Agricultural Sci. J. 42 : 3 (Suppl.) : 61-64 (2011) ว. วิทย. กษ. 42 : 3 (พิเศษ) : 61-64 (2554)

การใช้สารสกัดจากธรรมชาติ เพื่อยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์จากถั่วลิสงฝักสดที่เกิดการเน่าเสีย

The utilization of natural extract to inhibit growth of microorganisms isolated from rotten peanut pods

สิริวัฒน์ บุญชัยศรี[1] **และ สุนิษา บุญจันทร์**[1]
Siriwat Boonchaisri[1] and Sunisa Boonjun[1]

Abstract

The purpose of this study was to evaluate the efficiency of active compounds extracted from 2 herbs: galanga (*Alpinia galanga* (L.) Swartz) and clove (*Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & L. M. Perry) on growth and development of bacteria and fungi isolated from rotten peanut pods. Galanga was extracted by 95% methanol while clove oil which contains antiseptic compound, Eugenol, was purchased from a local drug store. The inhibitory effect of active compounds on bacterial growth was conducted by disc diffusion method using either galangal extract or clove oil at concentration of 25, 50 and 100% (v/v). The fungi growth inhibition was evaluated by employing the poisoned food technique using either galanga extract at 10, 20, 30, 40 and 50% (v/v) or clove oil at 0.5, 1 and 2% (v/v). The concentration of the clove oil in this test was lower than that of the galanga extract because high concentration of the clove oil liquefy potato dextrose agar (PDA). In this study, we were able to isolate 50 bacterial isolates and 20 fungi isolates from the rotten peanut pods. Then these isolates were tested against the active compounds. The results showed that clove oil at any concentrations showed strong inhibitory effect on growth of every fungi and bacteria isolation. For galanga extract, the concentration higher than 50% inhibited growth of all fungi isolation while the extract totally failed to inhibit the growth of any bacteria. In conclusion, the active compounds extracted from herbs in this study showed a promising effect to control growth of microorganisms which possibly causes rotting of peanut pods.

Keywords: galanga, clove oil, peanut, rot

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบประสิทธิภาพของสารออกฤทธิ์จากพืชสมุนไพร 2 ชนิด คือ ข่า (*Alpinia galanga* (L.) Swartz) และ กานพลู (*Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & L. M. Perry) ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราที่แยกได้จากถั่วลิสงฝักสดที่เน่าเสีย สารออกฤทธิ์จากข่าสกัดด้วย 95% เมธานอล ส่วนน้ำมันกานพลูซื้อจากร้านขายยา ทำการทดสอบการยับยั้งแบคทีเรียด้วยวิธี disc diffusion method โดยใช้สารสกัดจากข่าหรือน้ำมันกานพลูเข้มข้น 25, 50 และ 100% (v/v) ทดสอบการยับยั้งเชื้อราด้วยกรรมวิธี poisoned food technique โดยใช้สารสกัดข่าเข้มข้น 10, 20, 30, 40 และ 50% (v/v) แต่ใช้น้ำมันกานพลูเพียง 0.5, 1 และ 2% (v/v) เพราะหากผสมน้ำมันกานพลูมากเกินไปจะทำให้อาหารวุ้น (PDA) ไม่แข็งตัว จากการทดลองสามารถแยกแบคทีเรียเด่นจากถั่วลิสงที่เน่าเสียได้ 50 ไอโซเลต และได้เชื้อรา 20 ไอโซเลต เมื่อนำมาทดสอบกับสารออกฤทธิ์จากพืช พบว่าน้ำมันกานพลูทุกความเข้มข้นสามารถยับยั้งแบคทีเรียและเชื้อราได้ทุกไอโซเลต แต่สารสกัดข่าต้องมีความเข้มข้นเกินกว่า 50% จึงสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ทุกไอโซเลต อย่างไรก็ดีสารสกัดข่าทุกความเข้มข้นไม่สามารถยับยั้งแบคทีเรียได้เลย ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าสารออกฤทธิ์ที่ได้จากสมุนไพรในการทดลองนี้น่าจะมีฤทธิ์ในการควบคุมเชื้อจุลินทรีย์ที่ทำให้ถั่วลิสงเน่าเสียได้

