



ผลของน้ำส้มควันไม้จากสะเดาต่อการต้านแบคทีเรียและประสิทธิภาพ

การเจริญเติบโตในลูกสุกรหย่านม

Effects of Neem Wood Vinegar on Antibacterial Activities and Growth

Performance in Weaned Piglets

พิมพชนก โล่ห์ทองคำ* และ ภคินิจ คุปพิทยานันท์¹

¹สาขาวิชาเทคโนโลยีและนวัตกรรมทางสัตว์ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

อำเภอเมือง จังหวัดนครราชสีมา 30000

*E-mail: pimchanok.l@nrru.ac.th

บทคัดย่อ

การศึกษานี้ได้ผลิตน้ำส้มควันไม้จากไม้สะเดา เพื่อศึกษาองค์ประกอบทางเคมีด้วยเครื่อง Gas chromatography–mass spectrometry (GC-MS) ศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของน้ำส้มควันไม้ในระดับห้องปฏิบัติการด้วย 3 วิธี คือ 1) วิธี Agar disc diffusion 2) วิธี Broth microdilution และ 3) การใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด รวมทั้งผลของน้ำส้มควันไม้ต่อประสิทธิภาพการเจริญเติบโตของลูกสุกรหย่านม ผลพบว่า น้ำส้มควันไม้สะเดามีองค์ประกอบหลักเป็นกรดอะซิติก (24.8%) และสารในกลุ่มฟีนอล เช่น phenol, 2, 6-dimethoxy (15.3%) มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียได้ทั้งแกรมบวกและแกรมลบ โดยมีค่า MIC อยู่ระหว่าง 1.25-5 %v/v และค่า MBC อยู่ระหว่าง 2.5-10 %v/v ภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแสดงฤทธิ์ในการยับยั้งการแบ่งเซลล์ของแบคทีเรีย ผลการศึกษาในลูกสุกรหย่านมที่ได้รับน้ำส้มควันไม้สะเดามีอัตราการแลกเนื้อไม่แตกต่างกับลูกสุกรที่ได้รับยาปฏิชีวนะ ในลำไส้เล็กของลูกสุกรพบว่า อัตราส่วนความสูงของวิลไลต่อความลึกของครีปต์ในลำไส้ส่วนเจริญและส่วนไอเลียมในลูกสุกรที่ได้รับน้ำส้มควันไม้เพิ่มขึ้นใกล้เคียงกับลูกสุกรที่ให้อาหารยาปฏิชีวนะ ซึ่งสอดคล้องกับลักษณะของวิลไลภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน ผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า น้ำส้มควันไม้จากไม้สะเดามีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียก่อโรค สามารถใช้เป็นทางเลือกแทนยาปฏิชีวนะในฟาร์มสุกรได้

Received: December 24, 2019

Revised: February 15, 2020

Accepted: April 29, 2020

คำสำคัญ: น้ำส้มควันไม้ สะเดา ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย ประสิทธิภาพการเจริญเติบโต ลูกสุกรหย่านม

Abstract

This study produced neem (*Azadirachta indica*) wood vinegar and explored its chemical compositions in laboratory by gas chromatography–mass spectrometry (GC-MS), its effects on antibacterial activities by 1) agar disc diffusion method, 2) broth microdilution method and 3) scanning electron microscopy, and its effects on growth performance in weaned piglets. The GC-MS analysis showed the presence of acetic acid (24.8%) and phenol, 2,6-dimethoxy (15.3%) as major bioactive compounds of neem wood vinegar which exhibited broad spectrum of antibacterial activities with MIC value ranging from 1.25 to 5 %v/v and MBC value from 2.5 to 10 %v/v. The scanning electron micrographs observation showed that neem wood vinegar inhibited bacterial cell division. The feed conversion ratio with piglets treated with neem wood vinegar was not different to those received antibiotics. The study of intestinal morphology revealed that neem wood vinegar trended to increase the ratio of villus height to crypt depth in jejunum and ileum of piglets which was similar to those received antibiotics. This was consistent with the study of scanning electron micrographs. The finding illustrated that neem wood vinegar has antibacterial activities and may be substituted as an alternative use for antibiotics in weaned piglets farm.

Keywords: Wood vinegar, Neem, Antibacterial activities, Growth performance, Weaned piglets

1. บทนำ

น้ำส้มควันไม้ (Wood vinegar) หรือ Pyroigneous acid เป็นผลพลอยได้ที่เกิดขึ้นจากการเผาถ่านที่อุณหภูมิ 300-400 องศาเซลเซียส ใช้น้ำและควันที่เกิดขึ้นจากการเผา เกิดการควบแน่นเป็นหยดน้ำ รวมกันจนได้เป็นของเหลวสีน้ำตาล มีกลิ่นควันไฟ ซึ่งประกอบไปด้วยกรดอินทรีย์หลายชนิด โดยมีกรดอะซิติก เป็นองค์ประกอบหลักและมีสารในกลุ่มฟีนอล [1] ส่วนองค์ประกอบย่อยอื่นๆ ของสารเคมีในน้ำส้มควันไม้ขึ้นอยู่กับชนิดของไม้ที่นำมาเผาและอุณหภูมิที่ใช้เผา [1-2] น้ำส้มควันไม้ได้ถูกนำมาใช้ประโยชน์เป็นเวลานาน ตั้งแต่อดีตจนปัจจุบัน ถือเป็นภูมิปัญญาของแต่ละท้องถิ่น เนื่องจากน้ำส้มควันไม้มีค่าความเป็นกรดและมีกลิ่น

จากการเผาไหม้ จึงได้มีการประยุกต์ใช้ในกิจกรรมต่างๆ เช่น การควบคุมโรคในพืช การปรับสภาพดิน การควบคุมกลิ่นในฟาร์มปศุสัตว์ เป็นต้น นอกจากนี้ได้มีการนำมาใช้ผสมกับอาหารสัตว์ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการเจริญเติบโตที่ดี เป็นที่ทราบกันว่าการเลี้ยงสุกรช่วงเวลาการหย่านมลูกสุกรเป็นสาเหตุการเกิดความเครียด อีกทั้งระบบทางเดินอาหารในระยะดังกล่าวยังพัฒนาไม่สมบูรณ์ ทำให้มีประสิทธิภาพการย่อยและดูดซึมสารอาหารต่ำ ลูกสุกรมีการเจริญเติบโตและสร้างภูมิคุ้มกันลดลง สุขภาพอ่อนแอและเกิดปัญหาท้องเสียได้ง่าย การเสริมน้ำส้มควันไม้ให้กับลูกสุกรหลังหย่านมเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจ มีผลวิจัยอย่างองแสดงถึงการเพิ่มประสิทธิภาพการเจริญเติบโตในสุกร โดย

การผสมน้ำส้มควันไม้ไฟในอาหารลูกสุกรหย่านม [3] และน้ำส้มควันไม้มั่งคุดในสุกรขุน [4] อย่างไรก็ตาม ฤทธิ์ทางชีวภาพของน้ำส้มควันไม้ตามหลักวิชาการยังจำเป็นต้องมีการศึกษาเพื่อสนับสนุนภูมิปัญญาท้องถิ่นที่เกิดขึ้น

สะเดา (*Azadirachta indica*) เป็นไม้ที่พบได้ทั่วไปในประเทศไทย และมีการปลูกในหลายพื้นที่ เป็นต้นไม้ที่มีเนื้อไม้และโตเร็ว จึงนิยมนำมาใช้ในการเผาเพื่อผลิตถ่าน ผลิตภัณฑ์ข้างเคียงที่ได้คือ น้ำส้มควันไม้จากไม้สะเดา ในท้องถิ่นแต่ละภูมิภาคได้มีการนำน้ำส้มควันไม้ไปใช้ประโยชน์ แต่ยังคงต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมในระดับห้องปฏิบัติการและในระดับฟาร์ม มีผลวิจัยอ้างอิงหลายงานวิจัยที่แสดงให้เห็นว่าการใช้กรดอินทรีย์สามารถการกระตุ้นการเจริญ และควบคุมการก่อโรคของแบคทีเรียในสัตว์ได้ [5] กรดอินทรีย์หลายชนิดที่ถูกนำมาวิจัย ได้แก่ กรดอะซิติก (Acetic acid) กรดแล็กติก (Lactic acid) กรดซิตริก (Citric acid) และกรดมาลิก (Malic acid) [5-6] ซึ่งกรดเหล่านี้ให้ผลดีต่อการเจริญและควบคุมเชื้อแบคทีเรียได้ ดังนั้นในการวิจัยครั้งนี้ จึงได้ทำการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียในระดับห้องปฏิบัติการของน้ำส้มควันไม้จากไม้สะเดาและประสิทธิภาพในการใช้ทดแทนยาปฏิชีวนะในลูกสุกรหย่านมในระดับฟาร์มทดลอง นอกจากนี้ งานวิจัยนี้ยังได้ศึกษาถึงองค์ประกอบของสารเคมีในน้ำส้มควันไม้ด้วยเครื่อง Gas chromatography–mass spectrometry (GC-MS)

2. วัสดุอุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

2.1 การเตรียมน้ำส้มควันไม้จากไม้สะเดา

ในการศึกษาครั้งนี้ได้เตรียมกิ่งไม้ และลำต้นของต้นสะเดาตากแห้งเป็นเวลา 3 วัน ตัดเป็นท่อนเล็ก ๆ ซึ่งน้ำหนัก 3 กิโลกรัม เพื่อนำมาเผาเป็น

ถ่าน ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จาก ผศ.ดร.ปรีชา ชันติโกมล สาขาวิชาวิศวกรรมเครื่องกล มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี นครราชสีมา เผาถ่านที่อุณหภูมิ 100-400 องศาเซลเซียส นาน 90 นาที ไอและควันที่เกิดขึ้นจากการเผาคัดแยกเป็นน้ำส้มควันไม้ เก็บน้ำส้มควันไม้ดิบไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 เดือน เพื่อเตรียมนำไปใช้ในการศึกษาต่อไป

2.2 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของน้ำส้มควันไม้

น้ำส้มควันไม้จากสะเดาถูกนำไปตรวจหาองค์ประกอบของสารเคมีด้วยเครื่อง GC-MS (Agilent Technology, USA) ที่ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ใช้คอลัมน์ 60-m DB-WAX (0.25 มิลลิเมตร ID × 0.25 มิลลิเมตร) โดยตั้งอุณหภูมิส่วนที่ฉีดสารที่ 250 องศาเซลเซียส ส่วนอุณหภูมิกอลัมน์จะตั้งโปรแกรมโดยใช้อุณหภูมิเริ่มต้นที่ 35 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที และค่อย ๆ เพิ่มอุณหภูมิด้วยอัตราเร็ว 3 องศาเซลเซียส / นาที จนถึงอุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส แล้วเพิ่มอุณหภูมิขึ้นด้วยอัตราเร็ว 5 องศาเซลเซียส/นาที จนถึงอุณหภูมิ 240 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาทีและสภาวะสำหรับตรวจวิเคราะห์มวลสารที่อุณหภูมิ 250 องศาเซลเซียส โดยใช้พลังงานในการแตกตัวเป็นอิเล็กตรอนเท่ากับ 70 eV อิเล็กตรอนถูกตรวจสอบที่ 30–400 amu. น้ำส้มควันไม้ที่ใช้ฉีดเข้าเครื่องปริมาตร 3 ไมโครลิตร และใช้แก๊สฮีเลียม (Helium) เป็นเฟสเคลื่อนที่โดยมีอัตราการไหลเท่ากับ 1 มิลลิตร/นาที มวลโมเลกุลที่ได้ถูกนำไปเทียบกับฐานข้อมูล NIST MS 14.0 [7] ขนาดมวลที่ตรงกัน (มากกว่า 90%) กับมวลโมเลกุลในฐานข้อมูล จะถูกแปลผลเป็นสารชนิดนั้น ๆ

2.3 การศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของน้ำส้มคั้น

1) แบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ

เชื้อแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ คือ เชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 เชื้อ MRSA NPRC 001R และเชื้อ *Escherichia coli* ATCC 29522 ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากผศ.ดร.มณฑล วิสุทธิ สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏนครราชสีมา

เชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากลูกสุกรท้องเสีย 18 สายพันธุ์ ได้รับความอนุเคราะห์จากผศ.สพญ.ดร.จุฬิพร ศักดิ์สง่าวงศ์ ภาควิชาสัตวแพทย์ สาธารณสุข คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น และเชื้อ *Escherichia coli* TISTR 073 ได้รับจากศูนย์จุลินทรีย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

นำเชื้อแบคทีเรียทดสอบมาเพาะเลี้ยงในอาหาร Tryptic soy agar (TSA) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนนำไปใช้ในการตรวจสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของน้ำส้มคั้น

2) การทดสอบฤทธิ์ของน้ำส้มคั้นด้วย

วิธี Agar disc diffusion

ตรวจสอบฤทธิ์ต้านเชื้อเบื้องต้นด้วยวิธี Agar disc diffusion ดัดแปลงจาก CLSI [8] โดยเชื้อแบคทีเรียทดสอบจากจานอาหารเลี้ยงเชื้อมา 1 โคโลนี ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller-Hinton broth (MHB) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมง จากนั้นปรับความขุ่นด้วย น้ำเกลือปราศจากเชื้อ (NSS) ความเข้มข้น 0.85% ให้ได้ความขุ่นเท่ากับสารละลาย McFarland No. 0.5 จะได้ความเข้มข้นของจำนวนเซลล์เท่ากับ 1.5×10^8 CFU/mL ใช้ไม้ปั่นสำลีที่ปลอดเชื้อ จุ่มเชื้อที่เตรียม

ไว้ เกลี่ยให้ทั่วผิวหน้าอาหาร Mueller-Hinton agar (MHA)

การเตรียมแผ่น paper disc คัดกระดาษกรอง Whatman No.1 ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที จากนั้นหยดน้ำส้มคั้น (100 % v/v) ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงบนแผ่น paper disc ที่ไว้ให้แห้ง 24 ชั่วโมง ก่อนนำไปวางบนอาหาร MHA ที่ลงเชื้อไว้แล้ว นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตและบันทึกผลการทดลองโดยใช้เวอร์เนียคาลิเปอร์ (Vernier calipers) วัดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใส หรือบริเวณยับยั้ง (Inhibition zone) รอบแผ่น paper disc ทั้งหมด 3 ครั้ง ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ สำหรับชุดควบคุมแบบ positive control ใช้แผ่นยาปฏิชีวนะสำเร็จรูป ชนิดยาที่ใช้คือ Enrofloxacin (5 ไมโครกรัม/แผ่น, Oxoid, UK)

3) การตรวจหาความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อได้ (Minimum inhibitory concentration; MIC) และความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรีย (Minimum Bactericidal Concentration; MBC)

การหาค่า MIC โดยวิธี Microdilution method ดัดแปลงจาก CLSI [8] เตรียมเชื้อแบคทีเรียตามวิธีการข้างต้นและนำน้ำส้มคั้นไม่ที่ความเข้มข้น 100% v/v มาเจือจางลงครึ่งละ 2 เท่า ด้วยอาหาร MHB ใน 96 well plate จะมีค่าความเข้มข้นของน้ำส้มคั้นไม่ระหว่าง 0.39-25% v/v จากนั้นเติมเชื้อที่ปรับความเข้มข้นให้เท่ากับ 1×10^6 CFU/mL ลงในแต่ละหลุมปริมาตร 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง การอ่านผลการทดลองค่า MIC โดยสังเกตความขุ่น

หรือใสของอาหารที่ไม่มีเชื้อเจริญเปรียบเทียบกับชุดการทดลองที่มีแต่อาหารกับน้ำส้มควันไม้ ความเข้มข้นที่น้อยที่สุดของน้ำส้มควันไม้ที่ไม่มีการเจริญของเชื้อบันทึกผลการทดลองเป็นค่า MIC ทำการทดสอบ 3 ซ้ำ สำหรับชุดควบคุมแบบ positive control ใช้ยาปฏิชีวนะ Enrofloxacin เติรมยาที่ความเข้มข้น 32 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เจือจางลงครึ่งละ 2 เท่า แล้วเติมเชื้อลงไป ความเข้มข้นสุดท้ายของยาจะมีค่าความเข้มข้นระหว่าง 0.125-8 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

