บทที่ 4

อภิปรายและสรุปผลการวิจัย

อภิปรายผลการวิจัย

การเก็บตัวอย่างเห็ดรา การคัดแยก และการจัดจำแนกชนิดของเห็ดราที่ได้จากแหล่งธรรมชาติ

ในการเก็บตัวอย่างเห็ดราโดยเลือกเก็บบริเวณป่าชุมชนอำเภอนครไทย จังหวัดพิษณุโลก และป่าชุมชนจังหวัดพิจิตรนั้น เนื่องจากได้มีการสำรวจแล้วพบว่ามีเห็ดราขึ้นตลอดทั้งปีและจะมีมากในช่วงฤดูฝน อีกทั้งยังเป็นป่าธรรมชาติที่อนุรักษ์ไว้ในท้องถิ่น จากการออกเก็บตัวอย่างพบว่าโดยส่วนใหญ่ร้อยละ 90 ของตัวอย่างเห็ดราที่เก็บได้นั้นมาจากเขตพื้นที่แถบจังหวัดพิษณุโลก ส่วนตัวอย่างเห็ดราที่เก็บได้จากบริเวณพื้นที่ป่าชุมชนจังหวัดพิจิตรนั้นจะเป็นตัวอย่างเห็ดราที่เจริญบนขอนไม้มากกว่าเจริญบนดิน เนื่องจากบริเวณพื้นที่ป่าชุมชนจังหวัดพิจิตร ในฤดูฝนนั้นฝนไม่ตกต้องตามฤดูกาล จึงก่อให้เกิดความแห้งแล้งและมีความชื้นน้อยมาก ส่งผลให้ความหลากหลายของเห็ดรามีน้อยมาก จึงพบเฉพาะเห็ดราที่สามารถเจริญได้ในสภาวะที่แห้งแล้งหรือเป็นเห็ดราที่ทนร้อนได้เท่านั้น ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของอรพินท์ บุญทอง (2546) ที่เก็บตัวอย่างจากป่าชุมชนอำเภอนครไทยได้มากกว่าป่าชุมชนจังหวัดพิจิตร ซึ่งในงานวิจัยนี้สามารถเก็บตัวอย่างได้ทั้งหมด 239 ตัวอย่าง และคัดแยกได้มีจำนวนทั้งสิ้น 125 ไอโซเลต ซึ่งลักษณะของเส้นใยที่ได้แต่ละไอโซเลตนั้นแตกต่างกันไปตามชนิดและสภาวะแวดล้อมที่เห็ดราเจริญ โดยแบ่งเป็นเห็ดราที่เจริญบนดินจำนวน 52 ไอโซเลต เห็ดราที่เจริญบนไม้จำนวน 73 ไอโซเลต ทั้งนี้เส้นใยเห็ดราที่สามารถคัดแยกได้มีจำนวนน้อยอาจเนื่องมาจากเห็ดที่เก็บมามีสภาพไม่สมบูรณ์ เช่น มีหนอนเจาะภายในเนื้อเยื่อ มีรอยกัดแทะของแมลง เป็นต้น

ในการจัดจำแนกชนิดเห็ดราทั้ง 125 ชนิดนั้นสามารถจำแนกได้เป็น 13 ออเดอร์ 38 แฟมิลี 71 จีนัส และ 93 สปีชีย์ โดยมี 27 ไอโซเลต ที่จัดจำแนกได้เพียงระดับจีนัส และอีก 5 ไอโซเลตนั้นไม่สามารถระบุชนิดได้ โดยส่วนมากที่จัดจำแนกได้จะอยู่ในออเดอร์ Agaricales มากที่สุด จำนวน 53 สายพันธุ์ รองลงมาคือ ออเดอร์ Polyporales จำนวน 33 สายพันธุ์ ซึ่งถือว่ามีจำนวนไม่น้อยเมื่อเทียบกับจำนวนเห็ดราทั้งหมดในประเทศไทยที่รวบรวมโดยบัณฑิตยสถานในปี 2550 และ เกษม (2537) ที่พบประมาณ 82 ชนิด และ 94 ชนิด ตามลำดับ และพบว่ามีเกือบทุกชนิดเมื่อเทียบกับการศึกษาของอนงค์ ในปี 2544 แต่มี 5 ไอโซเลต ดังกล่าวที่ไม่สามารถระบุได้ ทั้งนี้อาจเป็นเพราะ