คำสำคัญ: ข่า น้ำมันหอมระเหยกานพลู ถั่วลิสง การเน่าเสีย

คำนำ

ถั่วลิสงเป็นพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจชนิดหนึ่งของประเทศไทย แต่ปัจจุบันเกษตรกรผู้ปลูกถั่วลิสงกลับประสบปัญหาเกี่ยวกับโรคพืช ทั้งก่อนและหลังการเก็บเกี่ยว (ธรรมศักดิ์, 2540) โดยเฉพาะถั่วลิสงฝักสดที่มีโอกาสการติดเชื้อได้ง่าย

[1] สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยพะเยา พะเยา 56000
[1] Department of Biology School of Sciences, University of Phayao, Phayao 56000

กว่าถั่วลิสงฝักแห้ง เนื่องจากมีปริมาณความชื้นสูงเป็นสาเหตุทำให้เชื้อจุลินทรีย์เจริญได้ดี ก่อให้เกิดความเสียหายกับฝักถั่วลิสง ซึ่งความสูญเสียนี้ทำให้ผลผลิตที่ได้มีคุณภาพต่ำและมีราคาถูกเมื่อนำส่งขายให้กับพ่อค้าคนกลาง (กรมวิชาการเกษตร, 2545) ปัจจุบันเป็นที่ยอมรับว่าสารเคมีหลายชนิดที่มีอยู่ในพืชสมุนไพรสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ได้ เช่น น้ำมันหอมระเหยจากกานพลู (clove, *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & L. M. Perry) (Omidbeygi et al., 2007) สารสกัดจากข่า (galanga, *Alpinia galanga* (L.) Swartz) (นุชนารถ และคณะ, 2548) ซึ่งหาได้ง่ายและราคาถูก ดังนั้นจึงได้ทำการศึกษาการใช้สารต้านเชื้อจุลินทรีย์จากธรรมชาติ เพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์บนผลผลิตทางการเกษตรต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

การแยกเชื้อจุลินทรีย์ (แบคทีเรียและรา) จากฝักถั่วลิสง โดยใช้ตัวอย่างถั่วลิสงฝักสดจากเกษตรกร จังหวัดเชียงราย จากนั้นนำฝักถั่วลิสงสดใส่ไว้ในกระสอบปุยและใส่ไว้ในตะกร้าที่มีการถ่ายเทอากาศดี รอจนถั่วลิสงฝักสดเกิดการเน่าเสีย จึงนำฝักถั่วลิสงที่มีเชื้อจุลินทรีย์อยู่มาทำการแยกเชื้อจุลินทรีย์ โดยทำการแยกเชื้อจุลินทรีย์ด้วยวิธี Streak plate กับวิธี Pour plate จากนั้นทำการแยกเชื้อจุลินทรีย์ให้บริสุทธิ์แล้วเก็บรักษาเชื้อบนอาหารวุ้นเอียงเพื่อทำการศึกษาต่อไป ศึกษาเชื้อแบคทีเรียที่เจริญบนอาหารแข็งโดยการสังเกตด้วยตาเปล่าและทำการทดสอบการตอบสนองทางชีวเคมี (biochemistry test) เพื่อแยกกลุ่มแบคทีเรียอย่างคร่าวๆ อ้างอิงตาม Bergey's Manual of Systematic Bacteriology volume 1 สำหรับเชื้อราศึกษาโดยสังเกตโคโลนี, สีของเส้นใย, สปอร์และรงควัตถุ บนอาหารแข็งด้วยตาเปล่าแล้วจำแนกราตามเอกสารอ้างอิง (วาสนา, 2544) การเตรียมสารสกัดข่าและน้ำมันกานพลู กระทำโดยนำข่ามาล้างน้ำให้สะอาด แล้วฝานเป็นแผ่นบางๆ นำไปอบที่อุณหภูมิ 60 ซ° เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำข่าที่ได้ไปปั่นด้วยเครื่องปั่นไฟฟ้าให้ละเอียด นำข่าบรรจุลงในภาชนะแก้วแล้วเติม 95% เมธานอล [ข่า:เมธานอล 1:10 (w/v)] แช่ข่าในตัวทำละลายเป็นเวลา 3 วัน จากนั้นกรองแยกเอาเศษพืชออก แล้วนำสารละลายที่ได้ไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่อง Rotary vacuum evaporator ที่อุณหภูมิ 40 ซ° ทำการระเหยจนกระทั่งสารสกัดพืชมีลักษณะเหนียวข้น แล้วเก็บสารสกัดที่ได้ไว้ในที่มืดและเย็น สำหรับน้ำมันกานพลูซื้อจากร้านขายยาในอำเภอเมือง จังหวัดเชียงราย จากนั้นทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดจากข่าและน้ำมันหอมระเหยจากกานพลูต่อการเจริญของเชื้อแบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยวิธี Disc diffusion method โดยใช้สารสกัดจากข่าหรือน้ำมันกานพลูเข้มข้น 25 50 และ 100% (v/v) บันทึกผลโดยวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณยับยั้ง (inhibition zone) ที่เกิดขึ้น ทำการทดสอบ 4 ซ้ำสำหรับทุกความเข้มข้น การทดสอบฤทธิ์ของสารออกฤทธิ์ต่อการเจริญของเชื้อรากระทำตามกรรมวิธี Poisoned food technique โดยผสมสารสกัดจากข่าที่เตรียมไว้กับอาหาร PDA ให้มีความเข้มข้น 10, 20, 30, 40 และ 50 % (v/v) แต่น้ำมันกานพลูทดสอบที่ความเข้มข้น 0.5, 1 และ 2 % (v/v) เท่านั้นเพราะน้ำมันกานพลูที่เข้มข้นมากทำให้อาหาร PDA ไม่แข็งตัว แล้วจึงคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญเติบโต

