

Pemencilan dan Pencirian Spesies *Vibrio* Berpotensi Patogen daripada Air Balast di Pelabuhan Malaysia Terpilih

(Isolation and Characterization of Potentially Pathogenic *Vibrio* Species from Ballast Water in Selected Malaysian Ports)

NURATHIRAH MAT NASIR¹, NIK NURAZNIDA NIK IBRAHIM¹, FATHUL KARIM SAHRANI², ASMAT AHMAD¹ & FAREED SAIRI^{1,3,*}

¹Jabatan Sains Biologi dan Bioteknologi, Fakulti Sains dan Teknologi, Universiti Kebangsaan Malaysia, 43600 UKM Bangi, Selangor, Malaysia

²Jabatan Sains Bumi dan Alam Sekitar, Fakulti Sains dan Teknologi, Universiti Kebangsaan Malaysia, 43600 UKM Bangi, Selangor, Malaysia

³UKM Culture Collection (UKMCC), Fakulti Sains dan Teknologi, Universiti Kebangsaan Malaysia, 43600 UKM Bangi, Selangor, Malaysia

Diserahkan: 12 Disember 2023/Diterima: 27 Jun 2024

ABSTRACT

The introduction of *Vibrio* through ballast water can increase the existing *Vibrio* population in local waters, thereby increasing the risks of *Vibrio*-related infections in humans and marine animals. Additionally, it can disrupt local marine ecosystems through competition with native species and altering microbial communities. However, information related to the risk of ballast water-borne pathogenic species release, particularly *Vibrio* spp. in Malaysia is still limited. Therefore, this study was conducted to characterize and identify potentially pathogenic *Vibrio* species from ballast water discharged from cargo ships anchored in Port Klang and Port Tanjung Pelepas. Initial identification of *Vibrio* from ballast water samples was based on Gram staining, oxidase, catalase, glucose fermentation, motility, and susceptibility to O129 static vibrio agent. In addition, the characterization of factors related to virulence such as hemolysis, protease, lipase, biolayer formation and antibiotic resistance tests were also performed. *Vibrio* isolates showing virulent characteristics were then identified based on chromogenic agar and 16S rRNA gene analysis. As a result, a total of 154 *Vibrio* isolates were screened and 24 of them showed a positive response to all the virulence factors tested and had Multiple Antibiotic Resistance (MAR) index value > 0.2. Characterization of the 16S rRNA gene identified all 24 *Vibrio* spp. as *V. alginolyticus* (n=16), *V. fluvialis* (n=7) and *V. harveyi* (n=1). In conclusion, the presence of potentially pathogenic *Vibrio* species from ballast water clearly shows that ships anchored in Port Klang and Port Tanjung Pelepas are at risk of transferring potentially pathogenic species into local waters.

Keywords: Ballast water; invasive species; pathogen; *Vibrio* spp.

ABSTRAK

Kemasukan *Vibrio* melalui air balast boleh meningkatkan populasi *Vibrio* sedia ada di perairan tempatan, justeru meningkatkan risiko jangkitan *Vibrio* pada manusia dan haiwan marin. Selain itu, ia boleh mengganggu ekosistem marin tempatan melalui persaingan spesies asli dan mengubah komuniti mikrob. Walau bagaimanapun, maklumat berkaitan risiko pelepasan spesies patogen bawaan air balast khususnya *Vibrio* spp. di Malaysia masih terhad. Oleh itu, kajian ini dilakukan untuk mencari dan mengenal pasti spesies *Vibrio* berpotensi patogen dari air balast daripada kapal-kapal kargo yang berlabuh di Pelabuhan Klang dan Pelabuhan Tanjung Pelepas. Pengenalpastian awal *Vibrio* daripada sampel air balast dilakukan berdasarkan ujian pewarnaan Gram, oksidase, katalase, fermentasi glukosa, motiliti dan kerentanan terhadap agen vibrio statik O129. Selain itu, pencirian faktor terkait dengan kevirulenan seperti hemolisis, protease, lipase, pembentukan biolapisan serta ujian kerintangan antibiotik juga dilakukan. Pencirian *Vibrio* yang menunjukkan ciri kevirulenan kemudiannya dikenal pasti berdasarkan agar kromogenik dan penjujukan gen 16S rRNA. Hasilnya, sebanyak 154 penciran *Vibrio* telah disaring dan 24 daripadanya menunjukkan tindak balas positif terhadap kesemua faktor kevirulenan yang diuji serta mempunyai nilai indeks Antibiotik Pelbagai Rintang (MAR) > 0.2. Pencirian gen 16S rRNA telah mengenal pasti kesemua 24 *Vibrio* spp. sebagai *V. alginolyticus* (n=16), *V. fluvialis* (n=7) dan *V. harveyi* (n=1). Kesimpulannya, kehadiran spesies *Vibrio* berpotensi patogen daripada air balast jelas menunjukkan bahawa kapal yang berlabuh di Pelabuhan Klang dan Pelabuhan Tanjung Pelepas berisiko memindah masuk spesies berpotensi patogen daripada perairan luar ke dalam perairan tempatan.

Kata kunci: Air balast; patogen; spesies invasif; *Vibrio* spp.

PENGENALAN

Air balast merupakan pemberat tambahan yang diisi masuk ke dalam kapal untuk menambahkan drauf, mengubah trim atau menstabilkan kapal pada kedalaman air yang mencukupi semasa belayar (IMO 2017). Semasa proses pengepaman masuk air balast, pelbagai jenis organisma seperti protozoa, haiwan akuatik, tumbuhan, fitoplankton dan mikroorganisma turut dibawa masuk ke dalam tangki balast (Ardura, Borrell & Fern 2020; Drake, Doblin & Dobbs 2007; Ruiz et al. 2000). Apabila air balast tersebut dilepaskan keluar, organisma tersebut berkemungkinan dipindah keluar ke perairan persinggahan dan dikenali sebagai spesies penceroboh. Walaupun spesies ini terdiri dari pelbagai jenis organisma, kajian semasa lebih tertumpu kepada pencerobohan spesies bawaan air balast yang melibatkan metazoa dan fitoplankton toksik berbanding mikroorganisma.

Di Malaysia, hanya terdapat beberapa kajian yang pernah melaporkan kehadiran mikroorganisma di dalam air balast daripada kapal yang berlabuh di beberapa pelabuhan negara. Sebagai contoh, Salleh et al. (2021) dan Ibrahim et al. (2021) melaporkan kehadiran beberapa spesies bakteria berpotensi patogen seperti *E. coli*, *Vibrio* spp., *Enterococcus* spp., *Pseudomonas* spp., *Tenacibaculum* spp., *Flavobacteriaceae* spp., *Halomonas* spp., *Acinetobacter junii* dan *Shewanella algae*. Manakala, Hing et al. (2018) dan Siang et al. (2018) melaporkan kehadiran pelbagai taksa fitoplankton dan zooplankton, termasuk beberapa spesies dinoflagelat berbahaya serta bakteria petunjuk pencemar yang dicadangkan oleh IMO iaitu *Vibrio* spp., *Enterococcus* spp. dan *E. coli*. Daripada kajian tersebut, pengenalpastian *Vibrio* spp. hanya dilakukan pada peringkat genus. Sedangkan, terdapat lebih daripada 30 spesies *Vibrio* yang boleh menyebabkan jangkitan kepada manusia (taun, gastroenteritis, septisemia, jangkitan luka) dan haiwan akuatik (sindrom ulser, penyakit nekrosis hepatopankreatik akut, vaskulitis) (De Souza Valente & Wan 2021; Mohamad et al. 2019).

Kepatogenan sesuatu spesies *Vibrio* dikaitkan dengan pelbagai faktor kevirulenan seperti pelekatan, hemolisin, lipase, protease, biolapisan, pengambilan besi, sistem rembesan dan kerintangan antibiotik (Baker-Austin et al. 2018; Darshanee Ruwandepika et al. 2012; Zhang & Austin 2005; Thomas, Hamat & Neela 2014). Kajian kevirulenan *Vibrio* yang dilaporkan ini kebanyakannya dipencilkan daripada sampel klinikal, ternakan akuakultur, hidupan marin, air laut dan sungai. Namun, kajian berkaitan kevirulenan terhadap spesies *Vibrio* daripada air balast masih sangat terhad. Setakat ini, kajian kerintangan antibiotik *Vibrio* spp. terhadap antibiotik kumpulan betalaktam oleh Ng et al. (2018) adalah satu-satunya laporan kajian berkaitan dengan kevirulenan *Vibrio* daripada air balast yang telah dilaporkan. Kajian tentang faktor terkait kevirulenan sesuatu spesies bakteria adalah penting untuk memberi maklumat yang berguna dalam membangunkan

strategi berkesan untuk mengawal penyebaran dan jangkitan. Justeru, kajian ini dilakukan untuk mencirikan dan mengenal pasti spesies *Vibrio* yang berpotensi patogen daripada air balast melalui pendekatan penyaringan faktor kevirulenan seperti hemolisis, lipase protease, penghasilan biolapisan serta kerintangan terhadap antibiotik.

