

# ความไวต่อสารต้านจุลชีพของแบคทีเรียที่แยกได้จากกุ้งน้ำเค็มของกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) ที่เก็บรักษาแบบแช่แข็ง

## Antimicrobial susceptibility of bacteria isolated from black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) spermatophore maintained in cryopreservation

สุบันทิต นิมรัตน์<sup>1\*</sup>, เนตฤทัย ศรีสมศักดิ์<sup>2</sup>, วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย<sup>3</sup>

Subuntith Nimrat<sup>1\*</sup>, Neshtai Srisomsak<sup>2</sup>, Verapong Vuthiphandchai<sup>3</sup>

Received : 8 January 2013; Accepted : 30 March 2013

### บทคัดย่อ

การศึกษาในครั้งนี้เป็นการศึกษาถึงความไวของแบคทีเรียที่แยกได้จากกุ้งน้ำเค็มของกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) ที่เก็บรักษาแบบแช่แข็งต่อสารต้านจุลชีพจำนวน 14 ชนิด ด้วยวิธี Disk diffusion method โดยแบคทีเรียที่แยกได้ดื้อต่อสารต้านจุลชีพแต่ละชนิดแตกต่างกัน โดย *Pseudomonas aeruginosa* เป็นแบคทีเรียที่ดื้อต่อสารต้านจุลชีพสูงที่สุด (85.71%) ในขณะที่ *Alcaligenes xylosoxidans*, *Proteus mirabilis*, *Ochrobactrum anthropi*, *Microbacterium* spp. และ *Burkholderia cepacia* เป็นแบคทีเรียที่ดื้อต่อสารต้านจุลชีพได้ค่อนข้างสูง โดยดื้อต่อยาต้านจุลชีพเท่ากับ 50.00%, 50.00%, 50.00%, 57.14% และ 71.43% ตามลำดับ และ *Kocuria varians* เป็นแบคทีเรียที่ดื้อต่อสารต้านจุลชีพน้อยที่สุด คิดเป็น 85.71% เมื่อทำการศึกษาเกี่ยวกับความไวต่อยากลุ่มเบต้า-แลคแตม จำนวน 3 ชนิด คือ Penicillin, Ampicillin และ Imipenem พบว่าแบคทีเรียจำนวน 12 ชนิด คือ *Bacillus cereus*, *B. megaterium*, *B. licheniformis*, *Staphylococcus epidermidis*, *P. mirabilis*, *P. aeruginosa*, *O. anthropi*, *A. xylosoxidans*, *A. faecalis*, *Micrococcus* spp., *Brevibacterium* spp. และ *Microbacterium* spp. เป็นแบคทีเรียที่ดื้อต่อยากลุ่มเบต้า-แลคแตมได้มากกว่า 50.00% แต่พบว่าแบคทีเรียในกลุ่มนี้มีเพียง 7 ชนิด ได้แก่ *B. cereus*, *B. licheniformis*, *S. epidermidis*, *P. mirabilis*, *A. xylosoxidans*, *A. faecalis* และ *P. aeruginosa* เท่านั้นที่สามารถผลิตเอนไซม์เบต้า-แลคตาเมส แสดงให้เห็นว่าการดื้อต่อสารต้านจุลชีพกลุ่มเบต้า-แลคแตมของแบคทีเรียที่แยกได้จากกุ้งน้ำเค็มของกุ้งกุลาดำในการศึกษาครั้งนี้ไม่มีความสัมพันธ์กับการผลิตเอนไซม์ชนิดนี้ ดังนั้นการดื้อต่อสารต้านจุลชีพในกลุ่มเบต้า-แลคแตมของแบคทีเรียกลุ่มนี้ไม่ได้เกิดจากการผลิตเอนไซม์เบต้า-แลคตาเมสเพียงอย่างเดียว

**คำสำคัญ:** สารต้านจุลชีพ แบคทีเรีย กุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) การแช่แข็ง กุ้งน้ำเค็ม เอนไซม์เบต้า-แลคตาเมส

### Abstract

In this study, the susceptibility of bacteria isolated from black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) spermatophore maintained in cryopreservation to 14 antimicrobial agents was examined using the disk diffusion method. *P. aeruginosa* showed the highest percentage of resistance (85.71%) to antimicrobial agents, while *A. xylosoxidans*, *P. mirabilis*, *O. anthropi*, *Microbacterium* spp. and *B. cepacia* displayed a high percentage of resistance: 50.00%, 50.00%, 50.00%, 57.14% and 71.43%, respectively, and *K. varians* exhibited the highest level of susceptibility (85.71%). Moreover, *B. cereus*, *B. megaterium*, *B. licheniformis*,

<sup>1</sup> ภาควิชาจุลชีววิทยาและโครงการวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ชลบุรี

<sup>2</sup> ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ชลบุรี

<sup>3</sup> ภาควิชาวชิราศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ชลบุรี

<sup>1</sup> Department of Microbiology and Environmental Science Program, Faculty of Science, Burapha University, Chon Buri Province

<sup>2</sup> Department of Microbiology, Faculty of Science, Burapha University, Chon Buri Province

<sup>3</sup> Department of Aquatic Science, Faculty of Science, Burapha University, Chon Buri Province

\* Corresponding author : E-mail: subunti@buu.ac.th

*S. epidermidis*, *P. mirabilis*, *P. aeruginosa*, *O. anthropi*, *A. xylosoxidans*, *A. faecalis*, *Micrococcus* spp., *Brevibacterium* spp. and *Microbacterium* spp. showed a percentage of resistance to  $\beta$ -lactams of more than 50.00%, and *B. cereus*, *B. licheniformis*, *S. epidermidis*, *P. mirabilis*, *A. xylosoxidans*, *A. faecalis* and *P. aeruginosa* were able to produce  $\beta$ -lactamase. This investigation highlighted that the resistance to  $\beta$ -lactams of bacteria isolated from black tiger shrimp spermatophore was not related to  $\beta$ -lactamase production. Therefore, the incidence of  $\beta$ -lactams resistance of those bacteria did not only emerge from  $\beta$ -lactamase production.

