

ผลของปุ๋ยไนโตรเจนต่อการเติบโตและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสาหร่ายผักกาดทะเล (*Ulva rigida*)

Effects of nitrogen fertilizers on growth and antioxidant activities of sea lettuce (*Ulva rigida*)

อัญชลี ต้นไชยชะ¹, พงศ์เชษฐ พิชิตกุล^{1*}, อีสริยา วุฒิสินธุ์¹ และ มณฑกานติ ท้ามตัน²

Anchali Tanchaiha¹, Phongchate Pichitkul^{1*}, Idsariya Wudtisinn¹ and Montakan Tamtin²

¹ คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน กรุงเทพฯ 10900

¹ Faculty of Fisheries, Kasetsart University, Bang Khen Campus, Bangkok, Thailand, 10900

² ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่งสมุทรสาคร จ.สมุทรสาคร 74000

² Samut Sakhon Coastal Aquaculture Research and Development Center, Samut Sakhon, Thailand, 74000

บทคัดย่อ: งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการเติบโตและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสาหร่ายผักกาดทะเล (*Ulva rigida*) ที่เลี้ยงด้วยปุ๋ยไนโตรเจนต่างกันในห้องปฏิบัติการ แบ่งเป็น 2 การทดลอง คือ การทดลองที่ 1 ศึกษาการเติบโตของสาหร่าย มี 3 ชุดการทดลอง ๆ ละ 4 ซ้ำคือ ชุดการทดลองที่ 1 เลี้ยงด้วยน้ำทะเล (T1) ชุดการทดลองที่ 2 เติมแอมโมเนียมคลอไรด์ให้มีความเข้มข้นของแอมโมเนียมรวม 5 มก.-ไนโตรเจน/ล. (T2) และชุดการทดลองที่ 3 เติมโซเดียมไนเตรทให้มีความเข้มข้นของไนเตรท 5 มก.-ไนโตรเจน/ล. (T3) โดยใช้น้ำหนักสาหร่ายและเปลี่ยนถ่ายน้ำ 100% ทุก ๆ 7 วัน ใช้ระยะเวลาทดลอง 21 วัน พบว่า สาหร่ายใน T2 และ T3 มีการเติบโตไม่แตกต่างกันและมีค่าสูงกว่า T1 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) การทดลองที่ 2 ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสาหร่ายที่ได้จากการทดลองที่ 1 พบว่า สาหร่ายใน T2 และ T3 มีปริมาณแคโรทีนอยด์ทั้งหมดไม่แตกต่างกันและมีค่าสูงกว่า T1 ส่วนปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของทุกชุดการทดลองมีค่าไม่แตกต่างกัน แต่สาหร่ายใน T3 มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH สูงที่สุด ($85.45 \pm 1.12\%$) และแตกต่างจากชุดการทดลองอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ดังนั้น เราควรส่งเสริมให้เลี้ยงสาหร่ายผักกาดทะเลด้วยการเติมปุ๋ยไนโตรเจน (แอมโมเนียมคลอไรด์) ในน้ำ เพราะทำให้สาหร่ายเติบโตดี มีปริมาณแคโรทีนอยด์ทั้งหมดสูง และมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH สูงที่สุด ซึ่งสาหร่ายชนิดนี้น่าไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร เกษตรกรรม และเครื่องสำอางได้

คำสำคัญ: สาหร่ายผักกาดทะเล; แอมโมเนียมคลอไรด์; โซเดียมไนเตรท; การเติบโต; ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

ABSTRACT: This study investigated the effects of different nitrogen fertilizers on the growth and antioxidant activities of sea lettuce (*Ulva rigida*) that were cultured in the laboratory. The study was divided into 2 experiments. Experiment 1: the study on the growth of *U. rigida*, there were 3 treatments with 4 replications which consisted of seawater (T1), added ammonium chloride to a total ammonia concentration of 5 mg-N/L (T2) and added sodium nitrate to a nitrate concentration of 5 mg-N/L (T3). The algae were weighed, and the water exchange rate was 100% every 7 days in 21-day trial period. According to the results, *U. rigida* of T2 and T3 treatments had no different growth and were significantly higher than T1 treatment ($P < 0.05$). Experiment 2: the study on the antioxidant activity of *U. rigida*, the algae from experiment 1 were used to determine the total carotenoids, total phenolic contents and antioxidant activity by DPPH radical scavenging activity. The result displayed that *U. rigida* of T2 and T3 treatments showed no different total carotenoids and were higher than T1 treatment ($P < 0.05$). The total phenolic contents in all treatments had no difference ($P > 0.05$). However, *U. rigida* of T2 treatment showed the highest DPPH

* Corresponding author: ffispcp@ku.ac.th

Received: date; March 31, 2021 Accepted: date; July 7, 2021 Published: date; December 29, 2021

radical scavenging activity ($85.45 \pm 1.12\%$) and was statistically significant ($P < 0.05$) compared to the other treatments. In conclusion, we should promote the cultivation of *U. rigida* with nitrogen fertilizer (ammonium chloride) in water because the algae gave high yield, high carotenoids and the highest DPPH radical scavenging activity. *U. rigida* can be used for food, pharmaceutical and cosmetic industries.

