

NGHIÊN CỨU ẢNH HƯỞNG CỦA PROBIOTIC ĐẾN HỆ VI SINH VẬT ĐƯỜNG RUỘT, CÁC CON ĐƯỜNG BIẾN DƯỠNG VÀ GEN KHÁNG KHÁNG SINH TRÊN TÔM THẺ CHÂN TRẮNG (*Litopenaeus vannamei*) BẰNG KỸ THUẬT SHOTGUN METAGENOMICS

IMPACT OF PROBIOTIC SUPPLEMENTATION ON GUT MICROBIOTA, METABOLIC PATHWAYS, AND ANTIBIOTIC RESISTANCE GENES IN WHITELEG SHRIMP (*Litopenaeus vannamei*) USING SHOTGUN METAGENOMICS

Vũ Đặng Hạ Quyền*, Võ Đức Trung, Trương Thị Oanh

Viện Công nghệ Sinh học và Môi trường, Trường Đại học Nha Trang

*Tác giả liên hệ: Vũ Đặng Hạ Quyền, Email: quyenvdh@ntu.edu.vn

Ngày nhận bài: 4/6/2025; Ngày phản biện thông qua: 13/6/2025; Ngày duyệt đăng: 13/6/2025

TÓM TẮT

Nghiên cứu ứng dụng kỹ thuật shotgun metagenomics để đánh giá tác động của việc bổ sung hỗn hợp probiotics (*Lactobacillus acidophilus* và *Bacillus subtilis*) lên hệ vi sinh vật đường ruột của tôm thẻ chân trắng (*Litopenaeus vannamei*). Hai nghiệm thức, đối chứng và bổ sung probiotic, thực hiện trong 84 ngày. Kết quả cho thấy probiotic tạo ra những thay đổi tích cực đáng kể, đặc biệt là giảm sự hiện diện của giống *Vibrio* - một mầm bệnh quan trọng. Phân tích chức năng hệ gen cho thấy probiotic thúc đẩy nhiều con đường biến dưỡng có lợi, như sinh tổng hợp acid béo, lipid, amino acid và cải thiện khả năng phân hủy các hợp chất thơm, từ đó tăng cường hiệu quả trao đổi chất và sức khỏe tổng thể của tôm. Nghiên cứu phát hiện một phổ gen kháng kháng sinh (ARGs) đa dạng, với các gen kháng đa kháng sinh, tetracycline và aminoglycoside chiếm ưu thế. Tuy nhiên, không có sự khác biệt về thành phần ARGs tổng thể giữa hai nhóm. Điều này có thể do liều lượng hoặc thời gian sử dụng probiotic chưa đủ, hoặc do tính ổn định và khả năng lây truyền ngang mạnh mẽ của các gen này trong môi trường nuôi tôm. Những phát hiện này củng cố vai trò của probiotic trong việc cải thiện sức khỏe tôm và cung cấp thông tin quý giá về tập hợp ARGs trong nuôi trồng thủy sản.

Từ khóa: con đường biến dưỡng, hệ vi sinh vật đường ruột, gen kháng kháng sinh, shotgun metagenomics, tôm thẻ chân trắng,

ABSTRACT

This study utilized shotgun metagenomics to evaluate the impact of supplementing a probiotic mixture (*Lactobacillus acidophilus* and *Bacillus subtilis*) on the gut microbiota of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). The 84-day experiment involved two treatments, a control group and a probiotic-supplemented group. Results revealed significant changes in the shrimp gut microbiota. Regarding species composition, probiotic supplementation notably reduced the abundance of *Vibrio* – a key pathogen in shrimp aquaculture. Functional metagenomic analysis indicated that probiotics promoted the activity of various beneficial metabolic pathways, including the biosynthesis of fatty acids, lipids, and amino acids, while also enhancing the degradation of aromatic compounds, thereby suggesting improved nutrient utilization and detoxification. Concerning antibiotic resistance genes (ARGs), a diverse array was found, with multidrug, tetracycline, and aminoglycoside resistance genes being predominant. However, statistical analysis showed no significant difference in the overall ARG composition between the two treatments, which could be attributed to insufficient dosage or duration, or the inherent stability and strong horizontal gene transfer potential of these genes in the aquaculture environment. These findings reinforce the role of probiotics in improving shrimp health and provide valuable insights into the ARG reservoir in aquaculture.

Keywords: metabolic pathway, gut microbiota, antibiotic resistance genes, shotgun metagenomics, Pacific whiteleg shrimp

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Ngành nuôi trồng thủy sản toàn cầu, đặc biệt là nuôi tôm thẻ chân trắng (*Litopenaeus vannamei*), đã và đang đóng góp vai trò thiết yếu vào an ninh lương thực và nền kinh tế của nhiều quốc gia. Tại Việt Nam, tôm thẻ chân trắng là đối tượng nuôi chủ lực, mang lại giá trị kinh tế cao và tạo việc làm cho hàng triệu người dân [1]. Tuy nhiên, hoạt động nuôi tôm thâm canh và siêu thâm canh thường xuyên phải đối mặt với những thách thức nghiêm trọng từ dịch bệnh, gây thiệt hại kinh tế đáng kể cho người nuôi [2].

Việc sử dụng kháng sinh tràn lan và không đúng cách để kiểm soát dịch bệnh đã dẫn đến sự gia tăng đáng báo động của các gen kháng kháng sinh (ARGs). Những gen này đang tích tụ ngày càng nhiều trong môi trường nước và hệ vi sinh vật đường ruột của các loài thủy sản nuôi [3, 4]. Điều này không chỉ ảnh hưởng đến hiệu quả điều trị khi tôm nhiễm bệnh mà còn tiềm ẩn nguy cơ lây truyền các gen kháng kháng sinh sang vi khuẩn gây bệnh trên người và động vật thông qua chuỗi thức ăn, gây ra các thách thức lớn về sức khỏe cộng đồng [5].

Trước thực trạng kháng kháng sinh ngày càng gia tăng và phức tạp, việc tìm kiếm các giải pháp thay thế hoặc bổ sung để nâng cao sức khỏe tôm, đồng thời giảm sự phụ thuộc vào kháng sinh trở nên cấp thiết hơn bao giờ hết. Trong số các chiến lược đó, bổ sung chế phẩm sinh học (probiotics) là một trong những giải pháp hiệu quả và bền vững, được áp dụng rộng rãi trong ngành nuôi trồng thủy sản [6]. Các chủng Probiotics, điển hình như *Lactobacillus acidophilus* và *Bacillus subtilis*, được chứng minh có khả năng cải thiện cân bằng hệ vi sinh vật đường ruột, cạnh tranh với vi khuẩn gây bệnh, tăng cường khả năng miễn dịch bẩm sinh và cải thiện hiệu quả sử dụng thức ăn ở vật nuôi [6, 7].

