

文章编号: 1000-0615(2016)03-0308-10

DOI: 10.11964/jfc.20151110138

## 胡子鲶致病性气单胞菌的分离鉴定及其致病力与毒力基因型相关性

龙 苏<sup>1,2</sup>, 韩书煜<sup>1,3\*</sup>, 牛志伟<sup>1,2</sup>, 梁静真<sup>1,2</sup>, 胡大胜<sup>1,3</sup>,  
黄 钧<sup>1,2\*</sup>, 李鸿骥<sup>1,2</sup>, 刘 齐<sup>1,2</sup>, 苏江华<sup>1,2</sup>

(1. 广西水生动物病害诊断实验室, 广西南宁 530005;

2. 广西大学动物科学技术学院, 广西高校水生生物健康养殖与营养调控重点实验室, 广西南宁 530005;

3. 广西壮族自治区水产技术推广总站, 广西南宁 530021)

**摘要:** 为探讨广西南宁市、浦北县和玉林市暴发性死亡胡子鲶的病原菌及其所携带6种毒力基因对其致病力的影响, 用常规方法从病鱼的心脏、肝脏等部位分离细菌, 人工感染实验确定病原菌的致病性, 以API 20NE生化鉴定和16S rRNA分子鉴定相结合的方法对病原菌进行鉴定, 采用PCR扩增法检测病原菌的6种毒力基因携带情况。结果显示, 从患病鱼中共分离到5株病原菌, 其中嗜水气单胞菌3株, 温和气单胞菌2株。3株嗜水气单胞菌与标准菌株*Aeromonas hydrophila* ATCC 7966(CP000462)的亲缘关系最近, 相似性均为99.8%, 2株温和气单胞菌与标准菌株*Aeromonas sobria* NO.106(AB472903.1)的亲缘关系最近, 相似性均达99.9%。6种毒力基因在5株病原菌中的阳性检出率分别为*Act*和*Aer*基因100%, *ahal*、*hly*和*Alt*基因均为80%, *ahp*基因仅20%; 毒力基因型共3种, 在5株气单胞菌中分布情况为*Act<sup>+</sup>ahal<sup>+</sup>hly<sup>+</sup>Alt<sup>+</sup>ahp<sup>-</sup>Aer<sup>+</sup>* 3株, 占实验菌株的60%, 为主要的毒力基因, *Act<sup>+</sup>ahal<sup>+</sup>hly<sup>+</sup>Alt<sup>+</sup>ahp<sup>+</sup>Aer<sup>+</sup>*和*Act<sup>+</sup>ahal<sup>+</sup>hly<sup>-</sup>Alt<sup>+</sup>ahp<sup>-</sup>Aer<sup>+</sup>*各1株, 各占20%。携带全部所检6种毒力基因的菌株致病力最强, 只携带*Act*和*Aer* 2种毒力基因的菌株致病力最弱。*ahp*基因在菌株的致病力中起重要作用, 病原菌的致病力是多种毒力基因协同作用的结果。

**关键词:** 胡子鲶; 暴发性死亡症; 嗜水气单胞菌; 温和气单胞菌; 毒力基因

**中图分类号:** Q 933; S 917

**文献标志码:** A

胡子鲶(*Clarias fuscus*)是一种广泛分布在两广地区的底栖杂食性小型鱼类, 受到两广地区广大消费者的喜爱。近年来, 作为名特优水产品种之一, 胡子鲶在广西得到普遍推广养殖。但在胡子鲶的养殖中各种疾病时有发生, 一旦发病常给养殖者带来严重的经济损失。国内已报道的胡子鲶疾病主要有腹水病<sup>[1]</sup>、败血症病<sup>[2]</sup>、腐皮病<sup>[3]</sup>、烂身病<sup>[4]</sup>、头甲溃烂症<sup>[5]</sup>、出血性水肿病<sup>[6]</sup>等, 其中, 腹水病、败血症病、腐皮病和头甲溃烂症是由细菌感染引起, 病原菌均已确定。另外, 王玉娟等<sup>[7]</sup>和黄钧等<sup>[8]</sup>分别报道了

革胡子鲶(*Clarias gariepinus*)出血性败血症和暴发性流行病原菌的分离鉴定结果。有关水生动物源气单胞菌的毒力基因, 国内外学者已获得了大量的研究成果<sup>[9-24]</sup>, 朱大玲等<sup>[14]</sup>和刘杰等<sup>[23]</sup>也分别对鱼源和黄沙鳖(*Trionyx sinensis*)源嗜水气单胞菌的致病力与毒力基因型相关性进行了研究。但未见有关胡子鲶暴发性死亡症病原菌及其致病力与毒力基因型相关性的研究报道。本研究对广西南宁市、浦北县和玉林市共5个胡子鲶养殖场患暴发性死亡症胡子鲶进行病原菌的分离鉴定、致病力测定及所携带*hly*、*Aer*、*Alt*、

收稿日期: 2015-11-02 修回日期: 2016-01-21

资助项目: 广西水产畜牧兽医局专项(桂渔牧财[2012]30号, 桂渔牧财[2013]35号, 桂渔牧财[2014]52号)

通信作者: 韩书煜, E-mail: henry0779@163.com; 黄钧, E-mail: hj1351@163.com

*Act*、*ahal*和*ahp* 6种毒力基因情况进行检测, 旨在查明广西南宁市、浦北县和玉林市3地胡子鲶暴发性死亡的病原菌及其6种毒力基因的携带情况, 了解病原菌的致病力与其所携带毒力基因型的相关性, 为有效防控胡子鲶暴发性死亡症及相关基因疫苗的研发、气单胞菌病的快速诊断等领域的深入研究提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

患病胡子鲶采自广西南宁市、浦北县和玉林市共5个胡子鲶养殖场, 病鱼体长16~20 cm。健康胡子鲶从南宁市某养殖场购得, 个体质量约25 g, 体长12 cm左右, 购回后先进行15 d的检疫暂养, 实验前随机抽样剖检并进行细菌分离, 确认健康且无病原菌感染后供人工感染实验用。

普通营养琼脂培养基和兔血琼脂培养基购自北京陆桥有限公司, 氧化酶试剂、API细菌鉴定试剂条及相关配套试剂均购自法国梅里埃公司。

PCR扩增引物由生工生物工程技术服务(上海)有限公司合成。10×PCR Buffer、10mmol/L dNTPs、Taq DNA酶、25 mmol/L的MgCl<sub>2</sub>、ddH<sub>2</sub>O均购于宝生物工程(大连)有限公司。琼脂糖购于美国Invitrogen公司。细菌基因组DNA提取试剂盒购自北京天根生化科技有限公司。

### 1.2 实验方法

**病鱼症状观察及细菌分离** 病鱼带回实验室后, 按常规方法剖检, 肉眼观察病鱼的主要症状。无菌条件下从病鱼的心脏、肝脏、脾脏、肾脏等组织取样, 分别在普通营养琼脂培养基和兔血琼脂培养基上划线接种, 36.8 °C培养24 h, 挑选形态一致的优势菌落, 经纯化后转接至斜面中4 °C保存备用。