**Keywords :** Antimicrobial agents; Bacteria; Black tiger shrimp (*Penaeus monodon*); Cryopreservation; Spermatophore;  $\beta$ -lactamase

## บทนำ

กุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) เป็นสัตว์น้ำที่มีความสำคัญในอุตสาหกรรมเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำของประเทศไทย โดยในปี พ.ศ. 2543 ประเทศไทยสามารถส่งออกกุ้งกุลาดำมากที่สุดในโลก สร้างรายได้มากกว่า 89,230 ล้านบาท (Department of Fisheries, 2000) ส่งผลให้ความต้องการลูกกุ้งเพื่อนำมาเพาะเลี้ยงมีปริมาณเพิ่มสูงขึ้น ซึ่งในอดีตการผสมเทียมกุ้งกุลาดำส่วนใหญ่มักพึ่งพาธรรมชาติ เช่น การจับพ่อพันธุ์มาจากทะเลและการตัดตาของแม่พันธุ์ ส่งผลให้น้ำเชื้อและลูกกุ้งมีคุณภาพไม่ดีนัก (Nimrat et al., 2008) ดังนั้นจึงจำเป็นต้องอย่างยิ่งในการพัฒนากระบวนการในการเก็บรักษาถุงน้ำเชื้อกุ้งกุลาดำ เพื่อเพิ่มคุณภาพน้ำเชื้อและสนองต่อความต้องการของกุ้งกุลาดำ ซึ่งการเก็บรักษากุ้งน้ำเชื้อกุ้งกุลาดำแบบแช่แข็งเป็นทางเลือกหนึ่งที่มีประสิทธิภาพในการเก็บรักษาน้ำเชื้อเพื่อใช้ในการผสมเทียม (Vuthiphandchai et al., 2007; Nimrat et al., 2008) แต่อย่างไรก็ตามการเก็บรักษากุ้งน้ำเชื้อมักมีการปนเปื้อนของแบคทีเรีย ยกตัวอย่างเช่น การศึกษาของ Nimrat et al., 2006 ได้ทำการศึกษากการเก็บรักษากุ้งน้ำเชื้อกุ้งขาวแบบแช่เย็น พบการปนเปื้อนของแบคทีเรียหลายชนิด ได้แก่ *B. circulans*, *S. hominis*, *S. lugdunensis*, *S. sciuri*, *S. xylosus* และ *Micrococcus* spp. ในระหว่างการเก็บรักษา และ Lahnsteiner and Weismann (1999) พบว่าการปนเปื้อนของแบคทีเรียส่งผลให้น้ำเชื้อมีคุณภาพและอัตราการปฏิสนธิลดลง รวมทั้งยังอาจก่อให้เกิดผลกระทบต่อผู้บริโภคกุ้งกุลาดำที่ปนเปื้อนแบคทีเรียก่อโรค โดยเฉพาะอย่างยิ่งแบคทีเรียก่อโรคที่ได้รับการถ่ายทอดยีนดื้อต่อสารต้านจุลชีพ (Bielanski, 2005) ดังนั้นการศึกษาคความไวต่อสารต้านจุลชีพของแบคทีเรียที่แยกได้จากถุงน้ำเชื้อกุ้งกุลาดำในระหว่างการแช่แข็งจึงเป็นเรื่องที่มีความสำคัญในด้านการแพทย์และทำให้เกิดตระหนักถึงการใชสารต้านจุลชีพในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำมากยิ่งขึ้น

## วิธีการศึกษา

1. การจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรียที่แยกได้จากถุงน้ำเชื้อกุ้งกุลาดำแบบแช่แข็ง (Nimrat et al., 2008)

นำแบคทีเรียบริสุทธิ์แต่ละไอโซเลทที่คัดแยกได้จากถุงน้ำเชื้อกุ้งกุลาดำแบบแช่แข็งตามวิธีการของ Vuthiphandchai et al. (2007) มาเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic Soy Agar (TSA) ด้วยวิธีการ Cross streak และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง จากนั้นนำแบคทีเรียที่ได้ไปทำการย้อมแกรม (Gram's staining) และทำการจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรียตาม Bergey's Manual of Systematic Bacteriology และ API test kits (bioMérieux, Marcy-l'Etoile, France) ในทุกขั้นตอนทำด้วยเทคนิคปราศจากเชื้อ

2. การทดสอบความไวของแบคทีเรียต่อสารต้านจุลชีพด้วยเทคนิค Disk diffusion (Bauer et al., 1966)