Mặc dù những lợi ích tích cực của việc sử dụng probiotics trong nuôi tôm đã được ghi nhận rộng rãi, nhưng tác động cụ thể của chúng đến cấu trúc và thành phần của hệ gen kháng kháng sinh (resistome) trong hệ vi sinh vật đường ruột tôm vẫn chưa được làm rõ một cách toàn

diện. Việc hiểu rõ mối liên hệ phức tạp này là rất quan trọng để đánh giá một cách khoa học các rủi ro liên quan đến kháng kháng sinh khi áp dụng probiotics, cũng như khai thác tối đa tiềm năng của chúng trong việc kiểm soát quần thể vi khuẩn mang ARGs trong các hệ thống nuôi trồng thủy sản [8].

Với sự phát triển vượt bậc của công nghệ sinh học, kỹ thuật giải trình tự hệ gen môi trường toàn bộ (shotgun metagenomics) đã nổi lên như một công cụ hiện đại và mạnh mẽ [9]. Kỹ thuật này cho phép phân tích đồng thời thành phần cộng đồng vi sinh vật và toàn bộ tiềm năng chức năng di truyền của chúng, bao gồm cả sự hiện diện và phân bố của các gen kháng kháng sinh một cách chi tiết mà không cần nuôi cấy. Việc ứng dụng kỹ thuật shotgun metagenomics nhằm cung cấp cái nhìn sâu sắc và toàn diện hơn về sự tương tác giữa vật chủ, probiotics và các ARGs trong hệ vi sinh vật đường ruột tôm.

Xuất phát từ những vấn đề thực tế trên, nghiên cứu này được thực hiện nhằm mục tiêu khảo sát thành phần gen kháng kháng sinh của hệ vi sinh vật đường ruột tôm thẻ chân trắng được nuôi trong điều kiện có bổ sung hỗn hợp probiotics bằng kỹ thuật shotgun metagenomics. Cụ thể, nghiên cứu tập trung vào việc đánh giá sự khác biệt về phổ và cấu trúc gen kháng kháng sinh giữa nhóm tôm được bổ sung probiotics (sử dụng hỗn hợp *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 và *Bacillus subtilis* ATCC 6633) và nhóm đối chứng (không bổ sung probiotics). Đồng thời, nghiên cứu cũng xác định các loài vi sinh vật mang gen kháng kháng sinh có tần suất cao trong từng nhóm thí nghiệm. Kết quả từ nghiên cứu này góp phần làm sáng tỏ tác động của việc bổ sung probiotics đến vấn đề kháng kháng sinh trong hệ thống nuôi tôm, từ đó cung cấp cơ sở khoa học cho các chiến lược quản lý hiệu quả và bền vững.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Vật liệu nghiên cứu

Nguồn vi khuẩn: Chủng chuẩn *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 và *Bacillus subtilis* ATCC 6633

Tôm thẻ chân trắng: Tôm giống giai đoạn Post 10 từ công ty Việt Úc (Ninh Thuận) được nuôi thuần 7 ngày trong bể composite 1m³ sử dụng thức ăn công nghiệp và không bổ sung chế phẩm sinh học. Sau thời gian nuôi thuần, tôm đạt kích cỡ 13-15 mm được đưa vào các bể thí nghiệm với mật độ là 500 cá thể/bể.

Chăm sóc và quản lý: Tôm được cho ăn bằng thức ăn công nghiệp Growbest, với hàm lượng protein chiếm 40%. Chế độ cho ăn: 4 lần/ngày vào lúc 7, 11, 17 và 21 giờ. Giai đoạn đầu cho tôm ăn 15% khối lượng thân, sau đó mỗi ngày tăng lên 5% khối lượng thức ăn so với ngày trước và điều chỉnh theo nhu cầu sử dụng thức ăn của tôm. Trong quá trình nuôi, nước được siphon 2 lần/ngày vào lúc 9 và 20 giờ. Tùy vào giai đoạn nuôi, nước được thay từ 10-30%/ ngày. Các thông số môi trường nuôi được xác định 1-2 lần/ngày bằng các bộ kit chuyên dụng của Sera (Đức) và duy trì theo nghiên cứu của Nguyễn Đình Huy và cộng sự (2023) [10].

2. Phương pháp nghiên cứu

2.1. Bố trí thí nghiệm

Thí nghiệm được bố trí gồm 2 nghiệm thức, mỗi nghiệm thức được lặp lại 5 lần, với tổng thời gian thí nghiệm là 84 ngày. **Nghiệm thức đối chứng (DC):** tôm thẻ chân trắng được nuôi trong các điều kiện chuẩn mà không bổ sung bất kỳ chế phẩm sinh học nào. **Nghiệm thức bổ sung probiotics (P):** tôm thẻ chân trắng được nuôi với chế độ bổ sung hỗn hợp hai chủng probiotic: *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 và *Bacillus subtilis* ATCC 6633, với nồng độ $0,5 \times 10^7$ CFU/gam thức ăn cho mỗi chủng.

2.2. Thu mẫu đường ruột tôm thẻ chân trắng

Trong suốt thời gian thí nghiệm 84 ngày, các mẫu tôm được thu thập tại ba thời điểm quan trọng để đánh giá tác động của chế phẩm sinh học:

- **Ngày thứ 63:** Khi tôm đạt kích thước thương phẩm (khoảng 80 cá thể/kg), 50 cá thể tôm khỏe mạnh (10 cá thể từ mỗi bể lặp lại) đã được thu thập từ mỗi nghiệm thức. Các mẫu này được ký hiệu là **DC63** cho nghiệm thức đối chứng và **P63** cho nghiệm thức bổ sung probiotic.

- **Ngày thứ 74:** Tại thời điểm này, tôm ở cả hai nghiệm thức bắt đầu xuất hiện các triệu chứng bất thường như lơ dờ, uể oải và bỏ ăn. Để đánh giá tình trạng sức khỏe, 50 mẫu tôm từ mỗi nghiệm thức đã được thu thập, ký hiệu là **DC74** và **P74** tương ứng.
- **Ngày thứ 84:** Vào ngày cuối cùng của thí nghiệm, tôm ở các bể thuộc nghiệm thức đối chứng cho thấy hiện tượng yếu và chết hàng loạt, kèm theo triệu chứng phân trắng. Toàn bộ số tôm còn lại trong nghiệm thức này được thu thập, và từ đó 50 cá thể đã được chọn ngẫu nhiên để phân tích (ký hiệu **DC84**). Đồng thời, 50 cá thể tôm khỏe mạnh từ nghiệm thức bổ sung probiotic cũng được thu thập để so sánh (ký hiệu **P84**).