BAHAN DAN KAEDAH

PERSAMPELAN AIR BALAST

Persampelan telah dijalankan di Pelabuhan Klang, Selangor dan Pelabuhan Tanjung Pelepas, Johor dari Ogos 2016 sehingga Februari 2018. Sebanyak 17 sampel air balast telah diambil secara duplikat daripada lima buah kapal dari Pelabuhan Klang dan 12 kapal di Pelabuhan Tanjung Pelepas (Jadual 1). Sampel air balast diambil sama ada melalui lubang tangki balast atau paip limpah mengikut ketersediaan ketika persampelan dijalankan. Pengambilan air balast melalui lubang dilakukan dengan cara menenggelamkan baldi yang telah disterilkan dengan 70% v/v alkohol ke dalam tangki balast. Sebanyak satu liter air balast yang diperoleh kemudiannya dimasukkan ke dalam botol Schott steril. Manakala air balast yang diambil daripada saluran paip limpah ditadah masuk terus ke dalam botol Schott steril. Kesemua air balast disimpan di dalam kotak penyejuk yang mengandungi ais dan dibawa balik ke makmal untuk diproses.

PEMENCILAN DAN PENGKULTURAN *Vibrio*

Pemencilan *Vibrio* spp. dilakukan dengan memasukkan 1 mL sampel air balast ke dalam 9 mL kaldu air pepton berakali (APW) dan dieram selama 24 jam pada suhu 30 °C. Selepas eraman, pencairan bersiri (10^{-1} hingga 10^{-5}) dilakukan menggunakan larutan garam (0.95% w/v) yang steril. Sebanyak 0.1 mL alikuot daripada setiap pencairan 10^{-1} , 10^{-3} dan 10^{-5} disebar di atas agar *thiosulfate-citrate-bile salts-sucrose* (TCBS) (BD Difco™, UK) secara duplikat dan dieram pada suhu 30 °C selama 24 jam sehingga 48 jam. Koloni yang berpigmen hijau dan kuning (disyaki sebagai *Vibrio* spp.) telah dipilih dan dikultur di atas agar marin bagi mendapatkan kultur tulen. Pengenalpastian awal genus *Vibrio* telah dijalankan berdasarkan beberapa ujian menurut Nogueroles dan Blanch (2008) iaitu pewarnaan Gram, ujian oksidase, ujian katalase, ujian motiliti, ujian fermentasi glukosa dan ujian kepekaan terhadap cakera vibrio statik O129.

PENCIRIAN FENOTIP FAKTOR KEVIRULENAN YANG TERKAIT DAN BIOLAPISAN

Pencirian fenotip faktor kevirulenan terkait merangkumi ujian hemolisis, protease, lipase dan biolapisan. Agar darah

JADUAL 1. Bilangan pencilan *Vibrio* daripada air balast

Nombor sampel	Pelabuhan terlibat	Sampel air balast	Bilangan pencilan
BW1	Klang	Singapura	5
BW2	Klang	Jepun	34
BW3	Klang	China	2
BW4	Klang	China	1
BW5	Klang	Selat Melaka	16
BW6	Tanjung Pelepas	China	14
BW7	Tanjung Pelepas	China	8
BW8	Tanjung Pelepas	Singapura	1
BW9	Tanjung Pelepas	Singapura	11
BW10	Tanjung Pelepas	Indonesia	9
BW11	Tanjung Pelepas	Singapura	4
BW12	Tanjung Pelepas	Singapura	5
BW13	Tanjung Pelepas	Selat Melaka	12
BW14	Tanjung Pelepas	Singapura	2
BW15	Tanjung Pelepas	Indonesia	9
BW16	Tanjung Pelepas	China	12
BW17	Tanjung Pelepas	Vietnam	9

biri-biri Columbia (ISOLAB, Malaysia) (5% w/v) digunakan untuk melihat aktiviti hemolisis. Bagi ujian protease pula dijalankan dengan menggunakan 2% w/v susu tepung skim dicampur ke dalam agar infusi jantung-otak (BHI) (Oxoid, UK). Pengesanan aktiviti lipase dilakukan dengan menggunakan agar *spirit blue* (BD Difco™, UK) yang ditambah dengan 3% w/v minyak zaitun. Kesemua agar dieram dalam suhu 30 °C selama 24 jam sehingga 48 jam. Hasil pembentukan zon jernih pada setiap ujian yang dijalankan menunjukkan positif terhadap penghasilan enzim tersebut. Manakala, asai pembentukan biolapisan dilakukan dengan menggunakan kaedah O'toole (2011) dan pengkelasan berdasarkan Stepanović et al. (2000). Pengkelasan dilakukan dengan membandingkan nilai purata OD setiap pencilan dengan nilai purata OD kawalan (ODk). Nilai ODk dihitung dengan cara menambahkan nilai purata bacaan OD kawalan negatif ditambah dengan tiga kali sisihan piawaian (SD) seperti yang ditunjukkan dalam persamaan:

$OD \leq ODk$ Tiada pelekatan; $ODk < OD \leq 2 \times ODk$
Pelekatan lemah; $2 \times ODk < OD \leq 4 \times ODk$ Pelekatan sederhana; $4 \times ODk \leq OD$ Pelekatan kuat

KERINTANGAN ANTIBIOTIK

Ujian kerintangan antibiotik dilakukan menurut kaedah cakera resapan Kirby-Bauer (Hudzicki 2009). Sebanyak sembilan antibiotik digunakan untuk ujian kerintangan antibiotik: ampisilin (10 µg/cakera), penisilin (10 µg/cakera), eritromisin (15 µg/cakera), oksitetrasiklin (30 µg/cakera), kolistin sulfat (30 µg/cakera), polimiksin B (300 U/cakera), asid nalidixik (30 µg/cakera), sulfametozazol (25 µg/cakera) dan kloramfenikol (30 µg/cakera). Ujian ini dijalankan secara duplikat dan zon perencatan diukur berdasarkan *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI 2017). Indeks Antibiotik Pelbagai Rintang (MAR) dinilai berdasarkan Krumberman (1983): x/y dengan x adalah bilangan antibiotik yang rintang dan y adalah jumlah antibiotik yang diuji.

PENGENALPASTIAN SPESIES *Vibrio*

Pengenalpastian pencilan yang menunjukkan kehadiran faktor kevirulenan terkait dilakukan melalui agar kromogenik (CHROMagar™ *Vibrio*, Oxoid, UK) dan analisis jujukan 16S rRNA. Bagi analisis jujukan 16S rRNA, DNA genom bakteria telah diekstrak menggunakan kaedah CTAB/NaCl (Wilson 2001). Amplifikasi gen 16S

rRNA pula telah dilakukan melalui kaedah tindak balas berantai polimerase (PCR) menggunakan set pencetus *Vibrio* 16S rRNA: pencetus ke hadapan 700F: 5'-CGGTGAAATGCGTAGAGAT-3' dan pencetus balikan 1325R: 5'-TTACTAGCGATTCCGAGTTC-3' (Tarr et al. 2007). Sebanyak 12.5 µL campuran master EconoTaq PLUS GREEN 2X (Lucigen, US), 1 µL pencetus ke hadapan (0.1 µM) dan 1 µL pencetus balikan (0.1 µM), 1 µL sampel DNA dan 9.5 µL air suling steril telah disediakan. PCR dijalankan dengan ketetapan berikut: Penyahasian awal pada 94 °C selama 1 minit diikuti dengan 35 kitaran penyahasian (94 °C, 35 saat), penyepuh Lindapan (57 °C, 1 minit), pemanjangan (72 °C, 1.5 minit) dan diakhiri dengan pemanjangan akhir pada suhu 72 °C selama 7 minit.

Hasil produk PCR yang berukuran 663 pb dihantar ke Apical Scientific Sdn. Bhd. (Selangor, Malaysia) untuk perkhidmatan penjujukan gen 16S rRNA. Hasil penjujukan disemak dan disunting menggunakan perisian BioEdit 7.0 sebelum dihimpun pasang (*assembled*) menjadi satu jujukan DNA lengkap. Pengenalpastian spesies dilakukan dengan membandingkan jujukan lengkap dengan jujukan dalam perisian *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST - <https://www.blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>).

Akhir sekali, penjujukan spesies *Vibrio* dalam kajian ini dan strain rujukan dalam pangkalan data NCBI telah dijajarkan menggunakan *Clustal W*. Pohon filogeni seterusnya dibina menggunakan kaedah penggabungan jiran (NJ - *Neighbor Joining*). Analisis butstrap telah dilakukan dengan 1000 kali ulangan dan jarak evolusi dikira menggunakan kaedah Jukes-Cantor. Analisis pohon filogeni ini dilakukan menggunakan perisian MEGA 11 (Tamura, Stecher & Kumar 2021).

