

## Antibacterial activity of the black soldier fly (*Hermetia illucens*) larva protein hydrolysates against some pathogenic bacterial strains on freshwater fish

Nhu L. K. Nguyen, Duyen T. M. Tran, Tam P. B. Nguyen, & Thy T.T. Ho\*

Faculty of Fisheries, Nong Lam University, Ho Chi Minh City, Vietnam

### ARTICLE INFO

#### Research Paper

Received: August 28, 2023

Revised: October 16, 2023

Accepted: October 31, 2023

#### Keywords

Antimicrobial activity

Fresh water fish

*Hermetia illucens*

Pathogenic bacteria

Protein hydrolysates

#### \*Corresponding author

Ho Thi Truong Thy

Email:

thy.hothitruong@hcmuaf.edu.vn

### ABSTRACT

The study was carried out to determine the antibacterial activity of protein hydrolysates from black soldier fly (*Hermetia illucens*) larva (PHBSF) on some pathogenic bacteria including *E. ictaluri*, *A. hydrophila*, *A. veronii*, and *S. agalactiae* on freshwater fish. The results showed that the tested bacteria were highly sensitive with significant difference ( $P < 0.05$ ) in diameter clear zone compared to the negative control at the tested concentrations of 20, 35, and 70 mg/100  $\mu$ L. Particularly, *E. ictaluri* was sensitive at all three test concentrations with the diameter of clear zones following  $14.0 \pm 1.0$ ,  $18.7 \pm 0.7$ , and  $20.7 \pm 0.7$  mm, respectively. *A. veronii* and *S. agalactiae* were sensitive at concentrations of 35 and 70 mg/100  $\mu$ L, and *A. hydrophila* with a clear zone diameter of  $14.3 \pm 0.3$  mm at the concentration of 70 mg/100  $\mu$ L. The PHBSF was able to kill *A. veronii* and *S. agalactiae* with MIC (minimum inhibitory concentration) = MBC (minimum bactericidal concentration) = 44 mg/mL, while *E. ictaluri* and *A. hydrophila* were inhibited at MIC 44 mg/mL, and MBC was 88 mg/mL. These results indicated that PHBSF could be potentially used to prevent fish diseases caused by *E. ictaluri*, *A. hydrophila*, *A. veronii*, and *S. agalactiae*.

**Cited as:** Nguyen, N. L. K., Tran, D. T. M., Nguyen, T. P. B., & Ho, T. T. T. (2024). Antibacterial activity of the black soldier fly (*Hermetia illucens*) larva protein hydrolysates against some pathogenic bacterial strains on freshwater fish. *The Journal of Agriculture and Development* 23(2), 39-48.

## Xác định khả năng kháng khuẩn dịch đạm thủy phân của nhộng ruồi lính đen (*Hermetia illucens*) lên một số chủng vi khuẩn gây bệnh trên cá nuôi nước ngọt

Nguyễn Lam Kim Như, Trần Thị Mỹ Duyên, Nguyễn Phạm Băng Tâm & Hồ Thị Trường Thy\*

Khoa Thủy Sản, Trường Đại Học Nông Lâm TP.HCM, TP. Hồ Chí Minh

### THÔNG TIN BÀI BÁO

#### Bài báo khoa học

Ngày nhận: 28/08/2023

Ngày chỉnh sửa: 16/10/2023

Ngày chấp nhận: 31/10/2023

#### Từ khóa

Cá nước ngọt

Đạm thủy phân

*Hermetia illucens*

Kháng khuẩn

Vi khuẩn gây bệnh

#### \*Tác giả liên hệ

Hồ Thị Trường Thy

Email:

thy.hothitruong@hcmuaf.edu.

vn

### TÓM TẮT

Nghiên cứu được thực hiện nhằm xác định khả năng kháng khuẩn của dịch đạm thủy phân từ nhộng ruồi lính đen (*Hermetia illucens*) (ĐTPNRLĐ) lên một số chủng vi khuẩn gây bệnh trên cá nuôi nước ngọt bao gồm *E. ictaluri*, *A. hydrophila*, *A. verroni*, và *S. agalactiae*. Kết quả cho thấy các chủng vi khuẩn trên nhạy cảm với dịch ĐTPBSF với đường kính vòng kháng khuẩn khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê ( $P < 0,05$ ) so với đối chứng âm ở các nồng độ thử nghiệm là 20, 35, và 70 mg/100  $\mu$ L. Cụ thể, *E. ictaluri* nhạy cảm ở cả ba nồng độ thử nghiệm với vòng kháng khuẩn lần lượt là  $14,0 \pm 1$ ,  $18,7 \pm 0,7$ , và  $20,7 \pm 0,7$  mm. *A. veronii* và *S. agalactiae* nhạy ở nồng độ 35 và 70 mg/100  $\mu$ L, và *A. hydrophila* với vòng kháng khuẩn  $14,3 \pm 0,3$  mm ở nồng độ 70 mg/100  $\mu$ L. Dịch đạm thủy phân từ nhộng ruồi lính đen có khả năng diệt được *A. veronii* và *S. agalactiae* với giá trị MIC (minimum inhibitory concentration) = MBC (minimum bactericidal concentration) = 44 mg/mL, trong khi đó *E. ictaluri* và *A. hydrophila* bị ức chế ở MIC 44 mg/mL và MBC là 88 mg/mL. Kết quả này chứng tỏ rằng ĐTPNRLĐ có khả năng được sử dụng để phòng và trị bệnh trên cá do các chủng vi khuẩn *E. ictaluri*, *A. hydrophila*, *A. verroni*, và *S. agalactiae* gây ra.