Tất cả các mẫu tôm thu thập được đóng gói vào túi khí, vận chuyển trong điều kiện lạnh về Phòng Thí nghiệm Sinh học phân tử thuộc Trường Đại học Nha Trang trong vòng 2 giờ để đảm bảo chất lượng mẫu cho các phân tích tiếp theo.

Trước khi tiến hành giải phẫu, các dụng cụ (dao, kéo, panh), bề mặt bàn làm việc và găng tay đều được khử trùng bằng bleach 10% và cồn 70%. Phần ruột của mỗi cá thể tôm được thu lấy cẩn thận, sau đó được đặt vào ống eppendorf tube 1,5 mL có chứa sẵn 1 mL đệm phosphate-buffered saline (PBS) và được bảo quản trong đá lạnh suốt quá trình giải phẫu. Các mẫu ruột tôm từ cùng một nghiệm thức tại cùng thời điểm thu mẫu được gộp lại thành một mẫu đại diện để phân tích.

2.3. Tách chiết DNA, chuẩn bị thư viện và giải trình tự shotgun metagenomics

Mẫu ruột tôm được đồng hóa trong đệm PBS bằng chày nghiền mẫu, sau đó tiến hành ly tâm ở 13000g trong 2 phút để thu dịch nổi bằng máy ly tâm (Hettich® MIKRO 200/200R). DNA tổng số được tách chiết từ các mẫu dịch nổi bằng cách sử dụng bộ kit DNeasy PowerSoil Pro (Qiagen, Đức) theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Các mẫu sau khi tách chiết được tiến hành kiểm tra bằng phương pháp điện di trên gel agarose 1% ở điều kiện 90 Volt trong 25 phút. Sau đó, bản gel được đặt lên bàn UV để ghi

nhận kết quả. Nồng độ DNA được xác định sử dụng máy đo huỳnh quang Qubit 2.0 (Thermo Scientific, Mỹ). Độ tinh sạch được đánh giá thông qua tỉ lệ A260/280 trên máy đo Nano Drop C1000 (Thermo Scientific, Mỹ). Mẫu DNA có nồng độ tối thiểu là 10 ng/μL và độ tinh sạch (A260/280) nằm trong khoảng từ 1,7 đến 2,0 được lựa chọn để tiếp tục phân tích.

Thư viện shotgun metagenomic được xây dựng bằng cách sử dụng NEBNext dsDNA Fragmentase và bộ kit NEBNext Ultra II DNA Library Prep Kit (NEB, Mỹ) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Sau đó, các thư viện được giải trình tự trên hệ thống Illumina MiSeq với cấu hình 2 x 150bp.

2.4. Phân tích và xử lý số liệu

Phân tích dữ liệu shotgun metagenomic

Các trình tự metagenomic thô được xử lý ban đầu để loại bỏ adapter và các đoạn đọc có chất lượng thấp theo quy trình của công cụ Kneaddata (<https://huttenhower.sph.harvard.edu/kneaddata/>). Sau đó, các đoạn đọc còn lại được kiểm tra và loại bỏ các trình tự nghi ngờ nhiễm DNA vật chủ (tôm) hoặc DNA người bằng công cụ Bowtie v2.5.4 [11]. Sau đó, các đoạn đọc chất lượng cao được ghép nối (pair-end merging) bằng công cụ PEAR v0.9.6 [12] để tạo thành các đoạn đọc dài hơn. Tiếp theo, các đoạn đọc này được phân cụm (clustering) với độ tương đồng trình tự lớn hơn 97% sử dụng Vsearch v2.29.1 [13] để xác định các Đơn vị phân loài (Operational Taxonomic Units - OTUs). Để trực quan hóa thành phần cộng đồng vi sinh vật giữa các mẫu của hai nghiệm thức, chúng tôi đã áp dụng biểu đồ phân loại Qiime v2 (<http://qiime.org/>) ở ba cấp độ (Ngành, Giống và Loài), tập trung vào 30 OTUs có độ phong phú cao nhất.

Dự đoán chức năng hệ gen và Gen kháng kháng sinh (ARGs)

Chức năng hệ gen của cộng đồng vi sinh vật được dự đoán bằng công cụ PICRUSt2 v2.5 [14] và đối chiếu với các cơ sở dữ liệu chức năng như MetaCyc và KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes). Quá trình này bao gồm bốn bước chính: định vị trình tự (phylogenetic

placement), dự đoán bộ gen (genome prediction), dự đoán metagenome (metagenome prediction) và dự đoán các con đường chức năng (pathway prediction). Sau đó, kết quả về các con đường biến dưỡng ở cấp độ 2 và 3 được hiển thị bằng công cụ online IPATH3 (<https://pathways.embl.de/>).

Các gen kháng kháng sinh (ARGs) được xác định bằng công cụ DeepARG [15], sử dụng đối chiếu với các cơ sở dữ liệu chuyên biệt về kháng kháng sinh như CARD (Comprehensive Antibiotic Resistance Database), ARDB (Antibiotic Resistance Gene Database) và UniProt. Ngưỡng tiêu chí để xác định ARGs bao gồm: giá trị E (e-value) $\leq 1e-20$ (ngưỡng chấp nhận sự tương đồng ngẫu nhiên, càng nhỏ càng cho thấy sự tương đồng có ý nghĩa thống kê cao) và độ tương đồng trình tự (sequence identity) $\geq 80\%$. Cuối cùng, kết quả về ARGs được trực quan hóa bằng công cụ ggplot2 [16] trên R và được kiểm định thống kê bằng PERMANOVA (Permutational Multivariate Analysis of Variance) để đánh giá sự khác biệt đáng kể giữa các nghiệm thức theo thời gian.