HASIL KAJIAN DAN PERBINCANGAN

PEMENCILAN *Vibrio* DARIPADA AIR BALAST

Dalam kajian ini, sebanyak 154 bakteria yang disyaki sebagai *Vibrio* spp. telah berjaya dipencilkan dan dihidupkan daripada 17 sampel air balast (Jadual 1). Daripada jumlah 154 pencilan, 133 pencilan menunjukkan koloni berwarna kuning dan 21 pencilan menunjukkan koloni berwarna hijau di atas agar TCBS. Kesemua pencilan yang disyaki *Vibrio* ini menunjukkan Gram negatif rod melengkung, berkebolehan bermotil, tindak balas oksidase dan katalase adalah positif, mampu fermentasi glukosa dan sensitif terhadap antibiotik vibrio statik, selari dengan kajian yang dilaporkan oleh Noguera dan Blanch (2008). Keupayaan *Vibrio* melakukan fermentasi glukosa dan sensitif terhadap vibrio statik O129 adalah penting untuk membezakannya daripada *Aeromonas* dan *Pseudomonas* (Folsom et al. 2010; Semwal, Kumar & Kumar 2023). Hal ini kerana bakteria *Aeromonas* spp. dan *Pseudomonas* spp. juga berkeupayaan tumbuh di atas

agar TCBS yang menunjukkan koloni berwarna kuning atau hijau (Alhusayni & Al-Khikani 2024).

PENCIRIAN *Vibrio* BERPOTENSI PATOGEN

Penyaringan potensi kepatogenan sesuatu pencilan kajian dapat ditentukan melalui ujian kehadiran faktor yang dikaitkan dengan kevirulenan. Kesemua 154 pencilan presumptif *Vibrio* ini menunjukkan tindak balas positif terhadap sekurang-kurangnya satu faktor kevirulenan yang diuji. Manakala, sebanyak 24 pencilan telah menunjukkan kehadiran kesemua faktor terkait kevirulenan yang diuji (Rajah 1(a)). Aktiviti lipase mencatatkan peratusan pencilan paling tinggi iaitu sebanyak 99% (n=152) diikuti dengan pembentukan biolapisan sebanyak 96% (n=148). Aktiviti protease dan β-hemolisis masing-masing mencatatkan peratusan pencilan sebanyak 43% (n=66) dan 35% (n=54).

Kehadiran lipase, protease, hemolisin dan biolapisan sebagai faktor kevirulenan *Vibrio* telah dilaporkan oleh beberapa kajian sebelum ini (Dahanayake et al. 2020; Darshane Ruwandeepika et al. 2012; Menezes et al. 2017). Lipase, protease dan hemolisin merupakan enzim yang telah diketahui penghasilannya dalam *Vibrio* terutamanya klad *Harveyi* (Darshane Ruwandeepika et al. 2012). Dalam kajian ini, peratusan pencilan yang menghasilkan lipase dilihat paling tinggi daripada keseluruhan pencilan *Vibrio* yang diuji. Lipase merupakan enzim yang berfungsi untuk mengurai rantaian panjang triasilgliserol kepada asid lemak dan molekul gliserol. Menurut Chimalapati et al. (2020), *V. parahaemolyticus* menghasilkan lipase VPA0266 untuk melemahkan membran sel dari dalam sitoplasma sel perumah yang dijangkiti.

Enzim protease pula membantu dalam meningkatkan kevirulenan *Vibrio* untuk menjangkiti manusia mahupun haiwan marin. Terdapat dua jenis protease yang dihasilkan dalam *Vibrio* iaitu metaloprotease (kolagenase dan vibriolisin) dan kumpulan serin-protease (krimotipsin protease) (Miyoshi 2013; Osei-Adjei, Huang & Zhang 2018; Salamone et al. 2019). *V. cholerae* contohnya, menghasilkan vibriolisin yang menyebabkan kerosakan tisu perumah dan memudahkan pengambilan heme bagi tujuan mendapatkan ion besi (Fe²⁺) untuk pertumbuhan bakteria (Galvis et al. 2021). Selain daripada *V. cholerae* dan *V. parahaemolyticus*, antara patogen *Vibrio* lain yang merekodkan kehadiran protease adalah *V. vulnificus*, *V. alginolyticus*, *V. metschnikovii*, *V. fluvialis* dan *V. mimicus* (Miyoshi 2013; Osei-Adjei, Huang & Zhang 2018; Shinoda & Miyoshi 2011).

Keupayaan bakteria presumptif *Vibrio* daripada air balast untuk melisis darah dalam kajian ini membuktikan kehadiran toksin hemolisin yang penting dalam proses jangkitan perumah. Menurut Zhang dan Austin (2005), hemolisin merupakan toksin yang paling banyak disebarkan dalam kalangan patogen *Vibrio* untuk

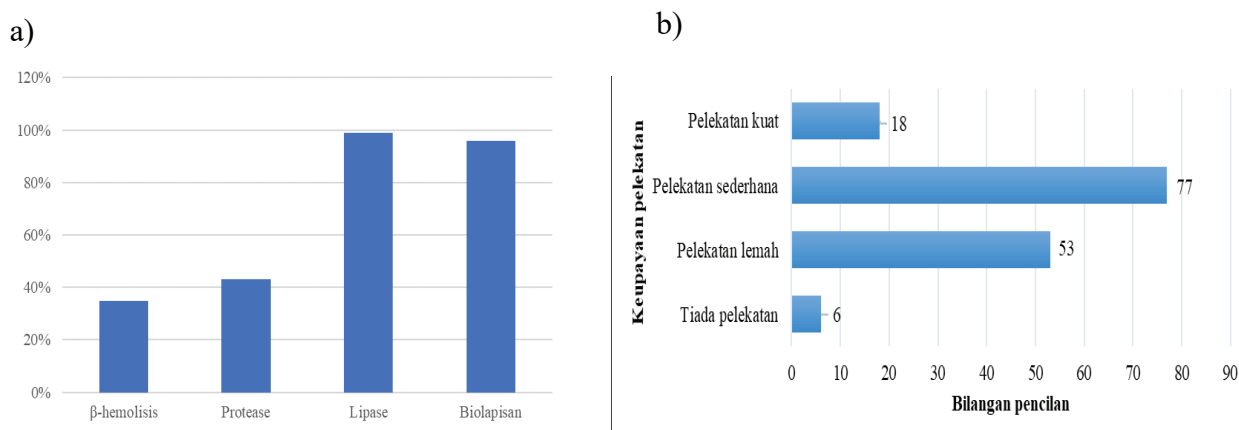
KERINTANGAN AKIVITI ANTIMIKROB

mendapatkan ion besi. Perembesan hemolisin boleh mengaruh nekrosis, lisis dan apoptosis sel perumah terutamanya sel darah merah melalui tindak balas pembentukan pori atau hidrolisis membran sfingolipid untuk menggalakkan pencerobohan masuk patogen serta merosakkan sistem keimunan perumah (Flores-Diaz et al. 2016; Sonnen & Henneke 2013). Selain daripada memecahkan sel darah merah, hemolisin juga mampu menyerang sel mast serta sel darah putih seperti neutrofil (Wong, Zhang & Woo 2012; Zhu et al. 2024).

Dalam kajian ini juga, sebanyak 96% bakteria presumptif *Vibrio* mampu membentuk biolapisan. Keupayaan membentuk biolapisan ini dinilai berdasarkan kekuatan pelekatan pada permukaan yang dikategorikan sebagai lemah, sederhana, kuat dan tiada pelekatan (Rajah 1(b)). Sebanyak 77 (50%) pencilan presumptif *Vibrio* berupaya membentuk pelekatan sederhana diikuti dengan pelekatan lemah sebanyak 53 (34%), pelekatan kuat sebanyak 18 (12%) dan tiada pelekatan sebanyak 6 (4%) pencilan. Pembentukan biolapisan merupakan salah satu faktor utama suatu patogen untuk mengkoloni dan bermandiri dalam sel perumah yang dijangkiti atau permukaan ekstrem (Schulze et al. 2021). Menurut Drake et al. (2005) biolapisan pada tangki balast boleh mengandungi bakteria 2-8 kali lebih tinggi daripada air balast (per liter isi padu). Di samping itu, pembentukan biolapisan pada tangki balast juga berupaya untuk memerangkap lebih banyak mikroorganisma termasuklah spesies patogen setiap kali proses pengisian masuk dan pembuangan air balast dilakukan. Namun begitu, Baier et al. (2014) dan Forsberg et al. (2005) mendapati hanya sebilangan kecil biolapisan akan tertanggal daripada dinding tangki balast semasa proses pertukaran tersebut.


Kesemua pencilan *Vibrio* yang berpotensi patogen (n=24) menunjukkan kerintangan terhadap enam antibiotik iaitu ampisilin, penisilin, kolistin sulfat, oksitetrasiklin, polimiksin B dan eritromisin (Rajah 2). Namun begitu, antibiotik kloramfenikol masih berupaya merencatkan kesemua pencilan *Vibrio* yang diuji dalam uji kaji ini. Antibiotik sulfametosazol berupaya merencatkan 22 pencilan *Vibrio* dan hanya dua pencilan sahaja menunjukkan kerentanan sederhana terhadap antibiotik tersebut. Manakala, 12 pencilan *Vibrio* menunjukkan kerintangan terhadap asid nalidixik, 11 pencilan menunjukkan kerentanan sederhana dan hanya satu pencilan sahaja yang rentan terhadap antibiotik tersebut. Kesemua pencilan *Vibrio* kajian ini menunjukkan nilai indeks MAR melebihi 0.2 (Rajah 2) yang mencadangkan kemungkinan pencilan tersebut datang daripada persekitaran yang tercemar dan berisiko tinggi di mana antibiotik digunakan secara kerap dan meluas (Adinortey et al. 2020; Kathleen et al. 2016).

