

BỘ GIÁO DỤC
VÀ ĐÀO TẠO

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



Nghiêm Xuân Bách Khoa

**NGHIÊN CỨU ĐA DẠNG GENE KHÁNG THUỐC, GENE ĐỘC LỰC VÀ
HỆ VI KHUẨN ĐƯỜNG RUỘT CÁ TRÁ (*PANGASIANODON
HYPOPHTHALMUS*) BẰNG GIẢI TRÌNH TỰ METAGENOMICS**

LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC

Hà Nội - 2024

BỘ GIÁO DỤC
VÀ ĐÀO TẠO

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



Nghiên Xuyên Bách Khoa

**NGHIÊN CỨU ĐA DẠNG GENE KHÁNG THUỐC, GENE ĐỘC LỰC VÀ
HỆ VI KHUẨN ĐƯỜNG RUỘT CÁ TRA (*PANGASIANODON
HYPOPHthalmus*) BẰNG GIẢI TRÌNH TỰ METAGENOMICS**

LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC

Ngành: Sinh học Thực nghiệm

Mã số: 8420114

NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC :

1. TS. Nguyễn Quang Huy

2. PGS. TS. Lê Thị Nhi Công

Hà Nội - 2024

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xác nhận rằng các nội dung và kết quả trong luận văn này được thực hiện hoàn toàn dựa trên nghiên cứu và tìm tòi của cá nhân tôi, sử dụng các tài liệu và số liệu mà tôi tự thu thập và phân tích. Tôi cam kết rằng các kết quả trong nghiên cứu này là chính xác, khách quan và chưa từng được công bố trong bất kỳ công trình nào khác. Tôi hoàn toàn chịu trách nhiệm trước pháp luật về độ tin cậy và tính xác thực của các số liệu và kết quả mà tôi đã trình bày trong luận văn này.

Tác giả luận văn ký và ghi rõ họ tên


Nghiêm Xuân Bách Khoa

LỜI CẢM ƠN

Hành trình nghiên cứu và hoàn thành luận văn Thạc sĩ này là một chặng đường đầy thử thách nhưng cũng tràn ngập những kỷ niệm đáng nhớ. Giờ đây, khi nhìn lại những tháng ngày đã qua, lòng tôi tràn đầy cảm xúc và biết ơn sâu sắc tới những cá nhân và tổ chức đã đồng hành, hỗ trợ và chấp cánh cho tôi trên con đường này.

Lời đầu tiên, tôi xin được bày tỏ lòng biết ơn chân thành tới Học Viện Khoa học và Công nghệ - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, mái nhà chung đã nuôi dưỡng và vun đắp tình yêu khoa học trong tôi. Sự tận tâm và tâm huyết của các thầy cô, cùng với môi trường học thuật năng động và đầy cảm hứng tại Học Viện đã tạo nền tảng vững chắc cho tôi trên hành trình chinh phục tri thức.


Đặc biệt, tôi xin gửi lời tri ân sâu sắc tới hai người thầy, người cô đáng kính, TS. Nguyễn Quang Huy và PGS. TS. Lê Thị Nhi Công. Thầy cô không chỉ là những người hướng dẫn tận tâm, chỉ bảo tận tình mà còn là những người truyền cảm hứng, khơi dậy niềm đam mê nghiên cứu trong tôi. Những lời khuyên quý báu, sự động viên kịp thời và những góp ý chân thành của thầy cô đã giúp tôi vượt qua những khó khăn, trở ngại và hoàn thiện luận văn này.

Không thể không nhắc tới sự đồng hành quý báu của các bạn đồng nghiệp trong và ngoài phòng thí nghiệm. Những giờ phút cùng nhau trao đổi, thảo luận, chia sẻ kiến thức và kinh nghiệm đã giúp tôi mở rộng tầm nhìn và hoàn thiện bản thân. Sự giúp đỡ nhiệt tình và tinh thần hợp tác của các bạn đã tạo nên một môi trường làm việc thân thiện, cởi mở và đầy sáng tạo.

Cuối cùng, tôi xin gửi lời cảm ơn chân thành tới gia đình và bạn bè, những người luôn bên cạnh ủng hộ và động viên tôi trong suốt quá trình học tập và nghiên cứu. Tình yêu thương và sự tin tưởng của mọi người là nguồn động lực vô giá giúp tôi vượt qua mọi thử thách và hoàn thành ước mơ của mình.

Xin được trân trọng ghi nhận và biết ơn tất cả những đóng góp, dù lớn hay nhỏ, đã giúp tôi hoàn thành luận văn này. Mỗi sự hỗ trợ, mỗi lời động viên đều là một mảnh ghép quan trọng làm nên thành công của tôi ngày hôm nay.

Tác giả luận văn


Nguyễn Xuân Bách Khoa

MỤC LỤC

DANH MỤC CÁC BẢNG	vi
DANH MỤC CÁC HÌNH VẼ, ĐỒ THỊ	vii
MỞ ĐẦU	1
1 Chương 1. TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU	3
1.1. TÌNH HÌNH KHÁNG KHÁNG SINH TRÊN THẾ GIỚI	3
1.2. CƠ CHẾ KHÁNG THUỐC Ở VI KHUẨN	4
1.2.1. Tổng quan về kháng kháng sinh	4
1.2.2. Cơ chế thu nhận tính kháng thuốc ở vi khuẩn	4
1.3. GENE ĐỘC LỰC Ở THỦY SẢN	7
1.4. KHÁNG KHÁNG SINH TRONG CHĂN NUÔI THỦY SẢN	8
1.4.1. Tình hình nuôi trồng thủy sản thế giới và Việt Nam	8
1.4.2. Tình trạng KKS ở trong chăn nuôi thủy sản thế giới và Việt Nam	9
1.5. GIẢI TRÌNH TỰ NGS METAGENOMICS GIÁM SÁT KHÁNG KHÁNG SINH Ở THỦY SẢN	10
1.5.1. Khái niệm Metagenomics	10
1.5.2. Metagenomics dựa trên trình tự	11
1.5.3. Phân cụm metagenomics	11
1.5.4. Metagenomics với giám sát kháng kháng sinh ở thủy sản	12
1.6. ĐẶC ĐIỂM CÁ TRA	12
1.7. HỆ VI SINH VẬT ĐƯỜNG RUỘT CÁ TRA	13
1.7.1. Vai trò của vi sinh vật đường ruột cá	13
1.7.2. Hệ vi sinh vật đường ruột cá Tra	15
2 Chương 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	16
2.1. ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU	16
2.1.1. Vật liệu nghiên cứu	16
2.1.2. Hóa chất, máy móc thí nghiệm	16

2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	17
2.2.1. Thu thập mẫu và tách chiết DNA tổng số.....	17
2.2.2. Giải trình tự NGS và phân tích dữ liệu metagenomics	17
2.2.2.1. Giải trình tự NGS.....	17
2.2.2.2. Đánh giá, xử lý dữ liệu Metagenomics	17
2.2.3. Phân tích đa dạng quần thể vi khuẩn trong ruột cá tra.....	19
2.2.4. Xác định đa dạng gene KKS và gene độc lực	19
2.2.4.1. Đánh giá sự tương quan của gen KKS với các mẫu Metagenomics	19
2.2.4.2. Nhận dạng và định lượng các gen kháng kháng sinh, yếu tố độc lực, độc tố vi khuẩn và các yếu tố di truyền di động (MGEs) trên các hệ gene được lắp ráp từ metagenomics MAGs.....	19
2.2.5. Phân tích số liệu và thống kê.....	20
3 Chương 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN.....	21
3.1. LẮP RÁP, PHÂN CỤM VÀ ĐÁNH GIÁ CHẤT LƯỢNG SHORTGUN METAGENOMICS	21
3.2. ĐA DẠNG HỆ VI SINH VẬT ĐƯỜNG RUỘT CÁ TRA.....	23
3.3. XÁC ĐỊNH ĐA DẠNG GENE KKS VÀ GEN ĐỘNG LỰC.....	34
3.3.1. Dự đoán gene KKS có trong mẫu cá	34
3.3.2. Dự đoán gene độc lực từ 5 mẫu	39
3.4. TƯƠNG QUAN GIỮA PHÂN LOẠI VI KHUẨN VÀ GENE KHÁNG KHÁNG SINH TRONG RUỘT CÁ	41
KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ	44
KẾT LUẬN.....	44
KIẾN NGHỊ	44
DANH MỤC TÀI LIỆU THAM KHẢO	46

DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU, CÁC CHỮ VIẾT TẮT

Chữ viết tắt	Giải nghĩa Tiếng Anh	Giải nghĩa Tiếng Việt
ARG	Antibiotic Resistance Gene	Gene kháng kháng sinh
DNA	Deoxyribonucleic acid	Phân tử mang thông tin di truyền
ĐBSCL		Đồng bằng Sông Cửu Long
GDP	Gross Domestic Product	Tổng Sản Phẩm Quốc Nội
GLASS	Global Antimicrobial Resistance and Use Surveillance System	Hệ thống Giám sát Sử dụng và Kháng kháng sinh Toàn cầu
KKS		Kháng kháng sinh
NGS	Next Generation Sequencing	Giải trình tự gene thế hệ mới
MGE	Mobile genetic elements	Yếu tố di truyền di động
MAG	Metagenome-assembled genomes	Hệ gene được lắp ráp từ đa hệ gene
LMIC	Low- and Middle-Income Countries	Các khu vực có thu nhập thấp và trung bình
PCR	Polymerase Chain Reaction	Phản ứng chuỗi polymerase
rRNA	Ribosomal Ribonucleic Acid	RNA ribosome
USDA	United States Department of Agriculture	Bộ Nông nghiệp Hoa Kỳ
WHO	World Health Organization	Tổ chức Y tế Thế giới
VF	Virulence factors	Yếu tố gây độc

DANH MỤC CÁC BẢNG

Bảng 2.1. Kí hiệu tên các mẫu ruột cá thu thập từ 2 tỉnh Cần Thơ và Đồng Tháp và dữ liệu về giai đoạn phát triển của cá.....	16
Bảng 3.1. Kết quả đo nồng độ và chất lượng 6 mẫu DNA ruột cá đo bằng máy Nanodrop 2000 spectrophotometers (Thermo Fisher, Mỹ)	21
Bảng 3.2. Đánh giá chất lượng shotgun metagenomics đã lắp ráp theo các thông số N50, N75, L50, L75	23

DANH MỤC CÁC HÌNH VẼ, ĐỒ THỊ

Hình 2.1. Quy trình đánh giá chất lượng, lắp ráp, phân loại trình tự shotgun metagenomics bằng nf-core/mag.	18
Hình 3.1. Biểu đồ đánh giá chất lượng shotgun metagenomics theo các phân tích độ trùng lặp trình tự, tỉ lệ nucleotide G-C, tổng trình tự ngắn sau khi sàng lọc loại bỏ adapter, tỉ lệ adapter bị loại bỏ.	22
Hình 3.2. Số trình tự đọc thô được nhận diện là thuộc Vi khuẩn trong các mẫu, Cột màu ngọc lam hiển thị trung bình số lượt trình tự đọc của các phân loại phía dưới Vi khuẩn; thanh màu cam hiển thị số lượt trình tự đọc được xác định là thuộc Vi khuẩn	24
Hình 3.3. Biểu đồ cấu trúc thành phần các Ngành vi sinh vật có trong các mẫu ruột cá, các phân loại có tỉ lệ >1% được hiển thị	25
Hình 3.4. Biểu đồ cấu trúc thành phần các Bộ vi sinh vật có trong các mẫu ruột cá, các phân loại có tỉ lệ >1% được hiển thị	26
Hình 3.5. Biểu đồ cấu trúc thành phần các Bộ vi sinh vật có trong các mẫu ruột cá, các phân loại có tỉ lệ >1% được hiển thị	27
Hình 3.6. Cấu trúc thành phần của các chi, loài của các mẫu thuộc khu vực Cần Thơ (a. Biểu đồ Sankey thành phần chi loài của mẫu TC3-F16, b. Biểu đồ Sankey thành phần chi loài của mẫu TC4-F17).....	29
Hình 3.7. Cấu trúc thành phần của các chi, loài của các mẫu thuộc khu vực Đồng Tháp DT2-F18.....	31
Hình 3.8. Cấu trúc thành phần của các chi, loài của các mẫu thuộc khu vực Đồng Tháp DT3-F19.....	32
Hình 3.9. Cấu trúc thành phần của các chi, loài của các mẫu thuộc khu vực Đồng Tháp DT4-F20.....	32
Hình 3.10. Biểu đồ thống kê số lượng gene kháng kháng sinh tìm được trong 5 mẫu ruột cá.....	36
Hình 3.11. Biểu đồ nhiệt cho sự tương quan giữa các nhóm kháng kháng sinh với các mẫu (số liệu được chuẩn hóa log ₁₀ (bản sao/tế bào))	37
Hình 3.12. Biểu đồ thống kê tần suất dự đoán các gene gây độc theo từng nhóm chức năng của 5 mẫu ruột cá.....	40
Hình 3.13. Cây phát sinh chủng loài và biểu đồ nhiệt dự đoán số lượng gene thuộc danh mục kháng kháng sinh của từng phân cụm được xác định tối thiểu đến phân loại bộ.....	43

MỞ ĐẦU

Kháng kháng sinh (KKS) hiện là một thách thức nghiêm trọng đối với sức khỏe cộng đồng trên toàn cầu và đang cản trở quá trình đạt được các Mục tiêu Phát triển Bền vững do Liên Hợp Quốc đề ra. Dự báo đến năm 2030, KKS có thể làm gia tăng tỉ lệ mắc bệnh, tử vong sớm, suy giảm năng suất lao động và gây ra những tác động tiêu cực lên nền kinh tế thế giới nếu không có biện pháp can thiệp kịp thời. Đặc biệt, trong ngành chăn nuôi, vật nuôi bị nhiễm vi khuẩn kháng thuốc không chỉ ảnh hưởng tới năng suất mà còn tiềm ẩn nguy cơ lây lan dịch bệnh sang con người. Trong bối cảnh này, ngành nuôi trồng thủy sản – một trong những ngành chăn nuôi phát triển nhanh nhất trên thế giới, đặc biệt là tại châu Á, nơi cung cấp 2/3 sản lượng cá thực phẩm toàn cầu – cũng đang đối mặt với những vấn đề phức tạp liên quan đến KKS.

Cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*) là loài cá có giá trị kinh tế cao và được nuôi rộng rãi ở Việt Nam cũng như các nước trong khu vực như Thái Lan, Bangladesh, Indonesia, Myanmar và Ấn Độ. Đặc biệt, khu vực Đồng bằng sông Cửu Long (ĐBSCL) là trung tâm sản xuất cá tra lớn nhất, với diện tích nuôi ước tính 6.600 ha, sản lượng đạt 1,42 triệu tấn và kim ngạch xuất khẩu lên tới 2,01 tỷ USD (VASEP, 2019). Tuy nhiên, quá trình chuyển đổi từ nuôi quảng canh sang thâm canh đã làm gia tăng ô nhiễm môi trường và bùng phát dịch bệnh, đặc biệt là các bệnh nhiễm khuẩn ảnh hưởng đến gan, thận, mủ và xuất huyết. Để đối phó với các bệnh này, nhiều loại kháng sinh đã được sử dụng, nhưng việc lạm dụng kháng sinh, dựa nhiều vào kinh nghiệm thay vì nghiên cứu khoa học, đã dẫn đến dư lượng kháng sinh trong môi trường và sự phát triển của vi khuẩn kháng thuốc. Các nghiên cứu quốc tế đã chứng minh rằng vi khuẩn kháng thuốc không chỉ gây hại cho thủy sản mà còn đe dọa sức khỏe con người và động vật. Tuy nhiên, thông tin về tình trạng vi khuẩn kháng kháng sinh trong hệ vi sinh đường ruột của cá tra tại ĐBSCL vẫn còn hạn chế.

Metagenomics là lĩnh vực nghiên cứu vật liệu di truyền được thu thập trực tiếp từ các mẫu môi trường hoặc lâm sàng thông qua kỹ thuật giải trình tự. Với những lợi thế khi so với phương pháp phân lập truyền thống như: Lượng dữ liệu lớn cho biết khái quát hơn về sự đa dạng vi sinh vật, các gene chức năng; metagenomics cho thấy được tính ưu việt và cũng là cách tiếp cận mới mẻ khi khám phá hệ vi sinh vật cũng như các gene KKS, gene độc lực tồn tại trong đường ruột cá.

Mục đích nghiên cứu:

Mục tiêu của nghiên cứu này là áp dụng công nghệ giải trình tự NGS

metagenomics để xác định sự đa dạng của hệ vi khuẩn đường ruột, gene kháng kháng sinh và gene độc lực trong cá tra. Từ đó, đánh giá mức độ phát tán vi khuẩn gây bệnh kháng thuốc ra môi trường và rủi ro lây nhiễm cho con người và động vật, đồng thời xác định các lợi khuẩn tiềm năng để phát triển chế phẩm sinh học tăng cường sức khỏe đường ruột, hạn chế việc sử dụng kháng sinh.

Nội dung nghiên cứu:

- Xác định sự đa dạng vi khuẩn trong đường ruột cá tra ở 2 tỉnh Cần Thơ và Đồng Tháp
- Phân tích đa dạng gene kháng kháng sinh và các loại kháng sinh thường bị kháng của các mẫu cá tra thu thập được.
- Xác định đa dạng gene độc lực tìm được trong các mẫu cá tra

Cơ sở khoa học và tính thực tiễn của đề tài:

Đề tài này sẽ dựa trên các phương pháp giải trình tự tiên tiến và kỹ thuật metagenomics để cung cấp một cái nhìn toàn diện về hệ vi sinh đường ruột của cá tra. Những kết quả thu được sẽ đóng góp vào việc phát triển các giải pháp thay thế kháng sinh trong nuôi trồng thủy sản, góp phần bảo vệ sức khỏe cộng đồng và môi trường.

Những đóng góp của luận văn:

Nghiên cứu này không chỉ cung cấp thông tin khoa học về hệ vi khuẩn đường ruột và tình trạng kháng kháng sinh trong nuôi cá tra, mà còn đưa ra cách tiếp cận mới mẻ trong vấn đề này.

Chương 1. TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU

1.1. TÌNH HÌNH KHÁNG KHÁNG SINH TRÊN THẾ GIỚI

Kể từ khi penicillin được phát hiện vào những năm 1920, thuốc kháng sinh đã được coi là thần dược để chữa trị các bệnh nhiễm trùng do vi khuẩn và đã làm giảm gánh nặng toàn cầu của các bệnh truyền nhiễm phổ biến [1]. Tuy vậy, hiện tại toàn cầu đang đối mặt với một tình trạng đáng lo ngại – kháng kháng sinh (KKS). Kháng kháng sinh (KKS) hiện lên như một trong những mối đe dọa nghiêm trọng nhất đối với sức khỏe cộng đồng toàn cầu trong thế kỷ 21, đặt ra thách thức to lớn cho y tế hiện đại. Việc sử dụng và lạm dụng thuốc kháng sinh tràn lan, đặc biệt là trong y tế và nông nghiệp, đã vô tình thúc đẩy sự xuất hiện và lây lan của các vi sinh vật kháng thuốc, đe dọa hiệu quả của những loại thuốc thiết yếu này [2].

Theo báo cáo của Hệ thống Giám sát Sử dụng và Kháng kháng sinh Toàn cầu (GLASS) vào năm 2022, tỉ lệ kháng thuốc đáng báo động ở các mầm bệnh do vi khuẩn phổ biến. Tỷ lệ trung bình được báo cáo ở 76 quốc gia là 42% đối với *E. coli* kháng cephalosporin thế hệ thứ ba và 35% đối với *Staphylococcus aureus* kháng methicillin là một mối lo ngại lớn. Đối với nhiễm trùng đường tiết niệu do *E. coli*, cứ 5 trường hợp thì có 1 trường hợp giảm nhạy cảm với các loại kháng sinh tiêu chuẩn như ampicillin, co-trimoxazole và fluoroquinolon vào năm 2020. Điều này đang gây khó khăn cho việc điều trị hiệu quả các bệnh nhiễm trùng thông thường [3]. Theo ước tính của Tổ chức Y tế Thế giới [4], mỗi năm có khoảng 700.000 người chết vì nhiễm trùng kháng thuốc [5]. Nếu không có hành động khẩn cấp và phối hợp trên quy mô toàn cầu, con số này dự kiến sẽ tăng lên 10 triệu ca tử vong mỗi năm vào năm 2050, vượt qua cả ung thư [6]. Các khu vực có thu nhập thấp và trung bình (LMIC) phải gánh chịu gánh nặng KKS nặng nề nhất do khả năng tiếp cận các phương pháp điều trị hiệu quả hạn chế, hệ thống giám sát yếu kém và các yếu tố thúc đẩy như sử dụng thuốc kháng sinh không hợp lý [7]. Tuy rằng ở các nước có mức thu nhập cao chiều hướng sử dụng thuốc kháng sinh có giảm nhưng tại Mỹ hay Úc lại có mức tiêu thụ cao (22 – 70 đơn vị/người) [1]. Sự gia tăng kháng kháng sinh là một mối đe dọa nghiêm trọng đối với sức khỏe toàn cầu, và metagenomics đã chứng minh là một công cụ vô giá để giám sát và điều tra vấn đề này. Tyagi và cộng sự (2018) đã sử dụng phương pháp metagenomics shotgun để phân tích hệ vi sinh vật đường ruột của cá, xác định được 51 gen kháng kháng sinh (ARGs) khác nhau thuộc 15 họ gen kháng đa kháng thuốc. Trong số này, các gen kháng beta-lactam (như beta-lactamase TEM), tetracycline và macrolide phổ biến nhất, ngay cả ở những con cá không tiếp xúc trực tiếp với kháng sinh. Phân tích

metagenomics cho phép hiểu biết toàn diện về sự phong phú, di truyền và khả năng di động của gen kháng kháng sinh (ARG) trong hệ sinh thái sông. Nghiên cứu của Guan và cộng sự đã sử dụng metagenomics để làm sáng tỏ tác động của con người lên sự lây lan của ARG từ môi trường nước sang ruột cá, nhấn mạnh nguy cơ tiềm ẩn đối với sức khỏe con người. Các mầm bệnh tiềm ẩn *Vibrio parahaemolyticus*, *Enterobacter kobei*, *Aeromonas veronii* và *Microcystis aeruginosa_C* với nhiều ARG đã được tìm thấy từ vi khuẩn đường ruột cá ở hạ lưu sông Ba [8]. Các phát hiện này nhấn mạnh vai trò của môi trường tự nhiên như một ổ chứa ARGs. Vì vậy những nỗ lực nghiên cứu và ngăn chặn tình trạng sử dụng kháng sinh bừa bãi cũng như KKS là vấn đề chung của toàn cầu.

1.2. CƠ CHẾ KHÁNG THUỐC Ở VI KHUẨN

1.2.1. Tổng quan về kháng kháng sinh

Kháng kháng sinh là khả năng kháng thuốc kháng khuẩn của vi sinh vật, loại thuốc mà trước đây có thể điều trị nhiễm trùng do vi sinh vật đó gây ra [4]. Kháng thuốc là một đặc tính của vi khuẩn, không phải của con người hay sinh vật khác bị nhiễm vi khuẩn [9]. Tất cả các loại vi khuẩn đều có thể phát triển khả năng kháng thuốc. Do đó, có kháng kháng sinh, kháng nấm, kháng vi rút và kháng ký sinh trùng [10, 11].

Kháng kháng sinh là một dạng cụ thể của kháng kháng khuẩn. Việc kháng thuốc này đặc biệt liên quan đến vi khuẩn và được phân thành hai nhóm nhỏ hơn: kháng vi sinh vật và kháng lâm sàng. Kháng vi sinh vật thường gặp nhất, xảy ra khi các gen của vi khuẩn bị đột biến hoặc được truyền từ thế hệ trước, giúp chúng chống lại các cơ chế tiêu diệt của một số loại kháng sinh. Kháng lâm sàng xuất hiện khi các phương pháp điều trị, mà ban đầu có hiệu quả, dần dần trở nên vô dụng do vi khuẩn sống sót và phát triển khả năng kháng thuốc sau quá trình điều trị. Trong cả hai trường hợp, vi khuẩn có thể truyền thông tin di truyền gây kháng thuốc cho nhau thông qua chuyển gen ngang, bao gồm các quá trình tiếp hợp, tải nạp hoặc biến nạp, điều này làm cho sự kháng thuốc lan rộng không chỉ trong cùng loài vi khuẩn mà còn giữa các loài vi khuẩn khác nhau [12].

1.2.2. Cơ chế thu nhận tính kháng thuốc ở vi khuẩn

Kháng thuốc đơn giản nhất là kháng thuốc bẩm sinh, xảy ra khi vi sinh vật vốn dĩ không nhạy cảm với một loại kháng sinh nào đó. Đây là đặc điểm cố hữu của một loài, chủng hoặc cả một nhóm vi khuẩn. Một vi sinh vật nhất định không nhạy cảm với thuốc kháng sinh do khả năng kháng "bẩm sinh" của nó đối với một số nhóm thuốc kháng sinh nhất định. Nó có thể liên quan đến việc không có thụ thể

cho thuốc kháng sinh, ái lực thấp, không thấm thành tế bào hoặc sản xuất enzyme [13].

Sự thay đổi về độ nhạy cảm của vi khuẩn với thuốc có thể là nguyên phát hoặc thứ phát. Kháng thuốc nguyên phát phát sinh do đột biến tự phát và có thể xuất hiện mà không cần tiếp xúc với thuốc. Loại kháng thuốc này được mã hóa trên nhiễm sắc thể và không truyền sang các loài vi khuẩn khác. Tần suất xuất hiện vi khuẩn đột biến thấp, nhưng khi có kháng sinh, các thể đột biến có lợi thế hơn so với phần còn lại của quần thể, do đó chúng tồn tại và phát triển số lượng áp đảo quần thể nhạy cảm. Chúng có thể lan sang các ổ sinh thái khác trong cùng một cá thể hoặc có thể được truyền sang các sinh vật lớn khác. Trong quá trình tiến hóa, để tự vệ trước các tác nhân kháng khuẩn, bao gồm cả kháng sinh, vi khuẩn đã phát triển nhiều cơ chế chống lại tác động của các tác nhân này. Kháng thuốc thứ phát là kết quả của việc vi khuẩn thu nhận các gen kháng thuốc. Nhờ đó, vi khuẩn trở nên kháng một phần hoặc hoàn toàn với một loại kháng sinh nhất định bằng cách phát triển các cơ chế hiệu ứng khác nhau [14].

Dựa trên rất nhiều nghiên cứu khoa học được thực hiện từ giữa thế kỷ 20, một số cơ chế giải thích sự kháng kháng sinh của vi khuẩn đã được đề xuất. Vi khuẩn hiện được cho là có khả năng kháng kháng sinh thông qua việc loại bỏ kháng sinh ra khỏi tế bào, biến đổi enzyme kháng sinh, biến đổi các thành phần tế bào là mục tiêu của kháng sinh, tăng cường sản xuất enzyme bị kháng sinh ức chế, thay đổi tính thấm của màng tế bào vi khuẩn, tạo ra con đường trao đổi chất thay thế, tăng nồng độ chất đối kháng kháng sinh, giảm lượng hoặc hoạt tính của enzyme kích hoạt tiền chất kháng sinh, biến đổi hệ thống điều hòa không liên quan trực tiếp đến cơ chế tác động của kháng sinh, hoặc giảm nhu cầu sản phẩm của con đường trao đổi chất bị ức chế [15, 16].

Nhiều nghiên cứu đã ghi nhận rằng vi khuẩn sử dụng hai chiến lược di truyền chính cho phép phòng thủ tự nhiên chống lại thuốc kháng sinh: đột biến gen, thường liên quan đến cơ chế hoạt động của một hợp chất kháng khuẩn và thu nhận DNA ngoại lai mã hóa các yếu tố quyết định kháng thuốc thông qua chuyển gen ngang [17].

Chuyển gen ngang đóng một vai trò quan trọng trong việc truyền bá cả các gen kháng thuốc đã biết và mới, chưa được xác định. Cơ chế này cho phép kháng thuốc mở rộng ra ngoài các dòng vô tính cụ thể. Bằng cách này, việc chuyển gen làm cho các gen kháng thuốc có sẵn cho số lượng vi khuẩn lớn hơn nhiều, thậm chí phá vỡ rào cản loài giữa vi khuẩn môi trường (không gây bệnh) và mầm bệnh trong

môi trường sống nhất định của vi sinh vật [18]. Quá trình chuyển gen kháng thuốc ngang giữa các vi khuẩn có thể diễn ra trong bất kỳ môi trường nào có chúng. Tuy nhiên, để các gen kháng thuốc được chuyển ngang từ vi khuẩn môi trường sang vi khuẩn gây bệnh, ít nhất chúng phải tạm thời có mặt trong cùng một môi trường. Ngoài ra, việc chuyển gen ngang có nhiều khả năng xảy ra giữa các vi khuẩn có quan hệ phát sinh loài gần gũi [19]. Cuối cùng, việc chuyển vật liệu di truyền giữa các tế bào vi khuẩn được gây ra bởi các tác nhân gây stress như thuốc kháng sinh [20] và có khả năng là kim loại và thuốc diệt sinh học [21]. Lựa chọn thuốc kháng sinh cũng góp phần vào việc thiết lập các gen kháng thuốc được chuyển giao trong vật chủ mới. Do đó, việc chuyển kháng thuốc sang mầm bệnh có thể được cho là tương đối phổ biến giữa các vi khuẩn liên quan đến con người [22], đặc biệt là trong quá trình điều trị bằng thuốc kháng sinh. Ngược lại, việc chuyển các gen kháng thuốc sang mầm bệnh từ vi khuẩn môi trường chiếm một môi trường sống khác và thường ít liên quan chặt chẽ với hệ thống phát sinh loài có thể sẽ ít phổ biến hơn, mặc dù các tác nhân gây stress môi trường có thể gây ra sự chuyển gen ngang đến và đi từ (cơ hội) mầm bệnh ở người trong điều kiện môi trường. Điều này có nghĩa là khi một yếu tố kháng thuốc được chuyển sang mầm bệnh ở người, sẽ có nhiều cơ hội lây lan hơn giữa các loài commensals và mầm bệnh so với việc chuyển sang mầm bệnh khác từ vi khuẩn môi trường.

Cơ chế dẫn đến kháng thuốc thứ phát, phát triển trong điều kiện vi sinh vật tiếp xúc với thuốc kháng khuẩn, phức tạp hơn nhiều. Cơ chế kháng thứ phát là ngoại nhiễm sắc thể. Các gen chịu trách nhiệm cho hiện tượng này nằm trong các phân tử DNA hình tròn nhỏ gọi là plasmid trong tế bào chất. Một plasmid có thể chứa gen kháng nhiều loại kháng sinh khác nhau. Plasmid có thể truyền gen mã hóa kháng thuốc từ tế bào vi khuẩn này sang tế bào vi khuẩn khác.

Plasmid được truyền chủ yếu qua tiếp hợp và tải nạp.

- Trong quá trình tiếp hợp, plasmid được truyền qua tiếp xúc trực tiếp giữa hai hoặc nhiều tế bào vi khuẩn thông qua các sợi protein do chúng tạo ra. Vi khuẩn thuộc các loài và chi khác nhau, thường có quan hệ phát sinh loài xa, có thể tham gia vào quá trình tiếp hợp. Việc truyền kháng thuốc từ vi khuẩn hoại sinh sang vi khuẩn gây bệnh theo cách này đặc biệt bất lợi.

- Tải nạp là quá trình chuyển plasmid từ tế bào cho sang tế bào nhận, được thực hiện bởi thể thực khuẩn (virus của vi khuẩn). Sau khi thể thực khuẩn bám vào thụ thể trên bề mặt tế bào, DNA được đưa vào vi khuẩn. Thể thực khuẩn khai thác các quá trình trao đổi chất của tế bào để sao chép DNA của virus và tạo ra protein của

virus. Sau khi hình thành các thể thực khuẩn mới bên trong tế bào vi khuẩn, nó sẽ trải qua quá trình ly giải - chu trình tan. DNA của thể thực khuẩn cũng có thể được tích hợp vào nhiễm sắc thể của vi khuẩn (prophage), được gọi là lysogeny [16, 23].