**无菌滤液的人工感染** 参照黄钧等<sup>[19]</sup>和黄艳华等<sup>[20]</sup>的方法, 在分离细菌的同时, 取病鱼的内脏器官匀浆, 10 °C条件下10 000 r/min离心30 min后取上清液, 经0.22 μm微孔滤器(Millipore, 美国)过滤获得无菌滤液。将无菌滤液涂布于普通营养琼脂培养基上36.8 °C培养24 h; 健康胡子鲶分为实验组和对照组(30尾/组), 采用胸鳍基部腹腔注射法向实验组注射无菌滤液, 每尾注射

0.2 mL, 对照组注射等量的无菌生理盐水, 注射后分养于不同水族箱内连续进行15 d的饲养观察。

**分离菌株的人工感染** 人工感染实验分2次进行, 第1次在无菌条件下以无菌生理盐水洗下经纯化的分离菌株新鲜培养物并配成菌悬液, 以细菌浊度仪将菌悬液的细菌浓度调至10<sup>8</sup>~10<sup>9</sup> cfu/mL。挑取大小规格基本一致的胡子鲶, 随机分成实验组和对照组, 每组30尾, 实验组注射菌悬液, 对照组注射无菌生理盐水, 每尾注射0.2 mL, 胸鳍基部腹腔注射。注射后, 在相同环境下按组分别饲养管理, 连续观察15 d, 每天记录受试鱼的发病和死亡等情况。从第1次人工感染实验中发病濒死个体的心脏、肝脏、脾脏、肾脏等部位取样, 进行常规的细菌分离和纯化, 得到与原人工感染实验菌落、菌体形态特征一致的菌株, 再按第1次人工感染实验的方法进行第2次人工感染实验。

2次实验期间的水温均在25~29 °C之间。

**分离菌株的生化鉴定** 按常规方法对分离菌株的菌落大小、形状特征、溶血性和菌体的染色特性等进行观察, 并进行氧化酶实验。本实验中分离菌株均为革兰氏阴性, 氧化酶实验阳性, 选用API 20NE细菌鉴定系统对分离菌株进行生化鉴定。

**分离菌株的16S rRNA分子鉴定** 将各分离菌株在普通营养培养基上36.8 °C培养24 h后, 无菌条件下用移液枪收集到无菌离心管中配制成细菌悬浊液。按黄钧等<sup>[19]</sup>方法收集菌体并提取细菌基因组DNA, -20 °C保存备用; 菌株的16S rRNA基因以细菌通用引物进行PCR扩增, 正向引物fD1: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3', 反向引物rp2: 5'-ACGGCTACCTTGTTACGACTT-3'; 反应体系(25 μL): 10×PCR Buffer 2.5 μL, 10 mmol/L dNTPs 0.5 μL, 25 mmol/L MgCl<sub>2</sub> 2.5 μL, 10 μmol/L上下游引物各1 μL, Taq DNA聚合酶(5U)0.3 μL, DNA模板2 μL, 用ddH<sub>2</sub>O补足至25 μL; 94 °C预变性5 min; 94 °C变性30 s, 58 °C退火45 s, 72 °C延伸2 min, 29个循环; 最后72 °C延伸10 min。PCR反应结束后以1.0%琼脂糖凝胶电泳方法(100 V电压下电泳30 min)进行鉴定, 用北京六一凝胶成像分析系统(WD-9413B)观察, 根据出现的电泳条带确定并记录结果; PCR产物送华大生物技术有限公司测序。

以BLAST(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)、ClustalX及DNASTAR中的MegAlign软件进行核苷酸序列的验证和相似性分析,用MEGA 5.0软件的邻接法(Neighbor-Joining, NJ)构建系统发育树。

**病原菌6种毒力基因的检测** 根据已有研究结果,6种毒力基因*hly*<sup>[11]</sup>、*Aer*<sup>[15]</sup>、*Alt*<sup>[9]</sup>、*Act*<sup>[10]</sup>、*ahal*<sup>[13]</sup>、*ahp*<sup>[12]</sup>各选择相应的特异性引物进行PCR扩增,实验中所用的各个毒力基因的正向、反向引物和PCR的退火温度及目的片段大小(表1)和反应体系均参照黄钧等<sup>[19]</sup>的方法,其中反应体系(25  $\mu$ L)为10 $\times$ PCR Buffer 2.5  $\mu$ L, 10 mmol/L dNTPs 0.5  $\mu$ L, 25 mmol/L MgCl<sub>2</sub> 2.5  $\mu$ L, 10  $\mu$ mol/L上下游引物各1  $\mu$ L, Taq DNA聚合酶(5U)0.3  $\mu$ L, DNA模板2  $\mu$ L,用ddH<sub>2</sub>O补足至25  $\mu$ L,PCR反应程序为94  $^{\circ}$ C预变性5 min; 94  $^{\circ}$ C变性30 s,退火45 s, 72  $^{\circ}$ C延伸2 min, 30个循环;最后72  $^{\circ}$ C延伸10 min。PCR结束后以1.5%琼脂糖凝胶电泳方法(100 V电压下电泳35 min)进行鉴定,凝胶成像系统进行观察,根据凝胶成像显示的电泳条带确定并记录结果。

## 2 结果

### 2.1 病鱼症状观察及细菌分离

自然发病鱼的主要症状:体表局部溃烂,下颌至腹部皮肤出现红点或弥散性发红,腹部肿胀,肛门红肿;解剖发现病鱼体腔中有大量腹水,肠胃充气,肠道发炎,有部分病鱼肝脏坏死糜烂;镜检可见鳃丝末端有部分溶解。

从患病胡子鲶的心脏和肝脏等组织中共分离到5株优势菌株,分别编号为HZN-98、HZN-500、HZN-198、HZN-241和HZN-378,其中HZN-

98来自南宁市,HZN-500来自浦北县,HZN-198、HZN-241和HZN-378来自玉林市。5株菌株的菌落形态很相似,菌落均为圆形、表面光滑、中央微凸、半透明、白色或乳白色,菌落直径在1.0~2.3 mm不等。除HZN-378菌株不溶血外,其余的4株菌株均为 $\beta$ 溶血。革兰氏染色结果,5株菌株均为革兰氏染色阴性短杆菌。

### 2.2 人工感染

**无菌滤液的人工感染** 将无菌滤液涂布于普通营养琼脂培养基上36.8  $^{\circ}$ C培养24 h无肉眼可见菌落,注射无菌滤液和无菌生理盐水的实验胡子鲶经15 d的连续观察均未出现病症或死亡现象,初步判定广西南宁市、浦北县和玉林市发病死亡的胡子鲶由病毒感染引起的可能性不大。