การหาค่า MBC โดยใช้วิธี Drop plate คัดแปลงจาก CLSI [8] ทำการหยดอาหารที่ไม่มีเชื้อเจริญเติบโตของเชื้อจากการหาค่า MIC ลงบนอาหาร Nutrient agar (NA) โดยใช้ปริมาตร 10 ไมโครลิตร แล้วปล่อยให้แห้ง จากนั้นนำไปเข้าตูบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตและบันทึกผลการทดลองค่า MBC โดยบันทึกค่าความเข้มข้นน้อยที่สุดของน้ำส้มควันไม้ที่ไม่มีการเจริญของเชื้อ คือไม่มีโคโลนีของเชื้อบนอาหาร NA ทำการทดสอบ 3 ซ้ำ เพื่อยืนยันผลการทดลอง

4) การตรวจสอบฤทธิ์ของน้ำส้มควันไม้ต่อลักษณะเซลล์แบคทีเรียด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด

การศึกษานี้ใช้น้ำส้มควันไม้ที่ความเข้มข้นเท่ากับค่า MIC นำมาทดสอบกับเซลล์ของเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* TISTR 073 จากนั้นนำเซลล์แบคทีเรีย มาตรวจสอบลักษณะเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนที่เวลา 0 12 24 และ 48 ชั่วโมง นำน้ำเลี้ยงเซลล์แบคทีเรียมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที จากนั้นล้างเซลล์ด้วย Phosphate buffer ความเข้มข้น 0.1 M ที่ค่า pH 7.4 และ คงสภาพเซลล์ด้วย

Glutaraldehyde ความเข้มข้น 2.5% (Sigma, USA) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ล้างเซลล์และคงสภาพเซลล์ด้วย Osmium tetroxide ความเข้มข้น 4% (Sigma, USA) เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่นและค่อย ๆ ดึงน้ำจากเซลล์ออกด้วยอะซิโตน (Acetone) ความเข้มข้นเริ่มต้นที่ 20% ไปจนถึง 100% เซลล์แบคทีเรียที่แห้งแล้วจะถูกนำไปวางบนแผ่นอะลูมิเนียมและเคลือบด้วยทอง ก่อนนำไปตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Carl Zeiss, Auriga, Germany)

2.4 การศึกษาประสิทธิภาพการเจริญเติบโตในลูกสุกรหย่านม

การศึกษายุทธศาสตร์ของน้ำส้มควันไม้จากสะเดาในลูกสุกรได้ปฏิบัติตามระเบียบของสมาคมวิทยาศาสตร์สัตว์ทดลองแห่งประเทศไทย และวิธีการดำเนินการวิจัยนี้ได้ผ่านการตรวจรับรองจรรยาบรรณการศึกษาในสัตว์ทดลองจากคณะกรรมการกำกับดูแลการดำเนินการต่อสัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีเป็นที่เรียบร้อยแล้ว ก่อนดำเนินการวิจัย

การศึกษานี้ได้ดำเนินการในฟาร์มสุกรเลี้ยงโดยระบบปิดของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีภายใต้อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ที่ความชื้นน้อยกว่า 80% โดยใช้ลูกสุกรผสม 3 สายพันธุ์ (Duroc x Yorkshire x Landrace) หย่านมที่อายุ 21 วัน น้ำหนักตัวเฉลี่ย 10 กิโลกรัม จำนวน 60 ตัว แบ่งเป็นเพศผู้ตอน 30 ตัวและเพศเมีย 30 ตัว ลูกสุกรจะถูกแบ่งกลุ่มออกเป็น 3 กลุ่มตามการทดลอง ได้แก่ กลุ่มควบคุม กลุ่มเสริมยาปฏิชีวนะ และกลุ่มเสริมน้ำส้มควันไม้สะเดา แต่ละกลุ่มแบ่งออกเป็น 4 ซ้ำ (เพศผู้ 2 ซ้ำและเพศเมีย 2 ซ้ำ) ซ้ำละ 5 ตัว ใช้แผนการทดลองแบบบล็อกกลุ่มสมบูรณ์ (RCBD)

อาหารที่ให้ป้อนอาหารสูตรพื้นฐานที่ระดับโปรตีนพลังงานตามคำแนะนำของ NRC [9] โดยกลุ่มควบคุมลูกสุกรจะกินอาหารสูตรพื้นฐาน กลุ่มเสริมยาปฏิชีวนะ คือลูกสุกรจะกินอาหารสูตรพื้นฐานและเสริมยาปฏิชีวนะ Enrofloxacin (Baytril 0.5%) โดยการป้อนปากปริมาณยา 1 มิลลิลิตร ต่อน้ำหนักตัว 20 กิโลกรัม และกลุ่มเสริมน้ำส้มควันไม้ (100 % v/v) ลูกสุกรจะกินอาหารสูตรพื้นฐานและเสริมน้ำส้มควันไม้โดยการป้อนปากปริมาณ 1 มิลลิลิตร ต่อน้ำหนักตัว 20 กิโลกรัม ทุกวัน อาหารและน้ำให้กินแบบไม่จำกัด เป็นเวลา 28 วัน ชั่งน้ำหนักและปริมาณอาหารที่กินทุกสัปดาห์ จนสิ้นสุดการทดลอง เพื่อนำไปคำนวณหาอัตราการเจริญเติบโต

2.5 การตรวจค่าทางโลหิตวิทยาและค่าเคมีคลินิก

การเก็บตัวอย่างเลือดจะเก็บจากหลอดเลือดดำ Jugular บริเวณคอของลูกสุกร ปริมาณ 3 มิลลิลิตร โดยสุ่มเก็บก่อนและหลังการทดลองจากลูกสุกร 1 ตัว ในแต่ละซ้ำของทุกกลุ่มทดลอง เลือดที่ได้จะถูกแบ่งออกเป็น 2 ส่วน ส่วนที่ 1 เลือดครบส่วน (Whole blood) ใส่ในหลอดที่มี Ethylene Diamine Tetra-Acetic acid (EDTA) เพื่อป้องกันการแข็งตัวของเลือดและส่วนที่ 2 ซีรัม (Serum) ใส่ในหลอดปกติและปล่อยให้เกิดการแข็งตัว ตัวอย่างเลือดส่วนที่ 1 จะถูกนำไปตรวจค่าความสมบูรณ์ของเม็ดเลือด (Complete Blood Count) ตัวอย่างเลือดส่วนที่ 2 จะนำซีรัมไปวิเคราะห์หาค่าการทำงานของเอนไซม์ ได้แก่ Aspartate transaminase (AST) Alanine aminotransferase (ALT) และ Creatinine

2.6 การวิเคราะห์ปริมาณแบคทีเรียในมูล

การเก็บตัวอย่างมูลลูกสุกรจะสุ่มเก็บในวันที่ 1 7 14 21 และ 28 ของการทดลอง มูลสุกรสดปริมาณ 10 กรัม ต่อ 1 ตัว [10] จะเก็บด้วยไม้พินสำลี

ใส่น้ำเกลือปราศจากเชื้อ ปริมาตร 190 มิลลิลิตร จากนั้นคนให้เข้ากันและเจือจางแบบ 10 เท่า จนได้ระดับการเจือจางที่ 10^{-3} ถึง 10^{-8} จากนั้นนำตัวอย่างที่เจือจางแล้ว 1 มิลลิลิตร ไปเกลี่ยบนอาหาร NA เพื่อตรวจนับปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดในมูล เกลี่ยตัวอย่างบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MacConkey agar เพื่อตรวจหาปริมาณเชื้อ *Escherichia coli* และเกลี่ยตัวอย่างบนอาหาร deMan, Rogosa and Sharpe agar เพื่อตรวจนับ *Lactobacillus* spp. จานอาหารเลี้ยงเชื้อ NA และ MacConkey agar บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จานอาหารเลี้ยงเชื้อ deMan, Rogosa and Sharpe agar บ่มภายใต้สภาวะไร้อากาศในตู้บ่มคาร์บอนไดออกไซด์ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนี 30 – 300 โคโลนี ที่โตบนอาหารเลี้ยงและคำนวณจำนวนเชื้อในมูลสุกรในหน่วย $\log_{10}$ CFU/mL.