Trong số các yếu tố chuyển vị có khả năng thay đổi vị trí trong bộ gen, chúng ta có thể phân biệt chuỗi xen đoạn (IS) và transposon (Tn). Chuỗi xen đoạn là các đoạn DNA chứa gen mã hóa cho transposase, được bao quanh bởi các trình tự lặp lại đảo ngược. Enzyme này cho phép các yếu tố xen đoạn di chuyển đến bất kỳ vị trí nào trong DNA. Các gen kháng thuốc cũng có thể nằm trên transposon, đôi khi được gọi là 'gen nhảy'. Trong số các transposon (Tn), chúng ta có thể phân biệt:

- Transposon hỗn hợp, bao gồm hai chuỗi xen đoạn nằm ở hai bên của gen mã hóa kháng kháng sinh hoặc các gen khác không liên quan đến sự di chuyển của transposon (ví dụ: Tn10).

- Trong transposon không hỗn hợp (loại Tn3), các gen mã hóa các đặc điểm bổ sung được bao quanh bởi các trình tự đảo ngược ngắn, và sự chuyển vị là sao chép và yêu cầu sản phẩm của cả hai gen.

- Transposon tiếp hợp khác với transposon cổ điển ở chỗ chúng có thể được truyền không chỉ trong DNA của một tế bào đơn lẻ mà còn giữa các tế bào. Chúng tồn tại ở dạng tích hợp với plasmid hoặc nhiễm sắc thể của vi khuẩn. Đáp ứng với các tín hiệu nhất định, các transposon này tạo thành các dạng vòng không có khả năng sao chép. Việc chuyển giao tương tự như trong trường hợp plasmid tiếp hợp [16].

Trong quá trình tiến hóa của khả năng kháng đa thuốc ở vi khuẩn, một vai trò quan trọng cũng được gán cho integrons, có thể nằm trong cả nhiễm sắc thể và plasmid của vi khuẩn. Đây là một loại vật mang thông tin di truyền tự chuyển vị đặc biệt, có đặc tính đặc biệt là khả năng kết hợp các gen kháng thuốc thành các cassette, được chuyển giao cùng nhau ở dạng này cho các tế bào nhận [15].

1.3. GENE ĐỘC LỰC Ở THỦY SẢN

Các đợt bùng phát dịch bệnh được coi là một trở ngại đáng kể đối với sự phát triển của ngành nuôi trồng thủy sản, với ước tính tổn thất do dịch bệnh trên toàn cầu lên đến hàng tỷ đô la Mỹ mỗi năm [24]. Chu kỳ lây nhiễm của vi khuẩn gây bệnh bao gồm (i) sự xâm nhập của mầm bệnh; (ii) thiết lập và nhân lên, do đó tránh được sự bảo vệ của vật chủ và gây tổn thương cho các mô và tế bào vật chủ; và (iii) thoát ra. Các bước khác nhau này liên quan đến sự biểu hiện của các yếu tố độc lực, tức là các sản phẩm gen cho phép mầm bệnh lây nhiễm và làm hỏng vật chủ, bao gồm các

sản phẩm liên quan đến motil, bám dính, thoái hóa mô vật chủ, thu nhận sắt và bảo vệ khỏi sự bảo vệ của vật chủ [25].

Các gen độc lực mã hóa các protein có chức năng thiết yếu để thiết lập hiệu quả một nhiễm trùng vi khuẩn trong cơ thể vật chủ. Ở nhiều vi khuẩn Gram âm, sự biểu hiện của một số yếu tố độc lực được điều chỉnh bởi ngưỡng cảm ứng [26].

Trong nghiên cứu của Mendez, các gene độc lực của *Yersinia ruckeri* bao gồm *yh1BA* liên quan đến việc sản xuất hemolysin, *cdsAB* liên quan đến hấp thu cysteine, *yctCBA* liên quan đến hấp thu citrate, và *yrp1* mã hóa metalloprotease serralysin. Những gene này được biểu hiện trong quá trình nhiễm trùng cá hồi cầu vồng, cho thấy vai trò quan trọng của chúng trong việc thiết lập và phát triển nhiễm trùng [27].

1.4. KHÁNG KHÁNG SINH TRONG CHĂN NUÔI THỦY SẢN

1.4.1. Tình hình nuôi trồng thủy sản thế giới và Việt Nam

Ngành nuôi trồng thủy sản đang phát triển vượt bậc, đóng góp đáng kể vào nguồn cung cấp thực phẩm toàn cầu. Với gần 80 triệu tấn cá được sản xuất hàng năm, ngành này cung cấp hơn một nửa lượng cá tiêu thụ trên toàn thế giới. Sự tăng trưởng này phản ánh nhu cầu ngày càng tăng đối với cá, với mức tiêu thụ bình quân đầu người tăng gấp đôi từ năm 1960 đến 2016 [28]. Cá không chỉ là một nguồn thực phẩm quan trọng mà còn là mặt hàng giao dịch quốc tế lớn, góp phần đảm bảo an ninh lương thực và dinh dưỡng cho dân số toàn cầu [29]. Đặc biệt, ở các nước đang phát triển, nuôi trồng thủy sản cung cấp nguồn protein giá cả phải chăng, giúp giảm nghèo đói [30]. Trung Quốc dẫn đầu thế giới về sản xuất cá nuôi, chiếm 62% sản lượng toàn cầu, tiếp theo là Ấn Độ, Indonesia, Việt Nam, Bangladesh và Na Uy. Nuôi trồng thủy sản nội địa cũng đóng góp đáng kể, chiếm gần hai phần ba tổng sản lượng cá nuôi trên toàn thế giới vào năm 2013. Các loài cá chủ lực trong nuôi trồng thủy sản nội địa bao gồm cá chép, cá hồi, cá rô phi sông Nile và cá da trơn [31].

Ngành thủy sản là một phần quan trọng của nền kinh tế Việt Nam, đóng góp 4-5% GDP và 5-6% tổng kim ngạch quốc gia. Từ đầu những năm 1960, nuôi trồng thủy sản đã chuyển đổi từ tự cung tự cấp sang sản xuất hàng hóa tập trung, trở thành yếu tố chính của ngành từ năm 2007. Đồng bằng sông Cửu Long ở phía nam và Đồng bằng sông Hồng ở phía bắc là hai khu vực chính cho đánh bắt cá tự nhiên và nuôi trồng thủy sản. Đồng bằng sông Cửu Long đóng góp hơn 70% tổng sản lượng nuôi trồng thủy sản của cả nước, với các loài cá tra, tôm sú và tôm thẻ chân trắng là chủ lực. Từ những năm 1990, thủy sản đã trở thành mặt hàng xuất khẩu lớn thứ ba của Việt Nam. Giá trị xuất khẩu đạt 1 tỷ USD vào năm 2000, 3 tỷ USD vào năm

2006, 6 tỷ USD vào năm 2011 và 7,9 tỷ USD vào năm 2014. Hiện nay, thủy sản Việt Nam được xuất khẩu đến hơn 140 quốc gia và vùng lãnh thổ trên toàn thế giới. Theo FAO, gần 10% dân số Việt Nam có thu nhập chính từ ngành thủy sản, với hơn bốn triệu lao động, bao gồm nhiều phụ nữ, làm việc trong lĩnh vực này.

1.4.2. Tình trạng KKS ở trong chăn nuôi thủy sản thế giới và Việt Nam

Xu hướng toàn cầu và ứng dụng kháng sinh trong chăn nuôi động vật (gia súc lấy sữa và thịt, gia cầm) đã được ghi chép rõ ràng. Tuy nhiên, thông tin về việc sử dụng kháng sinh trong nuôi trồng thủy sản còn khan hiếm, do đó, rất khó để đánh giá chính xác số lượng kháng sinh được sử dụng [32].

Dựa trên dữ liệu từ Bộ Nông nghiệp Hoa Kỳ (USDA), Benbrook ước tính khoảng 204.000–433.000-pound kháng sinh đã được sử dụng trong nuôi trồng thủy sản ở Hoa Kỳ vào giữa những năm 1990 và hàng năm, khoảng 126.000–252.000-pound kháng sinh được sử dụng trong nuôi cá da trơn [33]. Các nhà nuôi trồng thủy sản ở Na Uy đã thành công trong việc giảm sử dụng kháng sinh trong nuôi cá hồi nhờ tăng cường các biện pháp vệ sinh và tiêm phòng. Tuy nhiên, mức độ sử dụng kháng sinh ở các quốc gia khác lại có sự khác biệt lớn do các quy định và yêu cầu khác nhau về việc phê duyệt và sử dụng kháng sinh. Ngành nuôi trồng thủy sản đóng vai trò quan trọng trong đảm bảo an ninh lương thực ở Bangladesh, nhưng việc lạm dụng kháng sinh trong hệ thống nuôi trồng của họ cũng đã dẫn đến tình trạng kháng kháng sinh. Một nghiên cứu dựa trên metagenomics trong nước ao từ sáu trang trại cá vây đã phát hiện nhiều ARG được dự đoán là tạo ra khả năng kháng với 18 loại kháng sinh khác nhau. Các ARG phổ biến nhất tạo ra khả năng kháng với aminoglycoside và sulfonamide và hiện diện trong các đơn vị phân loại có liên quan đến cả mầm bệnh ở cá và người [34].

Tại Việt Nam, mặc dù không có nhiều dữ liệu thống kê nhưng ở các nghiên cứu trong các năm gần đây cũng chỉ ra những mầm mống của tình trạng KKS đang xảy ra trong các khu nuôi trồng thủy hải sản. Một nghiên cứu các trang trại nuôi trồng thủy sản và sông ở Cần Thơ đã phát hiện dư lượng sulfamethoxazole và sulfadimidine cùng với các gen kháng sulfa là *sul1* và *sul2*. Ngoài ra, dư lượng sulfamethoxazole và gen kháng β -lactamase *bla_{CTX-M-1}* đã được phát hiện trong tám hệ thống nước ngọt, cho thấy những hệ thống nước ngọt này có thể đã bị ô nhiễm bởi hoạt động của con người [35]. Tương tự, tình trạng kháng kháng sinh ở vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri*, tác nhân gây bệnh gan thận mũ ở cá tra, cũng rất đáng báo động. Nghiên cứu của Thi và cộng sự (2014) [36] cho thấy hơn 86% chủng *E. ictaluri* phân lập từ các ao nuôi cá tra ở Đồng bằng sông Cửu Long kháng với

florfenicol, một loại kháng sinh được sử dụng phổ biến trong điều trị bệnh cho cá tra.

1.5. GIẢI TRÌNH TỰ NGS METAGENOMICS GIÁM SÁT KHÁNG KHÁNG SINH Ở THỦY SẢN

Các nghiên cứu về hệ vi sinh trong môi trường nuôi trồng thủy sản đã chú trọng đến mối quan hệ giữa vi khuẩn, đặc biệt là các loại vi khuẩn gây bệnh, với các sinh vật nhân thực như cá và động vật giáp xác [37]. Cho đến nay, hầu hết các nghiên cứu về gen kháng kháng sinh (ARGs) trong nuôi trồng thủy sản hoặc môi trường nước đã sử dụng các phương pháp tiếp cận truyền thống của sinh học phân tử như nuôi cấy thuần khiết, chiết xuất DNA và PCR định lượng [38]. Mặc dù những phương pháp này cung cấp thông tin chi tiết về cơ chế của ARGs trong môi trường nước, nhưng môi trường nuôi cấy thuần khiết trong phòng thí nghiệm khá khác biệt so với điều kiện quan sát được trong môi trường tự nhiên [39]. Các công nghệ mới được phát triển như PCR định lượng cũng có một số hạn chế; chúng chỉ có thể được sử dụng để phát hiện các gen đã được nghiên cứu kỹ lưỡng và không dành cho sàng lọc rộng rãi. Do đó, kết quả của các phương pháp thông thường này có thể không phản ánh tiềm năng KKS thực sự của các vi sinh vật độc lập với nuôi cấy trong môi trường [40].

Nhờ sự tiến bộ nhanh chóng của công nghệ giải trình tự thế hệ mới và chi phí ngày càng giảm, phương pháp metagenomics đã phát triển mạnh mẽ và được áp dụng để phân tích các gene kháng kháng sinh (ARGs) trong nhiều môi trường khác nhau như nhà máy xử lý nước thải, các khu vực ít bị ảnh hưởng, đất và phân [41-43]. Phương pháp tiếp cận độc lập với nuôi cấy này là một công cụ mạnh mẽ để làm sáng tỏ sự đa dạng vi sinh vật phức tạp và cơ chế kháng kháng sinh trong các mẫu môi trường.

1.5.1. Khái niệm Metagenomics

Metagenomics là lĩnh vực nghiên cứu vật liệu di truyền được thu thập trực tiếp từ các mẫu môi trường hoặc lâm sàng thông qua kỹ thuật giải trình tự. Lĩnh vực này còn có thể được gọi là bộ gen môi trường, ecogenomics, bộ gen cộng đồng hoặc microbiomics.

Trong khi vi sinh vật học truyền thống và giải trình tự bộ gen vi sinh vật và bộ gen dựa vào nuôi cấy vô tính, giải trình tự gen môi trường sớm nhận bản các gen cụ thể (thường là gen 16S rRNA) để tạo ra một hồ sơ đa dạng trong một mẫu tự nhiên. Công việc như vậy cho thấy phần lớn đa dạng sinh học vi sinh vật đã bị bỏ qua bởi các phương pháp dựa trên phân lập [44].

Do khả năng tiết lộ sự đa dạng tiềm ẩn trước đây của sự sống vi mô, metagenomics cung cấp một cách hiểu mạnh mẽ về thế giới vi sinh vật có thể cách mạng hóa sự hiểu biết về sinh học [45]. Khi giá giải trình tự DNA tiếp tục giảm, metagenomics hiện cho phép hệ sinh thái vi sinh vật được điều tra ở quy mô và chi tiết hơn nhiều so với trước đây. Các nghiên cứu gần đây sử dụng trình tự "shotgun" hoặc PCR để có được các mẫu phân lớn không thiên vị của tất cả các gen từ tất cả các thành viên của quần xã được lấy mẫu [46].

1.5.2. Metagenomics dựa trên trình tự

Metagenomics dựa trên trình tự liên quan đến việc trích xuất và giải trình tự DNA ngẫu nhiên trực tiếp từ môi trường, bao gồm DNA của vi khuẩn chưa nuôi cấy. Thông thường, các tế bào nhân chuẩn, vi khuẩn, virus và DNA tự do được phân tách theo kích thước (sử dụng phương pháp lọc hoặc ly tâm), và tổng DNA được chiết xuất từ phần thích hợp. Một mẫu DNA được giải trình tự, và mẫu đó được giả định là một phần ngẫu nhiên của toàn bộ cộng đồng. Các trình tự metagenomic sau đó được so sánh với các trình tự đã biết đã được tích lũy trong nhiều năm trong các ngân hàng dữ liệu quốc gia và quốc tế (trình tự tham chiếu) để xác định các gen kháng thuốc và/hoặc các đột biến được biết là gây ra kháng thuốc. Sử dụng một loạt các gen kháng thuốc tham chiếu, khả năng kháng thuốc đối với nhiều loại kháng sinh có thể được dự đoán từ một metagenome duy nhất. Các trình tự metagenomic cũng đại diện cho sự đa dạng của cộng đồng, bao gồm các chủng không thể nuôi cấy, thông tin có giá trị cho việc nghiên cứu những thay đổi của cộng đồng do điều trị bằng kháng sinh.

Cho đến nay, hơn một nghìn metagenomes khác nhau đã được giải trình tự từ nhiều môi trường đa dạng, như đất, đại dương và ruột người. Ngoài ra, các loài đã tuyệt chủng như voi ma mút [47] và người Neanderthal [48] đã được phân tích bằng phương pháp metagenomic dựa trên trình tự.

Khối lượng dữ liệu trình tự được tạo ra trong vài năm qua đã sinh ra một thể hệ công cụ phân tích mới (Hình 4) và cơ sở dữ liệu trình tự, chẳng hạn như IMG [49], MG-RAST [50], CAMERA [51] và Sequence Read Archive [52]. Hiện nay, không có một nguồn đáng tin cậy duy nhất cho tất cả dữ liệu trình tự metagenomic thô, và chất lượng và mô tả của dữ liệu khác nhau giữa các cơ sở dữ liệu và giữa các bộ dữ liệu.

1.5.3. Phân cụm metagenomics

Phân cụm metagenomics (hay binning metagenomic) là một kỹ thuật phân tích dữ liệu sinh học, đặc biệt là dữ liệu DNA, từ các mẫu phức tạp như cộng đồng

vi sinh vật trong môi trường tự nhiên. Phương pháp này tập trung vào việc sắp xếp các đoạn trình tự DNA được thu thập từ nhiều sinh vật khác nhau thành các nhóm tương ứng với các loài hoặc giống loài cụ thể [53]. Phân cụm metagenomics hỗ trợ các nhà khoa học có cái nhìn sâu sắc hơn về tính đa dạng sinh học, sự tương tác giữa các loài vi sinh vật trong một môi trường cụ thể và vai trò của chúng trong hệ sinh thái [54]. Các kỹ thuật phân cụm thường sử dụng các phương pháp dựa trên tỉ lệ nucleotide G và C, độ phủ của trình tự và sự tương đồng giữa các đoạn trình tự để phân loại chính xác các đoạn DNA này [55]. Kết quả từ quá trình này có thể được tận dụng để tạo ra hồ sơ về cộng đồng vi sinh vật, giúp làm sáng tỏ các chức năng sinh học cũng như các quá trình sinh hóa diễn ra trong môi trường..

1.5.4. Metagenomics với giám sát kháng kháng sinh ở thủy sản

Sự ra đời của công nghệ giải trình tự DNA thông lượng cao hiện nay cung cấp một công cụ mạnh mẽ để lập hồ sơ đầy đủ về DNA, bao gồm cả gen kháng thuốc (ARGs), có nguồn gốc từ các chiết xuất DNA thu được từ nhiều ngăn môi trường khác nhau. Ví dụ, ARGs hiện đã được lập hồ sơ bằng cách sử dụng phương pháp metagenomic này trong phân gia súc, phân trộn, nhà máy xử lý nước thải, đất, nước và các môi trường bị ảnh hưởng khác [56], cũng như trong hệ vi sinh vật người [57, 58]. Việc xác định ARGs từ các mẫu như vậy hiện nay dựa trên nguyên tắc tính toán so sánh trình tự DNA metagenomic với các cơ sở dữ liệu trực tuyến có sẵn. Việc so sánh như vậy được thực hiện bằng cách sắp xếp các đoạn đọc thô hoặc các khung đọc mở dự đoán (toàn bộ trình tự chiều dài gen) từ các contigs được lắp ráp vào cơ sở dữ liệu được chọn, sử dụng các chương trình như BLAST [59], Bowtie [60] hoặc DIAMOND [61], và sau đó dự đoán hoặc gán các loại ARGs có mặt bằng cách sử dụng điểm cắt tương tự trình tự và đôi khi là yêu cầu về chiều dài căn chỉnh [62].

1.6. ĐẶC ĐIỂM CÁ TRA

Cá tra ánh kim, hoặc cá tra vây ánh kim (*Pangasianodon hypophthalmus*) là một loài cá tra (thuộc họ *Pangasiidae*) có nguồn gốc từ các sông ở Đông Nam Á. Mặc dù có tên như vậy, nhưng nó không phải là cá mập. Nó được tìm thấy ở lưu vực sông Mekong cũng như sông Chao Phraya và được nuôi trồng rộng rãi để làm thực phẩm ở đó.

Ban đầu, cá tra được đánh bắt, đặc biệt là ở Việt Nam vào những năm 1940 và ở mức độ thấp hơn là ở Thái Lan và Campuchia. Sau đó, người ta phát hiện ra rằng cá tra được nuôi với mật độ thả cao, có tốc độ tăng trưởng nhanh và hiệu quả thức ăn cao. Do đó, nuôi trồng thủy sản dần dần thay thế việc đánh bắt cá theo thời

gian và hiện nó là một loài nuôi trồng thủy sản quan trọng ở Bangladesh, Campuchia, Trung Quốc, Indonesia, Malaysia và Cộng hòa Dân chủ Nhân dân Lào [63]. Cá sống ở các con sông lớn [64]. Được ghi nhận là đã hoặc đang được nuôi trong các cánh đồng lúa [65]. Là loài ăn tạp [66], ăn cá và giáp xác cũng như các mảnh vụn thực vật [64]. Đây là loài di cư, di chuyển ngược dòng sông Mekong từ các khu vực nuôi dưỡng không xác định để sinh sản ở những khu vực không rõ vào tháng 5 - 7 và quay trở lại dòng chính khi nước sông rút, tìm kiếm môi trường nuôi dưỡng vào tháng 9 - 12 [67]. Phía nam thác Khone, cuộc di cư ngược dòng diễn ra từ tháng 10 đến tháng 2, với đỉnh điểm vào tháng 11 - 12. Sự di cư này được kích hoạt bởi sự rút nước và dường như là một cuộc di cư phân tán sau khi di chuyển ngang từ các khu vực ngập lụt trở lại sông Mekong vào cuối mùa lũ. Cuộc di cư xuôi dòng diễn ra từ tháng 5 đến tháng 8 từ Stung Treng đến Kandal ở Campuchia và tiếp tục vào đồng bằng sông Cửu Long ở Việt Nam. Sự hiện diện của trứng từ tháng 3 đến tháng 8 từ Stung Treng đến Kandal cho thấy rằng cuộc di cư xuôi dòng vừa là di cư sinh sản vừa là di cư dinh dưỡng, cuối cùng đưa cá đến các khu vực đồng bằng ngập lụt ở Campuchia và Việt Nam trong mùa lũ [64, 68]. Loài này phổ biến ở hạ lưu sông Mekong, nơi cá con được thu gom để nuôi trong lồng cá nổi. Ở trung lưu sông Mekong, loài này được đại diện bởi những cá thể lớn mất đi màu sắc đen của cá non và cá bán trưởng thành, trở nên xám mà không có sọc [64].

1.7. HỆ VI SINH VẬT ĐƯỜNG RUỘT CÁ TRA

1.7.1. Vai trò của vi sinh vật đường ruột cá

Do khả năng thích nghi sinh thái đa dạng, vi sinh vật thể hiện sự đa dạng phong phú, từ đó thu hút các nhà vi sinh học khám phá môi trường sống của chúng trong và trên cơ thể động vật. Sau khi dự án "Hệ vi sinh vật của loài người" cung cấp những hiểu biết đầu tiên về sự đa dạng của các cộng đồng vi sinh, người ta đã phát hiện rằng hầu hết các vi khuẩn cộng sinh và ký sinh sống trong đường tiêu hóa và mối tương tác giữa chúng với nhau và với vật chủ có ý nghĩa rất lớn đối với sinh học con người [69]. Kể từ đó, nghiên cứu sâu rộng đã đóng góp vào việc nâng cao hiểu biết về hệ vi sinh vật đường ruột với sự phức tạp tiềm tàng và những đóng góp chức năng, khiến nó trở thành một lĩnh vực nghiên cứu hấp dẫn ở các loài động vật có xương sống khác. Đại diện cho hơn một nửa số loài động vật có xương sống với sự đa dạng sinh thái rộng lớn và các đặc điểm cấu trúc đặc biệt trong đường ruột [70, 71], cá đã trở thành một lớp quan trọng để nghiên cứu mối liên minh của vi sinh vật với vật chủ. Trước đây, các phương pháp phụ thuộc vào nuôi cấy truyền thống [72] và việc sử dụng các kỹ thuật Điện di Gel Gradient biến tính (DGGE) và Điện di Gel Gradient Nhiệt độ tạm thời (TTGE) [73, 74] chỉ tiết lộ một phần nhỏ

các vi sinh vật quan trọng này. Mặc dù các phương pháp này chỉ nhằm tiết lộ "sự đa dạng" trong hệ vi sinh vật, một số nghiên cứu ban đầu cũng đã liên kết sự phong phú về mặt phân loại của hệ vi sinh đường ruột cá với các chức năng cụ thể của vật chủ [75, 76]. Qua nhiều năm, các đánh giá dựa trên nuôi cấy đã dẫn đến việc xác định một số chủng vi khuẩn probiotic và gây bệnh, và vẫn tiếp tục được sử dụng trong các nghiên cứu về hệ vi sinh vật đường ruột cá [77]. Tuy nhiên, trong những năm gần đây, các phương pháp không phụ thuộc vào nuôi cấy đã thay thế các kỹ thuật truyền thống này khi việc khai thác trực tiếp DNA của cộng đồng hứa hẹn tiết lộ các loài vi khuẩn hiếm và có mặt ít [78]. Trong khi các nền tảng giải trình tự thế hệ tiếp theo (NGS) đã giúp dễ dàng giải mã cấu trúc toàn bộ cộng đồng, chúng cũng đòi hỏi các nhà nghiên cứu phải phát triển các phương pháp khai thác tiềm năng chức năng toàn diện của hệ vi sinh vật đường ruột cá.

Quá trình định cư của vi sinh vật trong ruột cá bắt đầu từ giai đoạn ấu trùng và liên tục được thúc đẩy để đạt được một tập hợp phức tạp các vi sinh vật liên quan đến đường ruột [79]. Khoảng 10^8 tế bào vi khuẩn thuộc hơn 500 loài khác nhau đã được báo cáo là sinh sống trong đường tiêu hóa của cá, chủ yếu là vi khuẩn hiếu khí hoặc kỵ khí tùy ý, mặc dù các vi khuẩn kỵ khí tuyệt đối cũng đã được phát hiện [80, 81].

Cho đến nay, phân tích dữ liệu giải trình tự đã tiết lộ sự đa dạng loài đặc biệt thấp, với các ngành Proteobacteria, Firmicutes và Bacteroidetes chiếm tới 90% hệ vi sinh vật đường ruột của các loài cá khác nhau, cùng với các ngành Fusobacteria, Actinobacteria, và Verrucomicrobia [82]. Điều này không quá ngạc nhiên khi xét đến những thách thức mà môi trường ruột đặt ra cho vi sinh vật, làm giảm đáng kể sự đa dạng trong hốc sinh thái. Sự đa dạng thường tăng lên khi chế độ ăn của cá chuyển từ ăn thịt sang ăn tạp rồi sang ăn cỏ [83]. Thành phần vi sinh vật cũng khác nhau do các điều kiện môi trường khác nhau. *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Flavobacterium*, *Lactococcus*, và *Pseudomonas*, các vi khuẩn kỵ khí tuyệt đối như *Bacteroides*, *Clostridium*, và *Fusobacterium*, và các thành viên của họ Enterobacteriaceae chiếm ưu thế trong ruột của các loài cá nước ngọt [84]. Ruột của cá biển chủ yếu là *Aeromonas*, *Alcaligenes*, *Alteromonas*, *Carnobacterium*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Moraxella*, *Pseudomonas* và *Vibrio* [84]. Sự phong phú của các ngành vi khuẩn tương tự, bất kể vị trí phân loại hay vị trí địa lý của cá, cho thấy vai trò của hệ vi sinh vật trong các chức năng quan trọng của vật chủ như hấp thu dinh dưỡng, tiêu hóa và tạo ra phản ứng miễn dịch. Thêm vào đó, sự tương đồng về cấu trúc của hệ vi sinh vật đường ruột cá với động vật có vú cho thấy hệ vi sinh vật đường ruột cốt lõi của động vật có xương sống.

1.7.2. Hệ vi sinh vật đường ruột cá Tra

Hệ vi sinh vật đường ruột là một hệ sinh thái phức tạp bao gồm vi khuẩn, virus, nấm, và động vật nguyên sinh sống trong đường tiêu hóa của động vật, đóng vai trò quan trọng trong nhiều chức năng sinh lý. Gần đây, hệ vi sinh vật đường ruột của cá, đặc biệt là cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*), đã trở thành tâm điểm chú ý của các nhà khoa học nhờ vào tác động của nó đến sức khỏe, tăng trưởng, và hệ miễn dịch của cá.

Ở cá tra nước ngọt, các ngành vi khuẩn chiếm ưu thế bao gồm Bacteroidetes, Firmicutes, Proteobacteria và Verrucomicrobia [85, 86]. Proteobacteria phổ biến trong giai đoạn ấu trùng, trong khi Firmicutes và Bacteroides trở nên phong phú hơn khi cá trưởng thành. Cá tra bị bệnh biểu hiện sự gia tăng của Proteobacteria. Các chi như *Lactobacillus* chủ yếu được tìm thấy ở cá tra khỏe mạnh, trong khi *Aeromonas* phổ biến hơn ở những cá thể bị bệnh [86].

Hệ vi sinh vật đường ruột chủ yếu bao gồm các loài vi khuẩn Gram âm, với một số ít vi khuẩn Gram dương. Các loài vi khuẩn được xác định bao gồm *Bacillus*, *Macrococcus*, *Citrobacter*, *Aeromonas*, *Proteus*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Escherichia* và *Edwardsiella*, trong đó *Aeromonas* là chi phổ biến nhất. Kết quả thử nghiệm độ nhạy cảm với kháng sinh cho thấy tất cả các chủng đều nhạy cảm với gentamycin, mặc dù một số loài có biểu hiện kháng đa kháng sinh [87].

Nghiên cứu này nhấn mạnh vai trò quan trọng của hệ vi sinh vật đường ruột đối với sức khỏe của cá tra và nhấn mạnh tầm quan trọng của việc hiểu rõ thành phần và động lực của nó. Nghiên cứu sâu hơn về sự tương tác giữa hệ vi sinh vật và sinh lý của vật chủ có thể dẫn đến các chiến lược cải tiến để thúc đẩy sức khỏe của cá và quản lý dịch bệnh trong nuôi trồng thủy sản.

Chương 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU

2.1.1. Vật liệu nghiên cứu

Các mẫu cá tra được thu thập từ 6 ao nuôi cá tại 02 tỉnh Cần Thơ và Đồng Tháp (03 ao/tỉnh) trong tháng 03, năm 2024. Các mẫu cá thu thập đại diện cho 03 nhóm gồm: cá < 3 tháng tuổi, 4 – 5 tháng tuổi và > 6 tháng tuổi (ở giai đoạn thương phẩm). Khu vực thu mẫu sẽ được ghi lại tọa độ, thời gian, địa điểm thu mẫu, thức ăn sử dụng.

Bảng 2.1. Kí hiệu tên các mẫu ruột cá thu thập từ 2 tỉnh Cần Thơ và Đồng Tháp và dữ liệu về giai đoạn phát triển của cá

Khu vực	Tên mẫu	Giai đoạn phát triển
Cần Thơ	TC2-F15	< 3 tháng tuổi
	TC3-F16	4 – 5 tháng tuổi
	TC4-F17	> 6 tháng tuổi
Đồng Tháp	DT2-F18	< 3 tháng tuổi
	DT3-F19	4 – 5 tháng tuổi
	DT4-F20	> 6 tháng tuổi

2.1.2. Hóa chất, máy móc thí nghiệm

Hóa chất:

Cồn 96°

Bộ kit tách chiết DNA - DNeasy PowerSoil Pro (QIAGEN, Đức)

Agarose

Thiết bị:

Máy Benchtop UV Transilluminators (Analytik Jena, Đức)

Máy Nanodrop 2000 spectrophotometers (Thermo fisher, Mỹ).

Tủ lạnh sâu -80°C

Máy chủ hiệu năng cao khoa Khoa học Sự Sống – Đại học Khoa học & Công nghệ Hà Nội (USTH)

2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.2.1. Thu thập mẫu và tách chiết DNA tổng số

Mẫu ruột cá Tra được thu tại trại nuôi cá Tra ở 2 tỉnh Cần Thơ và Đồng Tháp trong tháng 3/2024. Tại mỗi tỉnh, lựa chọn 3 trại nuôi cá tra để thực hiện thu mẫu. Ở các trại nuôi cá, lấy ngẫu nhiên các con cá Tra và tiến hành giải phẫu thu ruột. Phần ruột sẽ được bảo quản trong cồn 96 °C và lưu trữ ở nhiệt độ -20°C trước khi có các bước xử lý tiếp theo.

Sử dụng lưỡi dao dùng một lần khứa thân của ruột và vortex để dịch trong ruột được đẩy ra ngoài dung dịch cồn 96°. Tiến hành loại bỏ ruột cá còn phần dịch ruột sẽ được ly tâm để lắng cặn, sau đó phần cặn này sẽ được cân tới 1 g để cho vào bộ kit tách chiết DNA - DNeasy PowerSoil Pro (QIAGEN, Đức), các bước tiến hành được tuân thủ theo hướng dẫn của nhà sản xuất ở phụ lục 2. DNA tổng số sau khi thu được sẽ được điện di trên thạch 1% agarose và chụp kết quả điện di bằng máy Benchtop UV Transilluminators (Analytik Jena, Đức). Song song với đó, mỗi mẫu DNA sẽ được kiểm tra chất lượng và đo nồng độ bằng máy Nanodrop 2000 spectrophotometers (Thermo fisher, Mỹ). Tất cả các mẫu DNA tinh khiết sẽ được bảo quản ở -80°C cho đến khi được phân tích.

