

บทที่ 1

บทนำ

พื้นที่ป่าเป็นแหล่งสำคัญของความหลากหลายของสิ่งมีชีวิตนานาชนิดทั้งพืช สัตว์ และ จุลินทรีย์ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง กลุ่มเห็ดรา ปัจจุบันพบว่าพื้นที่ป่าไม้ลดลงเหลือเพียง 26% ของพื้นที่ทั้งหมด และมีแนวโน้มจะลดลงเรื่อยๆ มีระบบนิเวศน์ไรร่า สวนผลไม้ และสวนป่าเข้ามาแทนที่ มีผลทำให้ความหลากหลายของสิ่งมีชีวิตต่างๆ เปลี่ยนแปลงและลดจำนวนลงไป จนบางชนิดไม่สามารถหามาทดแทนได้อีก ดังนั้นจึงต้องตระหนักและทำการศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพ (Biodiversity) ของสิ่งมีชีวิตเหล่านี้ เพราะมีความสำคัญจนอาจจะสามารถกล่าวได้ว่า เป็นตัวกำหนดถึงแต่ละเผ่าพันธุ์ในอนาคต จุลินทรีย์ โดยเฉพาะพวกเห็ดหลายสปีชีส์ อาศัยอยู่ในป่า ซึ่งเป็นสิ่งมีชีวิตอีกกลุ่มหนึ่งที่มีความสำคัญต่อมนุษย์ เช่น ใช้เป็นอาหาร และเป็นแหล่งผลิตสารมีฤทธิ์ทางชีวภาพต่างๆ ตลอดจนมีความสำคัญทางระบบนิเวศวิทยา และสิ่งแวดล้อม เห็ดสามารถเจริญได้บนดิน ขอนไม้ หรือกิ่งไม้ที่ตายแล้ว หรือเปลือกต้นไม้ต่างๆ เป็นต้น เนื่องจากปัจจุบันพื้นที่ป่าธรรมชาติถูกรบกวน และลดจำนวนลงอย่างรวดเร็ว ซึ่งมีผลต่อความอุดมสมบูรณ์ของป่าและความหลากหลายของสิ่งมีชีวิต สิ่งมีชีวิตหลายชนิดสูญพันธุ์ไป เกิดก็เช่นกันเมื่อสภาพความสมบูรณ์ของป่าลดลง ปริมาณและชนิดของเห็ดก็ลดลงตามไปด้วย

อุทยานแห่งชาติภูหินร่องกล้า เป็นอุทยานแห่งชาติที่มีลักษณะภูมิประเทศ โดยทั่วไปเป็นเทือกเขา สลับซับซ้อน มีความสูงลดหลั่นลงไปและเป็นแหล่งกำเนิดของแม่น้ำหลายสาย มีลักษณะภูมิอากาศหนาว เย็นเกือบตลอดปี ฤดูร้อนอากาศจะเย็นสบาย ฝนตกชุกในฤดูฝน อุณหภูมิเฉลี่ยทั้งปีประมาณ 18-25 องศาเซลเซียส อุทยานแห่งชาติภูหินร่องกล้ามีพื้นที่ป่าประกอบด้วย ป่าเต็งรัง ป่าดิบเขา และป่าสนเขา ทำให้มีความสวยงามความสมบูรณ์ และมีความหลากหลายของสิ่งมีชีวิตชนิดต่างๆ มากมาย เห็ดจัดเป็นจุลินทรีย์ขนาดใหญ่ที่มีความหลากหลาย มีความสำคัญต่อระบบนิเวศน์ เนื่องจากเป็นผู้ย่อยสลายที่ดี ช่วยให้ผืนป่าอุดมสมบูรณ์ และมนุษย์เรามีการนำเห็ดมาใช้ประโยชน์ในการเป็นอาหาร เพราะเห็ดป่าหลายชนิดมีคุณค่าทางโภชนาการสูง หลายชนิดเป็นแหล่งสร้างรายได้แก่ชุมชน บางชนิดมีคุณสมบัติเป็นสมุนไพรรักษาโรค สร้างสารเพื่อใช้ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรค และบางชนิดมีการสกัดสารสำคัญมาใช้ทางอุตสาหกรรม แต่ก็มีเห็ดบางชนิดที่เป็นโทษ เนื่องจากสร้างสารพิษซึ่งอาจเป็นอันตรายถึงแก่ชีวิตได้ถ้ารับประทานโดยไม่มีความรู้เพียงพอ การศึกษาเกี่ยวกับสิ่งมีชีวิตกลุ่มของเห็ดรา นี้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งเห็ดขนาดใหญ่ ยังไม่มีรายงานอย่างเป็นทางการที่ใช้ประกอบเป็นข้อมูลทางวิชาการของอุทยานฯ เลย ซึ่งการศึกษาและการจัดจำแนกชนิดของเห็ด ทำให้เกิดประโยชน์ต่อชุมชน นักท่องเที่ยว และผู้สนใจทั่วไปเพื่อเป็นความรู้ในการท่องเที่ยวเชิงนิเวศน์ได้ การศึกษาโดยอาศัยชุมชนเป็นผู้ร่วมวิจัย ก็เป็นการนำภูมิปัญญา

ของชุมชนมาใช้ได้อย่างเป็นระบบและมีการบันทึกเป็นหลักฐานการใช้ประโยชน์จากเห็ดได้ดีขึ้น ส่วนเห็ดที่ชุมชนมีการนำมาใช้ในการเป็นสมุนไพร หรือการนำมาใช้ในด้านอื่นๆ ก็จะได้มีการศึกษาเพิ่มเติมถึงศักยภาพในการนำมาใช้ประโยชน์เพื่อเพิ่มศักยภาพมากขึ้น โดยการนำมาศึกษาและเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ เพื่อเพิ่มปริมาณการผลิต และนำมาสกัดเป็นสารบริสุทธิ์ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ หรือนำมาใช้ในทางอุตสาหกรรมต่อไป

ดังนั้นผู้วิจัยจึงมีความสนใจศึกษาการเก็บรวบรวมชนิดของตัวอย่างเห็ดป่า ในพื้นที่ที่ศึกษาทำการจัดจำแนกชนิด ทำการแยกและเพาะเลี้ยงเส้นใยเห็ดตัวอย่างบางชนิด และทำการทดสอบฤทธิ์ต้านแคนดิดา (Anticandida activity) ที่มีสมบัติในการทำลายหรือยับยั้งการเจริญของเชื้อยีสต์สาเหตุของโรคติดเชื้อราแคนดิดา ตลอดจนหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดหยาบ (crude extract) ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแคนดิดาได้ ทำให้ได้ข้อมูลทางวิชาการเกี่ยวกับลักษณะของเห็ดป่าชนิดต่างๆ การเพาะเลี้ยงและเป็นแหล่งผลิตสารที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อแคนดิดา และเล็งเห็นความสำคัญของเห็ดป่าที่จำเป็นต้องอนุรักษ์เห็ดไว้ให้ลูกหลานได้ใช้ประโยชน์ต่อไปในอนาคต ควบคู่กับการอนุรักษ์ป่าไปพร้อมกันด้วย นอกจากนี้ ก็เป็นโอกาสความก้าวหน้าทางการแพทย์อีกก้าวหนึ่ง ที่จะก้าวต่อไป เพื่อที่จะพัฒนานำสารสกัดไปสกัดให้บริสุทธิ์มากขึ้น นำไปใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อแคนดิดาในอนาคตต่อไป และเชื่อว่าน่าจะเป็นงานวิจัยหนึ่งที่กระตุ้นให้มีการวิจัยเกี่ยวกับเห็ดมากขึ้น

วัตถุประสงค์

- 1 เพื่อสำรวจ เก็บรวบรวมและจำแนกชนิดของเห็ดป่า ในเขตอุทยานแห่งชาติภูหินร่องกล้า จังหวัดพิษณุโลก ในช่วงระหว่างวันที่ 1 ตุลาคม 2551 – 30 กันยายน 2552
- 2 เพื่อศึกษาการแยก และการเพาะเลี้ยงเส้นใยของเห็ดป่าบางชนิด
- 3 ทำการสกัดสารสกัดหยาบจากดอกเห็ด และการเพาะเลี้ยงเส้นใยเห็ดในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวมาทดสอบฤทธิ์ต้านแคนดิดา