สภาพภูมิอากาศที่อาจจะมีผลต่อสัณฐานวิทยาของเห็ด ซึ่งมีผู้ศึกษาพบว่าเห็ดราที่พบต่างสถานที่กันนั้นอาจเป็นจีนัสเดียวกันเพียงแต่รูปร่างได้เปลี่ยนแปลงไปตามสภาพภูมิศาสตร์ ซึ่งถ้านำไปวิเคราะห์ระดับโมเลกุลอาจเป็นชนิดเดียวกันก็ได้ ดังนั้นจึงควรศึกษาถึงระดับโมเลกุล ซึ่งจะช่วยเพิ่มความถูกต้องในการระบุชนิดเห็ดรา (Petersen and Greilhuber, 1996)

การคัดกรองเห็ดราจากแหล่งธรรมชาติที่สามารถสร้าง ligninolytic enzymes ในขั้นต้นโดยการย่อยสลายสีสังเคราะห์

ในการทดสอบความสามารถของเห็ดราในการย่อยสลายสีสังเคราะห์แต่ละชนิด แล้วทำให้เกิดวงใสบนอาหารคัดแยกเฉพาะที่แตกต่างกันในระยะเวลา 15 วัน ทั้งนี้เป็นผลมาจากการทำปฏิกิริยา oxidation ระหว่างสีสังเคราะห์กับเอนไซม์ที่หลั่งออกมาโดยเห็ดราบนอาหารคัดแยกเฉพาะ (Premjet *et al.*, 2009) นอกจากนี้แล้วเห็ดราจะหลั่ง ligninolytic enzymes ออกมาย่อยสลายสีสังเคราะห์ควบคู่กับการสร้างระบบ H_2O_2-generating system จึงสามารถเข้าทำปฏิกิริยากับสับสเตรทได้ อย่างไม่เฉพาะเจาะจง (Akira *et al.*, 2002) โดยเชื้อเห็ดราแต่ละชนิดนั้นมีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ได้แตกต่างกันด้วย ซึ่ง Hatvani และคณะ (2002) รายงานว่าความสามารถในการสร้าง ligninolytic enzymes ของเห็ดราจะมากหรือน้อยนั้นขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของเชื้อและปริมาณสารอาหารที่ได้รับ โดยเฉพาะอย่างยิ่งสารอาหารในกลุ่มไนโตรเจน (N) และ microelements ที่ใช้เป็นสับสเตรทในการเจริญ รวมถึงสภาวะในการเพาะเลี้ยง และอาจเนื่องมาจากปฏิกิริยารีดักชันที่เกี่ยวข้องกับไนโตรเจนในอาหารและในสีสังเคราะห์ (Palmieria *et al.*, 2005; Pelaez *et al.*, 2005; Radha *et al.*, 2005; Marjina *et al.*, 2006) จึงเป็นผลที่สนับสนุนว่าทำไมเห็ดราแต่ละชนิดจึงมีความสามารถในการย่อยสลายสีได้แตกต่างกัน นอกจากนี้แล้วยังสอดคล้องกับการศึกษาของ Cinthia และคณะ (2004) ที่กล่าวว่ามีเห็ดราบางสายพันธุ์เท่านั้นที่สามารถสร้าง ligninolytic enzymes ได้ทั้ง 3 ชนิด ในขณะที่เห็ดราส่วนใหญ่ผลิตได้เฉพาะ 1 หรือ 2 เอนไซม์เท่านั้น (Leonowicz *et al.*, 2001)