2.7 การศึกษาลักษณะจุลกายวิภาคของลำไส้เล็ก

เมื่อสิ้นสุดการทดลองในฟาร์ม สุ่มลูกสุกร 1 ตัว ในแต่ละซ้ำจากทุกกลุ่มทดลอง ทำให้ลูกสุกรตายอย่างสงบและทำการเก็บตัวอย่างลำไส้เล็กส่วนดูโอดินัม ส่วนเจจูนัม และส่วนไโเลียม โดยเก็บเนื้อเยื่อจากลำไส้เล็กที่ตำแหน่งตรงกลางของแต่ละส่วน ความยาวประมาณ 2 เซนติเมตร ตรึงในแผ่นโฟม คงสภาพในสารฟอร์มาลินความเข้มข้น 10% เพื่อรักษาเนื้อเยื่อก่อนนำไปตรวจสอบลักษณะเนื้อเยื่อด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงและกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด

1) การเตรียมตัวอย่างลำไส้สำหรับกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง

ตัวอย่างลำไส้เล็กแต่ละชิ้นจะถูกตัดแบ่งเป็นขนาด 8×10 มิลลิเมตร แล้วแช่ในสาร

ฟอร์มาลินความเข้มข้น 10% เพื่อดึงน้ำออกจากตัวอย่าง แล้วนำเข้ากระบวนการเตรียมทำสไลด์เนื้อเยื่อด้วยเครื่อง Automatic tissue processor เป็นเวลา 16 ชั่วโมง จากนั้นนำเนื้อเยื่อฝังในพาราฟินด้วยเครื่อง Paraffin embedding นำแท่งขึ้นเนื้อเยื่อมาตัดด้วยเครื่องตัดชิ้นเนื้อ (Microtome รุ่น Leica RM-2145) ให้มีความหนาประมาณ 5-6 ไมครอน นำแผ่นเนื้อเยื่อที่ตัดได้วางลงบนแผ่นสไลด์แล้ววางบนแผ่นให้ความร้อน (Hot plate) ที่อุณหภูมิ 57 องศาเซลเซียส เพื่อให้ชิ้นตัวอย่างแห้ง จากนั้นนำแผ่นสไลด์ไปย้อมสี Haematoxylin และสี Eosin เพื่อเตรียมเป็นสไลด์ถาวร โดยตัวอย่างลำไส้แต่ละชิ้นจะเตรียมเป็นสไลด์ 10 แผ่น เพื่อนำไปวัดความสูงของวิลไล (Villi) ความลึกของคริปต์ (Crypt depth) และคำนวณหาสัดส่วนความสูงของวิลไลต่อความลึกของคริปต์ [11] ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 10 เท่า (Leica DM 750, Japan)

2) การเตรียมตัวอย่างลำไส้สำหรับกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope; SEM)

ตัวอย่างลำไส้เล็กส่วนดูโอดินัมตัดขนาด 2×3 เซนติเมตร ล้างทำความสะอาดด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 M pH 7.4 จากนั้นนำไปแช่ในสารฟอร์มาลินความเข้มข้น 10% เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ตัดลำไส้ให้มีขนาด 3×10 มิลลิเมตร นำไปแช่ในน้ำกลั่นและสารอะซิโตน 1 ชั่วโมง ทำให้แห้งและแข็งตัวด้วยคาร์บอนไดออกไซด์เหลว จากนั้นนำไปเคลือบด้วยทอง แล้วจึงนำตัวอย่างลำไส้ตรวจสอบลักษณะเซลล์เยื่อผิวของวิลไล ความยาวและรูปร่างผิวสัมผัสของวิลไลด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Carl Zeiss, Auriga, Germany)

2.8 การวิเคราะห์ค่าทางสถิติ

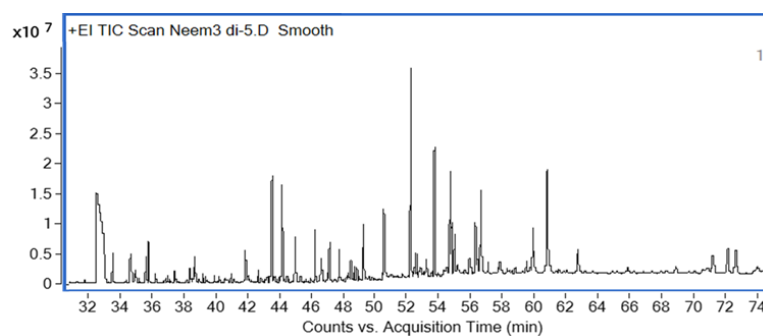
ผลการทดลองของแต่ละการทดลองนำมาหาค่าเฉลี่ยและเปรียบเทียบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $P < 0.05$ ด้วยวิธี Duncan's multiple range test โดยใช้โปรแกรม IBM SPSS Statistics (Version 20.0; SPSS Inc, USA)

3. ผลการวิจัยและวิจารณ์ผลการวิจัย

3.1 องค์ประกอบทางเคมีของน้ำส้มควันไม้

ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของน้ำส้มควันไม้จากสะเดาด้วยวิธี GC-MS ตรวจพบสารเคมีที่เป็นองค์ประกอบทั้งหมด 24 ชนิดแสดงผลในรูปแบบที่ 1 และแสดงรายชื่อสารเคมีหลักที่ตรวจพบในตารางที่ 1 โดยองค์ประกอบหลักทางเคมีของน้ำส้มควันไม้จากสะเดาได้แก่ สารกลุ่มกรดแอลกอฮอล์และกลุ่มสารประกอบฟีนอลิก โดยสารหลักคือ กรดอะซิติก (24.8%) และ Phenol, 2,6-dimethoxy (15.3%) ซึ่งกลุ่มสารองค์ประกอบหลักเหล่านี้สอดคล้องกับผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีในน้ำส้มควันไม้จากไม้กระถิน สะเดา ยูคาลิปตัส ขางพารา ไข่ [12] และลิ้นจี่ [13]

น้ำส้มควันไม้เป็นของเหลวที่ได้จากการเผาถ่านที่อุณหภูมิ 300-400 องศาเซลเซียส ที่ประกอบไปด้วยสารอินทรีย์ชนิดต่าง ๆ ที่สะสมอยู่ในเปลือกและแก่นไม้ในรูปของเซลลูโลส (Cellulose) เฮมิเซลลูโลส (Hemicellulose) และลิกนิน (Lignin) เกิดการสลายตัว มีองค์ประกอบหลักได้แก่ กรดอะซิติกและสารประกอบฟีนอลิกที่มีฤทธิ์ต้านจุลชีพ ซึ่งมีรายงานว่า อุณหภูมิช่วง 230-370 องศาเซลเซียส เป็นช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเตรียมน้ำส้มควันไม้ โดยจะให้ฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียได้ดีมากกว่าช่วงอุณหภูมิ 90-230 องศาเซลเซียสและ 370-450 องศาเซลเซียส [2]



รูปที่ 1 โครมาโตแกรมของสารเคมีในน้ำส้มควันไม้จากสะเดาวิเคราะห์ด้วยวิธี GC-MS

ตารางที่ 1 องค์ประกอบทางเคมีของน้ำส้มควันไม้จากสะเดาวิเคราะห์ด้วยวิธี GC-MS

No.	RT (min)	Compounds	Area percentage (%)
1	32.91	Acetic acid	24.8
2	34.75	Formic acid	2.0
3	35.59	2-Cyclopenten-1-one, 3-methyl-	0.6
4	35.83	Propanoic acid	1.5
5	38.37	Butanoic acid	0.4
6	38.68	Butanoic acid, 4-hydroxy-	1.4
7	41.85	2(5H)-Furanone	0.4
8	41.91	Acetamide	0.8
9	43.23	2H-Pyran-2-one, tetrahydro-	0.8
10	43.50	2-Cyclopenten-1-one, 2- hydroxy-3-methyl-	3.0
11	44.15	Phenol, 2-methoxy-	1.1
12	44.98	2-Cyclopenten-1-one, 3-ethyl-2-hydroxy-	1.2
13	45.33	2-Butenedioic acid (Z)-, dimethyl ester	0.5
14	46.23	Cresol	0.6
15	47.06	o-Cresol	0.3
16	47.15	Phenol	1.8
17	47.75	Phenol, 4-ethyl-2-methoxy-	0.6
18	48.29	2-Pyrrolidinone	1.4
19	48.46	2,2-Dimethyl-3-heptanone	0.6
20	48.68	p-Cresol	0.5
21	48.85	Phenol, 3-methyl-	0.7

