การคัดแยกแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและปริมาณธาตุอาหารหลักในวัสดุเลี้ยงด้วงมะพร้าว

The isolation of cellulase producing bacteria and macronutrient components in coconut weevil feed

พรชนก บุญลับ[1*], นภัสสร วงเปรียว[2] และ กิตติ ตันเมืองปัก[1]

Pornchanok Boonlub[1*], Napatsorn Wongpriaw[2] and Kitti Tanmuangpak[1]

Received: 12 August 2023 ; **Revised**: 19 September 2023 ; **Accepted**: 18 October 2023

บทคัดย่อ

การวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดแยกแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลส และศึกษาปริมาณธาตุอาหารสำคัญในวัสดุเลี้ยงด้วงมะพร้าว 5 ตัวอย่าง สามารถคัดแยกแบคทีเรียได้ 108 ไอโซเลท และพบว่าสามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ 22 ไอโซเลท โดยมีแบคทีเรียจำนวน 15 ไอโซเลท (ร้อยละ 13.89) ที่มีประสิทธิภาพในการสร้างเอนไซม์อยู่ในระดับสูง มีค่า HC value เท่ากับ 2.01-3.00 โดยไอโซเลท SA05 ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปท่อน มีประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์สูงที่สุดมีค่า HC value เท่ากับ 3.00 และเมื่อนำวัสดุเลี้ยงด้วงมะพร้าวไปศึกษาปริมาณธาตุอาหารหลัก ได้แก่ ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และโพแทสเซียม พบว่าตัวอย่าง SA มีปริมาณไนโตรเจนและโพแทสเซียมสูงที่สุด เท่ากับ 2.20 ± 0.00 mg/kg และ 30.59 ± 2.70 mg/kg ตามลำดับ ในขณะที่ตัวอย่าง SB มีปริมาณฟอสฟอรัสสูงที่สุด เท่ากับ 319.48 ± 0.00 mg/kg ผลจากการวิจัยนี้พบว่าวัสดุเหลือใช้จากการเลี้ยงด้วงมะพร้าวพบแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสที่ย่อยเซลลูโลส และเป็นแหล่งของธาตุอาหารหลักโดยเฉพาะอย่างยิ่งฟอสฟอรัสให้กับพืชได้ แต่อย่างไรก็ตามควรมีการศึกษาเพิ่มเติม เพื่อพัฒนาต่อยอดในการผลิตปุ๋ยอินทรีย์ด้วงมะพร้าวจากวัสดุเหลือใช้จากการเลี้ยงด้วงมะพร้าวต่อไป

คำสำคัญ: เซลลูเลส, แบคทีเรีย, ธาตุอาหารหลัก, ด้วงมะพร้าว

Abstract

The purpose of this research was to isolate cellulase producing bacteria and study the amount of Macronutrient components in 5 samples of coconut weevil feed. 22 of 108 bacterial isolates produced cellulase. Enzymatic production efficiency was high in 15 bacterial isolates (13.89%) with HC value of 2.01-3.00. The isolate SA05, a gram-positive, rod-shaped bacterium, produced the highest cellulase activity (HC value of 3.00). In addition, the macronutrient components nitrogen, phosphorus, and potassium in samples were measured. The highest amounts of nitrogen and potassium components were found in the SA sample, 2.20 ± 0.00 mg/kg and 30.59 ± 2.70 mg/kg, respectively while the highest phosphorus component in the SB sample was 319.48 ± 0.00 mg/kg. This study found that coconut weevil feed contained cellulase producing bacteria and could be a source of plant nutrients especially phosphorus. However, there should be further study in development of organic fertilizer production from waste materials from coconut beetle farming.

Keywords: Cellulase, bacteria, macronutrient, coconut weevil

---

[1] *สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเลย ต.เมือง อ.เมืองเลย จ.เลย 42000*

[2] *สาขาวิชาเคมีประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเลย ต.เมือง อ.เมืองเลย จ.เลย 42000*

[1] *Program of Biology, Faculty of Science and Technology, Loei Rajabhat University, Muang, Muang Loei district, Loei Province 42000*

[2] *Program of Applied Chemistry, Faculty of Science and Technology, Loei Rajabhat University, Muang, Muang Loei district, Loei Province 42000*

