บทที่ 5
อภิปราย และสรุปผลการวิจัย

1 การสำรวจ รวบรวมตัวอย่างเห็ดป่าในเขตอุทยานแห่งชาติภูหินร่องกล้า

จากการสำรวจ และรวบรวมตัวอย่างเห็ดป่าในเขตอุทยานแห่งชาติภูหินร่องกล้าทั้ง 3 ช่วงฤดู คือ ฤดูฝน ฤดูร้อน และฤดูหนาว แล้วทำการบันทึกภาพด้วยกล้องถ่ายรูป บันทึกข้อมูลลักษณะทางสัณฐานวิทยาต่าง ๆ ทั้งลักษณะที่มองเห็นได้ด้วยตาเปล่า และลักษณะที่เห็นภายใต้กล้องจุลทรรศน์ สภาพถิ่นกำเนิด ของตัวอย่างเห็ดป่า สำรวจตัวอย่างเห็ดทั้งหมดได้ 69 ตัวอย่าง จำนวนตัวอย่างของเห็ดป่าที่เจริญในแต่ละฤดูมีจำนวนแตกต่างกัน กล่าวคือพบเห็ดป่าในช่วงฤดูฝน ประมาณเดือนกรกฎาคม-ตุลาคม จำนวน 46 ชนิด (66.66%) ส่วนใหญ่เจริญบนดิน ฤดูหนาวช่วงเดือนพฤศจิกายน-กุมภาพันธ์ จำนวน 23 ชนิด (33.33%) ส่วนใหญ่เจริญบนกิ่งไม้ และในฤดูร้อนช่วงเดือนมีนาคม-มิถุนายน พบการเจริญของเห็ดป่าจำนวนน้อยที่สุดเพียง 9 ชนิด(13.04%)เท่านั้น ส่วนใหญ่เจริญบนกิ่งไม้ที่ตายแล้ว จากการสำรวจตัวอย่างเห็ดยังพบว่า ตัวอย่างเห็ดบางชนิดพบได้ทั้งฤดูฝนและฤดูหนาว เช่น *Gandoderma lucidum* และ *Microporus xanthopus* เป็นต้น การเจริญของเห็ดราในกลุ่มเห็ดครีบ (agarics) มักจะเจริญได้ดีในสภาวะที่มีความชื้นสูง อุณหภูมิปานกลาง(อนงค์ และคณะ .2529) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยนี้ที่พบเห็ดครีบมากในฟดูฝน และมักจะเป็นพวกที่เน่าสลายได้ง่ายที่สุด

2 การศึกษาการจัดจำแนกชนิดเห็ดป่า

การศึกษาการจัดจำแนกชนิดเห็ดป่าโดยศึกษาจากลักษณะรูปร่าง โครงสร้างต่างๆของดอกเห็ด ขนาด สี กลิ่น ถิ่นกำเนิดอาศัย ของ fruiting body ลักษณะ Basidium สี รูปร่างสปอร์ รวมทั้งข้อมูลอื่นๆ ที่สำคัญที่ใช้ประกอบในการคีย์ เอกสารที่ใช้สำหรับการจัดจำแนกชนิด ได้แก่เอกสารอ้างอิง ลำดับที่ 27-32 และ 39-48, 50 จำนวนทั้งหมด 69 ตัวอย่าง สามารถจำแนกชนิดได้ 25 family จัดอยู่ในไฟลัม Basidiomycota จำนวน 22 family จัดจำแนกชนิดในระดับ genus ได้ 48 genus family ที่พบสมาชิกจำนวนมากที่สุดคือ polyporaceae ,agaricaceae และboletaceae มีจำนวน 9, 5, 5 ชนิดตามลำดับ และและพบเชื้อราขนาดใหย่ในไฟลัม Ascomycota จำนวน 3 family 4 genus คือ xylariaceae จำนวน 2 genus (*Xylaria* sp. และ *Daldinia concentrica* family leotiaceae จำนวน 1 genus (*Leotia* sp.) และ family Helvellaceae จำนวน 1 genus (*Helvella* sp.) และไม่สามารถบ่งบอกชนิดได้ จำนวน 3 ตัวอย่าง ดังแสดงผลในตารางที่ 2. และรูปที่ 7.-15.

