86-91 K) 爲試驗菌株。試驗前將二菌株分別接種於 Trypticase Soy Broth。經 37°C，18 小時測得發育濃度爲 *E. tarda*: 1.6×10^9 CFU/ml, *A. hydrophila*: 2.7×10^9 CFU/ml，並經腹腔接種再分別重覆接種及回收四次，以增加菌株毒性。供試菌株之半致死濃度 (Lethal dose 50; LD₅₀) 分別爲 *E. tarda*: 3.0×10^5 CFU/ml 及 *A. hydrophila*: 5.4×10^6 CFU/ml。

三、供試菌液之製備

將選用的二菌株 *E. tarda* 及 *A. hydrophila*，分別接種於 TS Broth，經 37°C，24 小時發育後以滅菌生理食鹽水 (0.85% NaCl) 分別經十倍稀釋。腹腔接種組，*E. tarda* 菌液固定爲 10^6 CFU/ml 再分別與等量但不同濃度之 *A. hydrophila* 菌液 10^2 CFU/ml, 10^6 CFU/ml 經振盪器充分均勻混合，做爲接種菌液。口服接種組係將二菌株等量混合 (細菌濃度各爲 10^6 CFU/ml)，然後以 5 ml 混合菌液與 1 g 重鰻魚粉狀飼料之比例再充分混合，以胃導管行人工口服接種至胃內。每次口服接種菌液皆

重新配製，以維持所需之固定濃度。菌浴之水中菌濃度，係於 80 ℓ 試驗水槽內，每天各加入 30 ml 之二供試菌之菌液，使含 10⁶ CFU/ml 之 *E. tarda* 及 *A. hydrophila*。

四、人工接種試驗

人工接種試驗之試驗分組請參見 Table 1。A 組為腹腔注射組，B 組為菌浴組。A 組再區分為 4 個處理組。A-I 至 A-III 各組鰻魚皆注射 1 ml 之混合菌液，其混合菌液含 *E. tarda* 與 *A. hydrophila* 二菌濃度之比例，請參見 Table 1。A-III 組除腹腔注射 1 ml 混合菌液外，接種後鰻魚使置於含 Ammonia-N=1.5 ppm 及 NO₂⁻-N=0.2 ppm 之試驗槽水中。A-IV 組為對照組，即腹腔注射生理食鹽水。菌浴組亦再區分為三個處理組。每組菌浴之細菌濃度為含 *E. tarda* 及 *A. hydrophila* 各 10⁶ CFU/ml。B-I 組為皮膚割傷後菌浴組；B-II 組為皮膚割傷，及菌浴於水中放置含氮化合物（初含量如 A-III 組；但於試驗過程中並不換水，水中含氮化合物量任其消長增減）。B-III 組為口服接種後菌浴組，口服 1 ml（含菌濃度為 10⁶ CFU/ml 之 *E. tarda* 與 *A. hydrophila*），每隔日灌服一次，共灌服三次。菌浴之各處理組皆有等量鰻魚為對照組，即不行菌浴或以灌服飼料 B-III 之對照組。所有菌浴及腹腔接種之供試鰻，皆自感染後開始觀察，並於接種後 12 小時、1 天、2 天、3 天、4 天、5 天、6 天、7 天、10 天、14 天等各解剖四尾並採樣行各項實驗。試驗中若有供試鰻死亡亦即刻解剖及實行各項實驗，接種後 30 天試驗結束，所有供試鰻亦行剖檢及採樣試驗。

Table 1. Inoculation and Sampling Schedule

Inoculation group		Sampling
A. (Peritoneal Inoculation)	I: 10 ⁶ CFU/ml <i>E. tarda</i> -10 ⁶ CFU/ml <i>A. hydrophila</i>	25
	II: 10 ⁶ CFU/ml <i>E. tarda</i> -10 ² CFU/ml <i>A. hydrophila</i>	60
	III: 10 ⁶ CFU/ml <i>E. tarda</i> -10 ² CFU/ml <i>A. hydrophila</i> (immersed in water containing nitrogenous compounds.)	50
	IV: Control (I. P. with 0.85% NaCl Saline)	60
B. (Immersion)*	I: Skin Incision	50(50)#
	II: Incision and Immersed in water containing nitrogenous compounds	25
	III: Oral inoculations	50(50)

*: Contained *E. tarda* and *A. hydrophila* (10⁶ CFU/ml for each).

#: Control.

五、試驗水槽 Ammonia-N 及 NO₂⁻-N 之添加及測試

依 Yamagata 及 Niwa 之方法 (1982) 以 NH₄Cl 及 NaNO₂ 依 Ammonia-N=1.5 ppm，NO₂⁻-N=0.2 ppm 之濃度加入試驗水槽 (80 ℓ 水)。試驗期間每日以 Direct Nesslerization 法 (陳 1981) 測試 Ammonia-N 以及 Griess-Romijn 法 (陳 1981) 測試 NO₂⁻-N 之水中濃度。若濃度不足則酌量再添加 NH₄Cl 及 NaNO₂，若濃度太高則加水以稀釋之，使供試驗水槽保持在 Ammonia-N=1.5 ppm 及 NO₂⁻-N=0.2 ppm 之條件下。本試驗水槽保持水溫在 25±1°C 及酸鹼度 (pH 值) 在 7.8±0.2 之條件下。

六、供試鰻體 *E. tarda* 及 *A. hydrophila* 之分離、鑑定與菌數測定

人工接種各組供試鰻於試驗期間定期採樣 (包括各組之死亡鰻魚)。鰻魚經 MS-222 麻醉後，體

表由 70%酒精棉擦拭後剖開體腔，依無菌操作法採取肝、腎、胃腸道及鰓各為 0.5 g 重以及脾 0.3 g 重，分別放入滅菌研鉢中磨碎，製成 10 倍乳劑。再以滅菌生理生鹽水 (0.85% NaCl) 行 8 階段十倍稀釋，每階段重覆計算四次。各稀釋液以微量分注器 (micropipete) 吸取 0.01 ml 滴於 Xylose Lysine Desoxy cholate Agar，並培養於 37°C，24 小時後計算菌落數。將發育不同之菌落經 Cytochrome Oxidase 反應以區分屬於腸內細菌科後，再接種於 TSI, SIM, Lysine Decarboxylase Broth, Arginine Decarboxylase Broth, O-F Test, Simmon's Citrate, Urea, MR-VP Medium 等生化鑑定培養基，以確定 *E. tarda* 及 *A. hydrophila* (郭等 1977 及 Baumann 等 1984)。

七、肉眼及組織病理學檢查

各組試驗鰻行剖檢時，詳加檢查及記錄供試鰻外表及臟器之肉眼變化。肝、腎、脾、胃腸道、鰓、腦、心臟及具有肉眼病變的組織器官固定於 10%中性福馬林液。固定後標本經石臘包埋、切片及染色 (H & E Stain) 後鏡檢其組織病理變化。