นำแบคทีเรียที่แยกได้มาเพาะในอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic Soy Broth (TSB) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง นำเชื้อมาปรับให้มีความเข้มข้นเท่ากับ McFarland No. 0.5 ด้วย 0.85% Normal saline ใช้ไม้ปั่นสำลีจุ่มลงใน Suspension ของเชื้อบดพอหมาด ๆ กับข้างหลอด จากนั้นป้ายลงบนหน้าอาหาร Mueller-Hinton Agar โดยป้ายให้ทั่วเพื่อให้แบคทีเรียกระจายสม่ำเสมอ วางทิ้งไว้ประมาณ 15 นาที ใช้ปากคีบที่ปราศจากเชื้อคีบแผ่นยาที่ต้องการทดสอบ ได้แก่ Clindamycin (2  $\mu$ g), Oxytetracycline (30  $\mu$ g), Tetracycline (30  $\mu$ g), Chloramphenicol (30  $\mu$ g), Erythromycin (15  $\mu$ g), Vancomycin (30  $\mu$ g), Sulphonamides (30  $\mu$ g), Oxolinic acid (2  $\mu$ g), Streptomycin (20  $\mu$ g), Doxycycline hydrochloride (30  $\mu$ g), Ampicillin (10  $\mu$ g), Imipenem (10  $\mu$ g), Sulphamethoxazole/Trimethoprim (25  $\mu$ g) และ Penicillin G (10 Unit) วางบนอาหารเลี้ยงเชื้อแล้วกดเบา ๆ ให้แผ่นยาดิตกับอาหารเลี้ยงเชื้อ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 16-18 ชั่วโมง การอ่านผลทำโดยวัดขนาดของบริเวณยับยั้งเป็นมิลลิเมตร และแปลผลตามตารางแปลผลของ

National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) ในการทดสอบความไวต่อสารต้านจุลชีพชนิดต่าง ๆ ต้องมีการควบคุมคุณภาพของการทดสอบทุกครั้งโดยใช้เชื้อมาตรฐาน (Reference strain) ได้แก่ *E. coli* ATCC 25922 และ *S. aureus* ATCC 25923

3. การทดสอบหาเอนไซม์เบต้า-แลคตาเมส โดยวิธี **Rapid iodometric method** (Lennette et al., 1985) เติมสารละลาย Penicillin 0.1 มิลลิลิตร ลงในหลุมของ Micro-titer plate จากนั้นเติมเชื้อที่ต้องการทดสอบที่ปรับให้มีความเข้มข้นเท่ากับ McFarland No. 4 ด้วย 0.85% Normal saline จำนวน 1 หยด เขย่าให้เข้ากันตั้งไว้ในอุณหภูมิห้อง นาน 30 นาที แล้วเติมสารละลายแบ่งและสารละลายไอโอดีนจำนวน 2 และ 1 หยด ตามลำดับ ซึ่งจะเกิดสีน้ำเงินทันที เนื่องจากปฏิกิริยาของแบคทีเรียกับไอโอดีน เขย่าและตั้งทิ้งไว้ในอุณหภูมิห้องนาน 10 นาที การอ่านผลถ้าสีน้ำเงินจางหายไปจนกลายเป็นสีขาวภายใน 10 นาที แสดงว่าเป็นผลบวกคือ แบคทีเรีย

ทดสอบสามารถสร้างเอนไซม์เบต้า-แลคตาเมสได้ ซึ่งชุดควบคุมใช้เชื้อมาตรฐาน คือ *E. coli* ATCC 25922 และ *S. aureus* ATCC 25923

## ผลการศึกษา

### 1. การจัดจำแนกชนิดแบคทีเรียที่แยกจากถุงน้ำเชื้อของกิ้งกูดำ

จากการจัดจำแนกแบคทีเรียที่แยกจากถุงน้ำเชื้อของกิ้งกูด้าแบบแช่แข็งโดยอาศัยคุณสมบัติทางชีวเคมีพบว่าสามารถจัดจำแนกแบคทีเรียได้จำนวน 17 ชนิด ได้แก่ *B. cereus*, *B. amyloliquefaciens*, *B. circulans*, *B. megaterium*, *B. licheniformis*, *Micrococcus* spp., *K. varians*, *S. epidermidis*, *C. aquaticum*, *Brevibacterium* spp., *P. mirabilis*, *P. aeruginosa*, *O. anthropi*, *B. cepacia*, *A. faecalis*, *A. xylosoxidans* และ *Microbacterium* spp. (Table 1)