ซึ่งในการทดสอบการย่อยสลายสีสังเคราะห์ RBBR Azuer-B และ Phenol red นั้นให้ผลสอดคล้องกับการทดลองของ Koker และคณะ (2000) ที่ทำการคัดกรองเห็ดราที่สร้าง ligninolytic enzymes โดยการย่อยสลายสีดังกล่าวในอาหารที่มีแหล่งไนโตรเจนสูงและต่ำ จำนวน 600 ไอโซเลต ซึ่งมีเพียง 48 % ที่ย่อยสีได้ และส่วนมากจะย่อยสลายสี RBBR ได้ ซึ่งในการทดสอบก็พบว่าเชื้อเห็ดราส่วนมากสามารถย่อยสลายสี RBBR ได้ เพราะว่าเชื้อส่วนใหญ่จะสร้างเอนไซม์ Laccase เป็นเอนไซม์หลักในระหว่างกระบวนการย่อยสลายสีสังเคราะห์ เนื่องจากเป็นเอนไซม์ชนิด multicoper enzyme ที่สามารถเข้าทำปฏิกิริยาออกซิเดชัน กับสีสังเคราะห์โดยไม่จำเป็นต้อง

ใช้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ในการเข้าทำปฏิกิริยากับสับสเตรท (Palmieria *et al.*, 2005; Emrah *et al.*, 2007)

การทดสอบการย่อยสลายสารสารประกอบ 2,4-PCB ในอาหาร production medium

การทดสอบการย่อยสลายสารประกอบ 0.25 mM 2,4-PCB โดยเชื้อเห็ดรา 7 สายพันธุ์ที่สามารถย่อยสลายสีสังเคราะห์ Azure-B Phenol red และ RBBR ได้ดีกว่าหรือเทียบเท่ากับเชื้อมาตรฐาน *P. chrysosporium* และ *T. versicolor* ที่เป็นตัวบ่งชี้การสร้าง ligninolytic enzymes ในขั้นต้น (Koker *et al.*, 2000) ซึ่งเชื้อเหล่านี้มีแนวโน้มในการย่อยสลายสารพิษที่ตกค้างในธรรมชาติรวมถึงสารโพลิเมอร์สังเคราะห์ หรือสารประกอบที่มีโครงสร้างคล้ายลิกนิน เช่น สีสังเคราะห์ต่างๆ โพลีอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน (PAHs) และสารประกอบโพลีคลอริเนเตดไบฟีนิล (PCBs) (Kadhim *et al.*,1999; Baldrian, 2008, Field, 2003)

จากการทดสอบย่อยสลายสารประกอบ 0.25 mM 2,4-PCB ของเชื้อเห็ดราแล้วเชื้อสามารถย่อยสลายสารประกอบได้แตกต่างกัน ทั้งนี้ประสิทธิภาพการย่อยสลายสารพิษนั้นขึ้นอยู่กันชนิดของสารพิษและชนิดของเห็ดราที่ใช้ในกระบวนการย่อยสลาย และโดยเฉพาะสารพิษที่ย่อยสลายได้ยาก เช่น PAHs และ PCBs ที่มีจำนวนคลอรีนอะตอมสูง (Field, 2003; Liliana and Maria , 2004; Field and Reyes, 2008) ซึ่งการย่อยสลายที่เกิดขึ้นพบว่าเชื้อที่สร้างเอนไซม์ LiP, Laccase และ MnP สามารถย่อยสลายได้ดีกว่าเชื้อที่สร้างเอนไซม์ได้เพียงเอนไซม์เดียว หรือสองเอนไซม์ หรือเชื้อที่ไม่สามารถสร้างเอนไซม์ LiP หรือ MnP ได้ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Liliana และ Maria (2004) พบว่าในการย่อยสลายสารประกอบ 2,4-PCB ที่มีคลอรีนอะตอมตั้งแต่ 1 ถึง 6 อะตอม เอนไซม์ที่มีบทบาทในกระบวนการที่จะย่อยสลายสารพิษได้อย่างมีประสิทธิภาพคือเอนไซม์ LiP และ MnP โดยเชื้อที่นิยมใช้ในการศึกษาได้แก่เชื้อ *Coriolopsis polyzona, Pleurotus ostreatus* และ *T. versicolor* แต่สำหรับเอนไซม์ Laccase จะมีบทบาทมากในกระบวนการย่อยสลาย PAHs และ สีสังเคราะห์ต่างๆ ซึ่งเชื้อที่มักใช้ในกระบวนการได้แก่เชื้อ *P. chrysosporium, T. versicolor* และ *Pycnoporus sanguineis* ซึ่งการศึกษาดังกล่าวสนับสนุนผลการย่อยสลาย 2,4-PCB ของเชื้อ *T. versicolor* ที่ให้อัตราการย่อยสลายได้ดีกว่าเชื้อ *P. chrysosporium* (Krumar and Ulrich, 1998; Novotny *et al.*, 2004)