III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

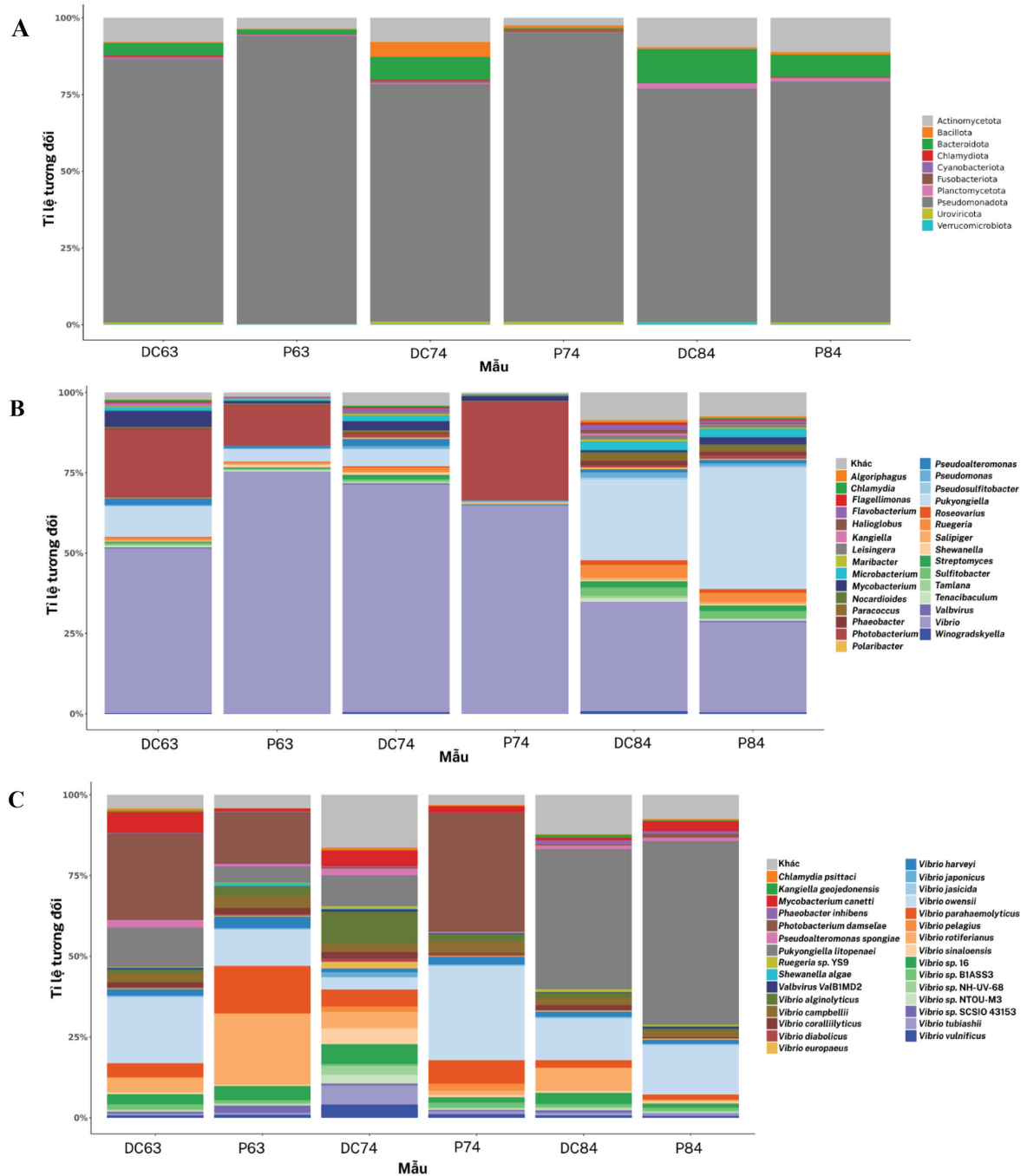
1. Thành phần và cấu trúc hệ vi sinh vật đường ruột tôm thẻ chân trắng

Tổng cộng 6 thư viện shotgun metagenomics được giải trình tự. Sau khi đánh giá và sàng lọc chất lượng, số lượng đoạn đọc dao động từ 1.283.273 (mẫu P63) đến 4.312.963 (mẫu DC74).

Thành phần hệ vi sinh vật đường ruột tôm thể hiện sự khác biệt giữa hai nghiệm thức (đối chứng và bổ sung probiotic), đồng thời thể hiện sự thay đổi theo thời gian nuôi (Hình 1). Ở cấp độ ngành (Hình 1A), ngành Pseudomonadota (trước đây là Proteobacteria) chiếm ưu thế ở tất cả các mẫu, đặc biệt trong nghiệm thức bổ sung probiotic ở ngày 63 và 74 (P63 và P74), với tỉ lệ lớn hơn 94%. Đây là nhóm vi khuẩn phổ biến thường được ghi nhận trong hệ vi sinh vật đường ruột của các loài thủy sản bởi vai trò quan trọng của chúng trong chu trình nitơ và phân hủy chất hữu cơ [17, 18]. Khi so

sánh giữa hai nghiệm thức, sự đa dạng về ngành được thể hiện rõ hơn ở nghiệm thức đối chứng, với sự hiện diện đồng thời của các ngành như Actinomycetota, Bacteroidota, Planctomycetota và Verrucomicrobiota. Điều này có thể cho thấy

việc bổ sung các chủng *L. acidophilus* và *B. subtilis* đã tạo ra một môi trường chọn lọc, thúc đẩy sự phát triển của một số nhóm vi khuẩn nhất định, làm thay đổi cấu trúc cộng đồng so với nghiệm thức không được bổ sung.



Hình 1. Thành phần hệ vi sinh vật đường ruột theo cấp độ Ngành (A), Giống (B) và Loài (C) ở các nghiệm thức (Đối chứng-DC và Probiotic-P) và các thời điểm thu mẫu (63, 74 và 84)