**Table 1** Biochemical characterization of cryopreserved bacteria isolated from *P. monodon* spermatophore

| Bacteria                         |                  |                          |                    |                      |                         |                         |                   |                       |                     |                            |  |                     |                      |                    |                   |                    |                       |                            |
|----------------------------------|------------------|--------------------------|--------------------|----------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------|-----------------------|---------------------|----------------------------|--|---------------------|----------------------|--------------------|-------------------|--------------------|-----------------------|----------------------------|
| Biochemical tests                | <i>B. cereus</i> | <i>B. myliquefaciens</i> | <i>B.circulans</i> | <i>B. megaterium</i> | <i>B. licheniformis</i> | <i>Micrococcus</i> spp. | <i>K. varians</i> | <i>S. epidermidis</i> | <i>C. aquaticum</i> | <i>Brevibacterium</i> spp. |  | <i>P. mirabilis</i> | <i>P. aeruginosa</i> | <i>O. anthropi</i> | <i>B. cepacia</i> | <i>A. faecalis</i> | <i>A. xylooxidans</i> | <i>Microbacterium</i> spp. |
| Catalase test                    | +                | +                        | +                  | +                    | +                       | +                       | +                 | +                     | +                   | +                          |  | NT                  | NT                   | NT                 | +                 | NT                 | NT                    | +                          |
| Oxidase test                     | NT               | +                        | NT                 | NT                   | NT                      | V                       | -                 | -                     | NT                  | NT                         |  | -                   | +                    | +                  | +                 | +                  | +                     | NT                         |
| KIA ทดสอบ TSI, gas               | NT               | NT                       | NT                 | NT                   | NT                      | NT                      | NT                | NT                    | NT                  | NT                         |  | A/A - K/A+          | NT                   | NT                 | NT                | NT                 | NT                    | NT                         |
| H <sub>2</sub> S production test | NT               | NT                       | NT                 | NT                   | NT                      | NT                      | NT                | NT                    | NT                  | NT                         |  | +                   | -                    | NT                 | NT                | NT                 | NT                    | V                          |
| Indole production test           | -                | -                        | -                  | -                    | -                       | NT                      | NT                | NT                    | NT                  | NT                         |  | -                   | NT                   | NT                 | NT                | NT                 | NT                    | NT                         |
| Methyl red test                  | NT               | NT                       | NT                 | NT                   | NT                      | NT                      | NT                | NT                    | NT                  | NT                         |  | +                   | NT                   | NT                 | NT                | NT                 | NT                    | NT                         |
| Voges-Proskauer test             | +                | +                        | +                  | -                    | +                       | V                       | NT                | +                     | NT                  | NT                         |  | V                   | NT                   | NT                 | NT                | NT                 | NT                    | NT                         |
| Citrate utilization test         | -                | V                        | NT                 | +                    | +                       | -                       | +                 | NT                    | NT                  | NT                         |  | V                   | NT                   | NT                 | NT                | NT                 | NT                    | +                          |
| Urease test                      | V                | NT                       | -                  | NT                   | V                       | -                       | +                 | +                     | -                   | -                          |  | +                   | V                    | +                  | +                 | -                  | NT                    | -                          |
| Motility test                    | +                | +                        | +                  | -                    | V                       | -                       | -                 | -                     | +                   | NT                         |  | +                   | +                    | +                  | +                 | +                  | +                     | V                          |
| Malonate utilization test        | NT               | NT                       | NT                 | NT                   | NT                      | NT                      | NT                | NT                    | NT                  | NT                         |  | -                   | NT                   | NT                 | +                 | +                  | NT                    | NT                         |
| Lysine decarboxylase test        | NT               | -                        | NT                 | NT                   | NT                      | NT                      | NT                | NT                    | NT                  | NT                         |  | -                   | NT                   | NT                 | +                 | NT                 | NT                    | NT                         |
| Ornithine decarboxylase test     | NT               | -                        | NT                 | NT                   | NT                      | NT                      | NT                | V                     | NT                  | NT                         |  | +                   | NT                   | NT                 | V                 | NT                 | NT                    | NT                         |
| Acetamide utilization test       | NT               | NT                       | NT                 | NT                   | NT                      | NT                      | NT                | NT                    | NT                  | NT                         |  | NT                  | +                    | -                  | NT                | +                  | V                     | NT                         |
| Anaerobic growth                 | +                | -                        | -                  | -                    | +                       | NT                      | NT                | NT                    | NT                  | NT                         |  | NT                  | NT                   | NT                 | NT                | NT                 | NT                    | NT                         |
| Coagulase test                   | NT               | NT                       | NT                 | NT                   | NT                      | -                       | -                 | -                     | NT                  | NT                         |  | NT                  | NT                   | NT                 | NT                | NT                 | NT                    | NT                         |
| Growth at 50 °C                  | -                | +                        | -                  | -                    | +                       | NT                      | NT                | NT                    | NT                  | NT                         |  | NT                  | NT                   | NT                 | NT                | NT                 | NT                    | NT                         |

**Table 1** Biochemical characterization of cryopreserved bacteria isolated from *P. monodon* spermatophore (Cont.)

|                                             |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
|---------------------------------------------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
| Growth at 65 °C                             | -  | NT | -  | -  | -  | NT | NT | NT | NT | NT | NT | NT | NT | NT | NT | NT | NT |
| Starch hydrolysis test                      | +  | +  | +  | +  | +  | V  | -  | NT | NT | NT | NT | NT | NT | NT | NT | NT | V  |
| Arginine dihydrolase test                   | NT | -  | NT | NT | NT | -  | -  | V  | NT | NT | NT | NT | NT | NT | NT | NT | NT |
| Pyrrolidonyl arylamidase test               | NT | NT | NT | NT | NT | NT | NT | -  | NT | V  | NT | NT | NT | NT | NT | NT | NT |
| NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> reduction test | +  | +  | V  | V  | +  | V  | +  | +  | V  | V  | NT | +  | +  | V  | -  | +  | V  |
| β-glucosidase test                          | NT | NT | NT | NT | NT | NT | NT | V  | V  | -  | NT | NT | NT | NT | NT | NT | NT |
| β-galactosidase test                        | NT | V  | NT | NT | NT | NT | NT | -  | NT | -  | NT | NT | NT | NT | NT | NT | NT |
| Polymyxin B susceptibility test             | NT | NT | NT | NT | NT | NT | NT | R  | NT | NT | NT | S  | NT | R  | NT | NT | NT |
| Novobiocin susceptibility test              | NT | NT | NT | NT | NT | NT | NT | S  | NT | NT | NT | NT | NT | NT | NT | NT | NT |
| Acid from Glucose                           | +  | +  | +  | +  | +  | -  | +  | +  | +  | NT | NT | +  | +  | +  | +  | +  | +  |
| Acid from Maltose                           | NT | +  | +  | V  | +  | NT | NT | +  | -  | NT | NT | V  | NT | V  | NT | NT | +  |
| Acid from Sucrose                           | V  | +  | +  | +  | +  | NT | NT | +  | +  | NT | NT | NT | NT | V  | NT | NT | V  |
| Acid from Lactose                           | -  | V  | NT | V  | -  | -  | -  | V  | V  | NT | NT | -  | -  | V  | NT | +  | +  |
| Acid from Mannitol                          | -  | +  | +  | +  | +  | -  | -  | -  | V  | NT | NT | V  | V  | +  | NT | +  | NT |
| Acid from Mannose                           | +  | NT | NT | NT | NT | -  | -  | +  | NT | NT | NT | NT | NT | NT | NT | NT | +  |
| Acid from Arabinose                         | -  | -  | +  | V  | +  | V  | NT | -  | NT | NT | NT | NT | NT | NT | NT | NT | NT |
| Acid from Trehalose                         | +  | NT | NT | NT | NT | +  | NT | -  | NT | NT | NT | NT | NT | NT | NT | V  | V  |
| Acid from Xylose                            | -  | +  | -  | V  | +  | -  | +  | -  | V  | NT | NT | NT | +  | +  | +  | +  | NT |
| Acid from Raffinose                         | NT | +  | NT | NT | NT | -  | NT | -  | NT | NT | NT | NT | NT | NT | NT | V  | V  |
| Acid from Cellobiose                        | NT | +  | NT | NT | NT | NT | NT | -  | NT | NT | NT | NT | NT | NT | NT | NT | NT |
| N-acetyl-D-glucosamine assimilation test    | NT | V  | NT | NT | NT | NT | NT | -  | NT | NT | NT | NT | NT | NT | NT | NT | NT |
| Gas from Glucose                            | -  | NT | -  | -  | -  | NT | NT | NT | NT | NT | NT | NT | NT | NT | NT | NT | NT |
| Gas from Sucrose                            | NT | NT | NT | NT | NT | NT | NT | NT | NT | NT | -  | NT | NT | NT | NT | NT | NT |
| Gas from Mannitol                           | NT | NT | NT | NT | NT | NT | NT | NT | NT | NT | -  | NT | NT | NT | NT | NT | NT |
| Gas from Arabinose                          | NT | NT | NT | NT | NT | NT | NT | NT | NT | NT | -  | NT | NT | NT | NT | NT | NT |