### 1. Đặt Vấn Đề

Theo MITV (2022), ngành thủy sản hiện nay giữ vai trò quan trọng trong sự phát triển của nền kinh tế Việt Nam với quy mô ngày càng mở rộng. Tuy nhiên, nghề nuôi cá nước ta phải đối mặt với những khó khăn và thách thức khi dịch bệnh bùng phát và gây thiệt hại đáng kể (VA, 2021). Ngoài ra, việc điều trị bằng kháng sinh trong chăn nuôi hiện nay đã bị cấm trên nhiều nước vì những hệ lụy tiêu cực tác động vào môi trường

và sức khỏe người tiêu dùng (WAP, 2022).

Trên thế giới đã có nhiều nghiên cứu về lợi ích từ các loài côn trùng mà nó mang lại, trong đó có loài ruồi lính đen (*Hermetia illucens*) (Craig & ctv., 2002; Cickova & ctv., 2015). Ruồi lính đen có thể sống trong môi trường bất lợi, tiếp xúc với nhiều vi sinh vật khác nhau, vì chúng có khả năng tiêu thụ rác thải hữu cơ (Craig & ctv., 2002; Banks & ctv., 2013). Vì vậy, chúng có một hệ thống miễn dịch bẩm sinh rất phát triển

và có thể tạo ra các peptide có khả năng bảo vệ chống lại vi khuẩn, nấm và vi rút (Choi & ctv., 2018). Trên cơ sở đó, nghiên cứu được thực hiện nhằm khảo sát hoạt tính kháng khuẩn từ đạm thủy phân nhộng ruồi lính đen lên một số loài vi khuẩn gây bệnh trên cá nuôi nước ngọt. Nghiên cứu nhằm đóng góp thông tin khai thác lợi ích từ loài ruồi lính đen, góp phần vào việc phát triển ngành thủy sản theo hướng bền vững hạn chế việc sử dụng thuốc và hoá chất trong chăn nuôi.

## 2. Vật Liệu và Phương Pháp Nghiên Cứu

### 2.1. Thu và phân lập mẫu vi khuẩn gây bệnh

Các mẫu vi khuẩn gây bệnh được phân lập trên hai đối tượng cá nuôi nước ngọt phổ biến là cá tra và cá rô phi tại phòng lab bệnh học của công ty Proconco, Cần Thơ và công ty GenoMar, Tây Ninh. Các mẫu vi khuẩn được thu bao gồm các chủng gây bệnh xuất huyết, bệnh gan thận mũ trên cá tra, và bệnh lở loét trên cá rô phi. Cá được ghi nhận dấu hiệu bệnh lý bên ngoài, giải phẫu và phân lập vi khuẩn từ gan, thận, lách và nuôi cấy trên môi trường chọn lọc Rimler short (Himedia) dành cho *Aeromonas* spp. gây bệnh xuất huyết, *Streptococcus selective* agar (Himedia) dành cho liên cầu khuẩn gây bệnh lở loét trên cá rô phi, và EIA-*Edwardseilla ictaluri* agar (Himedia) dành cho vi khuẩn gây bệnh gan thận mũ trên cá tra.

Các chủng vi khuẩn gây bệnh được phân lập trên môi trường chọn lọc ở trên sẽ được nuôi trong môi trường dinh dưỡng TSB (Tryptic Soya Broth, Himedia) có bổ sung 25% glycerol và được trữ -80°C cho các phân tích thí nghiệm.

### 2.2. Định danh các chủng vi khuẩn gây bệnh

Các chủng vi khuẩn được phục hồi nuôi cấy trên môi trường TSA (Tryptic Soya Agar, Himedia) và thử nghiệm các chỉ tiêu như nhuộm Gram, phản ứng oxidase, catalase, di

động đồng thời được giải trình tự gen 16S rRNA. Các chủng được ly trích DNA bằng bộ Kit chiết tách TopPure extraction Kit (ABT, Việt Nam) sử dụng cột silicate. Gen 16S rRNA được khuếch đại sử dụng bộ mồi 1492R 5'TACGGTTACCTTGTACACT-3'; 27F5'-AGAGTTTGATCCTGGCTC-3'. Chương trình được chạy với chu kỳ nhiệt thực hiện phản ứng là 95°C - 5 phút, 95°C - 1 phút, 53°C - 30 giây, 72°C - 90 giây, 72°C - 5 phút, và giữ ở 10°C. Phản ứng được lặp lại 35 chu kỳ. Các sản phẩm pcr được gửi qua công ty the First Base, Singapore để giải trình tự.