No.	RT (min)	Compounds	Area percentage (%)
22	49.23	Cyclopentanol	2.2
23	50.50	1,4:3,6-Dianhydro- α -d-glucopyranose	1.2
24	50.59	2(3H)-Furanone, dihydro-3-hydroxy-4,4-dimethyl-, ($\pm$)-	2.4
25	52.22	Phenol, 2,6-dimethoxy-	15.3
26	52.51	2(3H)-Furanone, 3-acetyldihydro-3-methyl-	1.5
27	52.61	2,3-Anhydro-d-mannosan	1.0
28	53.22	Pentanoic acid, 4-oxo-	1.0
29	53.53	Pyrrolidine, 1-(1-oxo-5-octadecenyl)-	0.5
30	53.72	1,2,4-Trimethoxybenzene	6.4
31	53.97	2(3H)-Furanone, 5-acetyldihydro-	0.5
32	54.32	Pyrrolidine, 1-acetyl-	1.0
33	54.7	5-tert-Butylpyrogallol	4.2
34	54.78	1,4:3,6-Dianhydro- α -d-glucopyranose	4.0
35	55.93	2,4-Hexadienedioic acid, 3,4-diethyl-, dimethyl ester, (Z,Z)-	0.4
36	55.99	Succinimide	0.8
37	56.27	(S)-(+)-2',3'-Dideoxyribonolactone	5.2
38	56.38	5-Hydroxymethylfurfural	0.7
39	57.1	Phenol, 2,6-dimethoxy-4-(2-propenyl)	0.4
40	57.83	Vanillin	0.6
41	60.82	Catechol	1.1
42	68.85	Benzaldehyde, 4-hydroxy-3,5-dimethoxy-	0.5
43	71.19	Ethanone, 1-(4-hydroxy-3,5-dimethoxyphenyl)-	1.1
44	72.61	Hydroquinone	2.9

3.2ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของน้ำส้มควันไม้

น้ำส้มควันไม้ให้ฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียได้ทั้งแกรมบวกและแกรมลบ แสดงผลในตารางที่ 2 โดยมีค่าการยับยั้งเชื้ออยู่ระหว่าง 6.5-7.5 มิลลิเมตร มีค่า MIC และ MBC ต่อแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบเท่ากันเท่ากับ 3.12 และ 6.25 % v/v ตามลำดับ นอกจากนี้ ได้ทำการประเมินฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบสายพันธุ์อื่น ๆ ที่

แยกได้จากสุกรท้องเสีย แสดงผลในตารางที่ 3 พบว่า น้ำส้มควันไม้จากไม้สะเดาให้ฤทธิ์ยับยั้งและฆ่าเชื้อได้โดยมีค่า MIC อยู่ระหว่าง 1.25-5 %v/v และมีค่า MBC อยู่ระหว่าง 2.5-10 %v/v จากการทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียด้วยวิธี Agar disc diffusion จะเห็นได้ว่าบริเวณที่เกิดการยับยั้งเชื้อมีขนาดเล็กมาก แสดงให้เห็นว่าการยับยั้งเชื้อของน้ำส้มควันไม้เกิดขึ้นเฉพาะบริเวณที่สัมผัสกับน้ำส้ม

คว้นไม้เท่านั้น จากผลการทดลองนี้ สอดคล้องกับการใช้ประโยชน์ของน้ำส้มคว้นไม้ในภูมิปัญญาท้องถิ่น เกี่ยวกับการนำมาใช้ทาแผล หรือการคิดเชื่อที่ผิวหนัง นอกจากนี้ น้ำส้มคว้นไม้สามารถนำมาใช้ถนอมอาหารกับอาหารประเภทผลิตภัณฑ์เนื้อ เพื่อพัฒนาเป็นเนื้อรมคว้นไม้ ซึ่งมีงานวิจัยที่แสดงให้เห็นถึงการใช้ น้ำส้มสายชูที่ผสมสารลดแรงตึงผิว (Sodium dodecyl sulfate) และกรดเลวูลินิก (Levulinic acid) สามารถควบคุมเชื้อแบคทีเรีย และยีสต์อายุผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ได้ [14] ซึ่งรวมไปถึงการใช้กรดเพียงชนิดใดชนิดหนึ่ง เช่น กรดแล็กติก [15] กรดซิตริก [16] และกรดมาลิก [17] เป็นต้น

3.3 ฤทธิ์ของน้ำส้มคว้นไม้ต่อเซลล์แบคทีเรีย

E. coli ตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด

เนื่องจากโรคท้องเสียในลูกสุกร มีปัญหามาจากแบคทีเรียแกรมลบ โดยเฉพาะอย่างยิ่งเชื้อ *Escherichia coli* ดังนั้นจึงได้เลือกแบคทีเรีย *Escherichia coli* TISTR 073 มาตรวจสอบลักษณะเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนที่เวลา 0 12 24 และ 48 ชั่วโมง ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 2 พบว่าลักษณะโครงสร้างของเซลล์แบคทีเรียที่เลี้ยงในอาหารเหลวที่มีน้ำส้มคว้นไม้ที่มีความเข้มข้นระดับ MIC ลักษณะเซลล์มีการยืดยาวขึ้น เมื่อเวลาผ่านไป 24 และ 36 ชม. ผลการทดลองนี้ แสดงให้เห็นว่าเซลล์ไม่สามารถแบ่งเซลล์ เพิ่มจำนวนได้ จึงเกิดลักษณะเซลล์ยืดยาวอย่างที่ปรากฏในรูปที่ 2C และ 2D ผลของน้ำส้มคว้นไม้ที่เกิดขึ้นกับเซลล์แบคทีเรียคล้ายกับฤทธิ์ของกรดอินทรีย์กับเซลล์แบคทีเรียพบว่าไอออนของกรดจะมีผลต่อความคงตัวของเยื่อหุ้มเซลล์ โดยเฉพาะ โปรตีนที่แทรกอยู่ระหว่างเยื่อหุ้มเซลล์ที่ทำหน้าที่รักษาสมดุลกรด-เบสระหว่างภายในและภายนอกเซลล์ และเมื่อเซลล์เสียสมดุล

กรด-เบส ส่งผลให้สภาพภายในเซลล์มีความเป็นกรดสูง ทำให้โปรตีน และเอนไซม์ต่าง ๆ ภายในเซลล์เสียหาย เซลล์จึงเกิดความผิดปกติเกิดขึ้น [3] ซึ่งน้ำส้มคว้นไม้สะเดามีองค์ประกอบของกรดอินทรีย์สูงและสารกลุ่มฟีนอลิกสูง สอดคล้องกับองค์ประกอบหลักในน้ำส้มคว้นไม้จากไม้ลิ้นจี่และเปลือกออลันท์ [13], [17] ที่มีรายงานการศึกษาแสดงถึงผลยับยั้งแบคทีเรียในวงกว้าง (Broad spectrum)

