ฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียของเจลพอลิแซ็กคาไรด์จากเปลือกผลทุเรียน
ต่อเชื้อที่แยกได้จากเต้านมอักเสบในโคนม

นางสาว ธนัชพร เพื่อนฝูง

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาชีวเวชเคมี ภาควิชาชีวเคมี
คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2548
ISBN 974-14-3323-9
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF DURIAN FRUIT- HULL POLYSACCHARIDE GEL AGAINST BACTERIAL ISOLATES FROM BOVINE MASTITIS

Miss Tanatchaporn Phaunfoong

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Biomedicinal Chemistry
Department of Biochemistry
Faculty of Pharmaceutical Sciences
Chulalongkorn University
Academic Year 2005
ISBN 974-14-3323-9

481784

Thesis Title	ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF DURIAN FRUIT-HULL POLYSACCHARIDE GEL AGAINST BACTERIAL ISOLATES FROM BOVINE MASTITIS
By	Miss Tanatchaporn Phaunfoong
Field of Study	Biomedicinal Chemistry
Thesis Advisor	Associate Professor Vimolmas Lipipun, Ph.D.
Thesis Co-advisor	Associate Professor Sunanta Pongsamart, Ph.D.

Accepted by the Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment of the Requirements for Master's Degree

.....Dean of the Faculty of Pharmaceutical Sciences

(Associate Professor Pornpen Promyothin, Ph.D.)

THESIS COMMITTEE

.....Chairman

(Assistant Professor Niyada Kiatying-Angsulee, Ph.D.)

.....Thesis Advisor

(Associate Professor Vimolmas Lipipun, Ph.D.)

.....Thesis Co-advisor

(Associate Professor Sunanta Pongsamart, Ph.D.)

.....Member

(Associate Professor Sukanya Jesadanont, Ph.D.)

.....Member

(Assistant Professor Kittisak Ajariyakhajorn, DVM. Ph.D.)

ธนัชพร เพื่อนฝูง: ฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียของเจลพอลิแซ็กคาไรด์จากเปลือกผลทุเรียน
ต่อเชื้อที่แยกได้จากเต้านมอักเสบในโคนม (ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF DURIAN FRUIT- HULL POLYSACCHARIDE GEL AGAINST BACTERIAL ISOLATES FROM BOVINE MASTITIS) อาจารย์ที่ปรึกษา ร.ศ. ดร. วิมลมาศ ลิปิพันธ์, อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ร.ศ. ดร. สุนันท์ พงษ์สามารถ, 111 หน้า
ISBN 974-14-3323-9

