



## รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

ความหลากหลายทางชีวภาพและฤทธิ์ต้านแคนดิดาของเห็ดป่า  
ในอุทยานแห่งชาติภูหินร่องกล้า จังหวัดพิษณุโลก

Biodiversity of Wild Mushrooms and Their Anticandida Activity at  
Phu Hin Rong Kla National Park in Phitsanulok Province

โดย นางอุรรัตน์ พิมลศรี ลี และคณะ  
สนับสนุนทุนวิจัยโดยกองทุนวิจัยมหาวิทยาลัยนเรศวร  
ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2552

มีนาคม พ.ศ. 2554

600251079

ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ



246113

สัญญาเลขที่ M

## รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ ความหลากหลายทางชีวภาพและฤทธิ์ต้านแคนติดาของเห็ดป่า  
ในอุทยานแห่งชาติภูหินร่องกล้า จังหวัดพิษณุโลก  
Biodiversity of Wild Mushrooms and Their Anticandida  
Activity at Phu Hin Rong Kla National Park in Phitsanulok  
Province

### คณะผู้วิจัยสังกัด

- |    |                              |                       |
|----|------------------------------|-----------------------|
| 1. | นางอุรรัตน์ พิมลศรี ลี       | หัวหน้าโครงการวิจัย   |
| 2. | ผศ.ศรีสุตา กวยาสกุล          | ผู้ร่วมโครงการวิจัย   |
| 3. | นางอารี ทองทุ่ง              | ผู้ร่วมโครงการวิจัย   |
| 4. | นายสิทธิศักดิ์ สร้อยเพชรเกษม | ผู้ร่วมโครงการวิจัย   |
| 5. | ผศ.ดร. อูราภรณ์ สอาดสุด      | ที่ปรึกษาโครงการวิจัย |



สนับสนุนโดยกองทุนวิจัยมหาวิทยาลัยนเรศวร

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

ชื่อโครงการ      ความหลากหลายทางชีวภาพและฤทธิ์ต้านแคนดิดาของเห็ดป่าในอุทยานแห่งชาติ  
ภูหินร่องกล้า จังหวัดพิษณุโลก  
Biodiversity of Wild Mushrooms and Their Anticandida Activity at Phu Hin Rong  
Kla National Park in Phitsanulok Province

|              |                             |                      |      |
|--------------|-----------------------------|----------------------|------|
| ผู้รับผิดชอบ | นางอุรรัตน์ พิมลศรี ลี      | สัดส่วนที่ทำการวิจัย | 60 % |
|              | ผศ.ศรีสุดา กวยาสกุล         | สัดส่วนที่ทำการวิจัย | 10 % |
|              | นางอารี ทองทุ่ง             | สัดส่วนที่ทำการวิจัย | 10 % |
|              | นายสิทธิธัตถ์ สร้อยเพชรเกษม | สัดส่วนที่ทำการวิจัย | 10 % |

ที่ปรึกษาโครงการ

|                         |                      |      |
|-------------------------|----------------------|------|
| ผศ.ดร. อูราภรณ์ สอาดสุด | สัดส่วนที่ทำการวิจัย | 10 % |
|-------------------------|----------------------|------|

สถานที่ติดต่อ

ภาควิชาจุลชีววิทยาและปรสิตวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์  
มหาวิทยาลัยนเรศวร อำเภอเมือง จังหวัดพิษณุโลก  
โทรศัพท์ : 055-964624                      โทรสาร : 055-964470

งบประมาณที่ได้รับอนุมัติ

290,000 บาท (สองแสนเก้าหมื่นบาทถ้วน)

ระยะเวลาดำเนินงาน

1 ธันวาคม 2551 – 31 ธันวาคม 2552

สถานที่ดำเนินงานวิจัย

1) ห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาและปรสิตวิทยา

## กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ กองทุนอุดหนุนการวิจัย มหาวิทยาลัยนเรศวร ที่ได้อนุมัติทุนสนับสนุนการวิจัยปีงบประมาณ 2552 พร้อมนี้ ขอขอบคุณ อุทยานแห่งชาติภูหินร่องกล้า จังหวัดพิษณุโลก และเจ้าหน้าที่นำทาง สำหรับการศึกษาดัวอย่างในพื้นที่การทำวิจัย ขอขอบคุณ ภาควิชาจุลชีววิทยาและปรสิตวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ ที่ได้อำนวยความสะดวกในการใช้ห้องปฏิบัติการทางจุลชีววิทยา และ ให้ความอนุเคราะห์ ในการใช้เครื่องมือ อุปกรณ์ต่างๆในการทำวิจัยครั้งนี้ คณะผู้วิจัยคาดหวังเป็นอย่างยิ่งว่า ผลการวิจัยในครั้งนี้จะเป็นข้อมูลที่เป็นประโยชน์ของผู้ที่สนใจเกี่ยวกับการศึกษาเห็ดป่าต่อไป