Melalui hasil kajian yang diperolehi, pencilan *Vibrio* daripada air balast menunjukkan tahap kerintangan yang tinggi terhadap antibiotik ampisilin, penisilin, kolistin sulfat, oksitetrasiklin, polimiksin B dan eritromisin. Kerintangan *Vibrio* terhadap antibiotik telah banyak dilaporkan daripada kajian lepas. Kajian daripada Laganà et al. (2011) dan Vaseeharan et al. (2005) menunjukkan kerintangan pencilan *Vibrio* daripada sangkar udang dan ladang ternakan akuakultur terhadap ampisilin, penisilin, kolistin sulfat, eritromisin dan oksitetrasiklin. Selain itu, kajian daripada Gxalo et al. (2021) pula menunjukkan pencilan *Vibrio* yang rintang terhadap antibiotik ampisilin dan polimiksin B daripada air sisa buangan di kawasan sungai Afrika Selatan.



RAJAH 1. (a) Peratusan tindak balas positif aktiviti faktor kevirulenan berdasarkan semua pencilan (n = 154) dan (b) bilangan keupayaan pencilan membentuk biolapisan daripada air balast

Sampel	Ujian kerintangan antibiotik									MAR	Ujian biolapisan	Spesies	Sumber air balast
	AMP	P	CT	OT	PB	RL	C	NA	E				
BW1 5V	■	■	■	■	■	■	■	■	■	0.67	+	<i>Vibrio fluvialis</i>	Singapura
BW2 29V	■	■	■	■	■	■	■	■	■	0.78	+	<i>Vibrio fluvialis</i>	Jepun
BW2 32V	■	■	■	■	■	■	■	■	■	0.78	++	<i>Vibrio fluvialis</i>	Jepun
BW5 8V	■	■	■	■	■	■	■	■	■	0.78	++	<i>Vibrio alginolyticus</i>	Selat Melaka
BW5 12V	■	■	■	■	■	■	■	■	■	0.78	++	<i>Vibrio alginolyticus</i>	Selat Melaka
BW5 16V	■	■	■	■	■	■	■	■	■	0.67	+++	<i>Vibrio harveyi</i>	Selat Melaka
BW7 2V	■	■	■	■	■	■	■	■	■	0.78	+	<i>Vibrio alginolyticus</i>	China
BW7 3V	■	■	■	■	■	■	■	■	■	0.78	+	<i>Vibrio alginolyticus</i>	China
BW7 4V	■	■	■	■	■	■	■	■	■	0.78	+	<i>Vibrio alginolyticus</i>	China
BW7 5V	■	■	■	■	■	■	■	■	■	0.78	++	<i>Vibrio alginolyticus</i>	China
BW8 2V	■	■	■	■	■	■	■	■	■	0.78	++	<i>Vibrio alginolyticus</i>	Singapura
BW9 2V	■	■	■	■	■	■	■	■	■	0.67	+	<i>Vibrio fluvialis</i>	Singapura
BW9 5V	■	■	■	■	■	■	■	■	■	0.67	++	<i>Vibrio fluvialis</i>	Singapura
BW10 1V	■	■	■	■	■	■	■	■	■	0.67	++	<i>Vibrio fluvialis</i>	Indonesia
BW10 2V	■	■	■	■	■	■	■	■	■	0.67	++	<i>Vibrio alginolyticus</i>	Indonesia
BW10 3V	■	■	■	■	■	■	■	■	■	0.67	++	<i>Vibrio alginolyticus</i>	Indonesia
BW10 4V	■	■	■	■	■	■	■	■	■	0.67	++	<i>Vibrio alginolyticus</i>	Indonesia
BW10 5V	■	■	■	■	■	■	■	■	■	0.67	++	<i>Vibrio alginolyticus</i>	Indonesia
BW10 6V	■	■	■	■	■	■	■	■	■	0.67	++	<i>Vibrio alginolyticus</i>	Indonesia
BW11 1V	■	■	■	■	■	■	■	■	■	0.67	+	<i>Vibrio alginolyticus</i>	Singapura
BW13 4V	■	■	■	■	■	■	■	■	■	0.78	+++	<i>Vibrio alginolyticus</i>	Selat Melaka
BW13 5V	■	■	■	■	■	■	■	■	■	0.78	++	<i>Vibrio alginolyticus</i>	Selat Melaka
BW14 1V	■	■	■	■	■	■	■	■	■	0.67	++	<i>Vibrio alginolyticus</i>	Singapura
BW14 2V	■	■	■	■	■	■	■	■	■	0.67	++	<i>Vibrio fluvialis</i>	Singapura



■ Sensitif ■ Perantara ■ Rintang

AMP; ampisilin (10 µg), P; penisilin (10 µg), CT; kolistin sulfat (30 µg), OT; oksitetrasiklin (30 µg), PB; polimiksin B (300 U), RL; sulfametosazol (25 µg), C; kloramfenikol (30 µg), NA; asid nalidixik (30 µg), E; eritromisin (15 µg), +; pelekatan lemah, ++; pelekatan sederhana dan +++; pelekatan kuat

RAJAH 2. Pola kerintangan antibiotik serta nilai indeks MAR pencilan *Vibrio* terpilih berdasarkan keupayaan menunjukkan tindak balas positif terhadap semua ujian faktor kevirulenan dan hubung kait dengan jenis keupayaan penghasilan biolapisan

Kerintangan terhadap ampisilin dan penisilin yang tinggi disebabkan oleh penggunaan antibiotik tersebut secara meluas sejak tahun dari 1940-an hingga 1960-an (Lobanovska & Pilla 2017; You, Bong & Lee 2016). Selain itu, eritromisin dan oksitetrasiklin digunakan dalam rawatan akuakultur terutamanya di negara-negara ASEAN (Loo et al. 2020; Tan et al. 2017; Weese et al. 2015). Penggunaan antibiotik tersebut dalam jangka masa yang lama dan berterusan berkemungkinan meningkatkan kerintangan bakteria terhadap antibiotik tersebut.

Peningkatan kerintangan bakteria *Vibrio* terhadap kolistin yang sebelum ini rentan terhadap antibiotik tersebut menunjukkan kemunculan ancaman kesihatan awam yang baharu, dijangka berpunca daripada penggunaan secara berlebihan dalam sektor kesihatan, veterinar dan akuakultur (Jeannot, Bolard & Plesiat 2017; Pulss et al. 2017; Rhouma, Beaudry & Letellier 2016). Misalnya, Dung et al. (2008) dan Zouiten et al. (2017) telah melaporkan kemunculan kerintangan kolistin oleh *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus* dan *Edwardsiella ictaluri* yang dipencil dari ladang akuakultur.

Selain itu, hampir separuh daripada keseluruhan pencilan *Vibrio* yang diuji menunjukkan kerintangan terhadap antibiotik asid nalidisik (50%). Kerintangan terhadap antibiotik yang sama pernah dilaporkan dalam kajian Laganà et al. (2011) dan Vaseeharan et al. (2005) yang mencatatkan nilai peratusan 12.5% dan 32%. Manakala, kerintangan pencilan *Vibrio* terhadap sulfametozazol dalam kajian ini (8.7%), hampir selari dengan hasil kajian You, Bong dan Lee (2016) yang menunjukkan pencilan *Vibrio* dari sungai Kuala Selangor (8.7%).

Walaupun kesemua 24 pencilan *Vibrio* dalam kajian ini masih rentan terhadap kloramfenikol seperti hasil kajian Laganà et al. (2011), Lee et al. (2009) dan Tan et al. (2020), Gxalo et al. (2021) telah melaporkan kerintangan *Vibrio* yang tinggi terhadap antibiotik yang sama (> 90%). Peningkatan peratusan pencilan *Vibrio* yang rintang kepada antibiotik ini dijangka mengancam sektor kesihatan dan akuakultur di Malaysia jika tidak dibendung dari awal.

Berdasarkan nilai indeks MAR, kesemua pencilan *Vibrio* daripada air balast (n=24) menunjukkan nilai melebihi > 0.2. Ini selari dengan kajian Martínez (2003) yang mendapati lebih daripada 90% pencilan bakteria dari air laut mempunyai kerintangan terhadap lebih daripada satu sebatian antibiotik. Hal ini mencadangkan kemungkinan air balast yang diambil datang daripada persekitaran berisiko tinggi yang tercemar dengan antibiotik. Persekitaran air balast yang tertutup, penyimpanan yang lama dan tercemar dengan antibiotik, mampu memberi tekanan selektif melalui pemindahan gen kerintangan antibiotik secara melintang dalam air balast (Altug et al 2012; Salleh et al. 2021; Thomson, Heinemann & Dobbs 2003). Walau bagaimanapun, penentuan sumber air balast yang tercemar ini sukar ditentukan kerana terdapat kapal yang melepaskan air balast secara separa dan boleh menyebabkan percampuran air balast sedia ada dengan air daripada sumber pelabuhan berbeza (Minchin 2001).