2.2.2. Giải trình tự NGS và phân tích dữ liệu metagenomics

2.2.2.1. Giải trình tự NGS

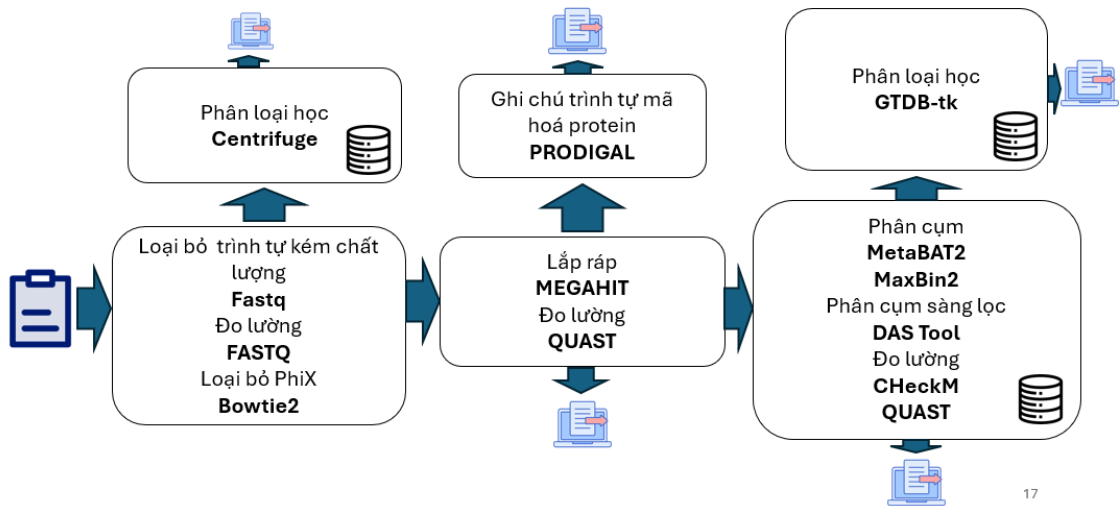
Mẫu DNA tổng số được đánh giá đảm bảo chất lượng sẽ gửi giải trình tự NGS metagenomics shotgun với 5G dữ liệu/1 mẫu. Trình tự thu nhận được sẽ được xử lý trên máy chủ của USTH.

2.2.2.2. Đánh giá, xử lý dữ liệu Metagenomics

Nhằm xử lý dữ liệu, lắp ráp trình tự, và phân loại dữ liệu metagenomics, nf-core/mag được sử dụng như luồng quy trình chính cho nghiên cứu này. Luồng hoạt động được xử lý bởi Nextflow v24.04.2 với câu lệnh như sau:

```
1. nextflow run nf-core/mag -profile docker --input
/home/ngghk/Document/5mau.csv --outdir
/home/ngghk/Document/metagenomicsThesis -resume
```

Việc đánh giá, lắp ráp, phân loại trình tự shotgun metagenomics được mô tả bằng sơ đồ ở Hình 2.1.



Hình 2.1. Quy trình đánh giá chất lượng, lắp ráp, phân loại trình tự shotgun metagenomics bằng nf-core/mag.

Công cụ FastQC đóng vai trò thiết yếu trong việc đánh giá chất lượng dữ liệu thô, cung cấp cái nhìn tổng quan về các chỉ số quan trọng như phân bố chất lượng theo base, sự hiện diện của adapter, tình trạng lặp lại trình tự, xác định các vấn đề tiềm ẩn trong dữ liệu, ví dụ như chất lượng đọc thấp ở cuối đoạn đọc hoặc sự nhiễm adapter. Sau khi đánh giá chất lượng ban đầu với FastQC, công cụ fastp cung cấp một giải pháp toàn diện để tiền xử lý dữ liệu một cách hiệu quả. Fastp cho phép chúng ta thực hiện nhiều tác vụ quan trọng như cắt bỏ adapter, loại bỏ các đoạn đọc có chất lượng thấp, và lọc bỏ các trình tự không mong muốn.

Ngoài ra, Bowtie2 là công cụ quan trọng trong việc loại bỏ các trình tự không mong muốn, chẳng hạn như trình tự PhiX, thường được sử dụng làm chất kiểm soát trong quá trình giải trình tự. Bằng cách map các đoạn đọc vào bộ gen tham chiếu của PhiX, Bowtie2 giúp xác định và loại bỏ các đoạn đọc có nguồn gốc từ PhiX, đảm bảo rằng dữ liệu metagenomics của chúng ta chỉ chứa các trình tự vi sinh vật thực sự [88-90].

Quy trình này sử dụng MEGAHIT để lắp ráp metagenome. MEGAHIT được thiết kế để lắp ráp các bộ dữ liệu metagenomic lớn và phức tạp với hiệu suất cao và sử dụng ít bộ nhớ. QUAST được sử dụng để đánh giá chất lượng của các trình tự được lắp ráp, cung cấp các số liệu như N50, L50 và số lượng contigs, là những yếu tố cần thiết để đánh giá tính hoàn chỉnh và độ chính xác của quá trình lắp ráp.

Phân cụm Metagenome sử dụng các công cụ như MetaBAT2, MaxBin2. Các công cụ này sử dụng các thuật toán và chiến lược khác nhau để phân cụm các trình

tự dựa trên các tính năng khác nhau như độ bao phủ, thành phần trình tự và tần số tetra-nucleotide. Sau đó, chất lượng của các nhóm bộ gen được xác minh bằng cách sử dụng CheckM [55], đánh giá mức độ hoàn chỉnh và nhiễm bản. Quy trình tinh chỉnh các phân cụm bằng DAS Tool.

2.2.3. Phân tích đa dạng quần thể vi khuẩn trong ruột cá tra

Phân loại đa dạng là một bước quan trọng trong phân tích metagenomic. Nf-core/mag sử dụng các công cụ như Centrifuge và Kraken2 cho dữ liệu tiền lắp ráp. Centrifuge được biết đến với tốc độ và độ chính xác trong việc phân loại trình tự so với cơ sở dữ liệu lớn, trong khi Kraken2 cung cấp độ nhạy và độ đặc hiệu nâng cao. Bằng cách gán phân loại cho các bài đọc, các nhà nghiên cứu có thể xác định sự đa dạng và thành phần của các cộng đồng vi sinh vật trong các mẫu.

Bước cuối cùng của quy trình nf-core/mag là phân loại đa dạng cho phân cụm Metagenomic. Điều này đạt được bằng cách sử dụng GTDB-Tk, cung cấp phân loại phân loại dựa trên cơ sở dữ liệu toàn diện và cập nhật. GTDB-Tk đặc biệt hữu ích để phân loại bộ gen vi khuẩn và vi khuẩn cổ. Dựa trên kết quả đánh giá chất lượng của checkM, các phân cụm metagenomics có độ hoàn thiện trên 50% được GTDB-Tk đóng trình tự và phân loại tối đa tới loài.

2.2.4. Xác định đa dạng gene KKS và gene độc lực

2.2.4.1. Đánh giá sự tương quan của gen KKS với các mẫu Metagenomics

Đối với dữ liệu shotgun metagenomics đã lắp ráp, các đoạn đọc sạch thu được đã được xử lý và các gen KKS (ARGs) đã được tìm kiếm bằng cách sử dụng ARGs-OAP v2.0 và PathoFact. Các trình tự ARG tiềm năng đã được so sánh với cơ sở dữ liệu gen kháng kháng sinh có cấu trúc (SARG) bằng cách sử dụng BLASTX với các giá trị cắt là 10^{-7} E-value, 80% nhận dạng trình tự và 25 axit amin trong độ dài sắp xếp. Sự phong phú của ARG đã được chuẩn hóa dựa trên số lượng tế bào, được hiển thị dưới dạng số lượng bản sao ARG trên mỗi tế bào (bản sao/tế bào).

2.2.4.2. Nhận dạng và định lượng các gen kháng kháng sinh, yếu tố độc lực, độc tố vi khuẩn và các yếu tố di truyền di động (MGEs) trên các hệ gene được lắp ráp từ metagenomics MAGs

Quy trình PathoFact (v1.0) đã được sử dụng để đồng thời dự đoán ARGs, VFs và độc tố vi khuẩn, cùng với vị trí của chúng trên mỗi MGEs. Tóm lại, DeepARG (v1.0.2) và RGI (v6.0.2) đã được sử dụng để dự đoán ARGs. Mỗi phage đã được xác định bằng cách sử dụng DeepVirFinder và VirSorter, trong khi

PlasFlow (v1.1) đã được sử dụng để dự đoán từng plasmid. Ngoài ra, VFs đã được dự đoán thông qua quy trình PathoFact bằng cách sử dụng kết hợp cơ sở dữ liệu HMM và mô hình rừng ngẫu nhiên. Các mầm bệnh kháng kháng sinh tiềm năng (ARPs) đã được xác định theo sự xuất hiện đồng thời của cùng một MAGs bởi ARGs và VFs.

2.2.5. Phân tích số liệu và thống kê

Các số liệu thống kê thu được phân tích và diễn giải bằng ngôn ngữ lập trình R. Đối với các bộ dữ liệu có phân phối chuẩn với phương sai đồng nhất, kiểm định t của Student hoặc phân tích phương sai một chiều (ANOVA) đã được thực hiện; nếu không, kiểm định Mann-Whitney không tham số đã được chọn.

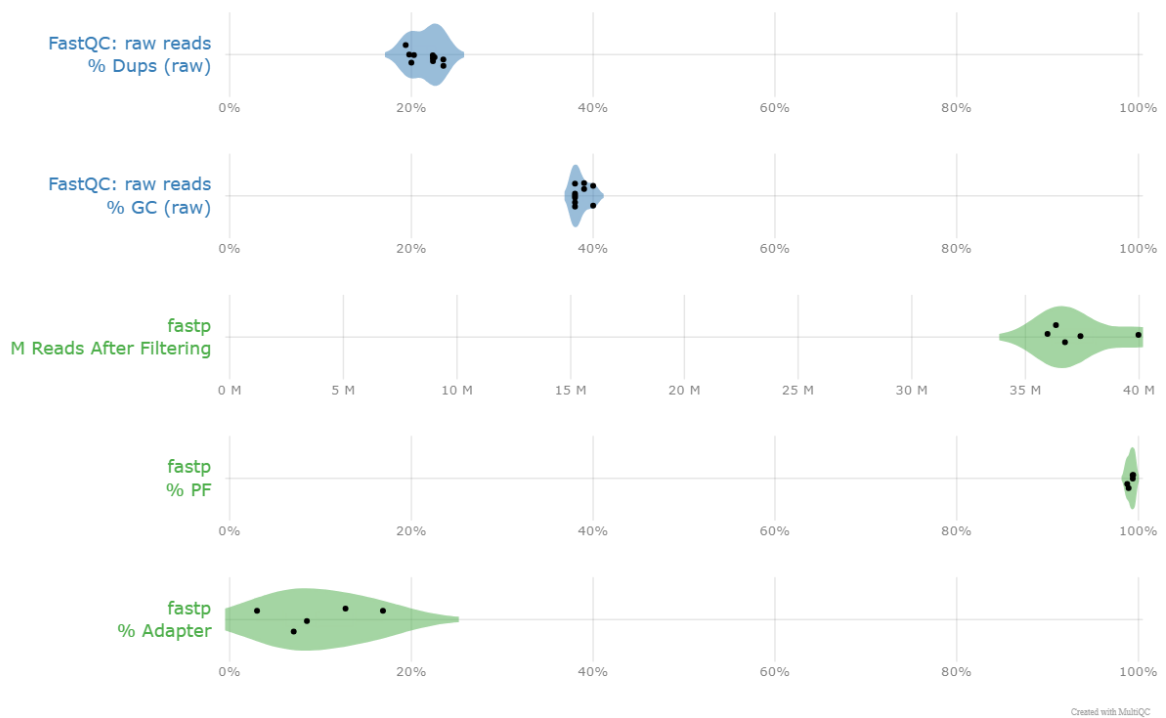
Chương 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. LẮP RÁP, PHÂN CỤM VÀ ĐÁNH GIÁ CHẤT LƯỢNG SHOTGUN METAGENOMICS

Sau khi đánh giá chất lượng DNA tổng số tách chiết từ 6 mẫu ruột cá, sàng lọc ra được 5 mẫu đủ tiêu chuẩn mang đi giải trình tự shotgun metagenomics 2 chiều bao gồm: TC3-F16, TC4-F17, DT2-F18, DT3-F19, DT4-F20. Dựa trên các kết quả đánh giá chất lượng trình tự shotgun metagenomics của 2 công cụ FastQC và fastp cho thấy được các trình tự ngắn của các dữ liệu có độ dài trung bình là 150 bp, tỉ lệ trùng lặp trong dữ liệu thô rơi vào khoảng 20%. Tỉ lệ nucleotide GC thô trung bình 40%, cho thấy tính ổn định và bảo toàn của các trình tự ở mức tốt. Sau khi sàng lọc và loại bỏ các trình tự không đạt chất lượng, thu được trung bình các mẫu thu được là 37 triệu trình tự ngắn độ dài 150bp. Tỉ lệ các adapter bị loại bỏ chỉ từ 3 – 16%. Điều này chứng tỏ trình tự shotgun metagenomic thô đạt chất lượng tương đối tốt, có thể sử dụng cho các phân tích sau này.

Bảng 3.1. Kết quả đo nồng độ và chất lượng 6 mẫu DNA ruột cá đo bằng máy Nanodrop 2000 spectrophotometers (Thermo Fisher, Mỹ)

Tên mẫu	Nồng độ (ng/ μ L)	OD 260/280
TC2-F15	21	1,31
TC3-F16	58,6	1,87
TC4-F17	45,7	1,71
DT2-F18	47,01	1,94
DT3-F19	65	1,93
DT4-F20	51,9	1,86



Hình 3.1. Biểu đồ đánh giá chất lượng shotgun metagenomics theo các phân tích độ trùng lặp trình tự, tỉ lệ nucleotide G-C, tổng trình tự ngắn sau khi sàng lọc loại bỏ adapter, tỉ lệ adapter bị loại bỏ.

Đối với kết quả đánh giá chất lượng sau lắp ráp của các mẫu được thể hiện ở bảng 3.1, DT3-F19 cho thấy kết quả lắp ráp tốt nhất trong tất cả các mẫu. Nó có N50 cao nhất (1,189 Kbp), cho thấy các contig dài hơn và ít phân mảnh hơn. Mặc dù L50 của nó không phải là thấp nhất, nhưng contig lớn nhất của nó lớn nhất (162,644 Kbp) và chiều dài cũng lớn nhất (90,589415 Mbp), cho thấy khả năng lắp ráp tốt hơn và bao phủ nhiều dữ liệu hơn. DT4-F20 cũng cho kết quả lắp ráp tốt với N50 cao (1,288 Kbp) và contig lớn nhất lớn thứ hai (98,938 Kbp). L50 của nó thấp nhất (7,106 K), cho thấy cần ít contig hơn để bao phủ phần lớn dữ liệu. TC3-F16 có kết quả lắp ráp ở mức trung bình. Mặc dù contig lớn nhất của nó lớn thứ ba (124,099 Kbp), nhưng N50 của nó thấp hơn so với hai mẫu trên. DT2-F18 và TC4-F17 cho thấy kết quả lắp ráp kém nhất. Chúng có N50 thấp nhất và L50 cao nhất.

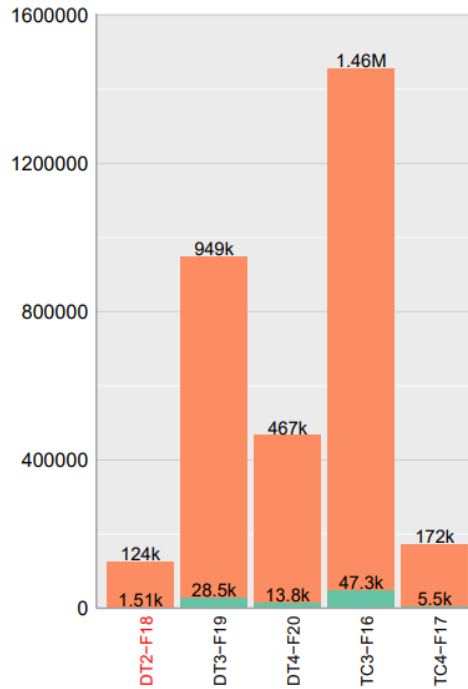
Bảng 3.2. Đánh giá chất lượng shotgun metagenomics đã lắp ráp theo các thông số N50, N75, L50, L75

Tên Mẫu	N50 (Kbp)	N75 (Kbp)	50 (K)	L75 (K)	Contig lớn nhất (Kbp)	Chiều dài (Mbp)
DT3-F19	1,2Kbp	0,7Kbp	14,5K	40,1K	162,6Kbp	90,6Mbp
DT4-F20	1,3Kbp	0,7Kbp	7,1K	19,1K	98,9Kbp	45,0Mbp
TC3-F16	1,1Kbp	0,6Kbp	7,2K	19,8K	124,1Kbp	39,9Mbp
TC4-F17	0,9Kbp	0,6Kbp	5,2K	10,8K	27,3Kbp	16,4Mbp
DT2-F18	0,8Kbp	0,6Kbp	4,0K	7,7K	35,8Kbp	10,0Mbp

Sau khi sử dụng checkM để đánh giá các phân cụm được hình thành từ 3 công cụ là Maxbin2, MetaBat2. Đánh giá về độ hoàn thiện của các phân cụm, lấy được 47 phân cụm để sử dụng cho phân loại bằng GTDB-Tk.

3.2. ĐA DẠNG HỆ VI SINH VẬT ĐƯỜNG RUỘT CÁ TRA

Từ các trình tự đọc trong shotgun metagenomics, lần lượt trong mẫu TC3-F16, TC4-F17, DT2-F18, DT3-F19, DT4-F20 nhận diện được các trình tự thuộc vi khuẩn là khoảng 1.46 triệu (20.4%), 172 nghìn (8.8%), 124 nghìn (11.9%), 949 nghìn (15.8%) và 467 nghìn (12.5%) được thể hiện tại hình 3.2. Việc có sự chênh lệch lớn giữa các trình tự đọc từ trình tự shotgun metagenomics với các trình tự đọc được xác định là do mẫu còn tồn tại các trình tự nhiễu đến từ DNA của vật chủ (cá tra) và DNA từ người làm thí nghiệm.

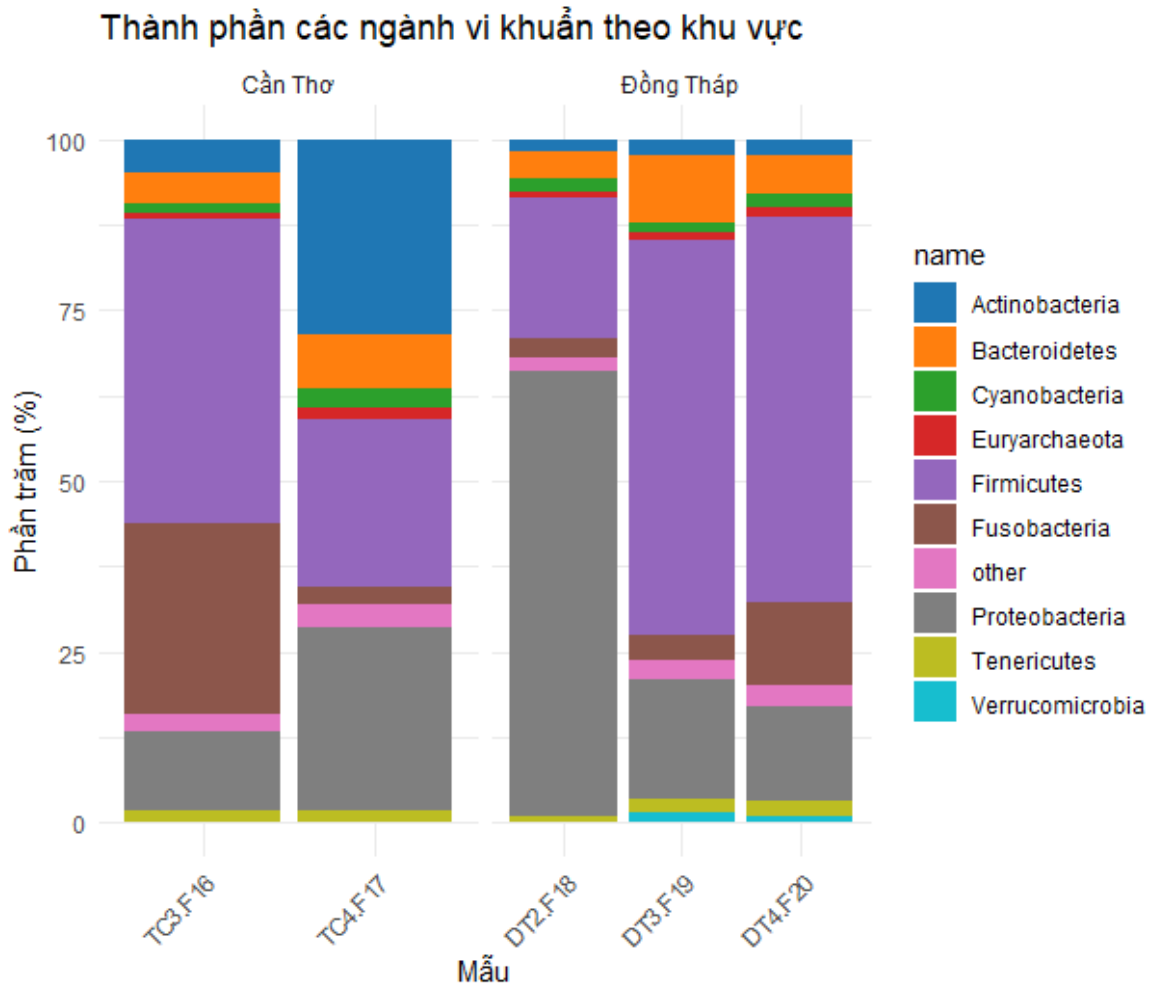


Hình 3.2. Số trình tự đọc thô được nhận diện là thuộc vi khuẩn trong các mẫu, cột màu ngọc lam hiển thị trung bình số lượt trình tự đọc của các phân loại phía dưới vi khuẩn; thanh màu cam hiển thị số lượt trình tự đọc được xác định là thuộc vi khuẩn

Thành phần các ngành vi khuẩn trong 5 mẫu từ Cần Thơ và Đồng Tháp cho thấy sự khác biệt rõ rệt về sự đa dạng và tỷ lệ của các ngành. Ở mẫu TC3-F16 từ Cần Thơ, Firmicutes chiếm tỷ lệ cao nhất (44.38%). Proteobacteria (11.51%) và Actinobacteria (5.02%) cũng có mặt, cho thấy sự đa dạng chức năng sinh học trong môi trường. Ngành Fusobacteria (24.13%) xuất hiện với tỷ lệ cao, cho thấy môi trường có thể thiếu oxy và có quá trình phân hủy kỵ khí. Trong mẫu TC4-F17, Actinobacteria chiếm ưu thế lớn (28.67%), điều này có thể liên quan đến vai trò của vi khuẩn phân hủy chất hữu cơ trong môi trường. Một vài vi khuẩn thuộc ngành Proteobacteria (26.87%) và Firmicutes (24.71%) cũng góp phần lớn vào hệ vi sinh, trong khi Fusobacteria có mặt với tỷ lệ nhỏ hơn (9.11%).

Ở Đồng Tháp, mẫu DT2-F18 có tỷ lệ Proteobacteria cao nhất (65.19%), phản ánh môi trường giàu dinh dưỡng hoặc có sự hiện diện của vi khuẩn cố định đạm hoặc phân giải chất hữu cơ. Firmicutes chiếm 20.63%, trong khi Fusobacteria xuất hiện với 6.34%, cho thấy môi trường này có thể chứa các điều kiện kỵ khí. Mẫu DT3-F19 lại có Firmicutes chiếm ưu thế lớn (57.73%), cho thấy vai trò của vi khuẩn lên men trong môi trường này, với Proteobacteria (17.43%) và Fusobacteria (7.35%) đóng góp thêm vào sự đa dạng của vi khuẩn. Mẫu DT4-F20 có sự phân bố tương tự với Firmicutes (56.30%) và Proteobacteria (13.91%), nhưng có tỷ lệ

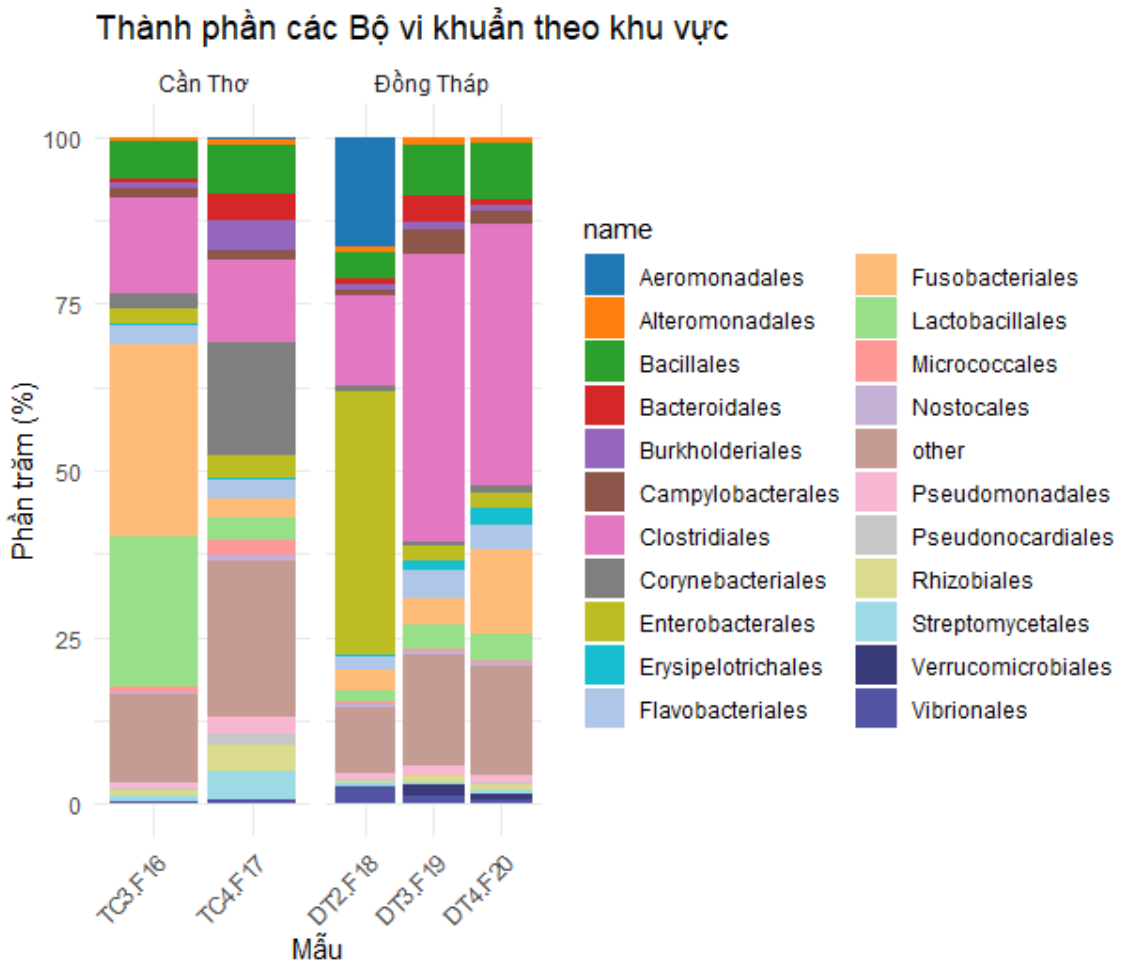
Fusobacteria cao hơn (11.15%), cho thấy môi trường này có thể đặc trưng bởi các điều kiện kỵ khí và sự phân giải hữu cơ.



Hình 3.3. Biểu đồ cấu trúc thành phần các ngành vi sinh vật có trong các mẫu ruột cá, các phân loại có tỉ lệ >1% được hiển thị

Dữ liệu về thành phần các bộ vi khuẩn trong 5 mẫu từ Cần Thơ và Đồng Tháp cho thấy sự đa dạng và phân bố khác biệt giữa các mẫu. Trong mẫu DT2-F18 từ Đồng Tháp, Enterobacterales chiếm tỷ lệ lớn nhất (39.50%), phản ánh sự ưu thế của vi khuẩn Gram âm, thường có vai trò phân giải chất hữu cơ và đôi khi liên quan đến các vi khuẩn gây bệnh. Aeromonadales cũng chiếm tỷ lệ đáng kể (16.38%), cho thấy môi trường có khả năng giàu chất hữu cơ và liên quan đến nước. Các bộ khác như Vibrionales (2.80%) và Pseudomonadales (0.94%) có mặt nhưng chiếm tỷ lệ thấp hơn. Ở mẫu DT3-F19 và DT4-F20, Enterobacterales chiếm tỷ lệ nhỏ hơn nhiều (2.23% và 2.36%), trong khi Vibrionales và Pseudomonadales vẫn hiện diện nhưng không chiếm ưu thế, cho thấy môi trường ít bị chi phối bởi một nhóm vi khuẩn cụ thể. Trong các mẫu từ Cần Thơ, Enterobacterales có tỷ lệ thấp trong mẫu TC3-F16 (2.32%) nhưng cao hơn ở mẫu TC4-F17 (3.45%), trong khi Pseudomonadales cũng

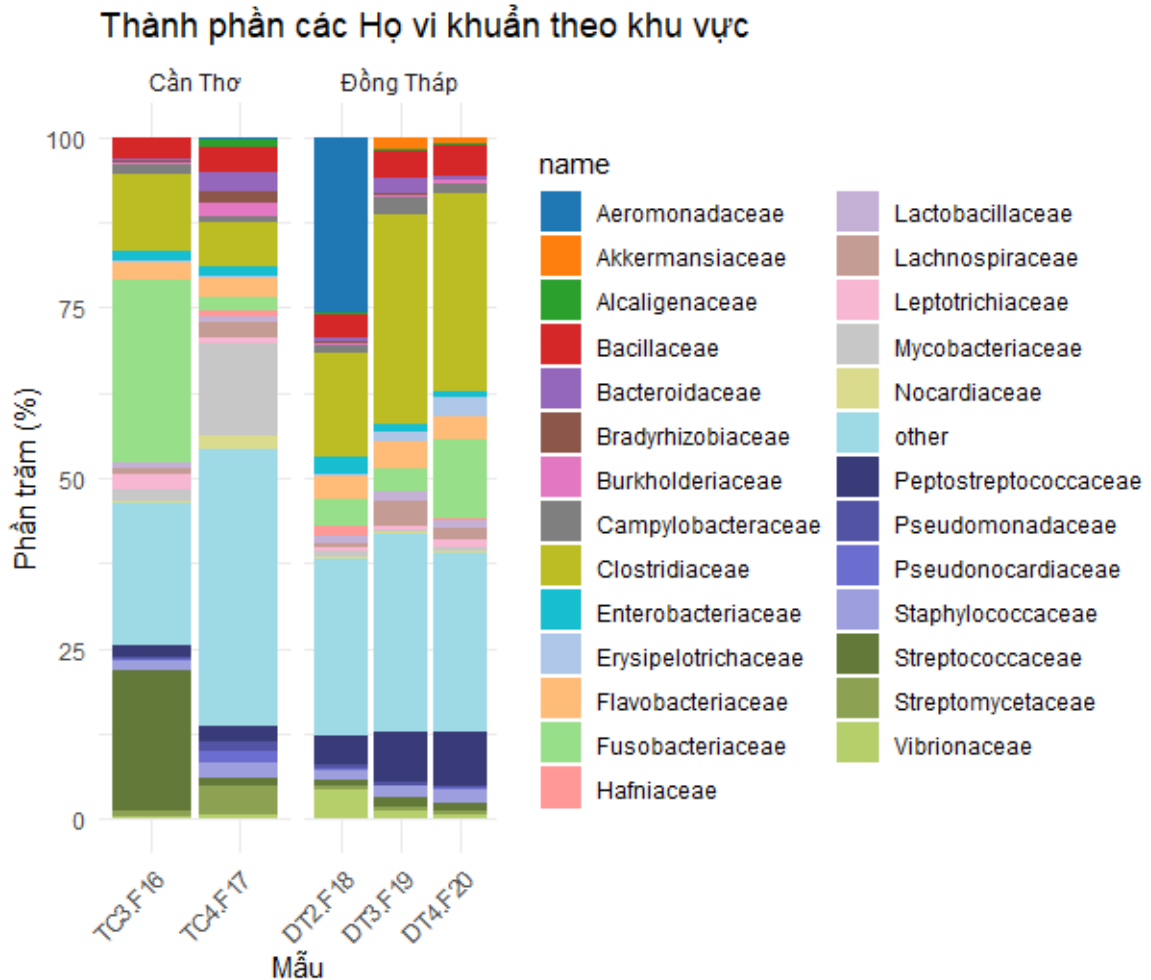
xuất hiện với tỷ lệ đáng kể ở cả hai mẫu (0.87% và 2.43%). Các bộ như Aeromonadales và Vibrionales có tỷ lệ nhỏ ở cả hai mẫu, nhưng vẫn phản ánh tính đa dạng của hệ vi khuẩn trong các môi trường nước và liên quan đến quá trình phân giải hữu cơ. Nhìn chung, sự khác biệt giữa các mẫu từ Cần Thơ và Đồng Tháp cho thấy các điều kiện môi trường khác nhau đã ảnh hưởng đến sự phân bố của các bộ vi khuẩn, với Đồng Tháp có sự ưu thế của Enterobacterales trong mẫu DT2-F18, còn Cần Thơ có sự hiện diện mạnh mẽ hơn của Pseudomonadales và Enterobacterales trong các mẫu TC4-F17 và TC3-F16.