อรัตน์ พิมลศรี ลี

ศรีสุดา กวยาสกุล

อารี ทองทุ่ง

สิทธิรัตน์ สร้อยเพชรเกษม

อราภรณ์ สอาดสุด

**Research Title** Diversity of wild mushrooms and their anticandida activity from Phu Hin Rong Kla National Park in Phitsanulok

**Researcher**

1. Ms. Urat Pimolsri
2. Ass. Prof. Srisuda Kawayasakul
3. Ass. Prof.Dr. Uraporn Sa-ardsud
4. Ms. Aree Thongthung
5. Mr. Sittud Soypetcasem

### Abstract

246113

*Candida*, (*Candida albicans*) is a fungal disease which has become increasingly significant threaten in Thailand because of the opportunistic behavior towards the altered and/or compromised conditions of its host. There has been much interest in the resources of bioactive compounds for treatment fungal diseases. There are a wide range of mushrooms which regularly produce antifungals in world-wide, especially in the Asia region. Therefore, this study sought for diversity of wild mushrooms which generally grow in nature and investigated their anticandida activity. The samples of wild mushrooms were randomly collected from Phu Hin Rong Kla National Park in the Phitsanulok province during 2009. Each sample was morphologically characterized both macroscopically and microscopically to identify the genus. They were then dried at 45°C until brittle (3-7 days). The dried samples were ground with a motorized stone grinder and extracted with chloroform, ethyl acetate and methanol (25 g/L). The anticandida activity of extracts was determined by paper disc agar diffusion method using three species of *Candida* including *Candida albicans*, *C. tropicalis* and *C. krusei*. The diameter of the inhibition zone was measured and minimal inhibitory concentration (MIC) was determined using broth tube dilution. The thin layer chromatographic method was used to separate into fractions with chloroform and methanol ratio (10:1) as a mobile phase with extracted mushroom which showed the highest diameter of inhibition zone. Then the active fraction was calculated and checked its activity by bioautography method with *Candida* spp. The 69 wild mushroom samples were found and identified to 55 genus into 25 families and unidentified 3 samples. The anticandida activity of extracted mushroom samples with ethyl acetate were generally given diameter of the inhibition zone higher than the methanolic and chloroform extracts. The methanolic extract of *Polyporus* PHK 24 provided the highest of diameter of clear zone 15.0 mm. The minimal inhibitory concentration was 6.25 mg/ml. The retention factor ( $R_f$ ) of active fraction was 0.56 which could inhibit the growth of three tested organism. Thus wild mushrooms vary markedly in their potency of anticandida activity. Some of these may be amenable to commercial exploration for development to medical benefits.

**Keywords:** Anticandida activity, Wild mushrooms, Phu Hin Rong Kla National Park

ชื่อเรื่อง ความหลากหลายทางชีวภาพและฤทธิ์ต้านแคนดิดาของเห็ดป่าในอุทยานแห่งชาติ  
ภูหินร่องกล้า จังหวัดพิษณุโลก

ชื่อผู้วิจัย นางอุรวิทย์ พิมลศรี ลิ  
ผศ.ศรีสุดา กวยาสกุล  
นางอารี ทองทุ่ง  
นายสิทธิศักดิ์ สร้อยเพชรเกษม