PENGENALPASTIAN SPESIES *Vibrio*

Berdasarkan kehadiran faktor kevirulenan (lipase, protease, β -hemolisis dan biolapisan) serta kerintangan terhadap enam antibiotik, 24 pencilan *Vibrio* telah dikategorikan sebagai bakteria yang berpotensi patogen. Pengenalpastian spesies pencilan *Vibrio* ini melalui agar kromogenik dan juga penjujukan gen 16S rRNA menunjukkan kehadiran tiga spesies *Vibrio* iaitu *V. alginolyticus* (n=16), *V. fluvialis* (n=7) dan *V. harveyi* (n=1) dalam sampel air balast. Ketiga-tiga spesies *Vibrio* ini dikenali sebagai patogen berdasarkan kajian lepas yang melaporkan kemampuan spesies tersebut dalam menyebabkan jangkitan kepada manusia mahupun hidupan akuatik (Baker-Austin et al. 2018; De Souza Valente & Wan 2021). Berdasarkan Jadual 2, *V. alginolyticus* menunjukkan koloni berwarna krim, *V. fluvialis* pula

menunjukkan koloni berwarna ungu dan *V. harveyi* pula menunjukkan koloni berwarna putih. Hasil pemerhatian *V. alginolyticus* dan *V. fluvialis* selari dengan hasil kajian Canizalez-Roman et al. (2011) dan Eddabra, Piemont dan Scheftel (2011). Namun, penghasilan warna koloni *V. harveyi* yang berwarna putih di atas agar kromogenik belum pernah lagi dilaporkan oleh mana-mana kajian sebelum ini.


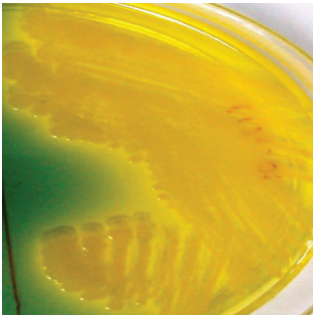


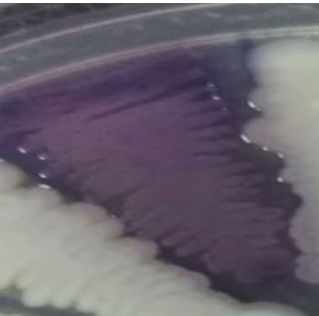
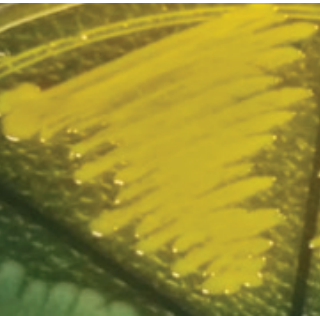
Pengenalpastian spesies pencilan air balast melalui analisis gen 16S rRNA yang dibandingkan melalui pangkalan data NCBI menunjukkan persamaan peratusan 99%-100% kepada spesies *Vibrio* (Jadual 3). Sebanyak 16 pencilan *V. alginolyticus* menunjukkan persamaan jujukan terhadap *V. alginolyticus* ATCC 17749, tujuh pencilan *V. fluvialis* mempunyai persamaan jujukan kepada *V. fluvialis* NCTC 11327 dan satu pencilan *V. harveyi* menunjukkan persamaan terdekat terhadap *V. harveyi* NCIMB 1280. Hasil ini juga disokong oleh pohon filogeni (Rajah 3) yang menunjukkan setiap spesies *V. alginolyticus*, *V. fluvialis* dan *V. harveyi* daripada air balast memasuki klad masing-masing bersama spesies rujukan (*V. alginolyticus* ATCC 17749, *V. fluvialis* NCTC 11327 dan *V. harveyi* NCIMB 1280). Kehadiran spesies *V. alginolyticus*, *V. fluvialis* dan *V. harveyi* daripada air balast dalam kajian ini juga turut dijumpai dalam air balast yang pernah dilaporkan oleh kajian lepas (Altug et al. 2012; Li et al. 2013; Ling et al. 2005; Mimura, Katakura & Ishida 2005; Ng et al. 2018; Wu et al. 2017; Xue et al. 2021). Kajian daripada Ng et al. (2018) telah mengesan kehadiran *V. cholerae* dalam air balast daripada kapal yang berlabuh di pelabuhan Singapura. Walau bagaimanapun, kehadiran *V. cholerae* bertoksin tidak dapat dikesan dalam air balast hasil daripada kajian ini seperti mana yang disarankan oleh peraturan D-2 konvensyen BWM (piawai prestasi air balast berasaskan penilaian risiko bakteriologi) yang hanya tertumpu kepada bakteria *V. cholerae*, *E. coli* dan juga *Enterococcus*. Dalam peraturan tersebut, pelepasan air balast perlu mencapai spesifikasi berikut: 1) *V. cholerae* bertoksin (O1 & O139) mestilah kurang daripada 1 CFU (*Colony Form Unit*) per 100 mL atau kurang daripada 1 CFU per 1 g, 2) *E. coli* kurang daripada 250 CFU per 100 mL dan 3) *Enterococci* spp. mestilah kurang daripada 100 CFU per 100 mL (IMO 2017).

Kes jangkitan *V. alginolyticus* berpunca daripada aktiviti rekreasi di pantai dan penggunaan produk bersumberkan hidupan marin pada manusia telah dilaporkan di Malaysia, Britain, Turkey dan Amerika Syarikat (Citol et al. 2015; Jacobs Slifka, Newton & Mahon 2017; Mohamed et al. 2016; Reilly et al. 2011). Manakala, kes jangkitan *V. alginolyticus* terhadap hidupan marin seperti udang, ikan kerapu, ikan pari, ikan siakap serta gamat juga telah dilaporkan (Darshanee Ruwandeepika et al. 2012; Emam et al. 2019; Kahla-Nakbi, Chaieb & Bakhrouf 2009; Rafidah et al. 2017). Jangkitan yang disebabkan oleh *V. fluvialis* pula sering kali dikaitkan

dengan masalah cirit-birit pada manusia di India dan Brazil serta Rusia (Ramamurthy et al. 2014). Jangkitan *V. fluvialis* pada haiwan pula jarang dilaporkan, namun laporan daripada Aguirre et al. (1994) telah mengaitkan *V. fluvialis* dengan penyakit fibropapillomatosis pada penyu hijau di Hawaii. Kes jangkitan *V. harveyi* pula boleh menyebabkan lesi pada mata, gastroenteritis, nekrosis otot, ulser kulit dan penyakit reput ekor (*tail rot disease*) pada ikan serta vibriosis swacahaya (*luminous*) pada udang (Zhang, He & Austin 2020).

Kehadiran spesies *Vibrio* berpotensi patogen daripada air balast di dalam kajian ini merupakan satu ancaman terhadap kesihatan manusia mahupun ekosistem marin sekiranya air balast dilepaskan keluar ke dalam perairan tempatan. Walaupun kehadiran patogen dalam sampel air balast kajian ini adalah rendah bilangannya (yang boleh dikultur) namun ini tidak menggambarkan populasi sebenar bakteria yang hadir dalam air balast apabila terdapat bakteria yang tidak boleh dikultur atau berada

JADUAL 2. Pengenalpastian spesies *Vibrio* berdasarkan agar kromogenik dan agar TCBS

Agar kromogenik	Agar TCBS	Spesies
		<i>Vibrio alginolyticus</i>
Krim	Kuning	
		<i>Vibrio harveyi</i>
Putih	Kuning	
		<i>Vibrio fluvialis</i>
Ungu	Kuning	