NT; Not test, V; Variable, R; Resistant, S; Susceptible

## 2. ความไวต่อสารต้านจุลชีพและการผลิตเอนไซม์เบต้า-แลคตาเมสของแบคทีเรียที่แยกจากถุงน้ำเชื้อของกุ้งกุลาดำ

จากการทดสอบความไวของแบคทีเรียที่แยกจากถุงน้ำเชื้อของกุ้งกุลาดำต่อสารต้านจุลชีพจำนวน 14 ชนิด พบว่าแบคทีเรียที่แยกได้ดื้อต่อสารต้านจุลชีพแต่ละชนิดแตกต่างกัน ซึ่งแบคทีเรียที่ดื้อต่อสารต้านจุลชีพได้มากกว่าร้อยละ 50 ได้แก่ *P. mirabilis* (50.00%), *O. anthropi* (50.00%), *A. xylosoxidans* (50.00%), *Microbacterium* spp. (57.14%), *B. cepacia* (71.43%) โดย *P. aeruginosa* ดื้อต่อสารต้านจุลชีพสูงที่สุด (85.71%) และแบคทีเรียที่ไวต่อสารต้านจุลชีพสูงที่สุดได้แก่ *K. varians*

(Table 2) นอกจากนี้ยังพบว่า *B. cereus*, *B. megaterium*, *B. licheniformis*, *S. epidermidis*, *P. mirabilis*, *P. aeruginosa*, *O. anthropi*, *A. xylosoxidans*, *A. faecalis*, *Micrococcus* spp., *Brevibacterium* spp. และ *Microbacterium* spp. ดื้อต่อยากลุ่มเบต้า-แลคแทมได้มากกว่าร้อยละ 50 (Table 3) และพบว่า *B. cereus*, *B. licheniformis*, *S. epidermidis*, *P. mirabilis*, *A. xylosoxidans*, *A. faecalis* และ *P. aeruginosa* สามารถผลิตเอนไซม์เบต้า-แลคตาเมสได้ (Table 4) จากการศึกษาในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าการผลิตเอนไซม์เบต้า-แลคตาเมสและร้อยละของการดื้อต่อสารต้านจุลชีพกลุ่มเบต้าแลคแทม (Penicillin, Ampicillin และ Imipenem) ไม่มีความสัมพันธ์กัน

**Table 2** Antibigram of cryopreserved bacteria isolated from *P. monodon* spermatophore

| Bacteria                    | Antibiogram* (%) |              |             |
|-----------------------------|------------------|--------------|-------------|
|                             | Resistant        | Intermediate | Susceptible |
| <i>B. cereus</i>            | 3 (21.43%)       | -            | 11 (78.57%) |
| <i>B. amyloliquefaciens</i> | 2 (14.29%)       | 1 (7.14%)    | 11 (78.57%) |
| <i>B. circulans</i>         | 2 (14.29%)       | 1 (7.14%)    | 11 (78.57%) |
| <i>B. megaterium</i>        | 3 (21.43%)       | -            | 11 (78.57%) |
| <i>B. licheniformis</i>     | 4 (28.57%)       | -            | 10 (71.43%) |
| <i>Micrococcus</i> spp.     | 2 (14.29%)       | -            | 11 (78.58%) |
| <i>K. varians</i>           | 2 (14.29%)       | -            | 12 (85.71%) |
| <i>S. epidermidis</i>       | 4 (28.58%)       | 1 (7.14%)    | 9 (64.26%)  |
| <i>C. aquaticum</i>         | 3 (21.43%)       | 1 (7.14%)    | 10 (71.42%) |
| <i>Brevibacterium</i> spp.  | 4 (28.57%)       | 1 (7.14%)    | 9 (64.26%)  |
| <i>P. mirabilis</i>         | 7 (50.00%)       | -            | 7 (50.00%)  |
| <i>P. aeruginosa</i>        | 12 (85.71%)      | -            | 2 (14.29%)  |
| <i>O. anthropi</i>          | 7 (50.00%)       | -            | 7 (50.00%)  |
| <i>B. cepacia</i>           | 10 (71.43%)      | 1 (7.14%)    | 3 (21.43%)  |
| <i>A. faecalis</i>          | 5 (35.71%)       | 2 (14.28%)   | 7 (50.00%)  |
| <i>A. xylosoxidans</i>      | 7 (50.00%)       | 1 (7.14%)    | 6 (42.86%)  |
| <i>Microbacterium</i> spp.  | 8 (57.14%)       | 1 (7.14%)    | 5 (35.71%)  |

