ความไวต่อสารต้านจุลชีพของแบคทีเรียที่แยกได้จากถุงน้ำเชื้อของกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) ที่เก็บรักษาแบบแช่แข็ง

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

สุบัณฑิต นิ่มรัตน์[1*], เนตฤทัย ศรีสมศักดิ์[2], วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย[3]
Subuntith Nimrat[1*], Nesrhtai Srisomsak[2], Verapong Vuthiphandchai[3]
Received : 8 January 2013; Accepted : 30 March 2013

บทคัดย่อ

การศึกษาในครั้งนี้เป็นการศึกษาถึงความไวของแบคทีเรียที่แยกได้จากถุงน้ำเชื้อกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) ที่เก็บรักษาแบบแช่เข็งต่อสารต้านจุลชีพจำนวน 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-แลคแตมของแบคทีเรียที่แยกได้จากถุงน้ำเชื้อกุ้งกุลาดำในการศึกษาครั้งนี้ไม่มีความสัมพันธ์กับการผลิตเอนไซม์ชนิดนี้ ดังนั้นการดื้อต่อสารต้านจุลชีพในกลุ่มเบต้า-แลคแตมของแบคทีเรียกลุ่มนี้ไม่ได้เกิดจากการผลิตเอนไซม์เบต้า-แลคตาเมสเพียงอย่างเดียว

คำสำคัญ: สารต้านจุลชีพ แบคทีเรีย กุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) การแช่แข็ง ถุงน้ำเชื้อ 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*,

[1] *ภาควิชาจุลชีววิทยาและโครงการวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ชลบุรี*
[2] *ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ชลบุรี*
[3] *ภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ชลบุรี*
[1] *Department of Microbiology and Environmental Science Program, Faculty of Science, Burapha University, Chon Buri Province*
[2] *Department of Microbiology, Faculty of Science, Burapha University, Chon Buri Province*
[3] *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 β-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 β-lactamase. This investigation highlighted that the resistance to β-lactams of bacteria isolated from black tiger shrimp spermatophore was not related to β-lactamase production. Therefore, the incidence of β-lactams resistance of those bacteria did not only emerge from β-lactamase production.

Keywords : Antimicrobial agents; Bacteria; Black tiger shrimp (*Penaeus monodon*); Cryopreservation; Spermatophore; β-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) ดังนั้นจึงจำเป็นอย่างยิ่งในการพัฒนากระบวนการในการเก็บรักษาถุงน้ำเชื้อกุ้งกุลาดำ เพื่อเพิ่มคุณภาพน้ำเชื้อและสนองต่อความต้องการของกุ้งกุลาดำ ซึ่งการเก็บรักษาถุงน้ำเชื้อกุ้งกุลาดำแบบแช่แข็งเป็นทางเลือกหนึ่งที่มีประสิทธิภาพในการเก็บรักษาน้ำเชื้อเพื่อใช้ในการผสมเทียม (Vuthiphandchai et al., 2007; Nimrat et al., 2008) แต่อย่างไรก็ตามการเก็บรักษาถุงน้ำเชื้อมักมีการปนเปื้อนของแบคทีเรีย ยกตัวอย่าง เช่น การศึกษาของ Nimrat et al., 2006 ได้ทำการศึกษาการเก็บรักษาถุงน้ำเชื้อกุ้งขาวแบบแช่เย็น 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) ดังนั้นการศึกษาความไวต่อสารต้านจุลชีพของแบคทีเรียที่แยกได้จากถุงน้ำเชื้อกุ้งกุลาดำในระหว่างการแช่แข็งจึงเป็นเรื่องที่มีความสำคัญในด้านการแพทย์และทำให้เกษตรกรได้ตระหนักถึงการใช้สารต้านจุลชีพในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำมากยิ่งขึ้น

วิธีการศึกษา

1. การจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรียที่แยกได้จากถุงน้ำเชื้อกุ้งกุลาดำแบบแช่แข็ง (Nimrat et al., 2008)