### 2.3. Chuẩn bị dịch đạm thủy phân từ nhộng ruồi lính đen

Quá trình chuẩn bị đạm thủy phân (ĐTP) được thực hiện theo phương pháp của Nguyen (2021) tại Viện Công Nghệ Sinh Học và Môi Trường, Trường Đại học Nông Lâm TP.HCM. Ấu trùng ruồi lính đen được nuôi tại Viện, sau 15 ngày tuổi được thu hoạch, sấy khô ở 65°C trong 48 giờ và nghiền mịn để làm nguyên liệu thủy phân. Bột nhộng ruồi tiếp tục được đưa vào thủy phân trong 3 giờ bằng enzyme alcalase ở nồng độ 2%, tỷ lệ bột nhộng và nước 1:15, trong điều kiện nhiệt độ 60°C, và pH 6,8 được điều chỉnh bởi acid acetic. Sau khi thủy phân, dung dịch được lọc bỏ cặn và ly tâm 6.000 vòng/giờ, trong 30 phút để thu lấy dịch peptide ở tầng giữa. Đạm thủy phân được bảo quản ở nhiệt độ cấp đông -20°C để sử dụng cho thí nghiệm.

### 2.4. Thử nghiệm tính kháng khuẩn bằng phương pháp giếng khuếch tán

Trải đều 100 µL dịch vi khuẩn ở mật độ 10<sup>7</sup> cfu/mL vào đĩa môi trường TSA. Tiếp tục đục lỗ có đường kính 8 mm trên bề mặt thạch. Dịch peptide nhộng ruồi được cô đặc khô trong lò sấy ở nhiệt độ 65°C trong 48 giờ, sau đó pha loãng cùng với dung dịch acid acetic 7,6 mg/mL để có nồng độ thử nghiệm 20, 35, và 70 mg/100 µL.

Tiếp tục nhỏ 100  $\mu\text{L}$  dịch peptide vào các giếng trên và ủ ở nhiệt độ  $30^\circ\text{C}$ , sau 24 giờ kiểm tra kích thước đường kính vòng vô khuẩn và so sánh khả năng kháng khuẩn với đối chứng. Mỗi chủng vi khuẩn thử nghiệm sẽ lặp lại 3 lần. Đối chứng dương sử dụng tetracycline 0,03 mg/100  $\mu\text{L}$ , và đối chứng âm sẽ sử dụng dung dịch acid acetic 0,76 mg/100  $\mu\text{L}$  tương đương trong môi trường thủy phân (Elhag & ctv., 2017).

## 2.5. Thử nghiệm tính kháng khuẩn bằng phương pháp pha loãng xác định MIC (minimal inhibitory concentration) và MBC (minimal bactericidal concentration)

Thí nghiệm được thực hiện trên đĩa nhựa 96 giếng gồm 10 nồng độ loãng dần theo tỷ lệ 1:1 cùng với dung dịch TSB (Tryptic Soya Broth) từ nồng độ peptide ban đầu 352 mg/mL, và được lặp lại 3 lần. Tiếp tục cho 10  $\mu\text{L}$  dịch vi khuẩn tương ứng với McFaland 0,5 vào dãy dung dịch trên có thể tích 100  $\mu\text{L}$ . Giếng đối chứng âm gồm dung dịch TSB và 10  $\mu\text{L}$  acid acetic 7,6 mg/mL, đối chứng dương chỉ có vi khuẩn và TSB. Sau 24 giờ ủ ở  $30^\circ\text{C}$ , giá trị MIC được xác định ở nồng độ thấp nhất tại giếng có sự ức chế khả năng phát triển của vi khuẩn, được biểu hiện ở độ trong của dung dịch và không có tế bào vi khuẩn lắng dưới đáy giếng. Tiếp tục dùng que cấy vòng lấy ít dịch môi trường từ dãy nồng độ ức chế vi khuẩn và cấy rìa trên thạch TSA để tìm nồng độ MBC

mà tại đó không thấy sự xuất hiện khuẩn lạc trên môi trường thạch dinh dưỡng.

## 2.5. Phân tích thống kê

Dữ liệu thử nghiệm hoạt tính kháng khuẩn *in vitro* được kiểm tra bằng phần mềm SPSS. Phân tích phương sai ANOVA với 95% mức độ tin cậy hoặc  $\alpha = 0,05$ . Sự khác biệt về kết quả giữa các nồng độ được phân tích bằng trắc nghiệm Duncan.