\*14 types of antimicrobial agents

**Table 3** Antibigram and  $\beta$ -lactamase production of cryopreserved bacteria isolated from *P. monodon* spermatophore

| Bacteria                    | Percent of resistant against $\beta$ -lactam antimicrobial agents** (%) |
|-----------------------------|-------------------------------------------------------------------------|
| <i>B. cereus</i>            | 2 (66.67%)                                                              |
| <i>B. amyloliquefaciens</i> | 1 (33.33%)                                                              |
| <i>B. circulans</i>         | 1 (33.33%)                                                              |
| <i>B. megaterium</i>        | 2 (66.67%)                                                              |
| <i>B. licheniformis</i>     | 2 (66.67%)                                                              |
| <i>Micrococcus</i> spp.     | 2 (66.67%)                                                              |
| <i>K. varians</i>           | 0 (0.00%)                                                               |
| <i>S. epidermidis</i>       | 2 (66.67%)                                                              |
| <i>C. aquaticum</i>         | 0 (0.00%)                                                               |
| <i>Brevibacterium</i> spp.  | 2 (66.67%)                                                              |
| <i>P. mirabilis</i>         | 2 (66.67%)                                                              |
| <i>P. aeruginosa</i>        | 2 (66.67%)                                                              |
| <i>O. anthropi</i>          | 2 (66.67%)                                                              |
| <i>B. cepacia</i>           | 1 (33.33%)                                                              |
| <i>A. faecalis</i>          | 2 (66.67%)                                                              |
| <i>A. xylosoxidans</i>      | 2 (66.67%)                                                              |
| <i>Microbacterium</i> spp.  | 2 (66.67%)                                                              |

\*\* 3 types of  $\beta$ -lactam antimicrobial agents

**Table 4**  $\beta$ -lactamase production of cryopreserved bacteria isolated from *P. monodon* spermatophore

| Bacteria                    | $\beta$ -lactamase production |
|-----------------------------|-------------------------------|
| <i>B. cereus</i>            | +                             |
| <i>B. amyloliquefaciens</i> | -                             |
| <i>B. circulans</i>         | -                             |
| <i>B. megaterium</i>        | -                             |
| <i>B. licheniformis</i>     | +                             |
| <i>Micrococcus</i> spp.     | -                             |
| <i>K. varians</i>           | -                             |
| <i>S. epidermidis</i>       | +                             |
| <i>C. aquaticum</i>         | -                             |
| <i>Brevibacterium</i> spp.  | -                             |
| <i>P. mirabilis</i>         | +                             |
| <i>P. aeruginosa</i>        | +                             |
| <i>O. anthropi</i>          | -                             |
| <i>B. cepacia</i>           | -                             |
| <i>A. faecalis</i>          | +                             |
| <i>A. xylosoxidans</i>      | +                             |
| <i>Microbacterium</i> spp.  | -                             |

### อภิปรายผลการศึกษา

จากการตัดแยกแบคทีเรียที่ปนเปื้อนในระหว่างการเก็บรักษาถุงน้ำเชื้อกึ่งกลาดำแบบแช่แข็งพบว่าแบคทีเรียที่แยกได้ทั้งหมดมีจำนวน 17 ชนิด ได้แก่ *B. cereus*, *B. amyloliquefaciens*, *B. circulans*, *B. megaterium*, *B. licheniformis*, *Micrococcus* spp., *K. varians*, *S. epidermidis*, *C. aquaticum*, *Brevibacterium* spp., *P. mirabilis*, *P. aeruginosa*, *O. anthropi*, *B. cepacia*, *A. faecalis*, *A. xylosoxidans*, *Microbacterium* spp. ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Nimrat et al. (2008) ที่ได้ทำการศึกษเกี่ยวกับแบคทีเรียที่พบในระหว่างการเก็บรักษาถุงน้ำเชื้อกึ่งกลาดำแบบแช่แข็ง พบว่าในระหว่างการเก็บรักษาถุงน้ำเชื้อนั้นสามารถพบแบคทีเรียที่ปนเปื้อนหลายชนิดซึ่งเหมือนกับการศึกษาในครั้งนี้ ได้แก่ *B. cereus*, *B. amyloliquefaciens*, *B. circulans*, *K. varians*, *P. mirabilis*, *P. aeruginosa*, *B. cepacia* นอกจากนี้ยังพบ *Enterobacter* spp. และ *Vibrio* spp. เป็นแบคทีเรียที่ไม่พบในการศึกษารุ่นนี้อีกด้วย และเมื่อนำแบคทีเรียที่พบในการศึกษารุ่นนี้มาศึกษาความไวต่อสารต้านจุลชีพจำนวน 14 ชนิด พบว่าแบคทีเรียที่พบดังกล่าวตอบสนองต่อการต้านจุลชีพแต่ละชนิดแตกต่างกัน กล่าวคือ *P. aeruginosa* ตอบสนองต่อการต้าน