[*] *Corresponding author: E-mail: pornchanok.boo@lru.ac.th*

บทนำ

ปัจจุบันนี้การบริโภคแมลงชนิดต่าง ๆ เป็นที่นิยมเป็นอย่างมาก ด้วงงวงมะพร้าว (*Rhynchophorus ferrugineus* Olivier) หรือด้วงมะพร้าว ถือเป็นแมลงอีกชนิดหนึ่งที่กำลังเป็นที่นิยมสำหรับผู้บริโภค เนื่องจากผู้บริโภคทั่วไปเชื่อว่าด้วงมะพร้าวอุดมไปด้วยโปรตีนสูงใกล้เคียงกับโปรตีนจากเนื้อสัตว์ มีคุณค่าทางโภชนาการที่ดี สามารถบริโภคได้อย่างปลอดภัย อีกทั้งยังเป็นการช่วยลดปัญหาสิ่งแวดล้อมที่เกิดจากด้วงมะพร้าวอีกด้วย (สุภาภรณ์ และบุษกรณ์, 2565) กลุ่มวิสาหกิจชุมชนผู้เลี้ยงด้วง บ้านท่าสวรรค์ อ.นาด้วง จ.เลย เป็นเกษตรกรอีกกลุ่มหนึ่งที่สนใจเลี้ยงด้วงมะพร้าว เพื่อจำหน่ายเป็นรายได้ให้กับชุมชน จนสร้างรายได้ให้กับเกษตรกรได้เป็นอย่างดี ซึ่งในกระบวนการเพาะเลี้ยงด้วงมะพร้าว วัตถุดิบสำคัญในการเพาะเลี้ยงประกอบไปด้วยเปลือกมะพร้าว รำละเอียด มันสำปะหลังบด กากน้ำตาล เป็นต้น การเพาะเลี้ยงด้วงนั้นใช้เวลาค่อนข้างสั้นประมาณ 30-40 วัน จะได้ตัวอ่อนของด้วงหรือตัวหนอนและสามารถจำหน่ายได้ โดยในการเพาะเลี้ยงจะใส่วัสดุเพาะเลี้ยงลงไปในกะละมัง ซึ่งวัสดุที่ใช้จะเพียงพอต่อการเพาะเลี้ยงด้วงมะพร้าวจนได้เป็นตัวอ่อนและสามารถจำหน่ายได้ ในแต่ละกะละมังจะใส่ตัวเต็มวัยด้วงประมาณ 5 คู่ต่อกะละมัง ซึ่งสามารถเพาะเลี้ยงได้คราวละประมาณ 50-100 กะละมัง ด้วงจะผสมพันธุ์และได้เป็นตัวอ่อนออกมา ตัวอ่อนจะกินอาหารจากวัสดุเพาะและจะเจริญเป็นตัวหนอน ในขณะเดียวกันตัวอ่อนของด้วงมะพร้าวจะขับมูลออกมาในกะละมังเพาะเลี้ยง ซึ่งในระบบทางเดินอาหารของตัวอ่อนด้วงมะพร้าวมีรายงานว่าพบแบคทีเรียหลายชนิดในลำไส้ของตัวอ่อนด้วงมะพร้าว อีกทั้งยังพบแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสซึ่งสามารถย่อยเซลลูโลสที่เป็นองค์ประกอบของเปลือกมะพร้าว ได้แก่ *Serratia enterica*, *Enterococcus cloacae*, *Raoultella* sp., *Klebsiella pneumonia* และ *Citrobacter koseri* เป็นต้น (Muhammad *et al*., 2017) เมื่อเสร็จสิ้นกระบวนการเพาะเลี้ยงด้วงมะพร้าวของกลุ่มวิสาหกิจชุมชนผู้เลี้ยงด้วงในแต่ละรอบ จะมีวัสดุเหลือใช้เป็นจำนวนมากประมาณ 250-500 กิโลกรัม วัสดุเหล่านี้จะถูกนำไปกองทิ้งไว้นอกโรงเรือนเลี้ยงด้วงมะพร้าว กองทับถมกันไปเรื่อย ๆ เป็นระยะเวลากว่า 1 ปี ซึ่งผู้เลี้ยงด้วงมะพร้าว ได้มีการนำวัสดุเหลือใช้ดังกล่าวบางส่วนไปใช้เป็นวัสดุปลูกสำหรับพืชผักสวนครัว และพบว่าพืชผักสวนครัวเจริญเติบโตได้ดี แสดงให้เห็นว่ามีแร่ธาตุที่ช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตให้กับพืช อีกทั้งเปลือกมะพร้าวยังสามารถช่วยอุ้มน้ำ และดูดซับความชื้นได้ดีอีกด้วย จึงมีความเป็นไปได้ในการนำวัสดุเหลือใช้จากการเลี้ยงด้วงมะพร้าวดังกล่าวมาใช้ประโยชน์ นอกจากนี้ในปัจจุบันได้มีการนำมูลหรือวัสดุเหลือใช้จากการเพาะเลี้ยงจิ้งหรีด ซึ่งถือว่าเป็นแมลงเศรษฐกิจที่สำคัญอีกชนิดหนึ่งของประเทศไทยมาผลิตเป็นปุ๋ยเชิงพาณิชย์ เนื่องจากการเพาะเลี้ยงจิ้งหรีดจะทำให้ได้มูลจิ้งหรีดปริมาณหนึ่งในสามส่วนของอาหารที่กินเข้าไป อีกทั้งยังพบว่ามูลจิ้งหรีดมีธาตุอาหารหลัก ได้แก่ ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส โพแทสเซียม ในปริมาณที่สามารถช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตให้กับข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1 ได้อีกด้วย (ปรัชวนี พิบำรุง, 2565) ดังนั้นผู้วิจัยจึงสนใจที่จะคัดแยกแบคทีเรียที่สามารถสร้างเอนไซม์เซลลูเลสและศึกษาปริมาณธาตุอาหารหลักในวัสดุเลี้ยงด้วงมะพร้าว เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการพัฒนาวัสดุเลี้ยงด้วงมะพร้าว ต่อยอดเป็นปุ๋ยอินทรีย์ต่อไป

การทดลอง

1. ขอบเขตของการศึกษา

การศึกษาครั้งนี้ผู้วิจัยมุ่งเน้นการศึกษาแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและศึกษาปริมาณธาตุอาหารหลัก ได้แก่ ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และโพแทสเซียม จากวัสดุเพาะเลี้ยงด้วงมะพร้าว โดยศึกษาจากตัวอย่างวัสดุเพาะเลี้ยงด้วงมะพร้าวที่กลุ่มวิสาหกิจชุมชนกองทับถมกันเป็นระยะเวลาไม่ต่ำกว่า 1 ปี กระจายจุดเก็บตัวอย่างเป็น 5 จุด ลึกลงไปจากผิวกองวัสดุ 10 - 15 เซนติเมตร จุดละ 500 กรัม จำนวนทั้งสิ้น 5 ตัวอย่าง โดยจุดที่เก็บตัวอย่าง วัสดุมีลักษณะเปื่อยยุ่ย สีน้ำตาลเข้ม อุณหภูมิของจุดที่เก็บอยู่ในช่วง 38 - 40 องศาเซลเซียส และมีความชื้นเหมาะสม กำวัสดุแล้วยังคงเกาะติดกันเป็นก้อน เก็บตัวอย่างใส่ถุงซิปล็อคปลอดเชื้อ เก็บรักษาในกล่องโฟมบรรจุน้ำแข็งก่อนนำไปศึกษาในห้องปฏิบัติการ-

2. การคัดแยกแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากปุ๋ยมูลด้วงมะพร้าว

2.1 การเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างวัสดุเพาะเลี้ยงด้วงมะพร้าวที่เหลือใช้จากกระบวนการเพาะเลี้ยงด้วงมะพร้าว ของกลุ่มวิสาหกิจชุมชนผู้เลี้ยงด้วง บ้านท่าสวรรค์ อ.นาด้วง จ.เลย โดยวัสดุเพาะเลี้ยงด้วงมะพร้าวประกอบไปด้วยวัสดุหลักคือ เปลือกมะพร้าว โดยเปลือกมะพร้าวได้รับมาจากผู้ประกอบการไอศกรีมกะทิสดที่อยู่บริเวณใกล้ ๆ กับที่ทำการของกลุ่มวิสาหกิจชุมชนผู้เลี้ยงด้วง ซึ่งจะมีเปลือกมะพร้าวเหลือทิ้งจากการผลิตไอศกรีมเป็นจำนวนมาก จากนั้นเปลือกมะพร้าวจะถูกนำมาสับให้มีขนาดเล็ก เสริมด้วยสารอาหารจากโปรตีน และมันสำปะหลังบดอัตราส่วน 10:1:1 จากนั้นนำไปใส่ในกะละมังประมาณครึ่ง