Hình 3.4. Biểu đồ cấu trúc thành phần các bộ vi sinh vật có trong các mẫu ruột cá, các phân loại có tỉ lệ >1% được hiển thị

Dữ liệu về thành phần các họ vi khuẩn trong 5 mẫu từ Cần Thơ và Đồng Tháp cho thấy sự đa dạng đáng kể, với mỗi khu vực thể hiện các đặc trưng vi sinh khác nhau. Trong mẫu DT2-F18, Aeromonadaceae chiếm tỷ lệ cao nhất (25.74%), liên quan đến các vi khuẩn gây bệnh như *Aeromonas*, thường có trong môi trường nước và gây bệnh cho cá và người. Enterobacteriaceae (2.69%) cũng xuất hiện với tỷ lệ đáng kể, liên quan đến các vi khuẩn gây bệnh như *Escherichia coli*, nhưng cũng có chi vi khuẩn hỗ trợ tiêu hóa. Vibrionaceae (4.40%) là một Họ chứa nhiều vi

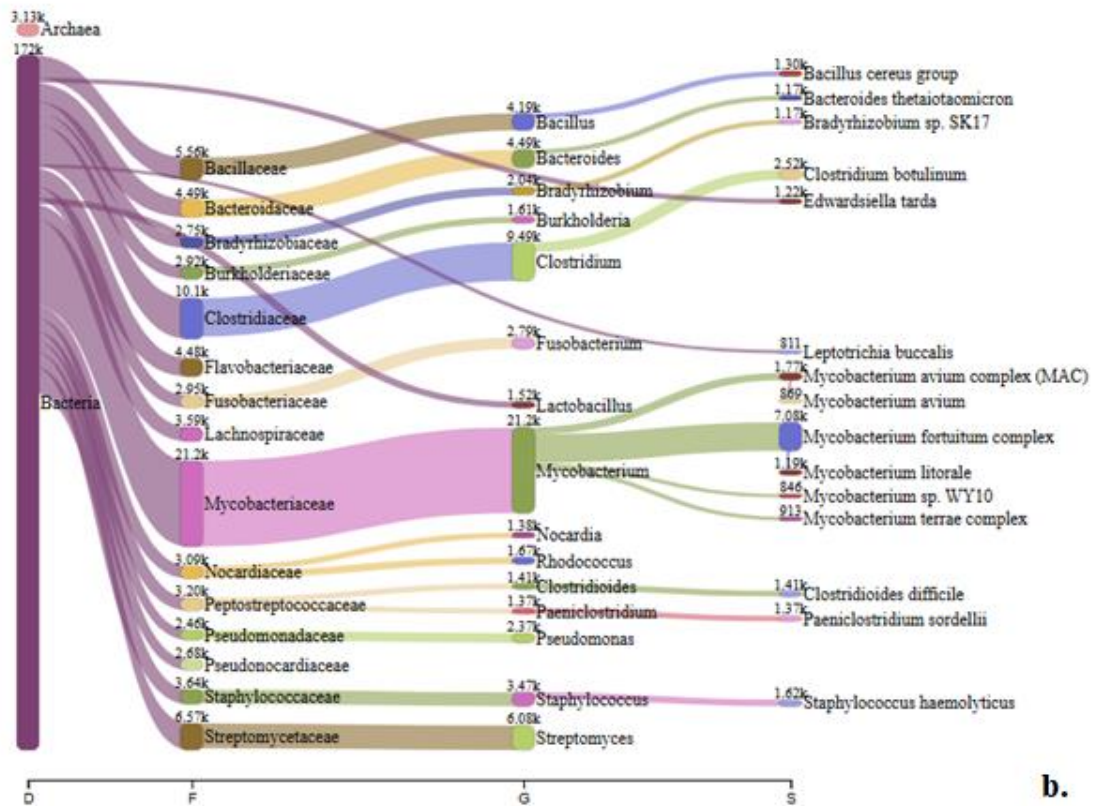
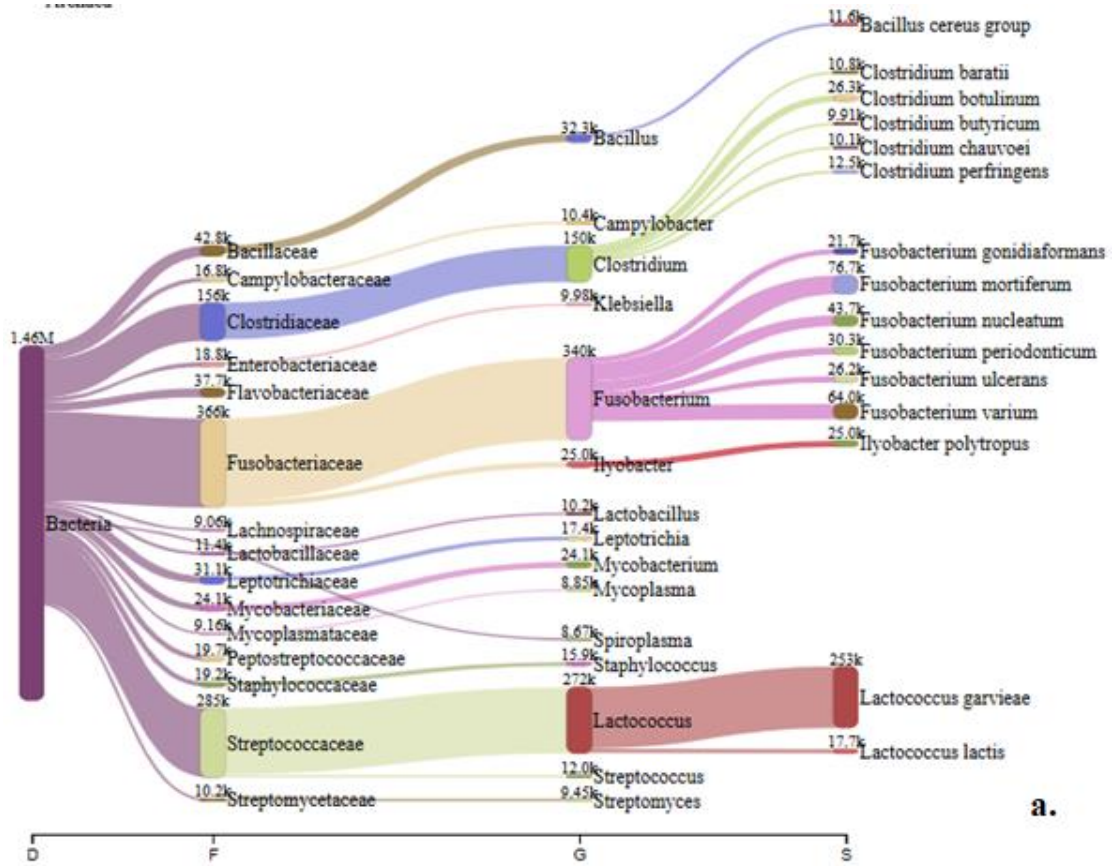
khủng gây bệnh như *Vibrio*. Trong mẫu DT3-F19 và DT4-F20, tỷ lệ của Enterobacteriaceae và Vibrionaceae giảm xuống, trong khi Pseudomonadaceae cũng hiện diện nhưng với tỷ lệ nhỏ hơn, cho thấy sự đa dạng về vi khuẩn gây bệnh. Ở Cần Thơ, mẫu TC3-F16 và TC4-F17 có sự hiện diện của Enterobacteriaceae với tỷ lệ từ 1.27% đến 1.37%, phản ánh khả năng có chi vi khuẩn probiotics, mặc dù tỷ lệ này không cao. Pseudomonadaceae xuất hiện với tỷ lệ cao hơn trong mẫu TC4-F17, liên quan đến vi khuẩn phân giải chất hữu cơ.



Hình 3.5. Biểu đồ cấu trúc thành phần các họ vi sinh vật có trong các mẫu ruột cá, các phân loại có tỉ lệ >1% được hiển thị

Hình 3.6 thể hiện mức độ đa dạng chi và loài của các mẫu thuộc khu vực Cần Thơ. Đối với mẫu TC3-F16 (Hình 3.6a) cho thấy sự đa dạng rõ rệt của các chi vi khuẩn trong mẫu ruột cá. Các chi chiếm tỉ lệ bao gồm *Fusobacterium*, *Lactococcus*, và *Clostridium*. Đây là những chi vi khuẩn quan trọng có thể đóng vai trò khác nhau trong hệ sinh thái vi sinh vật đường ruột. Trong đó, *Lactococcus* là chi vi khuẩn quan trọng với các đại diện khả năng probiotic, giúp cân bằng hệ vi sinh vật và bảo vệ đường ruột của cá. *Lactococcus lactis* được biết đến với vai trò trong các quy

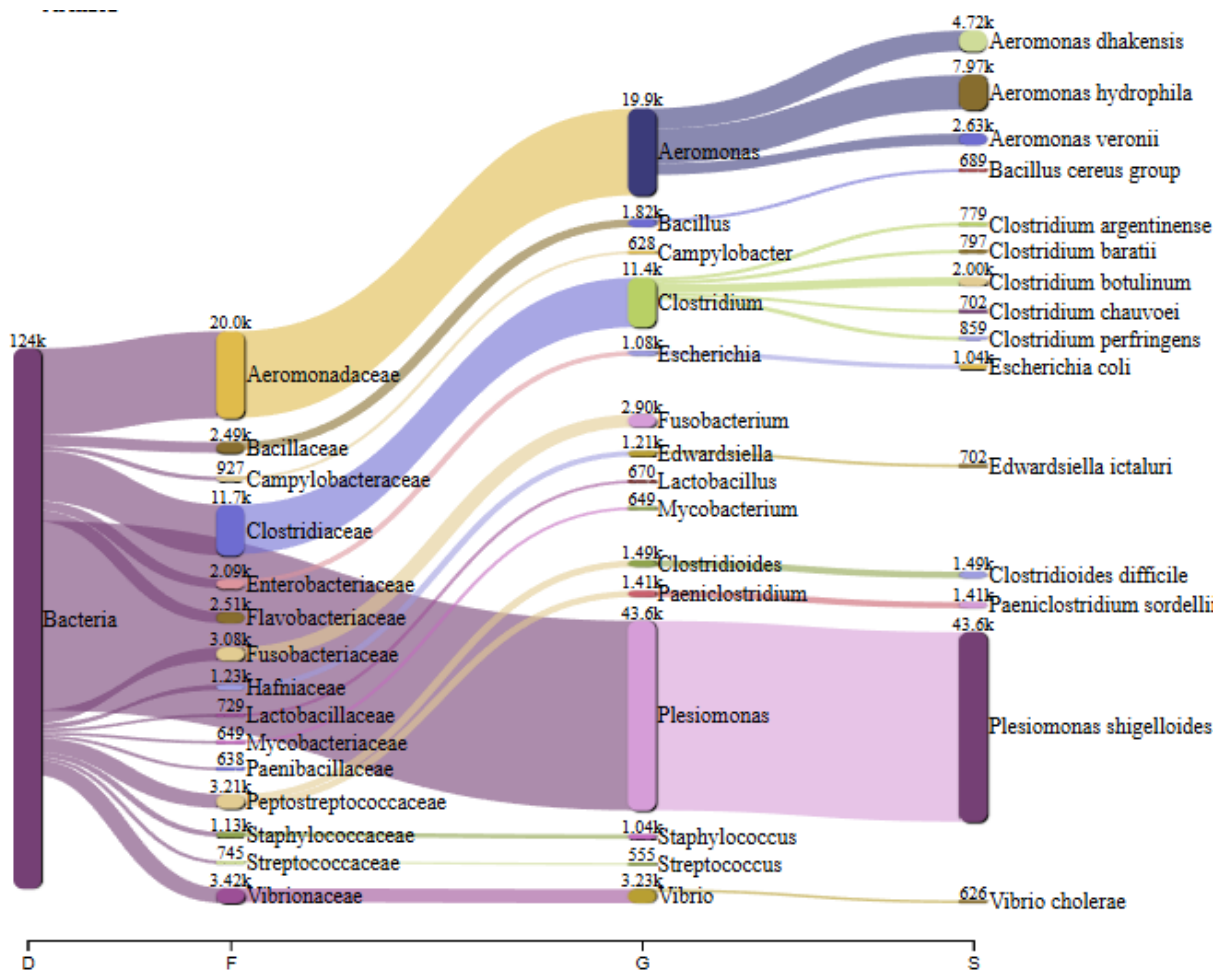
trình lên men, đồng thời có lợi cho sức khỏe đường ruột cá khi cạnh tranh và ức chế sự phát triển của các vi khuẩn gây bệnh. Ngoài ra, *Fusobacterium* chiếm một tỷ lệ lớn trong hệ vi sinh vật. Chi này có liên quan đến các bệnh lý đường tiêu hóa, bao gồm các nhiễm trùng miệng và ruột. *Fusobacterium nucleatum* và các loài liên quan thường được tìm thấy trong các môi trường kỵ khí và có thể đóng góp vào các tình trạng bệnh lý nghiêm trọng. *Clostridium* là chi vi khuẩn nổi bật trong các quá trình gây bệnh đường ruột, với nhiều loài như *Clostridium perfringens* và *Clostridium botulinum* có khả năng gây bệnh nghiêm trọng. Việc xuất hiện *Clostridium* trong ruột cá có thể là dấu hiệu cần theo dõi kỹ về sức khỏe của cá. Đối với mẫu TC3-F17, Trong Hình 3.6a, sự xuất hiện của các chi như *Mycobacterium*, *Staphylococcus*, và *Clostridium* tiếp tục khẳng định tính đa dạng cao của vi sinh vật trong mẫu ruột cá. Sự xuất hiện của *Lactobacillus*, mặc dù với tỷ lệ nhỏ hơn so với *Lactococcus*, nhưng vẫn là một chi quan trọng trong lợi khuẩn. *Lactobacillus* thường được sử dụng trong việc cải thiện chức năng tiêu hóa và duy trì cân bằng hệ vi sinh vật, giúp bảo vệ đường ruột cá khỏi các vi khuẩn gây hại. Với các chi vi khuẩn gây bệnh, *Mycobacterium* là một chi quan trọng liên quan đến các bệnh truyền nhiễm, trong đó bao gồm các loài có khả năng gây bệnh nghiêm trọng ở cá như *Mycobacterium avium* và *Mycobacterium fortuitum complex*. Việc xuất hiện các loài này có thể liên quan đến các bệnh lý mãn tính ở cá. *Staphylococcus* cũng là một chi vi khuẩn đáng lưu ý với khả năng gây bệnh, đặc biệt là các loài như *Staphylococcus aureus* có thể dẫn đến nhiễm trùng da và mô mềm ở cá. Điều này chỉ ra sự cần thiết phải giám sát kỹ lưỡng về sức khỏe của hệ vi sinh vật đường ruột của cá. *Clostridium* tiếp tục xuất hiện trong mẫu TC4-F17 với một tỷ lệ đáng kể, củng cố thêm mối lo ngại về các bệnh lý liên quan đến vi khuẩn này. Qua đó ta thấy được, các khu vực trại cá tại Cần Thơ đều thể hiện sự đa dạng cao của các chi vi khuẩn trong ruột cá, từ những chi probiotic có lợi như *Lactococcus* và *Lactobacillus* đến những chi vi khuẩn gây bệnh nghiêm trọng như *Fusobacterium*, *Clostridium*, và *Mycobacterium*. Đối với đa dạng lợi khuẩn, các chi vi khuẩn probiotic như *Lactococcus* và *Lactobacillus* có sự hiện diện đáng kể, thể hiện vai trò tích cực trong việc duy trì sức khỏe của đường ruột cá. Đặc biệt, *Lactococcus* chiếm tỷ lệ rất cao trong biểu đồ a, khẳng định tầm quan trọng của vi khuẩn này đối với môi trường ruột cá từ khu vực Cần Thơ. Các chi vi khuẩn gây bệnh như *Fusobacterium*, *Clostridium*, và *Mycobacterium* có mặt trong cả hai biểu đồ, với tỷ lệ khá cao. Điều này có thể là dấu hiệu cảnh báo về tình trạng sức khỏe của cá, đặc biệt là khi những chi này liên quan đến các bệnh đường tiêu hóa và truyền nhiễm nghiêm trọng



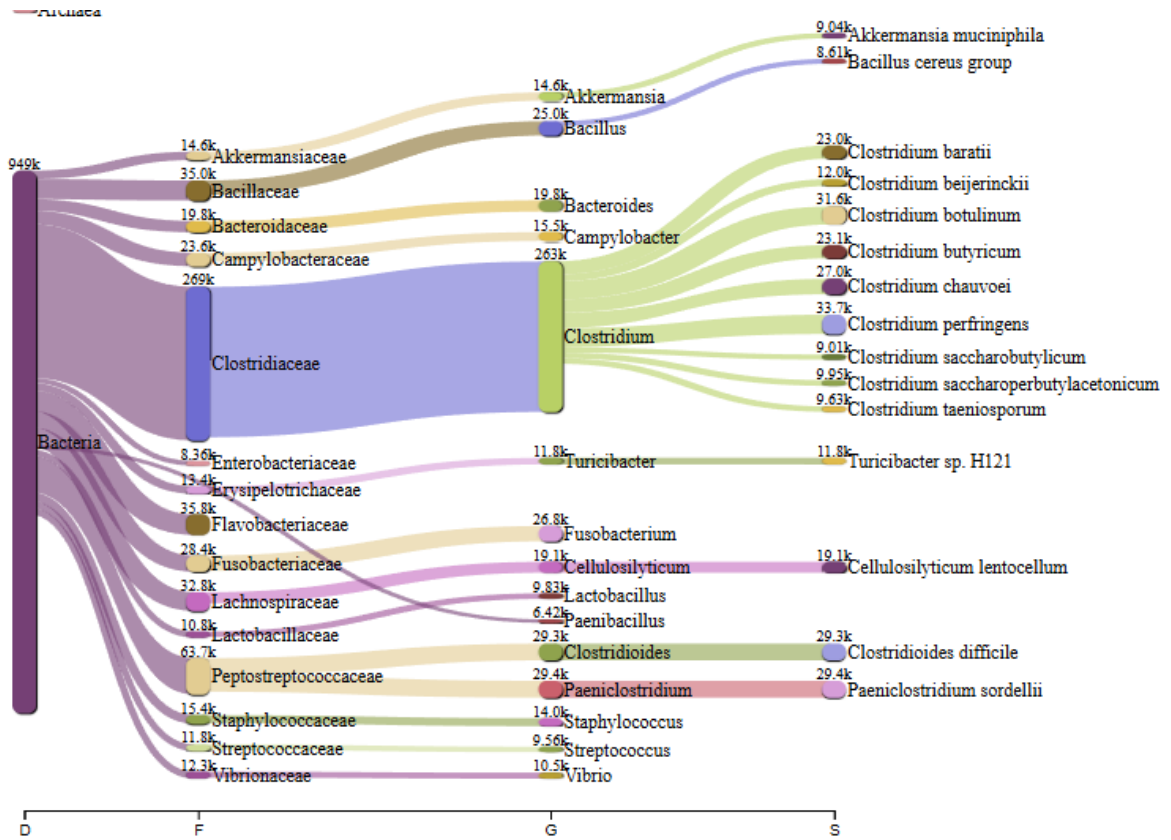
Hình 3.6. Cấu trúc thành phần của các chi, loài của các mẫu thuộc khu vực Cần Thơ (a. Biểu đồ Sankey thành phần chi loài của mẫu TC3-F16, b. Biểu đồ Sankey thành phần chi loài của mẫu TC4-F17)

Đối với phân tích thành phần chi loài vi sinh vật ở khu vực Đồng Tháp bao gồm 3 mẫu DT2-F18, DT3-F19, DT4-F20, Hình 3.7, 3.8, 3.9 đã thể hiện mức độ đa dạng cao ở cả 3 mẫu. Đối với mẫu DT2-F17 (Hình 3.7) cho thấy sự đa dạng cao của các chi vi khuẩn trong mẫu ruột cá. Các chi nổi bật bao gồm *Aeromonas*, *Plesiomonas*, *Clostridium*, và *Fusobacterium*. *Aeromonas* là chi chiếm ưu thế nhất trong biểu đồ này. Đây là một chi vi khuẩn có thể tồn tại ở môi trường nước ngọt và thường được tìm thấy trong đường ruột cá Tra và cũng bao gồm nhiều loài gây bệnh, như *Aeromonas hydrophila*, có khả năng gây bệnh truyền nhiễm nghiêm trọng ở cá. *Plesiomonas shigelloides* là một chi vi khuẩn khác nổi bật, được biết đến với khả năng gây bệnh đường tiêu hóa ở cá và người. *Lactobacillus* là một chi vi khuẩn thuộc nhóm probiotic, tuy có tỷ lệ nhỏ nhưng đáng chú ý. *Lactobacillus* có khả năng hỗ trợ cân bằng hệ vi sinh vật đường ruột và cải thiện sức khỏe tiêu hóa. Ngoài *Aeromonas*, *Clostridium* xuất hiện trong biểu đồ với các loài như *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens*, và *Clostridium chauvoei*, đều là những loài vi khuẩn gây bệnh nghiêm trọng. *Escherichia coli* cũng xuất hiện, một nhóm vi khuẩn tương đối phổ biến có trong đường ruột, tuy nhiên cũng không ngoài khả năng có thể là chúng có khả năng gây bệnh ở đường tiêu hóa. Đối với đa dạng vi sinh vật mẫu DT3-F19 (Hình 3.8), Tổng quan có sự xuất hiện nổi bật của chi *Clostridium* và *Akkermansia*. *Clostridium* chiếm tỷ lệ lớn và có nhiều loài liên quan đến khả năng gây bệnh. *Akkermansia* là chi vi khuẩn có mặt khá đáng chú ý. Loài *Akkermansia muciniphila* được biết đến với khả năng phân hủy chất nhầy trong ruột và hỗ trợ duy trì sức khỏe đường ruột. *Lactobacillus* tiếp tục xuất hiện nhưng với tỷ lệ rất nhỏ với tư cách là chi có nhiều loài lợi khuẩn. Bên cạnh đó, *Clostridium* xuất hiện với nhiều loài như *Clostridium botulinum*, *Clostridium chauvoei*, *Clostridium perfringens*, và *Clostridium difficile* và *Fusobacterium* xuất hiện là một chi vi khuẩn gây bệnh, đặc biệt liên quan đến các bệnh lý viêm nhiễm đường tiêu hóa. Cuối cùng là Hình 3.7c thể hiện mức độ đa dạng vi sinh vật ở mẫu DT4-F20. Về cơ bản, mẫu có sự xuất hiện của các chi như *Clostridium*, *Fusobacterium*, và *Akkermansia*. *Clostridium* tiếp tục chiếm ưu thế trong hệ vi sinh vật của mẫu này. *Akkermansia* và *Fusobacterium* là hai chi đáng chú ý với khả năng tác động đến hệ vi sinh vật đường ruột. *Lactobacillus* tiếp tục có mặt trong mẫu với tỷ lệ tương đối nhỏ nhưng vẫn đóng vai trò quan trọng trong việc hỗ trợ hệ tiêu hóa và bảo vệ đường ruột cá. *Clostridium* tiếp tục chiếm tỷ lệ lớn với nhiều loài gây bệnh như *Clostridium botulinum*, *Clostridium chauvoei*, *Clostridium difficile*, và *Clostridium perfringens*. *Fusobacterium* cũng có mặt với tỷ lệ đáng kể, thể hiện sự liên quan đến các bệnh lý tiêu hóa. Cả ba biểu đồ Sankey về thành phần chi loài của các mẫu ruột cá thu thập

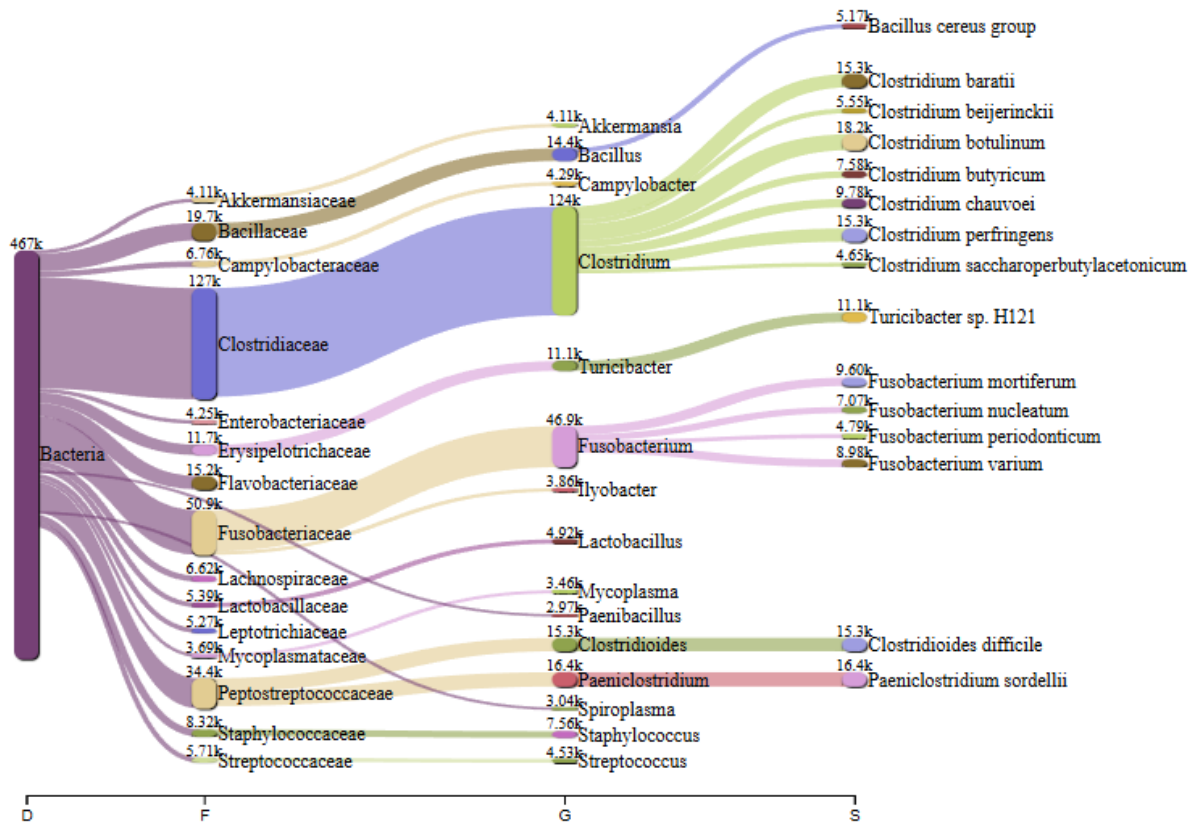
từ Đồng Tháp cho thấy sự đa dạng cao của hệ vi sinh vật đường ruột, với sự xuất hiện nổi bật của các chi như *Clostridium*, *Fusobacterium*, *Aeromonas*, và *Akkermansia*. Trong đó, *Clostridium* và *Fusobacterium* là những chi vi khuẩn gây bệnh quan trọng, có liên quan đến các bệnh lý tiêu hóa nghiêm trọng ở cá, trong khi *Aeromonas* cũng là một tác nhân gây bệnh phổ biến trong môi trường nước ngọt. Mặc dù vi khuẩn gây bệnh chiếm ưu thế, các chi probiotic như *Lactobacillus* và *Akkermansia* cũng xuất hiện trong cả ba biểu đồ. *Lactobacillus* có vai trò quan trọng trong việc cân bằng hệ vi sinh vật và bảo vệ đường ruột cá, còn *Akkermansia muciniphila* hỗ trợ duy trì sức khỏe đường ruột qua việc phân hủy chất nhầy và điều hòa hệ miễn dịch.



Hình 3.7. Cấu trúc thành phần của các chi, loài của các mẫu thuộc khu vực Đồng Tháp DT2-F18



Hình 3.8. Cấu trúc thành phần của các chi, loài của các mẫu thuộc khu vực Đồng Tháp DT3-F19



Hình 3.9. Cấu trúc thành phần của các chi, loài của các mẫu thuộc khu vực Đồng Tháp DT4-F20

Mặc dù cả hai khu vực Cần Thơ và Đồng Tháp đều có sự xuất hiện của các chi vi khuẩn gây bệnh như *Fusobacterium* và *Clostridium*, sự khác biệt chính nằm ở thành phần chiếm ưu thế của các chi vi khuẩn probiotic và gây bệnh đặc trưng cho từng vùng. Cần Thơ có sự hiện diện mạnh mẽ hơn của các chi như *Lactococcus* và *Mycobacterium*, trong khi Đồng Tháp nổi bật với *Aeromonas*, *Plesiomonas*, và *Akkermansia*. Điều này cho thấy hệ vi sinh vật ở mỗi khu vực có sự khác biệt về sự cân bằng giữa vi khuẩn có lợi và có hại, có thể phản ánh các yếu tố môi trường và điều kiện sống khác nhau của cá tại hai khu vực này.