สูงที่สุดเท่ากับ 85.71% ซึ่ง *P. aeruginosa* มีการตอบสนองต่อการต้านจุลชีพหลายชนิด เนื่องจากการผลิตเอนไซม์เบต้า-แลคตาเมส หรือการถ่ายทอดยีนดื้อสารต้านจุลชีพที่อยู่บนพลาสมิดจากแบคทีเรียชนิดหนึ่งไปยังแบคทีเรียชนิดหนึ่ง จึงทำให้สารต้านจุลชีพบางชนิดไม่มีประสิทธิภาพในการทำลายแบคทีเรีย (นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ, 2544) และสอดคล้องกับรายงานของ Jensen et al. (2001) ที่ได้ศึกษาการดื้อต่อสารต้านจุลชีพของ *Pseudomonas* และ *B. cereus* ที่แยกได้จากพื้นที่การเกษตรในประเทศเดนมาร์ก พบว่าแบคทีเรียชนิดนี้ดื้อต่อ Tetracycline และ Chloramphenicol ขณะที่ *B. cereus* ดื้อต่อ Erythromycin, Penicillin และ Streptomycin จากการศึกษานี้ยังพบว่าแบคทีเรียแกรมลบรูปท่อนที่แยกได้จากถุงน้ำเชื้อกึ่งกลาดำมีความสามารถในการดื้อต่อสารต้านจุลชีพสูงกว่าแบคทีเรียแกรมบวก ทั้งนี้เนื่องจากส่วนประกอบของผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบแตกต่างจากแบคทีเรียแกรมบวก ซึ่งผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวกประกอบด้วยเปปติโดไกลแคนเป็นส่วนใหญ่ ในขณะที่ผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบมีความซับซ้อนมากกว่าแบคทีเรียแกรมบวกซึ่งประกอบด้วยเปปติโดไกลแคนและมีส่วนของไลโปพอลิแซคาไรด์และไลโป-โปรตีนอยู่ด้านนอกของผนังเซลล์

ทำให้ผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบแข็งแรงและถูกทำลายด้วยสารต้านจุลชีพได้ยากกว่าผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวก (Braude, 1982; Ceylan and Fung, 2004)

จากการศึกษาในครั้งนี้พบว่าแบคทีเรียที่แยกได้คือต่อ Penicillin และ Ampicillin สูงกว่าสารต้านจุลชีพชนิดอื่น ๆ ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่ามีการนำยาปฏิชีวนะทั้งสองชนิดนี้มาใช้ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ทำให้มีการกระจายของแบคทีเรียที่ต่อต้านสารต้านจุลชีพทั้งสองชนิดนี้มากขึ้น (McPhearson et al., 1991; Goni-Urriza et al., 2000) นอกจากนี้แบคทีเรียทุกชนิดที่แยกได้จากถุงน้ำเชื้อกุ้งกุลาดำไวต่อ Imipenem เนื่องจากยาชนิดนี้เป็นสารต้านจุลชีพในกลุ่ม Carbapenems ที่ได้รับการพัฒนาในระยะหลังซึ่งเป็นยาที่ทนต่อเอนไซม์เบต้า-แลคตาเมส (Hausler et al., 1991)

ปัจจุบันเกษตรกรร่นำสารต้านจุลชีพหลายชนิด เช่น Oxytetracycline, Tetracycline และ Oxolinic acid มาใช้ในการรักษาโรคที่เกิดจากแบคทีเรียในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ซึ่งการใช้สารต้านจุลชีพเหล่านี้เป็นเวลานานทำให้เกิดการดื้อต่อสารต้านจุลชีพเหล่านี้ ซึ่งจากการทดลองครั้งนี้พบว่าแบคทีเรียที่แยกได้ทั้งหมดดื้อต่อ Oxolinic acid สูงถึง 50.00% สอดคล้องกับรายงานของ Tendencia and Pena (2002) ที่รายงานว่าแบคทีเรียที่แยกได้จากน้ำ ดินตะกอนและตัวกุ้งที่มีการใช้ Oxolinic acid มีระดับการดื้อยาสูงกว่าแบคทีเรียที่แยกได้จากบ่อเลี้ยงกุ้งที่ไม่เคยมีการใช้ยาชนิดนี้

การตรวจสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์เบต้า-แลคตาเมสเพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละของการดื้อต่อสารต้านจุลชีพในกลุ่มเบต้า-แลคตาเมสกับการผลิตเอนไซม์เบต้า-แลคตาเมสของแบคทีเรีย พบว่า *B. cereus*, *B. licheniformis*, *P. mirabilis*, *P. aeruginosa*, *S. epidermidis*, *A. xylosoxidans* และ *A. faecalis* เป็นแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์เบต้า-แลคตาเมสได้ สอดคล้องกับกับรายงานของ Wolozin et al. (2003) ที่กล่าวว่า *B. cereus* สามารถผลิตเอนไซม์ชนิดนี้ได้ จากรายงานก่อนหน้านี้แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียหลายชนิดสามารถผลิตเอนไซม์ชนิดนี้ได้ ยกตัวอย่างเช่น *S. aureus*, *B. licheniformis*, *A. xylosoxidans* และ *S. albus* (Filali et al., 1996; Karabancheva & Chritor, 2004; Shin et al., 2005) จากการศึกษาแสดงให้เห็นว่าการดื้อต่อสารต้านจุลชีพในกลุ่มเบต้า-แลคตาเมสของแบคทีเรียไม่มีความสัมพันธ์กับการสร้างเอนไซม์เบต้า-แลคตาเมส ดังนั้นการดื้อต่อสารต้านจุลชีพในกลุ่มเบต้า-แลคตาเมสของแบคทีเรียที่แยกได้จากถุงน้ำเชื้อกุ้งกุลาดำไม่ได้เกิดจากการสร้างเอนไซม์เบต้า-แลคตาเมสเพียงอย่างเดียว ซึ่งการดื้อยาในกลุ่มนี้อาจเกิดจากแบคทีเรียมีการเปลี่ยนแปลงเป้าหมาย