結 果

一、腹腔接種試驗成績

1. A-I 組 (*E. tarda* 10⁶ CFU/ml + *A. hydrophila* 10⁶ CFU/ml) :

本組試驗鰻接種 12 小時後均可自體內諸臟器及血液內分離到 *E. tarda* 及 *A. hydrophila*，由各臟器分離的細菌數 *E. tarda* 為 10³⁻⁵ CFU/g; *A. hydrophila* 為 10¹⁻² CFU/g。接種後不久開始見鰻魚死亡，直到第 7 日所有供試鰻全數死亡。死亡鰻魚各內臟之菌濃度皆達 10⁶ CFU/g 以上。(Table 2)

Table 2. Distribution and concentration of *E. tarda* and *A. hydrophila* in eels after I. P. with *E. tarda* (10⁶ CFU/ml) and *A. hydrophila* (10⁶ CFU/ml)

Day	Organ	Kidney	Spleen	Liver	Blood	No. of eels died (With Mortality)
1/2		A : 1.72*	A : 1.40	A : 0.76	A : 1.27	1
		E : 4.86	E : 4.04	E : 3.26	E : 3.68	
1		A : 2.34	A : 2.00	A : 1.52	A : 2.40	2
		E : 5.67	E : 6.28	E : 3.37	E : 6.79	
2		A : 4.76	A : 4.26	A : 4.40	A : 4.77	3
		E : 7.94	E : 6.57	E : 6.58	E : 6.89	
3		A : 6.85	A : 5.23	A : 3.68	A : 3.46	3
		E : 8.43	E : 7.92	E : 6.72	E : 5.80	
4		A : 7.62	A : 7.40	A : 4.50	A : 5.82	5
		E : 6.48	E : 6.87	E : 3.26	E : 4.26	
5		A : 7.40	A : 6.48	A : 3.52	A : 4.50	4
		E : 5.25	E : 5.86	E : 4.30	E : 3.43	
6		A : 6.86	A : 7.62	A : 4.37	A : 5.60	4
		E : 3.44	E : 4.60	E : 3.40	E : 2.64	
7		A : 7.15	A : 7.86	A : 5.60	A : 6.38	3
		E : 4.72	E : 3.80	E : 3.12	E : 2.86	

25(100%)

E: *E. tarda*.

A: *A. hydrophila*.

* : Presented in log₁₀.

二種接種菌在體內臟器及血液中之消長有明顯之對比。接種後 *E. tarda* 的菌數逐日上升，到第 3 日後再逐漸下降，而 *A. hydrophila* 則自接種後持較穩定的上升現象。

接種後死亡鰻體呈典型之細菌性敗血症。外觀上病鰻鰭部發紅，體軀兩側點狀至斑狀出血及肛門紅腫。(Fig. 1) 少數較後期死亡鰻魚大都因腹水而致腹部膨大。實質器官如肝、腎、脾都不見肉眼病變或偶可見輕度至中等度腫大。腹腔可見腹膜混濁、潮紅之腹膜炎病徵。

組織病理學上以腎、脾、肝臟之局部壞死 (Focal necrosis) 至瀰漫性壞死 (Diffuse necrosis) 為主要病變。脾臟血竇 (Sinusoid) 明顯擴張、充血。(Fig. 2) 一些已呈核濃縮及核破裂之造血細胞散佈其間，亦可見較明顯之局部壞死灶，以及炎症滲出物堆積於組織間隙。腎臟之壞死區大都在腎間造血組織，嚴重時波及絲球體及腎小管。(Fig. 3) 胃腸道之漿膜層有少許纖維素附著，並可見淋巴球浸潤，顯示腹膜炎之病徵。鰻及其他組織無特異性病變。

2. A-II 組 (*E. tarda* 10^6 CFU/ml + *A. hydrophila* 10^2 CFU/ml) :

本組於接種後第三日才開始在各臟器分離到 *A. hydrophila*，並見死亡病例，直至第十日共有 24 尾供試鰻發病死亡，死亡率為 40% (24/60)。臟器之細菌濃度以腎、脾較高，二菌合併計算腎為 10^{8-12} CFU/g，而脾為 10^{6-11} CFU/g。血液中 *A. hydrophila* 至接種第三日始分離出，而至第七日又消失。(Table 3) 各臟器及血液中細菌之消長顯示 *E. tarda* 呈平緩上昇；*A. hydrophila* 出現較慢，而開始爬升不久即直線下降。

病死鰻之病變亦與 A-I 組所見大致相同。

Table 3. Distribution and concentration of *E. tarda* and *A. hydrophila* in eels after intraperitoneal inoculation with *E. tarda* (10^6 CFU/ml) and *A. hydrophila* (10^2 CFU/ml)

Day	Organ	Kidney	Spleen	Liver	Blood	No. of eels died (With Mortality)
1/2		E : 3.58*	E : 3.67	E : 1.76	E : 3.30	0
1		A : 0.54 E : 4.68	E : 4.27	E : 2.60	E : 4.27	0
2		A : 2.54 E : 4.92	A : 2.73 E : 4.52	E : 2.27	E : 5.81	0
3		A : 3.58 E : 5.96	A : 4.87 E : 5.89	A : 2.02 E : 3.94	A : 3.76 E : 4.79	4
4		A : 4.49 E : 5.87	A : 4.15 E : 4.87	A : 3.85 E : 4.58	E : 6.68	6
5		A : 3.48 E : 5.96	A : 2.87 E : 6.72	A : 2.67 E : 4.88	A : 1.85 E : 6.67	4
6		A : 2.50 E : 6.63	A : 3.14 E : 6.82	A : 1.54 E : 5.20	A : 2.20 E : 6.51	4
7		A : 3.25 E : 7.88	A : 2.34 E : 7.52	A : 1.87 E : 6.52	E : 7.45	5
10		A : 3.47 E : 4.79	A : 3.25 E : 3.39	A : 2.14 E : 2.48	—	1
						24(40%)

E : *Edwardsiella tarda*.

A : *Aeromonas hydrophila*.

* : Presented in \log_{10} .