กะละมัง ตัดกล้วยน้ำว้าสุกประมาณ 3-5 ลูกให้เป็นแว่น วางกระจายไว้บนผิวหน้าวัสดุเพาะเลี้ยง ซึ่งเมื่อผ่านกระบวนการเพาะเลี้ยงด้วงและเก็บผลผลิต จะเหลือวัสดุเพาะเลี้ยงที่เป็นเปลือกมะพร้าว โดยด้วงมะพร้าวจะกินเปลือกมะพร้าวและกล้วยน้ำว้าสุกเป็นอาหาร จากนั้นขับของเสียออกมาสะสมในวัสดุเพาะเลี้ยง โดยวัสดุเพาะเลี้ยงด้วงมะพร้าวหลังจากเสร็จสิ้นกระบวนการเพาะเลี้ยงในทุกรอบ จะถูกนำมากองทับถมไว้บริเวณนอกโรงเรือนที่ใช้เพาะเลี้ยงด้วงมะพร้าว เป็นระยะเวลาเกินกว่า 1 ปี มีลักษณะเป็นกองสูงประมาณ 1 เมตร ผู้วิจัยได้ทำการสุ่มเก็บตัวอย่างจากกองวัสดุเพาะเลี้ยง โดยทำการเก็บตัวอย่างลึกลงไปจากผิวกองวัสดุ 10-15 เซนติเมตร (ชนิดาภา ธนะศรีรางกูร และคณะ, 2561) เนื่องจากเป็นบริเวณที่มีระดับความลึกที่มีสามารถพบแบคทีเรียที่ยังมีชีวิตอยู่ได้ เก็บตัวอย่างจำนวนทั้งสิ้น 5 จุด ๆ ละ 1 ตัวอย่าง ๆ ละ 500 กรัม รวมจำนวน 5 ตัวอย่าง โดยกระจายทั้ง 5 จุดให้ครอบคลุมพื้นที่กองวัสดุเพาะเลี้ยง กำหนดให้ตัวอย่างที่เก็บจากจุดที่ 1, 2, 3, 4 และ 5 แทนด้วยสัญลักษณ์ SA, SB, SC, SD และ SE ตามลำดับจากนั้นนำมาตรวจสอบที่ห้องปฏิบัติการภายในระยะเวลา 24 ชั่วโมง

2.2 การคัดแยกแบคทีเรียจากวัสดุเพาะเลี้ยงด้วงมะพร้าว

ชั่งตัวอย่าง 25 กรัม ใส่ลงในถุงปลอดเชื้อที่มี 0.85% Normal saline 225 มิลลิลิตร ตีปั่นด้วยเครื่อง Stomacher ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เจือจางตัวอย่างด้วยวิธี Ten-fold serial dilution method นำตัวอย่างมาคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี Spread plate บนอาหาร Nutrient agar จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อเป็นการตรวจสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส สังเกตลักษณะโคโลนีที่เจริญบนอาหารแข็ง คัดแยกเชื้อตามสัณฐานวิทยา โดยพิจารณาจากลักษณะการเจริญเติบโต รูปร่างและสีที่แตกต่างกัน แยกเชื้อให้บริสุทธิ์ ศึกษาลักษณะใต้กล้องจุลทรรศน์ด้วย Gram staining ที่กำลังขยาย 1000 เท่า (โสภณ คงสำราญ และคณะ, 2524) นำไปเก็บรักษาไว้เป็น Stock culture

3. การทดสอบประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส

นำ Stock culture เชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้มาถ่ายเชื้อลงใน Nutrient broth (NB) นำไปบ่มด้วยเครื่อง Shaker incubator ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ปรับค่าความขุ่น (Optical Density: OD) ของเซลล์แบคทีเรีย ที่ความยาวคลื่น 625 นาโนเมตร ให้เท่ากับ 0.5 McFarland standard ปิเปตตัวอย่างเชื้อ 0.5 ไมโครลิตร ทำการ Drop plate ลงบน Carboxymethyl cellulose (CMC) agar บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นเททับด้วย Gram's iodine (Kasana *et al*., 2008) ให้ท่วมผิวหน้าอาหาร และโคโลนีเป็นเวลา 30 นาที แล้วเทออก ล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อและเททับอีกครั้งด้วย 1M NaCl เป็นเวลา 15 นาที Gram's iodine จะทำปฏิกิริยากับเซลลูโลส เกิดเป็นสีน้ำเงินเข้ม ส่วนบริเวณที่เกิดการย่อยสลายด้วยเอนไซม์จะเกิดเป็นวงใส ซึ่งสามารถสังเกตเห็นวงใสได้ชัดเจนกว่าการใช้ 1% hexadecyltrimethyl ammonium bromide หรือ 0.1% Congo red ซึ่งจะใช้เวลาในการอ่านผลนานกว่า (Kasana *et al*., 2008) จากนั้นวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี และวัดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณใส เพื่อนำไปหาประสิทธิภาพการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส (hydrolysis capacity; HC value) จากอัตราส่วนเส้นผ่านศูนย์กลางวงใสต่อเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี (ชนิดาภา ธนะศรีรางกูร และคณะ, 2561) โดยกำหนดให้ ระดับ 1 หมายถึง HC value มีค่าน้อยกว่า 1.00 ระดับ 2 หมายถึง HC value มีค่าอยู่ระหว่าง 1.01-2.00 ระดับ 3 หมายถึง HC value มีค่าอยู่ระหว่าง 2.01-3.00 และระดับ 4 หมายถึง มีค่า HC value มากกว่า 3.00 ทำการทดลอง 4 ซ้ำ

4. การวิเคราะห์ธาตุอาหารในวัสดุเพาะเลี้ยงด้วงมะพร้าว

ตรวจวิเคราะห์หาปริมาณความเข้มข้นของไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และโพแทสเซียมในตัวอย่างวัสดุเพาะเลี้ยงด้วงมะพร้าว โดยนำตัวอย่างมาทำการอบให้แห้งจนน้ำหนักคงที่ บดให้ละเอียด และนำไปวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดด้วยวิธี Keldahl method วิเคราะห์ปริมาณฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ ด้วยวิธี Bray II (Bray & Kurtz, 1945) และวิเคราะห์ปริมาณ โพแทสเซียมด้วยเครื่อง Atomic Absorption Spectrophotometer (Suwannarong, 2004) วัดปริมาณแร่ธาตุในแต่ละตัวอย่าง 5 ซ้ำ นำผลที่ได้จากการวิเคราะห์ไปคำนวณหาความเข้มข้นของธาตุอาหารโดยการเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน ฟอสฟอรัสและโพแทสเซียม

5. การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (Method Validation)

5.1 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง (linearity)

เตรียมสารละลายมาตรฐานของฟอสฟอรัส (P) และโพแทสเซียม (K) มาจำนวน 7 ความเข้มข้น แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง UV-Visible Spectrophotometer และเครื่องอะตอมมิกแอบซอร์พชัน สเปกโทรโฟโตมิเตอร์ จากนั้นนำผลการวิเคราะห์ที่ได้ไปสร้างกราฟมาตรฐานความสัมพันธ์

ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและค่าความเข้มข้น แล้วคำนวณหาค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (R^2) ซึ่งค่า R^2 จะต้องมีค่าไม่ต่ำกว่า 0.9950 (ICH, 2005)

5.2 การวิเคราะห์หาร้อยละการกลับคืน (percentage recovery)

การทดสอบความถูกต้องจะใช้วิธี Standard addition ทำการวิเคราะห์โดยการเติมสารละลายมาตรฐานลงในสารละลายตัวอย่าง (spiked sample) จากนั้นนำสารละลายผสมไปทำการวัดซ้ำจำนวน 5 ครั้ง แล้วคำนวณหาค่าร้อยละการกลับคืนซึ่งค่าร้อยละการกลับคืนที่ผ่านเกณฑ์ควรอยู่ในช่วง 80-115% (AOAC, 2002)

5.3 การวิเคราะห์ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารที่สามารถตรวจวัดได้ (LOD) และการวิเคราะห์ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารที่วิเคราะห์ที่สามารถตรวจหาปริมาณได้ (LOQ)

ใช้วิธีการคำนวณจากสัญญานของ sample blank ที่อ่านได้จากเครื่องมือวัด โดยทำการวิเคราะห์ sample blank 11 ซ้ำ จากนั้นคำนวณค่าความเข้มข้น จากความเข้มข้นเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของ sample blank โดยทั่วไป LOD มีค่าประมาณ 3 เท่า และ LOQ จะมีค่าเป็น 10 เท่าของส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของสารละลาย blank (ทิพวรรณ นิ่งน้อย, 2549)

5.4 การวิเคราะห์ค่าร้อยละส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD)

นำตัวอย่างมาทำการทดสอบซ้ำจำนวน 10 ซ้ำ แล้วคำนวณหาค่าเฉลี่ยความเข้มข้นของสารในตัวอย่างที่วิเคราะห์ได้ และหาค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของความเข้มข้นของสารในตัวอย่างที่วิเคราะห์ได้ นำผลที่ได้จากการคำนวณมาคำนวณหาค่าร้อยละส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) ซึ่งค่า %RSD ที่ได้ไม่ควรเกิน 11% (AOAC, 2002)

6. การวิเคราะห์ทางสถิติ

วิเคราห์ความแปรปรวนของข้อมูลโดยใช้ ANOVA วิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ย ด้วยวิธี Scheffe โดยใช้โปรแกรม SPSS และกำหนดความเชื่อมั่นทางสถิติที่ระดับ P-value ≤ 0.05

ผลการทดลองและอภิปรายผล

การคัดแยกแบคทีเรียจากวัสดุเพาะเลี้ยงด้วงมะพร้าว

การคัดแยกแบคทีเรียจากตัวอย่างวัสดุเพาะเลี้ยงด้วงมะพร้าว จำนวน 5 ตัวอย่าง พบว่าแบคทีเรียที่คัดแยกได้มีลักษณะโคโลนีที่หลากหลาย (Figure 1) ในด้านของ ขนาดโคโลนี ผิวโคโลนี ขอบโคโลนี และรงควัตถุที่สร้าง ทำให้สามารถคัดแยกแบคทีเรียได้ 108 ไอโซเลท โดยตัวอย่าง SA, SB, SC, SD และ SE สามารถคัดแยกแบคทีเรียได้ 23, 19, 19, 22 และ 25 ไอโซเลท ตามลำดับ แสดงให้เห็นถึงความหลากหลายของแบคทีเรียในวัสดุเหลือใช้จากการเลี้ยงด้วงมะพร้าว จำนวนไอโซเลทที่คัดแยกได้จากแต่ละจุดมีปริมาณใกล้เคียงกัน แต่มีจำนวนน้อย อาจเนื่องมาจากบริเวณที่ผู้เลี้ยงด้วงกองวัสดุเหลือใช้จากการเลี้ยงด้วงมะพร้าว เป็นบริเวณที่อยู่นอกโรงเรือนเลี้ยงด้วงมะพร้าวและได้รับแสงแดดตลอดทั้งวัน เพื่อใช้ความร้อนในการทำวัสดุให้แห้ง เนื่องจากเมื่อผ่านกระบวนการเลี้ยงด้วงมะพร้าว วัสดุจะถูกกัดกินโดยตัวเต็มวัยและตัวอ่อนของด้วงมะพร้าว รวมไปถึงขับของเสียออกมาสะสมในวัสดุเพาะเลี้ยง อีกทั้งความชื้นและวัตถุดิบที่ใส่เป็นส่วนผสมทำให้วัสดุเพาะเลี้ยงมีกลิ่นค่อนข้างรุนแรง จึงจำเป็นต้องนำวัสดุที่เหลือใช้จากการเลี้ยงด้วงมะพร้าวมากองตากแดดให้แห้งเพื่อเป็นการลดกลิ่น และเมื่อกองวัสดุทับถมกันเป็นเวลานานพบว่า เปลือกมะพร้าวที่เป็นวัตถุดิบหลักมีลักษณะเปื่อยยุ่ยเพิ่มขึ้น แสดงให้เห็นว่ามีการย่อยสลายเปลือกมะพร้าวเกิดขึ้น โดยแบคทีเรียที่มีส่วนช่วยในการย่อยสลายส่วนหนึ่งอาจมาจากของเสียที่ด้วงมะพร้าวขับออกมาเนื่องจากในลำไส้ของด้วงมะพร้าวมีจุลินทรีย์ประจำถิ่น (Microflora) หลายชนิด ได้แก่ แบคทีเรียกลุ่ม Enterobacteriaceae, *Leminorella grimontii*, *Erysipelothrix*, *Lactobacillus* และ *Leuconostoc* (Farah *et al*., 2018) และยังสามารถพบแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้หลายชนิด ได้แก่ *Serratia marcescens, Enterobacter cloacae*, *Raoultella* sp., *Klebsiella pneumonia*, *Klebsiella variicola*, *Klebsiella oxytoca* และ*Citrobacter koseri* (Muhammad *et al*., 2017) ซึ่งจุลินทรีย์เหล่านี้อาจเป็นส่วนสำคัญที่ช่วยทำให้เกิดการย่อยสลายในวัสดุเพาะเลี้ยงด้วงมะพร้าวเมื่อเกิดการทับถมกันเป็นเวลานาน ในสภาพที่อุณหภูมิและความชื้นที่เหมาะสม