บทที่ 2

ทบทวนวรรณกรรม

อุทยานแห่งชาติภูหินร่องกล้า เป็นอุทยานแห่งชาติทางประวัติศาสตร์ ซึ่งมีสภาพธรรมชาติที่สวยงามแปลกตาจุดเด่นที่น่าสนใจจึงแบ่งออกเป็น 2 ด้าน คือด้านประวัติศาสตร์ และด้านธรรมชาติที่สวยงาม มีเขตพื้นที่ติดต่ออยู่ในจังหวัดพิษณุโลก เพชรบูรณ์ และ เลย (รูปที่ 1.) โดยเฉพาะเขตพื้นที่ที่อยู่ในจังหวัดพิษณุโลก เป็นแหล่งกำเนิดของแม่น้ำหลายสาย ฝนตกชุกในฤดูฝน ซึ่งพื้นที่ปกคลุมด้วยป่าไม้ 3 ชนิด คือ ป่าเต็งรัง ป่าดิบเขา และป่าสน และมีลักษณะภูมิประเทศ โดยทั่วไปเป็นเทือกเขาสลับซับซ้อน มีความสูงลดหลั่นลงไปและเป็นแหล่งกำเนิดของแม่น้ำหลายสาย มีลักษณะภูมิอากาศหนาวเย็นเกือบตลอดปี ฤดูร้อนอากาศจะเย็นสบาย ฝนตกชุกในฤดูฝน อุณหภูมิเฉลี่ยทั้งปีประมาณ 18-25 องศาเซลเซียส ทรัพยากรทางธรรมชาติประกอบด้วยพืชพันธุ์ไม้ สัตว์ป่า พันธุ์กล้วยไม้ป่า ดอกไม้ป่าสวยงาม และมีสภาพธรรมชาติที่เหมาะสมต่อการเจริญของเห็ดหลากหลายชนิด⁽¹⁾ จากการได้ไปสัมผัสบางโอกาสของผู้วิจัยในฐานะนักท่องเที่ยว พบว่าสภาพของพื้นที่ป่าในอุทยานฯ มีการเจริญของเห็ดหลากหลายชนิด ซึ่งสามารถพบเห็นเห็ดป่าหลายชนิดเจริญอยู่ทั่วไปรอบที่พัก แต่ยังไม่มีรายงานเกี่ยวกับชนิดของเห็ดป่าในพื้นที่ดังกล่าวเผยแพร่สู่สาธารณชนเลย

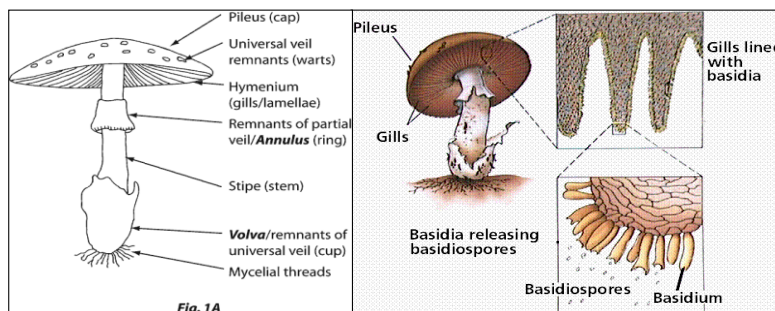


รูปที่ 1. แสดงแผนที่ที่ตั้งของอุทยานแห่งชาติภูหินร่องกล้า จังหวัดพิษณุโลก

ที่มา: <http://www.hamanan.com/tour/phitsanulok/mapphuinhongkla.html>⁽²⁾

<http://travel.kapook.com/view8044.html>⁽³⁾

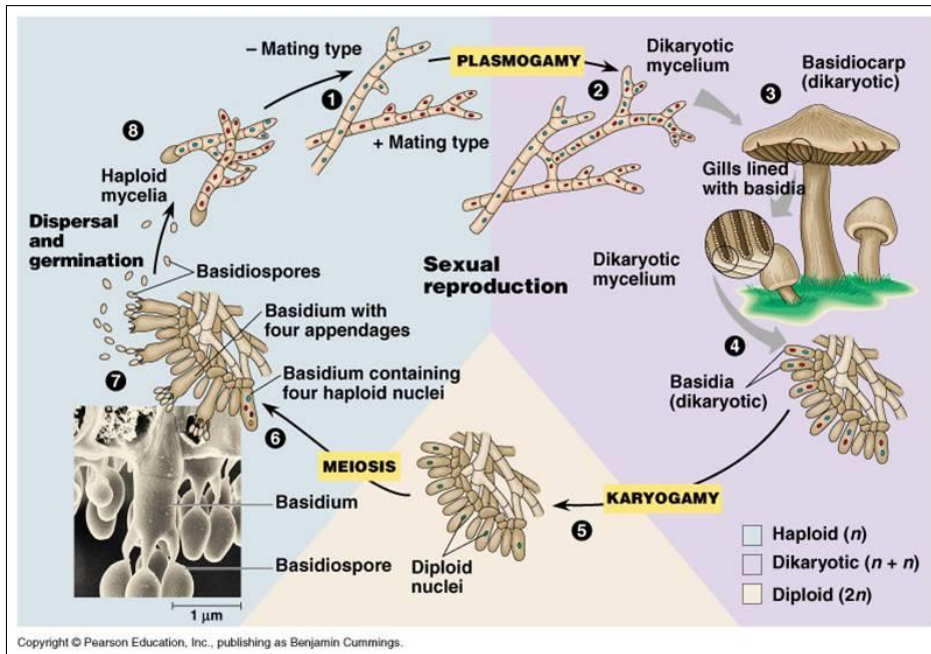
เห็ด จัดอยู่ในไฟลัม Basidiomycota เป็นส่วนของฟรุติติงบอดี้ (fruiting body) หรือที่เรียกว่า เบสิดิโอคารป์(basidiocarp) ขนาดใหญ่ของรา ส่วนของฟรุติติงบอดี้เป็นโครงสร้างที่ประกอบด้วยเส้นใยอัดรวมตัวกัน และเป็นส่วนที่สร้างสปอร์(basidiospore) ซึ่งเป็นหน่วยสืบพันธุ์ที่สามารถเจริญออกเป็นเส้นใยต่อไปได้ ส่วนของฟรุติติงบอดี้มีลักษณะได้หลายรูปแบบเช่น บางชนิดมีรูปร่างลักษณะคล้ายร่ม ทรงกลมคล้ายถ้วย คล้ายดอกไม้ม เป็นต้น⁽⁴⁾ เห็ดมีวงชีวิตและโครงสร้างของเห็ดโดยทั่วไปแสดงดังรูปที่ 2.-3. เห็ดสามารถเจริญได้บนดิน ตามขอนไม้ หรือกิ่งไม้ที่ตายแล้ว ใต้ต้นไม้ หรือเปลือกต้นไม้ต่างๆ เป็นต้น ซึ่งจะช่วยย่อยสลายอาหาร และหมุนเวียนธาตุอาหารให้กับสิ่งแวดล้อม และยัง มีประโยชน์อื่นๆนานับประการ เช่น เป็นอาหารของมนุษย์ และ สัตว์ และมีหลายชนิดสร้างสารต้านจุลินทรีย์ก่อโรค ทั้งแบคทีเรีย เชื้อรา ยีสต์ ไวรัส และมีคุณสมบัติในการสร้างสารให้สีย้อม สารให้กลิ่น และ สารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ^(7,8,9) การวิจัยเกี่ยวกับเห็ดในประเทศไทยนับว่ายังมีน้อยอยู่มาก แต่ถึงกระนั้นก็ตามประเทศไทยก็ยังมีเห็ดเชิงการค้ามากกว่าประเทศใด ๆ ในแถบเอเชียด้วยกัน ยกเว้นญี่ปุ่นอาจารย์กาน ชลวิจารณ์เป็นท่านแรกที่ริเริ่มค้นคว้าทดลองทำเห็ดเชื้อเห็ดฟางจากการเจริญตามธรรมชาติ ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2480 เป็นต้นมา จวบจนปัจจุบันเกษตรกรไทยในหลายจังหวัดสามารถเพาะเห็ดได้จำนวนมากจนกลายเป็นเห็ดเศรษฐกิจสามารถจำหน่ายให้กับผู้บริโภคในท้องตลาดได้หลายชนิด ได้แก่ เห็ดหูหนู เห็ดฟาง เห็ดนางฟ้า เห็ดหอม เห็ดหอยนางรม เห็ดหลินจือ⁽¹⁰⁾ นอกจากนี้ใช้เห็ดบางชนิดเพื่อการบริโภคแล้ว เห็ดบางชนิดสามารถใช้เป็นสมุนไพรรักษาโรคได้อีกด้วย ซึ่งได้รับความสนใจเป็นอย่างยิ่งในประเทศไทย ได้แก่ เห็ดหลินจือ ที่มีสรรพคุณเป็นยาอายุวัฒนะ เห็ดหอมป้องกันโรคมะเร็ง^(11,12,13,37)



รูปที่ 2. แสดงลักษณะโครงสร้างของเห็ด

ที่มา : http://www.emc.maricopa.edu/faculty/farabee/biobk/biobookdiversity_4.html⁽⁵⁾

http://www.toxinology.com/fusebox.cfm?staticaction=poisonous_mushrooms/mushrooms_idfile1.htm⁽⁶⁾