**分离菌株的人工感染** 经15 d的实验观察,注射菌悬液的实验结果表明,分离菌株对实验鱼均有致病力,人工感染后分别出现与自然发病鱼相似的症状。菌株HZN-500的致病力最强,在2次感染实验中对受试鱼的致死率均为100%,HZN-378的致病力最弱,2次人工感染实验受试鱼的致死率为6.67%~20.00%,其余3株菌株对受试鱼的致死率66.67%~86.67%(表2)。

### 2.3 细菌鉴定结果

**API生化鉴定** 对5株病原菌的API 20NE生化鉴定结果显示,3株分别来源于南宁市、玉林市和浦北县的菌株HZN-98、HZN-198和HZN-500均为嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*),2株来源于玉林市的HZN-241和HZN-378菌株为温和气单胞菌(*A. sobria*)(表3)。

**16S rRNA基因序列鉴定** 5株菌株均可扩增到大小约1.5 kb的16S rRNA基因片段(图1)。基

表1 六种毒力基因的PCR引物、退火温度及目标片段大小

Tab. 1 Primer sequences, annealing temperatures and fragment sizes of six virulence genes in PCR assay

毒力基因 virulence genes	引物序列(5'-3') primer sequences(5'-3')	退火温度/ $^{\circ}$ C annealing temperatures	片段大小/bp fragment sizes
<i>hly</i>	F: ggc cgg tgg ccc gaa gat acg gg R: ggc ggc gcc gga cga gac ggg	62	597
<i>Aer</i>	F: atg acc cag tcc tgg cac gg R: gtc acc ttc tgc ctc cag gc	52	326
<i>Alt</i>	F: atg acc cag tcc tgg cac gg R: gcc gct cag gcc gga gcc gc	59	482
<i>Act</i>	F: aga agg tga cca aga aca R: aac tga cat cgg cct tga act c	55	232
<i>ahal</i>	F: cta tga aaa aga caa ttc tgg ct R: agg cta gat tag aag ttg tat tg	55	1132
<i>ahp</i>	F: att gga tcc ctg cct atc gct tca ggt ca R: gct aag ctt gca gtg ccg tat tcc	50	898

表 2 五株菌株的人工感染实验结果

Tab. 2 Artificial infection results of the five strains

实验次数 test times	实验菌株 test strains	实验鱼数/尾 test fish numbers	菌悬液浓度/ (cfu/mL) suspension concentration	注射量/ (mL/尾) injection quantity	死亡数量/尾 death numbers										死亡率/% mortality
					8 h	1 d	2 d	3 d	4 d	5 d	6 d	7 d	8 d	9~15 d	
第一次 the first time	HZN-98	30	1.86×10 <sup>8</sup>	0.2	0	0	2	13	5	3	1	0	0	0	80.00
	HZN-198	30	2.41×10 <sup>8</sup>	0.2	1	3	3	6	6	3	1	0	0	0	76.67
	HZN-500	30	2.21×10 <sup>8</sup>	0.2	0	3	7	16	4	0	0	0	0	0	100
	HZN-241	30	1.90×10 <sup>8</sup>	0.2	0	0	0	8	8	5	1	1	0	0	76.67
	HZN-378	30	2.11×10 <sup>8</sup>	0.2	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	6.67
	各对照组 control	30	0		0.2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
第二次 the second time	HZN-98	30	7.53×10 <sup>8</sup>	0.2	0	0	10	14	1	1	0	0	0	0	86.67
	HZN-198	30	8.59×10 <sup>8</sup>	0.2	0	0	10	12	3	0	0	0	0	0	83.33
	HZN-500	30	7.89×10 <sup>8</sup>	0.2	0	10	15	5	0	0	0	0	0	0	100
	HZN-241	30	8.12×10 <sup>8</sup>	0.2	0	2	8	5	4	1	0	0	0	0	66.67
	HZN-378	30	7.88×10 <sup>8</sup>	0.2	0	2	3	1	0	0	0	0	0	0	20.00
	各对照组 control	30	0		0.2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

因测序分析结果, HZN-98、HZN-198、HZN-241、HZN-378、HZN-500的16S rRNA基因片段大小分别为1444、1444、1409、1345和1405 bp(登录号: KT364219~KT364223)。对HZN-98、HZN-198、HZN-500、HZN-241、HZN-378的基因序列进行BLAST, 并与GenBank中报道的16S rRNA基因序列进行同源性比较以及系统发育树的构建结果显示, 5株病原菌中, HZN-98、HZN-198、HZN-500与嗜水气单胞菌标准株ATCC 7966的亲缘关系最近, 同源相似性99.8%(图2); HZN-241、HZN-378与温和气单胞菌No.106的亲缘关系最近, 同源相似性99.9%(图3)。

#### 2.4 病原菌毒力基因携带情况及其与致病力的相关性

对6种毒力基因的PCR扩增结果, 5株病原菌株均携带*Act*和*Aer* 2种毒力基因, HZN-378菌株缺失*ahal*、*hly*、*Alt*和*ahp* 4种毒力基因, 除HZN-500菌株外, 其余4株菌株均缺失*ahp*毒力基因(图4)。

在5株病原菌中, *Act*和*Aer*的阳性率为100%, *ahal*、*hly*和*Alt*的阳性率均为80%, *ahp*的阳性率仅为20%。毒力基因型共3种, 在5株气单胞菌中分布为*Act*<sup>+</sup>*ahal*<sup>+</sup>*hly*<sup>+</sup>*Alt*<sup>+</sup>*ahp*<sup>-</sup>*Aer*<sup>+</sup> 3株, 占实验菌株的60%, 是主要的毒力基因型; *Act*<sup>+</sup>*ahal*<sup>+</sup>*hly*<sup>+</sup>*Alt*<sup>+</sup>

*ahp*<sup>+</sup>*Aer*<sup>+</sup>和*Act*<sup>+</sup>*ahal*<sup>+</sup>*hly*<sup>-</sup>*Alt*<sup>-</sup>*ahp*<sup>-</sup>*Aer*<sup>+</sup>各1株, 各占实验菌株的20%。其中3株嗜水气单胞菌HZN-98、HZN-198、HZN-500中包含*Act*<sup>+</sup>*ahal*<sup>+</sup>*hly*<sup>+</sup>*Alt*<sup>+</sup>*Aer*<sup>+</sup>*ahp*<sup>+</sup>和*Act*<sup>+</sup>*ahal*<sup>+</sup>*hly*<sup>+</sup>*Alt*<sup>+</sup>*ahp*<sup>-</sup>*Aer*<sup>+</sup> 2种毒力基因型, 2株温和气单胞菌中包含*Act*<sup>+</sup>*ahal*<sup>+</sup>*hly*<sup>+</sup>*Alt*<sup>+</sup>*ahp*<sup>-</sup>*Aer*<sup>+</sup>和*Act*<sup>+</sup>*ahal*<sup>+</sup>*hly*<sup>-</sup>*Alt*<sup>-</sup>*ahp*<sup>-</sup>*Aer*<sup>+</sup> 2种毒力基因型。同时携带所检6种毒力基因的HZN-500菌株致病力最强, 平均致死率100%; 缺失*ahp*的3株菌株HZN-98、HZN-198和HZN-241对实验鱼的平均致死率为71.67%~83.33%; 只携带*Act*和*Aer* 2种毒力基因的HZN-378菌株致病力最低, 对实验鱼的平均致死率为13.33%(表4)。