Figure 1 Characteristics of isolated bacterial colonies on CMC Agar

การทดสอบประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อแบคทีเรีย

ผลการทดสอบประสิทธิภาพการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส พบแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ 22 ไอโซเลท (ร้อยละ 20.37) ซึ่งเมื่อคำนวณหาประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส (HC value) พบแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส อยู่ในระดับ 2 (** = 1.01-2.00) จำนวน 7 ไอโซเลท (ร้อยละ 6.48) และแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสอยู่ในระดับ 3 (*** = 2.01-3.00) มี 15 ไอโซเลท (ร้อยละ 13.89) ตามลำดับ ดังแสดงใน Table 1 อาจเนื่องมาจากเอนไซม์เซลลูเลส มีคุณสมบัติเป็น inducible enzyme สามารถถูกชักนำให้เกิดการสร้างเอนไซม์ได้ด้วยซับเสตรทที่เหมาะสม (Meenu *et al*., 2014) โดยซับเสตรท ของเอนไซม์เซลลูเลสคือเซลลูโลสที่เป็นส่วนประกอบสำคัญเปลือกมะพร้าวที่เป็นส่วนประกอบหลักในวัสดุเพาะเลี้ยงด้วงมะพร้าว จึงทำให้สามารถพบแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสที่มีประสิทธิภาพสูงได้ และจากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าเศษวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรเป็นแหล่งของแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ ดังเช่นงานวิจัยของ ชนิดาภา ธนะศรีรางกูร และคณะ (2561) ซึ่งพบแบคทีเรียสามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสในดินบริเวณรอบรากพืชและเศษวัสดุทางการเกษตร ได้แก่ ใบอ้อย ชานอ้อย ฟางข้าว และทะลายปาล์ม 79 ไอโซเลท และพบว่ามีแบคทีเรียที่มีค่า HC value ≥ 3 จำนวน 25 ไอโซเลท (ร้อยละ 25) ซึ่งโดยส่วนใหญ่แล้วหากมีค่า HC value สูง ประสิทธิภาพของเอนไซม์เซลลูเลสในการย่อยสลายซับเสตรทสูง แต่อย่างไรก็ตามประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของแบคทีเรียสามารถเปลี่ยนแปลงได้ตามสภาพแวดล้อม เช่น พีเอช อุณหภูมิ ความชื้น เป็นต้น (ปรีชา ยอดยิ่ง และคณะ, 2562) ดังนั้นการเจริญเติบโตของแบคทีเรียในสภาวะที่มีปริมาณซับเสตรท อุณหภูมิ ความชื้น และpH ที่เหมาะสม จะช่วยส่งเสริมให้แบคทีเรียสามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสที่มีประสิทธิภาพสูง ส่งผลทำให้เกิดการย่อยสลายเซลลูโลสที่เป็นส่วนประกอบสำคัญในเปลือกมะพร้าว ซึ่งเป็นวัสดุหลักในการเพาะเลี้ยงด้วงมะพร้าว ทำให้เกิดการย่อยสลายและปลดปล่อยแร่ธาตุในวัสดุเพาะเลี้ยงด้วงมะพร้าวได้อีกด้วย

Table 1 Cellulase enzyme production efficiency of isolated bacteria

Isolate no.	Gram staining	Shape	HC value	Assessment of the level of cellulase production
SA02	Gram positive	Rod	1.83	**
SA05	Gram Positive	Rod	3.00	***
SA07	Gram positive	Rod	2.17	***
SA13	Gram positive	Rod	2.00	**
SA21	Gram Negative	Rod	2.36	***
SA22	Gram Negative	Short rod	2.71	***
SB03	Gram Negative	Short rod	1.83	**
SB05	Gram positive	Rod	1.83	**
SB17	Gram positive	Rod	2.17	***
SB19	Gram positive	Rod	2.83	***
SC10	Gram Negative	Rod	2.17	***
SC17	Gram positive	Rod	1.67	**
SC21	Gram Negative	Rod	2.50	***

Table 1 Cellulase enzyme production efficiency of isolated bacteria (Contunue)

Isolate no.	Gram staining	Shape	HC value	Assessment of the level of cellulase production
SD01	Gram Negative	Rod	2.20	***
SD03	Gram Negative	Rod	1.13	**
SD07	Gram positive	Rod	2.29	***
SD13	Gram positive	Rod	2.42	***
SE01	Gram positive	Rod	1.67	**
SE03	Gram positive	Rod	2.07	***
SE04	Gram positive	Rod	2.60	***
SE17	Gram positive	Rod	2.14	***
SE23	Gram Negative	Rod	2.33	***

* represent HC value ‹ 1.00, ** HC value as 1.01 - 2.00 and *** HC value as 2.01 - 3.00

แบคทีเรียทั้ง 22 ไอโซเลท เมื่อตรวจสอบใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าเป็นแบคทีเรียแกรมบวกจำนวน 13 ไอโซเลท (ร้อยละ 59.09) รูปร่างท่อน และแบคทีเรียแกรมลบ 9 ไอโซเลท (ร้อยละ 40.91) รูปร่างท่อน และท่อนสั้น โดยการที่พบแบคทีเรียแกรมบวกมากกว่าแบคทีเรียแกรมลบอาจเนื่องมาจากโครงสร้างผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวกมีความหนามากกว่าแบคทีเรียแกรมลบ จึงทำให้สามารถทนทานต่อสภาพแวดล้อมได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมลบ และจากผลการทดลองพบแบคทีเรียที่มีค่า HC value สูงที่สุด 3 อันดับแรก ได้แก่ แบคทีเรียไอโซเลท SA05 และ SB19 ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างท่อน ส่วน SA22 เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างท่อน (Figure 2) โดยแบคทีเรียที่พบในธรรมชาติมีโอกาสที่จะพบแบคทีเรียรูปร่างท่อนได้มากกว่าพวกรูปร่างท่อนสั้น เนื่องจากแบคทีเรียที่มีรูปร่างท่อนจะมีพื้นที่ผิวต่อปริมาตรมากกว่ารูปร่างกลม ทำให้สามารถแลกเปลี่ยนสารอาหารกับสภาพแวดล้อมได้ดีกว่ารูปร่างกลม จึงอาจเป็นสาเหตุทำให้พบแบคทีเรียรูปร่างท่อนและท่อนสั้นในตัวอย่างวัสดุเพาะเลี้ยงด้วงมะพร้าวได้ และหากเป็นพวกแบคทีเรียรูปร่างท่อนและสร้างเอนโดสปอร์ได้ จะยิ่งช่วยส่งเสริมให้สามารถทนต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม และสามารถอยู่รอดได้ดีอีกด้วย เช่นแบคทีเรียสกุล *Bacillus* เป็นต้น

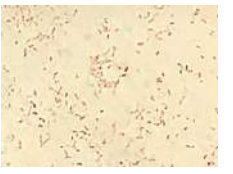
Isolate no.	morphology	Cellulase production
SA05		
SB19		
SA22		