3. A-III 組 (*E. tarda* 10^6 CFU/ml + *A. hydrophila* 10^3 CFU/ml, 並浸浴於含 Ammonia-N 及 NO_2^- -N 之水槽中) :

本組試驗期間共有 35 尾供試鰻發病死亡, 死亡率為 70% (35/50)。接種感染後 12 小時, 亦只能分離 *E. tarda*。供試鰻接種第二日後陸續死亡。本組臟器及血液中的菌量比 A-II 組高達 10~100 倍, 且菌血症時間延長。各臟器含菌量在感染二日以上之鰻魚, 均達 10^6 - 10^{12} CFU/g (*E. tarda* + *A. hydrophila*)。(Table 4) 二菌在各臟器的消長分析, 顯示 *E. tarda* 自接種開始即逐漸上升, 至第 5 天達高峯, 然後逐漸下降; 而 *A. hydrophila* 出現後即持續平緩增殖, 然後再顯著上升。

發病死亡鰻體其病徵與上述各組大致雷同, 惟鰓瓣潮紅, 並黏附較多量黏液。此外, 部份病鰻亦可見腹腔蓄積多量清澈腹水。鰓之鏡下病變以鰓薄板上皮細胞增生、肥大及部份血竇呈輕度之擴張為特徵。(Fig. 4)

Table 4. Distribution and concentration of *E. tarda* and *A. hydrophila* in eels after I. P. with *E. tarda* (10^6 CFU/ml) and *A. hydrophila* (10^3 CFU/ml) and immersed in water containing Ammonia-N (1.5 ppm) and NO_2^- -N (0.2 ppm)

Organ Day	Kidney	Spleen	Liver	Blood	No. of eels died (With Mortality)
1/2	E : 4.86*	E : 4.45	E : 2.43	E : 3.78	0
1	A : 1.28	A : 1.32			
	E : 4.90	E : 4.32	E : 3.20	E : 4.15	0
2	A : 2.25	A : 3.48	A : 3.18	A : 1.26	
	E : 5.49	E : 5.80	E : 4.56	E : 4.43	2
3	A : 3.67	A : 3.63	A : 4.21	A : 3.80	
	E : 5.75	E : 5.86	E : 4.68	E : 4.62	3
4	A : 4.37	A : 2.52	A : 2.57	A : 2.21	
	E : 5.86	E : 5.76	E : 5.82	E : 4.23	3
5	A : 3.62	A : 3.47	A : 4.26		
	E : 6.58	E : 6.92	E : 5.85	E : 6.74	4
6	A : 5.76	A : 4.02	A : 5.76	A : 2.63	
	E : 5.65	E : 6.63	E : 4.63	E : 5.87	6
7	A : 6.75	A : 5.42	A : 6.72	A : 4.87	
	E : 4.58	E : 5.68	E : 4.02	E : 3.82	8
8	A : 6.89	A : 6.43	A : 5.40	A : 5.87	
	E : 3.42	E : 4.27	E : 3.76	E : 3.14	4
9	A : 6.67	A : 6.82	A : 5.72	A : 4.42	
	E : 2.92	E : 3.08	E : 3.50	E : 3.27	2
10	A : 6.84	A : 6.00	A : 4.38	A : 5.36	
	E : 1.06	E : 2.54	E : 3.75		2
12	A : 5.83	A : 6.87	A : 3.40		
	E : 2.47	E : 2.86	E : 2.83	E : 4.32	1
					35(70%)

E: *Edwardsiella tarda*.

A: *Aeromonas hydrophila*.

* : Presented in \log_{10} .

Table 5. Distribution and concentration of *E. tarda* & *A. hydrophila* in eels after incision and immersion with 10^6 CFU/ml of *E. tarda* and *A. hydrophila*

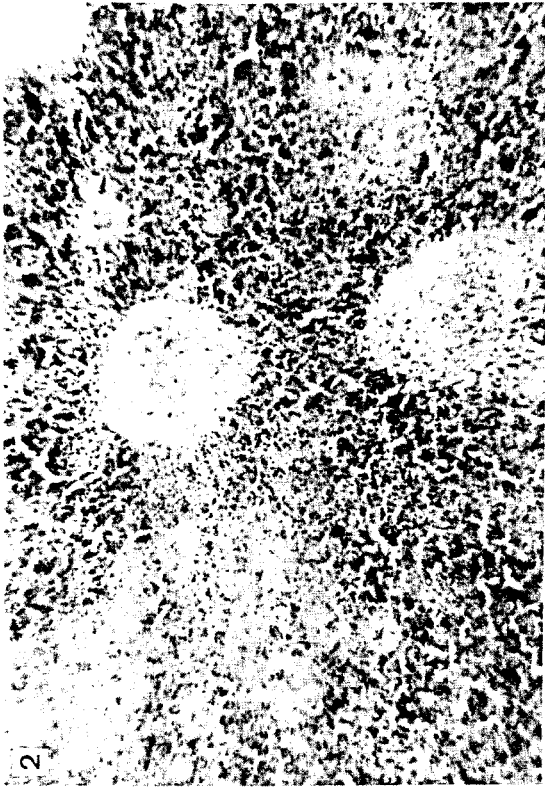
Organ Day	Liver	Kidney	Spleen	G-Itract	Gill	Blood
1/2	—	—	—	A : 1.3* E : 2.57	A : 2.33* E : 3.49	—
1	—	—	—	A : 2.00 E : 3.20	A : 2.75 E : 3.70	—
2	—	—	—	A : 2.25 E : 3.78	A : 2.50 E : 3.60	—
3	—	—	—	A : 2.60 E : 3.85	A : 3.85 E : 3.56	—
4	—	—	—	A : 2.10 E : 3.25	A : 2.35 E : 3.50	—
5	—	A : 1.30 E : 1.52	E : 1.60 E : 2.20	A : 1.50 E : 2.78	A : 1.27 E : 3.52	—
6	—	—	—	A : 2.48 E : 3.57	A : 2.16 E : 3.25	—
7	E : 0.5 —	E : 1.30 —	—	A : 1.00 E : 2.58	A : 2.50 E : 2.68	E : 1.85
10	—	—	E : 1.27 A : 1.20	A : 2.45 E : 3.50	A : 2.85 E : 3.95	A : 1.50 E : 1.54
14	E : 0.85	E : 1.26	E : 2.00	A : 1.50 E : 2.75	A : 1.58 E : 3.30	—
17	E : 1.2 A : 0.78 E : 1.00	E : 2.30 A : 1.26 E : 1.14	E : 2.00 A : 1.00 E : 1.85	A : 2.15 E : 3.50	A : 2.50 E : 3.68	A : 1.25 E : 1.40
21	—	A : 0.54	A : 1.42	A : 3.15 E : 1.20	A : 2.13 E : 2.47	—

A: *Aeromonas hydrophila*; E: *Edwardsiella tarda*.

* : Presented in \log_{10} .

Explanation for Figures

- Fig. 1. Eel. 2 days post I.P. with 10^6 CFU/ml of *E. tarda* and *A. hydrophila*. Showing marked petechial lesion in the ventral portion of the trunk.
- Fig. 2. Spleen. Eel. 4 days post I.P. with 10^6 CFU/ml of *E. tarda* and *A. hydrophila*. The haematopoietic tissue disappeared and the sinusoids were dilated and engulfed with blood. $\times 100$. H and E.
- Fig. 3. Kidney. Eel. 3 days post I.P. with 10^6 CFU/ml of *E. tarda* and *A. hydrophila*. Marked necrotizing change involved mainly the renal interstitium and partly the renal tubules. $\times 160$. H and E.
- Fig. 4. Gill. Eel. 10 days post I.P. with *E. tarda* (10^6 CFU/ml) and *A. hydrophila* (10^6 CFU/ml), and immersed in water containing Ammonia-N (1.5 ppm) and NO_2^- -N (0.2 ppm). Note hyperplasia of epithelial cells of secondary lamellae which fused together to form a dense cellular mass. Most capillaries in gill lamellae were collapsed but some (arrow) were dilated as a lesion of telangiectasis. $\times 250$. H and E.