การศึกษาคุณสมบัติการต้านเชื้อแบคทีเรียของเจลพอลิแซ็กคาไรด์จากเปลือกของผลทุเรียนเพื่อค้น หาสารชนิดใหม่ที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียที่แยกมาจากเต้านมอักเสบในโคนม สืบเนื่องมาจากข้อจำกัดและความต้องการที่จะลดการปนเปื้อนของยาปฏิชีวนะในฟาร์มโคนมและคาดว่าจะสามารถใช้สารยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่ได้มาจากสารธรรมชาติทดแทนการใช้ยาปฏิชีวนะ โดยทำการทดสอบกับแบคทีเรียที่แยกได้จากเต้านมอักเสบของโคนม 5 สายพันธุ์ ประกอบด้วย *Staphylococcus* spp. 42 isolates, *Streptococcus* spp. 34 isolates, *E. coli* 13 isolates, *K. pneumoniae* 5 isolates และ *Pseudomonas* spp. 15 isolates. จากการทดสอบความไวของแบคทีเรียในหลอดทดลองโดยเทคนิค agar diffusion พบว่าเจลพอลิแซ็กคาไรด์ที่ความเข้มข้นต่างๆจะให้ขนาดของวงใสมีขอบเขตที่คมและชัดเจนบนอาหารวุ้น แสดงความแรงตามลำดับในการยับยั้งแบคทีเรียของเจลพอลิแซ็กคาไรด์ คือ 5>2.5>1.25>0.625>0.312% *Staphylococcus* spp. และ *Streptococcus* spp. เป็นเชื้อที่ไวต่อการยับยั้งให้ clear zone ที่ใหญ่ที่สุด ขณะที่ *E. coli* เป็นเชื้อที่ไวน้อยที่สุดให้ clear zone ที่เล็กที่สุดพบว่าเกือบทุก เชื้อที่ทดสอบถูกยับยั้งโดยเจลพอลิแซ็กคาไรด์ที่ความเข้มข้นสูง (5% PG) การทดสอบโดยเทคนิค broth microdilution เพื่อหาปริมาณต่ำสุดของเจลพอลิแซ็กคาไรด์ที่ยับยั้งและฆ่าเชื้อแบคทีเรียแสดงค่าเป็น MBC/MIC โดยเปรียบเทียบกับ gentamicin ผลที่ได้พบว่าเชื้อแบคทีเรียแยกจากเต้านมอักเสบที่ทดสอบทั้งหมดมีความไวต่อเจลพอลิแซ็กคาไรด์มีค่าเฉลี่ยของ MBC อยู่ในช่วง 12.5-25 mg/ml พบว่าค่า MBC ของเจลพอลิแซ็กคาไรด์ส่วนใหญ่จะสูงกว่า MIC อยู่ 2 เท่า ผลที่ได้ออกมาชัดเจนว่าเชื้อ isolate ของ *Staphylococcus* spp. มีความไวต่อเจลพอลิแซ็กคาไรด์มากกว่า *S. aureus* ATCC 25923 และยังพบว่า *Streptococcus* spp., *K. pneumoniae* และ *Pseudomonas* spp. ที่ดื้อต่อ gentamicin (MBC $\geq$ 8µg/ml) มีความไวต่อเจลพอลิแซ็กคาไรด์ พบว่าค่า MIC อยู่ในช่วง 12.5-25 mg/ml เมื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อของเจลพอลิแซ็กคาไรด์จากเปลือกทุเรียนพันธุ์ หมอนทอง ชะนี และพันธุ์พื้นเมือง ต่อเชื้อ *S. aureus* และ *E. coli* พบว่าเจลพอลิแซ็กคาไรด์จากเปลือกทุเรียนพันธุ์ชะนีและพันธุ์พื้นเมืองให้ผลในการฆ่าเชื้อได้สูงกว่าเจลพอลิแซ็กคาไรด์จากเปลือกทุเรียนพันธุ์หมอนทอง การประเมินระยะเวลาของการทำลายเชื้อแบคทีเรียพบว่าเจลพอลิแซ็กคาไรด์ (หมอนทอง)ที่ความเข้มข้นที่ค่า MBC