Figure 2 Bacterial morphology under a 1000x magnification microscope and cellulase production of SA05 SB19 และ SA22

แบคทีเรียที่มีรายงานว่าพบในซากวัสดุเหลือใช้การเกษตรที่มีเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบ และมีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสสูง มีอยู่ด้วยกันหลายชนิด โดยสามารถพบได้ทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแบคทีเรียแกรมลบ ได้แก่ *Bacillus subtilis* (G+) (Deka *et al*., 2011) *Alcaligenes* sp. (G-) (ปรีชา ยอดยิ่ง และคณะ, 2562) *Enterococcus* sp. (G-) (ชนิดาภา ธนะศรีรางกูร และคณะ, 2561) *Thermobifida fusca* (G+) *Ruminococcus albus* (G+) *Thermobispora*

bispara (G+) *Erwinia chrysanthemi* (G-) *Clostridium* spp. (G+) *Cellulomonas* spp. (G+) *Acetivibrio cellulolyticus* (G+) (Sadhu *et al*., 2013) ซึ่งประสิทธิภาพของเอนไซม์เซลลูเลสจะแตกต่างกันไปตามชนิดของแบคทีเรีย นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าเชื้อราที่คัดแยกได้จากซากปาล์มน้ำมัน มีประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสสูงเช่นเดียวกัน ซึ่งได้แก่ *Aspergillus flavus*, *A. niger*, *Penicillum funiculosum P. janthinellum*, *A. tubingenis*, *Trichoderma harzianum* และ *T. inhamatum* (พิมพ์ชนา วงศ์พิศาล และคณะ, 2559) ซึ่งจุลินทรีย์เหล่านี้สามารถนำไปใช้ในกระบวนการย่อยสลายเศษวัสดุทางการเกษตรหรือใช้ในการเร่งการย่อยสลายเศษซากพืชในปุ๋ยหมักได้อีกด้วย

การวิเคราะห์ปริมาณธาตุอาหารในตัวอย่างวัสดุเพาะเลี้ยงด้วงมะพร้าว

จากผลการวิเคราะห์ปริมาณธาตุไนโตรเจนทั้งหมด ฟอสฟอรัส และโพแทสเซียมที่เป็นประโยชน์ในตัวอย่างจากทั้ง 5 จุด พบว่าค่าเฉลี่ยปริมาณธาตุอาหารทั้ง 3 ชนิดมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ P≤0.05 ซึ่งความแตกต่างของปริมาณธาตุอาหารอาจเนื่องมาจาก ตัวอย่างจากทั้ง 5 จุด เกิดจากแบคทีเรียในวัสดุเพาะเลี้ยง ซึ่งแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสออกมาย่อยสลายวัสดุ ส่วนหนึ่งมาจากมูลของตัวอ่อนของด้วงมะพร้าว และอีกส่วนอาจปะปนมากับวัตถุดิบที่ใช้ผสมรวมกันเป็นวัสดุเพาะเลี้ยง ซึ่งในแต่ละรอบของการเพาะเลี้ยงด้วงมะพร้าว แบคทีเรียดังกล่าวอาจมีความหลากหลายทั้งในด้านของจำนวน ชนิดและประสิทธิภาพของเอนไซมเซลลูเลสที่แบคทีเรียผลิต อีกทั้งปัจจัยสิ่งแวดล้อมที่อาจส่งผลกระทบ ได้แก่ ความร้อนจากแสงอาทิตย์ ซึ่งในแต่ละจุดเก็บตัวอย่างจะได้รับปริมาณความร้อนที่แตกต่างกันในแต่ละช่วงเวลาระหว่างวัน ส่งผลถึงความชื้นในกองวัสดุ ซึ่งทั้งความร้อนและความชื้น เป็นปัจจัยที่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรียทั้งสิ้น

จากการวิเคราะห์ปริมาณธาตุอาหารหลัก พบว่าปริมาณธาตุอาหารหลักที่พบสูงที่สุดคือ ฟอสฟอรัส รองลงมาคือ โพแทสเซียม และไนโตรเจน ตามลำดับ โดยตัวอย่างจุด SB มีปริมาณฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์สูงที่สุดเท่ากับ 319.48 ± 0.00^{c} mg/kg ดังแสดงใน Table 2 การที่พบปริมาณฟอสฟอรัสสูงกว่าธาตุอาหารหลักชนิดอื่น อาจเนื่องมาจากฟอสฟอรัสเป็นส่วนประกอบของกรดนิวคลิอิก เอนไซม์ โคเอนไซม์ นิวคลีโอไทด์ และฟอสโฟลิปิดที่สามารถพบได้ในพืช ซึ่งวัสดุที่เป็นส่วนประกอบหลักของวัสดุเพาะเลี้ยงด้วงมะพร้าว คือ เปลือกมะพร้าว ซึ่งเมื่อถูกย่อยสลายโดยเอนไซม์ที่สร้างจากแบคทีเรียจะทำให้เกิดการปลดปล่อยฟอสฟอรัสสู่วัสดุเพาะเลี้ยงด้วงมะพร้าวได้สูงกว่าธาตุอาหารหลักชนิดอื่น โดยปริมาณฟอสฟอรัสที่เพียงพอต่อการเจริญเติบโตของพืชทั่วไปอยู่ในช่วง 25-40 mg/kg (สำนักวิทยาศาสตร์เพื่อการพัฒนาที่ดิน, 2547) ซึ่งปริมาณฟอสฟอรัสที่พบในตัวอย่างวัสดุเพาะเลี้ยงด้วงมะพร้าวอยู่ในระดับที่สูงมาก จึงเหมาะที่จะใช้เป็นแหล่งเสริมฟอสฟอรัสให้กับพืช เนื่องจากฟอสฟอรัสเป็นธาตุอาหารที่ช่วยเร่งการเจริญเติบโตของราก และช่วยเพิ่มความต้านทานต่อโรคพืชได้ อีกทั้งยังช่วยส่งเสริมการออกดอกและผล การติดเมล็ด การพัฒนาเมล็ดและผล และมีส่วนช่วยในการเร่งการสุกแก่ของผลให้เร็วขึ้น (กรมพัฒนาที่ดิน, 2553)