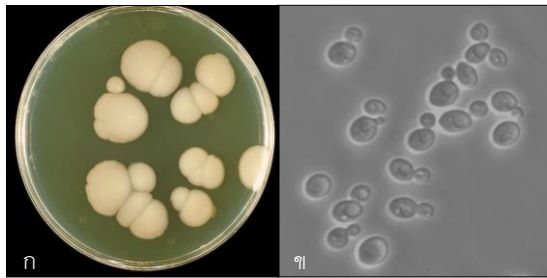


รูปที่ 3. แสดงวงจรชีวิตของเห็ด

ที่มา : http://simon-watts.blogspot.com/2010_04_01_archive.html⁽¹⁴⁾

การเจริญของเห็ดโดยปกติในสภาพธรรมชาติแล้ว มักจะสร้างสารที่มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ที่มีฤทธิ์มากน้อยต่างกันแล้วแต่ชนิดของเห็ด เพื่อดำเนินการเจริญของแบคทีเรีย เชื้อราชนิดอื่นในธรรมชาติ เพื่อให้เห็ดเจริญและสามารถมีชีวิตรอดในสิ่งแวดล้อมตามธรรมชาติได้ ถ้าได้มีการศึกษาการเพาะเลี้ยงเชื้อ และสกัดสารสำคัญเหล่านี้ ก็จะเป็นประโยชน์ต่อมนุษย์ในด้านการแพทย์ และอื่นๆ ได้⁽⁷⁾ ยีสต์แคนดิดา (*Candida* spp.) เป็นเชื้อราเซลล์เดี่ยว สืบพันธุ์โดยการแตกหน่อ มีรูปร่างรี โคโลนีสีครีม ดังรูปที่ 4 ส่วน *Candida albicans* มีลักษณะพิเศษสามารถสร้าง chlamydospore ที่มีรูปร่างกลมผนังหนา และ pseudohypha ดังรูปที่ 5. ทำให้ยีสต์ชนิดนี้สามารถบุกรุกสู่ชั้น epithelial cell ของ host ได้ดีกว่ายีสต์ชนิดอื่นๆ ยีสต์ชนิดนี้เป็นเชื้อสาเหตุของโรคติดเชื้อราแคนดิดา (Candidiasis)⁽¹⁶⁾ การอุบัติการเกิดโรคของโรคติดเชื้อราแคนดิดา มีผลคุกคามมากขึ้นเรื่อยๆ ในแต่ละปีของประชากรชาวไทย และ ส่งผลต่อสุขภาพของคนไทยได้ทุกเพศทุกวัย ในสภาพปัจจุบัน โรคติดเชื้อราแคนดิดา (Candidiasis) เป็นโรคแทรกซ้อนชนิดหนึ่งที่พบมากในผู้มีความต้านทานต่ำ เช่น ผู้ป่วยโรคเอดส์ ผู้ป่วยโรคเบาหวาน ผู้หญิงตั้งครรภ์ ผู้ป่วยที่ได้รับยาสเตียรอยด์ คนชรา เด็กทารก และจัดเป็น normal flora ชนิดหนึ่ง เป็นต้น โรคติดเชื้อราแคนดิดา สาเหตุ

เกิดจากเชื้อ *Candida albicans* และสายพันธุ์อื่นๆ เช่น *C. tropicalis* และ *C. krusei* ผู้ป่วยมักมีอาการได้หลายรูปแบบ เช่น เป็นฝ้าขาว (Thrush) ในปาก หรือผื่นแดง (Erythematous Candidiasis) มักจะเกิดที่เยื่อในปาก เพดานปากและลิ้น ในปากบางคนมีลักษณะปากนกกระจอก อาการในผู้ป่วยบางรายอาจจะมีอาการ กลืนอาหารลำบาก เจ็บคอ ฝ้าขาวที่คอ ลิ้น และช่องคลอด มีการตกขาวคันช่องคลอด เป็นๆหายๆ ยังไม่มีวิธีป้องกันการรับเชื้อ และเชื้อสาเหตุของโรคนี้ก็มักเกิดการดื้อยาเพิ่มขึ้นด้วย^(15,16)

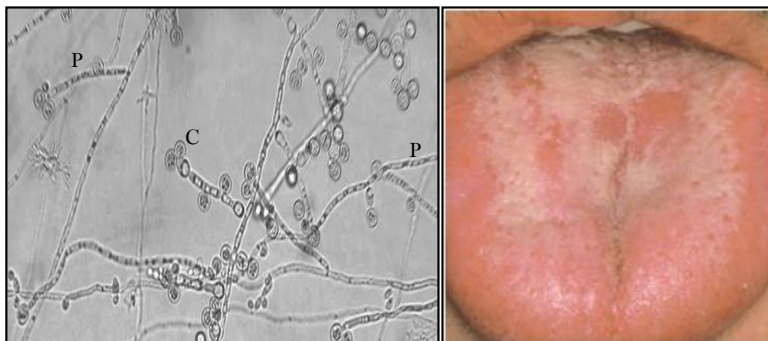


รูปที่ 4. ก. ลักษณะโคโลนีของ *Candida albicans* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Sabouraud dextrose broth

ข. ลักษณะ budding cell ของ *Candida albicans*

ที่มา : <http://m.eb.com/assembly/117167>⁽¹⁷⁾

: http://www.graphicshunt.com/health/images/candida_albicans-667.htm⁽¹⁸⁾



รูปที่ 5. ก. ลักษณะ chlamydospore (C) และ pseudohypha (P) ของ *Candida albicans*

ข. รอยแผ่นฝ้าลักษณะเป็นปื้น บนลิ้นของผู้ป่วยโรค candidiasis

ที่มา : <http://thunderhouse4-yuri.blogspot.com/2009/12/candida-albicans.html>⁽¹⁹⁾

: <http://www.modernmedicalguide.com/candidiasis/>⁽²⁰⁾

การวิจัยเกี่ยวกับความหลากหลายของเห็ดในประเทศไทยนับว่ายังอยู่น้อยมาก จากการรายงานของ อนิวรรณ และคณะ ได้ศึกษาความหลากหลายของเห็ดราทำลายไม้ในระบบนิเวศไม้วงศ์ไม้อย่างทองที่เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าแม่น้ำภาชี จังหวัดราชบุรี โดยทำการสำรวจความหลากหลายของเห็ดราทำลายไม้ (Wood-destroying fungi) ในระบบนิเวศป่าไม้ที่มีไม้วงศ์ไม้อย่างเป็นองค์ประกอบ ระหว่างเดือนพฤษภาคม 2541 พบเห็ดราทำลายไม้ในบริเวณท้องที่ศึกษาซึ่งเป็นป่าดิบแล้ง, ป่าเบญจพรรณ และป่าเต็งรัง ที่มีไม้วงศ์ไม้อย่างเป็นองค์ประกอบจำนวน 2 ไฟลัม (Phyla), 10 ลำดับ (Orders), 15 วงศ์ (Families), 30 สกุล (Genera), รวมทั้งสิ้น 37 ชนิด (Species)⁽²¹⁾ หนึ่งในรายงานความหลากหลายของเห็ดที่บริโภคได้ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยจากการเก็บตัวอย่างเห็ดป่าที่บริโภคได้ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือทั้งหมด พบว่าสามารถจำแนกได้ทั้งสิ้น 9 จินัส ได้แก่ *Russula*, *Boletus*, *Suillus*, *Latarius*, *Termitomyces*, *Amanita*, *Cantharellus*, *Tricholoma* และ *Astraeus* อย่างไรก็ตามพบว่าในกลุ่มจันัส *Russula* และ *Boletus* มีความหลากหลายในระดับ species สูงที่สุด⁽²²⁾ ริ้ววัฒน์และคณะ(2547)ได้สำรวจ ความหลากหลายของเห็ดในพื้นที่เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเขาอ่างฤๅไนในผลการสำรวจและเก็บตัวอย่างเห็ดในพื้นที่เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเขาอ่างฤๅไน ระหว่างเดือนพฤษภาคมถึงเดือนกรกฎาคม 2547 ได้จำนวน 329 หมายเลข โดยจัดจำแนกเป็นเห็ดอยู่ในกลุ่มราเมือก Myxomycetes จำนวน 1 วงศ์ 1 สกุล 1 ชนิด ได้แก่ *Stemonitis* sp. เป็นต้น เห็ดในกลุ่ม Ascomycetes จัดจำแนกอยู่ใน 5 วงศ์ 9 สกุล 12 ชนิด ได้แก่ *Cordyceps* sp., *Scutellinia* sp., *Cookeina sulcipes*, *C. tricholoma*, *Galiella celebica*, *Daldinia concentrica*, *Entonema liquescens*, *Hypoxylon* sp., *Poronia gigantea*, *Xylaria allantoide*, *X. ianthio-velutina* และ *X. obovata* เป็นต้น เห็ดในกลุ่ม Basidiomycetes จัดจำแนกอยู่ใน 32 วงศ์ 51 สกุล 67 ชนิด⁽²³⁾

Jonathan S.G. และ I.O.Fasidi (2003) รายงานว่าเห็ดลูกฟูกบางสายพันธุ์ในประเทศไนจีเรียสร้างสารที่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย เชื้อรา และยีสต์ *Candida albicans* ได้⁽⁶⁾ ส่วนรายงานอื่นๆที่ได้ศึกษาสารสกัดจากเห็ดที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ *Candida* sp. เช่น สารสกัด polysaccharide lentinan ที่สกัดได้จากเห็ดหอม และ schizophyllan จากเห็ดตีนตุ๊กแก⁽²⁴⁾ Nora Hatvani (2001) ได้เพาะเลี้ยงเส้นใยของเห็ด *Lentinus edodes* ในอาหารเหลว แล้วทำการสกัดส่วนน้ำเลี้ยงด้วย chloroform :methanol อัตราส่วน 9:1 แล้วนำส่วน chloroform fraction ไประเหยให้แห้ง นำสารสกัดที่ได้มาทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อแคนดิดา พบว่า สารสกัดดังกล่าวมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแคนดิดาได้⁽²⁵⁾ นอกจากนี้ Turkoglu และคณะ (2007) ยังพบว่าสารสกัด ที่ได้จากการสกัดดอกเห็ด *Laetiporus sulphureus* ด้วย ethanol มีฤทธิ์ยับยั้งแคนดิดาได้ดีมาก ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของ clear zone เท่ากับ 21 mm⁽²⁶⁾