二、菌浴組

1. B-I 組 (體表割傷後菌浴組, *E. tarda* 10⁶ CFU/ml + *A. hydrophila* 10⁶ CFU/ml) :

試驗期間試驗及對照組亦無供試鰻發病死亡。體表割傷後菌浴 12 小時後, 可從胃腸道及鰓分離出 *A. hydrophila* 及 *E. tarda*。於試驗終了, 胃腸道 *E. tarda* 及 *A. hydrophila* 菌濃度維持在 10¹⁻⁴ CFU/g, 而鰓部 *E. tarda* 菌量為 10²⁻⁴ CFU/g; *A. hydrophila* 為 10¹⁻³ CFU/g。內臟之含菌量, 於菌浴感染第 4 天, 可從脾臟分離出 *E. tarda*。整個試驗期間腎、脾含菌量較高, 但各臟器菌量 (*E. tarda* + *A. hydrophila*) 均未達 10⁴ CFU/g。血液菌量則由菌浴感染後第 7 天才分離出 *E. tarda* 10¹⁻² CFU/ml, 且二菌之分離率較低。(Table 5)

肉眼及剖檢亦無特異性病變。體表割傷部位於第 6 天已呈癒合。

2. B-II 組 (皮膚割傷後菌浴, 但水中含 Ammonia-N 及 NO₂⁻-N) :

試驗期間共有 4 尾 (4/25) 供試鰻發病死亡。菌浴第 3 天開始於腎、脾分離出 *A. hydrophila*, 直到第 6 天各臟器及血液才分離到兩菌, 但細菌濃度尚低。第 8 日開始見供試鰻死亡, 其腎臟含菌濃度為 10⁴⁻⁶ CFU/g (*E. tarda* + *A. hydrophila*)。(Table 6) 與 B-I 組比較本組各臟器含菌時間較長且菌量亦較高。

本組試驗期間於水槽中添加氯化銨 (Ammonia-N: 1.5 ppm) 及亞硝酸鈉 (NO₂⁻-N: 0.2 ppm)。但因不換水, 故隨日數增加水中含氮及亞硝酸鹽濃度亦持續增加, 試驗期間水中含 Ammonia-N 最高量為 9.5 ppm; 含 NO₂⁻-N 為 2.2 ppm。(Fig. 5)

發病死亡之所有鰻魚其病變與 A-III 相似, 但鰓弁較為蒼白部份鰓絲缺損及多量粘液附著於鰓弁上。鰓之組織病變甚為顯著, 供試鰻大多可見鰓上皮細胞增生, 且壓迫微血管, 嚴重病例上皮壞死及脫

Table 6. Distribution and concentration of *E. tarda* and *A. hydrophila* in eels after incision and immersion with 10⁶ CFU/ml of bacteria (*E. tarda* and *A. hydrophila*) and nitrogenous compounds (NH₄⁺-N + NO₂⁻-N)

Organ Days	Kidney	Spleen	Liver	Blood	No. of eels died
1/2	—	—	—	—	0
1	—	—	—	—	0
2	—	—	—	—	0
3	A : 1.41*	A : 1.78	—	—	0
4	—	A : 1.40	—	—	0
5	A : 2.43	A : 2.62	—	—	0
6	A : 1.18 E : 1.36	A : 1.47 E : 1.12	A : 0.48	E : 2.00	0
7	A : 1.34 E : 1.26	A : 1.20 E : 1.28	E : 0.65	E : 1.25	0
8	A : 2.45 E : 2.87	A : 1.45 E : 2.86	A : 1.45	A : 1.47 E : 2.30	1
10	A : 1.67 E : 3.43	A : 1.57 E : 3.72	A : 0.85 E : 2.12	E : 3.56	2
11	A : 1.87 E : 3.32	A : 1.24 E : 3.89	A : 0.87 E : 1.45	A : 1.35 E : 2.47	1
14	A : 1.00 E : 1.20	A : 1.20	A : 0.72	A : 1.46	0

A: *A. hydrophila*., E: *E. tarda*.

* : Presented in log₁₀.

PH: 7.77 ± 0.29

Water temperature: $24.1 \pm 0.4^{\circ}\text{C}$

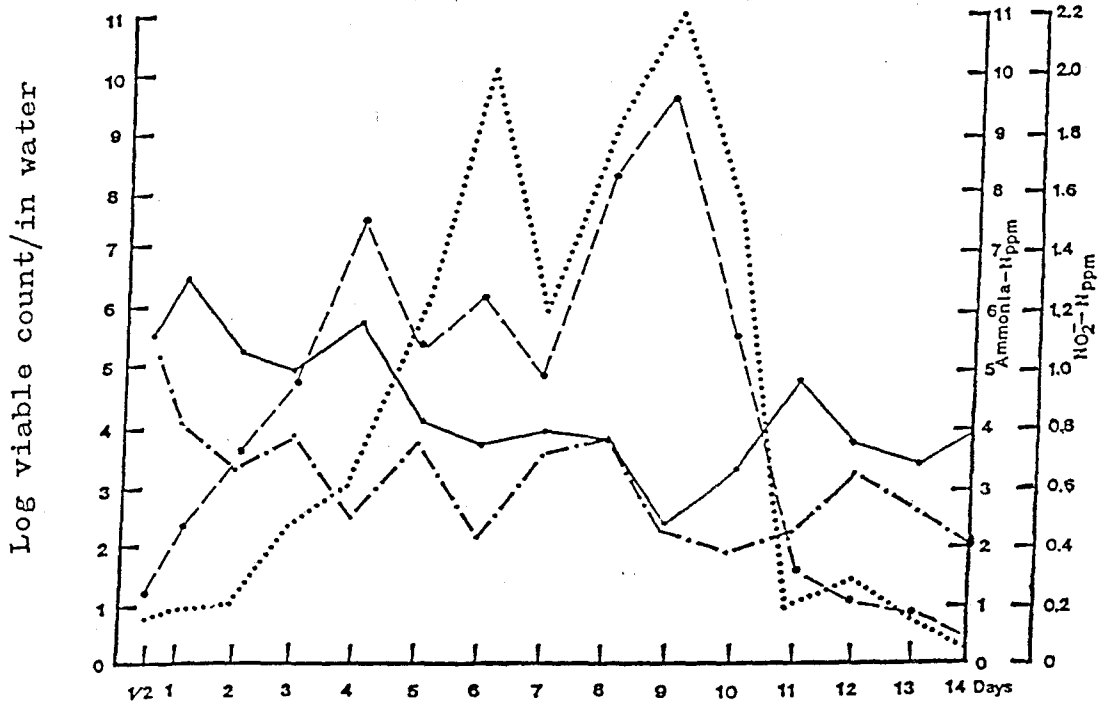


Fig. 5. Variation of *E. tarda* & *A. hydrophila* in water associated with different concentration of nitrogenous compounds.