ของแต่ละสายพันธุ์ สามารถฆ่าเชื้อ *S. aureus* (SP2), *S. aureus* (SP23) *S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* (CM49), *E. coli* (CM85) และ *E. coli* ATCC 25922 ที่เวลา 8, 2, 24, 12, 16 และ 24 ชั่วโมง ตามลำดับ *S. aureus* (SP23) มีความไวต่อเจลพอลิแซ็กคาไรด์มากกว่า *E. coli* เนื่องจากที่ค่า MIC (0.312 mg/ml) ของเจลพอลิแซ็กคาไรด์ต่อ *S. aureus* สามารถทำให้เชื้อลดลงถึง 0% ใน 16 ชั่วโมง ขณะที่ MIC ของเจลพอลิแซ็กคาไรด์ต่อ *E. coli* มีผลต่อการลดลงของเชื้อตั้งต้นเล็กน้อยโดยยับยั้งได้ 47.46% และพบว่าแบคทีเรียที่เป็น isolate strain จะมีความไวต่อ PG มากกว่า standard strain การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อคุณสมบัติในการฆ่าเชื้อแบคทีเรียของเจลพอลิแซ็กคาไรด์พันธุ์หมอนทอง พบว่าที่อุณหภูมิ 25และ37°C ไม่มีผลต่อฤทธิ์การฆ่าเชื้อของเจลพอลิแซ็กคาไรด์ต่อ *S. aureus* ขณะที่อุณหภูมิ 25°C ฤทธิ์การฆ่าเชื้อ *E. coli* จะต่ำกว่าที่ 37°C พบว่าที่ค่า MBC ไม่ทำให้เกิดการตายของ *E. coli* ได้หมดที่อุณหภูมิ 25°C การทดสอบฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อของเจลพอลิแซ็กคาไรด์ที่ pH ต่างๆต่อ *S. aureus* และ *E. coli* พบว่าการยับยั้ง *S. aureus* ของ เจลพอลิแซ็กคาไรด์ที่ pH2 และ control (HCl ใน MHB) ให้ผลคล้ายคลึงกัน แต่ที่ pH 3-5 เจลพอลิแซ็กคาไรด์แสดงผลในการยับยั้งเชื้อที่ดีกว่า HCl ใน MHB แสดงว่าคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้ออาจไม่ได้เกิดจากความเป็นกรดของเจลพอลิแซ็กคาไรด์เพียงอย่างเดียว ขณะที่ใน *E. coli* ที่ pH 3-4 เจลพอลิแซ็กคาไรด์มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อสูงกว่า HCl ใน MHB ในการศึกษาผลของ ionic strength โดยการใช้ NaCl 25และ 100 mM พบว่า NaCl มีผลลดฤทธิ์ของเจลพอลิแซ็กคาไรด์ในการยับยั้งการเจริญของ *E. coli* แต่ไม่มีผลลดฤทธิ์การยับยั้งต่อ *S. aureus* การศึกษาผลของ divalent cations ในการฆ่าเชื้อแบคทีเรียของเจลพอลิแซ็กคาไรด์พันธุ์หมอนทองพบว่า $BaCl_2$, $CaCl_2$, $MgCl_2$ และ $ZnCl_2$ ที่ความเข้มข้น 10 และ 20 mM มีผลในการลดคุณสมบัติการฆ่าเชื้อแบคทีเรียของเจลพอลิแซ็กคาไรด์ต่อเชื้อ *E. coli* แต่ไม่มีผลต่อเชื้อ *S. aureus* $ZnCl_2$ มีผลทำให้ฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อของเจลพอลิแซ็กคาไรด์สูงขึ้น จากผลการวิจัยนี้บ่งชี้ว่าเจลพอลิแซ็กคาไรด์มีศักยภาพที่มีประโยชน์ในการประยุกต์ใช้เป็นสารยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่ได้จากเต้านมอักเสบในโคนม