### 3 讨论

#### 3.1 胡子鲶的细菌性疾病及病原菌

有关胡子鲶细菌性疾病及其病原菌已有不少研究报道。如由嗜水气单胞菌感染引起的胡子鲶败血症病<sup>[2]</sup>、腐皮病<sup>[3]</sup>、头甲溃烂症<sup>[5]</sup>和革胡子鲶的出血性水肿病<sup>[7]</sup>, 豚鼠气单胞菌(*Aeromonas caviae*)感染引起的野生胡子鲶腹水病<sup>[1]</sup>, 细菌引起的胡子鲶烂身病<sup>[4]</sup>和出血性水肿病<sup>[6]</sup>, 温和气单胞菌引起的革胡子鲶暴发性流行病<sup>[8]</sup>。本研究从南宁市、浦北县和玉林市患病胡子鲶的心

表3 五株菌株的生化鉴定结果

Tab. 3 Biochemical identification results of the five strains

测定项目 detected items	实验菌株及生化谱 tested bacteria and biochemical spectra				
	HZN-98	HZN-198	HZN-500	HZN-241	HZN-378
硝酸钾 KNO <sub>3</sub>	+	+	+	+	+
色氨酸 TRP	+	+	+	+	+
葡萄糖 GLU	+	+	+	+	+
精氨酸 ADH	+	+	+	+	+
脲素 URE	-	-	-	-	-
七叶灵 ESC	+	+	+	-	-
明胶 GEL	+	+	+	+	+
对硝基-β-D甲基半乳糖 PNG	+	+	+	+	+
葡萄糖 GLU	+	+	+	+	+
阿拉伯糖 ARA	+	+	+	-	-
甘露糖 MNE	+	+	+	+	+
甘露醇 MAN	+	+	+	+	+
N-乙酰-葡萄糖胺园 NAG	+	+	+	+	+
麦芽糖 MAL	+	-	+	+	+
葡萄糖酸盐 GNT	+	+	+	+	+
癸酸 CAP	+	+	+	+	+
己二酸 ADI	-	-	-	-	-
苹果酸 MLT	+	+	+	+	+
柠檬酸 CIT	-	+	+	+	+
苯乙酸 PAC	-	-	-	-	-
四甲基-对一苯二胺 OX	+	+	+	+	+
API阳性代码值API positive code value	7577754	7577555	7577755	7176755	7176755
菌株来源地 strain source	南宁市 Nanning City	玉林市 Yulin City	浦北县 Pubei County	玉林市 Yulin City	玉林市 Yulin City
鉴定结果 identification results	嗜水气单胞菌 <i>Aeromonas hydrophila</i>	嗜水气单胞菌 <i>A. hydrophila</i>	嗜水气单胞菌 <i>A. hydrophila</i>	嗜水气单胞菌 <i>A. sobria</i>	嗜水气单胞菌 <i>A. sobria</i>

注：“+”表示阳性，表示产酸或生长；“-”表示阴性，表示不发酵或不生长

Notes: “+” denotes positive, which indicates acid production or growth; “-” denotes negative, which indicates no acid production or no growth

脏、肝脏等部位共分离到3株嗜水气单胞菌，所分离到的病原菌与韦友传等<sup>[2]</sup>、黄艳华等<sup>[3]</sup>、丁燊等<sup>[5]</sup>的结果一致，但与黄伟坚等<sup>[1]</sup>的结果不同。本研究5株病原菌的来源地分别为玉林市3株，南宁市和浦北县各1株，首次从患病胡子鲶中分离到2株温和气单胞菌；由5株病原菌感染引起的病鱼主要症状十分相似，但病原菌却有嗜水气单胞菌和温和气单胞菌2种。综合前人和本研究结果，在胡子鲶细菌性疾病中，由同一种病原菌引发多种症状的“一病多症”和由不同病原菌引发类似病症的“一症多病”现象广泛存在，这种现象在中华鳖(*Trionyx sinensis*)<sup>[25]</sup>和黄沙鳖<sup>[19]</sup>中

也有出现。因此，在生产一线中仅凭经验进行疾病的现场诊治效果往往存在很大偏差，必须通过实验室确诊后方可有针对性地制定相应措施对疾病进行防治。

### 3.2 胡子鲶源气单胞菌的毒力基因型及对致病力的影响

研究已证实，菌株所携带的毒力基因对嗜水气单胞菌和温和气单胞菌的致病力有直接影响。带毒型嗜水气单胞菌的毒力基因型为hlyA<sup>+</sup>aerA<sup>+</sup>，这种基因型在嗜水气单胞菌中最普遍<sup>[11]</sup>；不携带Aer基因的嗜水气单胞菌菌株对鲫(*Carassius*

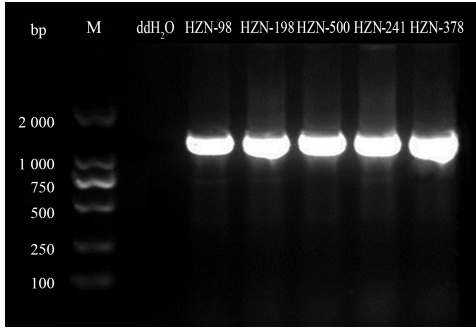


图 1 五株菌株的16S rRNA基因PCR扩增结果

Fig. 1 PCR amplification results of 16S rRNA genes of the five strains

*aurantus*)为无毒株, 毒力基因型为 $hly^+$ 、 $ahp^+$ 、 $Aer^+$ 的菌株为强毒株<sup>[14]</sup>; 黄沙鳖红底板病病原嗜水气单胞菌的毒力基因型有 $Act^+ ahal^+ hly^+ Alt^+ ahp^+ Aer^+$ 、 $Act^+ ahal^+ hly^+ Alt^+ ahp^- Aer^+$ 和 $Act^+ ahal^+ hly^+ Alt^+ ahp^+ Aer^+$  3种<sup>[20]</sup>, 分离自黄沙鳖白底板病的嗜水气单胞菌毒力基因型为 $Act^+ ahal^+ hly^+ Alt^+ ahp^+ Aer^+$ 和 $Act^+ ahal^+ hly^+ Alt^+ ahp^+ Aer^+$  2种, 对黄沙鳖的致死率均为100%<sup>[19]</sup>,  $Act^+ ahal^+ hly^+ Alt^+ ahp^+ Aer^+$ 是主要的毒力基因型,  $Alt$ 、 $ahp$ 和 $ahal$ 基因缺失对菌株的致病力无影响; 刘杰等<sup>[23]</sup>研究发现, 黄沙鳖源嗜水气单胞菌共包含9种毒力基因型, 主要为 $Act^+ ahal^+ hly^+ Alt^+ ahp^+ Aer^+$ ,  $hly$ 和