นำแบคทีเรียบริสุทธิ์แต่ละไอโซเลทที่คัดแยกได้จากถุงน้ำเชื้อกุ้งกุลาดำแบบแช่แข็งตามวิธีการของ Vuthiphandchai et al. (2007) มาเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic Soy Agar (TSA) ด้วยวิธีการ Cross streak และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศา-เซลเซียส 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 องศา-เซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง นำเชื้อมาปรับให้มีความขุ่นเท่ากับ McFarland No. 0.5 ด้วย 0.85% Normal saline ใช้ไม้พันสำลีจุ่มลงใน Suspension ของเชื้อบิดพอหมาด ๆ กับข้างหลอด จากนั้นป้ายลงบนหน้าอาหาร Mueller-Hinton Agar โดยป้ายให้ทั่วเพื่อให้แบคทีเรียกระจายสม่ำเสมอ วางทิ้งไว้ประมาณ 15 นาที ใช้ปากคีบที่ปราศจากเชื้อคีบแผ่นยาที่ต้องการทดสอบ ได้แก่ Clindamycin (2 µg), Oxytetracycline (30 µg), Tetracycline (30 µg), Chloramphenicol (30 µg), Erythromycin (15 µg), Vancomycin (30 µg), Sulphonamides (30 µg), Oxolinic acid (2 µg), Streptomycin (20 µg), Doxycycline hydrochloride (30 µg), Ampicillin (10 µg), Imipenem (10 µg), Sulphamethoxazole/Trimethoprim (25 µg) และ Penicillin G (10 Unit) วางบนอาหารเลี้ยงเชื้อแล้วกดเบา ๆ ให้แผ่นยาติดกับอาหารเลี้ยงเชื้อ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 16-18 ชั่วโมง การอ่านผลทำโดยวัดขนาดของบริเวณยับยั้งเป็นมิลลิเมตร และแปรผลตามตารางแปรผลของ

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

3. การทดสอบหาเอนไซม์เบต้า-แลคตาเมสโดยวิธี Rapid iodometric method (Lennette et al., 1985) เติมสารละลาย Penicillin 0.1 มิลลิลิตร ลงในหลุมของ Micro-titer plate จากนั้นเติมเชื้อที่ต้องการทดสอบที่ปรับให้มีความขุ่นเท่ากับ McFarland No. 4 ด้วย 0.85% Normal saline จำนวน 1 หยด เขย่าให้เข้ากันตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 30 นาที แล้วเติมสารละลายแป้งและสารละลายไอโอดีนจำนวน 2 และ 1 หยด ตามลำดับ ซึ่งจะเกิดสีน้ำเงินทันที เนื่องจากปฏิกิริยาของแป้งกับไอโอดีน เขย่าและตั้งทิ้งไว้ในอุณหภูมิห้องนาน 10 นาที การอ่านผลถ้าสีน้ำเงินจางหายไปจนกลายเป็นสีขาวภายใน 10 นาที แสดงว่าเป็นผลบวกคือ แบคทีเรียทดสอบสามารถสร้างเอนไซม์เบต้า-แลคตาเมสได้ ซึ่งชุดควบคุมใช้เชื้อมาตรฐาน คือ *E. coli* ATCC 25922 และ *S. aureus* ATCC 25923

ผลการศึกษา

1. การจัดจำแนกชนิดแบคทีเรียที่แยกจากถุงน้ำเชื้อของกุ้งกุลาดำ

จากการจัดจำแนกแบคทีเรียที่แยกจากถุงน้ำเชื้อของกุ้งกุลาดำแบบแช่แข็งโดยอาศัยคุณสมบัติทางชีวเคมี พบว่าสามารถจัดจำแนกแบคทีเรียได้จำนวน 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	*B. cereus*	*B. myloliquefaciens*	*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.
Catalase test	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	NT	NT	NT	+	NT	NT	+
Oxidase test	NT	+	NT	NT	NT	V	-	-	NT	NT	-	+	+	+	+	+	NT
KIA หรือ TSI, gas	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	A/A - K/A+	NT	NT	NT	NT	NT	NT
H_2S 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	NT
Starch hydrolysis test	+	+	+	+	+	V	-	NT	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	NT
Pyrrolidonyl arylamidase test	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	-	NT	V	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
NO_3^- 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	NT
β-galactosidase test	NT	V	NT	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	NT
Novobiocin susceptibility test	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	S	NT	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-acetly-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%) และแบคทีเรียที่ไวต่อสารต้านจุลชีพสูงสุดได้แก่ *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-แลคแตมได้มากกว่าร้อยละ 50 (Table 3) และพบว่า *B. cereus*, *B. licheniformis*, *S. epidermidis*, *P. mirabilis*, *A. xylosoxidans*, *A. faecalis* และ *P. aeruginosa* สามารถผลิตเอนไซม์เบต้า-แลคตาเมสได้ (Table 4) จากการศึกษาในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าการผลิตเอนไซม์เบต้า-แลคตาเมสและร้อยละของการดื้อต่อสารต้านจุลชีพกลุ่มเบต้าแลคแตม (Penicillin, Ampicillin และ Imipenem) ไม่มีความสัมพันธ์กัน

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

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

*14 types of antimicrobial agents

Table 3 Antibiogram and β-lactamase production of cryopreserved bacteria isolated from *P. monodon* spermatophore

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

** 3 types of β-lactam antimicrobial agents

Table 4 β-lactamase production of cryopreserved bacteria isolated from *P. monodon* spermatophore

Bacteria	β-lactamase production
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.	-