ผล

จากการแยกเชื้อจุลินทรีย์จากตัวอย่างถั่วลิสงฝักสดที่ทำให้เกิดการเน่าเสียด้วยวิธี Streak plate และ Pour plate สามารถแยกเชื้อแบคทีเรียเด่นได้ 50 ไอโซเลต (Table 1) และเชื้อราได้ 20 ไอโซเลต (Table 2) จากการทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียด้วยสารออกฤทธิ์จากธรรมชาติ พบว่าน้ำมันกานพลูทุกความเข้มข้นสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ทุกไอโซเลต โดยที่ความเข้มข้น 25% มีแนวโน้มยับยั้งแบคทีเรียได้ดีที่สุด (Figure 1a) อย่างไรก็ดีสารสกัดข่าทุกความเข้มข้นไม่สามารถยับยั้งแบคทีเรียได้เลย โดยมีหลักฐานคือขนาดของ inhibition zone ในทุกชุดการทดลองมีขนาดไม่แตกต่างจากชุดควบคุม (methanol) อย่างมีนัยสำคัญ (Figure 1b) เมื่อทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา พบว่าน้ำมันกานพลูทุกความเข้มข้นสามารถยับยั้งเชื้อราได้ทุกไอโซเลต (ไม่แสดงข้อมูล) ส่วนสกัดข่าความเข้มข้น 50% เป็นความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ทุกไอโซเลต (Table 3)

วิจารณ์ผล

การค้นหาเชื้อจุลินทรีย์ที่มีความน่าจะเป็นเชื้อสาเหตุของการเน่าเสียบนฝักถั่วลิสงสด ทำให้แยกเชื้อบริสุทธิ์และจำแนกเชื้อแบคทีเรียเด่นได้ 5 กลุ่ม ซึ่งจัดว่าครอบคลุมแบคทีเรียเกือบทุกกลุ่ม จึงเกิดสมมุติฐานว่าแบคทีเรียแทบทุกกลุ่มมีส่วนร่วมในการย่อยสลายถั่วลิสงฝักสดอันนำไปสู่การเน่าเสีย อย่างไรก็ดีผู้วิจัยจำต้องพิสูจน์สมมุติฐานนี้ตามวิธีการของ Koch (Koch's postulation) ให้ครบทั้ง 4 ขั้นตอนก่อนจึงจะยืนยันสมมุติฐานนี้ได้ สำหรับเชื้อราที่จำแนกได้ในการวิจัยนี้มี 4 กลุ่ม คือ *Rhizopus Aspergillus Fusarium Mucor* (Table 2) ซึ่งล้วนเป็นกลุ่มเชื้อราก่อโรคหลังการเก็บเกี่ยวในผักผลไม้ทั้งสิ้น (ดนัย,