ภาควิชา.....ชีวเคมี..... ลายมือชื่อนิสิต.....

สาขาวิชา.....ชีวเวชเคมี..... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

ปีการศึกษา.....2548..... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

4676566133; MAJOR BIOMEDICINAL CHEMISTRY
KEYWORD: ANTIBACTERIAL AGENT / DURIAN / *Durio zibethinus* / POLYSACCHARIDE GEL
TANATCHAPORN PHAUNFOONG: ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF DURIAN FRUIT- HULL POLYSACCHARIDE GEL AGAINST BACTERIAL ISOLATES FROM BOVINE MASTITIS. THESIS ADVISOR: ASSOC. PROF. VIMOLMAS LIPIPUN, Ph.D., THESIS CO-ADVISOR; ASSOC. PROF. SUNANTA PONGSAMART, Ph.D., 111 page. ISBN 974-14-3323-9

Antibacterial property of polysaccharide gel (PG) from fruit-hulls of durian (*Durio zibethinus* Murr.) was investigated to find a novel antibacterial agent against bacterial isolates from cow mastitis. Since the use of natural antibacterial from plant is expected to replace limited uses and contaminated residues of antibiotic in dairy farm. *In vitro* antibacterial activity of PG was performed to evaluate the susceptibility of bacterial isolates from cow mastitis. PG showed inhibitory activity against five strains of bacteria, 42 isolates of *Staphylococcus* spp., 34 isolates of *Streptococcus* spp., 13 isolates of *E. coli*, 5 isolates of *K. pneumoniae* and 15 isolates of *Pseudomonas* spp. *In vitro* susceptibility test was determined by agar diffusion method, inhibition zone of sharp and clear margin was observed on agar media with various strength of inhibitory activity by the following sequence of PG concentrations, 5>2.5>1.25>0.625>0.32% by weight. *Staphylococcus* spp. and *Streptococcus* spp. were the most susceptible bacteria, while *E. coli* was less susceptible to PG. PG at high concentrations inhibited growth of most of tested bacteria. Broth microdilution method was used to determine a quantitative antibacterial activity of PG. Values represented MICs and MBCs of PG against bacterial isolates were demonstrated in comparison with gentamicin, All strains of bacterial isolates showed similar susceptibility to PG. The range of MBCs of PG against most of the bacterial isolates was 12.5-25 mg/ml. MBC values of PG were mostly 2 times higher concentration than its MIC values. The result clearly demonstrated that most of the isolates of *S. aureus* were more susceptible to PG than laboratory tested strains of *S. aureus* ATCC 25923. In addition, the strains of *Streptococcus* spp., *Pseudomonas* spp. and *K. pneumoniae* that showed ability to survive compared with gentamicin resisted strains (MBC ≥8 μg/ml) were found susceptible to PG with the MIC values at 12.5-25mg/ml. In comparison of the bactericidal activity of PG of Montong (M), Chanee (C) and Native cultivar (Ncv) against bacteria between *S. aureus* and *E. coli,* PG of Chanee and Native cultivar showed higher bactericidal activity than PG of Monthong. Time-kill study demonstrated that the killing effect of PG against tested bacteria was obtained at PG concentration of 50, 6.25, 50, 12.5, 50 and 12.5 mg/ml in MHB medium against *S. aureus* (SP 2), *S. aureus* (SP 23), *S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* (CM 49), *E. coli* (CM 85) and *E. coli* ATCC 25922, which the colony counts were declined to 0% at 8, 2, 24, 12, 16 and 24 hr, respectively. *S. aureus* was more susceptible to PG than *E. coli*, the MIC at 0.312% PG against *S. aureus* (SP 23) produced zero colony count in 16 hr, while the colony count against *E. coli* at the same PG concentration was found 47.46% inhibition. The isolated bacteria was more susceptible to PG than standard bacteria. The effect of temperature on inhibitory activity of PG against *S. aureus* and *E. coli* was determine, temperatures (25°C and 37°C) were not effect killing activity of PG against *S. aureus*, whereas temperature at 25°C showed less killing activity than at 37°C against *E. coli.* The effect of difference pH on bactericidal activity of PG against *S. aureus* and *E. coli* showed that PG at pH 2 and control (HCl in MHB) gave the same inhibitory effect. PG at pH 3-5 showed more inhibitory effect than control (HCl in MHB), the result indicated that inhibitory effect of PG was not only due to its acidic property. The effect ionic strength at 25 and 100 mM NaCl on antibacterial activity of PG was investigated, NaCl reduced killing activity of PG against *E. coli* but no effect against *S. aureus.* The effect of divalent cations on bactericidal activity of PG demonstrated that divalent cations, $BaCl_2$, $CaCl_2$, $MgCl_2$ and $ZnCl_2$, decreased the bactericidal effect of PG against *E. coli* but no effect against *S. aureus.* $ZnCl_2$ in PG produced better bactericidal activity. The result in the present studies indicated that PG has potential benefit for application as an antibacterial agent against mastitis in dairy farm.

Department.....Biochemistry..... Student's signature.....
Field of study....Biomedicinal Chemistry.... Advisor's signature.....
Academic year.....2005..... Co-advisor's signature.....

ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to express my sincere gratitude and appreciation to my advisor, Associate Professor Dr. Vimolmas Lipipun, Department of Microbiology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University, for her kindness, helpful and valuable advice, excellent supervision, and encouragement which enable me to carry out my thesis successfully.

I wish to express my grateful thank to my thesis co-advisor, Associate Professor Dr. Sunanta Pongsamart, Department of Biochemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University, for her kindness, valuable advice, and helpful suggession for this research.

My sincere gratitude are extention to Associate Professor Dr. Sukanya Jesadanont and Assistant Professor Niyada Kiatying-Angsulee, Department of Biochemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University, for her helpful and valuable advice for my thesis.

My special thanks to Assistant Professor Dr. Kittisak Ajariyakhajorn, Department of Veterinary Medicine, Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University, for providing bacterial isolates from bovine mastitis cases and advices for my thesis.

I would like to thank all staff members and my classmate of Department of Biochemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University, for their assistance and great encouragement.

Finally, I wish to express my infinite gratude to my family for their love, understanding and encouragement throughout my life.