ดังนั้นการวิจัยนี้จึงต้องการทำการสำรวจความหลากหลายของเห็ดป่าในพื้นที่ที่ศึกษา ทำการจัดจำแนกชนิด การรวบรวมตัวอย่างเห็ด และทำการสกัดสารจากเห็ด แล้วนำมาทดสอบฤทธิ์ต้านยีสต์แคนดิดา ที่มีสมบัติในการทำลายหรือยับยั้งการเจริญของเชื้อยีสต์สาเหตุของโรคติดเชื้อราแคนดิดา นอกจากนี้ยังทดสอบฤทธิ์ต้านแคนดิดาจากการเพาะเลี้ยงเส้นใยเห็ดป่า ตลอดจนหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดหยาบ (crude extract) ที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อแคนดิดาได้ การวิจัยนี้ จึงมีความสำคัญมากที่จะได้ข้อมูลที่เป็นประโยชน์หน่วยงานหลัก และหน่วยงานสนับสนุนในเชิงวิชาการ และผู้สนใจอื่นๆ ดังนั้นคณะผู้วิจัย จึงมีความตั้งใจที่จะทำโครงการวิจัยครั้งนี้ขึ้น

บทที่ 32

วัสดุอุปกรณ์ สารเคมี และ วิธีการวิจัย

อาหารเลี้ยงเชื้อ

เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อจากบริษัท Merck (Germany) ได้แก่ Potato dextrose broth , Sabouraud dextrose broth, Glucose ,Polypeptone ,Yeast extract และ Agar

สารเคมีและวัสดุอุปกรณ์

Ethanol 95% (โรงงานสุรา องค์การสุรา กรมสรรพสามิต ส่วนสารเคมีจากบริษัท Merck (Germany) ได้แก่ Nystatin, Methanol, Chloroform, Ethyl acetate, Dimethyl sulfoxide และ Iodine วัสดุอุปกรณ์ ได้แก่

<u>Paper disc</u>	Filter paper Whatman No.1
Spore color chart	Test tube
Petri disc	Micropipette
Digital vernier caliper	Microscope
Autoclave	Reciprocal shaker
Incubator	<u>Test</u> tube
pH meter	Beaker
Computer	Erlenmeyer flask
Laminar flow	Magnetic stirrer
Steriomicroscope	Rotary evaporator
Separating funnel	Vial
Microtiter plate	TLC plate
TLC tank	Hand Lens
Volumetric flask	ขวดเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Duran
กล่องพลาสติกใสบรรจุตัวอย่างเห็ด	
เครื่องอบผลไม้แห้งขนาดเล็ก (ใช้สำหรับอบตัวอย่างเห็ดเวลาออกภาคสนาม)	

เชื้อยีสต์ทดสอบ

Candida albicans ATCC 90028

C. tropicalis

C. krusei

Formatted: Font: (Default) Cordia New, Complex Script Font: Cordia New, 16 pt

Formatted: Font: (Default) Cordia New, Bold, Complex Script Font: Cordia New, 16 pt, Bold

Formatted: Font: (Default) Cordia New, Bold, Complex Script Font: Cordia New, 16 pt, Bold

Formatted: Font: (Default) Cordia New, Bold, Complex Script Font: Cordia New, 16 pt, Bold

Formatted: Default, Left

Formatted: Default, Left, Indent: First line: 1.27 cm

Formatted: Font: (Default) Cordia New, Complex Script Font: Cordia New, 16 pt

Formatted: Font: (Default) Cordia New, Complex Script Font: Cordia New, 16 pt

Formatted: Font: (Default) Cordia New, Complex Script Font: Cordia New, 16 pt

Formatted: Font: (Default) Cordia New, Not Bold, Complex Script Font: Cordia New, 16 pt, Not Bold

วิธีการวิจัย

1. ทำการสำรวจ รวบรวมตัวอย่างเห็ดป่าในเขตอุทยานแห่งชาติภูหินร่องกล้าทั้ง 3 ช่วงฤดู คือ ฤดูฝน ฤดูร้อน และฤดูหนาว บริเวณเส้นทางเดินศึกษาธรรมชาติ จำนวน 17 จุด โดยการสุ่ม ทำการบันทึกภาพด้วยกล้องถ่ายรูป บันทึกข้อมูลลักษณะทางสัณฐานวิทยาต่าง ๆ ทั้งลักษณะที่มองเห็นได้ด้วยตาเปล่า และลักษณะที่เห็นภายใต้กล้องจุลทรรศน์ สภาพถิ่นกำเนิด โดยการเก็บรวบรวมตัวอย่างสองเดือนต่อ 1 ครั้ง จำนวนทั้งหมด 6 ครั้ง เป็นระยะเวลานาน 12 เดือน
2. ศึกษาการจัดจำแนกชนิดเห็ดป่า โดยศึกษาจากลักษณะรูปร่าง โครงสร้างต่างๆของดอกเห็ด ขนาด สี กลิ่น ถิ่นกำเนิดอาศัย ของ fruiting body ลักษณะ Basidium รูปร่างสปอร์ รวมทั้งข้อมูลอื่นๆ ที่สำคัญที่ใช้ประกอบในการคีย์^(27-32, 39-48,50)
3. นำตัวอย่างเห็ดบางชนิดที่มีขนาดใหญ่ และมีเนื้อเยื่อหนาเพียงพอที่สามารถทำการแยกเส้นใย เพื่อเลี้ยงเนื้อเยื่อบนอาหารเลี้ยงเชื้อได้ แล้ว subculture ให้เป็นเชื้อบริสุทธิ์บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato dextrose agar^(33,43)
4. ทำการเพาะเลี้ยงเส้นใยเห็ดบริสุทธิ์ที่สามารถแยกได้บางชนิด บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA แล้วบ่มที่อุณหภูมิห้องประมาณ 7-10 วัน ใช้ cork borer ตัดเป็นชิ้นขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 6 มิลลิเมตร แล้วถ่ายเชื้อลงในอาหารเหลว PDB และ GYP ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ที่บรรจุในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มเพาะเลี้ยงเส้นใยที่อุณหภูมิห้อง บนเครื่องเขย่าที่มีความเร็ว 120 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 วัน จากนั้นกรองเอาส่วนน้ำเลี้ยง เก็บไว้ในตู้เย็น 4 องศาเซลเซียส สำหรับไว้คัดเลือกส่วนน้ำเลี้ยงของตัวอย่างเห็ดที่มีฤทธิ์ต้านแคนดิดา
5. ส่วนดอกเห็ดที่เก็บรวบรวมได้ทั้งหมด หลังจากทำการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาแล้วนำไปอบแห้งใน hot air oven ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส จนแห้งสนิท (ประมาณ 3-5 วัน) จากนั้น นำไปบดให้ละเอียดด้วย stone motorized grinder แล้วนำผงละเอียดไปสกัดด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิด คือ methanol , Ethyl acetate และ chloroform 2.5 กรัม/100 มิลลิลิตร (W/V)^(25,34) จากนั้นกรองเอาส่วน organic solvent เก็บไว้ในตู้เย็น 4 องศาเซลเซียส สำหรับไว้คัดเลือกตัวอย่างเห็ดที่มีฤทธิ์ต้านแคนดิดา
6. นำส่วนที่ได้จากข้อ 4 และ 5 ของตัวอย่างเห็ดแต่ละชนิด มาทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อแคนดิดา แล้วทำการทดสอบฤทธิ์ต้านแคนดิดา โดยวิธี agar paper disc diffusion method⁽³⁵⁾ ใช้เชื้อทดสอบยีสต์ 3 สายพันธุ์ คือ *Candida albicans*, *C. krusei* และ *C. tropicalis*
 - 6.1 โดยทำการถ่ายเชื้อทดสอบจาก stock culture แต่ละชนิด มาเพาะเลี้ยงใน Petri disc ที่บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อ Sabouraud dextrose agar (SDA) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

6.2 จากนั้นถ่ายเชื้อทดสอบลงในหลอดทดลองที่บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อ Sabouraud dextrose broth (SDB) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ทำการบ่มเชื้อทดสอบที่อุณหภูมิห้องบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที เป็นเวลาประมาณ 18-20 ชั่วโมง

6.3 ทำการตรวจนับจำนวนเซลล์ที่ได้จากข้อ 6.2 ด้วย Hematocytometer และทำการเจือจาง cell suspension ด้วย SDB ให้มีปริมาณเซลล์ใน cell suspension สุดท้ายประมาณ 1×10^6 เซลล์/มิลลิลิตร

6.4 นำ cell suspension ที่ได้จากข้อ 6.3 มาเกลี่ย (swab) บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ SDA นำสารสกัดของเห็ดแต่ละชนิดที่ได้ในขั้นตอนที่ 4 และ 5 ปริมาตร 15 ไมโครลิตร ไปหยดลงบน paper disc (ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร) ที่ผ่านการทำให้ปราศจากเชื้อแล้ว

6.5 จากนั้นวาง Paper disc ที่ได้หยดสารละลายสารสกัดเห็ดแล้ว ปล่อยให้แห้งใน chamber ของ Laminar flow แล้วนำ Paper disc เหล่านี้ มาวางบน Petri disc ที่บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อ Sabouraud dextrose agar (SDA) แล้วทำการบ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ทำการบันทึกผล วัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของวงใส (clear zone หรือ inhibition zone) ที่เกิดขึ้นด้วย digital vernier caliper มีหน่วยเป็นมิลลิเมตร

7. ทำการทดสอบหาทดสอบหาค่า MIC (Minimal Inhibitory Concentration) ของสารสกัดเห็ดที่แยกได้ โดยวิธี broth dilution method⁽¹⁵⁾