---: *E. tarda*; —: *A. hydrophila*
---: Ammonia-N; : NO₂⁻-N

落顯著。(Fig. 6) 腎亦呈較顯著之晶質球滴樣變性，脾亦能見造血組織呈進行性壞死現象。(Fig. 7)

3. B-III 組 (經口接種菌浴組) :

供試鰻於試驗期間發病死亡共有 8 尾，死亡率達 16% (8/50)，而對照組並無供試鰻死亡。試驗及對照組於 12 小時能由胃腸道及鰓分離出 *E. tarda* 及 *A. hydrophila*；各臟器及血液在第 4 天後才能分離到二供試菌。腎、脾含菌量較肝為高，且保菌時間亦較長；對照組狀況相似。試驗組胃腸道及鰓兩菌總數皆呈顯著而穩定之增加。死亡鰻體之腎、脾含菌量 10^{2-6} CFU/g、肝含菌量為 10^{1-4} CFU/g (*E. tarda*+*A. hydrophila*)。(Table 7)

死亡供試鰻，外觀亦有顯著出血斑及腹鰭充血。但胃腸道黏膜大都潮紅且黏液分泌增加。腎、脾及肝等雖不見肉眼病變，但鏡下則可見小壞死灶。(Fig. 8) 試驗組之胃黏膜下層大都聚集水腫液。腸道呈典型之卡他性腸炎，鏡下可見黏液分泌增加及細胞脫落現象。(Fig. 9) 對照組無肉眼與組織病理病變。

討 論

野外養殖鰻魚感染愛德華氏菌，常可自病鰻體內臟器分離出 *E. tarda* 及 *A. hydrophila*。(林及蕭 1977 Hoshina 1962) 簡及劉 (1986) 雖然經人工接種試驗明瞭 *E. tarda* 對鰻魚之病原性及其致病機制；但若 *E. tarda* 與 *A. hydrophila* 混合感染，以及在水環境中有 Ammonia-N 與 NO₂⁻-N 之

水質因子刺激下是否更能危害鰻體乃是本研究所欲證實者。

本試驗由腹腔接種 *E. tarda* (10^6 CFU/ml) 及不同濃度之 *A. hydrophila* 顯示在 *E. tarda* 之菌液濃度相同時，對鰻體之致病性隨著 *A. hydrophila* 混合感染之菌液濃度增高而增加死亡率。各處理組死亡率依次為 A-I: 100% (25/25), A-II: 40% (24/60), A-III: 70% (35/50)。所有處理組之死亡鰻臟器含菌量 (*E. tarda*+*A. hydrophila*) 大都在 10^6 CFU/g 以上。這與董等 (1981)、鍾及郭 (1974)、簡及劉 (1986) 以人工單獨接種 *E. tarda* 或 *A. hydrophila* 發病死亡鰻體在肝、腎、脾及血液之含菌量均達 10^6 CFU/g (ml) 以上所見相同。即病鰻臟器之菌量與致死性有絕對的關係。

在兩菌皆為高菌液濃度下 (A-I 組)，供試鰻大都死於急性敗血症。除了急性腹膜炎外，腎、脾及肝臟皆能見到壞死灶，尤其以腎、脾等網狀內皮系之含菌量最高，炎症性充血及造血細胞壞死之現象甚顯著。由組織病理學變化顯示臟器含菌量愈多，破壞組織之程度愈嚴重。本試驗之各組試驗鰻大都在腎、脾分離到最高濃度之細菌。鍾及郭 (1974), Wakabayashi 及 Egusa (1979) 等人亦指出此現象，並解釋這是因為腎與脾是魚的重要網狀內皮系統，具有攻擊及清除細菌之能力，也就是與引致敗血症之細菌激烈戰鬥之場合。如若能在該處消滅細菌則病魚可恢復健康，否則勢必見細菌在該處之優勢而有大量增殖之現象。

A-II 與 A-III 的細菌感染濃度相同，皆為 *E. tarda* 10^6 CFU/ml 及 *A. hydrophila* 10^6 CFU/ml，但死亡率有差異。其不同在於 A-III 組係行腹腔接種後讓供試鰻浸泡於 Ammonia-N=1.5 ppm 及 NO_2^- -N=0.2 ppm 之水槽中。顯示水環境中含氮及亞硝酸鹽是可以促進鰻魚對細菌之感受性。Flagg 及 Hinck (1978) 將 channel catfish 分組飼養於含不同濃度之非離子氨 (NH_3 -N) 水槽中，在不同時間內由肝臟分離出 *A. hydrophila* 菌量，則有顯著差異。Hanson 及 Grizzle 1985 指出將低於半致死濃度 (sublethal doses 50) 之 *A. hydrophila* 菌濃度接種於 channel catfish 後，飼養於含有 5 ppm NO_2^- -N 之水槽中達 7 天，魚體對細菌之清除率降低，相對的延長臟器保菌的時間。Plumb 等 1976 調查池中溶氧量低的養殖鯰魚中發生大量死亡，由罹病魚體可分離出 *A. hydrophila*。這些試驗證據說明某些環境緊迫因子可以增強細菌對宿主之病原性。

菌浴組 B-I 體表割傷後混合菌浴 *E. tarda* 及 *A. hydrophila*，於試驗期間發現各臟器含菌量均未達致死濃度 (10^6 CFU/g)，故無發病及死亡。保科 (1962) 利用菌浴法、簡及劉 (1986) 亦採用菌浴法及體表割傷後菌浴，亦都無法引致鰻魚發病死亡。這說明了養殖池水中即使有病原性細菌，在沒有其

Explanation for Figures

- Fig. 6. Gill. Eel. 12 days after skin incision and immersed in water containing 10^6 CFU/ml of *E. tarda* and *A. hydrophila*, and immersed in water containing Ammonia-N (1.5 ppm) and NO_2^- -N (0.2 ppm). The epithelial cells of secondary lamellae showed extensive hyperplasia. Part of the hyperplastic lamellae were desquamatic and infiltrated by inflammatory cells. $\times 250$.
- Fig. 7. Kidney. 8 days after skin incision and immersed in water containing 10^6 CFU/ml of *E. tarda* and *A. hydrophila*, as well as in water containing nitrogenous compounds. The hematopoietic tissue of the kidney underwent necrotizing change. Pyknosis, karyorrhexis and karyolysis were markedly seen in this picture. $\times 160$. H and E.
- Fig. 8. Liver. Eel. Oral inoculation and immersed with both 10^6 CFU/ml of *E. tarda* and *A. hydrophila*. Showing early lesions of focal necrosis. Dissociation of hepatic cords were also noticed. $\times 400$. H and E.
- Fig. 9. Intestine. Eel. Oral inoculation and immersed with both 10^6 CFU/ml of *E. tarda* and *A. hydrophila*. Marked catarrhal enteritis. Increased numbers of goblet cells and infiltration of inflammatory cells were noted in the villi, of which, some were desquamatic. $\times 160$. H and E.