CONTENTS

Page

ABSTRACTS (Thai)....iv
ABSTRACTS (English)....v
ACKNOWLEDGEMENTS....vi
CONTENTS....vii
LIST OF TABLES....x
LIST OF FIGURES....xii
ABBREVIATIONS....xv
CHAPTER
I GENERAL BACKGROUND....1
1. Introduction....1
2. Review of literature....4
1. Carbohydrates....4
1.1 Monosaccharides....4
1.2 Oligosaccharides....4
1.3 Polysaccharides....5
2. Durian....8
2.1 Edible Species....8
2.2 Medicinal Uses....10
2.3 Polysaccharide gel from *Durio zibethinus* Murr....10
2.4 Sugar composition of polysaccharide gel....11
3. Cow mastitis....11
3.1 Microorganisms causing mastitis....12
3.1.1 Contagious microorganisms....13
3.1.2 Environmental microorganisms....15
1. Environmental Streptococci....16
2. Coliforms....16
3.1.3 Opportunistic microorganisms....17
3.1.4 Other microorganisms....17
3.2 Isolation and identification of pathogens from milk....18

3.3 Therapy and prognosis: Antimicrobial drugs.....19
3.4 Supportive therapy.....20
4. Composition and function of bacterial cell wall.....21
4.1 Flagella.....21
4.2 Pili (Fimbriae).....22
4.3 Cell walls.....23
4.4 The plasma membrane.....26
5. Antimicrobial susceptibility tests.....27
5.1 Agar diffusion susceptibility tests.....28
5.2 Dilution method.....29
5.3 Broth microdilution susceptibility test.....30
5.4 Time-kill analysis.....30
5.5 The assay of bactericidal activity.....31
5.6 Killing curve.....32
II MATERIAL AND METHODS.....34
Materials.....34
1. Chemicals!.....34
2. Equipments.....34
Methods.....36
1. Preparation of polysaccharide gel (PG) from Durian rinds.....36
1.1 PG isolation.....36
1.2 Preparation of test solution of PG.....36
2. Test microorganisms and preparations of inoculum.....36
3. Preparation of agar and broth media.....37
4. Determination of antimicrobial activity of polysaccharide gel.....37
4.1 Agar diffusion susceptibility test.....37
4.2 Broth microdilution susceptibility test.....38
4.2.1 Determination of minimum inhibitory concentration and minimum bactericidal concentration.....38
4.3 Time-kill analysis.....39
4.4 Effect of various factors on antibacterial activity of PG.....39
4.4.1 Effect of pH on antibacterial activity of PG.....40
4.4.2 Effect of ionic strength on antibacterial activity of PG.....40
4.4.3 Effect of metal ions on antibacterial activity of PG.....40

4.4.4 Effect of temperature on antibacterial activity of PG.....41
III RESULTS.....42
1. Determination of antimicrobial activity of polysaccharide gel
1.1 Agar diffusion susceptibility test.....42
1.2 Broth microdilution of minimum inhibitory concentrations (MIC) and minimum bactericidal concentrations (MBC).....48
1.2.1 Determination of MIC and MBC with PG Monthong and gentamicin.....48
1.2.2 Determination of MIC and MBC with variety of durian rind 65
1.3 Time kill analysis.....67
1.3.1 PG Monthong (M).....67
1.3.2 PG Chanee (C).....67
1.3.3 PG Native cultivar from Chumporn province (Ncv).....67
1.3.4 Galacturonic acid.....68
2. The effect of various factors on inhibitory activity of PG
2.1 Temperature effect.....77
2.2 pH effect.....77
2.3 Salt effect.....77
2.4 Divalent cations effect.....77
IV DISCUSSION AND CONCLUSION.....97
1. Agar diffusion.....97
2. MIC/MBC of PG Monthong.....98
3. Time kill of PG Monthong.....99
4. Time kill of PG Monthong, Chanee and native from Chumporn 100
5. Time kill of galacturonic acid.....100
6. Factors effecting inhibitory activity of PG.....102
6.1 Temperature.....102
6.2. pH or acid-base in media.....102
6.3. Mono and divalent cations.....102
CONCLUSION.....104
REFERENCES.....105
APPENDICES.....110
VITA.....111