Trong nghiên cứu của Pereira và các cộng sự (2022), thông tin nhấn mạnh vai trò của các vi khuẩn probiotic như *Lactococcus lactis* và *Enterococcus faecium*, có khả năng sản sinh ra các chất kháng khuẩn như bacteriocin và có tác dụng ức chế các mầm bệnh nghiêm trọng trong thủy sản, ví dụ như *Listeria monocytogenes*, *Salmonella Typhimurium* và *Staphylococcus aureus* [91]. Những vi khuẩn này không chỉ giúp cân bằng hệ vi sinh mà còn có khả năng bảo vệ vật chủ khỏi các tác nhân gây bệnh thông qua sản xuất các chất kháng khuẩn tự nhiên. Trong khi đó, Ở cả hai khu vực, các chi vi khuẩn probiotic cũng được ghi nhận, đặc biệt là *Lactococcus* và *Lactobacillus*. Tại Cần Thơ, *Lactococcus* chiếm ưu thế với vai trò hỗ trợ tiêu hóa, trong khi tại Đồng Tháp, *Akkermansia* cũng được phát hiện là chi probiotic quan trọng trong việc duy trì sức khỏe ruột. So với nghiên cứu, sự hiện diện của *Lactococcus* và *Lactobacillus* ở cả hai khu vực khớp với những tác nhân probiotic có khả năng bảo vệ hệ vi sinh vật đường ruột cá. Hơn nữa, công bố cũng chỉ ra các chi vi khuẩn gây bệnh phổ biến trong thủy sản như *Streptococcus*, *Staphylococcus*, và *Salmonella*. Các loài này thường gây ra các bệnh nghiêm trọng trong môi trường nuôi cá, đặc biệt là bệnh listeriosis và ngộ độc thực phẩm. Probiotic được khuyến nghị như một biện pháp để kiểm soát mầm bệnh mà không cần dùng đến kháng sinh, nhằm hạn chế kháng kháng sinh. Trong nghiên cứu này, các chi gây bệnh như *Fusobacterium*, *Clostridium*, và *Staphylococcus* đều xuất hiện đáng kể. *Aeromonas* và *Plesiomonas* cũng nổi bật tại Đồng Tháp với khả năng gây bệnh đường ruột. Sự xuất hiện của các vi khuẩn này phản ánh đúng như những gì nghiên cứu nêu ra, đặc biệt là khả năng gây nhiễm trùng ở cá, từ đó nhấn mạnh vai trò của probiotic trong việc ức chế sự phát triển của những mầm bệnh này. Đối với nghiên cứu khác về hệ vi sinh vật đường ruột cá Tra trước đây,

Dựa trên nghiên cứu của Bharathi (2024) và kết quả phân tích mẫu ruột cá tra từ Cần Thơ và Đồng Tháp, có sự tương đồng rõ rệt về thành phần vi khuẩn chiếm ưu thế và vai trò của các vi khuẩn probiotic và gây bệnh. Trong nghiên cứu, các chi như *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Fusobacteria*, và *Bacteroidetes* chiếm ưu

thể, đặc biệt là *Proteobacteria* trong mẫu cá bị bệnh và *Firmicutes* trong cá khỏe mạnh [92]. Kết quả từ Cần Thơ và Đồng Tháp cũng cho thấy sự chiếm ưu thế của *Fusobacterium*, *Clostridium*, *Aeromonas*, và *Lactococcus*, với *Fusobacterium* và *Clostridium* có liên quan đến các tình trạng bệnh lý. Về mặt probiotic, nghiên cứu xác nhận rằng *Lactobacillus* và *Actinomycetales* có vai trò quan trọng trong việc duy trì sức khỏe đường ruột, tương tự với kết quả từ Cần Thơ và Đồng Tháp, nơi *Lactococcus* và *Lactobacillus* là những chi vi khuẩn probiotic nổi bật, và *Akkermansia* cũng được ghi nhận tại Đồng Tháp. Ngược lại, *Aeromonas* được xác định là tác nhân gây bệnh chính trong nghiên cứu, tương tự với sự xuất hiện của *Aeromonas* trong các mẫu ruột cá bị nhiễm bệnh từ Đồng Tháp. Sự tương đồng giữa hai khu vực và nghiên cứu này cho thấy tầm quan trọng của sự cân bằng giữa các chi vi khuẩn có lợi và gây bệnh trong việc duy trì sức khỏe của cá tra.

3.3. XÁC ĐỊNH ĐA DẠNG GENE KKS VÀ GEN ĐỘNG LỰC

3.3.1. Dự đoán gene KKS có trong mẫu cá

Sử dụng công cụ PathoFact và ARGs-OAP v2.0 tìm ra được tổng cộng 19 danh mục KKS, trong đó TC3-F16 có 123 genes, TC4-F17 có 65 genes, DT2-F18 có 45 genes, DT3-F19 có 180 genes, DT4-F20 có 111 genes có liên tới tính kháng thuốc. Kết quả này được diễn giải trong phụ lục.

Hình 3.10 có thấy được sự đa dạng về thành phần gene KKS trong 5 mẫu ruột cá. Nhóm gene *tet* có mặt nhiều nhất trong tất cả các mẫu, cho thấy khả năng tồn tại và lan truyền mạnh mẽ của gene này ở cả hai khu vực. *tet* là gene liên quan đến khả năng kháng kháng sinh tetracycline, một loại kháng sinh phổ biến trong nông nghiệp và thủy sản, đặc biệt trong việc phòng ngừa và điều trị các bệnh viêm nhiễm ở cá. Việc *tet* xuất hiện với tần suất cao ở tất cả các mẫu gợi ý rằng tetracycline có thể đã được sử dụng rộng rãi trong các vùng này, hoặc vi khuẩn kháng tetracycline đã lan rộng trong môi trường thủy sản.

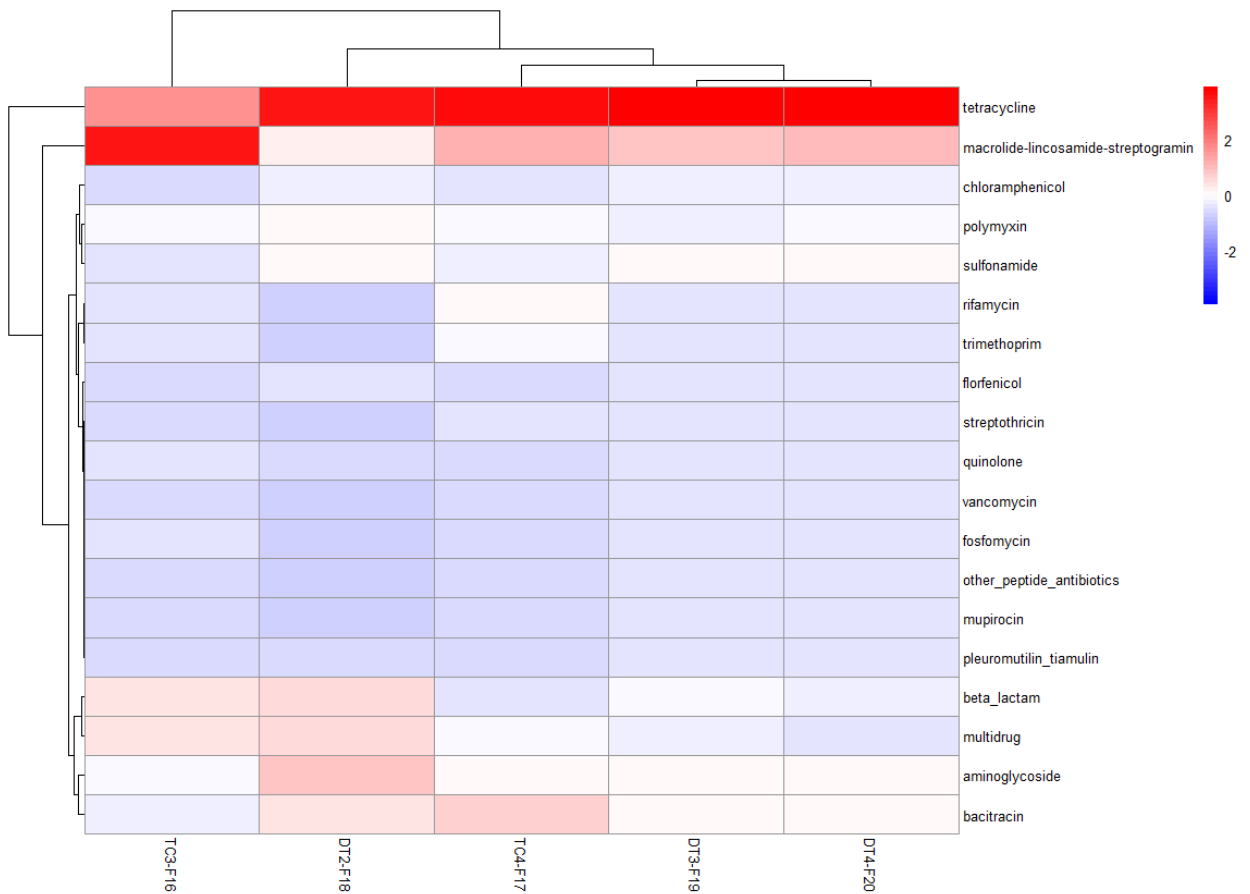
Nhóm gene *van* (liên quan đến kháng vancomycin) cũng xuất hiện với tần suất cao ở nhiều mẫu, đặc biệt trong các mẫu từ Đồng Tháp (DT3-F19, DT4-F20) và Cần Thơ (TC4-F17). Vancomycin thường được sử dụng trong các trường hợp kháng thuốc mạnh, và sự hiện diện của *van* có thể là dấu hiệu của áp lực kháng sinh mạnh mẽ trong các hệ vi sinh vật này.

Gene *ARLR* (liên quan đến kháng aminoglycoside) xuất hiện nhiều trong mẫu DT3-F19 và DT-F20, cho thấy có khả năng một số loài vi khuẩn kháng aminoglycoside chiếm ưu thế ở những mẫu này.

Gene *aac(2')* (liên quan đến kháng aminoglycoside) xuất hiện nhiều trong mẫu TC3-F16 từ Cần Thơ, nhưng lại ít thấy ở các mẫu khác. Điều này có thể phản ánh một đặc điểm cụ thể của hệ vi sinh trong mẫu này, hoặc sự ảnh hưởng của môi trường địa phương đến sự tồn tại của các gene kháng aminoglycoside.

Ở các mẫu từ Đồng Tháp, gene *erm* (kháng macrolide) xuất hiện nhiều trong mẫu DT2-F18, trong khi gene *ARLR* xuất hiện nổi bật ở DT3-F19 và DT4-F20. Điều này cho thấy sự đa dạng về cơ chế kháng kháng sinh trong các mẫu từ Đồng Tháp, với sự hiện diện của các gene kháng nhiều loại kháng sinh khác nhau như macrolide, aminoglycoside, và vancomycin. Các mẫu từ Cần Thơ cho thấy sự hiện diện của gene *oxa* (kháng beta-lactam) khá phổ biến, đặc biệt trong mẫu TC3-F16 và TC4-F17. Điều này có thể liên quan đến việc sử dụng các loại beta-lactam hoặc vi khuẩn kháng beta-lactam có khả năng phát triển trong môi trường nuôi cá ở Cần Thơ.

các mẫu đều cho thấy mức độ biểu hiện cao của gen kháng tetracycline, cho thấy sự phổ biến của khả năng kháng loại kháng sinh này trong các mẫu này. Một số mẫu, đặc biệt là DT4-F20 và DT2-F18, có tần xuất xuất hiện cao của gen kháng đa kháng sinh, cho thấy các mẫu này có tiềm năng chứa các vi khuẩn có khả năng kháng được nhiều loại kháng sinh khác nhau. Mặc dù có một số điểm tương đồng, nhưng cũng có sự khác biệt đáng kể về hồ sơ kháng kháng sinh giữa các mẫu. Ví dụ, TC3-F16 cho thấy mức độ xuất hiện thấp của hầu hết các gen kháng kháng sinh, trong khi DT4-F20 biểu hiện tần xuất cao của nhiều gen kháng kháng sinh khác nhau. Biểu đồ cũng cho thấy sự hiện diện của các nhóm gen kháng kháng sinh khác nhau với mức độ biểu hiện khác nhau giữa các mẫu, bao gồm các gen kháng macrolide-lincosamide-streptogramin, β -lactam và aminoglycoside. Khi đối chiếu với kết quả khảo sát gene KKS của A. Tyagi và cộng sự năm 2019, cho thấy các mẫu ruột cá tra có xu hướng phát hiện nhiều gene kháng tetracycline, trong khi đó mẫu từ cá Labeo rohita chỉ chiếm tỉ lệ chiếm tỷ lệ 0.84%, thay vào đó họ tìm thấy TEM beta-lactamase chiếm tỷ lệ cao nhất (90.5%) trong tổng số các gene kháng kháng sinh [93].



Hình 3.11. Biểu đồ nhiệt cho sự tương quan giữa các nhóm kháng kháng sinh với các mẫu (số liệu được chuẩn hóa \log_{10} (bản sao/tế bào))

TC3-F16 xuất hiện nhiều nhất gene SHV-84 cho thấy khả năng kháng penicillin ở mức độ cao (trừ piperacillin) và sự kết hợp giữa amoxicillin và axit clavulanic, tiếp theo đó là *aac(2')-IIA* mã hóa enzyme acetyltransferase, giúp vi khuẩn kháng lại kháng sinh kasugamycin là một chất kháng sinh thường được dùng trong nông nghiệp và *tetB(P)* thường thấy ở các vi khuẩn có đặc điểm kháng tetracycline.

Đối với mẫu TC4-F17, dự đoán thấy nhiều nhất là gene mã hóa cho protein *tetB*, tiếp đó là *aac(6')-Ib7* gene mã hóa enzyme aminoglycoside acetyltransferase phổ biến nhất, gây kháng các loại kháng sinh như tobramycin, streptomycin và kanamycin. Bên cạnh đó sự xuất hiện của gene *CTX-M-152* là một biến thể gene mới trong họ β -lactamase mở rộng, gây ra đa kháng kháng sinh nghiêm trọng, chẳng hạn như cephalosporins and penicillins.

Đối với mẫu DT2-F18 dường như chứa một số lượng đáng kể các gen kháng erythromycin, với *MPH(A)* và *MPH(F)* là những gen phổ biến nhất (cả hai đều có số lượng dự đoán là 2). Điều này cho thấy mẫu có khả năng kháng lại erythromycin. Ngoài ra còn có nhiều gen kháng kháng sinh khác được dự đoán với số lượng thấp hơn (số lượng dự đoán là 1). Các gen này mang lại khả năng kháng lại nhiều loại kháng sinh, bao gồm tetracycline, aminoglycoside, beta-lactam và các loại khác.

Trong mẫu DT3-F19, có sự xuất hiện nhiều của gene *rmtG* có khả năng kháng lại hầu hết các aminoglycoside có số lượng dự đoán nhiều nhất. Ngoài ra còn có các gene *Aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia* là nguyên nhân chính gây ra tình trạng kháng gentamicin mức độ cao, gene *rpoB2* có khả năng kháng rifampin là một loại thuốc kháng sinh sử dụng cho bệnh lao.

Trong mẫu DT4-F20, có rất nhiều sự xuất hiện của các gen kháng tetracycline như *tet32*, *tetA* và *tetB*. Ngoài ra, các biến thể khác nhau của gen kháng aminoglycoside *aac(2')* cũng được quan sát. Những phát hiện này cho thấy sự hiện diện đáng kể của các cơ chế kháng kháng sinh trong mẫu, cho thấy sự cần thiết phải điều tra thêm về các mô hình kháng thuốc và ý nghĩa tiềm năng đối với các chiến lược điều trị. Sự hiện diện của nhiều gen kháng thuốc làm nổi bật sự phức tạp của cộng đồng vi sinh vật và những thách thức trong việc chống lại tình trạng kháng kháng sinh.

3.3.2. Dự đoán gene độc lực từ 5 mẫu

Kết quả cho ra của công cụ PathoFact để dự đoán các gene độc lực, tìm thấy nhiều nhất gene có yếu tố gây độc ở mẫu DT3-F19 (2312 genes), tiếp theo đó là DT4-F20 (927 genes), TC2-F16 (516 genes), TC3-F17 (170 genes) và DT2-F18(182 genes). Hình 3.12 cho thấy gene AcrB/AcrD/AcrF xuất hiện với tần suất cao ở tất cả các mẫu, đặc biệt là mẫu DT3-F19 với 361 lần. Đây là nhóm gene liên quan đến bơm đẩy đa kháng, giúp vi khuẩn kháng lại nhiều loại kháng sinh khác nhau. Tần suất cao có thể chỉ ra rằng các mẫu này có vi khuẩn với khả năng kháng kháng sinh mạnh mẽ. Miền Cupin xuất hiện ở mức độ cao thứ hai, đặc biệt là trong mẫu DT3-F19 (83 lần) và DT4-F20 (41 lần). Cupin là một miền đa chức năng có thể liên quan đến quá trình kháng kháng sinh thông qua các cơ chế khác nhau. Mẫu DT3-F19 có tần suất dự đoán cao nhất cho nhiều nhóm gene, đặc biệt là AcrB/AcrD/AcrF và Cupin. Điều này có thể gợi ý rằng mẫu này chứa vi khuẩn có khả năng kháng kháng sinh mạnh và gây độc đa dạng hơn so với các mẫu khác.

Ngoài các nhóm chức năng liên quan đến kháng kháng sinh, tìm thấy một số nhóm chức năng khác có khả năng gây độc hoặc liên quan đến cơ chế gây hại, chẳng hạn như: Pretoxin HINT là một thành viên của siêu họ protease HINT, thường được tìm thấy ở đầu N-terminal của module độc tố trong các hệ thống độc tố đa hình. Miền này được dự đoán có chức năng giải phóng miền độc tố thông qua quá trình tự phân giải, RelB antitoxin, RTX toxin (RtxA), Anthrax edema toxin adenylate cyclase, hemolysin III. Và hyaluronidase liên quan đến cơ chế phá hủy các tế bào của vật chủ ở các mẫu đến từ khu vực Đồng Tháp. Khu vực Cần Thơ cũng có sự đa dạng về gene độc lực cao nhưng tỉ lệ xuất hiện của từng loại không nhiều.

Kết quả này nhấn mạnh sự cần thiết của việc theo dõi và kiểm soát các yếu tố nguy cơ liên quan đến vi khuẩn kháng kháng sinh và các gene gây độc trong môi trường nuôi trồng thủy sản, nhằm đảm bảo an toàn sinh học và sức khỏe cộng đồng.



Hình 3.12. Biểu đồ thống kê tần suất dự đoán các gene gây độc theo từng nhóm chức năng của 5 mẫu ruột cá.

3.4. TƯƠNG QUAN GIỮA PHÂN LOẠI VI KHUẨN VÀ GENE KHÁNG KHÁNG SINH TRONG RUỘT CÁ

Từ 47 phân cụm để sử dụng cho phân loại. GTDB-Tk xác định được 25 phân cụm có thể phân loại được tối thiểu tới Bộ. Sau đó kết quả của cây phát sinh chủng loại và tương quan giữa phân loại vi khuẩn với dự đoán gene kháng kháng sinh được thể hiện ở hình 3.13. Trong 5 mẫu ruột cá, qua kiểm tra, đánh giá và phân cụm, từ đó xác định được 2 loài và định danh được tối đa đến loài của 3 mẫu CT-F16, DT-F19 và DT-F20.

Dựa trên kết quả từ biểu đồ nhiệt và cây phát sinh chủng loài ở hình 3.13, Khi so sánh với dữ liệu về đa dạng KKS và phân loại vi khuẩn đã được đề cập ở các mục trên, cho thấy rằng sự phân bố về gene KKS lẫn đa dạng vi khuẩn ở các mẫu có sự tương đồng. Những chi thuộc các nhóm ưu thế ở các mẫu đề đã được phân loại qua các phân cụm. Từ đó có thể kiểm chứng được độ chính xác của các phân tích và sử dụng công cụ phân tích là tương đối đáng tin cậy.

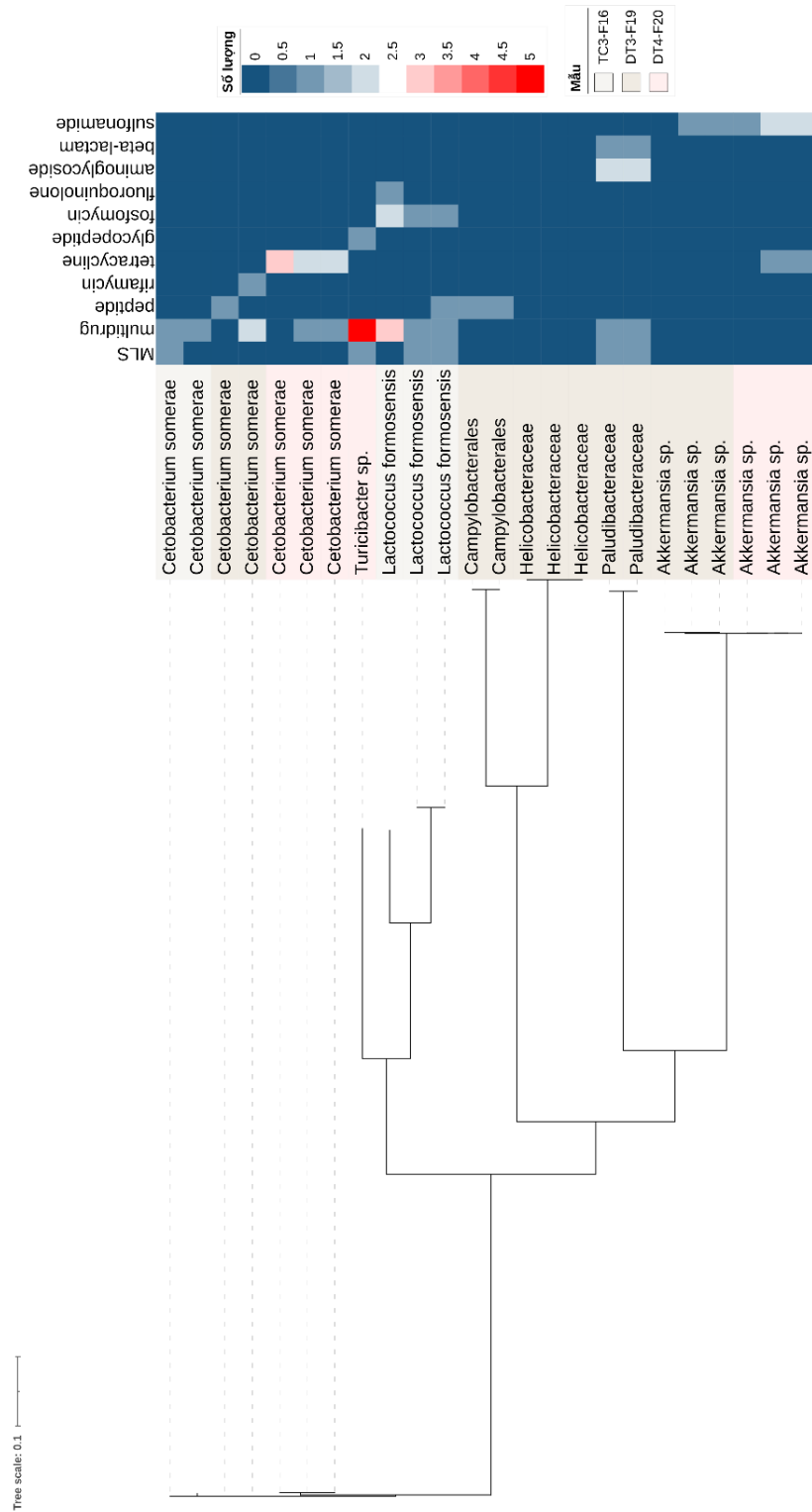
Chúng ta có thể thấy sự hiện diện và vắng mặt của gene kháng kháng sinh trong các nhóm vi khuẩn như *Cebobacterium*, *Turbicoccus*, và *Akkermansia* phản ánh khả năng thích nghi và đối phó với môi trường khác nhau. Trong khi *Cebobacterium* thể hiện sự hiện diện của nhiều gene kháng kháng sinh, điều này có thể chỉ ra rằng nhóm vi khuẩn này đã tiếp xúc với môi trường có áp lực kháng sinh cao, khiến chúng phát triển khả năng kháng thuốc để tồn tại. Đặc biệt, *Turbicoccus*, trong một số mẫu như DT3-F19, cũng cho thấy sự xuất hiện của gene kháng kháng sinh, gợi ý rằng vi khuẩn này có thể đã phát triển hoặc duy trì các đặc điểm kháng kháng sinh do tiếp xúc liên tục với kháng sinh trong môi trường.

Ngược lại, *Akkermansia* không cho thấy sự hiện diện đáng kể của các gene kháng kháng sinh, điều này có thể ám chỉ rằng vi khuẩn này ít bị tác động bởi kháng sinh hoặc tồn tại trong một môi trường mà áp lực chọn lọc không đủ lớn để thúc đẩy sự phát triển của các gene kháng thuốc. Sự khác biệt rõ rệt giữa *Cebobacterium* và *Akkermansia* phản ánh các chiến lược sinh tồn khác nhau dưới tác động của môi trường. Kết quả này cho thấy sự đa dạng trong khả năng kháng kháng sinh của các nhóm vi khuẩn khác nhau, điều này rất quan trọng trong việc hiểu rõ hơn về sự lan truyền và phát triển của gene kháng kháng sinh trong các hệ vi sinh vật.

Khi xem xét sự phân bố về vi khuẩn và gene kháng kháng sinh theo địa lý, đối với khu vực Cần Thơ, hai chi lợi khuẩn được xác định là *Cetobacterium* và *Lactococcus*, nhưng cả hai đều có sự hiện diện của các gene đa kháng, đặc biệt là

kháng sinh thuộc nhóm Macrolide, Lincosamide và Streptogramin. Trong khi đó, các mẫu từ khu vực Đồng Tháp cho thấy sự đa dạng hơn với sự xuất hiện của các chi *Turicibacter* và *Akkermansia*. Tuy nhiên, những chi này cũng được phát hiện có nhiều loại gene kháng khác nhau.

Điều này đặt ra giả thuyết rằng việc sử dụng kháng sinh trong nuôi trồng thủy sản có thể tạo ra áp lực, khiến các dòng lợi khuẩn phát triển khả năng kháng với nhiều loại kháng sinh. Hơn nữa, những gene kháng này có thể lây nhiễm cho cộng đồng vi khuẩn trong ruột cá thông qua cơ chế di truyền di động.



Hình 3.13. Cây phát sinh chủng loài và biểu đồ nhiệt dự đoán số lượng gene thuộc danh mục kháng kháng sinh của từng phân cụm được xác định tối thiểu đến phân loại bộ

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

KẾT LUẬN

Nghiên cứu này đã ứng dụng công nghệ giải trình tự metagenomics để phân tích đa dạng hệ vi sinh vật đường ruột, gene kháng kháng sinh và gene độc lực trong hệ vi sinh vật đường ruột của cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*) tại khu vực Đồng bằng sông Cửu Long. Các kết quả chính đạt được từ nghiên cứu bao gồm:

Nhiều gene kháng kháng sinh đã được phát hiện trong hệ vi sinh vật đường ruột của cá tra, trong đó có nhiều gene được phát hiện trong môi trường nuôi trồng thủy hải sản. Trong đó có sự tồn tại các loại gene kháng kháng sinh trong một số chi có tiềm năng là vi lợi khuẩn trong cả 2 khu vực Đồng Tháp và Cần Thơ.

Phát hiện sự đa dạng gene độc lực trong đường ruột cá, phù hợp với sự đa dạng của vi khuẩn gây bệnh trong đường ruột cá. Cho thấy nguy cơ tiềm ẩn cho việc lây truyền những gene này tới các vi khuẩn thông thường qua các yếu tố di truyền di động.

KIẾN NGHỊ

Từ những kết quả nghiên cứu đã đạt được, tôi xin đưa ra một số kiến nghị nhằm nâng cao hiệu quả quản lý và sử dụng kháng sinh trong nuôi trồng cá tra, cũng như thúc đẩy các nghiên cứu trong tương lai:

Với lượng dữ liệu thu được là rất lớn và còn nhiều phân tích còn chưa khai thác hết, đề tài vẫn sẽ tiếp tục triển khai các hạng mục khác trong tương lai. Điều này bao gồm việc phát triển và hoàn thiện các cơ sở dữ liệu cùng với các công cụ tin sinh học mới. Mục tiêu là xác định và phân tích mối tương quan giữa sự phân loại vi sinh vật và các gene độc lực. Việc này không chỉ giúp hiểu rõ hơn về sự tương tác giữa các vi sinh vật mà còn cung cấp cái nhìn sâu sắc về cách thức mà các gene độc lực có thể ảnh hưởng đến môi trường sinh thái của chúng. Các công cụ tin sinh hiện đại sẽ hỗ trợ trong việc xử lý và phân tích khối lượng dữ liệu lớn, từ đó đưa ra những kết luận chính xác và hữu ích cho nghiên cứu khoa học.

Nghiên cứu về các yếu tố di truyền di động của các gene KKS và gene độc lực đang là một lĩnh vực đang nhận được nhiều sự quan tâm. Việc phân tích sâu hơn về các yếu tố này sẽ giúp làm rõ cách thức mà chúng di chuyển và lan truyền trong quần xã vi sinh vật, đặc biệt là trong hệ sinh thái trong ruột cá Tra. Qua đó, chúng ta có thể đánh giá được mức độ ảnh hưởng của các gene này đến sức khỏe và sự cân bằng sinh thái của quần xã vi sinh vật. Từ những dữ liệu thu thập được, các nhà

nghiên cứu có thể xây dựng một cái nhìn tổng quan và toàn diện hơn về mối quan hệ phức tạp giữa các gene và vi sinh vật.

Trước tình trạng sử dụng kháng sinh trong nuôi trồng thủy sản ngày càng gia tăng, việc nghiên cứu và phát triển các biện pháp sinh học thay thế là cần thiết. Các chế phẩm sinh học (probiotics) đang được xem xét như những giải pháp tiềm năng nhằm tăng cường sức khỏe và hệ miễn dịch của cá Tra. Những biện pháp này không chỉ giúp cải thiện khả năng chống chịu bệnh tật của cá mà còn góp phần giảm thiểu việc sử dụng kháng sinh, từ đó giảm thiểu nguy cơ kháng kháng sinh. Ngoài ra, việc áp dụng các biện pháp sinh học còn hướng tới một nền nông nghiệp bền vững và thân thiện với môi trường, đảm bảo an toàn cho người tiêu dùng và bảo vệ hệ sinh thái tự nhiên.

DANH MỤC TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Van Boeckel T.P., Gandra S., Ashok A., Caudron Q., Grenfell B.T., Levin S.A., Laxminarayan R., 2014, Global antibiotic consumption 2000 to 2010: an analysis of national pharmaceutical sales data, *The Lancet infectious diseases*, 14(8): pp. 742-750.
2. Centers D.C.P., 2019, *Antibiotic resistance threats in the United States, 2019*, US Department of Health and Human Services, Centres for Disease Control and Prevention.
3. Organization W.H., 2021, Antimicrobial Resistance.
4. WHO, 2014, Antimicrobial resistance.
5. O'Neill J., 2016, Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations.
6. Kraker M.E.D, Stewardson A.J., Harbarth S., 2016, Will 10 million people die a year due to antimicrobial resistance by 2050?, *PLoS Medicine*, 13(11): pp. e1002184.
7. Laxminarayan R., Duse A., Wattal C., Zaidi A.K., Wertheim H.F., Sumpradit N., Vlieghe E., Hara G.L., Gould I.M., Goossens H., 2013, Antibiotic resistance—the need for global solutions, *The Lancet Infectious Diseases*, 13(12): pp. 1057-1098.
8. Guan Y., Xue X., Jia J., Li X., Xing H., Wang Z., 2022, Metagenomic assembly and binning analyses the prevalence and spread of antibiotic resistome in water and fish gut microbiomes along an environmental gradient, *Journal of Environmental Management*, 318: pp. 115521.
9. Smart G., 2013, Know when antibiotics work, *US Centers for Disease Control and Prevention*.
10. Tanwar J., Das S., Fatima Z., Hameed S., 2014, Multidrug resistance: an emerging crisis, *Interdisciplinary Perspectives On Infectious Diseases*, 2014(1): pp. 541340.
11. Saha M., Sarkar A., 2021, Review on multiple facets of drug resistance: a rising challenge in the 21st century, *Journal Of Xenobiotics*, 11(4): pp. 197-214.
12. MacGowan A., Macnaughton E., 2017, Antibiotic resistance, *Medicine*, 45(10): pp. 622-628.
13. Irving W., Boswell T., Ala'Aldeen D.A., Szewczyk E., Balcerczak E., Różalski A., 2012, *Mikrobiologia medyczna*, Wydawnictwo Naukowe PWN.

14. Acar J., Rostel B., 2001, Antimicrobial resistance: an overview, *Revue Scientifique et Technique-Office International des Epizooties*, 20(3): pp. 797-810.
15. Giedraitienė A., Vitkauskienė A., Naginienė R., Pavilonis A., 2011, Antibiotic resistance mechanisms of clinically important bacteria, *Medicina*, 47(3): pp. 19.
16. Van Hoek A.H., Mevius D., Guerra B., Mullany P., Roberts A.P., Aarts H.J., 2011, Acquired antibiotic resistance genes: an overview, *Frontiers In Microbiology*, 2: pp. 203.
17. Munita J.M., Arias C.A., 2016, Mechanisms of antibiotic resistance, *Virulence mechanisms of bacterial pathogens*: pp. 481-511.
18. Martínez J.L., 2012, Bottlenecks in the transferability of antibiotic resistance from natural ecosystems to human bacterial pathogens, *Frontiers in microbiology*, 2: pp. 265.
19. Smillie C.S., Smith M.B., Friedman J., Cordero O.X., David L.A., Alm E.J., 2011, Ecology drives a global network of gene exchange connecting the human microbiome, *Nature*, 480(7376): pp. 241-244.
20. Jutkina J., Marathe N., Flach C.F., Larsson D., 2018, Antibiotics and common antibacterial biocides stimulate horizontal transfer of resistance at low concentrations, *Science of the total Environment*, 616: pp. 172-178.
21. Zhang Y., Gu A.Z., He M., Li D., Chen J., 2017, Subinhibitory concentrations of disinfectants promote the horizontal transfer of multidrug resistance genes within and across genera, *Environmental Science Technology*, 51(1): pp. 570-580.
22. Poirel L., Madec J., Lupo A., Schink A., Kieffer N., Nordmann P., Schwarz S., 2018, *Antimicrobial resistance in Escherichia coli*. *Microbiol Spectr*. 2018, ARBA-0026-2017.
23. Węgleński P., 2008, Podstawowe Koncepcje Genetyczne i Wybrane Metody Analizy Genetycznej u Różnych Grup Organizmów, W: *Genetyka Molekularna*.
24. 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. 1137-1144.
25. Defoirdt T., 2014, Virulence mechanisms of bacterial aquaculture pathogens and antivirulence therapy for aquaculture, *Reviews in Aquaculture*, 6(2): pp. 100-114.