7.1 โดยคัดเลือกสารสกัดเห็ดที่ให้ผลการทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบ ที่มีวงใสกว้างมากที่สุด มาหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดเห็ดที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบ โดยทำการเตรียมสารสกัดเห็ดที่ได้จากข้อ 4 และ 5 มาทำให้แห้งโดยใช้ rotary evaporator เพื่อให้ได้ crude extract แล้วจึงนำ crude extract มาละลาย ด้วยน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และผสมกับอาหารเลี้ยงเชื้อ SDB ที่มีความเข้มข้นสองเท่า ที่บรรจุในหลอดทดลองมีปริมาตร 1 มิลลิลิตร จำนวน 1 หลอด (หลอดที่ 1) จากนั้นเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ SDB ที่มีความเข้มข้นปกติ และมี cell suspension ของเชื้อทดสอบอยู่ประมาณ 1×10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร อีกจำนวน 8 หลอดๆละ 1 มิลลิลิตร รวมหลอดทดลองทั้งหมดมี 9 หลอด

7.2 ทำการถ่ายสารละลายจากหลอดทดลองที่ 1 ลงในหลอดทดลองที่ 2 ที่บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อ SDB ที่มีความเข้มข้นปกติ และมี cell suspension ของเชื้อทดสอบอยู่ประมาณ 1×10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าหลอดทดลองด้วย vortex จากนั้น ถ่ายสารละลายจากหลอดทดลองที่ 2 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองที่ 3 เขย่าหลอดทดลองด้วย vortex ทำเช่นเดียวกันนี้ไปตลอดจนถึงหลอดที่ 8 แล้วถ่ายสารละลายจากหลอดที่ 8 ทั้งหมด 1 มิลลิลิตร ดังนั้น จะได้ความเข้มข้นของสาร

สกัดให้ลดลงครึ่งหนึ่งในแต่ละหลอดทดลอง และหลอดที่ 9 เป็นหลอดควบคุมที่มีเฉพาะเชื้อทดสอบอย่างเดียว การปฏิบัติต้องทำด้วยความระมัดระวังโดยใช้เทคนิคปลอดเชื้อ (Aseptic technique) ในทุกขั้นตอน

7.3 นำชุดหลอดทดลองนี้ทั้ง 9 หลอดไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วตรวจเช็คการเจริญของเชื้อทดสอบโดยการดูความขุ่นที่ความเข้มข้นต่างๆของแต่ละหลอดทดลอง บันทึกระดับความเจือจางของสารสกัดให้สูงสุดที่ไม่มีการเจริญของเชื้อทดสอบหรืออาหารเลี้ยงเชื้อไม่ขุ่น เป็นค่า MIC

8. นำสารสกัดแห้งที่ได้ให้ผลการทดลองดีที่สุดในการทดลองขั้นตอนที่ 6 มาทำการแยกสารด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีแบบแผ่นบาง (Thin layer Chromatography, TLC)⁽³⁰⁾ และตรวจสอบ active fraction ของสารสกัดแห้งที่แยกได้โดยวิธี Bioautography

8.1 spot ตัวอย่างสารละลายสารสกัดแห้งบนแผ่นกระจก TLC ที่เคลือบด้วย silica gel ทำหน้าที่เป็น stationary phase นำแผ่น TLC หย่อนลงใน chamber ที่มีส่วนผสมของสารละลายที่ทำหน้าที่เป็นเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) คือ chloroform : methanol 10:1 อย่างช้าๆ ในแนวตั้ง ด้วยความระมัดระวัง โดยให้มีหยดสารสารสกัดแห้งอยู่เหนือระดับสารละลายของเฟสเคลื่อนที่ ปิดฝา chamber แล้วรอจนสารละลายเคลื่อนที่ถึงระดับที่ต้องการ คือประมาณ 0.5 ซม.จากขอบบนของแผ่น TLC ตำแหน่งนี้เรียกว่า solvent front ยกแผ่น TLC ออก รีบทำเครื่องหมายตรง solvent front ปล่อยให้แห้ง 2 – 3 นาที ทำการบันทึกผลตำแหน่งสารจากการนำไปส่องด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ต แล้วทำเครื่องหมายรอบจุดที่บ่งแสง และ/หรือ สเปรย์ด้วยสารละลายไอโอดีน บันทึกระยะทางที่สารเคลื่อนที่ แล้วคำนวณค่า Rf แต่ละ fraction ที่แยกได้

8.2 การตรวจสอบ active fraction ของสารสกัดแห้งที่แยกได้โดยวิธี Bioautography โดยการนำ cell suspension ที่มีความเข้มข้นของเซลล์เท่ากับ 1×10^6 เซลล์/มิลลิลิตร ของเชื้อทดสอบแต่ละชนิด 3 มาเกลี่ย (swab) บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ SDA แล้วนำแผ่น TLC ที่หยดสารละลายสารสกัดแห้ง และผ่านการชะด้วย mobile phase และปล่อยให้แห้ง mobile phase แห้งสนิทแล้ว มาวางบนบิวด์หน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ SDA โดยให้ด้านที่เคลือบด้วย silica gel ติดกับบิวด์หน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ ทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที แล้วยกแผ่น TLC ออก นำจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีรอยของสารตัวอย่างให้แต่ละ fraction อยู่ ไปบ่มในตู้บ่มอุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ทำการบันทึกผลโดยการตรวจดูวงใส (clear zone หรือ inhibition zone) ที่เกิดขึ้นในแต่ละ fraction

บทที่ 43

ผลการวิจัยดำเนินงาน ปัญหาและอุปสรรค

1. ผลการสำรวจ รวบรวมตัวอย่างเห็ดป่าในเขตอุทยานแห่งชาติภูหินร่องกล้า

จากการสำรวจ และรวบรวมชนิดตัวอย่างเห็ดป่าในบริเวณป่าสนบริเวณบ้านพัก บริเวณเส้นทางเดินเท้าศึกษาธรรมชาติไปสู่ลานหินปุ่ม ผาชัน ที่หลบภัยทางอากาศ และสำนักอำนวยการ แบบสุ่ม ของอุทยานแห่งชาติภูหินร่องกล้า ดังรูปที่ 6. จำนวนทั้งหมด 14 จุด ในฤดูฝน ฤดูร้อน และฤดูหนาว บันทึกภาพด้วยกล้องถ่ายรูป บันทึกข้อมูลลักษณะทางสัณฐานวิทยาต่าง ๆ ทั้งลักษณะที่มองเห็นได้ด้วยตาเปล่า และลักษณะที่เห็นภายใต้กล้องจุลทรรศน์ สภาพถิ่นกำเนิด สำรวจตัวอย่างเห็ดทั้งหมดได้ 69 ชนิด ดังตารางที่ 1.

ตารางที่ 1. แสดงจำนวนตัวอย่างเห็ดทั้งหมดที่สำรวจได้ในแต่ละฤดู

ช่วงเวลา	จำนวนตัวอย่างเห็ด (ชนิด)	ร้อยละ(%)
ฤดูหนาว พฤศจิกายน 2551-กุมภาพันธ์ 2552	23	33.33
ฤดูร้อน มีนาคม - มิถุนายน 2552	9	13.04
ฤดูฝน กรกฎาคม- ตุลาคม 2552	46	66.66
มีจำนวนตัวอย่างทั้งหมด	69	100

หมายเหตุ เห็ดบางชนิดพบได้มากกว่า 1 ฤดู

Formatted: Normal

Formatted: Font: (Default) Cordia New, 18 pt, Complex Script Font: Cordia New, 18 pt

Formatted: Font: (Default) Cordia New, 18 pt, Complex Script Font: Cordia New, 18 pt

Formatted: Normal, Centered

Formatted: Normal



รูปที่ 6. แสดงตำแหน่งบริเวณเก็บตัวอย่างเห็ดป่าในพื้นที่อุทยานแห่งชาติภูหินร่องกล้าจำนวน 14 จุด

2. ผลการศึกษากการจ้ดจ้แนกชนิดเห้ดป้

การศึกษาการจัดจำแนกชนิดเห็ดป่าโดยศึกษาจากลักษณะรูปร่าง โครงสร้างต่างๆของดอกเห็ด ขนาด สี กลิ่น ถิ่นกำเนิดอาศัยของ fruiting body ลักษณะ Basidium รูปร่างสปอร์ รวมทั้งข้อมูลอื่นๆ ที่สำคัญที่ใช้ประกอบในการคีย์ เอกสารที่ใช้สำหรับการจัดจำแนกชนิด ได้แก่เอกสารอ้างอิง ลำดับที่ 27-32 และ 39-48 สามารถจำแนกชนิดได้ 25 family จัดอยู่ในไฟลัม Basidiomycota จำนวน 22 family และ Ascomycota จำนวน 3 family และไม่สามารถบ่งบอกชนิดได้ จำนวน 3 ตัวอย่าง ดังแสดงผลในตารางที่ 2. และรูปที่ 7.-15.