ที่ปรึกษาโครงการ ผศ.ดร. อูราภรณ์ สอาดสุด

แหล่งทุนวิจัย งบประมาณแผ่นดิน พุทธศักราช 2552 มหาวิทยาลัยนเรศวร

### บทคัดย่อ

246113

*Candida albicans* ทำให้เกิดโรคเชื้อรา candidiasis ที่คุกคามสุขภาพของคนไทยมากขึ้น ในปัจจุบัน ดังนั้นจึงมีความสนใจในการค้นหาแหล่งสารต้านเชื้อรา เพื่อใช้ในการรักษาโรคนี้ มีเห็ดจำนวนหลายชนิดที่สามารถผลิตสารต้านเชื้อราได้ ดังนั้นงานวิจัยนี้ จึงได้ศึกษาความหลากหลายของเห็ดป่าในอุทยานแห่งชาติภูหินร่องกล้า จังหวัดพิษณุโลก ในปี พ.ศ. 2552 และฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของ *Candida* spp. โดยนำตัวอย่างเห็ดแต่ละชนิด ที่ได้จากการสำรวจจนามาจัดจำแนกชนิดโดยศึกษา ลักษณะสัณฐานวิทยา และลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ในระดับ genus แล้วนำตัวอย่างเห็ดมาทำแห้ง และมาบดด้วยเครื่องบดให้เป็นผงละเอียด จากนั้นนำผงละเอียดของเห็ดแต่ละชนิดมาสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ คือ chloroform , ethylacetate และ methanol ปริมาณ 25 กรัม/ลิตรของตัวทำละลาย นำสารสกัดหยาบมาศึกษาฤทธิ์ต้านแคนดิดา โดยวิธี paper disc agar diffusion โดยทดสอบกับเชื้อทดสอบ 3 ชนิดคือ *C. albicans*, *C. krusei* และ *C. tropicalis* แล้ววัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของวงใส และหาค่า MIC โดยวิธี broth tube dilution ส่วน active fraction ทำการแยกโดยวิธี TLC ด้วยอัตราส่วนสารผสมของmobile phase คือ chloroform : methanol 10:1 (v/v) ตรวจสอบ active fraction ต่อเชื้อทดสอบ โดยวิธี Bioautography งานวิจัยครั้งนี้ สรรวจพบเห็ดป่า 69 ชนิด จัดจำแนกชนิดเป็น 55 genus จัดอยู่ใน 25 family และไม่สามารถจัดจำแนกชนิดได้ 3 ตัวอย่าง โดยทั่วไปฤทธิ์ต้านแคนดิดาของสารสกัดเห็ดที่สกัดด้วย ethylacetate ให้ผลบวกมากกว่าการสกัดด้วย methanol และ chloroform แต่พบว่าสารสกัดหยาบของ *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 จากผลการวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าเห็ดป่าบางชนิดมีศักยภาพสามารถผลิตสารต้านการเจริญของ *Candida* spp. ได้

คำสำคัญ เห็ดป่า ฤทธิ์ต้านแคนดิดา อุทยานแห่งชาติภูหินร่องกล้า

สารบัญ

|                                              | หน้า |
|----------------------------------------------|------|
| กิตติกรรมประกาศ                              | ก    |
| Abstract                                     | ข    |
| บทคัดย่อ                                     | ค    |
| สารบัญ                                       | ง    |
| สารบัญตาราง                                  | จ    |
| สารบัญรูปภาพ                                 | ฉ    |
| บทที่ 1 บทนำ                                 | 1    |
| บทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรม                        | 3    |
| บทที่ 3 วัสดุอุปกรณ์ สารเคมี และวิธีการวิจัย | 9    |
| บทที่ 4 ผลการวิจัย                           | 13   |
| บทที่ 5 อภิปราย และสรุปผลการวิจัย            | 27   |
| ข้อเสนอแนะ                                   | 30   |
| เอกสารอ้างอิง                                | 31   |
| ประโยชน์ที่ได้รับ                            | 35   |
| ภาคผนวก                                      | 36   |

สารบัญตาราง

|             |                                                                                                                                                     | หน้า |
|-------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| ตารางที่ 1. | แสดงจำนวนตัวอย่างเห็ดทั้งหมดที่สำรวจได้ในแต่ละฤดู                                                                                                   | 13   |
| ตารางที่ 2. | จำนวน วงศ์ และ ชนิด ของเห็ดราที่พบในไฟลัม Basidiomycota และ Ascomycota ที่สำรวจพบในอุทยานแห่งชาติภูหินร่องกล้า ในระหว่าง ธันวาคม 2551- ธันวาคม 2552 | 15   |
| ตารางที่ 3. | แสดงผลของฤทธิ์ต้านแคนดิดาของน้ำสกัดของของเส้นใย และน้ำสกัดของดอกเห็ด (ชนิดของตัวทำละลาย)                                                            | 25   |