26. Di Cagno R., De Angelis M., Calasso M., Gobbetti M., 2011, Proteomics of the bacterial cross-talk by quorum sensing, *Journal Of Proteomics*, 74(1): pp. 19-34.
27. Méndez J., Guijarro J., 2013, In vivo monitoring of *Yersinia ruckeri* in fish tissues: progression and virulence gene expression, *Environmental Microbiology Reports*, 5(1): pp. 179-185.
28. FAO, 2018, The State of World Fisheries and Aquaculture 2018, *Meeting the sustainable development goals*.
29. FAO, 2016, The state of world fisheries and aquaculture: opportunities and challenges, *Meeting the sustainable development goals*.
30. FAO, 2014, The state of world fisheries and aquaculture: opportunities and challenges. Rome.
31. FAO, 2016, FAO global aquaculture production database updated to 2013—summary information.
32. Van Boeckel T.P., Brower C., Gilbert M., Grenfell B.T., Levin S.A., Robinson T.P., Teillant A., Laxminarayan R., 2015, Global trends in antimicrobial use in food animals, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(18): pp. 5649-5654.
33. Benbrook C.M., 2002, Antibiotic drug use in US aquaculture, *Institute for Agriculture Trade Policy Report*, 2.
34. Bell A.G., Thornber K., Chaput D.L., Hasan N.A., Alam M.M., Haque M.M., Cable J., Temperton B., Tyler C.R., 2023, Metagenomic assessment of the diversity and ubiquity of antimicrobial resistance genes in Bangladeshi aquaculture ponds, *Aquaculture Reports*, 29: pp. 101462.
35. Nakayama T., Hoa T.T.T., Harada K., Warisaya M., Asayama M., Hinenoya A., Lee J.W., Phu T.M., Ueda S., Sumimura Y., 2017, Water metagenomic analysis reveals low bacterial diversity and the presence of antimicrobial residues and resistance genes in a river containing wastewater from backyard aquacultures in the Mekong Delta, Vietnam, *Environmental Pollution*, 222: pp. 294-306.
36. Thi Q.V.C., Dung T.T., Hiệp Đ.P.H., 2014, Hiện trạng kháng thuốc kháng sinh trên hai loài vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri* và *Aeromonas hydrophila* gây bệnh trên cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*) ở Đồng bằng sông Cửu Long, *Tạp chí Khoa học Đại học Cần Thơ*, (CĐ Thủy sản): pp. 7-14.

37. Martínez-Porchas M., Vargas-Albores F., 2017, Microbial metagenomics in aquaculture: a potential tool for a deeper insight into the activity, *Reviews in Aquaculture*, 9(1): pp. 42-56.
38. Muziasari W.I., Pärnänen K., Johnson T.A., Lyra C., Karkman A., Stedtfeld R.D., Tamminen M., Tiedje J.M., Virta M., 2016, Aquaculture changes the profile of antibiotic resistance and mobile genetic element associated genes in Baltic Sea sediments, *FEMS Microbiology Ecology*, 92(4): pp. fiw052.
39. Handelsman J., 2004, Metagenomics: application of genomics to uncultured microorganisms, *Microbiology Molecular Biology Reviews*, 68(4): pp. 669-685.
40. Schmieder R., Edwards R., 2012, Insights into antibiotic resistance through metagenomic approaches, *Future Microbiology*, 7(1): pp. 73-89.
41. Chen S.L., Yu H., Luo H.-M., Wu Q., Li C.-F., Steinmetz A., 2016, Conservation and sustainable use of medicinal plants: problems, progress, and prospects, *Chinese Medicine*, 11: pp. 1-10.
42. Li J., Qu X., Su L., Zhang W., Yang D., Kolandhasamy P., Li D., Shi H., 2016, Microplastics in mussels along the coastal waters of China, *Environmental Pollution*, 214: pp. 177-184.
43. Munck C., Albertsen M., Telke A., Ellabaan M., Nielsen P.H., Sommer M.O., 2015, Limited dissemination of the wastewater treatment plant core resistome, *Nature Communications*, 6(1): pp. 8452.
44. Hugenholtz P., Goebel B.M., Pace N.R., 1998, Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity, *Journal Of Bacteriology*, 180(18): pp. 4765-4774.
45. Marco D., 2011, Metagenomics: current innovations and future trends.
46. Eisen J.A., 2007, Environmental shotgun sequencing: its potential and challenges for studying the hidden world of microbes, *Plos Biology*, 5(3): pp. e82.
47. Poinar H.N., Schwarz C., Qi J., Shapiro B., MacPhee R.D., Buigues B., Tikhonov A., Huson D.H., Tomsho L.P., Auch A., 2006, Metagenomics to paleogenomics: large-scale sequencing of mammoth DNA, *Science*, 311(5759): pp. 392-394.
48. Noonan J.P., Coop G., Kudaravalli S., Smith D., Krause J., Alessi J., Chen F., Platt D., Paabo S., Pritchard J.K., 2006, Sequencing and analysis of Neanderthal genomic DNA, *Science*, 314(5802): pp. 1113-1118.

49. Markowitz V.M., Ivanova N.N., Szeto E., Palaniappan K., Chu K., Dalevi D., Chen I.-M.A., Grechkin Y., Dubchak I., Anderson I., 2007, IMG/M: a data management and analysis system for metagenomes, *Nucleic Acids Research*, 36(suppl_1): pp. D534-D538.
50. Meyer F., Paarmann D., D'Souza M., Olson R., Glass E.M., Kubal M., Paczian T., Rodriguez A., Stevens R., Wilke A., 2008, The metagenomics RAST server—a public resource for the automatic phylogenetic and functional analysis of metagenomes, *BMC Bioinformatics*, 9: pp. 1-8.
51. Sun S., Chen J., Li W., Altintas I., Lin A., Peltier S., Stocks K., Allen E.E., Ellisman M., Grethe J., 2010, Community cyberinfrastructure for advanced microbial ecology research and analysis: the CAMERA resource, *Nucleic Acids Research*, 39(suppl_1): pp. D546-D551.
52. Leinonen R., Sugawara H., Shumway M., 2010, The sequence read archive, *Nucleic acids research*, 39(Database issue): pp. D19-D21.
53. Almeida A., Nayfach S., Boland M., Strozzi F., Beracochea M., Shi Z.J., Pollard K.S., Sakharova E., Parks D.H., Hugenholtz P., 2021, A unified catalog of 204,938 reference genomes from the human gut microbiome, *Nature biotechnology*, 39(1): pp. 105-114.
54. Kang D.D., Li F., Kirton E., Thomas A., Egan R., An H., Wang Z., 2019, MetaBAT 2: an adaptive binning algorithm for robust and efficient genome reconstruction from metagenome assemblies, *PeerJ*, 7: pp. e7359.
55. Parks D.H., Imelfort M., Skennerton C.T., Hugenholtz P., Tyson G.W., 2015, CheckM: assessing the quality of microbial genomes recovered from isolates, single cells, and metagenomes, *Genome Research*, 25(7): pp. 1043-1055.
56. Fahrenfeld N., Knowlton K., Krometis L.A., Hession W.C., Xia K., Lipscomb E., Libuit K., Green B.L., Pruden A., 2014, Effect of manure application on abundance of antibiotic resistance genes and their attenuation rates in soil: field-scale mass balance approach, *Environmental Science and Technology*, 48(5): pp. 2643-2650.
57. Bengtsson J.P., Angelin M., Huss M., Kjellqvist S., Kristiansson E., Palmgren H., Larsson D.J., Johansson A., 2015, The human gut microbiome as a transporter of antibiotic resistance genes between continents, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 59(10): pp. 6551-6560.
58. Pehrsson E.C., Tsukayama P., Patel S., Mejía-Bautista M., Sosa-Soto G., Navarrete K.M., Calderon M., Cabrera L., Hoyos-Arango W., Bertoli M.T.,

- 2016, Interconnected microbiomes and resistomes in low-income human habitats, *Nature*, 533(7602): pp. 212-216.
59. Agarwal P., 1996, *Compact encoding strategies for DNA sequence similarity search*. in *Proceedings. International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology*.
60. Langmead B., Trapnell C., Pop M., Salzberg S.L., 2009, Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome, *Genome Biology*, 10: pp. 1-10.
61. Buchfink B., Xie C., Huson D.H., 2015, Fast and sensitive protein alignment using DIAMOND, *Nature Methods*, 12(1): pp. 59-60.
62. Yang Y., Jiang X., Chai B., Ma L., Li B., Zhang A., Cole J.R., Tiedje J.M., Zhang T., 2016, ARGs-OAP: online analysis pipeline for antibiotic resistance genes detection from metagenomic data using an integrated structured ARG-database, *Bioinformatics*, 32(15): pp. 2346-2351.
63. De Silva S.S.,Phuong N.T., 2011, Striped catfish farming in the Mekong Delta, Vietnam: a tumultuous path to a global success, *Reviews in Aquaculture*, 3(2): pp. 45-73.
64. Rainboth W.J., 1996, *Fishes of the cambodian mekong*, Food & Agriculture Org.
65. Halwart M.,Gupta M.V., 2004, *Culture of fish in rice fields*, FAO; WorldFish Center.
66. Ukkatawewat S., 1984, The taxonomic characters and biology of some important freshwater fishes in Thailand, *Manuscript. National Inland Fisheries Institute, Department of Fisheries, Ministry of Agriculture: Bangkok, Tailandia*: pp. 1-55.
67. Hill M.,Hill S., 1994, Fisheries ecology and hydropower in the Lower Mekong Basin: an evaluation of run-of-the-river projects.
68. Sokheng C., Chhea C.K., Viravong S., Bouakhamvongsa K., Suntornratana U., Yoorong N., Tung N.T., Bao T.Q., Poulsen A.F., Jorgensen J.V., 1999, Fish migrations and spawning habits in the Mekong mainstream: a survey using local knowledge (basin-wide), *Assessment of Mekong fisheries: Fish Migrations and spawning and the Impact of water Management Project (AMFC). AMFP Report*, 2: pp. 99.
69. Hooper L.V., Gordon J.I., 2001, Commensal host-bacterial relationships in the gut, *Science*, 292(5519): pp. 1115-1118.

70. Nelson J.S., Grande T.C., Wilson M.V., 2016, *Fishes of the World*, John Wiley & Sons.
71. Suyehiro Y., 1942, A study on the digestive system and feeding habits of fish, *Jap. J. Zool.*, 10: pp. 1-303.
72. Al-Harbi A.H.,Uddin M.N., 2004, Seasonal variation in the intestinal bacterial flora of hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus*× *Oreochromis aureus*) cultured in earthen ponds in Saudi Arabia, *Aquaculture*, 229(1-4): pp. 37-44.
73. Reveco F.E., Overland M., Romarheim O.H., Mydland L.T., 2014, Intestinal bacterial community structure differs between healthy and inflamed intestines in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.), *Aquaculture*, 420: pp. 262-269.
74. Navarrete P., Espejo R., Romero J., 2009, Molecular analysis of microbiota along the digestive tract of juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar* L.), *Microbial ecology*, 57: pp. 550-561.
75. Stickney R.R.,Shumway S.E., 1974, Occurrence of cellulase activity in the stomachs of fishes, *Journal of fish Biology*, 6(6): pp. 779-790.
76. Sugita H., Miyajima C., Deguchi Y., 1991, The vitamin B12-producing ability of the intestinal microflora of freshwater fish, *Aquaculture*, 92: pp. 267-276.
77. Nayak S.K., 2010, Probiotics and immunity: a fish perspective, *Fish and Shellfish Immunology*, 29(1): pp. 2-14.
78. Star B., Haverkamp T.H., Jentoft S., Jakobsen K.S., 2013, Next generation sequencing shows high variation of the intestinal microbial species composition in Atlantic cod caught at a single location, *BMC Microbiology*, 13: pp. 1-6.
79. Nayak S.K., 2010, Role of gastrointestinal microbiota in fish, *Aquaculture research*, 41(11): pp. 1553-1573.
80. Romero J.,Navarrete P., 2006, 16S rDNA-based analysis of dominant bacterial populations associated with early life stages of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*), *Microbial ecology*, 51: pp. 422-430.
81. Rawls J.F., Samuel B.S., Gordon J.I., 2004, Gnotobiotic zebrafish reveal evolutionarily conserved responses to the gut microbiota, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(13): pp. 4596-4601.
82. Wu S., Wang G., Angert E.R., Wang W., Li W., Zou H., 2012, Composition, diversity, and origin of the bacterial community in grass carp intestine, *Plos One*, 7(2): pp. e30440.

83. Liu H., Guo X., Gooneratne R., Lai R., Zeng C., Zhan F., Wang W., 2016, The gut microbiome and degradation enzyme activity of wild freshwater fishes influenced by their trophic levels, *Scientific reports*, 6(1): pp. 24340.
84. Gómez G.D., Balcázar J.L., 2008, A review on the interactions between gut microbiota and innate immunity of fish, *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 52(2): pp. 145-154.
85. Hieu D.Q., Hang B.T.B., Lokesh J., Garigliany M.-M., Huong D.T.T., Yen D.T., Liem P.T., Tam B.M., Hai D.M., Son V.N., 2022, Salinity significantly affects intestinal microbiota and gene expression in striped catfish juveniles, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 106(8): pp. 3245-3264.
86. Yang H., Yuan Q., Rahman M.M., Lv W., Huang W., Hu W., Zhou W., 2024, Comparative studies on the intestinal health of wild and cultured ricefield eel (*Monopterus albus*), *Frontiers in Immunology*, 15: pp. 1411544.
87. Begum M.A., Punom N.J., Eshik M.M.E., Begum M.K., Khan T., Saha M.L., Rahman M.S., 2020, Pathogenic gut microbiota associated with striped catfish, *Pangasianodon hypophthalmus* cultured in Bangladesh and their antibiotic sensitivity pattern, *Dhaka University Journal of Biological Sciences*, 29(1): pp. 61-73.
88. Kim D., Paggi J.M., Park C., Bennett C., Salzberg S.L., 2019, Graph-based genome alignment and genotyping with HISAT2 and HISAT-genotype, *Nature Biotechnology*, 37(8): pp. 907-915.
89. Kim D., Langmead B., Salzberg S.L., 2015, HISAT: a fast spliced aligner with low memory requirements, *Nature Methods*, 12(4): pp. 357-360.
90. Langmead B., Salzberg S.L., 2012, Fast gapped-read alignment with Bowtie 2, *Nature Methods*, 9(4): pp. 357-359.
91. Pereira W.A., Mendonça C.M.N., Urquiza A.V., Marteinsson V.P., LeBlanc J.G., Cotter P.D., Villalobos E.F., Romero J., Oliveira R.P., 2022, Use of probiotic bacteria and bacteriocins as an alternative to antibiotics in aquaculture, *Microorganisms*, 10(9): pp. 1705.
92. Bharathi R.R., Tripathi G., Das B.K., Jain R., Acharya A., 2024, Comparative analysis of gut microbiome in *Pangasionodon hypophthalmus* and *Labeo catla* during health and disease, *International Microbiology*: pp. 1-15.
93. Tyagi A., Singh B., Billekallu N.K.T., Singh N.K., 2019, Shotgun metagenomics offers novel insights into taxonomic compositions, metabolic

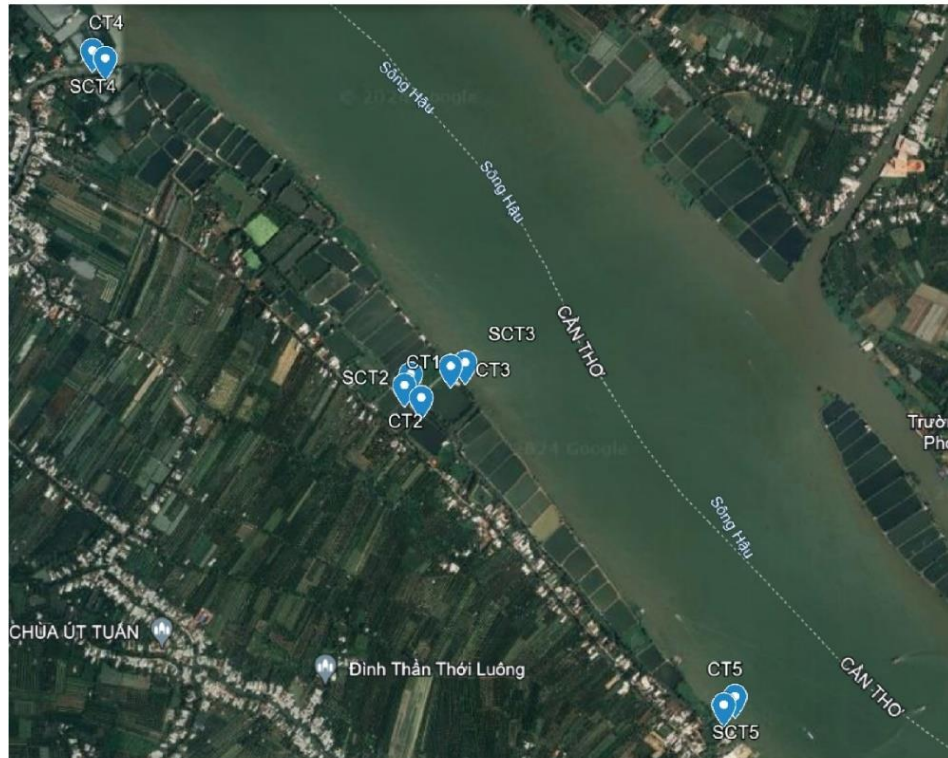
pathways and antibiotic resistance genes in fish gut microbiome, *Archives of Microbiology*, 201: pp. 295-303.

94. Huang G., Chen D., Li T., Wu F., Van Der Maaten L., Weinberger K.Q., 2017, Multi-scale dense networks for resource efficient image classification.
95. Ali M.L., Haque S.M., Borski R.J., 2015, The culture potential of *Pangasius catfish* in brackish (Hyposaline) waters of the Greater Barishal regions in Southern Bangladesh, pp. 1-14.

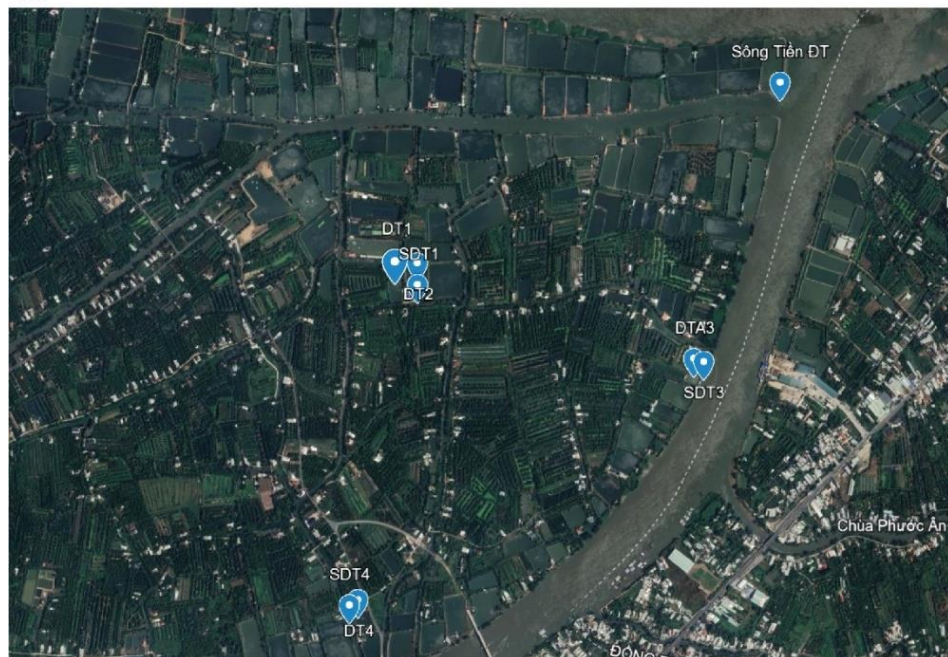
PHỤ LỤC

PL1. Bản đồ lấy mẫu sông Mekong, Việt Nam biểu diễn địa điểm lấy mẫu ở tỉnh Cần Thơ (A) và ở tỉnh Đồng Tháp (B). Ứng dụng MyMap được sử dụng để đánh dấu tọa độ các địa điểm lấy mẫu (Google, Mi)

A.



B.



PL2. Hướng dẫn sử dụng bộ kit tách DNA

Quick-Start Protocol

May 2019

DNeasy® PowerSoil® Pro Kit

Solution CD2 should be stored at 2–8°C upon arrival. All other reagents and kit components should be stored at room temperature (15–25°C).

Further information

- *DNeasy® PowerSoil® Pro Kit Handbook*: www.qiagen.com/HB-2495
- Safety Data Sheets: www.qiagen.com/safety
- Technical assistance: support.qiagen.com

Notes before starting

- Ensure that the PowerBead Pro Tubes rotate freely in the centrifuge without rubbing.
 - If Solution CD3 has precipitated, heat at 60°C until precipitate dissolves.
 - Perform all centrifugation steps at room temperature (15–25°C).
1. Spin the PowerBead Pro Tube briefly to ensure that the beads have settled at the bottom. Add up to 250 mg of soil and 800 µl of Solution CD1. Vortex briefly to mix.
 2. Secure the PowerBead Pro Tube horizontally on a Vortex Adapter for 1.5–2 ml tubes (cat. no. 13000-V1-24). Vortex at maximum speed for 10 min.
Note: If using the Vortex Adapter for more than 12 preps simultaneously, increase the vortexing time by 5–10 min.
Note: For more information about other bead beating methods, see the "Protocol: Detailed" section of *DNeasy® PowerSoil® Pro Kit Handbook*.
 3. Centrifuge the PowerBead Pro Tube at 15,000 x g for 1 min.
 4. Transfer the supernatant to a clean 2 ml Microcentrifuge Tube (provided).
Note: Expect 500–600 µl. The supernatant may still contain some soil particles.
 5. Add 200 µl of Solution CD2 and vortex for 5 s.
 6. Centrifuge at 15,000 x g for 1 min at room temperature. Avoiding the pellet, transfer up to 700 µl of supernatant to a clean 2 ml Microcentrifuge Tube (provided).
Note: Expect 500–600 µl.
 7. Add 600 µl of Solution CD3 and vortex for 5 s.

Sample to Insight



8. Load 650 μ l of the lysate onto an MB Spin Column and centrifuge at 15,000 \times g for 1 min.
9. Discard the flow-through and repeat step 8 to ensure that all of the lysate has passed through the MB Spin Column.
10. Carefully place the MB Spin Column into a clean 2 ml Collection Tube (provided). Avoid splashing any flow-through onto the MB Spin Column.
11. Add 500 μ l of Solution EA to the MB Spin Column. Centrifuge at 15,000 \times g for 1 min.
12. Discard the flow-through and place the MB Spin Column back into the same 2 ml Collection Tube.
13. Add 500 μ l of Solution C5 to the MB Spin Column. Centrifuge at 15,000 \times g for 1 min.
14. Discard the flow-through and place the MB Spin Column into a new 2 ml Collection Tube (provided).
15. Centrifuge at up to 16,000 \times g for 2 min. Carefully place the MB Spin Column into a new 1.5 ml Elution Tube (provided).
16. Add 50–100 μ l of Solution C6 to the center of the white filter membrane.
17. Centrifuge at 15,000 \times g for 1 min. Discard the MB Spin Column. The DNA is now ready for downstream applications.

Note: We recommend storing the DNA frozen (–30 to –15°C or –90 to –65°C) as Solution C6 does not contain EDTA. To concentrate DNA, please refer to the Troubleshooting Guide.



Scan QR code for handbook.

For up-to-date licensing information and product specific disclaimers, see the respective QIAGEN kit handbook or user manual.

Trademarks: QIAGEN®, Sample to Insight®, DNeasy®, PowerSoil® (QIAGEN Group) 1117569 05/2019 HB-2494.003 © 2019 QIAGEN, all rights reserved.

PL3. Đánh giá độ chất lượng các phân mục metagenomics

Bin Id	Độ hoàn thiện	GC (%)	N50	N75	L50	L75
MaxBin2Refined-DT2-F18.001	21,04	35,56	1490	1197	433	825
MaxBin2Refined-DT2-F18.002	23,46	49,31	1426	1159	321	577
MetaBAT2-DT2-F18.3	0,0	55,61	2199	1866	40	67
MetaBAT2-DT2-F18.2	12,5	32,56	1819	1628	56	92
MetaBAT2-DT2-F18.1	0,0	36,97	2290	1844	52	94
MaxBin2-DT2-F18.002	23,46	49,31	1426	1159	321	577
MaxBin2-DT2-F18.001	21,04	35,56	1490	1197	433	825
MaxBin2-DT3-F19.006	2,9	32,42	6047	3165	6	15
MaxBin2-DT3-F19.001	0,0	33,55	1764 0	1181 3	3	7
MaxBin2-DT3-F19.005	16,67	30,43	2256 7	1166 5	8	18
MaxBin2-DT3-F19.002	91,16	48,18	1096 6	5236	54	128
MaxBin2-DT3-F19.007	0,0	33,77	4899	2565	10	22
MaxBin2-DT3-F19.003	17,24	35,11	9980	5326	12	23
MaxBin2-DT3-F19.004	12,5	28,4	2580 9	1189 2	7	15
MaxBin2-DT3-F19.009	98,18	31,25	3833 2	2035 3	11	24
MaxBin2-DT3-F19.008	5,99	32,84	1213 1	7216	4	8
MaxBin2-DT3-F19.011	27,59	30,51	1975 8	9977	13	27
MaxBin2-DT3-F19.010	59,48	30,27	3510 4	1435 8	10	25
MaxBin2-DT3-F19.013	9,48	30,44	1773 1	9638	34	71
MaxBin2-DT3-F19.015	90,45	28,61	4369	1926	170	483
MaxBin2-DT3-F19.014	16,27	51,91	2151	1356	172	407
MaxBin2-DT3-F19.012	44,83	28,58	1673 0	7887	63	139
MaxBin2-DT3-F19.016	3,18	34,73	3090	1671	23	62
MaxBin2-DT3-F19.018	5,96	33,86	2101	1361	105	238
MaxBin2-DT3-F19.017	0,0	26,85	2734	1505	471	115 6
MaxBin2-DT3-F19.019	91,11	31,16	3948	1722	264	734
MaxBin2-DT3-F19.020	16,18	32,25	2431	1445	40	90
MaxBin2-DT3-F19.021	89,27	34,81	2950	1728	158	342
MaxBin2-DT3-F19.023	10,37	32,87	1859	1229	51	105
MaxBin2-DT3-F19.024	1,72	36,2	1582	1214	128	237
MaxBin2-DT3-F19.022	60,49	30,2	2118	1378	715	153

						1
MaxBin2-DT3-F19.025	52,16	38,34	1631	1229	718	1426
MaxBin2-DT3-F19.028	25,88	34,57	1496	1191	108	199
MaxBin2-DT3-F19.026	37,88	44,79	1479	1182	591	1108
MaxBin2-DT3-F19.030	31,31	34,16	1512	1191	324	599
MaxBin2-DT3-F19.029	37,26	34,32	1647	1242	429	810
MaxBin2-DT3-F19.027	23,89	35,93	1634	1229	157	310
MaxBin2-DT3-F19.031	16,14	33,57	1418	1218	57	99
MaxBin2-DT3-F19.032	35,02	35,83	1396	1203	66	114
MetaBAT2-DT3-F19.4	76,87	48,13	14488	6954	35	76
MetaBAT2-DT3-F19.10	88,76	28,74	5583	2727	117	311
MetaBAT2-DT3-F19.2	54,55	29,78	2306	1816	769	1437
MetaBAT2-DT3-F19.5	45,26	35,86	2817	2077	166	302
MetaBAT2-DT3-F19.3	93,31	31,61	7621	4045	120	258
MetaBAT2-DT3-F19.11	0,0	28,41	19537	11018	3	7
MetaBAT2-DT3-F19.7	96,99	29,3	12261	5449	238	579
MetaBAT2-DT3-F19.6	15,67	33,9	2028	1749	56	93
MetaBAT2-DT3-F19.1	81,05	34,63	3832	2548	101	205
MetaBAT2-DT3-F19.8	99,59	31,35	38332	20501	11	23
MetaBAT2-DT3-F19.9	32,26	29,53	23188	12609	16	35
DASToolUnbinned-DT3-F19	99,69	30,37	3921	1347	942	3671
MaxBin2Refined-DT3-F19.002	91,16	48,18	10966	5236	54	128
MaxBin2Refined-DT3-F19.003	17,24	35,11	9980	5326	12	23
MaxBin2Refined-DT3-F19.008	5,99	32,84	12131	7216	4	8
MaxBin2Refined-DT3-F19.009	98,18	31,25	38332	20353	11	24
MaxBin2Refined-DT3-F19.014	16,27	51,91	2151	1356	172	407
MaxBin2Refined-DT3-F19.020	16,18	32,25	2431	1445	40	90
MaxBin2Refined-DT3-F19.021_sub	24,75	35,05	1293	1133	122	213
MaxBin2Refined-DT3-F19.023_sub	10,37	32,84	1716	1210	54	106
MaxBin2Refined-DT3-F19.025_sub	47,85	38,55	1459	1181	683	1311
MaxBin2Refined-DT3-F19.026	37,88	44,79	1479	1182	591	110

						8
MaxBin2Refined-DT3-F19.028_sub	23,3	34,63	1364	1143	103	183
MaxBin2Refined-DT3-F19.030_sub	31,31	34,14	1457	1177	326	590
MetaBAT2Refined-DT3-F19.10_sub	88,76	28,74	5647	2747	116	309
MetaBAT2Refined-DT3-F19.1_sub	81,05	34,65	3832	2548	101	204
MetaBAT2Refined-DT3-F19.2_sub	43,68	29,59	2299	1815	717	134 3
MetaBAT2Refined-DT3-F19.3_sub	93,31	31,6	7621	4045	120	258
MetaBAT2Refined-DT3-F19.5	45,26	35,86	2817	2077	166	302
MetaBAT2Refined-DT3-F19.9	32,26	29,53	2318 8	1260 9	16	35
MaxBin2-DT4-F20.002	92,13	28,86	2008 2	7437	37	99
MaxBin2-DT4-F20.001	7,87	36,61	1315 7	6615	5	9
MaxBin2-DT4-F20.004	97,28	48,78	1627 1	3498	42	135
MaxBin2-DT4-F20.003	8,93	33,44	6421	2808	38	93
MaxBin2-DT4-F20.005	76,21	30,19	3370	1758	181	432
MaxBin2-DT4-F20.007	73,54	37,1	1560	1217	354	648
MaxBin2-DT4-F20.008	0,0	36,31	2222	1395	39	88
MaxBin2-DT4-F20.006	12,93	34,86	2562	1444	20	39
MaxBin2-DT4-F20.009	13,28	33,2	2261	1502	91	189
MaxBin2-DT4-F20.010	45,85	27,68	2166	1397	627	134 6
MaxBin2-DT4-F20.013	26,11	32,34	1862	1341	27	52
MaxBin2-DT4-F20.011	12,93	29,09	2183	1397	385	830
MaxBin2-DT4-F20.012	75,39	34,36	1991	1346	547	114 8
MaxBin2-DT4-F20.014	18,42	31,62	2199	1425	227	470
MetaBAT2-DT4-F20.2	92,18	48,39	2858 3	1450 6	22	46
MetaBAT2-DT4-F20.1	0,0	28,71	1541 7	7911	7	14
MetaBAT2-DT4-F20.5	70,69	28,61	2190 7	7665	28	75
MetaBAT2-DT4-F20.3	55,59	33,68	2990	2098	181	355
MetaBAT2-DT4-F20.4	38,11	35,33	2278	1873	77	135
MetaBAT2-DT4-F20.6	95,69	29,62	3120	2103	851	175 7
MaxBin2Refined-DT4-F20.002	92,13	28,86	2008	7437	37	99