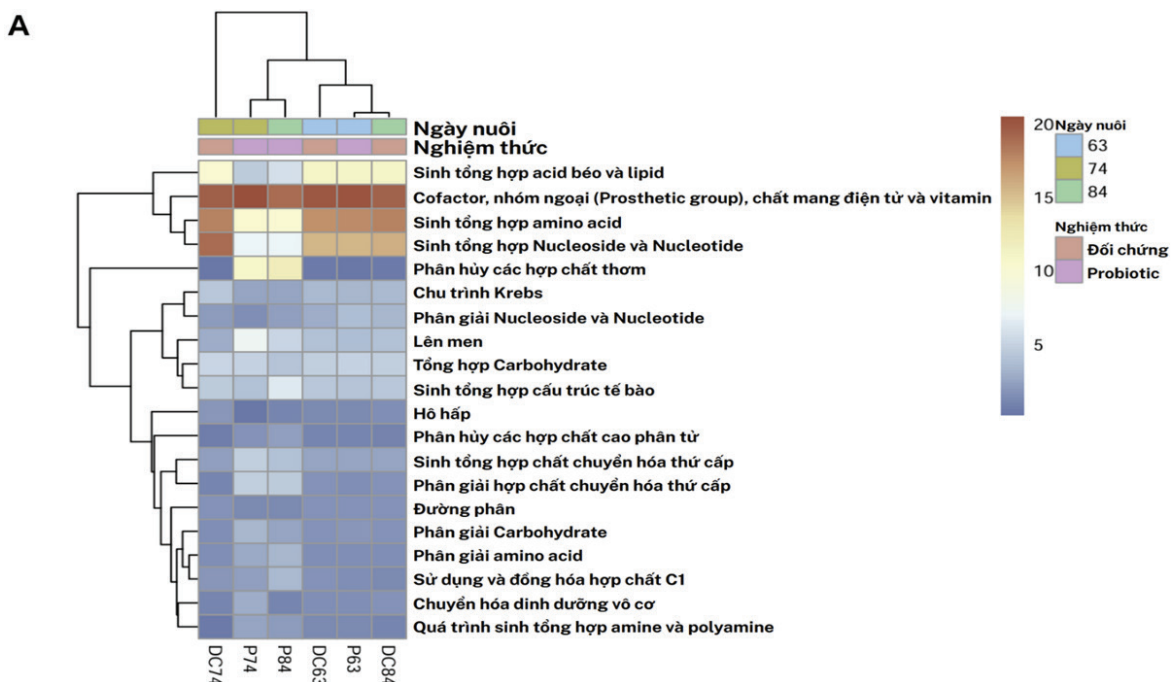
Ở cấp độ giống (Hình 1B), *Vibrio* chiếm ưu thế trong tất cả các mẫu. Cụ thể, tỷ lệ của *Vibrio* cao ở các mẫu thuộc nghiệm thức đối chứng, với 52,23% ở mẫu DC63 và 73,92% ở mẫu DC74. Trong khi đó, ở nghiệm thức bổ sung probiotic, *Vibrio* cũng chiếm tỷ lệ cao ở P63 (76,23%), nhưng có xu hướng giảm rõ rệt theo thời gian nuôi, xuống còn 30,37% ở mẫu P84. Phát hiện này củng cố vai trò của probiotic trong việc cạnh tranh và ức chế vi khuẩn gây bệnh, phù hợp với các nghiên cứu trước đây [7,18]. Sự cạnh tranh này có thể diễn ra thông qua việc cạnh tranh trong không gian sống, nguồn dinh dưỡng, hoặc sản xuất các chất kháng khuẩn như bacteriocin và axit hữu cơ, tạo môi trường không thuận lợi cho sự phát triển của *Vibrio* spp.. Một điểm đáng chú ý là sự xuất hiện của giống *Pukyongiella* vào ngày nuôi thứ 84 ở nghiệm thức probiotic, chiếm 40,81%. Ngoài ra, các giống vi khuẩn có lợi như *Ruegeria*, *Shewanella*, *Sulfitobacter* và *Phaeobacter* – cũng được phát hiện chủ yếu ở nghiệm thức bổ sung probiotics.

Ở cấp độ loài (Hình 1C), các loài vi khuẩn gây bệnh thuộc giống *Vibrio* như *V. owensii*, *V. parahaemolyticus*, *V. rotiferianus* và *V. alginolyticus* (được biết là tác nhân gây các bệnh như hoại tử gan tụy AHPND, bệnh phân trắng), đều chiếm ưu thế ở tất cả các mẫu. Kết quả này

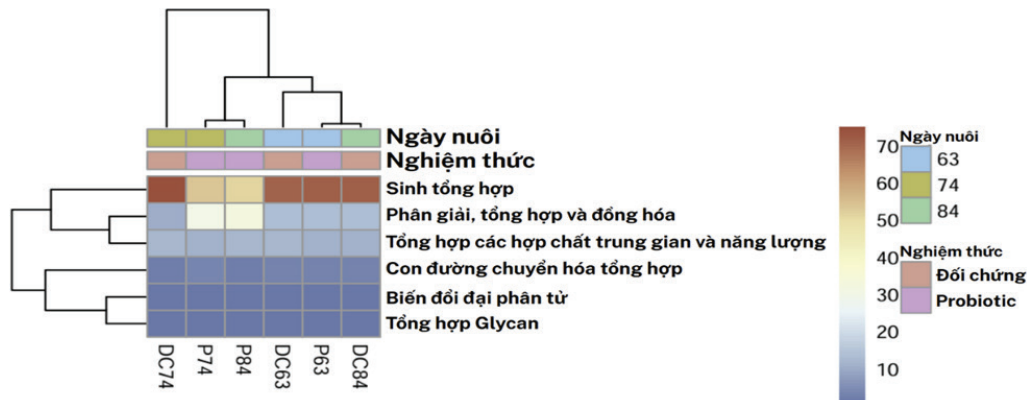
thể hiện rõ ở nghiệm thức đối chứng, với các loài *Vibrio* spp. chiếm tới 72,9% ở mẫu DC74. Ngoài ra, *Photobacterium damsela* – loài có khả năng gây bệnh cho cả động vật và người, cũng được ghi nhận ở các mẫu DC63, P63 và P74, với tỷ lệ lớn hơn 16%. Ngược lại, ở nghiệm thức bổ sung probiotic, các loài có hoạt tính sinh học cao như *Ruegeria* sp. YS9, *Phaeobacter inhibens*, *Sulfitobacter* sp. và *Pseudoalteromonas spongiae* lại được ghi nhận. Mặc dù với tỉ lệ thấp (dưới 5%), sự hiện diện của chúng cho thấy việc bổ sung probiotic tạo điều kiện thuận lợi cho các vi khuẩn có lợi phát triển. Những giống này thường được biết đến với khả năng sản xuất các hợp chất có hoạt tính sinh học, góp phần cải thiện chất lượng nước, ức chế vi khuẩn gây bệnh và thậm chí tham gia vào quá trình tiêu hóa [17]. Điều này củng cố nhận định về tác động tích cực của việc bổ sung probiotic đến sự cân bằng và chức năng của hệ vi sinh vật đường ruột tôm, tạo ra một cộng đồng vi khuẩn khỏe mạnh hơn, hỗ trợ vật chủ chống lại các tác nhân gây bệnh.

2. Khảo sát con đường biến dưỡng của hệ vi sinh vật đường ruột tôm thẻ chân trắng

Phân tích con đường biến dưỡng cho thấy có sự khác biệt rõ rệt giữa hai nghiệm thức và theo thời gian nuôi (Hình 2).



B



Hình 2. Biểu đồ nhiệt thể hiện cường độ của các con đường biến dưỡng ở cấp độ 2 (A) và cấp độ 3 (B)

Thang cường độ màu thể hiện khả năng hiện diện các con đường chuyển hóa trong mẫu, từ cao (đỏ) đến thấp (xanh dương). Biểu đồ cây phía trên biểu đồ thể hiện sự phân nhóm các mẫu dựa trên mức độ tương đồng về sự hiện diện của các con đường chuyển hóa. Biểu đồ cây ở bên trái biểu đồ cho thấy sự phân nhóm của các con đường chuyển hóa.