## 3. Kết Quả và Thảo Luận

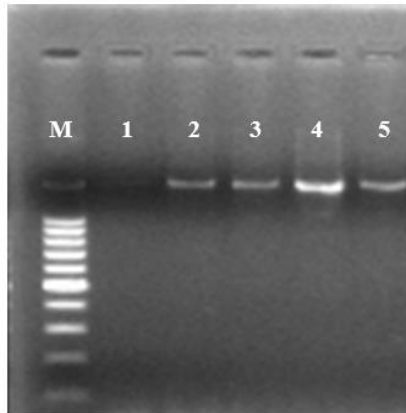
### 3.1. Phân lập và định danh một số chủng vi khuẩn gây bệnh trên cá nuôi nước ngọt

Các mẫu vi khuẩn phân lập được trên cá tra bao gồm 1 chủng gây bệnh gan thận mù và 2 chủng gây bệnh xuất huyết mọc trên môi trường chọn lọc lần lượt là môi trường EIA và RSA. Mẫu vi khuẩn mọc trên EIA có màu khuẩn lạc xanh lơ, đậm dần ở tâm, mọc sau 48 giờ nuôi cấy ở nhiệt độ  $28^\circ\text{C}$  (Hình 1a), đối với khuẩn lạc thuộc *Aeromonas* spp. gây bệnh xuất huyết có màu vàng nhạt, tròn nhẵn, đường kính 1,5 - 2 mm mọc trên môi trường RSA (Hình 1b) sau 24 giờ nuôi cấy ở nhiệt độ  $30^\circ\text{C}$ . Chủng liên cầu khuẩn được phân lập trên mẫu cá rô phi có khuẩn lạc màu xanh dương trên Streptococcus selection Agar, tròn, nhẵn, đường kính 0,5 mm (Hình 1c).



**Hình 1.** Khuẩn lạc trên môi trường chọn lọc *Edwarseilla* spp. (a), *Aeromonas* spp. (b), *Streptococcus* spp. (c).

Các chủng trên tiếp tục được khuếch đại gen 16S rRNA có kích thước 1500 bp trên gel chạy điện di (Hình 2).



**Hình 2.** Kết quả điện di gen 16S rRNA. Giếng M: Thang ADN 1 kb, giếng 1: đối chứng (-) giếng 2: mẫu gây bệnh gan thận mũ; giếng 3: mẫu gây bệnh lở mắt trên cá rô phi; giếng 4, 5: mẫu gây bệnh xuất huyết trên cá tra.

Kết quả giải trình tự được thể hiện trên Gene Bank Database bao gồm lần lượt 4 chủng vi khuẩn như sau: *Edwardseilla ictaluri* ATCC 33202 (ID 98,3%), *Streptococcus agalactiae* ATCC 13813 (ID 100%), *Aeromonas hydrophila* DSM 30187 (ID 98,4%), *Aeromonas veronii* ATCC 35624 (ID 98%). Các chủng vi khuẩn này đều được các nghiên cứu trước đó gồm những chủng vi khuẩn có khả năng gây bệnh trên cá nuôi nước ngọt. Cụ thể, loài *E. ictaluri* gây bệnh gan thận mũ trên cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*) (Crumlish & ctv., 2002). Ngoài ra trên thế giới cũng đã có một số nghiên cứu phát hiện loài này cũng gây bệnh trên cá rô phi (*Oreochromis niloticus*) (Soto & ctv., 2012). Chủng *A. hydrophila* và *A. veronii* là loài vi khuẩn cơ hội, gây bệnh xuất huyết trên nhiều loài cá nước ngọt tại các vùng khí hậu khác nhau và xuất hiện quanh năm (Inglis & ctv., 1993). Tại Việt Nam, theo một nghiên cứu của Trương & ctv. (2019), *A. veronii* là vi khuẩn gây chết với tỷ lệ tử vong cao trên cá nheo Mỹ (*Ictalurus punctatus*) nuôi tại một số tỉnh miền Bắc Việt Nam. Một báo cáo gần đây nhất của

Rakib & ctv. (2021) cho rằng, *A. veronii* xuất hiện trên mẫu cá rô đồng (*Anabas testudineus*) bị hội chứng lở loét (Epizootic Ulcerative Syndrome). Đối với *S. agalactiae*, vi khuẩn gây bệnh nghiêm trọng có thể lây nhiễm sang người và nhiều loại động vật khác nhau (Suanyuk & ctv., 2008; Wang & ctv., 2015). Tại Việt Nam, vi khuẩn *S. agalactiae* gây bệnh trên cá rô phi có tần suất xuất hiện từ 95 - 100% khi có nhiệt độ cao với tỷ lệ gây chết 42 - 100% đàn cá nuôi tại Việt Nam (Pham & ctv., 2013). Như vậy với kết quả này, bốn chủng vi khuẩn trên thích hợp để sử dụng cho thử nghiệm *in vitro* hoạt tính kháng khuẩn của ĐTP nhộng ruồi lính đen.