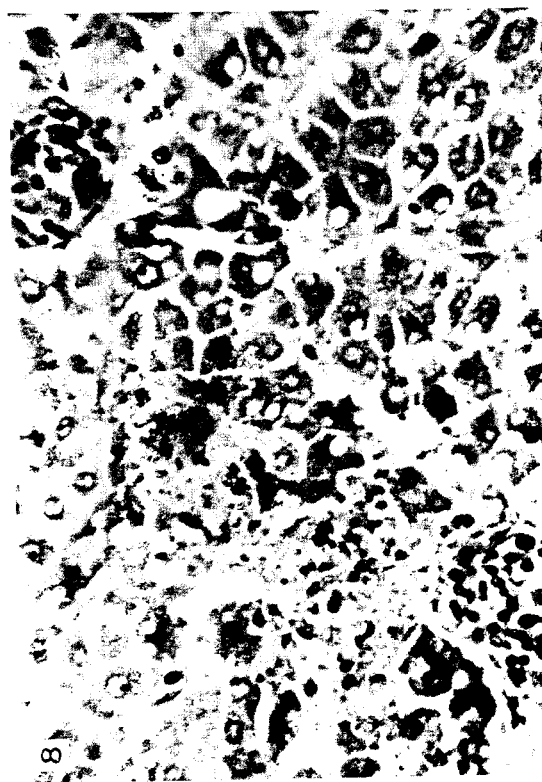
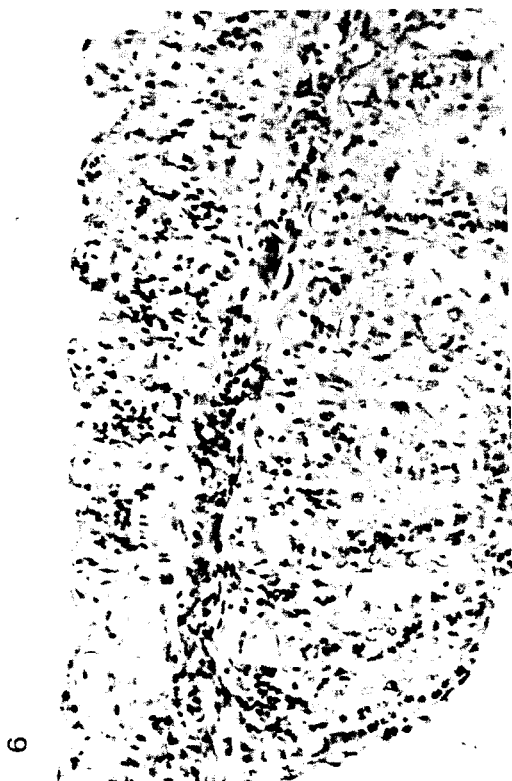
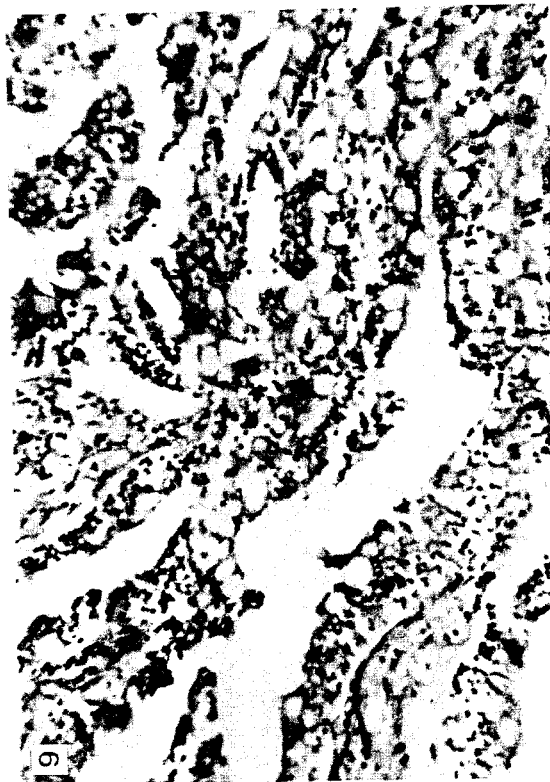
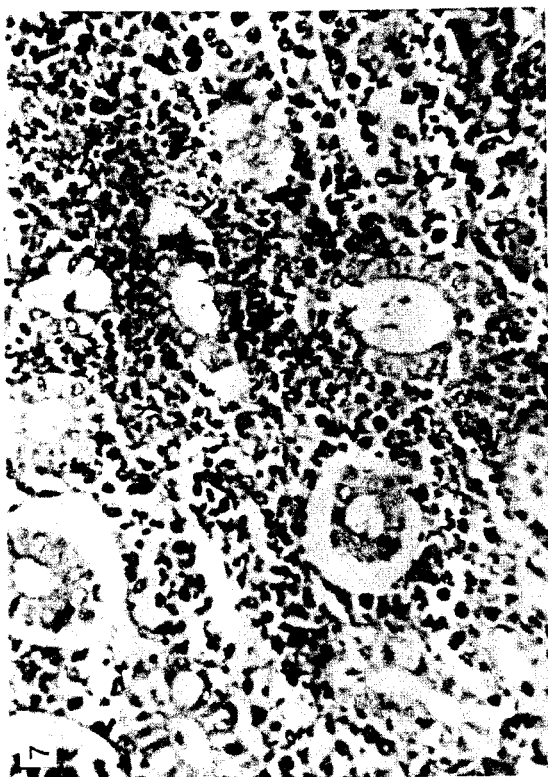


Table 7. Distribution and concentration of *E. tarda* & *A. hydrophila* in eels after oral inoculation and immersed in water containing 10⁸ CFU/ml of *E. tarda* & *A. hydrophila*