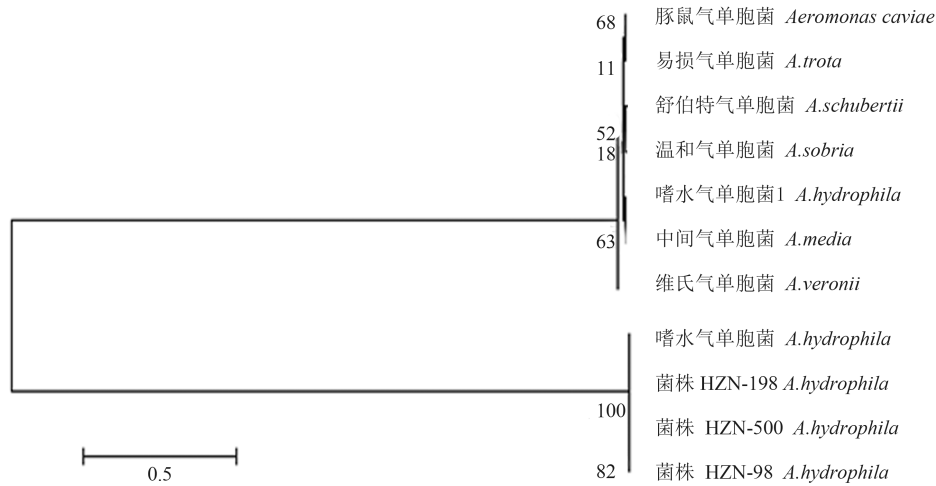


图 2 三株嗜水气单胞菌的16S rRNA基因序列系统发育树

基因登录号: X60409.1(豚鼠气单胞菌)、X60415.2(易损气单胞菌)、NR 119043.1(舒伯特气单胞菌)、NR 119044.1(温和气单胞菌)、X74677.1(嗜水气单胞菌1)、NR 119041.1(中间气单胞菌)、NR 119045.1(维氏气单胞菌)、CP000462.1(嗜水气单胞菌)

Fig. 2 Phylogenetic tree based on the 16S rRNA sequences of the three *Aeromonas hydrophila* strains

GenBank accession number: X60409.1 (*A. caviae*), X60415.2 (*A. trota*), NR\_119043.1 (*A. schubertii*), NR\_119044.1 (*A. sobria*), X74677.1 (*A. hydrophila*), NR\_119041.1 (*A. media*), NR\_119045.1 (*A. veronii*), CP000462.1 (*A. hydrophila*)

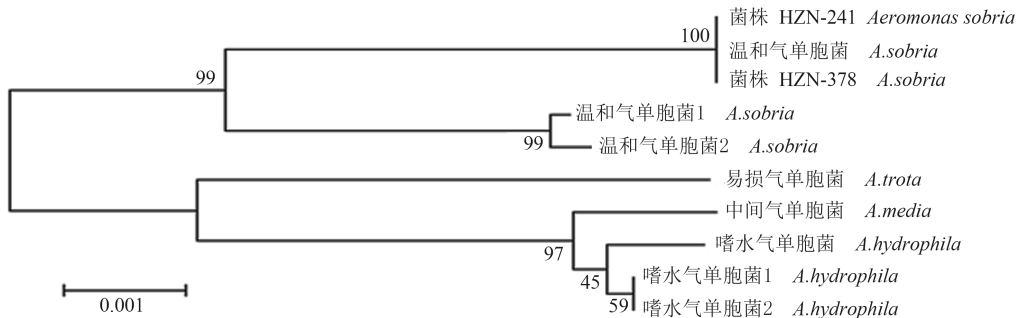


图 3 二株温和气单胞菌的16S rRNA基因序列系统发育树

基因登录号: AB472903.1(温和气单胞菌)、X60412.2(温和气单胞菌1)、NR 119044.1(温和气单胞菌2)、X60415.2(易损气单胞菌)、NR 119041.1(中间气单胞菌)、X74676.1(嗜水气单胞菌)、NR 118944.1(嗜水气单胞菌1)、X74677.1(嗜水气单胞菌2)

Fig. 3 Phylogenetic tree based on the 16S rRNA sequences of the two *Aeromonas sobria* strains

GenBank accession number: AB472903.1 (*A. sobria*), X60412.2 (*A. sobria*1), NR 119044.1 (*A. sobria*2), X60415.2 (*A. trota*), NR 119041.1 (*A. media*), X74676.1 (*A. hydrophila*), NR 118944.1 (*A. hydrophila*1), X74677.1 (*A. hydrophila*2)

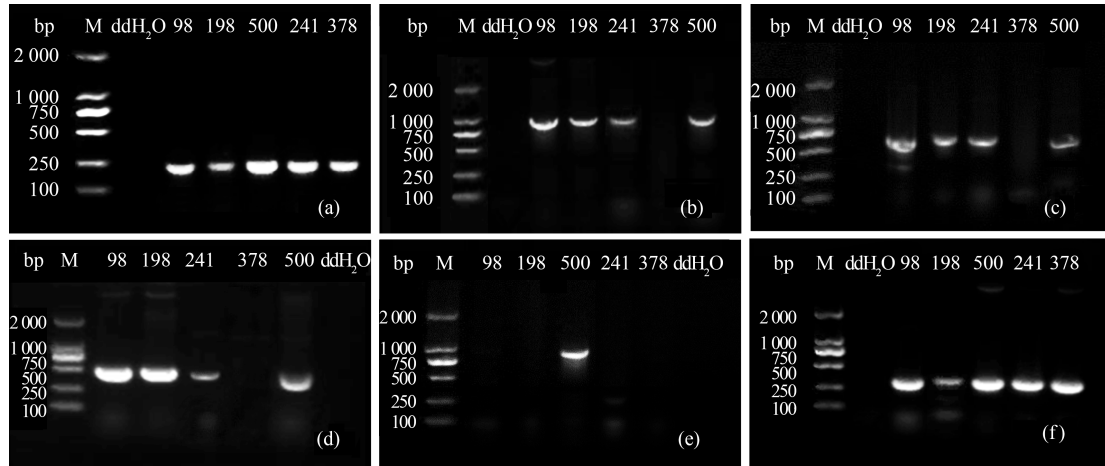


图4 6种毒力基因在5株病原菌株中的扩增结果

(a) *Act*基因在5株病原菌株中的扩增结果；(b) *ahal*基因在5株病原菌株中的扩增结果；(c) *hly*基因在5株病原菌株中的扩增结果；(d) *Alt*基因在5株病原菌株中的扩增结果；(e) *ahp*基因在5株病原菌株中的扩增结果；(f) *Aer*基因在5株病原菌株中的扩增结果；在(a)~(f)的各图中，98为HZN-98菌株，198为HZN-198菌株，241为HZN-241菌株，378为HZN-378菌株，500为HZN-500菌株

Fig. 4 Amplification results of the six virulence genes of the five pathogenic strains