### 3.2. Hoạt tính kháng khuẩn của ĐTP lên vi khuẩn gây bệnh bằng phương pháp giếng khuếch tán

Kết quả *in vitro* thí nghiệm giếng khuếch tán (Bảng 1) cho thấy đường kính vòng kháng khuẩn tại nồng độ 70 mg/100  $\mu$ L ức chế toàn bộ 4 chủng vi khuẩn thử nghiệm bao gồm *E. ictaluri*, *A. hydrophila*, *A. veronii*, *S. agalactiae*. Sự khác

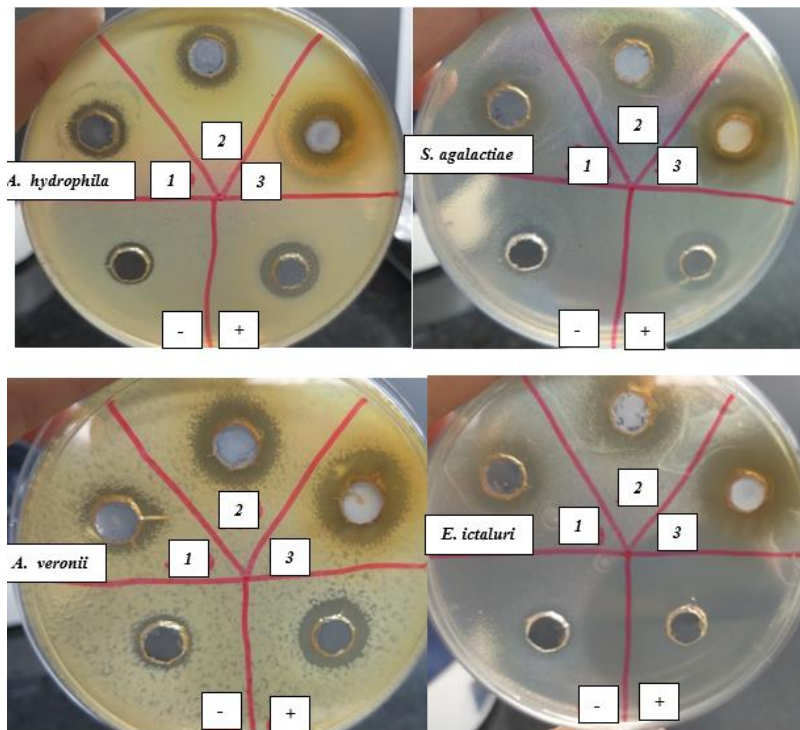
biệt này có ý nghĩa về mặt thống kê so với đối chứng âm. Ngược lại, ở nồng độ thử nghiệm 20 mg/100  $\mu$ L không ức chế 3 chủng bao gồm *A. hydrophila*, *A. veronii* và *S. agalactiae*, nhưng ức chế được chủng *E. ictaluri* với vòng kháng khuẩn 14  $\pm$  1,0 mm, lớn khác biệt so với đối

chứng âm. Tương tự, ở nồng độ 35 mg/100  $\mu$ L thể hiện sự ức chế 3 chủng vi khuẩn *E. ictaluri*, *A. veronii*, *S. agalactiae* với vòng kháng khuẩn lần lượt là 18,7  $\pm$  0,7, 16,3  $\pm$  0,9, 15  $\pm$  0,6 mm nhưng lại không ức chế được vi khuẩn *A. hydrophila* (Hình 3).

**Bảng 1.** Kết quả đường kính kháng khuẩn của đạm thủy phân (ĐTP) nhộng ruồi lên sự phát triển của vi khuẩn *E. ictaluri*, *A. hydrophila*, *A. veronii*, *S. agalactiae* bằng phương pháp giếng khuếch tán

Nồng độ dung dịch thử nghiệm (mg/100 $\mu$ L)	Đường kính vòng kháng khuẩn (mm)			
	<i>E. ictaluri</i>	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. veronii</i>	<i>S. agalactiae</i>
ĐTP 20	14,0 $\pm$ 1,0 <sup>b</sup>	11,0 $\pm$ 0,6 <sup>a</sup>	13,3 $\pm$ 0,3 <sup>a</sup>	13,0 $\pm$ 1,5 <sup>ab</sup>
ĐTP 35	18,7 $\pm$ 0,7 <sup>c</sup>	12,3 $\pm$ 0,3 <sup>a</sup>	16,3 $\pm$ 0,9 <sup>b</sup>	15,0 $\pm$ 0,6 <sup>b</sup>
ĐTP 70	20,7 $\pm$ 0,7 <sup>c</sup>	14,3 $\pm$ 0,3 <sup>b</sup>	19,7 $\pm$ 0,9 <sup>c</sup>	18,3 $\pm$ 0,9 <sup>c</sup>
Tetracycline 0,03	45,0 $\pm$ 0 <sup>d</sup>	15,7 $\pm$ 0,3 <sup>b</sup>	15,7 $\pm$ 0,7 <sup>b</sup>	15,3 $\pm$ 0,3 <sup>b</sup>
Acid acetic 0,76	11,3 $\pm$ 0,6 <sup>a</sup>	11,3 $\pm$ 0,6 <sup>a</sup>	11,3 $\pm$ 0,6 <sup>a</sup>	11,3 $\pm$ 0,6 <sup>a</sup>

Các số liệu đi kèm các chữ (a, b, c, d) trong cùng một cột thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê dựa trên trắc nghiệm Duncan.



**Hình 3.** Kết quả kháng khuẩn của đạm thủy phân (ĐTP) nhộng ruồi lên các chủng vi khuẩn khác nhau. (1) ĐTP 20 mg/100  $\mu$ L; (2) ĐTP 35 mg/100  $\mu$ L; (3) ĐTP 70 mg/100  $\mu$ L; (-) ĐC âm acid acetic 0,76 mg/100  $\mu$ L; (+) ĐC dương Tetracycline 0,03 mg/100  $\mu$ L.