Ở cấp độ 2 (**Hình 2A**), các mẫu đối chứng (DC63 và DC74) thể hiện mức độ hoạt động cao của các con đường liên quan đến tổng hợp amino acid, acid béo, lipid, nucleotide, chu trình Krebs và sinh tổng hợp cofactor. Điều này cho thấy một cộng đồng vi sinh vật mạnh mẽ, tập trung vào các quá trình đồng hóa và sinh tổng hợp cơ bản để phát triển. Kết quả này phù hợp với hiểu biết chung về các vi sinh vật đường ruột khỏe mạnh, thường ưu tiên các con đường sinh tổng hợp để duy trì quần thể và chức năng, đặc biệt là các vi khuẩn bản địa có vai trò quan trọng trong việc tổng hợp các chất cần thiết cho vật chủ [18].

Ngược lại, việc bổ sung probiotic đã tạo ra những thay đổi rõ rệt trong hoạt động trao đổi chất. Cụ thể, ở nghiệm thức bổ sung probiotic, đặc biệt là mẫu P84, các con đường như hô hấp, lên men, phân giải carbohydrate và chuyển hóa hợp chất thứ cấp lại biểu hiện mức độ hoạt động thấp hơn đáng kể so với nhóm đối chứng.

Điều này có thể do probiotic cạnh tranh nguồn dinh dưỡng với các vi khuẩn lên men hoặc thay đổi môi trường pH, từ đó giảm sản xuất các sản phẩm chuyển hóa không mong muốn hoặc tối ưu hóa hiệu quả sử dụng năng lượng [8]. Đáng chú ý, một số con đường như phân hủy hợp chất thơm, phân hủy hợp chất cao phân tử, phân hủy cấu trúc tế bào và dị hóa nucleoside ở mẫu P74 và P84 lại cho thấy mức độ biểu hiện cao hơn so với nghiệm thức đối chứng. Điều này gợi ý một cơ chế hoạt động tiềm năng của probiotic mà cần được khám phá thêm. Nhiều chủng probiotic được sử dụng trong nuôi trồng thủy sản được biết đến với khả năng sản xuất các enzyme ngoại bào tiêu hóa (như amylase, protease, cellulase, chitinase) [17, 18]. Sự gia tăng hoạt động của các con đường phân hủy này có thể cho thấy probiotic đang tăng cường khả năng tiêu hóa các thành phần phức tạp trong thức ăn tôm, từ đó giúp tôm hấp thụ dinh dưỡng hiệu quả hơn và giảm lượng chất thải ra môi trường nuôi [19].

Ở cấp độ 3 (**Hình 2B**), xu hướng này tiếp tục được xác nhận. Các nhóm chức năng như sinh tổng hợp, đồng hóa và phân giải đều cho thấy mức độ hoạt động cao hơn rõ rệt ở nhóm đối chứng so với nhóm bổ sung probiotic tại các thời điểm tương ứng. Điều này càng củng cố thêm nhận định rằng probiotic đã điều chỉnh

đáng kể hoạt động trao đổi chất của cộng đồng vi sinh vật đường ruột tôm, có thể thông qua việc tối ưu hóa hiệu quả sử dụng năng lượng và dinh dưỡng, thay vì chỉ tăng cường hoạt động biến dưỡng tổng thể một cách không chọn lọc.

3. Khảo sát sự hiện diện của gen kháng kháng sinh trong hệ vi sinh vật đường ruột của tôm thẻ chân trắng

Kết quả phân tích dữ liệu shotgun metagenomic của nghiên cứu này đã cung cấp một cái nhìn sâu sắc về tập hợp gen kháng kháng sinh trong hệ vi sinh vật đường ruột của tôm thẻ chân trắng. Nghiên cứu ghi nhận sự hiện diện của một phổ ARGs đa dạng, với các nhóm gen kháng đa kháng sinh (multidrug resistance genes), tetracycline, aminoglycoside và beta-lactam chiếm ưu thế đáng kể, xuất hiện với tỷ lệ cao trong tất cả các mẫu (**Hình 3**). Kết quả này phù hợp với nhiều nghiên cứu trước đây đã chỉ ra rằng các gen kháng tetracycline và aminoglycoside là những ARGs phổ biến trong môi trường nuôi trồng thủy sản [4]. Đặc biệt, tỷ lệ gen kháng đa kháng sinh chiếm ưu thế lớn nhất (35-50%) trong tất cả các mẫu, là một phát hiện đáng lưu ý. Các gen kháng đa kháng sinh thường mã hóa cho các bơm đẩy thuốc (*efflux pumps*) có khả năng đẩy nhiều loại kháng sinh ra khỏi tế bào vi khuẩn, góp phần vào sự kháng chéo đối với các nhóm kháng sinh khác nhau [20]. Sự phổ biến của các gen này trong đường ruột tôm thẻ chân trắng có thể phản ánh áp lực chọn lọc từ việc sử dụng kháng sinh rộng rãi trong nuôi trồng thủy sản, hoặc do sự lan truyền từ môi trường nước và trầm tích đã bị ảnh hưởng bởi các hoạt động nông nghiệp và y tế [3].

Các nhóm gen kháng tetracycline và aminoglycoside cũng cho thấy tỷ lệ cao (>6%) trong tất cả các mẫu, điều này không gây ngạc nhiên do tetracycline và aminoglycoside là hai trong số các loại kháng sinh được sử dụng phổ biến nhất trong điều trị và phòng ngừa bệnh ở vật nuôi thủy sản trong nhiều thập kỷ [4]. Sự hiện diện liên tục của các gen này cho thấy chúng đã trở thành một phần cố hữu trong quần thể vi sinh vật đường ruột của tôm, có thể thông

qua các yếu tố di truyền di động như plasmid và transposon, cho phép chúng dễ dàng lây lan giữa các vi khuẩn [4, 5].

Mặc dù các nhóm gen khác như phenicol, beta-lactam, MLS (macrolide-lincosamide-streptogramin) và fluoroquinolone được phát hiện với tỷ lệ thấp hơn, sự hiện diện của chúng vẫn là một dấu hiệu cảnh báo. Đặc biệt, gen kháng beta-lactamase là một trong những cơ chế kháng kháng sinh quan trọng nhất trên lâm sàng [21] và sự xuất hiện của chúng trong đường ruột tôm cần được theo dõi chặt chẽ.

Mặc dù các gen kháng kháng sinh chiếm ưu thế trong cả hai nghiệm thức, phân tích PERMANOVA đã chỉ ra rằng không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê về thành phần gen kháng kháng sinh của hệ vi sinh vật đường ruột giữa nghiệm thức bổ sung probiotic và nghiệm thức đối chứng (Pseudo-F = 0,2543, $p = 0,9$, $q = 0,9$). Kết quả này có thể được lý giải theo nhiều khía cạnh.