(a) amplification results of gene *Act* in the five pathogenic strains; (b) amplification results of gene *ahal* in the five pathogenic strains; (c) amplification results of gene *hly* in the five pathogenic strains; (d) amplification results of gene *Alt* in the five pathogenic strains; (e) amplification results of gene *ahp* in the five pathogenic strains; (f) amplification results of gene *Aer* in the five pathogenic strains. In the figures a~f, "98" denotes strain HZN-98, "198" denotes strain HZN-198, "241" denotes strain HZN-241, "378" denotes strain HZN-378, "500" denotes strain HZN-500

表4 5株病原菌的6种毒力基因检测结果及其与致病力的相关性

Tab. 4 Detection results of six virulence genes of the five pathogenic strains and their correlation with pathogenicity

菌株号 bacterial strain	细菌种类 bacterial species	毒力基因的携带情况 carrying case of virulence genes						致死率范围/% lethal rate range	平均致死率/% average death rate
		<i>Act</i>	<i>ahal</i>	<i>hly</i>	<i>Alt</i>	<i>ahp</i>	<i>Aer</i>		
HZN-98	嗜水气单胞菌 <i>A. hydrophila</i>	+	+	+	+	-	+	80.00~86.67	83.33
HZN-198	嗜水气单胞菌 <i>A. hydrophila</i>	+	+	+	+	-	+	76.67~83.33	80.00
HZN-500	嗜水气单胞菌 <i>A. hydrophila</i>	+	+	+	+	+	+	100~100	100
HZN-241	温和气单胞菌 <i>A. sobria</i>	+	+	+	+	-	+	66.67~76.67	71.67
HZN-378	温和气单胞菌 <i>A. sobria</i>	+	-	-	-	-	+	6.67~20.00	13.33

注：“+”为基因检测阳性，“-”为基因检测阴性

Notes: "+" denotes positive gene detection, "-" denotes negative gene detection in the table

*Act*是重要的毒力基因，所有携带*hly*基因的菌株均为有毒株，*ahp*基因缺失对菌株的致病力无影响，强毒株至少携带包含*hly*和*Act*基因在内的4种毒力基因，弱毒株只携带包括*hly*在内的2或3种毒力基因，只携带*Alt*和*ahal* 2种毒力基因的菌株无致病力。毒力基因型*hly*<sup>+</sup>*Alt*<sup>+</sup>*ahal*<sup>-</sup>*aerA*的温和气单胞菌为高毒力菌株<sup>[21]</sup>；黄钧等<sup>[19]</sup>对4株黄沙鳖源温和气单胞菌的研究结果表明，温和气单胞菌的毒力基因型包含*Act*<sup>+</sup>*ahal*<sup>+</sup>*hly*<sup>+</sup>*Alt*<sup>-</sup>*ahp*<sup>+</sup>*Aer*<sup>+</sup>和*hly*<sup>-</sup>*Aer*<sup>+</sup>*Alt*<sup>+</sup>*Act*<sup>+</sup>*ahal*<sup>+</sup>*ahp*<sup>+</sup> 2种，主要是*Act*<sup>+</sup>*ahal*<sup>+</sup>*hly*<sup>+</sup>*Alt*<sup>-</sup>*ahp*<sup>+</sup>*Aer*<sup>+</sup>，2种毒力基因型的菌株对

黄沙鳖的致死率均为100%，携带*hly*基因的菌株致病力更强；农新闻等<sup>[24]</sup>的研究发现，10株黄沙鳖源温和气单胞菌的毒力基因型共包含*hly*<sup>+</sup>*Aer*<sup>+</sup>*Alt*<sup>+</sup>*Act*<sup>+</sup>*ahal*<sup>+</sup>*ahp*<sup>+</sup>、*hly*<sup>+</sup>*Aer*<sup>+</sup>*Alt*<sup>+</sup>*Act*<sup>+</sup>*ahal*<sup>-</sup>*ahp*<sup>-</sup>、*hly*<sup>+</sup>*Aer*<sup>+</sup>*Alt*<sup>+</sup>*Act*<sup>+</sup>*ahal*<sup>+</sup>*ahp*<sup>+</sup>和*hly*<sup>+</sup>*Aer*<sup>+</sup>*Alt*<sup>+</sup>*Act*<sup>+</sup>*ahal*<sup>-</sup>*ahp*<sup>-</sup> 4种，主要为*hly*<sup>+</sup>*Aer*<sup>+</sup>*Alt*<sup>+</sup>*Act*<sup>+</sup>*ahal*<sup>+</sup>*ahp*<sup>+</sup>，占70%，其余3种各占10%，4种毒力基因型菌株对黄沙鳖的致死率为95.0%~100.0%，对小鼠的致死率为87.5%~100%，同时缺失*ahal*和*ahp*或者*Act*和*ahp* 2种毒力基因的菌株对黄沙鳖的致死率下降至95.0%，对小鼠的致死率下降至87.5%，只缺失

*ahal*基因的菌株对黄沙鳖和小鼠的致病力均无影响。

本研究的5株气单胞菌共包含3种毒力基因型, 主要为 $Act^+ahal^+hly^+Alt^+ahp^+Aer^+$ , 同时携带6种所检毒力基因的菌株致病力最强, 对胡子鲶的致死率为100%, 只携带 $Act$ 和 $Aer$  2种毒力基因的温和气单胞菌致病力最低, 对实验鱼的平均致死率仅13.33%, 当 $ahp$ 基因缺失时, 嗜水气单胞菌和温和气单胞菌的致病力均有较大幅度下降, 表明 $ahp$ 基因在菌株的致病力中起重要作用。本研究中胡子鲶源气单胞菌的主要毒力基因型与黄沙鳖源嗜水气单胞菌和温和气单胞菌<sup>[19-20, 23-24]</sup>均不相同,  $ahp$ 基因缺失对菌株致病力的影响与黄艳华等<sup>[20]</sup>和刘杰等<sup>[23]</sup>的研究结果也不同, 这种差异是否与菌株生物源性有关尚需更多研究数据证实, 但毒力基因型为 $Act^+ahal^+hly^+Alt^+ahp^+Aer^+$ 的菌株致病力与黄沙鳖源气单胞菌的研究结果一致<sup>[19-20, 23]</sup>。根据本研究结果,  $ahp$ 基因缺失时嗜水气单胞菌对实验鱼的致死率高于温和气单胞菌, 但仅凭本实验的数据量尚无法对同一毒力基因型的嗜水气单胞菌与温和气单胞菌致病力有较大差距的现象进行合理解释。在2株温和气单胞菌中, 只缺失 $ahp$ 毒力基因的菌株对胡子鲶的平均致死率比缺失 $ahal$ 、 $hly$ 、 $Alt$ 、 $ahp$  4种毒力基因的菌株高437.66%, 进一步证明病原菌的致病力是多种毒力基因协同作用的结果。根据本研究结果, 携带有 $ahp$ 的胡子鲶源嗜水气单胞菌的致病力更强。