Một số nghiên cứu trước đây cho thấy các chiết xuất từ nhộng ruồi lính đen ức chế một số chủng vi khuẩn gây bệnh trên thú và người. Cụ thể, dịch ức chế vi khuẩn *E. coli* và *Salmonella* spp. ở nồng độ 32 mg/100 µL trên đĩa khuếch tán với vòng kháng khuẩn lần lượt  $6,00 \pm 1,0$  và  $6,33 \pm 2,08$  mm (Harlystiarini & ctv., 2016). Peptide HP/F9 trong huyết thanh của nhộng ruồi có thể kháng lại vi khuẩn *Klebsiella pneumoniae* gây viêm hô hấp trên người ở nồng độ 12 µg/50 µL (Dong & ctv., 2020). Ngoài ra, theo nghiên cứu của Elhag & ctv. (2016), có 7 đoạn gen mã hoá cho 3 loại peptide kháng khuẩn trong nhộng ruồi lính đen, một trong những đoạn gen trên là stomoxynZH1 được mã hoá cho protein thioredoxin được chuyển vào vi khuẩn *E. coli* để tổng hợp cho kết quả kháng vi khuẩn gram dương *Staphylococcus aureus*, và gram âm *E. coli*, kể cả nấm *Rhizoctonia solani* và *Sclerotinia sclerotiorum* gây bệnh trên cây lúa. Trên thủy sản, Yongkang & ctv. (2021) đã thử nghiệm bột nhộng ruồi trộn vào thức ăn tôm thẻ chân trắng (*Litopenaeus vannamei*) với tỷ lệ 10, 20 và 30% giúp tăng cường sức khỏe tôm kháng bệnh do *V. parahaemolyticus*. Những nghiên cứu trước

đây cho thấy côn trùng có hệ thống miễn dịch bẩm sinh phát triển tốt, và Park & ctv. (2015) gần đây đã xác định được AMP (antimicropeptide) mới gồm 40 axit amin và đặt tên nó là defensin-like peptide4, AMP này được tạo ra từ miễn dịch dịch thể của ấu trùng nhộng ruồi lính đen.

Như vậy, kết quả nghiên cứu này cho thấy ĐTP nhộng ruồi lính đen cũng có khả năng kháng lại các chủng vi khuẩn gây bệnh động vật thủy sản.

### 3.3. Nồng độ ức chế tối thiểu MIC và diệt khuẩn tối thiểu MBC

Kết quả thử nghiệm xác định MIC thực hiện trên bảng nhựa 96 giếng cho thấy MIC của ĐTP nhộng ruồi có giá trị 44 mg/mL ức chế cả 4 chủng vi khuẩn thử nghiệm *E. ictaluri*, *A. hydrophila*, *A. veronii*, *S. agalactiae* (Bảng 2, Hình 4). Tiếp tục cấy ria lên thạch TSA, kết quả không thấy sự xuất hiện của khuẩn lạc tương ứng giá trị MBC là 88 mg/mL với 2 chủng *E. ictaluri* và *A. hydrophila*, và 44 mg/mL cho 2 chủng còn lại là *A. veronii* và *S. agalactiae* (Hình 5).

**Bảng 2.** Kết quả MIC (minimum inhibitory concentration) và MBC (minimum bactericidal concentration) của đạm thủy phân nhộng ruồi đối với bốn chủng vi khuẩn *E. ictaluri*, *A. hydrophila*, *A. veronii*, *S. agalactiae*

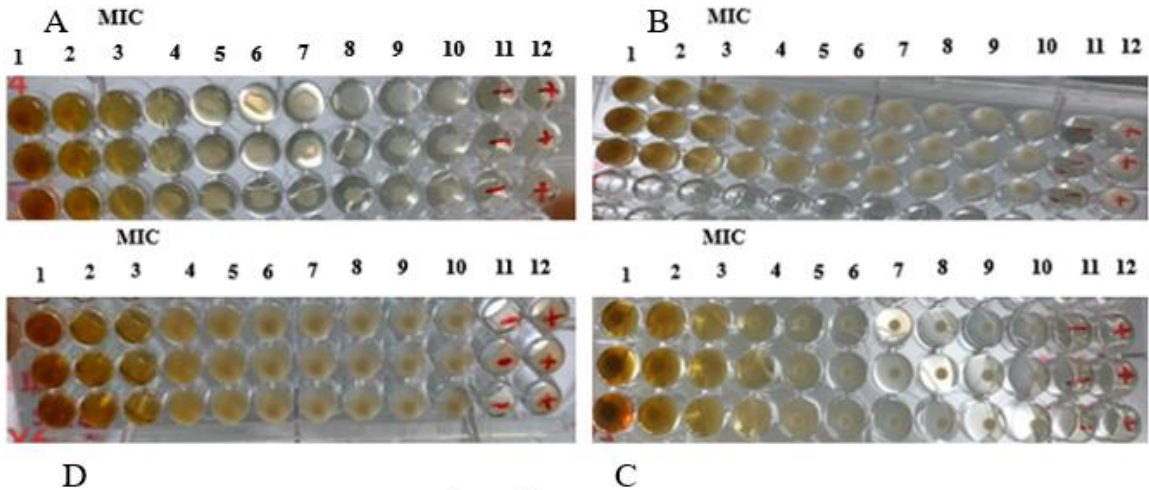
Vi khuẩn	MIC (mg/mL)	MBC (mg/mL)	MBC/MIC
<i>E. ictaluri</i>	44	88	2
<i>A. hydrophila</i>	44	88	2
<i>A. veronii</i>	44	44	1
<i>S. agalactiae</i>	44	44	1