3.4 ผลของน้ำส้มคว้นไม้ต่อประสิทธิภาพการเจริญเติบโตของลูกสุกร

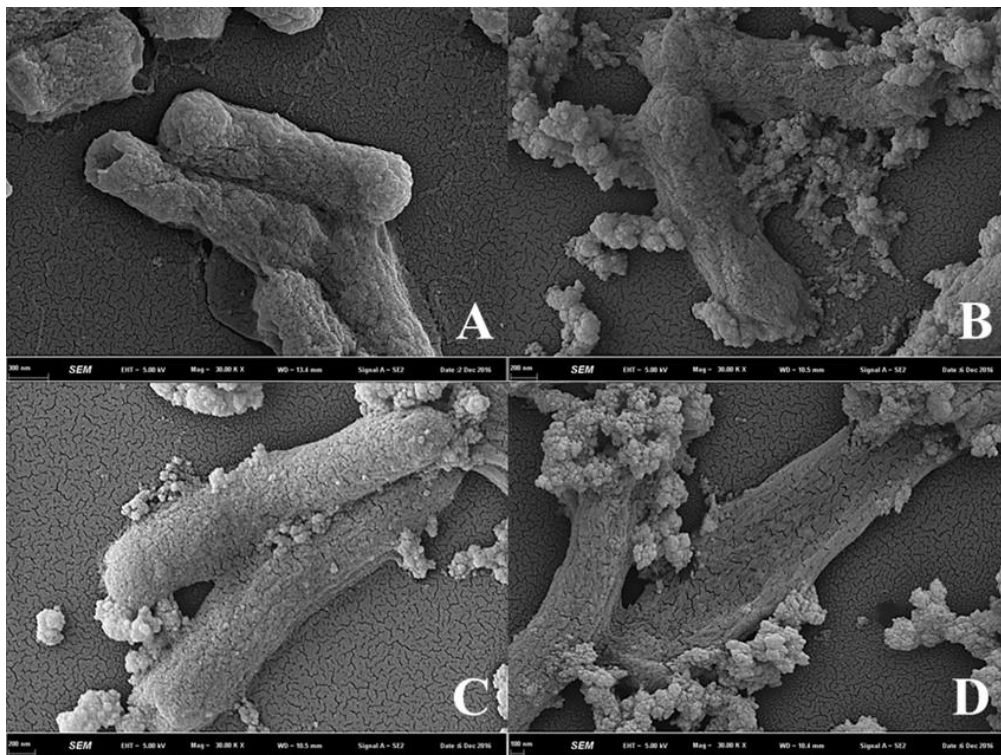
ผลของน้ำส้มคว้นไม้ต่อประสิทธิภาพการเจริญเติบโตของลูกสุกรในระยะเวลา 28 วัน ด้วยการให้น้ำส้มคว้นไม้แทนยาปฏิชีวนะ รวมไปถึงปริมาณแบคทีเรียในระบบทางเดินอาหาร ผลการทดลองพบว่าน้ำหนักลูกสุกรที่ให้น้ำส้มคว้นไม้แทนยาปฏิชีวนะ มีน้ำหนักเฉลี่ยเพิ่มขึ้น 13.13 ± 1.16 กิโลกรัม/ตัว และมีอัตราการแลกเนื้อเท่ากับ 1.17 ± 0.16 ในขณะที่น้ำหนักลูกสุกรที่ให้น้ำส้มคว้นไม้แทนยาปฏิชีวนะ มีน้ำหนักเฉลี่ยเพิ่มขึ้น 14.02 ± 2.10 กิโลกรัม/ตัว และมีอัตราการแลกเนื้อเท่ากับ 1.72 ± 0.24 อย่างไรก็ตาม น้ำหนักที่เพิ่มขึ้นและมีอัตราการแลกเนื้อของทั้งสองกลุ่มไม่ได้แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ รวมไปถึงไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับกลุ่มควบคุม โดยมีน้ำหนักเฉลี่ยเพิ่มขึ้น 14.35 ± 1.61 กิโลกรัม/ตัว และมีอัตราการแลกเนื้อเท่ากับ 1.75 ± 0.21 ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาวิจัยของน้ำส้มคว้นไม้จากไผ่ [18-19] ในลูกสุกรที่ให้อัตราการแลกเนื้อที่ไม่แตกต่างจากลูกสุกรที่ได้รับยาปฏิชีวนะ แต่มีแนวโน้มของอัตราการแลกเนื้อที่ลดลง ซึ่งแสดงถึงประสิทธิภาพการใช้อาหารที่ดีขึ้น และตลอดการทดลองไม่พบการถ่ายเหลวในลูกสุกรทุกกลุ่มการทดลอง

ตารางที่ 2 การประเมินฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของน้ำส้มควันไม้จากสะเดา

สายพันธุ์แบคทีเรีย	Inhibition Zone (mm)		MIC/MBC	
	น้ำส้มควันไม้ ¹	Enrofloxacin ²	น้ำส้มควันไม้ (% v/v)	Enrofloxacin (µg/ml)
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	7.45±0.05	28.32±0.88	3.12/6.25	0.12/0.25
MRSA NPRC 001R	7.22±0.06	11.63±0.29	3.12/6.25	4.00/10.00
<i>E. coli</i> ATCC29522	6.72±0.13	30.72±0.20	3.12/6.25	0.12/0.3

ตารางที่ 3 การประเมินฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของน้ำส้มควันไม้จากสะเดาต่อแบคทีเรียที่แยกได้จากสุกรท้องเสีย

สายพันธุ์แบคทีเรีย	MIC/MBC	
	น้ำส้มควันไม้ (%v/v)	Enrofloxacin (µg/ml)
<i>S. aureus</i> sar1	1.25/5.0	0.03/0.03
<i>S. aureus</i> sar 2	1.25/5.0	0.03/0.03
<i>S. aureus</i> sar 3	5/5	0.03/0.06
<i>E. coli</i> 1	2.5/2.5	0.015/0.03
<i>E. coli</i> 2	2.5/2.5	0.015/0.03
<i>Bacillus</i> spp. 1	2.5/5	0.06/0.06
<i>Bacillus</i> spp. 2	2.5/5	0.03/0.03
<i>Salmonella</i> typhi 1	2.5/5	0.03/0.06
<i>Salmonella</i> typhi 2	2.5/5	0.015/0.015
<i>Salmonella</i> typhi 3	2.5/5	0.015/0.015
<i>Salmonella</i> typhi 4	2.5/5	0.03/0.06
<i>Enterobacteria</i> spp.	2.5/5	0.015/0.015
<i>Salmonella</i> paratyphi	2.5/10	0.03/0.03
<i>Streptococcus</i> spp. A1	2.5/5	0.03/0.06
<i>Streptococcus</i> spp. A2	2.5/5	0.03/0.03
<i>Streptococcus</i> spp. B1	1.25/10	0.25/0.25
<i>Streptococcus</i> spp. B2	2.5/5	0.03/0.03
<i>Salmonella enteritidis</i> 3M	2.5/5	0.03/0.06



รูปที่ 2 ลักษณะเซลล์ *Escherichia coli* TISTR 073 ภายใต้สภาวะปกติ (A) และภายใต้สภาวะที่มีน้ำส้มควันไม้ที่ความเข้มข้นที่ระดับ MIC ที่เวลา 12 (B) 24 (C) 36 (D) ชม. (ภาพกำลังขยาย 30,000 เท่า)

3.5 ผลของน้ำส้มควันไม้ต่อค่าทางโลหิตวิทยาและค่าเคมีคลินิกในลูกสุกร

ผลการศึกษาพบว่าค่าความสมบูรณ์ของเม็ดเลือด ALT AST และ Creatinine ไม่มีความแตกต่างกันในลูกสุกรกลุ่มที่ให้น้ำส้มควันไม้และกลุ่มที่ให้อาปปฏิชีวนะ รวมไปถึงกลุ่มควบคุม ทั้งนี้ผลทางโลหิตวิทยาและค่าเคมีคลินิกในลูกสุกรทุกกลุ่มอยู่ในระดับที่เป็นมาตรฐานของค่าปกติ

3.6 ผลของน้ำส้มควันไม้ต่อลักษณะสัญญาณวิทยาของลำไส้

ผลของน้ำส้มควันไม้ต่อความสูงของวิลไล ความลึกของคริปต์และอัตราส่วนความสูงของวิลไลต่อความลึกของคริปต์ และภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน พบว่า ลูกสุกรที่ได้รับน้ำส้มควันไม้มีอัตราส่วนความสูงของวิลไลต่อความลึก

ของคริปต์ในลำไส้เล็กส่วนดูโอดินัมเท่ากับ 3.77 ± 0.06 ในขณะที่กลุ่มที่ให้อาปปฏิชีวนะมีค่าเท่ากับ 4.10 ± 0.06 มีผลไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับกลุ่มควบคุม (3.72 ± 0.02)

อัตราส่วนความสูงของวิลไลต่อความลึกของคริปต์ในลำไส้เล็กส่วนเจจูนัม และส่วนไโเลียมของลูกสุกรได้รับน้ำส้มควันไม้มีเท่ากับ 4.13 ± 0.07 และ 2.95 ± 0.16 ตามลำดับ ในขณะที่กลุ่มที่ให้อาปปฏิชีวนะมีค่า 4.24 ± 0.11 และ 3.26 ± 0.04 ตามลำดับ กลุ่มควบคุมที่ค่าเท่ากับ 3.80 ± 0.07 และ 2.39 ± 0.02 ตามลำดับ

อัตราส่วนความสูงของวิลไลต่อความลึกของคริปต์ในลำไส้ส่วนเจจูนัม และส่วนไโเลียมที่พบในลูกสุกรที่ได้รับน้ำส้มควันไม้มีค่าสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญแต่น้อยกว่ากลุ่มลูกสุกรที่