ตัวอย่างจุด SA มีปริมาณโพแทสเซียมที่เป็นประโยชน์ และไนโตรเจนทั้งหมดสูงที่สุด เท่ากับ 30.59 ± 2.70^{c} mg/kg และ 2.20 ± 0.00^{c} mg/kg ตามลำดับ แต่เมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณที่พืชต้องการแล้วยังถือว่าอยู่ในระดับต่ำมาก (สำนักวิทยาศาสตร์เพื่อการพัฒนาที่ดิน, 2547) ซึ่งโพแทสเซียมที่สามารถพบในธรรมชาติ ส่วนใหญ่เกิดจากการย่อยสลายของหินและแร่ เกิดการปลดปล่อยโพแทสเซียมที่อยู่ในรูปของไอออนที่สามารถดึงดูดยึดไว้ที่พื้นผิวของดิน โดยเฉพาะอย่างยิ่งดินเหนียว ซึ่งในวัสดุเพาะเลี้ยงด้วงมะพร้าวมีเพียงแค่ เปลือกมะพร้าว รำละเอียด มันสำปะหลังบด และกากน้ำตาล จึงอาจเป็นสาเหตุที่ทำให้พบโพแทสเซียมปริมาณต่ำเช่นเดียวกัน ส่วนธาตุไนโตรเจนที่สามารถพบได้ในธรรมชาติจะอยู่ในรูปของก๊าซ พืชจะสามารถนำมาใช้ได้เมื่อไนโตรเจนถูกตรึงด้วยแบคทีเรียบางชนิดที่พบในรากพืชตะกูลถั่ว หรือพบในดิน จึงอาจเป็นสาเหตุที่ทำให้พบไนโตรเจนในวัสดุเหลือทิ้งจากการเพาะเลี้ยงด้วงในปริมาณต่ำ

Table 2 Nitrogen, Phosphorus and Potassium contents in Coconut weevil feeding material

Sample	Macronutrient contents in sample (n=5)		
	Nitrogen (mg/kg)	Phosphorus (mg/kg)	Potassium (mg/kg)
SA	2.20 ± 0.00^{c}	309.78 ± 0.70^{b}	30.59 ± 2.70^{c}
SB	1.85 ± 0.00^{b}	319.48 ± 0.00^{c}	22.94 ± 5.41^{a}
SC	1.85 ± 0.00^{b}	316.23 ± 0.70^{c}	26.00 ± 1.71^{b}
SD	0.28 ± 0.00^{a}	308.52 ± 0.87^{b}	22.94 ± 2.70^{a}
SE	0.59 ± 0.00^{a}	299.49 ± 0.53^{a}	25.23 ± 2.09^{b}

Remark; $^{a, b, c}$ Different letters indicates a difference statistically significant at p≤0.05 (a, b, c show the experimental values in order from least to most)

การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (method validation)

จากการศึกษาการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ปริมาณฟอสฟอรัสและโพแทสเซียม พบว่ามีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ $R^2 \geq 0.995$ ซึ่งผ่านเกณฑ์การทดสอบโดย ICH (2005) กำหนดไว้ส่วนค่าร้อยละการกลับคืน (% Recovery) ของการวิเคราะห์ปริมาณ ฟอสฟอรัส และโพแทสเซียมจากการทดลองในการศึกษานี้จะใช้วิธี Standard addition พบว่ามีค่าร้อยละการกลับคืนของการวิเคราะห์อยู่ที่ 97.87 และ 89.07 ตามลำดับ ดังนั้นผลการวิเคราะห์จึงผ่านเกณฑ์โดย AOAC (2002) กำหนดให้ค่าร้อยละการกลับคืนควรมีค่าอยู่ระหว่าง 80.00-115.00 % ผลการวิเคราะห์ ค่า LOD และ LOQ ของฟอสฟอรัสและโพแทสเซียม พบว่า LOD ที่ทำโดยวิธีการคำนวณจากสัญญานของ sample blank ที่อ่านได้จากเครื่องมือวัด โดยทำการวิเคราะห์ sample blank 11 ซ้ำ โดยที่ระดับความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์ได้ คือ ที่ระดับ 0.0049 และ 0.0004 ppm และผลการทดสอบ LOQ โดยวิธีการคำนวณจากสัญญานของ sample blank จากการคำนวณพบค่า LOQ ที่ระดับ 0.0613 และ 0.0043 ppm จากผลวิเคราะห์พบว่ามีค่า %RSD ของตัวอย่างในการวิเคราะห์อยู่ในเกณฑ์มาตรฐาน (Table 3) แสดงให้เห็นว่าผลการวิเคราะห์ที่ได้น่าเชื่อถือและยอมรับได้

Table 3 % Recovery, data analysis and analytical performance determination

Macronutrients	R^2	% Recovery	LOD	LOQ	% R.S.D
Phosphorus	0.9984	97.87	0.0049	0.0163	0.37
Potassium	0.9996	89.07	0.0004	0.0043	6.21

สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาวัสดุเหลือใช้จากการเลี้ยงด้วงมะพร้าว พบว่าสามารถคัดแยกแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ ซึ่งเอนไซม์นี้จะย่อยสลายเซลลูโลสในเปลือกมะพร้าวที่เป็นวัสดุเพาะเลี้ยง จะทำให้เกิดการปลดปล่อยธาตุอาหาร โดยแบคทีเรียที่คัดแยกได้มีระดับในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสในระดับสูง คิดเป็นร้อยละ 13.89 ดังนั้นแบคทีเรียเหล่านี้สามารถนำไปต่อยอดเป็นหัวเชื้อในการหมักปุ๋ยอินทรีย์ต่อไปได้ และจากการตรวจสอบปริมาณธาตุอาหารหลักในวัสดุเหลือใช้จากการเพาะเลี้ยงด้วงมะพร้าว พบว่ามีธาตุอาหารหลัก ได้แก่ ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และโพแทสเซียม ซึ่งพบว่ามีปริมาณฟอสฟอรัสอยู่ในระดับสูง จึงสามารถนำไปใช้ในการเสริมแร่ธาตุให้กับดินที่มีฟอสฟอรัสต่ำ เพื่อช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตให้กับพืชได้ แต่อย่างไรก็ตามปริมาณฟอสฟอรัสที่พบในวัสดุเพาะเลี้ยงด้วงมะพร้าวนั้นมีปริมาณที่เหมาะสำหรับใช้พัฒนาเป็นวัสดุปรับปรุงดินและหากต้องการต่อยอดผลิตภัณฑ์ ควรมีการเสริมปริมาณไนโตรเจนและโพแทสเซียมเพื่อต่อยอดเป็นผลิตภัณฑ์ดินผสมพร้อมปลูก เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีคุณภาพต่อไป

ข้อเสนอแนะ

1. ควรศึกษากิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสของแบคทีเรียในสภาวะต่าง ๆ เพื่อให้ทราบสภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการย่อยสลายเซลลูโลสในพืช

2. ควรระบุชนิดของแบคทีเรีย พร้อมตรวจสอบความไม่เป็นพิษในคน สัตว์ และพืช เพื่อนำไปต่อยอดผลิตเป็นหัวเชื้อ สำหรับใช้เป็นเชื้อตั้งต้นในกระบวนการหมักปุ๋ยอินทรีย์ได้