ในกรณีของอาหารก็มีผลต่อการย่อยสลายสาร 2,4-PCB เช่นกัน เนื่องจากเชื้อบางชนิดย่อยได้ดีในอาหาร YMPG medium ที่มีเฉพาะแหล่งไนโตรเจน และแร่ธาตุเพียงแมงกานีสอย่างเดียว แต่เชื้อเกือบทั้งหมดย่อยสลายได้ดีกว่าในอาหาร Basal medium ซึ่งมีทั้งแหล่งไนโตรเจนจำกัด แร่ธาตุ และสารอาหารที่เหมาะสม ซึ่งสนับสนุนการวิจัยของ Krumar และ Ulrich (1998) ที่

ได้ทำการทดลองย่อยสาร PCBs ผสมคือ Delor 103 และ Delor 105 โดยเชื้อ *P. chrysosporium* ในอาหารที่มีแหล่งไนโตรเจนสูงและต่ำ พบว่าเชื้อไม่สามารถย่อยสลายได้ในอาหารที่มีแหล่งไนโตรเจนสูง เนื่องจากในสภาวะที่มีไนโตรเจนไม่จำกัดเอนไซม์ LiP และ MnP จะไม่ถูกชักนำในการย่อยสลาย ซึ่งก็เป็นเหตุผลหนึ่งที่ทำให้เชื้อ *P. chrysosporium* ที่ใช้ในการทดลองให้เปอร์เซ็นต์การย่อยสลายที่ต่ำในอาหาร YMPG medium ทั้งนี้ก็ขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อเช่นกัน (Graciela *et al.*, 2002)

อีกประการหนึ่งที่เชื้อทุกสายพันธุ์สามารถย่อยสลายสาร 2,4-PCB นอกจากการมี ligninolytic enzymes มาเกี่ยวข้องแล้ว อาจเป็นผลเนื่องมาจากมีการให้ออกซิเจนทุกวันประกอบกับปริมาณความเข้มข้นของ 2,4-PCB ที่มีความเหมาะสมต่อการย่อยสลาย จึงส่งผลให้เชื้อสามารถย่อยสลายได้เร็วขึ้นเพียงระยะเวลาแค่ 15 วัน และเนื่องมาจากมีจำนวนคลอรีนอะตอมเพียง 2 อะตอม และความเข้มข้นของสารตั้งต้นที่เหมาะสมต่อการย่อยสลาย ทำให้เชื้อย่อยสลายได้เร็วภายในเวลา 15 วัน โดย Satoshi และคณะ (1996) กล่าวว่าความสามารถในการย่อยสลายสาร PCBs จะลดลงเมื่อจำนวนคลอรีนอะตอมที่อยู่ในวงไบฟีนิลเพิ่มมากขึ้น นั่นก็คือยิ่งมีจำนวนคลอรีนอะตอมมากเท่าใดความสามารถในการย่อยสลายของเชื้อเห็ดราก็จะลดลงด้วยเช่นกัน (Satoshi *et al.*, 1996; Ashrafosadat *et al.*, 2009) อีกทั้งระยะเวลายังมีผลต่อการย่อยสลายสาร 2,4-PCB ของเชื้อเห็ดรา ซึ่งเมื่อระยะเวลาการย่อยสลายเพิ่มมากขึ้น ส่งผลให้เชื้อทุกชนิดมีอัตราการย่อยสลายที่สูงขึ้นด้วย (Premjet *et al.*, 2009)