			2			
MaxBin2Refined-DT4-F20.004	97,28	48,78	1627 1	3498	42	135
MaxBin2Refined-DT4-F20.007	73,54	37,1	1560	1217	354	648
MaxBin2Refined-DT4-F20.009	13,28	33,2	2261	1502	91	189
MaxBin2Refined-DT4-F20.012	75,39	34,36	1991	1346	547	114 8
MaxBin2Refined-DT4-F20.014	18,42	31,62	2199	1425	227	470
MetaBAT2Refined-DT4-F20.6_sub	91,61	29,02	3250	2139	640	134 2
DASToolUnbinned-DT4-F20	62,62	30,24	1372	1165	885	186 1
DASToolUnbinned-TC3-F16	3,45	29,07	5971	2774	112	306
MaxBin2Refined-TC3-F16.001	87,64	29,53	4083 2	1118 9	13	34
MaxBin2Refined-TC3-F16.003	76,01	38,57	1310 5	6277	35	76
MaxBin2Refined-TC3-F16.004	88,92	29,3	2540	1587	817	181 0
MaxBin2Refined-TC3-F16.005	50,26	37,36	6370	2164	47	180
MaxBin2Refined-TC3-F16.006	9,7	39,03	1524	1183	101 5	193 8
MetaBAT2-TC3-F16.3	59,55	29,4	4350 3	2510 2	6	11
MetaBAT2-TC3-F16.11	59,48	28,99	3097	2111	352	707
MetaBAT2-TC3-F16.10	32,76	37,04	2858 1	1174 0	12	25
MetaBAT2-TC3-F16.2	17,24	38,06	3724	2568	33	63
MetaBAT2-TC3-F16.1	0,0	28,14	1111 8	5193	24	74
MetaBAT2-TC3-F16.5	25,86	28,46	6191 9	1835 0	3	9
MetaBAT2-TC3-F16.6	67,61	38,8	1514 0	9460	22	45
MetaBAT2-TC3-F16.4	0,0	26,63	6514	4021	14	29
MetaBAT2-TC3-F16.7	0,0	26,42	4123	2374	46	97
MetaBAT2-TC3-F16.8	0,0	25,61	3141	2164	44	86
MetaBAT2-TC3-F16.9	0,0	29,39	6222	3281	11	23
MaxBin2-TC3-F16.004	88,92	29,3	2540	1587	817	181 0
MaxBin2-TC3-F16.003	76,01	38,57	1310 5	6277	35	76
MaxBin2-TC3-F16.001	87,64	29,53	4083 2	1118 9	13	34
MaxBin2-TC3-F16.002	3,45	29,07	5971	2774	112	306
MaxBin2-TC3-F16.005	50,26	37,36	6370	2164	47	180

PL8

MaxBin2-TC3-F16.006	9,7	39,03	1524	1183	101 5	193 8
MaxBin2-TC4-F17.001	0,0	34,44	4742	2208	19	40
MaxBin2-TC4-F17.002	4,68	38,91	1692	1247	108 3	224 4
MetaBAT2-TC4-F17.1	0,0	29,2	4007	2421	24	56

PL3. Dự đoán sự xuất hiện của gene KKS trong mẫu TC3-F16

OR F	Genes KKS	Danh mục thuốc kháng	Cơ chế kháng thuốc	Dự đoán gen di động
576 56_ 1	TET(40)	tetracycline	antibiotic efflux	-
667 98_ 1	AADA14	aminoglyco side	antibiotic inactivation	-
683 75_ 1	UGD	peptide	antibiotic target alteration	phage
704 48_ 1	FARA	antibacterial _free_fatty_ acids	antibiotic efflux	phage
839 51_ 1	EMRB	fluoroquino lone	antibiotic efflux	-
939 86_ 1	SUL1	sulfonamide	antibiotic target replacement	-
962 40_ 1	MDSC	multidrug	antibiotic efflux	-
966 06_ 1	ABCA	multidrug	antibiotic efflux	-
975 69_ 1	VANS	glycopeptid e	-	-
100 443 _1	TRUNCATED_PUTATIV E_RESPONSE_REGULA TOR_ARLR	-	-	-
666 9_1	TETA(60)	tetracycline	antibiotic efflux	-
670 2_1	AAC(2')-IIA	aminoglyco side	antibiotic inactivation	-

811 8_1	CHLORAMPHENICOL_ AND_FLORFENICOL_E XPORTER	phenicol	-	plasmid
202 38_ 1	ABCA	multidrug	antibiotic efflux	-
401 90_ 1	APH(3')-VC	aminoglyco side	antibiotic inactivation	phage
408 47_ 1	FOX-9	beta-lactam	antibiotic inactivation	phage
461 16_ 1	TETA(P)	tetracycline	antibiotic efflux	-
475 42_ 1	PER-6	beta-lactam	antibiotic inactivation	-
656 74_ 1	CATB10	phenicol	antibiotic inactivation	-
793 44_ 1	ABCA	multidrug	antibiotic efflux	-
845 78_ 1	OXA-427	beta-lactam	antibiotic inactivation	-
941 54_ 1	VANF	glycopeptid e	antibiotic target alteration	phage
105 772 _1	OXA-85	beta-lactam	antibiotic inactivation	-
109 878 _1	OXA-85	beta-lactam	antibiotic inactivation	-
104 502 _1	IRI	rifamycin	antibiotic inactivation	-
111 88_ 1	TRUNCATED_PUTATIV E_RESPONSE_REGULA TOR_ARLR	-	-	phage
964 _1	BACILLUS SUBTILIS MPRF	peptide	antibiotic target alteration	-
111 245 _1	OXA-192	beta-lactam	antibiotic inactivation	-

112 202 _1	AACA43	aminoglyco side	antibiotic inactivation	-
133 78_ 1	TETB(46)	tetracycline	antibiotic efflux	-
133 93_ 1	MDSB	multidrug	antibiotic efflux	phage
109 09_ 1	BIFIDOBACTERIUM ADOLESCENTIS RPOB MUTANTS CONFERRING RESISTANCE TO RIFAMPICIN	multidrug	antibiotic target alteration;antibiotic target replacement	phage
211 39_ 1	TETS	tetracycline	antibiotic target protection	plasmid
221 83_ 1	LMRD	MLS	antibiotic efflux	chromos ome
228 87_ 1	BAHA	peptide	antibiotic inactivation	-
229 62_ 1	CHRB	MLS	antibiotic target alteration	-
235 52_ 1	CATB9	phenicol	antibiotic inactivation	-
268 17_ 1	EFMA	multidrug	antibiotic efflux	-
429 82_ 1	AAC(2')-IIA	aminoglyco side	antibiotic inactivation	phage
430 01_ 1	AAC(2')-IIA	aminoglyco side	antibiotic inactivation	phage
435 40_ 1	CBP-1	beta-lactam	antibiotic inactivation	-
473 51_ 1	ERM(34)	MLS	antibiotic target alteration	-
484 02_ 1	TETB(P)	tetracycline	antibiotic target protection	-

1				
484 40_ 1	TETB(P)	tetracycline	antibiotic target protection	phage
529 66_ 1	OTRC	tetracycline	antibiotic efflux	-
539 31_ 1	AAC(2')-IIB	aminoglyco side	antibiotic inactivation	phage
539 62_ 1	LLMA 23S RIBOSOMAL RNA METHYLTRANSFERASE	MLS	antibiotic target alteration	-
573 47_ 1	TLRC	multidrug	antibiotic target protection	-
610 20_ 1	GIMA	MLS	antibiotic inactivation	-
677 54_ 1	CMEB	multidrug	antibiotic efflux	-
722 32_ 1	TOLC	multidrug	antibiotic efflux	phage
762 99_ 1	SMEE	multidrug	antibiotic efflux	phage
858 23_ 1	OXA-129	beta-lactam	antibiotic inactivation	-
238 90_ 1	FOSA	fosfomicin	antibiotic inactivation	-
182 43_ 1	MDSB	multidrug	antibiotic efflux	phage
270 59_ 1	OPRM	multidrug	antibiotic efflux	-
275 20_ 1	TET(31)	tetracycline	antibiotic efflux	-
288 22_ 1	TRUNCATED_PUTATIVE_RESPONSE_REGULATOR_ARLR	-	-	-

270 57_ 1	ERME	MLS	antibiotic target alteration	-
255 4_ 1	LPEB	MLS	antibiotic efflux	-
385 14_ 1	RPOB2	multidrug	antibiotic target alteration;antibiotic target replacement	phage
277 34_ 1	TRIC	triclosan	antibiotic efflux	-
495 74_ 1	EPTA	peptide	antibiotic target alteration	-
661 49_ 1	VANC	glycopeptide	antibiotic target alteration	phage
295 85_ 1	FOSX	fosfomycin	antibiotic inactivation	-
697 90_ 1	UGD	peptide	antibiotic target alteration	plasmid
299 79_ 1	EMRB-QACA	fluoroquinolone	antibiotic efflux	-
784 22_ 1	BRP(MBL)	glycopeptide	antibiotic inactivation	-
796 05_ 1	OXA-20	beta-lactam	antibiotic inactivation	-
872 11_ 1	ERM(39)	MLS	antibiotic target alteration	-
872 83_ 1	DFRA23	diaminopyrimidine	antibiotic target replacement	-
107 319_ 1	ESCHERICHIA COLI AMPC BETA-LACTAMASE	beta-lactam	antibiotic inactivation	-
108 830_ 1	SHV-84	beta-lactam	antibiotic inactivation	phage
111 780_ 1	TETB(58)	tetracycline	antibiotic efflux	-

343 98_ 1	EFRB	multidrug	antibiotic efflux	-
117 178 _1	APH(3')-IB	aminoglyco side	antibiotic inactivation	-
938 _1	MDSB	multidrug	antibiotic efflux	phage
110 9_ 1	EFRB	multidrug	antibiotic efflux	chromos ome
139 8_ 1	SHV-84	beta-lactam	antibiotic inactivation	-
466 7_ 1	TRUNCATED_PUTATIV E_RESPONSE_REGULA TOR_ARLR	-	-	-
505 7_ 1	ADEN	multidrug	antibiotic efflux	-
873 0_ 1	RBPA	rifamycin	antibiotic target protection	-
215 26_ 1	ERP-1	beta-lactam	antibiotic inactivation	-
261 44_ 1	SHV-84	beta-lactam	antibiotic inactivation	-
305 25_ 1	EFRA	multidrug	antibiotic efflux	-
440 49_ 1	AADS	aminoglyco side	antibiotic inactivation	-
450 76_ 1	OPTRA	multidrug	antibiotic target protection	plasmid
528 65_ 1	MTRD	multidrug	antibiotic efflux	-
581 87_ 1	LLMA 23S RIBOSOMAL RNA METHYLTRANSFERAS E	MLS	antibiotic target alteration	-
606 39_ 1	RPHA	rifamycin	antibiotic inactivation	-
631 47_ 1	CFXA6	beta-lactam	antibiotic inactivation	-

706 11_ 1	AAC(6')-IE-APH(2'')-IA	aminoglyco side	antibiotic inactivation	-
723 41_ 1	RMTC	aminoglyco side	antibiotic target alteration	phage
762 81_ 1	SHV-84	beta-lactam	antibiotic inactivation	-
802 02_ 1	MEXI	multidrug	antibiotic efflux	phage
802 27_ 1	LNUP	MLS	antibiotic inactivation	-
838 58_ 1	TEM-94	beta-lactam	antibiotic inactivation	-
866 08_ 1	LPEA	MLS	antibiotic efflux	-
875 72_ 1	VANRL	glycopeptid e	antibiotic target alteration	-
877 62_ 1	UGD	peptide	antibiotic target alteration	chromos ome
474 4_1	LNUC	MLS	antibiotic inactivation	-
944 53_ 1	OPRM	multidrug	antibiotic efflux	-
291 2_1	MEXN	phenicol	antibiotic efflux	-
565 0_1	TRUNCATED_PUTATIV E_RESPONSE_REGULA TOR_ARLR	-	-	-
647 5_1	IMI-8	beta-lactam	antibiotic inactivation	-
107 91_ 1	GADW	multidrug	antibiotic efflux	-
206 54_ 1	MDTG	fosfomycin	antibiotic efflux	chromos ome
521 42_	AAC(2')-IB	aminoglyco side	antibiotic inactivation	-

1				
578 40_ 1	VANS	glycopeptid e	-	-
684 66_ 1	TRIC	triclosan	antibiotic efflux	phage
791 98_ 1	LRA-12	beta-lactam	antibiotic inactivation	-
801 32_ 1	ANT(4')-IIA	aminoglyco side	antibiotic inactivation	-
870 83_ 1	MDSB	multidrug	antibiotic efflux	-
878 42_ 1	OXA-192	beta-lactam	antibiotic inactivation	-
929 84_ 1	TETB(P)	tetracycline	antibiotic target protection	-
976 96_ 1	BJP-1	beta-lactam	antibiotic inactivation	-
101 454 _1	MEXW	multidrug	antibiotic efflux	-
102 979 _1	AAC(2')-IIA	aminoglyco side	antibiotic inactivation	-
107 674 _1	CHRYSEOBACTERIUM MENINGOSEPTICUM BLAB	beta-lactam	antibiotic inactivation	-
107 787 _1	MEPA	multidrug	antibiotic efflux	phage
109 755 _1	APH(3')-IVA	aminoglyco side	antibiotic inactivation	-
115 234 _1	BACILLUS PUMILUS CAT86	phenicol	antibiotic inactivation	-
151 8_1	APH[94]-IA	aminoglyco side	antibiotic inactivation	phage
689 8_1	SHV-84	beta-lactam	antibiotic inactivation	-

889 0_1	TRUNCATED_PUTATIVE_RESPONSE_REGULATOR_ARLR	-	-	-
200 63_1	APH(3')-IIB	aminoglycoside	antibiotic inactivation	phage
213 60_1	LMRP	multidrug	antibiotic efflux	-
240 50_1	CDEA	multidrug	antibiotic efflux	-
365 12_1	KLEBSIELLA PNEUMONIAE KPNG	multidrug	antibiotic efflux	phage
448 07_1	MCR-7.1	peptide	antibiotic target alteration	-
454 25_1	LNUA	MLS	antibiotic inactivation	-
488 24_1	OPRM	multidrug	antibiotic efflux	-
740 91_1	TETB(P)	tetracycline	antibiotic target protection	-
748 45_1	ADEJ	multidrug	antibiotic efflux	-
911 23_1	AAC(6')-IE-APH(2'')-IA	aminoglycoside	antibiotic inactivation	-
916 32_1	RPOB2	multidrug	antibiotic target alteration;antibiotic target replacement	chromosome
921 33_1	PSEUDOMONAS AERUGINOSA CATB6	phenicol	antibiotic inactivation	phage
978 99_1	QNRE2	fluoroquinolone	antibiotic target protection	-
103 501_1	UGD	peptide	antibiotic target alteration	-
710 55_1	ANT(6)-IB	aminoglycoside	antibiotic inactivation	-

1				
103 739 _1	OXA-22	beta-lactam	antibiotic inactivation	-
107 579 _1	AAC(2')-IIA	aminoglyco side	antibiotic inactivation	phage
107 732 _1	BMR	multidrug	antibiotic efflux	phage
114 081 _1	HERA-8	beta-lactam	antibiotic inactivation	-
677 6_1	BRUCELLA SUIS MPRF	peptide	antibiotic target alteration	-
225 3_1	VATF	MLS	antibiotic inactivation	-
523 0_1	APH(2'')-IIIA	aminoglyco side	antibiotic inactivation	-
130 45_ 1	EFPA	multidrug	antibiotic efflux	-
220 50_ 1	TETB(P)	tetracycline	antibiotic target protection	-
220 51_ 1	TETP	tetracycline	-	chromos ome
236 40_ 1	MDTG	fosfomycin	antibiotic efflux	plasmid
252 62_ 1	VATB	MLS	antibiotic inactivation	-
253 93_ 1	DFRA6 FROM PROTEUS MIRABILIS	diaminopyri midine	antibiotic target replacement	-
272 04_ 1	LSA	multidrug	antibiotic target protection	plasmid
400 61_ 1	MPHH	MLS	antibiotic inactivation	-
415 56_ 1	IMP-33	beta-lactam	antibiotic inactivation	-
430	OXA-22	beta-lactam	antibiotic inactivation	phage

44_1				
819_60_1	GADX	multidrug	antibiotic efflux	-
470_77_1	CRP	multidrug	antibiotic efflux	phage
481_05_1	LPEB	MLS	antibiotic efflux	-
481_62_1	MDTO	multidrug	antibiotic efflux	-
525_25_1	SHV-84	beta-lactam	antibiotic inactivation	-

PL4. Dự đoán gene KKS ở mẫu TC4-F17

OR F	Genes KKS	Danh mục thuốc kháng	Cơ chế kháng thuốc	Dự đoán gen di động
708_1	MTRD	multidrug	antibiotic efflux	unclassified
377_2_1	RPOB2	multidrug	antibiotic target alteration;antibiotic target replacement	phage
986_5_1	AAC(6')-IB7	aminoglycoside	antibiotic inactivation	unclassified
988_2_1	AAC(6')-IB7	aminoglycoside	antibiotic inactivation	unclassified
583_8_1	MPHL	MLS	antibiotic inactivation	phage
676_2_1	TETB(P)	tetracycline	antibiotic target protection	unclassified
142_90_1	CATB9	phenicol	antibiotic inactivation	unclassified
323_52_1	TET(33)	tetracycline	antibiotic efflux	unclassified
483_42_1	TET(59)	tetracycline	antibiotic efflux	unclassified
519_18_1	MEXM	phenicol	antibiotic efflux	unclassified

1				
582 46_ 1	NORB	fluoroquinolone	antibiotic efflux	unclassified
596 49_ 1	CTX-M-152	beta-lactam	antibiotic inactivation	unclassified
444 5_ 1	LRA-3	beta-lactam	antibiotic inactivation	phage
169 74_ 1	TEM-193	beta-lactam	antibiotic inactivation	unclassified
189 95_ 1	TET32	tetracycline	antibiotic target protection	unclassified
190 42_ 1	RPOB2	multidrug	antibiotic target alteration;antibiotic target replacement	phage
251 40_ 1	OXA-85	beta-lactam	antibiotic inactivation	unclassified
309 26_ 1	VANXYG	glycopeptide	antibiotic target alteration	unclassified
336 78_ 1	VANRB	glycopeptide	antibiotic target alteration	phage
373 52_ 1	BCL-1	beta-lactam	antibiotic inactivation	unclassified
418 93_ 1	ACRF	multidrug	antibiotic efflux	unclassified
483 12_ 1	EFRA	multidrug	antibiotic efflux	unclassified
508 70_ 1	TEM-193	beta-lactam	antibiotic inactivation	unclassified
531 21_ 1	CIA-1	beta-lactam	antibiotic inactivation	phage
537 12_ 1	TETO	tetracycline	antibiotic target protection	unclassified
633 46_ 1	ADC-42	beta-lactam	antibiotic inactivation	phage

1				
184 51_ 1	MECC	beta-lactam	antibiotic target replacement	unclassified
476 38_ 1	TET(55)	tetracycline	antibiotic inactivation	unclassified
517 57_ 1	VATF	MLS	antibiotic inactivation	unclassified
556 93_ 1	ADEJ	multidrug	antibiotic efflux	phage
485 9_ 1	LRA-10	beta-lactam	antibiotic inactivation	phage
578 0_ 1	ADES	multidrug	antibiotic efflux	unclassified
907 5_ 1	NOVA	aminocoumarin	antibiotic efflux	phage
132 99_ 1	TMB-2	beta-lactam	antibiotic inactivation	unclassified
283 34_ 1	ERMH	MLS	antibiotic target alteration	phage
500 13_ 1	VANSO	glycopeptide	antibiotic target alteration	unclassified
516 34_ 1	Y56 BETA-LACTAMASE	beta-lactam	antibiotic inactivation	unclassified
534 19_ 1	MDTH	fluoroquinolone	antibiotic efflux	unclassified
600 84_ 1	DFRF	diaminopyrimidine	antibiotic target replacement	unclassified
750 4_ 1	MECR1	beta-lactam	antibiotic target replacement	phage
866 7_ 1	OXA-192	beta-lactam	antibiotic inactivation	unclassified
209 53_ 1	ANT(4')-IIB	aminoglycoside	antibiotic inactivation	unclassified
257 04_ 1	SUL1	sulfonamide	antibiotic target replacement	unclassified

261 30_ 1	SHV-84	beta-lactam	antibiotic inactivation	unclassified
336 77_ 1	FEXA	phenicol	antibiotic efflux	unclassified
325 56_ 1	AADA27	aminoglycoside	antibiotic inactivation	unclassified
468 11_ 1	FARB	antibacterial_free_fatty_acids	antibiotic efflux	phage
534 71_ 1	TET(40)	tetracycline	antibiotic efflux	chromosome
534 72_ 1	TETO	tetracycline	antibiotic target protection	unclassified
576 25_ 1	APH(3")-IB	aminoglycoside	antibiotic inactivation	phage
603 64_ 1	VANI	glycopeptide	antibiotic target alteration	unclassified
238 _1	ERME	MLS	antibiotic target alteration	unclassified
221 0_1	BACILLUS PUMILUS CAT86	phenicol	antibiotic inactivation	unclassified
736 4_1	TET32	tetracycline	antibiotic target protection	unclassified
359 39_ 1	TETB(P)	tetracycline	antibiotic target protection	phage
163 84_ 1	MDTC	aminocoumarin	antibiotic efflux	unclassified
168 27_ 1	MCR-7.1	peptide	antibiotic target alteration	unclassified
196 58_ 1	APH(6)-ID	aminoglycoside	antibiotic inactivation	unclassified
271 27_ 1	APH(3')-VIII B	aminoglycoside	antibiotic inactivation	unclassified
308	FRI-3	beta-lactam	antibiotic inactivation	unclassified

97_1				d
34736_1	OXA-198	beta-lactam	antibiotic inactivation	phage
42645_1	CTX-M-152	beta-lactam	antibiotic inactivation	unclassified
44041_1	OPTRA	multidrug	antibiotic target protection	phage
52457_1	CATB2	phenicol	antibiotic inactivation	unclassified
54253_1	ERM(O)-LRM	MLS	antibiotic target alteration	unclassified
57064_1	BLAR1	beta-lactam	antibiotic inactivation	unclassified
57315_1	MEXX	multidrug	antibiotic efflux	unclassified
40078_1	TETB(P)	tetracycline	antibiotic target protection	unclassified
44405_1	MEXD	multidrug	antibiotic efflux	phage
4260_1	RBPA	rifamycin	antibiotic target protection	unclassified
49440_1	VGAD	multidrug	antibiotic target protection	unclassified
4529_1	DHA-16	beta-lactam	antibiotic inactivation	unclassified
397_1	ERM(46)	MLS	antibiotic target alteration	phage

PL5. Dự đoán gene KKS mẫu DT2-F18

ORF	Gene KKS	Danh mục kháng sinh kháng	Cơ chế kháng kháng sinh	Dự đoán gene di động
1180	AAC(6')-IB7	aminoglycoside	antibiotic inactivation	Phage

3_1			n	
57_12_1	LMRB	MLS	antibiotic efflux	phage
24_47_3_1	ERM(36)	MLS	antibiotic target alteration	phage
30_45_9_1	TRANSCRIPTIONAL_REGULATOR_Y_PROTEIN_CPXR_CPXR	-	-	-
27_45_1	VANI	glycopeptide	antibiotic target alteration	-
69_47_1	MPHA	MLS	antibiotic inactivation	-
11_80_8_1	TET(39)	tetracycline	antibiotic efflux	-
85_69_1	VANZF	glycopeptide	antibiotic target alteration	-
12_62_6_1	ERMN	MLS	antibiotic target alteration	-
19_56_4_1	TET(E)	tetracycline	antibiotic efflux	-
21_20_4_1	MPHA	MLS	antibiotic inactivation	-
22_00_0_1	TETA(P)	tetracycline	antibiotic efflux	-
26_74_1_1	ROSA	peptide	antibiotic efflux	-
82	ALMG	peptide	antibiotic	-

_1			target alteration	
30 8_ 1	OTR(A)	tetracycline	antibiotic target protection	-
19 03 9_ 1	EMRA	fluoroquinolone	antibiotic efflux	-
19 96 2_ 1	QNRS11	fluoroquinolone	antibiotic target protection	-
20 95 6_ 1	TET(35)	tetracycline	antibiotic efflux	-
41 12 _1	YOJI	peptide	antibiotic efflux	-
67 44 _1	CDEA	multidrug	antibiotic efflux	-
76 60 _1	CHRB	MLS	antibiotic target alteration	-
90 08 _1	TET(J)	tetracycline	antibiotic efflux	-
91 99 _1	APH(3')-VIII A	aminoglycoside	antibiotic inactivation	-
17 03 7_ 1	ESCHERICHIA COLI EF-TU MUTANTS CONFERRING RESISTANCE TO PULVOMYCIN	elfamycin	antibiotic target alteration	-
18 35 1_ 1	TET(A)	tetracycline	antibiotic efflux	-
67 19 _1	OXA-724	beta-lactam	antibiotic inactivation	-
14 22 1_ 1	VPH	peptide	antibiotic inactivation	-

20 80 2_ 1	TRUNCATED_PUTATIVE_RESPON SE_REGULATOR_ARLR	-	-	-
21 51 6_ 1	VANYB	glycopeptid e	antibiotic target alteration	-
26 67 9_ 1	TETP	tetracycline	-	plasmid
26 68 0_ 1	TETB(P)	tetracycline	antibiotic target protection	chromos ome
58 1_ 1	STAPHYLOCOCCUS MUPB CONFERRING RESISTANCE TO MUPIROCIN	mupirocin	antibiotic target alteration	-
27 50 _1	TET(A)	tetracycline	antibiotic efflux	-
92 09 _1	LARIBACTER HONGKONGENSIS AMPC BETA-LACTAMASE	beta-lactam	antibiotic inactivatio n	phage
12 30 0_ 1	ERM(38)	MLS	antibiotic target alteration	-
26 87 7_ 1	MPHF	MLS	antibiotic inactivatio n	-
26 88 8_ 1	MPHF	MLS	antibiotic inactivatio n	-
13 82 8_ 1	MOX-2	beta-lactam	antibiotic inactivatio n	-
25 19 6_ 1	ACI-1	beta-lactam	antibiotic inactivatio n	-
29 69	MTRD	multidrug	antibiotic efflux	-

7_1				
30529_1	ACT-30	beta-lactam	antibiotic inactivation	-
30628_1	COB(I)ALAMIN_ADENOLSYLTRANSFERASE	-	-	-
5988_1	ERM(43)	MLS	antibiotic target alteration	-
6078_1	OPTRA	multidrug	antibiotic target protection	-
17457_1	LNUE	MLS	antibiotic inactivation	-
23401_1	MGTA	MLS	antibiotic inactivation	-
24704_1	CRP	multidrug	antibiotic efflux	-
1234_1	CATU	phenicol	antibiotic inactivation	phage

PL6. Dự đoán gene KKS mẫu DT3-F19

O RF	Gene KKS	Danh mục kháng sinh kháng	Cơ chế kháng sinh	Dự đoán gene di động
110241_1	CARA	multidrug	antibiotic target protection	-
116855_1	ADEB	multidrug	antibiotic efflux	phage
11	ADEJ	multidrug	antibiotic efflux	phage

71 16 _1				
11 90 31 _1	RPOB2	multidrug	antibiotic target alteration;antibiotic target replacement	phage
12 25 62 _1	LLMA 23S RIBOSOMAL RNA METHYLTRANSFERASE	MLS	antibiotic target alteration	-
13 31 27 _1	TRUNCATED_PUTATIVE_RESPONSE_REGULATOR_ARLR	-	-	-
15 18 58 _1	TRUNCATED_PUTATIVE_RESPONSE_REGULATOR_ARLR	-	-	-
94 89 8_ 1	TET36	tetracycline	antibiotic target protection	-
15 59 74 _1	VANRI	glycopeptide	antibiotic target alteration	-
18 91 08 _1	BRUCELLA SUIS MPRF	peptide	antibiotic target alteration	-
18 98 93 _1	OXA-450	beta-lactam	antibiotic inactivation	-
21 03 17 _1	TETS	tetracycline	antibiotic target protection	phage
21 41 32 _1	CME-1	beta-lactam	antibiotic inactivation	-
22 42 20 _1	ERMS	MLS	antibiotic target alteration	-

10 21 19 _1	ACINETOBACTER BAUMANNII AMVA	multidrug	antibiotic efflux	-
23 29 33 _1	UGD	peptide	antibiotic target alteration	-
23 34 15 _1	APMA	aminoglyc oside	antibiotic inactivation	-
23 51 49 _1	EFMA	multidrug	antibiotic efflux	-
56 87 _1	LNUA	MLS	antibiotic inactivation	chromoso me
10 12 2_ 1	RPOB2	multidrug	antibiotic target alteration;antibioti c target replacement	phage
14 21 7_ 1	RMTG	aminoglyc oside	antibiotic target alteration	plasmid
21 55 2_ 1	APHA15	aminoglyc oside	antibiotic inactivation	-
33 40 5_ 1	CATQ	phenicol	antibiotic inactivation	-
48 62 4_ 1	TET36	tetracyclin e	antibiotic target protection	-
11 05 29 _1	ABCA	multidrug	antibiotic efflux	-
58 04 9_ 1	MEL	multidrug	antibiotic target protection	-

111 13 7_ 1	RMTE2	aminoglyc oside	antibiotic target alteration	-
66 57 6_ 1	ACINETOBACTER BAUMANNII ABAF	fosfomyci n	antibiotic efflux	-
75 11 8_ 1	BACILLUS SUBTILIS MPRF	peptide	antibiotic target alteration	-
76 24 1_ 1	MEXP	multidrug	antibiotic efflux	-
83 18 4_ 1	HMB-1	beta- lactam	antibiotic inactivation	-
85 50 4_ 1	TRUNCATED_PUTATIVE_ RESPONSE_REGULATOR_ ARLR	-	-	-
93 45 4_ 1	TET(W/N/W)	tetracyclin e	antibiotic target protection	-
10 32 96 _1	EFRB	multidrug	antibiotic efflux	phage
11 27 64 _1	DFRA14	diaminopy rimidine	antibiotic target replacement	-
11 53 78 _1	DIM-1	beta- lactam	antibiotic inactivation	-
11 61 22 _1	OLED	MLS	antibiotic inactivation	-
12 71 68	TLRC	multidrug	antibiotic target protection	-

_1				
13 73 02 _1	TRUNCATED_PUTATIVE_RESPONSE_REGULATOR_ARLR	-	-	-
13 76 73 _1	TETO	tetracycline	antibiotic target protection	-
14 11 15 _1	AAC(6')-IE-APH(2'')-IA	aminoglycoside	antibiotic inactivation	-
14 61 21 _1	TRUNCATED_PUTATIVE_RESPONSE_REGULATOR_ARLR	-	-	-
14 65 60 _1	APH(6)-ID	aminoglycoside	antibiotic inactivation	-
17 04 12 _1	LRA-19	beta-lactam	antibiotic inactivation	-
12 54 82 _1	RMTG	aminoglycoside	antibiotic target alteration	-
20 24 31 _2	AMRB	aminoglycoside	antibiotic efflux	phage
20 83 50 _1	CARA	multidrug	antibiotic target protection	-
13 14 _1	ADEB	multidrug	antibiotic efflux	plasmid
23 27 _1	TET(W/N/W)	tetracycline	antibiotic target protection	phage
11 14 5_ 1	VATD	MLS	antibiotic inactivation	ambiguous (phage/chromosome)