2549) เช่น *Rhizopus stolonifer* เป็นสาเหตุโรคเน่าของผลสตรอเบอรี องุ่นและแตง *Aspergillus niger* เป็นสาเหตุของโรคราดำ *Fusarium* spp. เป็นสาเหตุของโรคเน่าของหัวขิงและหน่อของหน่อไม้ฝรั่ง *Mucor piriformis* (Fisher) เป็นสาเหตุของโรค mucor rot ในแอปเปิ้ล จึงมีความเป็นไปได้ที่เชื้อราทั้ง 4 กลุ่มนี้คือเชื้อสาเหตุของการเน่าเสียของถั่วลิสงฝักสด เช่นเดียวกับการศึกษาเชื้อแบคทีเรียผู้วิจัยยังต้องทดลองปลูกเชื้อราบนฝักถั่วแล้วแยกเชื้อราจากฝักถั่วลิสงที่เน่าเสียเพื่อยืนยันว่ากลุ่มเชื้อราที่แยกได้นี้คือเชื้อสาเหตุของการเน่าเสียของถั่วลิสงฝักสด อย่างไรก็ดีในเบื้องต้นมีความเป็นไปได้ที่การยับยั้งเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรากลุ่มนี้อาจช่วยยืดอายุการเก็บรักษาถั่วลิสงฝักสดได้ การควบคุมเชื้อจุลินทรีย์นิยมกระทำโดยสารเคมีสังเคราะห์ เช่น บีโนมิล ไทอะเบนดาโซล อิมาซาลีล ฯลฯ (ดนัย, 2549) แต่งานวิจัยนี้ต้องการทดลองยับยั้งการเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ที่แยกได้ด้วยสารที่ปลอดภัยกว่าคือ น้ำมันหอมระเหยกานพลูและสารสกัดหยาบจากข่า ซึ่งสอดคล้องกับวิธีการทดลองของวิชัยและชวเลิศ (ม.ป.ป.) ที่ทำการแยกเชื้อจากแง่งขิงจนพบเชื้อสาเหตุโรคเน่า คือ *Fusarium oxysporum* แล้วจึงควบคุมการเติบโตของ *F. oxysporum* ด้วยสารสกัดหยาบจากพืชสมุนไพรจำนวน 31 ชนิด จากการวิจัยนี้พบว่าน้ำมันหอมระเหยกานพลูมีประสิทธิภาพในการยับยั้งทั้งเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราทั้งหมดที่แยกได้จากถั่วลิสง ซึ่งสอดคล้องกับการวิจัยของบัญญัติ (2518) อ้างใน ศศิธร (2547) ที่พบว่าน้ำมันกานพลูเข้มข้นตั้งแต่ 20% ขึ้นไปสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้เกือบทุกกลุ่ม นอกจากนี้เกษมและจำรัส (2529) รายงานว่าน้ำมันกานพลูความเข้มข้น 2,000–6,000 mg/kg สามารถยับยั้งเชื้อรา *Aspergillus* spp. ได้มากกว่า 80% ส่วนวิชัยและชวเลิศ (ม.ป.ป.) พบว่าน้ำมันกานพลูยับยั้ง *F. oxysporum* ได้ 78.27%