LIST OF TABLES

Table **Page**

1. Description of *D. Zibethinus* species....9
2. Subclinical investigation in smallholder dairyfarms of Chiang Mai province during 2002-2003....18
3. Inhibitory activity of polysaccharide gel (PG; Monthong) on growth of *Staphylococci* by agar diffusion method....43
4. Inhibitory activity of polysaccharide gel (PG; Monthong) on growth of *Streptococci* by agar diffusion method....44
5. Inhibitory activity of polysaccharide gel (PG; Monthong) on growth of *Escherichia coli* by agar diffusion method....45
6. Inhibitory activity of polysaccharide gel (PG; Monthong) on growth of *Klebsiella pneumoniae* by agar diffusion method....46
7. Inhibitory activity of polysaccharide gel (PG; Monthong) on growth of *Pseudomonas* spp. by agar diffusion method....47
8. MICs and MBCs of polysaccharide gel (PG) and gentamicin sulfate against mastitis causing bacteria, *Staphylococcus* spp....50
9. MICs and MBCs of galacturonic acid against mastitis causing bacteria, *Staphylococcus* spp....51
10. MICs and MBCs of polysaccharide gel (PG) and gentamicin sulfate against mastitis causing bacteria, *Streptococcus* spp....53
11. MICs and MBCs of galacturonic acid against mastitis causing bacteria, *Streptococcus* spp....54
12. MICs and MBCs of polysaccharide gel (PG) and gentamicin against mastitis causing bacteria, *E. coli*....56
13. MICs and MBCs of galacturonic acid against mastitis causing bacteria, *E. coli*....57
14. MICs and MBCs of polysaccharide gel (PG) and and gentamicin sulfate against mastitis causing bacteria, *K. pneumoniae*....59
15. MICs and MBCs of galacturonic acid against mastitis causing bacteria, *K. pneumoniae*....60

Table **Page**

16. MICs and MBCs of polysaccharide gel (PG) and gentamicin sulfate against mastitis causing bacteria, *Pseudomonas* spp.....62
17. MICs and MBCs of galacturonic acid against mastitis causing bacteria, *Pseudomonas* spp.....63
18. MICs and MBCs of polysaccharide gel (PG) from varieties of durian against tested bacteria. 66
19. A summary of mono and divalent cations on the inhibitory activity of PG against bacteria.....96

LIST OF FIGURES

Figure **Page**

1. Disaccharides (a) maltose (b) galactose (c) sucrose.....5
2. Polysaccharides:(a) Amylose (b) Cellulose (c) Amylopectin (d) Pectin and (e)Glycogen.....7
3. Mastitis results from interactions between the cow, her environment and microorganisms.....12
4. Type of flagella and bacterial cell structure.....27
5. Antibiotic-sensitivity testing (disc diffusion test).....28
6. MICs and MBCs of (a) polysaccharide gel (PG) Monthong cultivar (b) gentamicin and (c) galacturonic acid against mastitis causing bacteria, *Staphylococci*.....52
7. MICs and MBCs of (a) polysaccharide gel (PG) Monthong cultivar (b) gentamicin and (c) galacturonic acid against mastitis causing bacteria, *Streptococci,* by broth microdilution test.....55
8. MICs and MBCs of (a) polysaccharide gel (PG) Monthong cultivar (b) gentamicin and (c) galacturonic acid against mastitis causing bacteria, *Escherichia coli*, by broth microdilution test.....58
9. MICs and MBCs of (a) polysaccharide gel (PG) Monthong cultivar (b) gentamicin and (c) galacturonic acid against mastitis causing bacteria, *K. pneumoniae,* by broth microdilution test.....61
10. MICs and MBCs of (a) polysaccharide gel (PG) Monthong cultivar (b) gentamicin and (c) galacturonic acid against mastitis causing bacteria, *Pseudomonas* spp.....64
11. Time- kill analysis of polysaccharide gel (PG Monthong) in (a) *S. aureus* (SP2), (b) *S. aureus* (SP 23) and (c) *S. aureus* ATCC 25923.....69
12. Time- kill analysis of polysaccharide gel (PG Chanee) in (a) *S. aureus* (SP2), (b) *S. aureus* (SP 23) and (c) *S. aureus* ATCC 25923.....70