Organ Day	Liver	Kidney	Spleen	G-tract	Gill	Blood	No. of eels died
1/2	-/-#	-/-	-/-	* A : 2.41/2.26 E : 3.20/3.59	A : 3.54/3.46 E : 3.68/3.56	-/-	0/0
1	-/-	-/-	-/-	A : 2.32/2.43 E : 3.58/3.26	A : 2.40/2.56 E : 3.23/3.90	-/-	0/0
2	-/-	-/-	-/-	A : 4.74/3.36 E : 4.15/4.65	A : 3.18/3.26 E : 4.45/3.57	-/-	0/0
3	-/-	A : 1.50/- E : 2.60/2.38	-/-	A : 4.20/3.58 E : 4.48/3.76	A : 2.45/3.28 E : 3.83/3.57	-/-	0/0
4	A : -/- E : 2.69/-	A : -/- E : 3.98/-	A : -/1.25 E : 3.23/-	A : 6.23/3.68 E : 7.50/4.32	A : 4.26/3.60 E : 5.60/4.32	A : -/1.30 A : 1.50/- E : 3.23/-	1/0
5	-/-	A : -/- E : 1.20/-	A : -/- E : 1.48/-	A : 3.26/2.43 E : 4.56/3.51	A : 3.25/3.16 E : 3.43/4.40	-/-	0/0
6	A : -/- E : 1.27/-	A : 1.50/1.38 E : 2.40/2.10	A : 1.32/- E : 3.90/1.35	A : 4.30/3.91 E : 4.57/4.95	A : 5.26/3.28 E : 5.67/4.62	-/-	1/0
7	A : -/- E : 1.95/-	A : -/1.53 E : 2.58/-	A : 1.32/ E : 2.75/1.32	A : 6.54/2.87 E : 6.80/3.52	A : 4.26/3.30 E : 5.63/4.66	A : 2.10/- E : 3.58/2.42	2/0
10	A : 2.59/- E : -/-	A : 2.00/1.57 E : 2.50/2.45	A : 1.70/1.69 E : 2.38	A : 5.42/2.43 E : 6.28/3.26	A : 4.20/2.04 E : 5.80/3.66	-/-	1/0
11	-/-	A : -/ E : 1.28/	A : -/ E : 1.45	A : 6.00/ E : 6.49/	A : 4.83/ E : 5.80	A : 1.15/ E : 2.43	1/0
14	A : 2.00/ E : 2.48/-	A : 2.84/2.47 E : 3.20/1.63	A : 2.90/1.17 E : 2.89/1.20	A : 6.48/4.58 E : 7.39/4.32	A : 5.47/3.18 E : 6.25/4.30	A : 2.45/- E : 3.57/1.60	2/0
17	A : 1.48/ E : -/-	A : -/0.95 E : 1.36/1.47	A : -/ E : 1.84/1.58	A : 2.15/2.07 E : 4.17/3.62	A : -/2.43 E : 4.84/3.56	A : 1.25/- E : -/1.26	0/0

*: A: *A. hydrophila*; E: *E. tarda*; Presented in log₁₀.

#: Tested/Controlled.

他誘因之下，並不引致細菌感染症。但是觀之本試驗之 B-II 組，即在與 B-I 之菌浴條件相同外又使供試鰻浸浴於含氮化合物之水中，則可見發病死亡病例；但死亡鰻體臟器之含菌量並不高。本組於試驗期間並不換水，因此水中含氮化合物節節升高，最高量達 Ammonia-N: 9.5 ppm 及 NO_2^- -N: 2.2 ppm。為免却本組試驗鰻急性中毒，水槽內充分打氣，以使溶氧量能維持在 6.5~7.2 ppm。與 B-I 組比較，供試鰻之臟器細菌數，雖然水中細菌量逐漸下降，而腎、脾之含菌量則高出甚多，且保菌時間延長。

本試驗所有浸泡於氮化合物水域中之供試鰻 (A-III, B-II 組) 因發病而死亡之鰻魚，皆可見到鰓組織呈典型之慢性氨中毒病徵，即鰓薄板上皮細胞增生。嚴重病例因而可能無法行使正常呼吸功能。即使鰓之病變並不嚴重，相信在氨及亞硝酸之刺激下亦使鰻魚之抗病能力減低，而易感染發病甚或死亡。

有關魚體緊迫引致之生理學已有許多研究。(Ahine 1983, Roberts 1978 Smith 1982) Tomass 等 (1981) 報告中指出，將 channel catfish 各別置於含 NO_2^- -N=5 ppm 及 Total Ammonia-N=200 ppm 之試驗水槽中。經 8 小時之浸浴，Total Ammonia-N 處理組血漿中 corticosteroid 濃度昇至最高濃度 10~11 $\mu\text{g}/\text{dl}$ ，然後隨時間增長而成直線下降，24 小時後血漿中之 corticosteroid 濃度仍然維持一定濃度 5 $\mu\text{g}/\text{dl}$ 。 NO_2^- -N 處理組隨浸浴時間的延長，24 小時後達最高濃度 8~9 $\mu\text{g}/\text{dl}$ 。如將兩者 NO_2^- -N=5 ppm 及 Total Ammonia-N=200 ppm 同時放置水槽中，由 channel catfish 血漿中測出的 corticosteroid，並無協同性作用 (synergistic interaction) 之增加。Schreck 及 Lorz (1978) 亦指出將 Coho salmon 置於含不同銅離子濃度之水槽中，在 78 小時後各處理組魚體血清中之 cortisol 含量均提高。McLeay (1972) 證實隨劑量的提高注射 ACTH 於 Coho salmon 體內，可使小淋巴球顯著性的減少，但嗜中性球相對性的增高。因此，長期緊迫而使魚體分泌可體松 (cortisol)，影響魚體免疫能力，相信是使魚體抗病力減弱之主要因素 (Roberts 1978, Smith 1982)。一般養殖戶為了增加單位面積生產量，大都有過於密飼之現象。在高水溫期鰻體代謝旺盛且攝餌量增加，相對排出氨量亦增加，使得養殖鰻經常處於緊迫因子之刺激下而易感染細菌性疾病。所以，欲預防 *E. tarda* 及 *A. hydrophila* 之感染症，優良之水質管理是必須的條件，道理甚明。

經口接種後菌浴處理組 (B-III)，胃腸道與鰓之混合菌濃度甚高，達 10^8 - 10^{12} CFU/g。病死鰻之主要病灶除在實質器官如：腎、脾、肝可見壞死外，亦可見卡他性腸炎之病變。簡及劉 (1986) 以同樣之方法亦證實 *E. tarda* 可引致幼鰻之感染而發生腸炎，但中鰻則否。但本試驗以兩菌經口服接種則能使中鰻發病，又證明兩菌合併感染之致病能力高於單獨之 *E. tarda* 感染。口服接種組胃腸道含菌量高出 B-I 組甚多，達 10^3 - 10^4 倍。反町等 (1971) 分析絕食鰻魚腸內之細菌消長情形，指出腸道內之細菌數因絕食而減漸。Iida 等 (1984) 亦認為鰻魚腸內細菌數之多寡與餵飼餌料量有關，餵得愈多腸道之細菌量愈高，又改變使用不同之動物性餌料或是一般完全飼料，皆會引起腸內各細菌比例之變化。至於口服組在實質器官之含菌量並不高，但已可見病變及發病死之現象，這可能是原發性感染灶，即胃腸道之病變，已足以威脅鰻魚之生命力。

摘 要

以不同途徑行人工接種試驗研討 *E. tarda* 與 *A. hydrophila* 混合感染或在水槽中添加含氮化合物 (Ammonia-N, NO_2^- -N) 次致死濃度條件下對鰻魚之致病性。