ของยาหรือลดการซึมผ่านของยาเข้าสู่เซลล์ทำให้แบคทีเรียดื้อต่อสารต้านจุลชีพในกลุ่มเบต้า-แลคตาเมส (มาลิน จุลศิริ, 2540)

## กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณภาควิชาจุลชีววิทยาและภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพาที่ให้ความอนุเคราะห์อุปกรณ์และสถานที่ในการทดลอง

## เอกสารอ้างอิง

1. นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ. แบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับโรค (พิมพ์ครั้งที่ 2). กรุงเทพฯ: Noble print; 2554.
2. มาลิน จุลศิริ. ยาด้านจุลชีพ ความรู้พื้นฐานและการประยุกต์ (พิมพ์ครั้งที่ 2). กรุงเทพฯ: สถาบันพัฒนาการสาธารณสุขอาเซียน; 2540.
3. Bauer AW, Kirby WMM, Sherris JC, Turck M. Antibiotic susceptibility testing by standardized single disc method. American Journal of Clinical Pathology 1966;36:493-496.
4. Bielanski A. Experimental microbial contamination and disinfection of dry (vapour) shipper dewars designed for short-term storage and transportation of cryopreserved germplasm and other biological specimens. Theriogenology 2005;63:1946-1957.
5. Braude AJ, David CE, Fierer J. Microbiology. Philadelphia: W.B. Saunders.; 1982.
5. Ceylan E, Fung DY. Antimicrobial activity of spices. Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology 2004;12:1-55.
6. Department of Fisheries. Statistics of shrimp culture 2000. Publication No. 2-2003. Fisheries statistics analysis and research group, Minister of agricultural and cooperatives, Thailand; 2000.
7. Filali FR, Zaid A, Ledent P, Vanhove M, Beeumen JV, Frere JM.  $\beta$ -lactamases produced by thermophilic *Bacillus*. FEMS Microbiology Letters 1996;140:61-64.
8. Goni-Urriza M, Pineau L, Capdepuys M, Roques C, Caumette P, Quentin C. Antimicrobial resistance of mesophilic *Aeromonas* spp. isolated from two European rivers. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 2000;46:297-301.

9. Hausler WJ, Herrmann KL, Isenberg HD, Shadomy HJ. Manual of Clinical Microbiology. Washington D.C.: American Society for Microbiology; 1991.
10. Jensen LB, Baloda S, Boye M, Aarestrup FM. Anti-microbial resistance among *Pseudomonas* spp. and the *Bacillus cereus* group isolated Danish agricultural soil. Environment International 2001;26:581-587.
11. Karabancheva T, Chrisstov C. Comparative theoretical study of the mechanisms of generation of rotational strengths in the near-UV in  $\beta$ -lactamases from class A. Chemical Physics Letters 2004;398:511-516.
12. Krieg NR, Holt JG. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, volume 1. Baltimore: Williams and Wilkins; 1984.
13. Lahnsteiner E, Weismann T. Change in gees of brown trout, rainbow trout and grayling during short-term storage. North American Journal of Aquaculture 1999;61:213-219.
14. Lennette EH, Dalows A, Ausler JR. Manual of Clinical Microbiology. Washington: D.C.: American Society for Microbiology; 1985.
15. McPhearson RM, DePaola A, Zywno A, Motes ML, Guarino AM. Antibiotic resistance in Gram-negative bacteria from cultured catfish and aquaculture ponds. Aquaculture 1991;99:203-211.
16. Nimrat S, Siriboonlamom S, Zhang S, Xu Y, Vuthiphandchai V. Chilled storage of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) spermatophores. Aquaculture 2006;261:944-951.
17. Nimrat S, Bart AN, Keatsaksit A, Vuthiphandchai V. Microbial flora of spermatophores from black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) declines over long-term cryostorage. Aquaculture 2008;274:247-253.
18. Shin KS, Han K, Le J, Hong SB, Son BR, Youn SJ, Kim J, Shin HS. Imipenem-resistant *Achromobacter xylosoxi* *dans* carrying *bla*VIM-2-containing class 1 integron. Diagnostic Microbiology and Infection Disease 2005; 53:215-220.
19. Tendencia EA, Pena DLD. Level and percentage recovery of resistance to oxytetracycline and oxolinic acid of bacteria from shrimp pond. Aquaculture 2002; 213:1-13.
20. Vuthiphandchai V, Nimrat S, Kotcharat S, Bart AN. Development of a cryopreservation protocol for long-term storage of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) spermatophores. Theriogenology 2007;68:1192-1199.
21. Wolozin BL, Myerowitz R, Pratt, RF. Specific chemical modification of the readily nitrated tyrosine of the R<sub>TEM</sub>  $\beta$ -lactamase and of *Bacillus cereus*  $\beta$ -lactamase I: The role of this tyrosine in  $\beta$ -lactamase catalysis. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology 2003;701(2):153-163.