ตารางที่ 2. จำนวน วงศ์ และ ชนิด ของเห็ดราที่พบในฟิล์ม Basidiomycota และ Ascomycota ที่สำรวจพบในอุทยานแห่งชาติภูหินร่องกล้า ในระหว่าง ธันวาคม 2551– ธันวาคม 2552

Phylum	Family	ตัวอย่าง
Basidiomycota	Polyporaceae	<i>Polyporus</i> sp. PHK 24 <i>Fomes</i> sp. <i>Pycnoporus sanguineus</i> <i>Microporus xanthopus</i> <i>Microporus</i> sp. <i>Fomes</i> sp. <i>Lentinus polychrus</i> <i>Lentizites</i> sp. <i>Trametes</i> sp.
	Sclerodermataceae	<i>Scleroderma citrinum</i> <i>Scleroderma flavidum</i> <i>Scleroderma polyrhizum</i>
	Lycopodaceae	<i>Lycopodon</i> sp.
	Geastraceae	<i>Geatrum</i> sp.
	Agaricaceae	<i>Chlorophyllum molybdites</i> <i>Agaricus</i> sp. <i>Lepiota</i> spp. <i>Leucolepiota</i> sp. <i>Macrolepiota</i> sp.
	Cortinariaceae	<i>Cortinarius</i> sp. <i>Inocybe</i> sp.
	Coprinaceae	<i>Coprinus</i> sp.
	Cantharellaceae	<i>Cantharellus</i> sp.
	Amanitaceae	<i>Amanita hemibapha</i> <i>Amanita pantherina</i> <i>Amanita</i> spp.

ตารางที่ 2. จำนวน วงศ์ และ ชนิด ของเห็ดราที่พบในฟิล์ม Basidiomycota และ Ascomycota ที่สำรวจพบในอุทยานแห่งชาติภูหินร่องกล้า ในระหว่าง ธันวาคม 2551– ธันวาคม 2552 (ต่อ)

Phylum	Family	ตัวอย่าง
Basidiomycota(ต่อ)	Ganodermataceae	<i>Ganoderma lucidum</i> <i>Ganoderma</i> spp. <i>Amauroderma rude</i>
	Russulaceae	<i>Russula</i> spp. <i>Russula mairei</i> <i>Lactarius hatsudake</i> <i>Lactarius deliciosus</i>
	Schizophyllaceae	<i>Schizophyllum commune</i>
	Coriolaceae	<i>Coriolus veriscolor</i>
	Nidulaceae	<i>Cyathus straitus</i>
	Steraceae	<i>Stereum ostrea</i>
	Dacrymycetaceae	<i>Calocera viscosa</i> <i>Dacryopinax spathularia</i>
	Marasmiceae	<i>Miramius</i> spp. <i>Armillariella</i> sp. <i>Marasmiellus</i> sp. <i>Omphalotus</i> sp.
	Fomitopsidaceae	<i>Fomitopsis</i> sp.
	Thelephorace	<i>Thelephora vialis.</i>
	Boletaceae	<i>Boletus</i> spp. <i>Boletellus</i> sp. <i>Heimiella</i> sp. <i>Phylloporus</i> sp. <i>Tylopius chromopes</i>
	Suillaceae	<i>Suillus intermedius</i>

ตารางที่ 2. จำนวน วงศ์ และ ชนิด ของเห็ดราที่พบในฟาร์ม Basidiomycota และ Ascomycota ที่สำรวจพบในอุทยานแห่งชาติภูหินร่องกล้า ในระหว่าง ธันวาคม 2551– ธันวาคม 2552 (ต่อ)

Phylum	Family	ตัวอย่าง
Basidiomycota(ต่อ)	Tricholomataceae	<i>Termitomyces eurrhiza</i> <i>Termitomyces clypeatus</i> <i>Hygrocybe</i> sp. <i>Lepista</i> sp. <i>Macrocybe</i> sp. <i>Xeromphlina</i> sp.
	Unidentified	3 ตัวอย่าง
Ascomycota	Xylariaceae	<i>Xylaria</i> sp. <i>Daldinia concentrica</i>
	Leotiaceae	<i>Leotia</i> sp.
	Helvellaceae	<i>Helvella</i> sp.



รูปที่ 7. ตัวอย่างเห็ดสกุล *Amanita* spp. ที่สำรวจพบในอุทยานแห่งชาติภูหินร่องกล้า (1) *Amanita* sp.1
(2) *Amanita hemibapha* (3) *Amanita* sp.2 (4) *Amanita pantherina*



รูปที่ 8. เห็ดกระด้างที่สำรวจพบในอุทยานแห่งชาติภูหินร่องกล้า (1) *Ganoderma lucidum*
(2) *Fomitopsis* sp. (3) *Ganoderma applanatum* (4) *Trametes* sp. (5) *Lentizite vespacea*
(6) *Amauroderma rugosum*



รูปที่ 9. เห็ดโคนที่สำรวจพบในอุทยานแห่งชาติภูหินร่องกล้า (1) *Termitomyces eurhiza* และรังปลวก (2) *Termitomyces eurhiza* (3) *Termitomyces clypeatus*



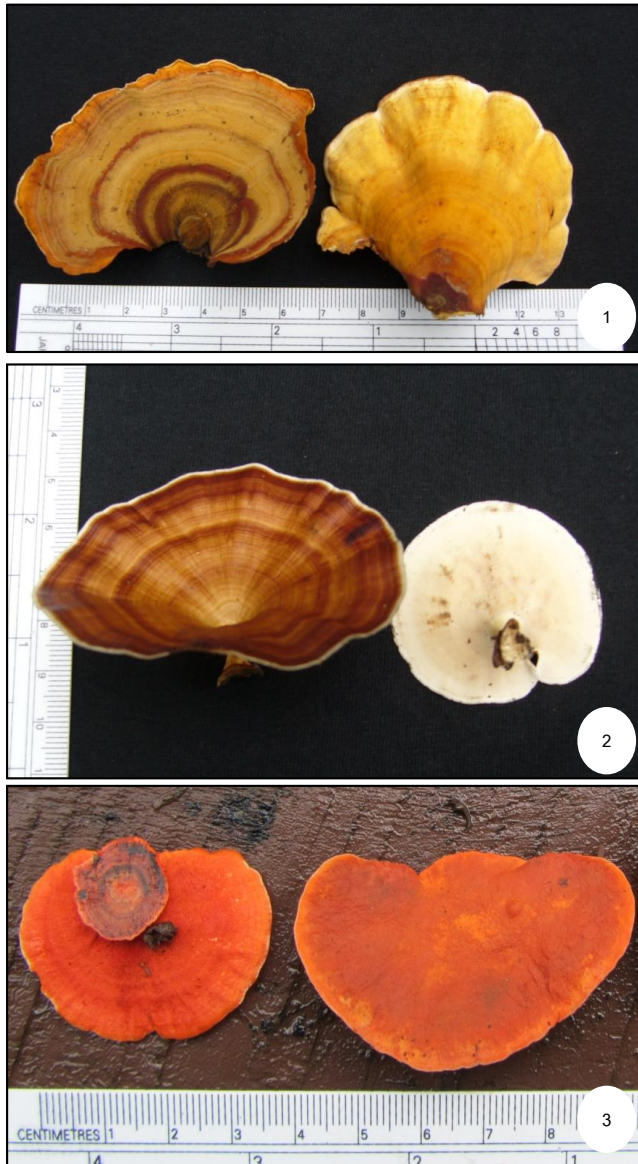
รูปที่ 10. เห็ดในวงศ์ boletaceae ที่สำรวจพบในอุทยานแห่งชาติภูหินร่องกล้า (1) *Boletus* sp.
(2) *Boletus chromapes*



รูปที่ 11. เห็ดในวงศ์ russulaceae ที่สำรวจพบในอุทยานแห่งชาติภูหินร่องกล้า (1) *Russula* sp.
(2) *Russula fragilis*



รูปที่ 12. Coral fungi ที่สำรวจพบในอุทยานแห่งชาติภูหินร่องกล้า (1) *Thelephora vialis*. (2) *Pterula verticella* (3) Unidentified (4) *Scyrtinoogon angulisporus*



รูปที่ 13. เห็ดกระด้างที่สำรวจพบในอุทยานแห่งชาติภูหินร่องกล้า (1) *Stereum ostrea* (2) *Microporus*

xanthopus (3) *Pycnoporus sanguineus*



รูปที่ 14. Coral fungi ที่สำรวจพบในอุทยานแห่งชาติภูหินร่องกล้า (1) *Thelephora vialis*.
(2) *Pterula verticella* (3) Unidentified (4) *Scytinooogon angulisporus*



รูปที่ 15. เห็ด class Gasteromycetes ที่สำรวจพบในอุทยานแห่งชาติภูหินร่องกล้า (1) *Scleroderma polyrhizum* (2) *Scleroderma sinnamariense* (3) *Lycopodon* sp.

3. ผลการเพาะเลี้ยงเส้นใยเห็ดให้บริสุทธิ์บางชนิด และการสกัดตัวอย่างเห็ด (ดอกเห็ด) ต่อฤทธิ์ต้านแคนดิดา

การเพาะเลี้ยงเส้นใยเห็ดบริสุทธิ์ที่สามารถแยกได้ 10 ชนิด เมื่อนำมาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ กิ่งสังเคราะห์ ในอาหารเหลว PDB และ GYB ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ที่บรรจุในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง บนเครื่องเขย่าที่มีความเร็ว 120 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 วัน จากนั้นกรองเอาส่วนน้ำเลี้ยง นำมาทดสอบเพื่อคัดเลือกฤทธิ์ต้านแคนดิดา

ส่วนดอกเห็ด(basidiocarp)ที่เก็บรวบรวมนำไปอบแห้งใน hot air oven ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส จนแห้งสนิท (ประมาณ 3-5 วัน) จากนั้น นำไปบดให้ละเอียดด้วย stone motorized grinder แล้วนำผงละเอียดปริมาณ 2.50 กรัม/100 มิลลิลิตร (W/V) ไปสกัดด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิด คือ methanol , Ethyl acetate และ chloroform นำส่วน organic solvent fraction นำมาทดสอบเพื่อคัดเลือกฤทธิ์ต้านแคนดิดาโดยวิธี agar paper disc diffusion method⁽¹⁴⁾ ใช้เชื้อทดสอบยีสต์ 3 สายพันธุ์ คือ *Candida albicans*, *C. krusei* และ *C. tropicalis* วัดขนาดของเส้นผ่าศูนย์กลางของวงใสรอบ paper disc มีหน่วยเป็นมิลลิเมตร พบว่าสารสกัดจากดอกเห็ด 10 ชนิด ที่มีฤทธิ์ต้านต้านแคนดิดาสูงสุดในแต่ละชนิดของตัวทำละลาย ดังตารางที่ 3.