#### 参考文献:

- [1] 黄伟坚, 黄均, 秦爱珍, 等. 野生胡子鲶“腹水病”病原分离和鉴定[J]. 中国兽医科技, 2000, 30(4): 30-33.  
Huang W J, Huang J, Qin A Z, *et al.* Isolation and identification of pathogen of wild *Clarias fuscus* with ascites [J]. Chinese Journal of Veterinary Science and Technology, 2000, 30(4): 30-33 (in Chinese).
- [2] 韦友传, 覃志彪, 韦祖炜. 胡子鲶败血症病原菌的研究[J]. 广西农业生物科学, 2002, 21(2): 111-112.  
Wei Y C, Qin Z B, Wei Z W. Studies on the pathogen of bacterial septicemia in *Clarias fuscus* [J]. Journal of Guangxi Agriculture and Biology Science, 2002, 21(2): 111-112 (in Chinese).
- [3] 黄艳华, 施金谷, 黄钧, 等. 胡子鲶腐皮病病原菌的分离鉴定和药敏试验[J]. 广西畜牧兽医, 2013, 29(1): 8-11.  
Huang Y H, Shi J G, Huang J, *et al.* Isolation, identification and drug sensitivity test of *Clarias fuscus* with rotten skin disease [J]. Guangxi Journal of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, 2013, 29(1): 8-11 (in Chinese).
- [4] 吕佩珊. 胡子鲶烂身病防治技术[J]. 现代农业科技, 2012(13): 293-294.  
Lu P S. Prevention and curing techniques of *Clarias fuscus* with rotten disease [J]. Modern Agricultural Science and Technology, 2012(13): 293-294 (in Chinese).
- [5] 丁燊, 唐啸尘, 吴应根. 本地胡子鲶头甲溃烂症病原菌的分离与特性[J]. 河北渔业, 2009(12): 30-33.  
Ding Y, Tang X C, Wu Y G. Isolation and character of pathogenic bacteria from *Clarias fuscus* with cantering head disease [J]. Hebei Fisheries, 2009(12): 30-33 (in Chinese).
- [6] 任海. 胡子鲶出血性水肿病的防治[J]. 中国水产, 1996(10): 24.  
Ren H. Prevention and curing of *Clarias fuscus* with hemorrhagic edema disease [J]. China Fisheries, 1996(10): 24 (in Chinese).
- [7] 王玉娟, 王秀华, 曲宪成, 等. 革胡子鲶出血性败血症病原菌的分离鉴定[J]. 淡水渔业, 2012, 42(3): 32-37.  
Wang Y J, Wang X H, Qu X C, *et al.* Isolation and identification of a bacterium associated with haemorrhagic septicemia in walking catfish (*Clarias gariepinus*) [J]. Freshwater Fisheries, 2012, 42(3): 32-37 (in Chinese).
- [8] 黄钧, 施金谷, 黄艳华, 等. 革胡子鲶暴发性流行病病原菌的分离鉴定及药敏试验[J]. 广西畜牧兽医, 2012, 28(6): 323-326.  
Huang J, Shi J G, Huang Y H, *et al.* Isolation, identification and drug sensitivity test of pathogen in the epidemic disease of *Clarias gariepinus* [J]. Guangxi Journal of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, 2012, 28(6): 323-326 (in Chinese).
- [9] Granum P E, O'Sullivan K, Tomás J M, *et al.* Possible virulence factors of *Aeromonas* spp. from food and water [J]. FEMS Immunology and Medical Microbiology, 1998, 21(2): 131-137.
- [10] Kingombe C I, Huys G, Tonolla M, *et al.* PCR detection, characterization, and distribution of virulence genes in *Aeromonas* spp. [J]. Applied and Environmental



- Microbiology, 1999, 65(12): 5293–5302.
- [11] Heuzenroeder M W, Wong C Y, Flower R L. Distribution of two hemolytic toxin genes in clinical and environmental isolates of *Aeromonas* spp.: correlation with virulence in a suckling mouse model [J]. FEMS Microbiology Letters, 1999, 174(1): 131–136.
- [12] 储卫华, 陆承平. 嗜水气单胞菌J-1株丝氨酸蛋白酶基因克隆与序列分析[J]. 水产学报, 2004, 28(1): 84–88.
- Chu W H, Lu C P. Cloning and sequence analysis of an extracellular serine-protease gene of *Aeromonas hydrophila* J-1 [J]. Journal of Fisheries of China, 2004, 28(1): 84–88 (in Chinese).
- [13] 方兵, 李槿年, 汪天杰, 等. 6株水产动物源气单胞菌安徽分离株的毒力基因的克隆与序列分析[J]. 中国水产科学, 2006, 13(6): 966–972.
- Fang B, Li J N, Wang T J, *et al.* Cloning and sequence analysis of virulence genes of six *Aeromonas* strains isolated from aquatic animals in Anhui [J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2006, 13(6): 966–972 (in Chinese).
- [14] 朱大玲, 李爱华, 汪建国, 等. 嗜水气单胞菌毒力与毒力基因分布的相关性[J]. 中山大学学报(自然科学版), 2006, 45(1): 82–85.
- Zhu D L, Li A H, Wang J G, *et al.* The correlation between the distribution pattern of virulence genes and the virulence of *Aeromonas hydrophila* strains [J]. Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni, 2006, 45(1): 82–85 (in Chinese).
- [15] Singh V, Rathore G, Kapoor D, *et al.* Detection of aerolysin gene in *Aeromonas hydrophila* isolated from fish and pond water [J]. Indian Journal of Microbiology, 2008, 48(4): 453–458.
- [16] 王志铮, 赵蓓蓓, 王忠发, 等. 四株鳖源致病性嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)的表型、分子鉴定及其毒力基因检测[J]. 海洋与湖沼, 2010, 41(5): 776–783.
- Wang Z Z, Zhao P P, Wang Z F, *et al.* Phenotype and molecular identification of virulence genes for four pathogenic *Aeromonas hydrophila* isolated from a dying *Trionyx sinensis* [J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2010, 41(5): 776–783 (in Chinese).
- [17] 蒋春阳, 黄金虎, 陈默, 等. 南京地区池塘水中嗜水气单胞菌的分离鉴定与相关毒力基因检测[J]. 畜牧与兽医, 2010, 42(16): 4–7.
- Jiang C Y, Huang J H, Chen M, *et al.* Isolation of *Aeromonas hydrophila* in some pools of Nanjing and detection of the virulence-associated genes [J]. Animal Husbandry and Veterinary Medicine, 2010, 42(16): 4–7 (in Chinese).
- [18] 张晓君, 阎斌伦, 邴旭文, 等. 异育银鲫病原温和气单胞菌表型及分子鉴定与溶血素基因检测[J]. 水生生态学杂志, 2010, 3(4): 102–107.
- Zhang X J, Yan B L, Bing X W, *et al.* Detection of hemolysin gene and phenotypic and molecular identification of pathogenic *Aeromonas sobria* from gibel carp (*Carassius auratus gibelio*) [J]. Journal of Hydroecology, 2010, 3(4): 102–107 (in Chinese).
- [19] 黄钧, 黄艳华, 胡大胜, 等. 黄沙鳖白底板病原菌的分离鉴定及6种毒力基因检测[J]. 水生生物学报, 2013, 37(5): 844–854.
- Huang J, Huang Y H, Hu D S, *et al.* Characterization of white plastron disease pathogens and detection of six known virulence genes in *Trionyx sinensis* [J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2013, 37(5): 844–854 (in Chinese).
- [20] 黄艳华, 黄钧, 胡大胜, 等. 黄沙鳖红底板病原菌的分离鉴定及其毒力基因检测[J]. 西南农业学报, 2013, 26(5): 2116–2121.
- Huang Y H, Huang J, Hu D S, *et al.* Isolation, identification and virulence genes detection of pathogenic bacteria from *Trionyx sinensis* with red abdominal shell disease [J]. Journal of Southwest Agricultural University, 2013, 26(5): 2116–2121 (in Chinese).
- [21] 王海娟, 王利. 温和气单胞菌毒力基因的检测及其对鲫鱼致病性试验[J]. 动物医学进展, 2015, 36(3): 17–20.
- Wang H J, Wang L. Detection of virulence genes and pathogenicity test of *Aeromonas sobria* to crucian carp [J]. Progress in Veterinary Medicine, 2015, 36(3): 17–20 (in Chinese).
- [22] 刘杰, 龙宜楠, 黄钧, 等. 黄颡鱼暴发性流行病原的分离鉴定及其3种毒力基因检测[J]. 淡水渔业, 2015, 45(2): 56–61.
- Liu J, Long Y N, Huang J, *et al.* Isolation, identification and virulence genes detection of bacterial pathogen from *Pelteobagrus fulvidraco* Richardson with fulminant epidemic [J]. Freshwater Fisheries, 2015, 45(2): 56–61 (in Chinese).
- [23] 刘杰, 黄艳华, 黄钧, 等. 黄沙鳖源嗜水气单胞菌的致病力与毒力基因型相关性[J]. 中国水产科学, 2015,