腹腔接種組於 *E. tarda* (10^6 CFU/ml) 與 *A. hydrophila* (依 10^6 10^2 CFU/ml) 菌濃度各等量混合接種，死亡率依次為 100% (25/25), 40% (24/60)。病 (死) 鰻呈現肚門紅腫、腹面體表出血斑及實質組織如腎、脾、肝之壞死灶。其病變之程度與接種菌量成正比。其次，*E. tarda* (10^6 CFU/ml) 與 *A. hydrophila* (10^2 CFU/ml) 等量混合接種之鰻魚，若置於水中含 Ammonia-N (1.5 ppm) 及 NO_2^- -N (0.2 ppm) 之條件下，其死亡率為 70% (35/50)，顯示比接種等菌量但水中不添加含氮化合物組為高。

體表割傷後菌浴組於試驗期間並不見發病。由各臟器及血液中所分離之菌濃度均未達 10^4 CFU/g (ml)。但是體表割傷後菌浴組在置於添加 Ammonia-N (1.5 ppm) 及 NO_2^- -N (0.2 ppm) 之水中則試驗期間其試驗組有 16% (4/25) 之死亡率。病(死)鰻鰓部潮紅、粘液分泌增多或顯現輕度缺損。鏡下除實質器官可見壞死灶外，在鰓可見鰓薄板上皮增生現象。

經口感染後菌浴組可達 16% (8/50) 之死亡率。其病變與腹腔接種組相似，但胃腸道呈卡他性炎病變。

謝 辭

本研究承農委會提供經費支持 (75-農建-7.1-漁-24(8))，試驗期間得林正忠先生及張淑慧小姐熱心幫忙部份試驗事宜，謹此誌謝。

參 考 文 獻

- 林敏雄、陳秀男、郭光雄 (1983)。臺灣地區魚病研究之回顧。魚病研究專集 V。p. 1-9。
- 林曜松、蕭世民 (1977)。魚池生態環境與魚病關係之研究(I)—臺灣鰻魚疾病之統計分析。魚病研究專集 I。p. 57-61。
- 郭上卿、鍾虎雲、郭光雄 (1977)。養殖鰻潰瘍病病原菌 *Edwardsiella anguillimortiferum* 之分離。魚病研究專集 I。p. 1-6。
- 陳建初編著 (1981)。水質分析。九大圖書公司。p. 85-97。
- 董明澄、劉正義、蔡信雄、何莉芳、陳靄雲 (1981)。鰻魚潰瘍病細菌性病性研究。臺灣省畜牧獸醫學會 70 年度年會及論文發表——論文摘要。
- 鍾虎雲、郭光雄 (1974)。鰻魚肌肉接種魚類病原菌 *Aeromonas hydrophila* 後血液、肝、脾及腎臟等之接種菌之消長。臺灣水產學會刊。3(2): 15-19。
- 簡茂盛、劉正義 (1986)。鰻魚愛德華氏病之人工接種試驗及致病機制之研討。魚病研究專集 7。p. 68-78。
- 反町稔、江草周三 (1971)。養殖ウナギの腸内好氣性細菌について。魚病研究。6: 1-7。
- 江草周三 (1978)。魚病の感染症。恒星社厚生閣版。東京。p. 210-215。
- 若林久嗣、江草周三 (1973)。静岡縣吉田地區に於ける養殖ウナギの細菌感染について。魚病研究。8: 91-97。
- 若林久嗣、江草周三 (1975)。再び静岡縣吉田地區に於ける養殖ウナギの細菌感染についで—とくに鰓病菌についで。魚病研究。9: 193-198。
- 保科利一 (1962)。ウナギの鰓赤病に關する研究。東京水產大學特別研究報告。6(2): 1-105。
- Ahine, W. (1983). Fish Diseases. Spring-Verlag Berlin Heidelberg, New York, 3rd, ed.
- Baumann, P., D. J. Brenner, J. J. Farmer, W. Frederiksen, and J. M. Shewan (1984). *Vibrionaceae* and Other Gram-Negative Facultatively Anaerobic Rod. in Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. N. R. Krieg editor, Volume Williams & Wilkins Co., Baltimore/London. 1st. p. 545-548.
- Flagg, R. M., and L. W. Hinck (1978). Influence of ammonia on aeromonad susceptibility in channel catfish Presented at: 32 Annual Conference Southeastern Association of Fish and Wildlife Agencies Hot Springs. VA (USA) 5. NOV. 32: 415-419.
- Gibbs, B. M., and F. A. Skinner (1969). Identification method for microbiologist part A. Academic press London and New York.

- Hanson, L. A., and J. W. Grizzle (1985). Nitrite induced predisposition of channel catfish *Ictalurus punctatus* to bacterial diseases. *Prog. Fish. Cult.* **47**(2): 98-101.
- Hoshina, T. (1962). On a new bacterium, *Paracolobacterium anguillimortiferum* new species. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.* **28**(2): 162-164.
- Iida, T. A., A. Yamamoto, and H. Wakabayashi (1984). Changes in intestinal flora of the juvenile eel (*Anguilla japonica*), after beginning to feed. *Fish. Pathol.* **19**(3): 201-204.
- Mcleay, D. J. (1973). Effects of ACTH on the pituitary-interrenal axis and abundance of white blood cell types in juvenile coho salmo, *Oncorhynchus Kisutch*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **21**: 431-440.
- Plumb, J. A., T. M. Grizzle, and J. Pefigueiredo (1976). Necrosis and bacterial infection in channel catfish *Ictalurus punctatus* following hypoxia. *J. Wild Dis.* **12**(2): 247-253.
- Roberts, R. J. (1978). *Fish Pathology*. Macmillan Pub. Co. Inc. New Yorw. p. 30-34, p. 55-58.
- Schreck, C. B., and H. W. Lorz (1978). Stress response of coho salmo (*Oncorhynchus Kisutch*) elicited by cadmium and copper and potential use of cortisol as an indicator of stress. *J. Fish Res. Bd. Can.* **35**: 1124-1129.
- Smith, L. S. (1982). *Introduction to Fish Physiology*. T. F. H. Pub, Inc., 211 West Sylvania Avenue, PO Box 427. Neptune, N. J. 07753, US. p. 281-346.
- Tomasso, J. R., K. B. Davis, and B. L. Simco (1981). Plasma corticosteroid dynamics in channel catfish (*Ictalurus punctatus*) exposed to ammonia and nitrite. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **38**: 1106-1112.
- Wakabayashi, H., and S. Egusa (1979). What is the best organ for isolation of eel pathogen. *Fish Pathol.* **13**(14): 201-202.
- Walters, G. R., and J. A. Plumb (1980). Environmental stress and bacterial infection in channel catfish *Ictalurus punctatus* Rafinesque. *J. Fish Biol.* **17**(2): 177-185.
- Yamagato, Y., and M. Niwa (1982). A cultured chronic toxicity of ammonia to eel, *Anguilla japonica*. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.* **48**(2): 171-176.