อภิปรายผลการศึกษา

จากการคัดแยกแบคทีเรียที่ปนเปื้อนในระหว่างการเก็บรักษาถุงน้ำเชื้อกุ้งกุลาดำแบบแช่แข็งพบว่าแบคทีเรียที่แยกได้ทั้งหมดมีจำนวน 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) ที่ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับแบคทีเรียที่พบในระหว่างการเก็บรักษาน้ำเชื้อกุ้งกุลาดำแบบแช่แข็ง พบว่าในระหว่างการเก็บรักษาถุงน้ำเชื้อนั้นสามารถพบแบคทีเรียที่ปนเปื้อนหลายชนิดซึ่งเหมือนกับการศึกษาในครั้งนี้ ได้แก่ *B. cereus*, *B. amyloliquefaciens, B. circulans*, *K. varians*, *P. mirabilis*, *P. aeruginosa, B. cepacia* นอกจากนี้ยังพบ *Enterobacter* spp. และ *Vibrio* spp. เป็นแบคทีเรียที่ไม่พบในการศึกษาครั้งนี้อีกด้วย และเมื่อนำแบคทีเรียที่พบในการศึกษาครั้งนี้มาศึกษาความไวต่อสารต้านจุลชีพจำนวน 14 ชนิด พบว่าแบคทีเรียที่พบดังกล่าวดื้อต่อสารต้านจุลชีพแต่ละชนิดแตกต่างกัน กล่าวคือ *P. aeruginosa* ดื้อต่อสารต้านชีพสูงที่สุดเท่ากับ 85.71% ซึ่ง *P. aeruginosa* มีการดื้อต่อสารต้านจุลชีพหลายชนิด 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 จากการศึกษาในครั้งนี้ยังพบว่าแบคทีเรียแกรมลบรูปท่อนที่แยกได้จากถุงน้ำเชื้อกุ้งกุลาดำมีความสามารถในการดื้อต่อสารต้านจุลชีพสูงกว่าแบคทีเรียแกรมบวก ทั้งนี้เนื่องจากส่วนประกอบของผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบแตกต่างจากแบคทีเรียแกรมบวก ซึ่งผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวกประกอบด้วยเปปติโดไกลแคนเป็นส่วนใหญ่ ในขณะที่ผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบมีความซับซ้อนมากกว่าแบคทีเรียแกรมบวกซึ่งประกอบด้วยเปปติโดไกลแคนและมีส่วนของไลโพพอลิแซคาไรด์และไลโพ-โปรตีนอยู่ด้านนอกของผนังเซลล์

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

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

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

การตรวจสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์เบต้า-แลคตาเมสเพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละของการดื้อต่อสารต้านจุลชีพในกลุ่มเบต้า-แลคแตมกับการผลิตเอนไซม์เบต้า-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; Karabencheva & Chritor, 2004; Shin et al., 2005) จากการศึกษาแสดงให้เห็นว่าการดื้อต่อสารต้านจุลชีพในกลุ่มเบต้า-แลคแตมของแบคทีเรียไม่มีความสัมพันธ์กับการสร้างเอนไซม์เบต้า-แลคตาเมส ดังนั้นการดื้อต่อสารต้านจุลชีพในกลุ่มเบต้า-แลคแตมของแบคทีเรียที่แยกได้จากถุงน้ำเชื้อกุ้งกุลาดำไม่ได้เกิดจากการสร้างเอนไซม์เบต้า-แลคตาเมสเพียงอย่างเดียว ซึ่งการดื้อยาในกลุ่มนี้อาจเกิดจากแบคทีเรียมีการเปลี่ยนแปลงเป้าหมายของยาหรือลดการซึมผ่านของยาเข้าสู่เซลล์ทำให้แบคทีเรียดื้อต่อสารต้านจุลชีพในกลุ่มเบต้า-แลคแตม (มาลิน จุลศิริ, 2540)

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณภาควิชาจุลชีววิทยาและภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพาที่ให้ความอนุเคราะห์อุปกรณ์และสถานที่ในการทดลอง

เอกสารอ้างอิง

1. นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ. แบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับโรค (พิมพ์ครั้งที่ 2). กรุงเทพฯ: Noble print; 2554.
2. มาลิน จุลศิริ. ยาต้านจุลชีพ 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 DYC. 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. β-lactamases produced by thermophilic *Bacillus*. FEMS Microbiology Letters 1996;140:61-64.
8. Goni-Urriza M, Pineau L, Capdepuy 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, Antimicrobial resistance among *Pseudomonas* spp. and the *Bacillus cereus* group isolated Danish agricultural soil. Environment International 2001;26:581-587.
11. Karabencheva T, Chrisstov C. Comparative theoretical study of the mechanisms of generation of rotational strengths in the near-UV in β-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 graying 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 balVIM-2-containg class 1 intregron. Diagnostic Mirobiology 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_{TEM} β-lactamase and of *Bacillus cereus* β-lactamase I: The role of this tyrosine in β-lactamase catalysis. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology 2003;701(2):153-163.