## สารบัญรูปภาพ

|                                                                                                                                                                       | หน้า |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| รูปที่ 1. แสดงแผนที่ตั้งของอุทยานแห่งชาติภูหินร่องกล้า จังหวัดพิษณุโลก                                                                                                | 3    |
| รูปที่ 2. แสดงลักษณะโครงสร้างของเห็ด                                                                                                                                  | 4    |
| รูปที่ 3. แสดงวงชีวิตของเห็ด                                                                                                                                          | 5    |
| รูปที่ 4. ก. ลักษณะโคโลนีของ <i>Candida albicans</i> บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Sabouraud dextrose broth                                                                      | 6    |
| ข. ลักษณะ budding cell ของ <i>Candida albicans</i>                                                                                                                    |      |
| รูปที่ 5. ก. ลักษณะ chlamydospore (C) และ pseudohypha (P) ของ <i>Candida albicans</i>                                                                                 | 6    |
| ข. รอยแผ่นฝ้าลักษณะเป็นปื้น บนลิ้นของผู้ป่วยโรค candidiasis                                                                                                           |      |
| รูปที่ 6. แสดงตำแหน่งบริเวณเก็บตัวอย่างเห็ดป่าในพื้นที่อุทยานแห่งชาติภูหินร่องกล้า จำนวน 14 จุด                                                                       | 14   |
| รูปที่ 7. ตัวอย่างเห็ดสกุล <i>Amanita</i> spp. ที่สำรวจพบในอุทยานแห่งชาติภูหินร่องกล้า                                                                                | 17   |
| (1) <i>Amanita</i> sp.1 (2) <i>Amanita hemibapha</i> (3) <i>Amanita</i> sp.2                                                                                          |      |
| (4) <i>Amanita pantherina</i>                                                                                                                                         |      |
| รูปที่ 8. เห็ดกระด้างที่สำรวจพบในอุทยานแห่งชาติภูหินร่องกล้า (1) <i>Ganoderma lucidum</i>                                                                             | 18   |
| (2) <i>Fomitopsis</i> sp. (3) <i>Ganoderma applanatum</i> (4) <i>Trametes</i> sp.                                                                                     |      |
| (5) <i>Lentizite vespacea</i> (6) <i>Amauroderma rugosum</i>                                                                                                          |      |
| รูปที่ 9. เห็ดโคนที่สำรวจพบในอุทยานแห่งชาติภูหินร่องกล้า (1) <i>Termitomyces eurhiza</i> และรังปลวก (2) <i>Termitomyces eurhiza</i> (3) <i>Termitomyces clypeatus</i> | 19   |
| รูปที่ 10. เห็ดในวงศ์ boletaceae ที่สำรวจพบในอุทยานแห่งชาติภูหินร่องกล้า                                                                                              | 19   |
| (1) <i>Boletus</i> sp. (2) <i>Boletus chromapes</i>                                                                                                                   |      |
| รูปที่ 11. เห็ดในวงศ์ russulaceae ที่สำรวจพบในอุทยานแห่งชาติภูหินร่องกล้า                                                                                             | 20   |
| (1) <i>Russula</i> sp. (2) <i>Russula fragilis</i>                                                                                                                    |      |
| รูปที่ 12. Coral fungi ที่สำรวจพบในอุทยานแห่งชาติภูหินร่องกล้า (1) <i>Thelphora vialis</i> .                                                                          | 20   |
| (2) <i>Pterula verticella</i> (3) Unidentified (4) <i>Scyrtinoogon a ngulisporus</i>                                                                                  |      |
| รูปที่ 13. เห็ดกระด้างที่สำรวจพบในอุทยานแห่งชาติภูหินร่องกล้า (1) <i>Stereum ostrea</i>                                                                               | 21   |
| (2) <i>Microporus xanthopus</i> (3) <i>Pycnoporus sanguineus</i>                                                                                                      |      |
| รูปที่ 14. Coral fungi ที่สำรวจพบในอุทยานแห่งชาติภูหินร่องกล้า (1) <i>Thelphora vialis</i> .                                                                          | 22   |
| (2) <i>Pterula verticella</i> (3) Unidentified (4) <i>Scyrtinoogon a ngulisporus</i>                                                                                  |      |
| รูปที่ 15. เห็ด class Gasteromycetes ที่สำรวจพบในอุทยานแห่งชาติภูหินร่องกล้า                                                                                          | 23   |
| (1) <i>Scleroderma polyrhizum</i> (2) <i>Scleroderma sinnamarie nse</i> (3) <i>Lycopodon</i> sp.                                                                      |      |

รูปที่ 16. แสดงตัวอย่างเห็ดที่มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อแคนดิดาที่ดีที่สุด

26

- ก. ลักษณะของดอกเห็ด *Polyporus* PHK 24
- ข. เส้นผ่าศูนย์กลางของวงใส ของสารสกัดหยาบที่สกัดด้วย methanol (A1:15 มม.)  
Chloroform (A2 : 9 mm) ethyl acetate ( A3: 7 mm)
- ค. แสดงภาพโครมาโตแกรม ของ active fraction ของ methnolic crude extract