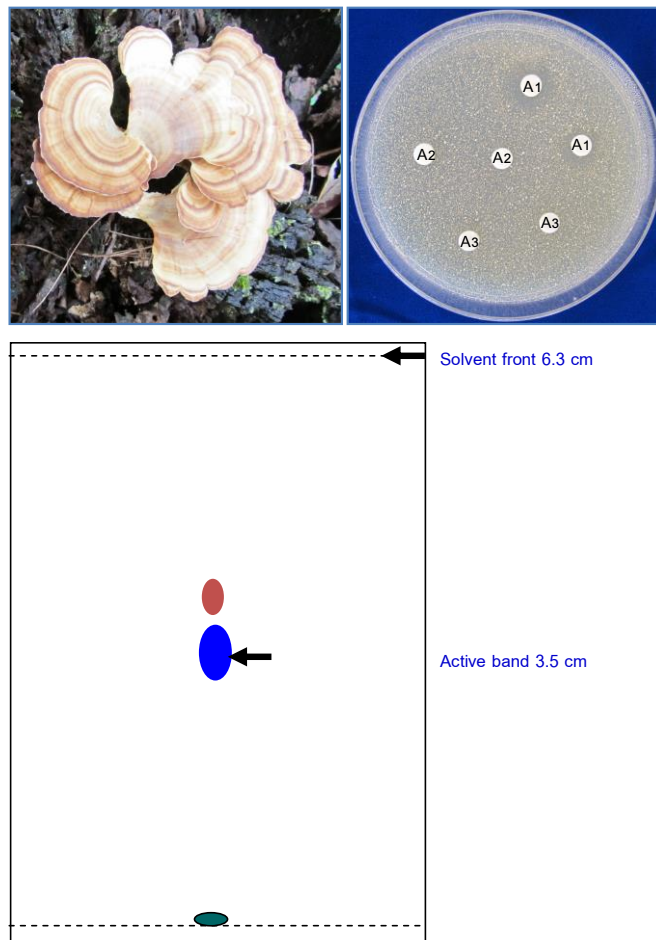
4. ผลทำการทดสอบฤทธิ์ต้านแคนดิดา

จากผลการคัดเลือกการทดสอบฤทธิ์ต้านแคนดิดาโดยวิธี agar paper disc diffusion method ต่อเชื้อทดสอบยีสต์ 3 สายพันธุ์ ที่มีเส้นผ่าศูนย์กลางของวงใสมากที่สุด ในตารางที่ 3. โดยนำผงละเอียดของตัวอย่างเห็ดแห้ง ปริมาณ 2.5 กรัม/100 มิลลิลิตร (W/V) และน้ำเลี้ยงจากเส้นใย อัตราส่วน 1: 1 (v/v) มาสกัดด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิด คือ methanol , Ethyl acetate และ chloroform นำส่วน organic solvent fraction แล้วมาระเหยให้แห้งด้วย rotary evaporator ได้ สารสกัดหยาบ (crude extract) นำมาหาค่า MIC (Minimal Inhibitory Concentration) โดยวิธี broth dilution method และนำสารสกัดหยาบมาศึกษาแยกส่วนของสารที่มีฤทธิ์ต้านแคนดิดา โดยวิธี Thin layer chromatography (TLC) และ นำโครมาโตแกรมที่ได้มาศึกษาหาค่า Rf ของ active fraction โดยวิธี Bioautography ได้ผลดังรูปที่ 16.

ตารางที่ 3. แสดงผลของฤทธิ์ต้านแคนดิดาของน้ำสกัดของของเส้นใย และน้ำสกัดของดอกเห็ด
(ชนิดของตัวทำละลาย)

Family	ตัวอย่าง	Anticandida activity		
		Diameter of Inhibition zone(mm)		
		basidiocarps extract	mycelium	broth
			PDB	GYB
Polyporaceae	<i>Polyporus sp.</i> PHK 24	15.0 (M)	8.0	10.0
Sclerodermataceae	<i>Scleroderma polyrhizum</i>	9.0 (E)	7.0	7.5
Agaricaceae	<i>Agaricus sp.</i>	8.5 (E)	8.0	8.0
	<i>Chlorophyllum molybdites</i>	10.0 (M)	8.0	7.0
	<i>Lepiota sp.</i>	8.0 (E)	6.5	-
	<i>Macrolepiota sp.</i>	8.5 (E)	-	7.5
Coprinaceae	<i>Coprinus sp.</i>	7.5 (M)	6.5	7.5
Ganodermataceae	<i>Ganoderma lucidum</i>	11.5 (E)	7.0	8.5
Schizophyllaceae	<i>Schizophyllum commune</i>	7.5 (C)	7.0	-
Xylariaceae	<i>Xylaria sp.</i>	10.0 (C)	8.0	7.0

หมายเหตุ ชนิดของตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดตัวอย่าง คือ E = Ethyl acetate , M = methanol
และ C = chloroform



รูปที่ 16. แสดงตัวอย่างเห็ดที่มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อแคนดิดาที่ดีที่สุด

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

บทที่ 54

อภิปรายและสรุปผลการวิจัย

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) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยนี้ที่พบเห็ดครีบมากในฤดูฝน และมักจะเป็นพวกที่เน่าสลายได้ง่ายที่สุด

2 การศึกษาการจัดจำแนกชนิดเห็ดป่า

การศึกษการจัดจำแนกชนิดเห็ดป่าโดยศึกษาจากลักษณะรูปร่าง โครงสร้างต่างๆ ของดอกเห็ด ขนาด สี กลิ่น ถิ่นกำเนิดอาศัย ของ fruiting body ลักษณะ Basidium สีสันสปอร์ 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 และพบเชื้อราขนาดใหญ่ในไฟลัม Ascomycota จำนวน 3 family 4 genus คือ xylariaceae จำนวน 2

Formatted: Font: (Default) Cordia New, 18 pt, Complex Script Font: Cordia New, 18 pt

Formatted: Normal, Left

Formatted: Normal

Formatted: Font: (Default) Cordia New, 18 pt, Complex Script Font: Cordia New, 18 pt

Formatted: Font: 18 pt, Complex Script Font: 18 pt

Formatted: Font: (Default) Cordia New, 18 pt, Complex Script Font: Cordia New, 18 pt

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 และนอกจากนี้การเจริญของเส้นใยเห็ดใช้เวลาาน มากกว่า 7 วัน และได้เส้นใยที่เป็นหมัน มีลักษณะเส้นใยที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA บางมาก แม้ว่าอาหารเลี้ยงเชื้อนี้จะเหมาะต่อการแยกเส้นใยของเห็ด⁽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) และ Glucose 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 แล้วนำไปจุ่มในภาชนะที่บรรจุตัวทำ

ละลายผสมที่เป็นเฟสเคลื่อนที่ โดยใช้อัตราส่วน chloroform : methanol เท่ากับ 10:1 โดยให้ระดับของตัวทำละลายต้องอยู่ต่ำกว่าระดับของจุดที่หยดสารผสมไว้ ตัวทำละลายจะซึมไปตามเฟสอยู่กับที่ด้วยการซึมตามรูเล็กเหมือนกับน้ำที่ซึมไปในกระดาษหรือผ้า เมื่อซึมถึงจุดที่หยดสารผสมไว้ ตัวทำละลายจะชะเอาองค์ประกอบในสารผสมนั้นไปด้วยอัตราเร็วที่แตกต่างกัน ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับสภาพมีขั้ว (polarity) ของสารที่เป็นองค์ประกอบกับสารที่เป็นตัวทำละลาย ถ้าตัวทำละลายเป็นโมเลกุลมีขั้ว (polar molecules) จะชะเอาสารในสารผสมที่เป็นสารมีขั้วไปได้เร็ว 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

และข้อเสนอแนะ

1. ควรเลือกทำการวิจัยในแง่ความหลากหลายอย่างเดียวเพราะว่าการเก็บตัวอย่างเห็ดในแต่ละครั้งไม่สามารถกำหนดปริมาณของตัวอย่างให้ได้ตามปริมาณที่ต้องการต่อการทำการทดลองได้ในทุกขั้นตอน
2. ควรเก็บข้อมูลทางด้านนิเวศวิทยาเพื่อทราบการกระจายตัวทางภูมิศาสตร์ และปัจจัยที่ทำให้เห็ดมีการกระจายตัวที่แตกต่างกัน และควรเพิ่มความถี่ในการสำรวจจากทุก 2 เดือน เป็นเดือนละครั้งเนื่องจากเห็ดบางชนิดมีวงจรชีวิตสั้น