3 การเพาะเลี้ยงเส้นใยเห็ดบริสุทธิ์ที่สามารถแยกได้บางชนิด

จากการเพาะเลี้ยงแยกเนื้อเยื่อของเห็ด สามารถแยกได้เส้นใยของเห็ดบริสุทธิ์ ที่เจริญได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato dextrose agar ได้จำนวน 10 ตัวอย่างคือ *Polyporus sp. PHK 24*, *Scleroderma polyrhizum* , *Agaricus sp.* , *Chlorophyllum molybdites* , *Lepiota sp.* , *Macrolepiota sp.* , *Coprinus sp.* , *Ganoderma lucidum* , *Schizophyllum commune* , และ *Xylaria sp.* การเพาะเลี้ยงเส้นใยมักมีปัญหาเรื่องการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรีย และเชื้อราที่เจริญเร็ว ทำให้ได้เส้นใยเห็ดบริสุทธิ์ค่อนข้างน้อย แม้ว่าได้มีการเติม chloramphenicol เพื่อยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก็ตาม และนอกจากนี้การเจริญของเส้นใยเห็ดใช้เวลานาน มากกว่า 7 วัน และได้เส้นใยที่เป็นหมัน มีลักษณะเส้นใยที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA บางมาก แม้ว่าอาหารเลี้ยงเชื้อนี้เหมาะต่อการแยกเส้นใยของเห็ด[51]

4. การสกัดตัวอย่างดอกเห็ดและน้ำเลี้ยงของเส้นใยเห็ด และการทดสอบฤทธิ์ต้านแคนดิดา

ดอกเห็ดที่เก็บรวบรวมได้ทั้งหมด หลังจากทำการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาแล้วนำมาสกัดด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิด คือ methanol , Ethyl acetate และ chloroform ปริมาณ 3.0 กรัม/100 มิลลิลิตร (W/V) และน้ำเลี้ยงของเส้นใยเห็ดที่เพาะเลี้ยงใน Potato dextrose broth(PDB) และGlucose yeast extract broth (GYB) ทั้ง 10 ชนิด นำมาสกัดด้วย ethyl acetate, methanol และ chloroform แล้วนำส่วน organic solvent fraction มาทดสอบฤทธิ์ต้านแคนดิดา เพื่อคัดเลือกตัวอย่างเห็ดที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของแคนดิดาได้ โดยวิธี agar paper disc diffusion method ใช้เชื้อทดสอบยีสต์ 3 สายพันธุ์ คือ *Candida albicans, C. krusei* และ *C. tropicalis* พบว่ามีเพียง 10 ชนิดที่ให้ขนาดของเส้นผ่าศูนย์กลางของวงใส มากกว่า 6 มิลลิเมตร (ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของ paper disc เท่ากับ 6 มิลลิเมตร)ต่อเชื้อทดสอบทั้ง 3 ชนิด จากตัวอย่างที่ทำการสกัด ethyl acetate มีจำนวนตัวอย่างเห็ดที่ให้ผลบวกในการทดสอบฤทธิ์ต้านแคนดิดามากที่สุด รองลงมาคือ methanol และ chloroform จากนั้นนำ organic portion มาระเหยให้แห้งด้วย rotary evaporator เพื่อทำการหาค่า MIC (Minimal Inhibitory Concentration) ของสารสกัดหยาบของเส้นใย และดอกเห็ดทำ โดยวิธี broth dilution method นำสารสกัดมาแยกโดยวิธี Thin layer chromatography (TLC) ซึ่งเป็นโครมาโทกราฟีแบบระนาบ (plane chromatography) โดยหยดสารละลายของสารผสมที่ต้องการแยกบนแผ่นที่เคลือบเฟสอยู่กับที่ แล้วนำไปจุ่มในภาชนะที่บรรจุตัวทำละลายผสมที่เป็นเฟสเคลื่อนที่ โดยใช้อัตราส่วน chloroform : methanol เท่ากับ 10:1 โดยให้ระดับของตัวทำละลายต้องอยู่ต่ำกว่าระดับของจุดที่หยดสารผสมไว้ ตัวทำละลายจะซึมไปตามเฟสอยู่กับที่ด้วยการซึมตามรูเล็กเหมือนกับน้ำที่ซึมไปในกระดาษหรือผ้า เมื่อซึมถึงจุดที่หยดสารผสมไว้ ตัวทำละลายจะชะเอาองค์ประกอบในสารผสมนั้นไปด้วยอัตราเร็วที่แตกต่างกัน ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับสภาพมีขั้ว (polarity) ของสารที่เป็นองค์ประกอบกับสารที่เป็นตัวทำละลาย ถ้าตัวทำละลายเป็นโมเลกุลมีขั้ว (polar molecules) จะชะเอาสาร