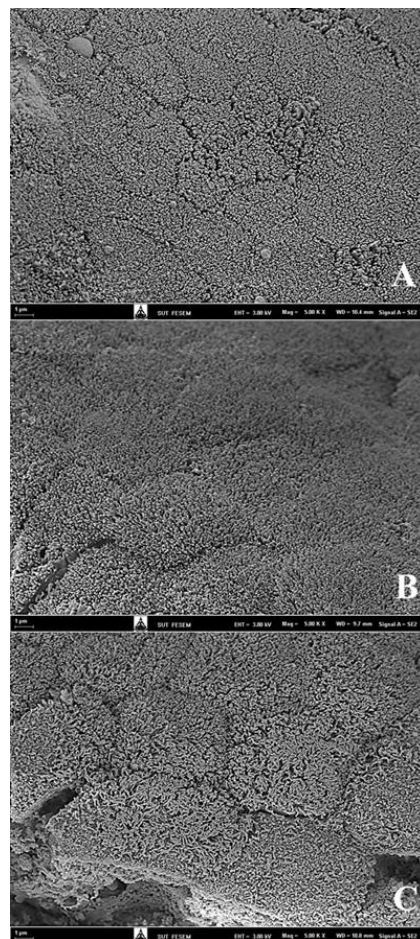
ให้ยาปฏิชีวนะ ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าการให้น้ำส้มคว้นไม้แก่ลูกสุกร ส่งผลให้รูปร่างลำไส้ของลูกสุกร มีอัตราส่วนความสูงของวิลโลสต่อความลึกของคริปต์ในลำไส้ส่วนเจริญ และส่วนไอเลียมเพิ่มขึ้น แสดงถึงแนวโน้มว่าวิลโลสมีการพัฒนาการที่ดีโดยปกติแล้วหากวิลโลสมีการพัฒนาการที่ดีย่อมส่งเสริมประสิทธิภาพการย่อยและการดูดซึมสารอาหารของลำไส้เล็กของสัตว์ได้ขึ้น [20] สอดคล้องกับรายงานการศึกษาน้ำส้มคว้นไม้จากต้นมังคุดที่เพิ่มประสิทธิภาพการย่อยสารอาหารในสุกรขุน [21]

ผลจากภาพกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนของลำไส้เล็กส่วนดูโอดินัมแสดงผลในรูปที่ 3 พบว่า ลักษณะของลำไส้เล็กของลูกสุกรที่ได้รับน้ำส้มคว้นไม้มีการพัฒนาของกลุ่มของไมโครวิลโลสยาวขึ้น (รูปที่ 3C) เช่นเดียวกับกลุ่มที่ให้ยาปฏิชีวนะที่เห็นลักษณะกลุ่มของไมโครวิลโลสที่ยาวขึ้นชัดเจน (รูปที่ 3B) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (รูปที่ 3A) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานในน้ำส้มคว้นไม้ไฟ ที่แสดงให้เห็นว่าน้ำส้มคว้นไม้จากไฟไม่มีผลต่อเชื้อบูฟิวลำไส้ของลูกสุกรด้วยการศึกษาระดับการแสดงออกของยีน Interleukin (IL)-10 IL-22 และ IL-25 หลังจากให้น้ำส้มคว้นไม้ผสมกับอาหารสัตว์ [3] รวมไปถึงการศึกษาน้ำส้มคว้นไม้จากต้นโอ๊ก (Oak) ต่อการซ่อมแซมเซลล์เซลล์เยื่อหูผนังซึ่งแสดงให้เห็นว่าน้ำส้มคว้นไม้สามารถลดการอักเสบ และส่งเสริมให้เกิดการสร้างเซลล์เยื่อหูผนังใหม่ได้ [22] ซึ่งสอดคล้องกับภูมิปัญญาท้องถิ่นที่นำน้ำส้มคว้นไม้มาทาแผลที่ผิวหนัง

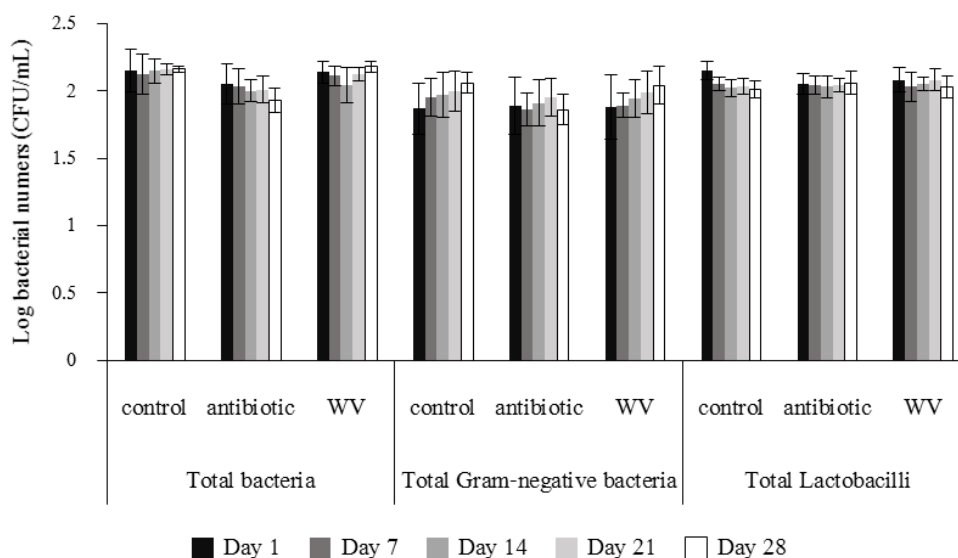
3.7 ผลของน้ำส้มคว้นไม้ต่อปริมาณแบคทีเรียในลำไส้

การศึกษาระดับปริมาณแบคทีเรียในลำไส้ของลูกสุกรหลังจากได้รับน้ำส้มคว้นไม้เป็นเวลา 28 วัน แสดงผลในรูปที่ 4 ผลการทดลองพบว่า ปริมาณ

แบคทีเรียทั้งหมดในลูกสุกรทั้ง 3 กลุ่มทดลองมีปริมาณไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญตั้งแต่วันที่ 1 จนถึงวันที่ 28 ของการทดลอง แต่กลุ่มที่ให้ยาปฏิชีวนะ ปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดมีแนวโน้มลดลงผลของน้ำส้มคว้นไม้ต่อปริมาณแบคทีเรียแกรมลบในลำไส้ลูกสุกรพบว่าทั้ง 3 กลุ่มทดลองมีปริมาณไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญเช่นกันแต่จำนวนแบคทีเรียแกรมลบมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นในกลุ่มลูกสุกรควบคุมและกลุ่มลูกสุกรที่ให้น้ำส้มคว้นไม้



รูปที่ 3 ลักษณะวิลโลสของลำไส้เล็กส่วนดูโอดินัมของลูกสุกร A คือ ลำไส้เล็กของลูกสุกรกลุ่มควบคุม B คือ ลำไส้เล็กของลูกสุกรกลุ่มที่ให้ยาปฏิชีวนะ และ C คือ ลำไส้เล็กของลูกสุกรกลุ่มที่ให้น้ำส้มคว้นไม้ (ภาพกำลังขยาย 3,000 เท่า)



รูปที่ 4 ผลของน้ำส้มควันไม้ (WV) ต่อปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด แกรมลบทั้งหมด และ *Lactobacillus* spp. ทั้งหมดในลำไส้ลูกสุกร หลังจากได้รับน้ำส้มควันไม้ที่วันที่ 1 7 14 21 และ 28 ของการทดลอง

สำหรับผลของน้ำส้มควันไม้ต่อปริมาณเชื้อ *Lactobacillus* sp. ในลำไส้ลูกสุกรทั้ง 3 กลุ่มพบว่าไม่มีการเปลี่ยนแปลงของปริมาณเชื้อ *Lactobacillus* sp. ในลำไส้ของลูกสุกรเช่นกัน

ในระยะเวลา 28 วัน ของการทดลองลูกสุกรที่ได้รับน้ำส้มควันไม้จากไม้สะเดามีปริมาณแบคทีเรียในลำไส้ในระดับเดียวกับ กลุ่มควบคุม และกลุ่มที่ให้ยาปฏิชีวนะ ความเข้มข้นยาในระดับการป้องกันและรักษาโรค [23] แสดงให้เห็นว่าความเข้มข้นของน้ำส้มควันไม้ที่ให้แก่ลูกสุกรไม่ส่งผลกระทบต่อปริมาณแบคทีเรียในลำไส้ ซึ่งสอดคล้องกับผลการวิจัยของน้ำส้มควันไม้ไผ่ [19] และสามารถป้องกันโรคติดเชื้อในลำไส้ของลูกสุกรได้ เพราะให้ผลการทดลองเช่นเดียวกับกลุ่มที่ให้ยาปฏิชีวนะ อย่างไรก็ตามในประเด็นของการป้องกันโรค และรักษาโรคยังต้องการการศึกษาต่อไปในอนาคต

