

**ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN**  
**VIỆN SINH THÁI VÀ TÀI NGUYÊN SINH VẬT**

**Nguyễn Hồng Nhung**

**NGHIÊN CỨU ĐA DẠNG HỆ VI SINH**  
**TRONG RUỘT TÔM THẺ CHÂN TRẮNG TẠI TỈNH SÓC TRĂNG**  
**BẰNG KỸ THUẬT METAGENOMICS**

**LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC THỰC NGHIỆM**

Hà Nội - 2018

**ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN**  
**VIỆN SINH THÁI VÀ TÀI NGUYÊN SINH VẬT**

**Nguyễn Hồng Nhung**

**NGHIÊN CỨU ĐA DẠNG HỆ VI SINH**  
**TRONG RUỘT TÔM THẺ CHÂN TRẮNG TẠI TỈNH SÓC TRĂNG**  
**BẰNG KỸ THUẬT METAGENOMICS**

Chuyên ngành: Sinh học thực nghiệm

Mã số: 8.42.01.14

NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC:

PGS. TS. Chu Hoàng Hà

Hà Nội – 2018

## **LỜI CAM ĐOAN**

Tôi xin cam đoan đây là công trình nghiên cứu của tôi được thực hiện dưới sự hướng dẫn của PGS. TS. Chu Hoàng Hà và TS. Nguyễn Trung Nam. Các nội dung nghiên cứu, kết quả trong đề tài này là trung thực và chưa từng được ai công bố dưới bất kỳ hình thức nào.

Luận văn sử dụng thông tin, số liệu và hình ảnh từ các bài báo và nguồn tài liệu của các tác giả khác đều được chú thích và trích dẫn đầy đủ.

Nếu có bất kỳ sự gian lận nào, tôi xin chịu trách nhiệm hoàn toàn về nội dung luận văn.

Hà Nội, tháng 11 năm 2018

Học viên

**Nguyễn Hồng Nhung**

## LỜI CẢM ƠN

*Lời đầu tiên tôi xin gửi lời cảm ơn tới PGS.TS Chu Hoàng Hà và TS. Nguyễn Trung Nam đã tận tình hướng dẫn và tạo mọi điều kiện thuận lợi, giúp đỡ tôi trong suốt quá trình học tập, làm việc và hoàn thành luận văn.*

*Xin chân thành cảm ơn Ths. Lê Hoàng Đức, cùng tập thể cán bộ, nghiên cứu sinh, học viên Phòng Công nghệ ADN ứng dụng và Phòng Công nghệ tế bào thực vật, Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam đã nhiệt tình giúp đỡ, truyền đạt kinh nghiệm quý báu cho tôi trong suốt thời gian thực hiện luận văn.*

*Tôi cũng xin gửi lời cảm ơn tới các thầy cô giáo và Ban đào tạo Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật đã hướng dẫn, truyền đạt kiến thức cho tôi trong suốt thời gian học tập và nghiên cứu.*

*Cuối cùng, tôi xin cảm ơn đến bạn bè và gia đình đã giúp đỡ và chia sẻ, động viên trong suốt quá trình học tập cũng như thực hiện luận văn.*