ในสารผสมที่เป็นสารมีขั้วไปด้วยได้เร็ว ส่วนสารที่ไม่มีขั้วในสารผสมจะถูกชะพาไปได้ช้า สารผสมก็จะแยกออกจากกัน[52] และศึกษาส่วนที่เป็น active fraction โดยวิธี Bioautography พบว่าสารสกัดหยาบของ *Polyporus* PHK 24. ที่สกัดด้วย methanol ให้ขนาดของเส้นผ่าศูนย์กลางของวงใสมากที่สุด ประมาณ 15 มิลลิเมตร มีค่า MIC เท่ากับ 6.25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร มีค่า Rf ของ active fraction ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบ มีค่าเท่ากับ 0.56 ดังรูปที่ 16.

สรุปงานวิจัยนี้ได้สำรวจพบตัวอย่างเห็ดป่าในอุทยานภูหินร่องกล้า จังหวัดพิษณุโลก จำนวน 69 ชนิด จัดอยู่ในไฟลัม Basidiomycota จำนวน 48 genus ในไฟลัม Ascomycota จำนวน 4 genus สามารถแยกเส้นใยบริสุทธิ์ที่เพาะเลี้ยงได้ในอาหารกึ่งสังเคราะห์ PDA จำนวน 10 ชนิด และพบว่าสารสกัดหยาบของดอกเห็ด *Polyporus* PHK 24 ที่สกัดด้วย methanol ให้ขนาดของเส้นผ่าศูนย์กลางของวงใสกว้างมากที่สุด ประมาณ 15 มิลลิเมตร มีค่า MIC เท่ากับ 6.25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร มีค่า Rf ของ active fraction ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบ มีค่าเท่ากับ 0.56 ดังนั้น จะเห็นได้ว่ามีเห็ดป่าบางชนิดที่สามารถผลิตสารที่มีฤทธิ์ในการต้าน/ยับยั้งแคนดิดาได้ ซึ่งเป็นเชื้อยีสต์สาเหตุก่อโรค candidiasis ในคน การวิจัยนี้ได้ข้อมูลที่เป็นประโยชน์ที่สามารถนำมาต่อยอดงานวิจัยต่อไป

ข้อเสนอแนะ

1. ควรเลือกทำการวิจัยในแง่ความหลากหลายอย่างเดียวเพราะว่าการเก็บตัวอย่างเห็ดในแต่ละครั้งไม่สามารถกำหนดปริมาณของตัวอย่างให้ได้ตามปริมาณที่ต้องการต่อการทำการทดลองได้ในทุกขั้นตอน

2. ควรเก็บข้อมูลทางด้านนิเวศวิทยาเพื่อทราบการกระจายตัวทางภูมิศาสตร์ และปัจจัยที่ทำให้เห็ดมีการกระจายตัวที่แตกต่างกัน และควรเพิ่มความถี่ในการสำรวจจากทุก 2 เดือน เป็นเดือนละครั้งเนื่องจากเห็ดบางชนิดมีวงจรชีวิตสั้น