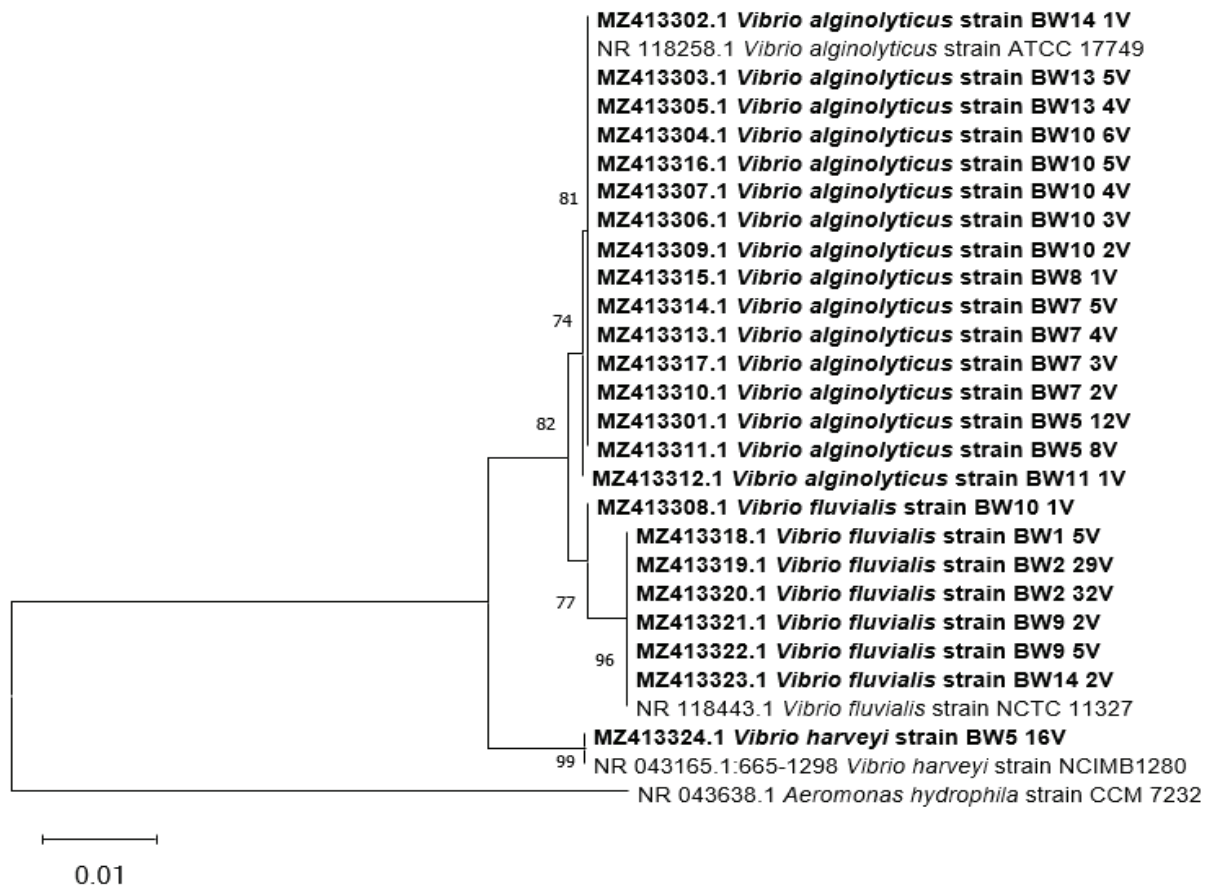
dalam keadaan *viable but non-culturable* (VBNC) (Drake et al. 2005). Malahan, populasi sebenar bakteria dalam air balast mungkin jauh lebih tinggi disebabkan oleh kebolehan menghasilkan biolapisan.

Pergerakan keluar masuk kapal domestik dan bot tempatan di laluan pelabuhan serta pelepasan air balast berterusan tanpa kawalan untuk jangka masa yang panjang dikhuatiri berpotensi menyebarkan spesies-spesies *Vibrio* ke kawasan perairan tempatan. Keadaan ini merupakan satu ancaman yang boleh mengganggu gugat kestabilan ekosistem marin dan juga meningkatkan risiko kesihatan yang serius melalui jangkitan penyakit kepada penduduk tempatan dan juga haiwan akuatik. Oleh itu, pemantauan tahap pencemaran mikrobiologi khususnya bakteria berpotensi patogen seperti *Vibrio* spp. di pelabuhan dan

juga air balast daripada kapal yang berlabuh di pelabuhan tempatan perlu dilakukan secara berterusan bagi membangunkan data asas yang lebih terperinci berkaitan spesies bawaan air balast. Hal ini bertujuan untuk membuat penilaian risiko kemasukan bakteria patogen ke dalam perairan tempatan melalui pelepasan air balast. Hasil kajian ini juga dapat disumbangkan sebagai data sokongan kepada Jabatan Laut Malaysia dalam langkah pembangunan maklumat asas spesies patogen. Di samping itu, pihak berkuasa tempatan juga boleh mengambil langkah yang lebih proaktif untuk memperkasakan lagi penguatkuasaan pengurusan air balast terutamanya pelepasan air balast mengikut garis panduan yang telah ditetapkan oleh IMO bagi mengurangkan penyebaran spesies patogen di perairan Malaysia.

JADUAL 3. Pengenalpastian spesies *Vibrio* berdasarkan penjujukan gen 16S rRNA

Spesies	Spesies terhampir (No. rujukan)	Pencilan (No. rujukan)	Peratus persamaan (%)
<i>Vibrio fluvialis</i>	<i>Vibrio fluvialis</i> NCTC 11327 (NR118443.1)	BW1_5V (MZ413318)	99.84
		BW2_29V (MZ413319)	99.84
		BW2_32V (MZ413320)	99.84
		BW9_2V (MZ413321)	99.85
		BW9_5V (MZ413322)	99.84
		BW10_1V (MZ413308)	99.37
		BW14_2V (MZ413323)	100
<i>Vibrio alginolyticus</i>	<i>Vibrio alginolyticus</i> ATCC 17749 (NR118258.1)	BW5_8V (MZ413311)	99.84
		BW5_12V (MZ413301)	99.84
		BW7_2V (MZ413310)	99.84
		BW7_3V (MZ413317)	99.69
		BW7_4V (MZ413313)	99.84
		BW7_5V (MZ413314)	99.85
		BW8_1V (MZ413315)	99.85
		BW10_2V (MZ413309)	99.69
		BW10_3V (MZ413306)	99.85
		BW10_4V (MZ413307)	100
		BW10_5V (MZ413316)	99.84
		BW10_6V (MZ413304)	99.84
		BW11_1V (MZ413312)	98.91
		BW13_4V (MZ413305)	99.84
BW13_5V (MZ413303)	99.84		
BW14_1V (MZ413302)	100		
<i>Vibrio harveyi</i>	<i>Vibrio harveyi</i> NCIMB 1280 (NR043165.1)	BW5_16V (MZ413324)	100



RAJAH 3. Pohon filogeni *Vibrio* spp. yang telah dikenal pasti berdasarkan jujukan 16S rRNA

KESIMPULAN

Dalam kajian ini beberapa spesies *Vibrio* berpotensi patogen daripada air balast telah berjaya dikenal pasti iaitu *V. alginolyticus*, *V. fluvialis* dan *V. harveyi*. Pengenalpastian ini berdasarkan keupayaan spesies-spesies ini menghasilkan semua aktiviti faktor kevirulenan iaitu lipase, protease, hemolisin dan biolapisan. Di samping itu, kesemua spesies *Vibrio* ini juga menunjukkan nilai indeks MAR melebihi 0.2 yang menggambarkan bahawa pencilan tersebut berkemungkinan datang daripada persekitaran yang tercemar serta berisiko tinggi dengan antibiotik digunakan secara kerap dan meluas. Hal ini jelas menunjukkan bahawa kapal yang berlabuh di Pelabuhan Klang dan Pelabuhan Tanjung Pelepas berisiko memindah masuk spesies berpotensi patogen daripada perairan luar ke dalam perairan tempatan.

PENGHARGAAN

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Universiti Kebangsaan Malaysia kerana menyediakan peralatan dan infrastruktur untuk penyelidikan. Penghargaan diberikan kepada Kementerian Sains, Teknologi dan Inovasi (MOSTI), Malaysia untuk geran Dana Sains Inovasi (No. geran; 04-01-02-SF1244) yang diberikan bagi membiayai kajian ini.

RUJUKAN

- Adinortey, C.A., Aheto, D.W., Boateng, A.A. & Agbeko, R. 2020. Multiple antibiotic resistance-coliform bacteria in some selected fish farms of the Central Region of Ghana. *Scientifica* 2020: 6641461.
- Aguirre, A.A., Balazs, G.H., Zimmerman, B. & Spraker, T.R. 1994. Evaluation of Hawaiian green turtles (*Chelonia Mydas*) for potential pathogens associated with fibropapillomas. *Journal of Wildlife Diseases* 30(1): 8-15.