Formatted: Font: 16 pt, Complex Script Font: 16 pt

Formatted: Normal

Formatted: Font: (Default) Cordia New, Complex Script Font: Cordia New

เอกสารอ้างอิง

1. http://www.tourthai.com/province/phetchabun/phuhin_rongkra_t.shtml
2. <http://www.hamanan.com/tour/phitsanulok/mapphuhinrongkla.html>
3. <http://travel.kapook.com/view8044.html>
4. วิจัย รักรักษาศาสตร์ .2546. ราชวิทยาลัยป้องกันพิษครั้งที่ 1. โรงพิมพ์จามจุรีไปรษณีย์ กรุงเทพฯ. 351 หน้า
5. [^{\(33\)}](http://www.emc.maricopa.edu/faculty/farabee/biobk/biobookdiversity_4.html)
6. http://www.toxinology.com/fusebox.cfm?staticaction=poisonous_mushrooms/mushrooms_idfile1.htm
7. Ulrike Lindequist *et.al.* 2005. The pharmacological potential of mushrooms. *eCAM*. 2(3), 285-299.
8. Jonathan S.G. and I.O.Fasidi. 2003. Antimicrobial activities of two Nigerian edible macrofungi *Lycopodon pusillum* and *L. giganteum*. *African journal of biomedical research*.6;85-90.
9. http://www.mushworld.com/medicine/view.asp?cata_id=6900&vid=6687
10. ปัญญา โพธิ์สุตติรัตน์. 2539. ภาควิชาเกษตรศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์และอุตสาหกรรม สหวิทยาลัยรัตนโกสินทร์ จันทบุรี กรุงเทพฯ.
11. อนงค์ จันทศรีกุล และคณะ .2529. การศึกษาเห็ดกลุ่ม agarics ในประเทศไทย.วารสารวิทยาศาสตร์.40 (1) :5-11.
12. อนงค์ จันทศรีกุล. 2535. เห็ดเมืองไทย. พิมพ์ครั้งที่ 4 บริษัทโรงพิมพ์ไทยวัฒนาพานิช จำกัด. กรุงเทพฯ. 161 หน้า.
13. <http://www.florahealth.com/Flora/home/usa/HealthInformation/Encyclopedias/ShiitakeMushroom.asp#Overview>
14. http://simon-watts.blogspot.com/2010_04_01_archive.html

15. กัญญา ปรีชาสุทธิ, ขจรศักดิ์ ตระกูลพั้ว และ บงกชวรรณ สุตะพาหะ. 2547. เชื้อราที่สำคัญทาง การแพทย์ ภาควิชาจุลชีววิทยาคลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
16. นงนุช วณิทยธนาคม. 2540. วิทยาเชื้อราทางการแพทย์. พี.บี.ฟอเรน บุคส์ เซ็นเตอร์ พิมพ์ครั้งที่ 1 กรุงเทพฯ.
17. <http://m.eb.com/assembly/117167>
18. http://www.graphicshunt.com/health/images/candida_albicans-667.htm
19. <http://thunderhouse4-yuri.blogspot.com/2009/12/candida-albicans.html>⁽¹⁹⁾
20. <http://www.modernmedicalguide.com/candidiasis/>
21. www.forest.go.th/research/pathology/pm9.htm-4k
22. www.sut.ac.th/ird/page/AbstractPDF/SUT3-304-42-12-10.pdf
23. ธีรวัฒน์ บุญทวีกุล, ยศนันท์ พรหมโชติกุล และ อรุณี วิณิน. 2547. ความหลากหลายของเห็ดใน พื้นที่เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเขาอ่างฤๅไน หน้า 134-145. ใน รายงานการประชุมความหลากหลาย ทางชีวภาพ งานวิจัยจากอดีตสู่ปัจจุบัน วันที่ 30 สิงหาคม- 3 กันยายน 2547 ณ โรงแรมเวียง- อินทร์ จังหวัดเชียงราย. 419 หน้า
24. Wasser AL. Weis AL.1999.Medicinal properties of substances occurring in higher basidiomycetes mushrooms : Current perspective (Review). International Journal of Medicinal Mushrooms. 1, 31-62
25. Nora Hatvani. 2001. Antibacterial effect of the culture fluid of *Lentinus edodes* mycelium grown in submerged liquid culture. International Journal of Antimicrobial Agents.17.71-74.
26. Aziz Turkoglu *et.al.* 2007. Antioxidant and antimicrobial activities of *Laetiporus sulphureus* (Bull.) Murrill Food Chemistry. 101(1).267-273.
27. Martin B.ELLis and J. Pamela Ellis.1991. Fungi without gills (Hymenomycetes and Gasteromycetes). An identification handbook . Chapman and Hall.
28. <http://www.mycology.com/>
29. <http://www.mykoweb.com/CAF/index.html>
30. <http://americanmushrooms.com/jewels.htm>
31. <http://www.mykoweb.com/boletes/index.html>
32. ราชบัณฑิตยสถาน. 2539. เห็ดกินได้และเห็ดพิษในประเทศไทย ฉบับราชบัณฑิตยสถาน.

- บริษัทอมรินทร์พริ้นติ้งแอนด์พับลิชชิ่ง จำกัด (มหาชน). กรุงเทพฯ. 180 หน้า.
33. Martyn A. Ainswoth. 1993. Isolation techniques for basidiomycetes. Technical Information Sheet No. 11. Published by UNESCO/WFCC-Education Committee .
 34. Shittu, O.B. *et.al.* 2006. Bioautographic evaluation of antibacterial metabolites production of wild mushrooms. Africa Journal of Biomedical Research. 9(1), 57-62.
 35. NCCLS. 2003. Method for antifungal disk diffusion susceptibility testing of yeasts; *Proposed Guideline*. NCCLS, document M44-P [ISBN 1-56238-488-0]. NCCLS, Pennsylvania, USA .
 36. <http://www.life.umd.edu/classroom/bsci424/LabMaterialsMethods/BrothTubeMIC.htm>
 37. ดีพร้อม ไชยวงศ์เกียรติ 2524. การเพาะเห็ดและเห็ดบางชนิดในประเทศไทย. ภาควิชาชีววิทยา. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน. โรงพิมพ์มิตรสยาม กรุงเทพฯ ฯ.
 38. http://www.lks.ac.th/student/kroo_su/chem11/sub10.html
 39. David L. Largent. 1986. How to identify mushrooms to genus I : Macroscopic features. Eureka Printing Co., Inc. USA.
 40. David L. Largent and Harry D. Thiers. 1977. How to identify mushrooms to genus II : Field identification of genera. Eureka Printing Co., Inc. USA.
 41. David L. Largent, David Johnson and Roy Watling. 1977. How to identify mushrooms to genus III : Microscopic features. Eureka Printing Co., Inc. USA.
 42. Daneil E. Stuntz. 1977. How to identify mushrooms to genus IV : Key to families and genera. Eureka Printing Co., Inc. USA.
 43. Roy Watling. 1977. How to identify mushrooms to genus V : Cultural and developmental features. Eureka Printing Co., Inc. USA.
 44. David L. Largent and Timothy J. Baroni. 1988. How to identify mushrooms to genus VI : Modern Genera. Eureka Printing Co., Inc. USA.
 45. Bill Russell. 2006. Field guide to wild mushroom of Pennsylvannia and the mid-Atlantic. The Pennsylvannia State University Press.
 46. ราชบัณฑิตยสถาน. 2550. เห็ดในประเทศไทย. ราชบัณฑิตยสถานจัดพิมพ์ ครั้งที่ 2. บริษัทที่พิมพ์ จำกัด นนทบุรี. 272 หน้า.
 47. อนงค์ จันทรศรีกุล และคณะ. 2551. ความหลากหลายของเห็ดราขนาดใหญ่ในประเทศไทย. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ. 514 หน้า.

48. ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ. 2544. เห็ดและราในประเทศไทย. สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ กรุงเทพฯ. 268 หน้า.
49. <http://www.ilmyco.gen.chicago.il.us/Taxa/KeytoKey1303.html>
50. Gerrit J.Keizer. 2007.The complete encyclopedia mushrooms. 2nd edition, Rebo publisher 286 pages
51. <http://malaysianfungi.blogspot.com/2010/02/media-for-culture-fungi.html>
52. http://www.lks.ac.th/student/kroo_su/chem11/sub10.html

ประโยชน์ที่ได้รับ

1. ได้ภาพถ่ายอย่างของเห็ดป่าชนิดต่างๆ ที่จัดรวบรวมไว้ใช้เป็นสื่อในการในการเรียน การสอนของ ภาควิชาฯ
2. ได้นำเสนอข้อมูลการวิจัยในที่ประชุมระดับนานาชาติ โดยการนำเสนอแบบโปสเตอร์ poster presentation

หน่วยงานที่สามารถนำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์ ได้แก่ หน่วยวิจัยเกี่ยวกับเห็ด และmicrobial bioactive compounds ในมหาวิทยาลัยต่าง ๆ และหน่วยงานอื่นๆ ที่เกี่ยวข้องกับทางด้านการแพทย์

ภาคผนวก

1. ได้นำเสนอข้อมูลการวิจัยในที่ประชุมระดับนานาชาติ โดยการนำเสนอแบบโปสเตอร์ poster presentation คือ The 3rd International Conferences on Natural Products for Health and Beauty. March 16-18, 2011 at The Emerald Hotel ,Bangkok Thailand.