4. สรุปผลการวิจัย

น้ำส้มควันไม้จากไม้สะเดาให้ฤทธิ์ยับยั้งและฆ่าเชื้อแบคทีเรียทั้งแกรมบวก และแกรมลบในระดับห้องปฏิบัติการ โดยมีค่า MIC เท่ากับ 3.12 % v/v และมีค่า MBC เท่ากับ 6.25 % v/v องค์ประกอบของสารเคมีในน้ำส้มควันไม้ส่วนใหญ่เป็น กรด และสารในกลุ่มฟีนอล นอกจากนี้ในการศึกษาในฟาร์มทดลอง ยังได้แสดงให้เห็นว่า น้ำส้มควันไม้จากไม้สะเดาให้ผลที่ดีต่อการเจริญของลูกสุกร โดยมีอัตราการแลกเนื้อ ลักษณะภายในลำไส้เล็ก และปริมาณแบคทีเรียภายในลำไส้ใกล้เคียงกับผลที่เกิดจากการใช้ยาปฏิชีวนะในการควบคุมโรค การศึกษานี้ได้แสดงผลการทดลองที่สามารถขยายผลไปสู่การลดการใช้ยาปฏิชีวนะในลูกสุกร และการควบคุมการเกิดการดื้อยาของเชื้อแบคทีเรียในฟาร์มสุกรด้วยการใช้น้ำส้มควันไม้เพื่อทดแทนการใช้ยาปฏิชีวนะต่อไปได้

5. กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณทุนสนับสนุนการวิจัยจาก กองทุนพัฒนานุเคราะห์ มหาวิทยาลัยราชภัฏ นครราชสีมาและขอขอบคุณคณาจารย์ทุกท่าน สำหรับความอนุเคราะห์เชื้อแบคทีเรียทดสอบในการวิจัยครั้งนี้

6. เอกสารอ้างอิง

- [1] Theappar, Y. , Chandumpai, A. , and Faroongsarng, D. (2018). Physicochemistry and Utilization of Wood Vinegar from Carbonization of Tropical Biomass Waste, In: Sudarshana P., Nageswara R. M., Soneji J. R. , editors. *Tropical Forests: New Edition*, Intech, London, 163-183.
- [2] Wei Q. , Ma X. , and Dong J. (2010) . Preparation, chemical constituents and antimicrobial activity of pyroligneous acids from walnut tree branches. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 87(1), 24-28.
- [3] Huo Y., Liu Z., Xuan H., Lu C., Yu L., Bao W., and Zhao, G. (2016). Effects of bamboo vinegar powder on growth performance and mRNA expression levels of interleukin- 10, interleukin- 22, and interleukin- 25 in immune organs of weaned piglets. *Animal Nutrition*, 2(2), 111-118.
- [4] Rodjan, P., Theappar, Y., Khongthong, S., and Jeenkeawpieam, J. (2018). Effects of mangosteen wood vinegar as a potential additive on nutrient digestibility in growing pigs. *Songklanakarin J. Sci. Technol*, 40(5), 1002-1008.
- [5] Mani-López E., García H. S., and López-Malo A. (2012) . Organic acids as antimicrobials to control *Salmonella* in meat and poultry products. *Food Research International*, 45(2), 713-721.
- [6] Harris K., Miller M. F., Loneragan G. H., and Brashears M. M. (2006). Validation of the use of organic acids and acidified sodium chlorite to reduce *Escherichia coli* O157 and *Salmonella Typhimurium* in beef trim and ground beef in a simulated processing environment. *Journal of Food Protection*, 69(8), 1802-1807.
- [7] Srivastava S., Kumar P. R., Mishra S. K. (2016) . Identification of Metabolites through GC/LC-MS Processed Data using Different Reference Libraries and Their Comparison. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Sciences*, 6(6), 363-368.
- [8] Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) . (2009) . Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically; approved standard-eight edition. CLSI documents M07- A8. *Clinical and Laboratory Standard Institute*, Wayne, Pa.
- [9] National Research Council. (1998) . Nutrition Requirement of Swine. 10th rev. ed. *National Academy Press*. Washington, DC.

- [10] Salanitro J. P., Blake I. G., and Muirhead P. A. (1977). Isolation and identification of fecal bacteria from adult swine. *Applied and Environmental Microbiology*, 33(1), 79-84.
- [11] Thu T. V., Loh T. C., Foo H. L., Yaakub H., and Bejo M. H. (2011). Effects of liquid metabolite combinations produced by *Lactobacillus plantarum* on growth performance, faeces characteristics, intestinal morphology and diarrhoea incidence in postweaning piglets. *Tropical Animal Health and Production*, 43(1), 69-75.
- [12] Theapparatt Y. , Chandumpai A. , Leelasuphakul W. , Laemsak N. , and Ponglimanont C. (2014). Physicochemical Characteristics of Wood Vinegars from Carbonization of *Leucaena leucocephala*, *Azadirachta indica*, *Eucalyptus camaldulensis*, *Hevea brasiliensis* and *Dendrocalamus asper*. *Kasetsart Journal. (Nat. Sci.)*, 48, 916-928.
- [13] Yang J.F., Yang C.H., Liang M.T., Gao Z.J., Wu Y. W. , and Chuang L. Y. (2016). Chemical Composition, Antioxidant, and Antibacterial Activity of Wood Vinegar from *Litchi chinensis*. *Molecules*, 21(9), 1150-1160.
- [14] Stelzleni A. M., Ponrajan A., and Harrison, M. A. (2013). Effects of buffered vinegar and sodium dodecyl sulfate plus levulinic acid on *Salmonella Typhimurium* survival, shelf- life, and sensory characteristics of ground beef patties. *Meat Science*, 95(1), 1-7.
- [15] Over K. F., Hettiarachchy N., Johnson M. G., and Davis B. (2009). Effect of organic acids and plant extracts on *Escherichia coli* O157: H7, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella Typhimurium* in broth culture model and chicken meat systems. *Journal of Food Science*, 74(9), 15-21.
- [16] Gadang V. P., Hettiarachchy N. S., Johnson M.G., and Owens C. (2008). Evaluation of antibacterial activity of whey protein isolate coating incorporated with nisin, grape seed extract, malic acid, and EDTA on a turkey frankfurter system. *Journal of Food Science*, 73(8), M389-M394.
- [17] Ma X., Wei Q., Zhang S., Shi L., and Zhao Z. (2011). Isolation and bioactivities of organic acids and phenols from walnut shell pyrolytic acid. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 91(2), 338-343.
- [18] Huo Y., Liu Z., Xuan H., Lu C., Yu L., Bao W., and Zhao, G. (2016). Effects of bamboo vinegar powder on growth performance and mRNA expression levels of interleukin-10, interleukin-22, and interleukin-25 in immune organs of weaned piglets. *Animal Nutrition*, 2(2), 111-118.
- [19] Wang H., Wang J. L., Wang C., Zhang W. M., Liu J. X., and Dai B. (2012). Effect of bamboo vinegar as an antibiotic alternative on growth performance and fecal bacterial

- communities of weaned piglets. *Livestock Science*, 144(1-2), 173-180.
- [20] Sekirov, I., Russell, S. L., Antunes, L. C. and Finlay, B. B. (2010). Gut microbiota in health and disease. *Physiol. Rev*, 90(3), 859-904.
- [21] Rodjan, P., Theapparatt, Y., Khongthong, S., and Jeenkeawpieam, J. (2018). Effects of mangosteen wood vinegar as a potential additive on nutrient digestibility in growing pigs. *Songklanakarin J. Sci. Technol.* 40(5), 1002-1008.
- [22] Lee C. S., Yi E. H., Kim H. R., Huh S. R., Sung S. H., Chung M. H., and Ye S. K. (2011). Anti-dermatitis effects of oak wood vinegar on the DNCB- induced contact hypersensitivity via STAT3 suppression. *Journal of Ethnopharmacology*, 135(3) , 747-753.
- [23] Nielsen P., and Gyrd-Hansen N. (1997). Bioavailability of enrofloxacin after oral administration to fed and fasted pigs. *Pharmacology & toxicology*, 80(5) , 246-250.