- Alhusayni, A.A. & Al-Khikani, F.H.O. 2024. Growth of different bacteria on thiousulfate citrate bile salts sucrose agar. *Journal of Marine Medical Society* 26(2): 347-348.
- Altug, G., Gurun, S., Cardak, M., Ciftci, P.S. & Kalkan, S. 2012. The occurrence of pathogenic bacteria in some ships' ballast water incoming from various marine regions to the Sea of Marmara, Turkey. *Marine Environmental Research* 81: 35-42.
- Ardura, A., Borrell, Y.J. & Fern, S. 2020. Nuisance algae in ballast water facing international conventions. Insights from DNA metabarcoding in ships arriving in Bay of Biscay. *Water* 12(8): 2168.
- Baier, R.E., Forsberg, R.L., Meyer, A.E. & Lundquist, D.C. 2014. Ballast tank biofilms resist water exchange but distribute dominant species. *Management of Biological Invasions* 5(3): 241-244.
- Baker-Austin, C., Oliver, J.D., Alam, M., Ali, A., Waldor, M.K., Qadri, F. & Martinez-Urtaza, J. 2018. *Vibrio* spp. infections. *Nature Review Disease Primers* 4: 1-19.
- Canizalez-Roman, A., Flores-Villaseñor, H., Zazueta-Beltran, J., Muro-Amador, S. & León-Sicairos, N. 2011. Comparative evaluation of a chromogenic agar medium-PCR protocol with a conventional method for isolation of *Vibrio parahaemolyticus* strains from environmental and clinical samples. *Canadian Journal of Microbiology* 57(2): 136-142.
- Chimalapati, S., De Souza Santos, M., Lafrance, A.E., Ray, A., Lee, W.R., Rivera-Cancel, G., Vale, G., Pawlowski, K., Mitsche, M.A., Mcdonald, J.G., Liou, J. & Orth, K. 2020. *Vibrio* deploys type 2 secreted lipase to esterify cholesterol with host fatty acids and mediate cell egress. *Elife* 9: e58057.
- Citil, B.E., Derin, S., Sankur, F., Sahan, M. & Citil, M.U. 2015. *Vibrio alginolyticus* associated chronic myringitis acquired in Mediterranean waters of Turkey. *Case Reports in Infectious Diseases* 2015: 187212.
- CLSI 2017. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing CLSI Approved Standards CLSI M100-S23*. United States: Clinical and Laboratory Standards Institute.
- Dahanayake, P.S., Hossain, S., Wickramanayake, M. & Heo, G.J. 2020. Prevalence of virulence and extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) genes harbouring *Vibrio* spp. isolated from cockles (*Tegillarca granosa*) marketed in Korea. *Letter in Applied Microbiology* 71(1): 61-69.
- Darshane Ruwandepika, H.A., Sanjeeva Prasad Jayaweera, T., Paban Bhowmick, P., Karunasagar, I., Bossier, P. & Defoirdt, T. 2012. Pathogenesis, virulence factors and virulence regulation of vibrios belonging to the *Harveyi* clade. *Reviews in Aquaculture* 4(2): 59-74.
- De Souza Valente, C. & Wan, A.H. 2021. *Vibrio* and major commercially important vibriosis diseases in *Decapod crustaceans*. *Journal of Invertebrate Pathology* 181: 107527.
- Drake, L.A., Doblin, M.A. & Dobbs, F.C. 2007. Potential microbial bioinvasions via ships' ballast water, sediment and biofilm. *Marine of Pollution Bulletin* 55(7-9): 333-341.
- Drake, L.A., Meyer, A.E., Forsberg, R.L., Baier, R.E., Doblin, M.A., Heinemann, S., Johnson, W.P., Koch, M., Rublee, P.A. & Dobbs, F.C. 2005. Potential invasion of microorganisms and pathogens via 'interior hull fouling': Biofilms inside ballast water tanks. *Biological Invasions* 7(6): 969-982.
- Dung, T.T., Haesebrouck, F., Tuan, N.A., Sorgeloos, P., Baele, M. & Decostere, A. 2008. Antimicrobial susceptibility pattern of *Edwardsiella ictaluri* isolates from natural outbreaks of bacillary necrosis of *Pangasianodon hypophthalmus* in Vietnam. *Microbial Drug Resistance* 14(4): 311-316.
- Eddabra, R., Piemont, Y. & Scheffel, J. 2011. Evaluation of a new chromogenic medium, Chromid™ *Vibrio*, for the isolation and presumptive identification of *Vibrio cholerae* and *Vibrio parahaemolyticus* from human clinical specimens. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* 30(6): 733-737.
- Emam, A.M., Hashem, M., Gadallah, A.O. & Haridy, M. 2019. An outbreak of *Vibrio alginolyticus* infection in aquarium-maintained dark-spotted (*Himantura uarnak*) and Tahitian (*H. Fai*) stingrays. *The Egyptian Journal of Aquatic Research* 45(2): 153-158.
- Flores-Díaz, M., Monturiol-Gross, L., Naylor, C., Alape-Girón, A. & Flieger, A. 2016. Bacterial sphingomyelinases and phospholipases as virulence factors. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 80(3): 597-628.
- Folsom, J.P., Richards, L., Pitts, B., Roe, F., Ehrlich, G., Parker, A., Mazurie, A. & Stewart, P. 2010. Physiology of *Pseudomonas aeruginosa* in biofilms as revealed by transcriptome analysis. *BMC Microbiology* 10: 294.
- Forsberg, R., Baier, R., Meyer, A., Doblin, M. & Strom, M. 2005. Fine particle persistence in ballast water sediments and ballast tank biofilms. *Proceedings 28th Annual Meeting of The Adhesion Society, Inc.* hlm. 92-94.
- Galvis, F., Barja, J.L., Lemos, M.L. & Balado, M. 2021. The vibriolysin-like protease VnpA and the collagenase ColA are required for full virulence of the bivalve mollusks pathogen *Vibrio neptunius*. *Antibiotics (Basel)* 10(4): 391.
- Gxalo, O., Digban, T.O., Igere, B.E., Olapade, O.A., Okoh, A.I. & Nwodo, U.U. 2021. Virulence and antibiotic resistance characteristics of *Vibrio* isolates from rustic environmental freshwaters. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 11: 732001.

- Hing, L.S., Bhubalan, K., Tan, P.Y. & Husain, R.M. 2018. Composition of ballast water from ships arriving at Kertih Port, Malaysia with observations on port and offshore waters, and notes on settlement patterns of fouling organisms. *ASEAN Journal on Science and Technology for Development* 35(1-2): 89-100.
- Hudzicki, J. 2009. Kirby-Bauer disk diffusion susceptibility test protocol. *American Society for Microbiology* 15: 55-63.
- Ibrahim, N.N.N., Nasir, N.M., Sahrani, F.K., Ahmad, A. & Sairi, F. 2021. Characterization of putative pathogenic *Shewanella algae* isolated from ballast water. *Veterinary World* 14(3): 678-688.
- IMO. 2017. *Implementing the Ballast Water Management Convention*. United Kingdom: International Maritime Organization.
- Jacobs Slifka, K.M., Newton, A.E. & Mahon, B.E. 2017. *Vibrio alginolyticus* infections in the USA, 1988-2012. *Epidemiology and Infection* 145(7): 1491-1499.
- Jeannot, K., Bolard, A. & Plesiat, P. 2017. Resistance to polymyxins in Gram-negative organisms. *International Journal of Antimicrobial Agents* 49(5): 526-535.
- Kahla-Nakbi, A.B., Chaieb, K. & Bakhrouf, A. 2009. Investigation of several virulence properties among *Vibrio alginolyticus* strains isolated from diseased cultured fish in Tunisia. *Diseases of Aquatic Organisms* 86(1): 21-28.
- Kathleen, M., Samuel, L., Felecia, C., Reagan, E., Kasing, A., Lesley, M. & Toh, S. 2016. Antibiotic resistance of diverse bacteria from aquaculture in Borneo. *International Journal of Microbiology* 2016: 2164761.
- Krumperman, P.H. 1983. Multiple antibiotic resistance indexing of *Escherichia coli* to identify high-risk sources of fecal contamination of foods. *Applied and Environmental Microbiology* 46(1): 165-170.
- Laganà, P., Caruso, G., Minutoli, E., Zacccone, R. & Delia, S. 2011. Susceptibility to antibiotics of *Vibrio* spp. and *Photobacterium damsela* ssp. *piscicida* strains isolated from Italian aquaculture farms. *New Microbiologica* 34(1): 53-63.
- Lee, S.W., Najjah, M., Wendy, W. & Nadirah, M. 2009. Comparative study on antibiogram of *Vibrio* spp. isolated from diseased postlarval and marketable-sized white leg shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Frontiers of Agriculture in China* 3(4): 446-451.
- Li, X., Liu, W., Yang, Y. & Zhao, S. 2013. Survey and preliminary invasion risk assessment of ship ballast water pathogenic microorganisms in Yantian Port. *Chinese Journal of Frontier Health and Quarantine* 36(3): 179-191.
- Ling, J., Yang, Z., Wu, B., Ceng, W., Ye, L. & Zhao, J. 2005. Analysis on epidemiologic investigation result of ballastic water in entry-exit shipping for pathogenic *Vibrio* in Zhuhai Port. *Port Health Control* 10(3): 8-10.
- Lobanovska, M. & Pilla, G. 2017. Penicillin's discovery and antibiotic resistance: Lessons for the future? *Yale Journal of Biology and Medicine* 90: 135-145.
- Loo, K.Y., Letchumanan, V., Law, J.W.F., Pusparajah, P., Goh, B.H., Ab Mutalib, N.S., He, Y.W. & Lee, L.H. 2020. Incidence of antibiotic resistance in *Vibrio* spp. *Reviews in Aquaculture* 12(4): 2590-2608.
- Martínez, J.L. 2003. Recent advances on antibiotic resistance genes. *Recent Advances in Marine Biotechnology* 10: 13-32.
- Menezes, F.G.D., Rodriguez, M.T., Carvalho, F.C.D., Rebouças, R.H., Costa, R.A., Sousa, O.V., Hofer, E. & Vieira, R.H. 2017. Pathogenic *Vibrio* species isolated from estuarine environments (Ceará, Brazil) - Antimicrobial resistance and virulence potential profiles. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 89: 1175-1188.
- Mimura, H., Katakura, R. & Ishida, H. 2005. Changes of microbial populations in a ship's ballast water and sediments on a voyage from Japan to Qatar. *Marine Pollution Bulletin* 50(7): 751-757.
- Minchin, D. 2001. Exotic species. Introduction of. *Encyclopedia of Ocean Sciences*, edited by Steele, J.H., Turekian, K.K. & Thorpe, S.A. New York: Associated Press. hlm. 887-889.
- Miyoshi, S. 2013. Extracellular proteolytic enzymes produced by human pathogenic *Vibrio* species. *Frontier Microbiology* 4: 339.
- Mohamad, N., Amal, M.N.A., Yasin, I.S.M., Saad, M.Z., Nasruddin, N.S., Al-Saari, N., Mino, S. & Sawabe, T. 2019. Vibriosis in cultured marine fishes: A review. *Aquaculture* 512: 1-17.
- Mohamed, N., Joseph, P., Hussin, H. & Hashim, R. 2016. A cat-bite wound infected with *Vibrio alginolyticus* following use of sea cucumber oil. *The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health* 47(5): 967-969.
- Ng, C., Goh, S.G., Saeidi, N., Gerhard, W.A., Gunsch, C.K. & Gin, K.Y.H. 2018. Occurrence of *Vibrio* species, beta-lactam resistant *Vibrio* species, and indicator bacteria in ballast and port waters of a tropical harbor. *Science of The Total Environment* 610-611: 651-656.
- Noguerola, I. & Blanch, A. 2008. Identification of *Vibrio* spp. with a set of dichotomous keys. *Journal of Applied Microbiology* 105(1): 175-185.
- OseiAdjei, G., Huang, X. & Zhang, Y. 2018. The extracellular proteases produced by *Vibrio parahaemolyticus*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 34: 68.
- O'toole, G.A. 2011. Microtiter dish biofilm formation assay. *Journal of Visualized Experiments* 47: 2437.
- Pulss, S., Semmler, T., Prenger-Berninghoff, E., Bauerfeind, R. & Ewers, C. 2017. First report of an *Escherichia coli* strain from swine carrying an OXA-181 carbapenemase and the colistin resistance determinant MCR-1. *International Journal of Antimicrobial Agents* 50(2): 232-236.