- 22(4): 698–706.
- Liu J, Huang Y H, Huang J, *et al.* Studies on the correlation with pathogenicity and virulence genes of *Aeromonas hydrophila* by *Truogx sinensis* [J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2015, 22(4): 698–706 (in Chinese).
- [24] 农新闻, 黄艳华, 龙苏, 等. 黄沙鳖致病性温和气单胞菌的分离鉴定及其毒力基因检测[J]. 南方农业学报, 2015, 46(7): 1322–1328.
- Nong X W, Huang Y H, Long S, *et al.* Isolation, identification and virulence genes detection of pathogenic *Aeromonas sobria* in *Truogx sinensis* [J]. Journal of Southern Agriculture, 2015, 46(7): 1322–1328 (in Chinese).
- [25] 沈锦玉, 潘晓艺, 余旭平, 等. 中华鳖白底板病原的分析[J]. 中国水产科学, 2007, (5): 815–822.
- Shen J Y, Pan X Y, Yu X P, *et al.* Pathogen in white abdominal shell disease of soft-shelled turtle (*Trionyx sinensis*) [J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2007, (5): 815–822 (in Chinese).

## Isolation and identification of pathogenic *Aeromonas* in *Clarias fuscus* and analysis of the correlation between its pathogenicity and virulence genotypes

LONG Su<sup>1,2</sup>, HAN Shuyu<sup>1,3\*</sup>, NIU Zhiwei<sup>1,2</sup>, LIANG Jingzhen<sup>1,2</sup>, HU Dasheng<sup>1,3</sup>,  
HUANG Jun<sup>1,2\*</sup>, LI Hongji<sup>1,2</sup>, LIU Qi<sup>1,2</sup>, SU Jianghua<sup>1,2</sup>

(1. Guangxi Aquatic Animal Disease Diagnostic Laboratory, Nanning 530005, China;

2. Guangxi Colleges and Universities Key Laboratory of Aquatic Healthy Breeding and Nutrition Regulation, College of Animal Science and Technology, Guangxi University, Nanning 530005, China;

3. Guangxi Zhuang Autonomous Region Aquaculture Technology Extension Station, Nanning 530021, China)

**Abstract:** This study investigated the pathogenic bacteria of *Clarias fuscus* with fulminant death in Nanning City, Pubei County and Yulin City of Guangxi, and analysed the effect of the six virulence genes on its pathogenicity. Pathogen was isolated from the heart, liver and some other parts of the diseased fish by using conventional method, then an artificial infection test was measured on the pathogenicity of the isolated strains. Identification of the isolates was confirmed by API 20NE analysis and 16S rRNA gene sequencing, including a PCR assay of detecting six kinds of virulence genes of the isolates. Results showed that five pathogenic strains were isolated from the diseased fish, including three strains of *Aeromonas hydrophila* and two strains of *Aeromonas sobria*. The three strains of *Aeromonas hydrophila* shared the highest similarity (99.8%) with *Aeromonas hydrophila* standard strain ATCC 7966 (CP000462). Meanwhile the two strains of *Aeromonas sobria* shared the highest similarity (99.9%) with *Aeromonas sobria* standard strain NO.106 (AB472903.1). Among the five strains, detection rates of six virulence genes were as follows. Hundred percent of the strains carried gene *Act* and *Aer*. Eighty percent carried gene *ahal*, *hly* and *Alt*. Only twenty percent of the strains carried gene *ahp*. The five *Aeromonas* strains contained three virulence genotypes in all, including the main genotype *Act<sup>+</sup>ahal<sup>+</sup>hly<sup>+</sup>Alt<sup>+</sup>ahp<sup>-</sup>Aer<sup>+</sup>* of three strains (accounting for 60% of all the strains), as well as the genotype *Act<sup>+</sup>ahal<sup>+</sup>hly<sup>+</sup>Alt<sup>+</sup>ahp<sup>+</sup>Aer<sup>+</sup>* and *Act<sup>+</sup>ahal<sup>-</sup>hly<sup>-</sup>Alt<sup>-</sup>ahp<sup>-</sup>Aer<sup>+</sup>* of one strain (each accounting for 20% of all the strains). Strain which carried all the six detected virulence genes had the highest pathogenicity, whereas the one carrying only *Act* and *Aer* had the minimal pathogenicity. Gene *ahp* played an important role in pathogenicity of strains, and the pathogenicity of pathogenic bacteria resulted from the synergistic reaction of multiple virulence genes.

**Key words:** *Clarias fuscus*; fulminating epidemic disease; *Aeromonas hydrophila*; *Aeromonas sobria*; virulence gene

**Corresponding author:** HAN Shuyu. E-mail: henry0779@163.com; HUANG Jun. E-mail: hj1351@163.com

**Funding projects:** Project of Bureau of Fishery Animal Husbandry and Veterinary, Guangxi Province(Gui-yu-mu-cai [2012] No. 30, Gui-yu-mu-cai [2013] No. 35, Gui-yu-mu-cai [2014] No. 52)