*Hà Nội, tháng 11 năm 2018*

*Học viên*

**Nguyễn Hồng Nhung**

## MỤC LỤC

LỜI CAM ĐOAN .....	i
LỜI CẢM ƠN .....	ii
MỤC LỤC.....	iii
DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU, CÁC CHỮ VIẾT TẮT.....	v
DANH MỤC CÁC BẢNG.....	vii
DANH MỤC CÁC HÌNH.....	viii
MỞ ĐẦU.....	1
1. Giới thiệu.....	1
2. Mục tiêu của đề tài .....	2
NỘI DUNG .....	3
Chương 1. Tổng quan tài liệu.....	3
1.1. Đặc điểm sinh học tôm thẻ chân trắng.....	3
1.1.1. Hệ thống phân loại, đặc điểm hình thái cấu tạo của tôm thẻ chân trắng.....	3
1.1.2. Đặc điểm sinh trưởng, sinh thái và tập tính của tôm thẻ chân trắng; phân bố tự nhiên của tôm thẻ chân trắng .....	4
1.2. Tình hình nuôi tôm thẻ chân trắng trên thế giới và tại Việt Nam.....	6
1.2.1. Tình hình nuôi tôm thẻ chân trắng trên thế giới và tại Việt Nam .....	6
1.2.2. Tình hình dịch bệnh trên tôm nuôi và các biện pháp phòng trừ bệnh trên thế giới và Việt Nam.....	8
1.3. Công nghệ metagenomics và hướng tiếp cận mới trong nuôi trồng và phòng trừ bệnh hại trên tôm nuôi.....	10
1.3.1. Giới thiệu về công nghệ metagenomics .....	10
1.3.2. Các nghiên cứu và thành tựu của công nghệ metagenomics trong lĩnh vực thủy sản.....	13
1.3.3. Công nghệ giải trình tự gen thế hệ mới (Next generation sequencing – NGS) và hệ thống giải trình gen thế hệ mới Illumina.....	19
1.3.3.1. Công nghệ giải trình tự gen thế hệ mới .....	19
1.3.3.2. Công nghệ giải trình tự gen thế hệ thứ hai của Illumina.....	20

Chương 2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu .....	24
2.1. Vật liệu.....	24
2.1.1. Vật liệu nghiên cứu.....	24
2.1.2. Hóa chất phục vụ nghiên cứu.....	24
2.1.3. Thiết bị phục vụ nghiên cứu.....	24
2.2. Phương pháp nghiên cứu .....	24
2.2.1. Phương pháp thu mẫu .....	25
2.2.2. Các phương pháp phân tích mẫu nước .....	25
2.2.3. Phương pháp tách ADN .....	25
2.2.4. Đánh giá chất lượng ADN tách chiết.....	33
2.2.5. Các phương pháp giải trình tự .....	33
2.2.6. Xử lý số liệu giải trình tự gen ADN 16S rARN .....	33
Chương 3. Kết quả và thảo luận.....	35
3.1. Kết quả thu mẫu và đánh giá các chỉ tiêu môi trường .....	35
3.2. Kết quả tách ADN tổng số của các mẫu ruột, nước .....	37
3.2.1. Kết quả tách ADN mẫu ruột.....	38
3.2.2. Kết quả tách ADN mẫu nước.....	41
3.3. Kết quả xác định trình tự metagenome ADN .....	46
3.3.1. Xác định trình tự ADN metagenome .....	46
3.3.2. Kết quả phân tích đa dạng vi sinh vật mẫu ruột và nước .....	48
3.3.3. Thành phần vi khuẩn trong mẫu tôm thẻ khỏe mạnh và bệnh .....	50
KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ.....	56
1. Kết luận.....	56
2. Đề nghị.....	56
TÀI LIỆU THAM KHẢO.....	57

## DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU, CÁC CHỮ VIẾT TẮT

<b>AHPND</b>	Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease	Chứng hoại tử gan tụy cấp
<b>BOD<sub>5</sub></b>	Biochemical Oxygen Demand	Nhu cầu oxy sinh hóa sau 5 ngày
<b>COD</b>	Chemical Oxygen Demand	Nhu cầu oxy hóa học
<b>EMS</b>	Early Mortality Syndrome	Hội chứng chết sớm
<b>FAO</b>	Food and Agriculture Organization of the United Nations	Tổ chức Lương thực và Nông nghiệp Liên Hiệp Quốc
<b>GAA</b>	Global Aquaculture Alliance	Liên minh Nuôi trồng Thủy sản Toàn cầu
<b>GOAL</b>	Global Outlook for Aquaculture Leadership	Hội nghị Dự báo Toàn cầu cho Giới lãnh đạo Nuôi trồng Thủy sản
<b>GOLD</b>	Genomes OnLine Database	
<b>MBV</b>	Monodon Baculovirus	Bệnh còi do <i>Monodon</i> <i>Baculovirus</i> gây ra
<b>OTUs</b>	Operational Taxonomic Units	Đơn vị phân loài
<b>PCR-DDGE</b>	Denaturing Gradient Gel Electrophoresis	Phương pháp PCR điện di gel dải nồng độ biến tính
<b>rt-PCR</b>	Real time PCR	
<b>SHIV</b>	Shrimp hemocyte iridescent virus	
<b>TAN</b>	Total ammonia nitrogen	Tổng đạm amôn
<b>TARS</b>	The Aquaculture Roundtable Series	Chuỗi Hội nghị bàn tròn về nuôi trồng thủy sản
<b>TDS</b>	Total Dissolved Solids	Tổng chất rắn hòa tan
<b>TN</b>	Total nitrogen	Tổng nitơ
<b>TP</b>	Total phosphorus	Tổng phospho