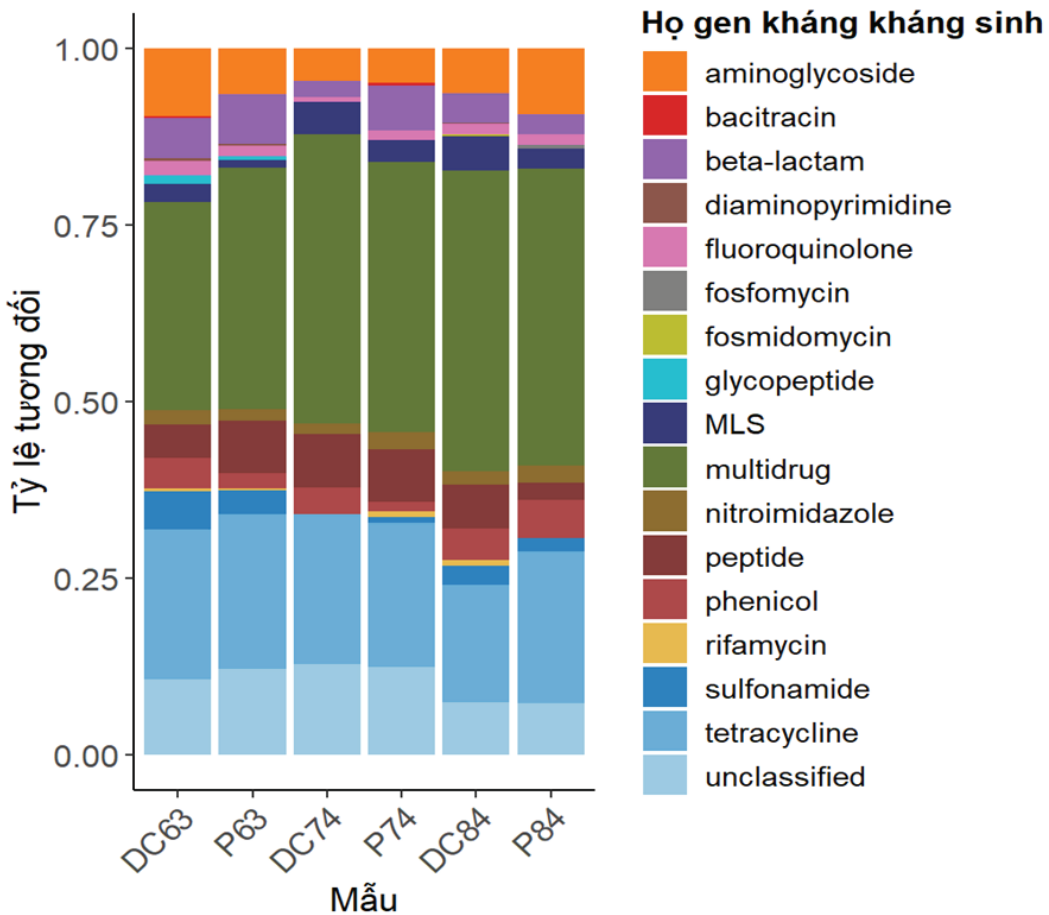
Thứ nhất, có thể lượng probiotic được bổ sung ($0,5 \times 10^7$ CFU/gam cho mỗi chủng) hoặc thời gian tiếp xúc (84 ngày) chưa đủ để tạo ra sự thay đổi đáng kể và có ý nghĩa thống kê trong tập hợp gen kháng kháng sinh. Một số nghiên cứu cho thấy rằng tác động của probiotics lên ARGs phụ thuộc vào chủng probiotic, liều lượng, thời gian sử dụng và điều kiện môi trường [8, 18, 19].

Thứ hai, mặc dù probiotic có thể cạnh tranh vị trí và dinh dưỡng với vi khuẩn gây bệnh hoặc vi khuẩn mang ARGs, nhưng chúng có thể không trực tiếp loại bỏ hoặc làm giảm số lượng ARGs đã tồn tại trong cộng đồng vi sinh vật đường ruột, đặc biệt nếu các gen này được tích hợp vào nhiễm sắc thể hoặc nằm trên plasmid có khả năng ổn định cao [18, 19]. Tập hợp ARGs trong môi trường nuôi trồng thủy sản thường rất lớn và đa dạng do ảnh hưởng từ các nguồn bên ngoài như thức ăn, nguồn nước, và trầm tích, khiến việc thay đổi đáng kể thành phần này trở nên khó khăn trong thời gian ngắn.

Thứ ba, việc không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê cũng có thể do tính chất ổn định

và khả năng lây truyền ngang (Horizontal Gene Transfer) mạnh mẽ của các ARGs. Ngay cả khi các vi khuẩn mang ARGs bị giảm số lượng, các gen này vẫn có thể tồn tại trong môi trường dưới dạng DNA tự do hoặc được truyền sang các vi khuẩn khác không mang ARGs thông

qua biến nạp, tải nạp hoặc tiếp hợp (Forsberg et al., 2014). Điều này cho thấy rằng việc kiểm soát sự lây lan của ARGs trong môi trường nuôi trồng thủy sản đòi hỏi một cách tiếp cận toàn diện hơn, không chỉ dừng lại ở việc bổ sung probiotic.



Hình 3. Thành phần gen kháng kháng sinh trong hệ vi sinh đường ruột tôm thẻ chân trắng theo các nghiệm thức (Đối chứng-DC và Probiotic-P) và theo các ngày thu mẫu (63, 74, 84)

IV. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ XUẤT

Nghiên cứu cung cấp thông tin về việc bổ sung probiotic có tác động tích cực đến sức khỏe và hiệu quả sinh học của tôm thẻ chân trắng thông qua việc cải thiện cân bằng hệ vi sinh vật đường ruột, tăng cường các con đường miễn dưỡng thiết yếu và tiềm năng kiểm soát sự lây lan của gen kháng kháng sinh từ các vi khuẩn gây bệnh. Những phát hiện này củng cố vai trò của probiotic như một giải pháp hứa hẹn cho ngành nuôi trồng thủy sản bền vững.