Figure **Page**

13. Time- kill analysis of polysaccharide gel (PG Native cultivar) in (a) *S. aureus* (SP2), (b) *S. aureus* (SP 23) and (c) *S. aureus* ATCC 25923.....71
14. Time- kill analysis of galacturonic acid in (a) *S. aureus* (SP2), (b) *S. aureus* (SP 23) and (c) *S. aureus* ATCC 25923.....72
15. Time- kill analysis of polysaccharide gel (PG Monthong) in (a) *E. coli* (CM 49), (b) *E. coli* (CM 85) and (c) *E. coli* ATCC 25923.....73
16. Time- kill analysis of polysaccharide gel (PG Chanee) in (a) *E. coli* (CM 49), (b) *E. coli* (CM 85) and (c) *E. coli* ATCC 25923.....74
17. Time- kill analysis of polysaccharide gel (PG Native cultivar) in (a) *E. coli* (CM 49), (b) *E. coli* (CM 85) and (c) *E. coli* ATCC 25922.....75
18. Time- kill analysis of galacturonic acid in (a) *E. coli* (CM 49), (a) *E. coli* (CM 85) and (c) *E. coli* ATCC 25923.....76
19. Effect of temperature on inhibitory activity of PG against (a) *S. aureus* (SP2) (b) *S. aureus* (SP23) and (c) *S. aureus* ATCC 25923.....79
20. Effect of temperature on inhibitory activity of PG against (a) *E. coli* (CM49), (b) *E. coli* (CM 85) and (c) *E. coli* ATCC 25922.....80
21. Effect of pH on inhibitory activity of PG against *S.aureus*.....81
22. Effect of pH on inhibitory activity of PG against *E. coli*. 82
23. Effect of pH on inhibitory activity of galacturonic acid (GA) against *S. aureus*.....83
24. Effect of pH on inhibitory activity of galacturonic acid against *E. coli*.....84
25. Effect of NaCl on inhibitory activity of PG against (a) *S. aureus* (SP2), (a) *S. aureus* (SP23) and (c) *S. aureus* ATCC 25923.....85
26. Effect of NaCl on inhibitory activity of PG against (a) *E. coli* (CM 49), (a) *E. coli* (CM 85) and (c) *E. coli* ATCC 25922.....86
27. Effect of $CaCl_2$ on inhibitory activity of PG against (a) *S. aureus* (SP2) (b) *S. aureus* (SP23) and (c) *S. aureus* ATCC 25923.....87
28. Effect of $CaCl_2$ on inhibitory activity of PG against (a) *E. coli* (CM 49), (a) *E. coli* (CM 85) and (c) *E. coli* ATCC 25922.....88

Figure **Page**

29. Effect of $BaCl_2$ on inhibitory activity of PG against (a) *S. aureus* (SP2) (b) *S. aureus* (SP23) and (c) *S. aureus* ATCC 25923 89
30. Effect of $BaCl_2$ on inhibitory activity of PG against (a) *E. coli* (CM 49), (a) *E. coli* (CM 85) and (c) *E. coli* ATCC 25922 90
31. Effect of $MgCl_2$ on inhibitory activity of PG against (a) *S. aureus* (SP2), (a) *S. aureus* (SP23) and (c) *S. aureus* ATCC 25923 91
32. Effect of $MgCl_2$ on inhibitory activity of PG against (a) *E. coli* (CM 49) (b) *E. coli* (CM 85) and (c) *E. coli* ATCC 25922 92
33. Effect of $ZnCl_2$ on inhibitory activity of PG against (a) *S. aureus* (SP2), (b) *S. aureus* (SP23) and (c) *S. aureus* ATCC 25923 93
34. Effect of $ZnCl_2$ on inhibitory activity of PG against (a) *E. coli* (CM 49) (b) *E. coli* (CM 85) and (c) *E. coli* ATCC 25922 94
35. Effect of $ZnCl_2$ on inhibitory activity of PG against (a) *S. aureus* ATCC 25923 and (b) *E. coli* ATCC 25922 95

ABBREVIATIONS

ATCC	American Type Culture Collection, Maryland, USA
°C	degree celsius (centigrade)
C	Chanee
CFU	colony forming unit
cm	centimeter (s)
cv	cultivar
e.g.	example gratia, for example
et al.	et alii, and others
g	gram (s)
hr	hour
kg	kilogram (s)
L	litre (s)
MBC	minimal bactericidal concentration
mg	milligram
MHA	mueller hinton agar
MHB	mueller hinton broth
MIC	minimal inhibitory concentration
min	minute (s)
ml	milliliter (s)
mm	millimeter (s)
Ncv	Native cultivar
M	Monthong
µg	microgram
µl	microliter
NCCLS	National Committee for Clinical Laboratory Standard
No.	number
NSS	normal saline solution
%	percentage

pH	the negative logarithm of hydrogen ion concentration
SD	standard deviation
TSA	tryptic soy agar
TSB	tryptic soy broth
w/v	weight by volume