- Rafidah, O., Firdaus-Nawi, M., Raehanah, S., Ina-Salwany, M., Ching, F., Abidin, N. & Zamri-Saad, M. 2017. An outbreak of *Vibrio alginolyticus* infection in juvenile sea cucumbers *Holothuria scabra* in Sabah, Malaysia. *Pertanika Journal of Tropical Agricultural Science* 40(4): 691-696.
- Ramamurthy, T., Chowdhury, G., Pazhani, G.P. & Shinoda, S. 2014. *Vibrio fluvialis*: An emerging human pathogen. *Frontiers in Microbiology* 5: 91.
- Reilly, G., Reilly, C., Smith, E. & Baker-Austin, C. 2011. *Vibrio alginolyticus* - associated wound infection acquired in British Waters, Guernsey, July 2011. *Eurosurveillance* 16(42): 19994.
- Rhouma, M., Beaudry, F. & Letellier, A. 2016. Resistance to colistin: What is the fate for this antibiotic in pig production? *International Journal of Antimicrobial Agents* 48(2): 119-126.
- Ruiz, G.M., Rawlings, T.K., Dobbs, F.C., Drake, L.A., Mullady, T., Huq, A. & Colwell, R.R. 2000. Global spread of microorganisms by ships. *Nature* 408(6808): 49-50.
- Salamone, M., Nicosia, A., Ghersi, G. & Tagliavia, M. 2019. *Vibrio* proteases for biomedical applications: Modulating the proteolytic secretome of *V. alginolyticus* and *V. parahaemolyticus* for improved enzymes production. *Microorganisms* 7: 387.
- Salleh, N.A., Rosli, F.N., Akbar, M.A., Yusof, A., Sahrani, F.K., Razak, S.A., Ahmad, A., Usup, G. & Bunawan, H. 2021. Pathogenic hitchhiker diversity on international ships' ballast water at West Malaysia Port. *Marine Pollution Bulletin* 172: 112850.
- Schulze, A., Mitterer, F., Pombo, J.P. & Schild, S. 2021. Biofilms by bacterial human pathogens: Clinical relevance - development, composition and regulation - therapeutical strategies. *Microb. Cell* 8(2): 28-56.
- Semwal, A., Kumar, A. & Kumar, N. 2023. A review on pathogenicity of *Aeromonas hydrophila* and their mitigation through medicinal herbs in aquaculture. *Heliyon* 9(3): e14088.
- Siang, H., Hussain, R., Bhubalan, K. & Orosco, C.A. 2018. Ballast water from ships berthed at major Ports of Malaysia. *Journal of Sustainability Science and Management* 13(5): 85-99.
- Shinoda, S. & Miyoshi, S.I. 2011. Proteases produced by vibrios. *Biocontrol Science* 16(1): 1-11.
- Sonnen, A.F.P. & Henneke, P. 2013. Role of pore-forming toxins in neonatal sepsis. *Clinical and Developmental Immunology* 2013: 608456.
- Stepanović, S., Vukovic, D., Dakic, I., Savic, B. & Svabic-Vlahovic, M. 2000. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *Journal of Microbiological Methods* 40(2): 175-179.
- Tamura, K., Stecher, G. & Kumar, S. 2021. MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Mol. Biol. Evol.* 38(7): 3022-3027.
- Tan, C.W., Rukayadi, Y., Hasan, H., Thung, T.Y., Lee, E., Rollon, W.D., Hara, H., Kayali, A.Y., Nishibuchi, M. & Radu, S. 2020. Prevalence and antibiotic resistance patterns of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from different types of seafood in Selangor, Malaysia. *Saudi Journal of Biological Sciences* 27(6): 1602-1608.
- Tan, C.W., Malcolm, T.T.H., Kuan, C.H., Thung, T.Y., Chang, W.S., Loo, Y.Y., Premarathne, J.M.K.J.K., Ramzi, O.B., Norshafawatie, M.F.S., Yusralimuna, N., Rukayadi, Y., Nakaguchi, Y., Nishibuchi, M. & Radu, S. 2017. Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from short mackerels (*Rastrelliger brachysoma*) in Malaysia. *Frontiers in Microbiology* 8: 1087.
- Tarr, C.L., Patel, J.S., Puh, N.D., Sowers, E.G., Bopp, C.A. & Strockbine, N.A. 2007. Identification of *Vibrio* isolates by a multiplex PCR assay and *rpoB* sequence determination. *Journal of Clinical Microbiology* 45(1): 134-140.
- Thomas, R., Hamat, R.A. & Neela, V. 2014. Extracellular enzyme profiling of *Stenotrophomonas maltophilia* clinical isolates. *Virulence* 5(2): 326-330.
- Thomson, F., Heinemann, S. & Dobbs, F. 2003. Patterns of antibiotic resistance in cholera bacteria isolated from ships' ballast water. *Proceedings of the Third International Conference on Marine Bioinvasions*. hlm. 118.
- Vaseeharan, B., Ramasamy, P., Murugan, T. & Chen, J.C. 2005. *In vitro* susceptibility of antibiotics against *Vibrio* spp. and *Aeromonas* spp. isolated from *Penaeus monodon* hatcheries and ponds. *International Journal of Antimicrobial Agents* 26(4): 285-291.
- Weese, J., Giguère, S., Guardabassi, L., Morley, P., Papich, M., Ricciuto, D. & Sykes, J.E. 2015. Acvim consensus statement on therapeutic antimicrobial use in animals and antimicrobial resistance. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 29(2): 487-498.
- Wilson, K. 2001. Preparation of genomic DNA from bacteria. *Current Protocols in Molecular Biology* 56(1): 241-245.
- Wong, S.K., Zhang, X.H. & Woo, N.Y.S. 2012. *Vibrio alginolyticus* thermolabile hemolysin (TLH) induces apoptosis, membrane vesiculation and necrosis in sea bream erythrocytes. *Aquaculture* 330-333: 29-36.
- Wu, H., Chen, C., Wang, Q., Lin, J. & Xue, J. 2017. The biological content of ballast water in China: A review. *Aquaculture and Fisheries* 2(6): 241-246.
- Xue, Z., Han, Y., Liu, B., Gu, Y., Tian, W., Whiting-Wagner, N., Zhao, H. & Zhang, W. 2021. Bacterial diversity in ballast water and sediments revealed by 2b-RAD sequencing. *Marine Pollution Bulletin* 169: 112523.
- You, K.G., Bong, C.W. & Lee, C.W. 2016. Antibiotic resistance and plasmid profiling of *Vibrio* spp. in tropical waters of Peninsular Malaysia. *Environmental Monitoring and Assessment* 188(3): 171.

- Zhang, X.H. & Austin, B. 2005. Haemolysins in *Vibrio* species. *Journal of Applied Microbiology* 98(5): 1011-1019.
- Zhang, X.H., He, X. & Austin, B. 2020. *Vibrio harveyi*: A serious pathogen of fish and invertebrates in mariculture. *Marine Life Science & Technology* 2: 231-245.
- Zhu, Z., Hu, Z., Li, S., Fang, R., Ono, H.K. & Hu, D.L. 2024. Molecular characteristics and pathogenicity of *Staphylococcus aureus* exotoxins. *International Journal of Molecular Science* 25: 395.
- Zouiten, A., Mehri, I., Beltifa, A., Ghorbel, A., Sire, O., Van Loco, J., Abdenaceur, H., Reyns, T. & Mansour, H.B. 2017. Designation of pathogenic resistant bacteria in the sparusaurata sea collected in Tunisia coastlines: Correlation with high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis of antibiotics. *Microbial Pathogenesis* 106: 3-8.

*Pengarang untuk surat-menyurat; email: fareed@ukm.edu.my