Tuy nhiên, nghiên cứu này vẫn còn một số giới hạn. Cụ thể, thời gian theo dõi 84 ngày trong điều kiện phòng thí nghiệm có thể chưa đủ để quan sát đầy đủ tác động dài hạn, sự ổn định của hệ vi sinh vật đường ruột cũng như hạn chế khả năng tổng quát hóa kết quả ra môi trường thực tế. Hơn nữa, việc chỉ sử dụng hai chủng probiotic cụ thể và giới hạn về số mẫu thư viện shotgun metagenomics cũng cần được xem xét. Để khắc phục những giới hạn này, các nghiên cứu tương lai nên tập trung vào

việc tăng số lượng mẫu, kéo dài thời gian theo dõi, thử nghiệm ở quy mô thương phẩm, khám phá các chủng probiotic mới, và sử dụng các phương pháp phân tích chức năng sâu hơn (như metatranscriptomics) để có cái nhìn toàn diện hơn về vai trò của probiotic trong nuôi trồng thủy sản.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được tài trợ bởi Bộ Giáo Dục và Đào tạo, thuộc đề tài Khoa học và Công nghệ cấp Bộ, Mã số B2023-TSN-14. Nhóm tác giả xin trân trọng cảm ơn các thành viên của nhóm nghiên cứu Đa dạng sinh học và Bảo tồn (Trường Đại học Nha Trang) trong việc hỗ trợ các phân tích dữ liệu.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Đỗ Doãn Dung, Lê Hùng Anh, Vũ Văn Vân, Lê Nguyễn Anh Đông (2023), “Phát triển bền vững ngành tôm Việt Nam: Thách thức và giải pháp”, *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Sư Phạm Tp Hồ Chí Minh*, Tập 20(12), tr. 2263-2278.
2. Bondad-Reantaso, M.G., Subasinghe, R.P., Arthur, J.R., Ogawa, K., Chinabut, S., Adlard, R., Tan, Z., Shariff, M. (2007), “Disease and health management in Asian aquaculture”, *Veterinary Parasitology*, 132 (3-4), pp. 249-272, <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2005.07.005>.
3. Cabello, F.C. (2006), “Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment”. *Environmental Microbiology*, 8(7), pp. 1137-44. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2006.01054.x>.
4. Singer, A. C., Shaw, H., Rhodes, V., Hart, A. (2016), “Review of Antimicrobial Resistance in the Environment and Its Relevance to Environmental Regulators”. *Frontiers in microbiology*, 7, pp. 1728. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01728>.
5. Vikesland, P. J., Pruden, A., Alvarez, P. J. J., Aga, D., Bürgmann, H., Li, X. D., Manaia, C. M., Nambi, I., Wigginton, K., Zhang, T., Zhu, Y. G. (2017), “Toward a Comprehensive Strategy to Mitigate Dissemination of Environmental Sources of Antibiotic Resistance”. *Environmental Science & Technology*, 51(22), pp. 13061–13069. <https://doi.org/10.1021/acs.est.7b03623>.
6. Bondad-Reantaso MG, MacKinnon B, Karunasagar I, et al. (2023), “Review of alternatives to antibiotic use in aquaculture”. *Review in Aquaculture*, 15(4), pp. 1421-1451. <https://doi.org/10.1111/raq.12786>
7. Wang, Y.B., Xu, Z.R., Xia, M.S. (2008), “The effectiveness of commercial probiotics in northern white shrimp *Penaeus vannamei* ponds”. *Fisheries Science*, 71(5), pp. 1036-104, <https://doi.org/10.1111/j.1444-2906.2005.01061.x>.
8. Xie, J.-J., Liu, Q.-Q., Liao, S., Fang, H.-H., Yin, P., Xie, S.-W., Tian, L.-X., Liu, Y.-J., & Niu, J. (2019), “Effects of dietary mixed probiotics on growth, non-specific immunity, intestinal morphology and microbiota of juvenile pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*”. *Fish & Shellfish Immunology*, 90, pp. 456–465. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.04.301>.
9. Quince, C., Walker, A. W., Simpson, J. T., Loman, N. J., & Segata, N. (2017), “Shotgun metagenomics, from sampling to analysis”. *Nature Biotechnology* 35, pp. 833–844. <https://doi.org/10.1038/nbt.3935>.
10. Nguyễn Đình Huy, Hà Minh Hoàng, Trương Thị Bích Hồng, Mai Đức Thao, Trần Văn Dũng (2023), “Sử dụng Artemia làm thức ăn bổ sung cho tôm thẻ chân trắng (*Penaeus vannamei* Boone, 1931) trong giai đoạn đầu của quy trình nuôi tôm nhiều giai đoạn”. *Tạp chí Khoa học - Công nghệ Thủy sản*, 2/2023, pp. 11-19. <https://doi.org/10.53818/jfst.02.2023.49>.
11. Langmead, B. and Salzberg, S.L., 2012. “Fast gapped-read alignment with Bowtie 2”. *Nature Methods*, 9(4), pp.357–359. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1923>.
12. Zhang, J., Kobert, K., Flouri, T. and Stamatakis, A., 2014. PEAR: a fast and accurate Illumina Paired-End reAd mergeR. *Bioinformatics*, 30(5), pp.614–620. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt593>.
13. Rognes, T., Flouri, T., Nichols, B., Quince, C. and Mahé, F., 2016. “VSEARCH: a versatile open source

- tool for metagenomics”. *PeerJ*, 4, e2584. <https://doi.org/10.7717/peerj.2584>.
14. Douglas, G.M., Maffei, V.J., Zaneveld, J.R., Yurgel, S.N., Brown, J.R., Taylor, C.M., Huttenhower, C. & Langille, M.G.I., 2020. “PICRUSt2 for prediction of metagenome functions”. *Nature Biotechnology*, 38, pp.685–688. <https://doi.org/10.1038/s41587-020-0548-6>.
 15. Arango-Argoty, G., Garner, E., Pruden, A., Heath, L.S., Vikesland, P. & Zhang, L., 2018. “DeepARG: a deep learning approach for predicting antibiotic resistance genes from metagenomic data”. *Microbiome*, 6(23). <https://doi.org/10.1186/s40168-018-0401-z>.
 16. Wickham, H., 2016. “ggplot2: Elegant graphics for data analysis”. *New York: Springer-Verlag*.
 17. Wang, S., Li, Y., Lin, X., Deng, X., Li, E., Meng, X., ... & Yu, K. (2020). “Effects of *Bacillus subtilis* supplementation on growth performance, immune responses, and gut microbiota of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*)”. *Fish & Shellfish Immunology*, 104, 381-390.
 18. Li, J., Ni, X., & Liu, Y. (2019). “Probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from healthy shrimp (*Litopenaeus vannamei*) gut”. *Aquaculture Research*, 50(1), 162-171.
 19. Verschuere, L., Rombaut, G., Sorgeloos, P., & Verstraete, W. (2000). “Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture”. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64(4), 655-671.
 20. Martínez, J.L., Baquero, F. and Andersson, D.I., 2009. “Predicting antibiotic resistance”. *Nature Reviews Microbiology*, 7(12), pp.936–946. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2455>.
 21. Bush, K., & Bradford, P. A. (2016). “ β -Lactamases and β -lactamase inhibitors: An update”. *Clinical Microbiology Reviews*, 29(4), pp. 951-994. <https://doi.org/10.1128/CMR.00075-16>.