Theo báo cáo của Canillac & Mourey (2001), nếu tỉ lệ MBC/MIC nhỏ hơn hoặc bằng 4, chiết xuất được xem là có khả năng diệt khuẩn; mặt khác, nếu tỉ lệ này lớn hơn 4, thì có tác dụng kìm khuẩn. Từ kết quả nghiên cứu trên, ĐTP nhộng

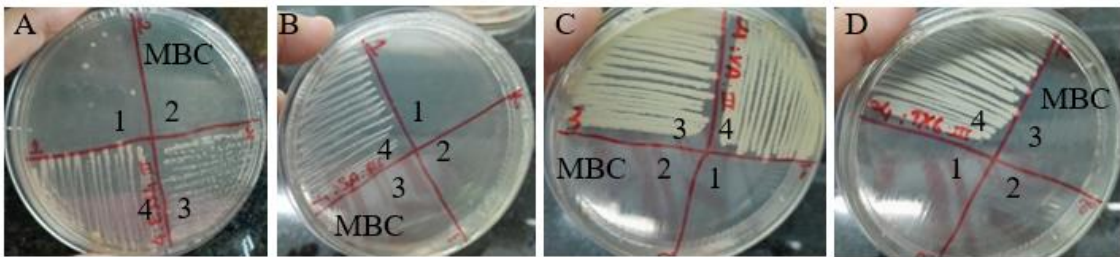
ruồi có khả năng diệt được một số vi khuẩn gây bệnh trên cá bao gồm *E. ictaluri*, *A. hydrophila*, *A. veronii*, và *S. agalactiae* (MBC/MIC < 4). Theo kết quả nghiên cứu của Elhag & ctv. (2021), chiết xuất peptide có tên là thioredoxin được mã hoá

bởi gen stomoxynZH1 có trong nhộng ruồi lính đen có thể ức chế *E. coli* ở nồng độ MIC 15 µg/mL, *S. aureus* tại MIC 27 µg/mL và *R. solani* tại MIC > 98 µg/mL. Muhammad & ctv. (2023) cho

rằng, loại enzyme và điều kiện thủy phân cũng ảnh hưởng đến khả năng chống oxy hoá và kháng khuẩn của các thành phần peptide trong ĐTP nhộng ruồi lính đen.



**Hình 4.** Giá trị MIC (minimum inhibitory concentration) 44 mg/mL ở giếng số 3. A: *E. ictaluri*; B: *S. agalactiae*; C: *A. hydrophila*; D: *A. veronii*.



**Hình 5.** Giá trị MBC (minimum bactericidal concentration) khi cấy vi khuẩn lên thạch MHA (Mueller Hinton agar) từ các giếng thử nghiệm MIC (minimum inhibitory concentration). A: *E. ictaluri*; B: *S. agalactiae*; C: *A. hydrophila*; D: *A. veronii*.

Các loại peptide kháng khuẩn đã được phân tích từ các nghiên cứu trước, hiện diện trong dịch ĐTP nhộng ruồi bao gồm defencin (Park & ctv., 2015), ceropin (Park & ctv., 2017), attacin (Shin & ctv., 2019), sarcotoxin và stomoxyn (Elhag & ctv., 2021). Các peptide này phá hủy lớp vỏ tế bào vi sinh vật bằng cách hình thành các kênh ion

hoặc lỗ xuyên màng làm tràn dịch tế bào ra bên ngoài, từ đó giết chết các tế bào (Epanđ & ctv., 1999). Ngoài việc gây tổn thương màng tế bào, một số peptide này có thể tự động đi qua màng, tương tác với các phân tử nội bào và do đó phá vỡ quá trình trao đổi chất trong tế bào (Nicolas & ctv., 2009).



#### 4. Kết Luận

Dịch ĐTP nhộng ruồi lính đen có khả năng ức chế tốt trên cả bốn chủng vi khuẩn gây bệnh được phân lập trên cá, cụ thể là chủng *E. ictaluri*, *A. hydrophila* và *A. veronii* trên cá tra, và *S. agalactiae* trên cá rô phi. Do đó, thông qua kết quả đạt được, ĐTP nhộng ruồi lính đen có thể được sử dụng để thử nghiệm ở giai đoạn *in vivo* và có tiềm năng trở thành chất kháng khuẩn thay thế kháng sinh trong tương lai.