3. หากต้องการนำวัสดุเหลือใช้จากการเพาะเลี้ยงด้วงมะพร้าวไปต่อยอดสร้างเป็นผลิตภัณฑ์ทางการเกษตร ควรมีการเสริมปริมาณธาตุฟอสฟอรัส ไนโตรเจนและโพแทสเซียมให้กับวัสดุเพาะเลี้ยง เพื่อการใช้ประโยชน์ พัฒนาต่อยอดไปเป็นผลิตภัณฑ์ปุ๋ยอินทรีย์ที่ได้มาตรฐานต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเลย ที่ได้อนุเคราะห์สถานที่ วัสดุ อุปกรณ์ในการทำวิจัย และทุนอุดหนุนวิจัยมหาวิทยาลัยราชภัฏเลย และขอขอบคุณกลุ่มวิสาหกิจชุมชนผู้เลี้ยงด้วงมะพร้าว ต.ท่าสวรรค์ อ.นาด้วง จ.เลย ที่ให้ความอนุเคราะห์ตัวอย่างวัสดุเพาะเลี้ยงด้วงมะพร้าวในการดำเนินงานวิจัย จนทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

กรมพัฒนาที่ดิน. (2553). *ธาตุอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของพืช*. http://oss101.ldd. go.th/web_soils_for_youth/s_prop_nutri02.htm

ชนิดาภา ธนะศรีรางกูร, เพชรดา ปินใจ, และพิลานี ไวถนอมสัตย์ (2561). การคัดเลือกแบคทีเรียผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและประสิทธิภาพในการย่อยสลายวัสดุลิกโนเซลลูโลส. *วารสารเกษตรพระจอมเกล้า*, *36*(3), 1-12.

ทิพวรรณ นิ่งน้อย. (2549). *แนวปฏิบัติการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ทางเคมีโดยห้องปฏิบัติการเดียว* (พิมพ์ครั้งที่ 1). กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์.

นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และปรีชา สุวรรณพินิจ. (2541). *จุลชีววิทยาทั่วไป.* (พิมพ์ครั้งที่ 3). สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ปรัชวนี พิบำรุง (2565). ผลการใช้ปุ๋ยหมักมูลจิ้งหรีดและมูลหนอนนกอัดเม็ดต่อสมบัติดินและผลผลิตข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1. *วารสารวิจัยและส่งเสริมวิชาการเกษตร*, *39*(1), 52-64.

ปรีชา ยอดยิ่ง, ศิริณา ทองดอนน้อย, และสิรินภา ช่วงโอกาส (2562). การคัดแยกแบคทีเรียย่อยสลายเซลลูโลสและประสิทธิภาพของการย่อยสลายซังข้าวโพดและผักตบชวาที่ใช้เป็นซับสเตรต. *แก่นเกษตร*, *47*(1), 177-186.

พิมพ์ชนา วงศ์พิศาล, พรศิลป์ สีเผือก, ชัยสิทธิ์ ปรีชา และวุฒิชัย สีเผือก. (2559). การคัดเลือกเชื้อราที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและไซแลนเนสจากซากปาล์มน้ำมัน (Elaeis guineensis Jac.). *แก่นเกษตร*, *44*(1), 948-952.

วัลลีย์ อมรพล, พินิจ กัลยาศิลปิน, ศุภกาญจน์ ล้วนมณี, ศรีสุดา ทิพยรักษ์, และกอบเกียรติ ไพศาลเจริญ. (2555). การจัดการธาตุอาหารพืชที่เหมาะสมเพื่อการผลิตอ้อยในดินทรายภาคตะวันออก. *แก่นเกษตร*, *40*(3), 141-148.

โสภณ คงสำราญ, อรอนงค์ พริ้งศุลกะ, และนงลักษณ์ สุวรรณพินิจ. (2524). *แบคทีเรียทางการแพทย์* (พิมพ์ครั้งที่ 1). โรงพิมพ์พิฆเณศ.

สำนักวิทยาศาสตร์เพื่อการพัฒนาที่ดิน. (2547). *คู่มือการวิเคราะห์ตัวอย่างดิน น้ำ ปุ๋ย พืช วัสดุปรับปรุงดินและการวิเคราะห์ เพื่อตรวจรับรองมาตรฐานสินค้า* (พิมพ์ครั้งที่ 1). ดับบลิว.เจ พร็อพเพอตี้ จำกัด.

AOAC. (2002). *AOAC guidelines for single laboratory validation of chemical methods for dietary supplements and botanicals*. Official Analytical Chemists, Arlington.

Bray, R.H., & Kurtz, L.T. (1945). Determination of total organic and available forms of phosphorus in soils. *Soil Science*, *59*(1), 39-45.

Deka, D., Bhargav, P., Sharma, A., Goyal, D., Jawed, M., & Goyal, A. (2011). Enhancement of cellulase activity from a new strain of Bacillus subtilis by medium optimization and analysis with various cellulosic substrates. *Enzyme Research*, 2011, 1-8.

Farah N., R., Shafinaz, M. N., & Wahida, O. (2018). Preliminary study of gut bacterial abundance in Rhynchophorus ferrugineus (Coleoptera: Dryophthoridae) fed on different diets. *Serangga*, *23*(1), 126-138.

ICH. (2005). *Harmonized tripartite guideline validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1)*. https://database.ich.org/sites/ default/files/Q2%28R1%29%20Guideline.pdf

Kasana, R.C., Salwan, R., Dhar, H., Dutt, S., & Gulati, A. (2008). A rapid and easy method for the detection of microbial cellulases on agar plates using gram's iodine. *Current Microbiology*, *57*(5), 503-507.

Meenu, K., Singh, G., & Vishwakarma, R.A. (2014). Chapter 12: Molecular mechanism of cellulase production systems in Trichoderma. In Vijai K. Gupta V.K., Schmoll, M., Herrera-Estrella, A., Upadhyay, R.S., Druzhinina, I., and Tuohy M. (Eds.), *Biotechnology and Biology of Trichoderma* (pp. 319-324). Elsevier.

Muhammad, A., Fang, Y., Hou, Y., & Shi, Z. (2017). The gut entomotype of red palm weevil Rhynchophorus ferrugineus Olivier (Coleoptera: Dryophthoridae) and their effect on host nutrition metabolism. *Frontiers in Microbiology*, *8*, 1-15.

Sadhu, S., & Maiti, T. K. (2013). Cellulase production by bacteria: A review. *Microbiology Research Journal International*, *3*(3), 235-258.

Sakka, K., Kimura, T., Karita, S., & Ohmiya, K. (2000). Molecular breeding of cellulolytic microbes, plants, and animals for biomass utilization. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 90, 227-233.

Suwannarong, S. (2004). *Analysis of plant nutrient* (2nd ed.). Kasetsart University.