สำหรับสารสกัดข่าพบว่าความเข้มข้น 0.25, 0.50 และ 1.00% ไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมคือ เมธานอล ซึ่งน่าเป็นผลจากการที่ความเข้มข้นของสารสกัดข่าที่ใช้นั้นน้อยเกินไป อย่างไรก็ดีเชื้อในกลุ่มที่ 1 (Gram-Negative Aerobic Rods and Cocci) ถูกยับยั้งด้วยสารสกัดข่าที่ความเข้มข้น 0.25 และ 1.00% น่าเป็นผลจากการที่สารสกัดข่าสามารถซึมผ่านชั้นไขมันบนผนังเซลล์ของ gram-negative bacteria ได้ดีแล้วจึงออกฤทธิ์ต่อกิจกรรมหรือการสังเคราะห์เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการหายใจแบบใช้ออกซิเจนภายในเซลล์ สอดคล้องกับ Trumbeckaitea *et al*. (2006) ที่รายงานว่า galangin ซึ่งเป็นสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ (flavonoids) ที่พบได้ในข่าสามารถลดอัตราการหายใจระดับเซลล์ให้ต่ำลงโดยไปรบกวนกระบวนการขนส่งสารเข้าออกในไมโตคอนเดรียจึงเป็นผลให้การสังเคราะห์ ATP ลดต่ำลง การยับยั้งการเจริญของเชื้อราพบว่าต้องใช้สารสกัดข่าที่ความเข้มข้นอย่างน้อย 50% จึงจะสามารถยับยั้งเชื้อราที่แยกจากถั่วลิสงได้ทุกกลุ่ม ความเข้มข้นนี้ต่ำกว่าความเข้มข้นที่รายงานในงานวิจัยของนุชนารถ และคณะ (2548) (60% สารสกัดข่า) ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Fusarium* sp., *Bipolaris* sp. *Curvularia* sp. และ *Alternaria* sp. ที่เป็นเชื้อสาเหตุของโรคที่ติดมากับเมล็ดข้าวหลังการเก็บเกี่ยว

สรุป

สารออกฤทธิ์ที่ได้จากสมุนไพรคือน้ำมันหอมระเหยจากกานพลูและสารสกัดหยาบจากข่ามีฤทธิ์ในการยับยั้งการเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ที่อาจเป็นสาเหตุของการเน่าเสียของถั่วลิสงฝักสดได้ ดังนั้นจึงมีความหวังที่จะประยุกต์ใช้สารจากธรรมชาติเหล่านี้เพื่อยืดอายุหลังการเก็บเกี่ยวของถั่วลิสงฝักสด

เอกสารอ้างอิง

กรมวิชาการเกษตร. 2545. ถั่วลิสง. ผลงานวิชาการประจำปี 2544. กรมวิชาการเกษตร,พิมพ์ครั้งที่1. กรุงเทพฯ.

เกษม สร้อยทอง และจำรัส คุณณรงค์นันทกุล. 2529. การยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Aspergillus* spp. ด้วยสารสกัดจากกานพลู. วารสารโรคพืช 6(1-2): 1-6.

ดนัย บุญเกียรติ. 2549. โรคหลังเก็บเกี่ยวของผักและผลไม้. สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์. กรุงเทพฯ. น. 115-124.

ธรรมศักดิ์ สมมาตย์ . 2540. โรคถั่วลิสง. กรุงเทพฯ; มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. น. 35-42.

นุชนารถ จงเลขา สมบัติ ศรีชูวงศ์ และ นุชนารถ กุมมารกาศ. 2548. การทดสอบประสิทธิภาพของการใช้สมุนไพรในการกำจัดเชื้อโรคที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์ข้าว. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา: http://www.phtnet.org/content.asp?mod=research2d&id=36. (12 มิ.ย. 2554).

วาสนา ฉัตรดำรง. 2544. ราวิทยาเบื้องต้น. ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทย์ศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร. น. 96-125.

วิชัย ก่อประดิษฐ์สกุล และชวเลิศ ตรีกรุณาสวัสดิ์. ม.ป.ป.. ผลของสารสกัดจากพืชสมุนไพรและจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ต่อการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคแง่งขิงเน่าระหว่างการเก็บรักษาจากพืช. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา: http://www.kps.ku.ac.th. (20 มิถุนายน 2554).

ศศิธร วุฒิวณิชย์. 2547. ประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากพืชสมุนไพรในการยับยั้งการเจริญของ *Eriwinia carotovora* subsp. *Carotovora*. เชื้อสาเหตุโรคเน่าของผัก. วิทยาสารกำแพงแสน ปี 2 ฉบับที่ 2.

Krieg, R. 1984. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology vol. 1. William & Wilkins. London. 964p.

Omidbeygi, M., M. Barzegar, Z. Hamidi and H. Naghdibadi. 2007. Antifungal activity of thyme, summer savory and clove essential oils against *Aspergillus flavus* in liquid medium and tomato paste. Food Control 18: 1518-1523.