#### Lời Cảm Ơn

Chúng tôi cảm ơn bài báo do nhóm tác giả thực hiện và không có bất kỳ mâu thuẫn nào giữa các tác giả.

#### Lời Cảm Ơn

Chân thành cảm ơn Trường Đại học Nông Lâm TP.HCM đã hỗ trợ kinh phí để tài mã số CS-SV23-TS-02.

#### Tài Liệu Tham Khảo (References)

- Abduh, M. Y., Prawitasari, D. A., Fitriani, U. A., & Firmansyah, M. (2023). Effects of enzymatic hydrolysis on the antioxidant activity of protein hydrolysate derived from the larvae of black soldier fly (*Hermetia illucens*). *Journal of Applied Biology and Biotechnology* 11(2), 151-157. <https://doi.org/10.7324/JABB.2023.110215>.
- Banks, I. J., Gibson, W. T., & Cameron, M. M. (2014). Growth rates of black soldier fly larvae fed on fresh human faeces and their implication for improving sanitation. *Tropical Medicine International Health* 19(1), 14-22. <https://doi.org/10.1111/tmi.12228>.
- Canillac, N., & Mourey, A. (2001). Antibacterial activity of the essential oil of picea excelsa on listeria, *Staphylococcus aureus* and coliform bacteria. *Food Microbiology* 18(3), 261-268. <https://doi.org/10.1006/fmic.2000.0397>.
- Chen, Y., Chi, S., Zhang, S., Dong, X., Yang, Q., Liu, H., & Xie, S. (2021). Evaluation of the dietary black soldier fly larvae meal (*Hermetia illucens*) on growth performance, intestinal health, and disease resistance to *Vibrio parahaemolyticus* of the Pacific White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Frontiers in Marine Science* 8, 706463. <https://doi.org/10.3389/fmars.2021.706463>.
- Choi, W. H., Choi, H. J., Goo, T. W., & Quan, F. S. (2018). Novel antibacterial peptides induced by probiotics in *Hermetia illucens* (Diptera: Stratiomyidae) larvae. *Entomological Research* 48(4), 237-247. <https://doi.org/10.1111/1748-5967.12259>.
- Čičková, H., Newton, G. L., Lacy, R. C., & Kozánek, M. (2015). The use of fly larvae for organic waste treatment. *Waste Management* 35, 68-80. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2014.09.026>.
- Crumlish, M., Dung, T. T., Turnbull, J. F., Ngoc, N. T. N., & Ferguson, H. W. (2002). Identification of *Edwardsiella ictaluri* from diseased freshwater catfish, *Pangasius hypophthalmus* (Sauvage), cultured in the Mekong Delta, Vietnam. *Journal of Fish Diseases* 25(12), 733-736. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2761.2002.00412.x>.
- Ehsan, R., Rahman, A., Paul, S. I., Ador, M. A. A., Haque, M. S., Akter, T., & Rahman, M. M. (2023). *Aeromonas veronii* isolated from climbing perch (*Anabas testudineus*) suffering from epizootic ulcerative syndrome (EUS). *Aquaculture and Fisheries* 8(3), 288-295. <https://doi.org/10.1016/j.aaf.2021.11.005>.
- Elhag, O., Zhou, D., Song, Q., Soomro, A. A., Cai, M., Zheng, L., & Zhang, J. (2017). Screening, expression, purification and functional characterization of novel antimicrobial peptide genes from *Hermetia illucens* (L.). *PLoS One* 12(1), e0169582. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0169582>.

- Eband, R. M., & Vogel, H. J. (1999). Diversity of antimicrobial peptides and their mechanisms of action. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* 1462(1-2), 11-28. [https://doi.org/10.1016/S0005-2736\(99\)00198-4](https://doi.org/10.1016/S0005-2736(99)00198-4).
- Harlystiarini, H., Mutia, R., Wibawan, I. W. T., & Astuti, D. A. (2019). *In vitro* antibacterial activity of black soldier fly (*Hermetia illucens*) larva extracts against gram-negative bacteria. *Buletin Peternakan* 43(2), 125-129. <https://doi.org/10.21059/buletinpeternak.v43i2.42833>.
- Inglis, V., Roberts, R. J., & Bromage, N. R. (1993). *Bacterial diseases of fish*. New York, USA: Halsted Press.
- Lee, D. H., Chu, K. B., Kang, H. J., Lee, S. H., & Quan, F. S. (2020). Peptides in the hemolymph of *Hermetia illucens* larvae completely inhibit the growth of *Klebsiella pneumoniae* *in vitro* and *in vivo*. *Journal of Asia-Pacific Entomology* 23(1), 36-43. <https://doi.org/10.1016/j.aspen.2019.10.004>.
- MITV (Ministry of Industry and Trade of Vietnam). (2022). Developing Vietnam's seafood industry to adapt to the new situation. Retrieved May 20, 2023, from <https://moit.gov.vn/tin-tuc/thi-truong-trong-nuoc/phat-trien-nganh-thuy-san-viet-nam-thich-ung-voi-tinh-hinh-moi.html>.