**TSS**

Turbidity and suspended solids

Tổng chất rắn lơ lửng



**DANH MỤC CÁC BẢNG**

<b>Bảng 3.1.</b> Thông tin các vị trí thu mẫu .....	35
<b>Bảng 3.2.</b> Kết quả phân tích các chỉ tiêu môi trường ao nuôi thu mẫu .....	36
<b>Bảng 3.3.</b> Kết quả định lượng ADN tổng số tách chiết theo ba phương pháp .....	39
<b>Bảng 3.4.</b> Kết quả định lượng ADN tổng số tách chiết theo ba phương pháp .....	42
<b>Bảng 3.5.</b> Bảng mô tả bộ dữ liệu giải trình tự gen trên máy Illumina.....	48
<b>Bảng 3.6.</b> Các thông số giải trình tự và các chỉ số đa dạng phân tích ở các mẫu nước, ruột của tôm thẻ bị bệnh và khỏe mạnh .....	49

## DANH MỤC CÁC HÌNH

<b>Hình 1.1.</b> Hình thái tôm thẻ chân trắng .....	3
<b>Hình 1.2.</b> Quy trình sản xuất tôm thẻ chân trắng ( <i>Nguồn: FAO</i> ) .....	6
<b>Hình 1.3.</b> Sản lượng tôm trên thế giới giai đoạn 1995-2017, dự báo đến năm 2019.	7
<b>Hình 1.4.</b> Tổng sản lượng tôm đánh bắt và nuôi trồng ( <i>Nguồn: FAO</i> ) .....	7
<b>Hình 1.5.</b> Số liệu sản xuất ngành tôm năm 2017.....	8
<b>Hình 1.6.</b> Xây dựng và sàng lọc thư viện metagenomics.....	12
<b>Hình 2.1.</b> Hình ảnh quá trình lọc nước qua các màng lọc có kích thước 8 $\mu\text{m}$ , 0,8 $\mu\text{m}$ và 0,22 $\mu\text{m}$ . .....	29
<b>Hình 3.1.</b> Hình ảnh ao nuôi tôm thu mẫu (A); và mẫu tôm khỏe (hình B, phải) và mẫu tôm bệnh (hình B, trái) .....	35
<b>Hình 3.2.</b> Sản phẩm tách chiết ADN tổng số từ mẫu ruột tôm sử dụng ba phương pháp khác nhau.....	39
<b>Hình 3.3.</b> Sơ đồ quy trình tách chiết metagenome ADN từ mẫu ruột tôm phục vụ giải trình tự gen thế hệ mới .....	41
<b>Hình 3.4.</b> Sản phẩm tách chiết ADN tổng số từ mẫu ruột tôm sử dụng ba phương pháp khác nhau.....	43
<b>Hình 3.5.</b> Hình ảnh điện di metagenomic ADN của mẫu với nhiệt độ ly giải 95 và 70 độ .....	44
<b>Hình 3.6.</b> Sơ đồ quy trình tách chiết metagenome ADN từ mẫu nước phục vụ giải trình tự gen thế hệ mới .....	46
<b>Hình 3.7.</b> Sơ đồ quy trình giải trình tự ADN metagenome .....	47
<b>Hình 3.8.</b> Kết quả kiểm tra thư viện ADN được gắn adapter của các mẫu bằng Bioanalyzer.....	47
<b>Hình 3.9.</b> Sơ đồ quá trình phân tích dữ liệu 16S rARN .....	48
<b>Hình 3.10.</b> Đường cong biểu diễn mối tương quan giữa số lượng trình tự và số lượng OTU ở các mẫu.....	50