Trumbeckaitea, S., J. Bernatonieneb, D. Majienea, V. Jakstasb, A. Savickasb and A. Toleikisa. 2006. The effect of flavonoids on rat heart mitochondrial function. Biomedecine & Pharmacotherapy 60(5): 245-248.

Table 1 Five groups of bacteria isolated from rotten peanut pods.

Group No.	Type of bacteria	Number of isolate
1	Gram-negative Aerobic Rods and Cocci	27
2	Facultatively Anaerobic Gram-Negative Rods	14
3	Gram-positive Cocci	2
4	Endospore-forming Gram-Positive Rods and Cocci	4
5	Regular, Nonsporing Gram-Positive Rods	3
	Total	**50**

Table 2 Number of isolates and genus of fungi isolated from rotten peanut pods.

Group no.	Isolation code*	Genus	Number of isolate
1	FS02, FS03, FS05, FP05, FP13	*Rhizopus*	5
2	FP06, FP10	*Aspergillus*	2
3	FP01	*Fusarium*	1
4	FP12	*Mucor*	1
5	FS01, FS04, FP02, FP03, FP04, FP07, FP08, FP09, FP11, FP14 และ, FP15	Unknown	11
	Total		**20**

* FS = fungi isolated from peanut pods by streak plate technique, FP = fungi isolated from peanut pods by pour plate technique

Table 3 Inhibitory effect of crude galanga extract dissolved in methanol on the growth of 6 examples of fungi isolates.

No.	Isolation code	Percentage of fungi growth inhibition (%)					
		0%	10%	20%	30%	40%	50%
1	FS01	0.00	34.58	57.13	63.76	100.00	100.00
2	FS02	0.00	49.26	65.63	100.00	100.00	100.00
3	FS03	0.00	81.93	94.40	100.00	100.00	100.00
4	FP01	0.00	51.96	62.00	73.12	100.00	100.00
5	FP02	0.00	48.19	63.17	100.00	100.00	100.00
6	FP03	0.00	47.25	63.84	70.92	90.41	100.00

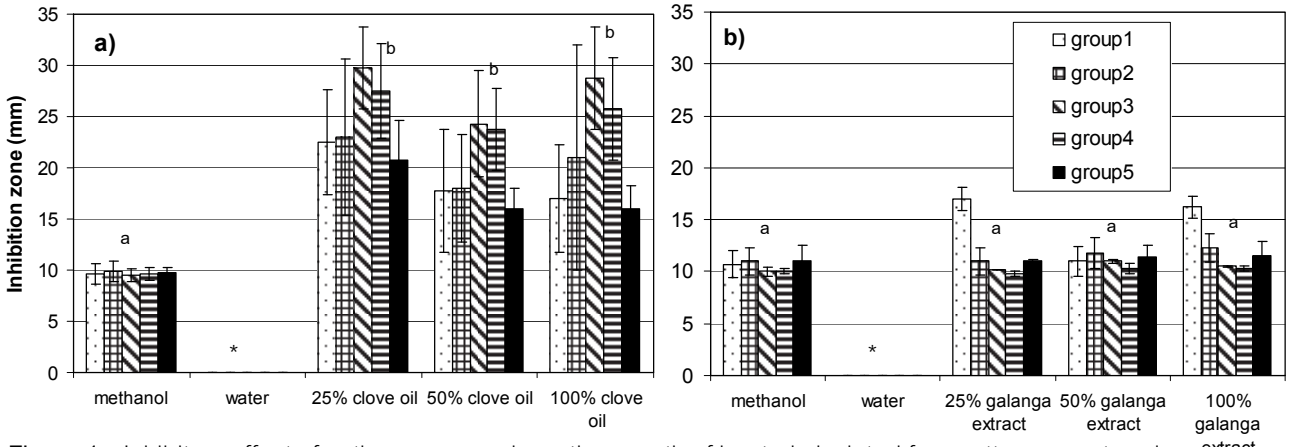

Figure 1 Inhibitory effect of active compounds on the growth of bacteria isolated from rotten peanut pods. a) clove oil and b) crude extract from galanga. Group 1-5 of bacteria defined as those appeared in Table 1.

[a,b] Different letters indicate significant difference between treatments ($P < 0.05$). * Water failed to inhibit any bacteria.