15 31 3_ 1	CFXA6	beta-lactam	antibiotic inactivation	-
18 81 5_ 1	TET36	tetracycline	antibiotic target protection	-
18 81 6_ 1	VANU	glycopeptide	-	-
19 44 4_ 1	MEXQ	multidrug	antibiotic efflux	-
37 14 3_ 1	TETB(60)	tetracycline	antibiotic efflux	-
44 07 2_ 1	VANTG	glycopeptide	antibiotic target alteration	-
46 11 1_ 1	AGROBACTERIUM FABRUM CHLORAMPHENICOL ACETYLTRANSFERASE	phenicol	antibiotic inactivation	-
13 26 0_ 1	OXA-347	beta-lactam	antibiotic inactivation	plasmid
13 26 1_ 1	ERMF	MLS	antibiotic target alteration	plasmid
57 02 9_ 1	STREPTOCOCCUS AGALACTIAE MPRF	peptide	antibiotic target alteration	-
57 07 3_ 1	RMTG	aminoglycoside	antibiotic target alteration	-
60 21 6_	OPMB	multidrug	antibiotic efflux	phage

1				
64 47 6_ 1	EMRB- QACA_FAMILY_MAJOR_F ACILITATOR_TRANSPORT ER	fluoroquin olone	antibiotic efflux	-
66 24 1_ 1	VIBRIO ANGUILLARUM CHLORAMPHENICOL ACETYLTRANSFERASE	phenicol	antibiotic inactivation	-
99 12 3_ 1	OXA-483	beta- lactam	antibiotic inactivation	phage
10 04 40 _1	RMTG	aminoglyc oside	antibiotic target alteration	-
10 20 17 _1	AAC[95]-XA	aminoglyc oside	antibiotic inactivation	-
13 74 23 _1	VANRI	glycopepti de	antibiotic target alteration	phage
10 44 16 _1	TRUNCATED_PUTATIVE_ RESPONSE_REGULATOR_ ARLR	-	-	-
11 28 88 _1	MEFA	MLS	antibiotic efflux	-
11 36 79 _1	FACT	elfamycin	antibiotic efflux	-
12 66 09 _1	VANSA	glycopepti de	antibiotic target alteration	-
12 69 07 _1	TETB(P)	tetracyclin e	antibiotic target protection	-
13 00	EMTA	MLS	antibiotic target alteration	phage

33 _1				
14 18 18 _1	VANXYE	glycopeptide	antibiotic target alteration	phage
14 59 1_1	ERMX	MLS	antibiotic target alteration	plasmid
18 06 34 _1	MEXB	multidrug	antibiotic efflux	-
18 12 00 _1	LRA-3	beta-lactam	antibiotic inactivation	phage
19 14 30 _1	RPHA	rifamycin	antibiotic inactivation	-
14 70 11 _1	APH(2")-IF	aminoglycoside	antibiotic inactivation	phage
19 64 61 _1	TETA(60)	tetracycline	antibiotic efflux	-
14 81 17 _1	TET(E)	tetracycline	antibiotic efflux	-
21 00 19 _1	FARB	antibacterial_free_fatty_acids	antibiotic efflux	-
11 57 _1	VANSF	glycopeptide	antibiotic target alteration	plasmid
44 84 _1	LLMA_23S_RIBOSOMAL_RNA_METHYLTRANSFERASE	MLS	antibiotic target alteration	chromosome
16 55 0_	OXA-243	beta-lactam	antibiotic inactivation	-

1				
16 96 5_ 1	TRUNCATED_PUTATIVE_ RESPONSE_REGULATOR_ ARLR	-	-	-
19 59 2_ 1	TET(40)	tetracyclin e	antibiotic efflux	-
15 04 79 _1	VANRI	glycopepti de	antibiotic target alteration	phage
23 95 0_ 1	RMTG	aminoglyc oside	antibiotic target alteration	-
25 38 6_ 1	SHV-43	beta- lactam	antibiotic inactivation	-
31 83 8_ 1	MCR-9.1	peptide	antibiotic target alteration	-
15 13 62 _1	TET32	tetracyclin e	antibiotic target protection	-
51 60 0_ 1	ANT(6)-IA	aminoglyc oside	antibiotic inactivation	-
61 97 5_ 1	SHV-43	beta- lactam	antibiotic inactivation	-
62 56 4_ 1	TETO	tetracyclin e	antibiotic target protection	-
69 62 1_ 1	AAD(6)	aminoglyc oside	antibiotic inactivation	-
74 71	TET(W/N/W)	tetracyclin e	antibiotic target protection	-

7_1				
78 18 2_1	OPRM	multidrug	antibiotic efflux	-
81 75 3_1	VANHB	glycopeptide	antibiotic target alteration	-
10 14 43_1	RMTG	aminoglycoside	antibiotic target alteration	-
10 25 03_1	LRA-12	beta-lactam	antibiotic inactivation	-
10 38 95_1	EFRB	multidrug	antibiotic efflux	-
10 67 24_1	BIC-1	beta-lactam	antibiotic inactivation	phage
10 69 08_1	ACINETOBACTER BAUMANNII ABAQ	fluoroquinolone	antibiotic efflux	-
12 14 73_1	DFRF	diaminopyrimidine	antibiotic target replacement	phage
16 05 74_1	ADEB	multidrug	antibiotic efflux	-
12 41 46_1	AAC(2')-IIB	aminoglycoside	antibiotic inactivation	-
12 42 91_1	TET32	tetracycline	antibiotic target protection	-
13	CFXA6	beta-	antibiotic	-

12 73 _1		lactam	inactivation	
13 65 60 _1	SUL3	sulfonamide	antibiotic target replacement	-
16 23 00 _1	VANRI	glycopeptide	antibiotic target alteration	-
14 42 62 _1	OPTRA	multidrug	antibiotic target protection	phage
14 42 63 _1	AAC(6')-IE-APH(2'')-IA	aminoglycoside	antibiotic inactivation	-
14 72 72 _1	DFRA8	diaminopyrimidine	antibiotic target replacement	-
16 32 19 _1	CME-1	beta-lactam	antibiotic inactivation	phage
15 39 25 _1	TRUNCATED_PUTATIVE_RESPONSE_REGULATOR_ARLR	-	-	-
15 51 70 _1	ACI-1	beta-lactam	antibiotic inactivation	-
15 54 14 _1	ERMF	MLS	antibiotic target alteration	phage
15 75 29 _1	AAC(2')-IA	aminoglycoside	antibiotic inactivation	phage
16 06 47 _1	BACILLUS PUMILUS CAT86	phenicol	antibiotic inactivation	-

16 37 06 _1	BAES	aminoglyc oside:amin ocoumarin	antibiotic efflux	phage
16 43 80 _1	VANYF	glycopepti de	antibiotic target alteration	-
16 53 11 _1	L1 BETA-LACTAMASE	beta- lactam	antibiotic inactivation	-
16 59 73 _1	TETQ	tetracyclin e	antibiotic target protection	-
18 21 16 _1	OXA-53	beta- lactam	antibiotic inactivation	-
16 79 91 _1	UGD	peptide	antibiotic target alteration	phage
20 27 52 _1	TET(D)	tetracyclin e	antibiotic efflux	-
20 52 72 _1	EFMA	multidrug	antibiotic efflux	phage
17 99 25 _1	TRUNCATED_PUTATIVE_ RESPONSE_REGULATOR_ ARLR	-	-	-
18 10 98 _1	ESCHERICHIA COLI AMPC1 BETA- LACTAMASE	beta- lactam	antibiotic inactivation	phage
18 28 17 _1	LRA-3	beta- lactam	antibiotic inactivation	phage
18 31 11	TET(49)	tetracyclin e	antibiotic inactivation	-

_1				
18 53 61 _1	TET32	tetracycline	antibiotic target protection	-
18 57 99 _1	PEXA	phenicol	antibiotic efflux	phage
19 23 22 _1	TET(59)	tetracycline	antibiotic efflux	-
19 24 76 _1	MPHB	MLS	antibiotic inactivation	phage
20 24 72 _1	ERMF	MLS	antibiotic target alteration	-
55 91 _1	SHV-43	beta-lactam	antibiotic inactivation	chromosome
99 87 _1	ADEJ	multidrug	antibiotic efflux	-
18 95 2_ 1	ERMQ	MLS	antibiotic target alteration	-
21 02 9_ 1	TETP	tetracycline	-	-
21 03 0_ 1	TETB(P)	tetracycline	antibiotic target protection	-
39 49 6_ 1	ANT(6)-IA	aminoglycoside	antibiotic inactivation	-
39 63 5_ 1	ANT(6)-IA	aminoglycoside	antibiotic inactivation	phage

39 63 6_ 1	AAC(6')-IE-APH(2'')-IA	aminoglyc oside	antibiotic inactivation	-
24 89 9_ 1	MEFA	MLS	antibiotic efflux	-
24 90 0_ 1	MEL	multidrug	antibiotic target protection	-
64 98 0_ 1	TRUNCATED_PUTATIVE_ RESPONSE_REGULATOR_ ARLR	-	-	-
65 67 2_ 1	MCR-2.2	peptide	antibiotic target alteration	phage
88 15 0_ 1	EMEA	acridine_d ye	antibiotic efflux	-
92 64 2_ 1	ROSA	peptide	antibiotic efflux	-
10 14 76 _1	TRUNCATED_PUTATIVE_ RESPONSE_REGULATOR_ ARLR	-	-	phage
10 77 94 _1	TET(E)	tetracyclin e	antibiotic efflux	-
28 59 4_ 1	TETW	tetracyclin e	antibiotic target protection	-
11 94 85 _1	UGD	peptide	antibiotic target alteration	-
12 50 44	AADS	aminoglyc oside	antibiotic inactivation	-

_1				
12 50 45 _1	ERED	MLS	antibiotic inactivation	phage
12 59 15 _1	TET(W/N/W)	tetracyclin e	antibiotic target protection	-
12 75 74 _1	VANS	glycopepti de	-	phage
29 72 9_ 1	ACRE	multidrug	antibiotic efflux	-
14 13 89 _1	CMLB1	phenicol	antibiotic efflux	-
14 14 13 _1	CMLB1	phenicol	antibiotic efflux	-
15 28 95 _1	MSRE	multidrug	antibiotic target protection	-
15 54 58 _1	TET32	tetracyclin e	antibiotic target protection	-
16 35 92 _1	FLOR	phenicol	antibiotic efflux	-
31 47 2_ 1	STREPTOCOCCUS SUIS CHLORAMPHENICOL ACETYLTRANSFERASE	phenicol	antibiotic inactivation	-
17 15 06 _1	OPTRA	multidrug	antibiotic target protection	-
18 06	MDSC	multidrug	antibiotic efflux	-

44 _1				
18 25 12 _1	TET(C)	tetracycline	antibiotic efflux	-
18 25 71 _1	POXTA	multidrug	antibiotic target protection	phage
19 67 94 _1	TETR	tetracycline	antibiotic efflux;antibiotic target alteration	phage
20 02 95 _1	APH(2'')-IF	aminoglycoside	antibiotic inactivation	-
20 53 86 _1	TLRC	multidrug	antibiotic target protection	-
21 57 40 _1	MPHF	MLS	antibiotic inactivation	-
21 60 73 _1	LNUP	MLS	antibiotic inactivation	phage
21 74 81 _1	TRUNCATED_PUTATIVE_RESPONSE_REGULATOR_ARLR	-	-	-
21 78 38 _1	RPHA	rifamycin	antibiotic inactivation	phage
22 29 84 _1	VANRG	glycopeptide	antibiotic target alteration	phage
22 58 20 _1	IMP-28	beta-lactam	antibiotic inactivation	phage
22	APH(3')-IIIA	aminoglyc	antibiotic	-

63 24 _1		oside	inactivation	
22 81 74 _1	EFRB	multidrug	antibiotic efflux	-
37 67 2_ 1	TRUNCATED_PUTATIVE_RESPONSE_REGULATOR_ARLR	-	-	-
23 33 30 _1	CDEA	multidrug	antibiotic efflux	-
23 79 11 _1	TRUNCATED_PUTATIVE_RESPONSE_REGULATOR_ARLR	-	-	phage
24 57 67 _1	APH(6)-ID	aminoglyc oside	antibiotic inactivation	-
24 57 68 _1	APH(3'')-IB	aminoglyc oside	antibiotic inactivation	-
24 59 17 _1	LSAE	multidrug	antibiotic target protection	-
24 59 18 _1	LNUB	MLS	antibiotic inactivation	-
24 62 98 _1	APH(3')-IIIA	aminoglyc oside	antibiotic inactivation	-
24 63 91 _1	AXYY	multidrug	antibiotic efflux	phage
24 70 39 _1	LPEB	MLS	antibiotic efflux	-

13 9_ 1	NDM-18	beta-lactam	antibiotic inactivation	plasmid
35 4_ 1	NDM-18	beta-lactam	antibiotic inactivation	-
17 65_ 1	MEXK	multidrug	antibiotic efflux	-
12 92 5_ 1	APH(6)-ID	aminoglycoside	antibiotic inactivation	-
18 17 5_ 1	AIM-1	beta-lactam	antibiotic inactivation	-
23 81 3_ 1	AAC(6')-IE-APH(2'')-IA	aminoglycoside	antibiotic inactivation	-
46 68 4_ 1	LLMA_23S_RIBOSOMAL_RNA_METHYLTRANSFERASE	MLS	antibiotic target alteration	phage
57 43 8_ 1	APH(3')-IA	aminoglycoside	antibiotic inactivation	-
71 05 0_ 1	RPHB	rifamycin	antibiotic inactivation	-
73 81 6_ 1	CLBB	multidrug	antibiotic target alteration	-
77 53 1_ 1	SUL2	sulfonamide	antibiotic target replacement	-
48 99 1_ 1	CMLB1	phenicol	antibiotic efflux	-
10 06	EFRA	multidrug	antibiotic efflux	-

11 _1				
10 06 12 _1	EFRB	multidrug	antibiotic efflux	-
11 13 44 _1	TRUNCATED_PUTATIVE_RESPONSE_REGULATOR_ARLR	-	-	-
11 88 22 _1	RPOB2	multidrug	antibiotic target alteration;antibiotic target replacement	phage
12 21 81 _1	EFRB	multidrug	antibiotic efflux	phage
12 28 18 _1	VAND	glycopeptide	antibiotic target alteration	-
12 38 44 _1	DFRA26	diaminopyrimidine	antibiotic target replacement	-
12 43 00 _1	LLMA_23S_RIBOSOMAL_RNA_METHYLTRANSFERASE	MLS	antibiotic target alteration	-
13 83 50 _1	MEXM	phenicol	antibiotic efflux	-
15 01 23 _1	TRUNCATED_PUTATIVE_RESPONSE_REGULATOR_ARLR	-	-	-
45 89 _1	RLMA(II)	MLS	antibiotic target alteration	plasmid
15 99 55 _1	APH(6)-IB	aminoglycoside	antibiotic inactivation	-
17 96	SALA	multidrug	antibiotic target protection	phage

35 _1				
18 47 54 _1	OXA-243	beta-lactam	antibiotic inactivation	phage
19 41 32 _1	RMTH	aminoglycoside	antibiotic target alteration	phage
20 00 29 _1	FOSB4	fosfomycin	antibiotic inactivation	-
20 39 60 _1	PMRA	fluoroquinolone	antibiotic efflux	-
21 18 26 _1	EFRA	multidrug	antibiotic efflux	phage
21 98 58 _1	CGA-1	beta-lactam	antibiotic inactivation	-
23 00 89 _1	OXA-354	beta-lactam	antibiotic inactivation	phage
23 12 73 _1	TRUNCATED_PUTATIVE_RESPONSE_REGULATOR_ARLR	-	-	-
23 24 80 _1	LRA-2	beta-lactam	antibiotic inactivation	phage
23 48 02 _1	TETM	tetracycline	antibiotic target protection	-
23 89 42 _1	FEXA	phenicol	antibiotic efflux	-
35	MEXL	multidrug	antibiotic efflux	-

3_1				
21_89_1	VANSL	glycopeptide	antibiotic target alteration	chromosome
80_28_1	MPHJ	MLS	antibiotic inactivation	plasmid
82_76_1	AAC(6')-IE-APH(2'')-IA	aminoglycoside	antibiotic inactivation	-
98_96_1	TETX	tetracycline	antibiotic inactivation	-
29_36_9_1	MCR-2.2	peptide	antibiotic target alteration	-
42_56_9_1	MSBA	nitroimidazole	antibiotic efflux	phage
76_74_1_1	TETX	tetracycline	antibiotic inactivation	-
79_17_7_1	PLASMID-ENCODED CAT (PP-CAT)	phenicol	antibiotic inactivation	-
79_93_7_1	TRUNCATED_PUTATIVE_RESPONSE_REGULATOR_ARLR	-	-	phage
95_48_3_1	VANRI	glycopeptide	antibiotic target alteration	phage
98_20_4_1	RMTG	aminoglycoside	antibiotic target alteration	-
10_86_95_1	MEF(EN2)	MLS	antibiotic efflux	-
10	LNUA	MLS	antibiotic	-

86 96 _1			inactivation	
11 68 87 _1	VANWB	glycopeptide	antibiotic target alteration	phage
13 98 63 _1	VANU	glycopeptide	-	-
15 17 94 _1	EMTA	MLS	antibiotic target alteration	-
15 46 99 _1	SMEE	multidrug	antibiotic efflux	-
17 29 58 _1	TET[94]	tetracycline	antibiotic target protection	-
17 76 75 _1	EXO-1	beta-lactam	antibiotic inactivation	-
19 45 59 _1	VANRA	glycopeptide	antibiotic target alteration	-
19 84 44 _1	JOHN-1	beta-lactam	antibiotic inactivation	-
19 91 33 _1	PATA	fluoroquinolone	antibiotic efflux	-
20 94 56 _1	LRA-19	beta-lactam	antibiotic inactivation	-
21 33 80 _1	VATA	MLS	antibiotic inactivation	-

21 39 09 _1	AAC(6')-IIB	aminoglyc oside	antibiotic inactivation	-
21 50 39 _1	CMEC	multidrug	antibiotic efflux	-
22 14 61 _1	LNUC	MLS	antibiotic inactivation	-
22 37 48 _1	TET(47)	tetracyclin e	antibiotic inactivation	-
22 63 92 _1	VANR	glycopepti de	-	phage
22 79 18 _1	CFXA3	beta- lactam	antibiotic inactivation	-
23 16 04 _1	TRUNCATED_PUTATIVE_ RESPONSE_REGULATOR_ ARLR	-	-	phage
23 87 63 _1	LLMA_23S_RIBOSOMAL_ RNA_METHYLTRANSFER ASE	MLS	antibiotic target alteration	-
24 25 69 _1	STAPHYLOCOCCUS MUPB CONFERRING RESISTANCE TO MUPIROCIN	mupirocin	antibiotic target alteration	-
24 56 63 _1	TETB(58)	tetracyclin e	antibiotic efflux	-
24 57 39 _1	VANS	glycopepti de	-	-
41 70 _1	FARB	antibacteri al_free_fat ty_acids	antibiotic efflux	plasmid

16 09 6_ 1	RPOB2	multidrug	antibiotic target alteration;antibiotic target replacement	phage
20 82 8_ 1	OPMH	triclosan	antibiotic efflux	-
41 11 2_ 1	CARB-20	beta-lactam	antibiotic inactivation	-
47 47 6_ 1	TETM	tetracycline	antibiotic target protection	-
51 06 5_ 1	TET(C)	tetracycline	antibiotic efflux	-
59 83 2_ 1	MCR-4.1	peptide	antibiotic target alteration	-
70 12 5_ 1	MECC	beta-lactam	antibiotic target replacement	-
79 77 3_ 1	MCR-9.1	peptide	antibiotic target alteration	phage
95 44 5_ 1	BCRB	peptide	antibiotic efflux	-

PL7. Dự đoán gene KKS mẫu DT4-F20

ORF	Gene KKS	Danh mục kháng sinh kháng	Cơ chế kháng kháng sinh	Dự đoán gene di động
------------	-----------------	----------------------------------	--------------------------------	-----------------------------

1106 27_1	TRUNCATED_PUTATIVE_RESP ONSE_REGULATOR_ARLR	unclassified	-	unclassified
1123 69_1	CTX-M-151	beta- lactam	antibiotic inactivation	phage
1345 4_1	TRUNCATED_PUTATIVE_RESP ONSE_REGULATOR_ARLR	unclassified	-	phage
1133 49_1	MPHL	MLS	antibiotic inactivation	unclassified
1160 67_1	VAN	glycopepti de	antibiotic target alteration	unclassified
1177 22_1	ROSB	peptide	antibiotic efflux	unclassified
1039 3_1	CDEA	multidrug	antibiotic efflux	unclassified
1077 4_1	APMA	aminoglyc oside	antibiotic inactivation	unclassified
1620 8_1	OXA	beta- lactam	antibiotic inactivation	unclassified
2312 0_1	TET	tetracyclin e	antibiotic target protection	unclassified
3292 9_1	TET	tetracyclin e	antibiotic inactivation	phage
4766 8_1	TET	tetracyclin e	antibiotic target protection	unclassified

4785 4_1	MEXX	multidrug	antibiotic efflux	unclassified
5669 3_1	TET	tetracyclin e	antibiotic efflux	unclassified
5706 4_1	SMES	multidrug	antibiotic efflux	unclassified
6155 0_1	TRUNCATED_PUTATIVE_RESP ONSE_REGULATOR_ARLR	unclassifie d	-	phage
6590 2_1	LNUP	MLS	antibiotic inactivatio n	phage
6830 6_1	LSA	multidrug	antibiotic target protection	chromosom e
2303 7_1	VIBRIO ANGUILLARUM CHLORAMPHENICOL ACETYLTRANSFERASE	phenicol	antibiotic inactivatio n	unclassified
7723 2_1	ERMT	MLS	antibiotic target alteration	unclassified
7723 3_1	AAC(6')	aminoglyc oside	antibiotic inactivatio n	unclassified
8912 5_1	BRUCELLA SUIS MPRF	peptide	antibiotic target alteration	unclassified
9364 2_1	LLMA_23S_RIBOSOMAL_RNA_ METHYLTRANSFERASE	MLS	antibiotic target alteration	phage
3535 _1	ERMS	MLS	antibiotic target alteration	unclassified

1645 3_1	OXA	beta-lactam	antibiotic inactivation	unclassified
1800 7_1	ERM(35)	MLS	antibiotic target alteration	phage
2098 4_1	PEXA	phenicol	antibiotic efflux	unclassified
3382 7_1	OPTRA	multidrug	antibiotic target protection	phage
4100 1_1	MTRD	multidrug	antibiotic efflux	unclassified
6153 0_1	RHODOCOCCLUS FASCIANS CMR	phenicol	antibiotic efflux	unclassified
6859 7_1	TRUNCATED_PUTATIVE_RESP ONSE_REGULATOR_ARLR	unclassified	-	phage
3482 5_1	TET	tetracycline	antibiotic target protection	unclassified
7294 1_1	BIFIDOBACTERIUM ADOLESCENTIS RPOB MUTANTS CONFERRING RESISTANCE TO RIFAMPICIN	multidrug	antibiotic target alteration; antibiotic target replacement	unclassified
7810 9_1	LNUA	MLS	antibiotic inactivation	unclassified
9770 5_1	EFRB	multidrug	antibiotic efflux	ambiguous (phage/chromosome)

1058 57_1	JOHN-1	beta-lactam	antibiotic inactivation	phage
1107 24_1	APH[94]-IA	aminoglycoside	antibiotic inactivation	unclassified
1137 05_1	TET	tetracycline	antibiotic efflux	unclassified
1141 62_1	VAN	glycopeptide	-	unclassified
1178 01_1	PEDO-3	beta-lactam	antibiotic inactivation	unclassified
1183 61_1	ABCA	multidrug	antibiotic efflux	phage
184_1	CATQ	phenicol	antibiotic inactivation	unclassified
1842 9_1	ADP-RIBOSYLATING_TRANSFERASE_ARR	rifamycin	-	unclassified
4685 6_1	OXY-2-3	beta-lactam	antibiotic inactivation	unclassified
3736 2_1	TET	tetracycline	antibiotic target protection	unclassified
4645 1_1	TET	tetracycline	antibiotic efflux	phage
5327 5_1	CEOA	multidrug	antibiotic efflux	unclassified
5447	TRUNCATED_PUTATIVE_RESP	unclassified	-	unclassified

8_1	ONSE_REGULATOR_ARLR	d		
5549 0_1	AAC(6')	aminoglyc oside	antibiotic inactivatio n	unclassified
8471 8_1	RPOB2	multidrug	antibiotic target alteration; antibiotic target replaceme nt	unclassified
5194 1_1	TLRC	multidrug	antibiotic target protection	unclassified
9334 2_1	TET	tetracyclin e	antibiotic target protection	unclassified
9378 2_1	VAN	glycopepti de	-	unclassified
9777 2_1	TET	tetracyclin e	antibiotic target protection	phage
1016 08_1	ADEK	multidrug	antibiotic efflux	unclassified
1071 57_1	ANT(4')-IIB	aminoglyc oside	antibiotic inactivatio n	unclassified
1090 23_1	EFRA	multidrug	antibiotic efflux	unclassified
1090 24_1	EFRB	multidrug	antibiotic efflux	chromosom e
1103	AADS	aminoglyc	antibiotic inactivatio	unclassified

57_1		oside	n	
1112 82_1	AAC[95]-IIIC	aminoglycoside	antibiotic inactivation	phage
1161 52_1	TET	tetracycline	antibiotic efflux	unclassified
3629 _1	SUL	sulfonamide	antibiotic target replacement	unclassified
4461 _1	PGPB	peptide	antibiotic target alteration	unclassified
4770 _1	STAPHYLOCOCCUS MUPB CONFERRING RESISTANCE TO MUPIROCIN	mupirocin	antibiotic target alteration	unclassified
4879 _1	CMLB1	phenicol	antibiotic efflux	unclassified
1076 3_1	TET	tetracycline	antibiotic target protection	unclassified
1076 4_1	TET	tetracycline	-	chromosome
1276 4_1	TRUNCATED_PUTATIVE_RESP ONSE_REGULATOR_ARLR	unclassified	-	phage
5791 6_1	VAN	glycopeptide	antibiotic target alteration	phage
1588 9_1	OXA	beta-lactam	antibiotic inactivation	phage
1879	ANT(6)-IA	aminoglyc	antibiotic	unclassified

1_1		oside	inactivation	
2551 6_1	ERM(36)	MLS	antibiotic target alteration	unclassified
2652 5_1	EREA	MLS	antibiotic inactivation	unclassified
2802 0_1	TET	tetracycline	antibiotic target protection	unclassified
3047 7_1	TET	tetracycline	antibiotic target protection	unclassified
4757 2_1	OKP-A-1	beta-lactam	antibiotic inactivation	unclassified
5696 3_1	SUL	sulfonamide	antibiotic target replacement	unclassified
5857 5_1	TET	tetracycline	antibiotic efflux	unclassified
6519 9_1	LNUC	MLS	antibiotic inactivation	unclassified
6828 8_1	OXA	beta-lactam	antibiotic inactivation	unclassified
8159 6_1	TET	tetracycline	antibiotic target protection	unclassified

8203 5_1	APH(2'')-IIIA	aminoglycoside	antibiotic inactivation	unclassified
8241 1_1	LSAE	multidrug	antibiotic target protection	plasmid
8241 2_1	LNUB	MLS	antibiotic inactivation	unclassified
8453 4_1	VAN	glycopeptide	-	phage
8838 0_1	AAC(2')-IB	aminoglycoside	antibiotic inactivation	unclassified
9487 5_1	BCRA	bacitracin	antibiotic efflux	unclassified
740_ 1	STAPHYLOCOCCUS MUPA CONFERRING RESISTANCE TO MUPIROCIN	mupirocin	antibiotic target alteration	unclassified
1150 0_1	TRUNCATED_PUTATIVE_RESP ONSE_REGULATOR_ARLR	unclassified	-	unclassified
1175 6_1	TET	tetracycline	antibiotic target protection	unclassified
2282 5_1	KLEBSIELLA PNEUMONIAE OMPK37	beta-lactam	reduced permeability to antibiotic	unclassified
2762 4_1	APH(3')	aminoglycoside	antibiotic inactivation	unclassified
3215	NOVA	aminocou	antibiotic	unclassified

6_1		marin	efflux	
4126 5_1	OXA	beta-lactam	antibiotic inactivation	unclassified
4546 1_1	NOVA	aminocoumarin	antibiotic efflux	unclassified
4864 6_1	ADEJ	multidrug	antibiotic efflux	unclassified
5051 0_1	MCR-1.4	peptide	antibiotic target alteration	phage
5731 9_1	MEXW	multidrug	antibiotic efflux	unclassified
7081 4_1	IMI-1	beta-lactam	antibiotic inactivation	unclassified
7269 3_1	TRUNCATED_PUTATIVE_RESP ONSE_REGULATOR_ARLR	unclassified	-	unclassified
7396 1_1	ANT(6)-IA	aminoglycoside	antibiotic inactivation	unclassified
7914 8_1	MDTB	aminocoumarin	antibiotic efflux	unclassified
8873 9_1	CORYNEBACTERIUM STRIATUM TETA	multidrug	antibiotic efflux	phage
1138 _1	MPHC	MLS	antibiotic inactivation	unclassified
1674 _1	APH(3'')-IB	aminoglycoside	antibiotic inactivation	unclassified
9279	APH(3')	aminoglyc	antibiotic	unclassified

_1		oside	inactivation	
1196 9_1	AAC(6')-30/AAC(6')-IB' FUSION PROTEIN	aminoglyc oside	antibiotic inactivation	unclassified
1347 9_1	SUL	sulfonami de	antibiotic target replaceme nt	unclassified
3069 6_1	OLEB	multidrug	antibiotic target protection	phage
3248 2_1	VAN	glycopepti de	-	phage
3707 3_1	TET	tetracyclin e	antibiotic target protection	unclassified
4462 7_1	TET	tetracyclin e	antibiotic target protection	unclassified
6476 0_1	LRA-18	beta- lactam	antibiotic inactivation	unclassified
9143 8_1	BIFIDOBACTERIUM ADOLESCENTIS RPOB MUTANTS CONFERRING RESISTANCE TO RIFAMPICIN	multidrug	antibiotic target alteration; antibiotic target replaceme nt	unclassified
7891 5_1	APH(3'')-IB	aminoglyc oside	antibiotic inactivation	unclassified

8221 7_1	SDIA	multidrug	antibiotic efflux	unclassified
9198 4_1	TET	tetracycline	antibiotic target protection	unclassified
1005 25_1	MEF(EN2)	MLS	antibiotic efflux	unclassified
1036 33_1	TET	tetracycline	antibiotic efflux	unclassified
1039 79_1	VAN	glycopeptide	antibiotic target alteration	unclassified
3324 _1	VAN	glycopeptide	antibiotic target alteration	phage
5380 _1	ROSB	peptide	antibiotic efflux	unclassified
1476 8_1	APH(3'')-IB	aminoglycoside	antibiotic inactivation	unclassified
1683 6_1	AADA5	aminoglycoside	antibiotic inactivation	phage
2052 0_1	CDEA	multidrug	antibiotic efflux	unclassified
2660 0_1	RLMA(II)	MLS	antibiotic target alteration	unclassified
3416 6_1	OPTRA	multidrug	antibiotic target protection	phage
3607	OPRZ	multidrug	antibiotic	unclassified

3_1			efflux	
4077 2_1	MEXN	phenicol	antibiotic efflux	unclassified
4386 6_1	BASS	peptide	antibiotic efflux;anti biotic target alteration	unclassified
4394 0_1	OXA	beta- lactam	antibiotic inactivatio n	unclassified
5498 2_1	VAN	glycopepti de	antibiotic target alteration	unclassified
5701 6_1	TET	tetracyclin e	antibiotic target protection	unclassified
6083 3_1	TRUNCATED_PUTATIVE_RESP ONSE_REGULATOR_ARLR	unclassifie d	-	unclassified
6588 3_1	OPRZ	multidrug	antibiotic efflux	unclassified
7088 6_1	BIFIDOBACTERIUM ILES CONFERRING RESISTANCE TO MUPIROCIN	mupirocin	antibiotic target alteration	phage
7675 6_1	AAC(6')	aminoglyc oside	antibiotic inactivatio n	unclassified
1010 49_1	TET	tetracyclin e	antibiotic target protection	unclassified
1043 63_1	GOLS	multidrug	antibiotic efflux	unclassified

1119 38_1	OXA	beta-lactam	antibiotic inactivation	unclassified
1123 15_1	AADA5	aminoglycoside	antibiotic inactivation	phage
1123 94_1	TET	tetracycline	antibiotic efflux	unclassified
1181 42_1	OXA	beta-lactam	antibiotic inactivation	unclassified
1186 50_1	TET	tetracycline	antibiotic inactivation	unclassified
1187 31_1	DFRG	diaminopyrimidine	antibiotic target replacement	unclassified