Keywords: *Ulva rigida*; ammonium chloride; sodium nitrate; growth; antioxidant activities

บทนำ

สาหร่ายผักกาดทะเล (*Ulva rigida*) จัดอยู่ในกลุ่มสาหร่ายสีเขียวขนาดใหญ่ สาเหตุที่เรียกว่าสาหร่ายผักกาดทะเลเนื่องจากแผ่นใบของสาหร่ายชนิดนี้จะแผ่กว้าง และใบหยาบคล้ายใบผักกาด สาหร่ายผักกาดทะเลสามารถพบได้บริเวณชายฝั่งทะเลของประเทศไทย ซึ่งเติบโตได้ในช่วงความเค็ม 15 - 40 ส่วนในพันส่วน (สุวรรณา, 2551) โดยสาหร่ายผักกาดทะเลถูกนำมาใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมอาหารและเภสัชกรรม เนื่องจากมีคุณค่าทางโภชนาการสูง ไม่ว่าจะเป็นโปรตีน (กรดอะมิโนต่าง ๆ ได้แก่ ลูซีน อาร์จินีน ทรีโอนีน วาลีน ฟีนิลอะลานีน ฯลฯ) คาร์โบไฮเดรต (พอลิแซ็กคาไรด์) ไขมัน (กรดไขมันไม่อิ่มตัว ได้แก่ กรดโอเลอิก กรดลิโนเลนิก กรดอะราคิโดนิก ฯลฯ) และแร่ธาตุ (แคลเซียม เหล็ก แมกนีเซียม และไอโอดีน) (สุวรรณา และคณะ, 2552; มนทกานติ และคณะ, 2559; จารุวรรณ และคณะ, 2563; Mahae et al., 2014) นอกจากนี้ สาหร่ายผักกาดทะเลยังมีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ค่อนข้างสูง เช่น สารประกอบฟีนอลิก สารฟลาโวนอยด์ แคโรทีนอยด์ วิตามินซี วิตามินอี เป็นต้น (สิริลักษณ์, 2558; รติยา และคณะ, 2562; Yildiz et al., 2011; Mezghani et al., 2016) โดยสาหร่ายผักกาดทะเลมีสรรพคุณในการรักษาโรคต่าง ๆ ได้แก่ โรคกระดูกพรุน โรคท้องผูก กระตุ้นภูมิคุ้มกัน บรรเทาไข้ข้ออักเสบ และต้านการเกิดโรคมะเร็ง สาหร่ายผักกาดทะเลเป็นสาหร่ายที่ไม่มีกลิ่นคาวเหมือนสาหร่ายทะเลชนิดอื่น จึงสามารถนำมาประกอบอาหารได้หลายรูปแบบ ได้แก่ ยำสาหร่าย แกงจืดสาหร่าย สาหร่ายชุบแป้งทอด ใส่ในก๋วยเตี๋ยว ใส่ในสลัด และนำไปรับประทานกับน้ำพริกต่าง ๆ นอกจากการรับประทานสดแล้วยังสามารถนำมาแปรรูปโดยการทำให้แห้งเพื่อเป็นส่วนประกอบของผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อสุขภาพทั้งอาหารคาวและอาหารหวานได้อีกด้วย (สุวรรณา และคณะ, 2552; จิรภา และคณะ, 2554; วิษณีย์ และคณะ, 2558; วิษณีย์ และคณะ, 2559; จารุวรรณ และคณะ, 2563)

สาหร่ายผักกาดทะเลมีความทนทาน สามารถเพาะเลี้ยงได้ง่าย และเลี้ยงได้หลายรูปแบบ เช่น การเลี้ยงสาหร่ายแบบปล่อยให้ลอยอิสระในน้ำ การเลี้ยงแบบมีที่ยึดเกาะโดยผูกติดกับตาข่ายพลาสติก การเลี้ยงสาหร่ายร่วมกับสัตว์น้ำโดยใช้สาหร่ายในกระชังในล่อน เป็นต้น การขยายพันธุ์สาหร่ายผักกาดทะเลสามารถใช้ได้ทั้งต้นอ่อนและการแบ่งส่วนของใบไปขยายพันธุ์ต่อ (สุวรรณา และคณะ, 2555; มนทกานติ และคณะ, 2559) ซึ่งปัจจัยที่ส่งผลต่อการเติบโตของสาหร่ายผักกาดทะเล ได้แก่ ปริมาณสารอาหาร ความเข้มแสง ความเค็มของน้ำ และอุณหภูมิ (สุวรรณา, 2551; สุวรรณ และคณะ, 2560; Moustafa et al., 2014; Shakouri and Balouch, 2020) ปัจจุบันนิยมเพาะเลี้ยงสาหร่ายผักกาดทะเลในบ่อปูนหรือถังพลาสติก เนื่องจากสะดวกในการเก็บเกี่ยวผลผลิต

ปัจจัยหลักที่มีผลต่อการเติบโตของสาหร่ายผักกาดทะเลคือปริมาณสารอาหารในน้ำ โดยปริมาณสารอาหารในน้ำจะมีผลต่อการสังเคราะห์แสงซึ่งทำให้สาหร่ายเกิดการเติบโต และการสืบพันธุ์ สารอาหารหลักที่จำเป็นต่อการเติบโตของสาหร่าย ได้แก่ สารประกอบไนโตรเจนและฟอสฟอรัส ซึ่งสาหร่ายผักกาดทะเลจะใช้สัดส่วนของไนโตรเจนมากกว่าฟอสฟอรัส (เอกธิดา, 2553; สุวรรณ และคณะ, 2560) การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของปุ๋ยไนโตรเจนต่อการเติบโตและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสาหร่ายผักกาดทะเล โดยเปรียบเทียบระหว่างการเติมสารละลายแอมโมเนียมคลอไรด์กับสารละลายโซเดียมไนเตรท ใช้ระยะเวลาการทดลอง 21 วัน ประโยชน์ที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้จะเป็นข้อมูลสำหรับการเลือกใช้ปุ๋ยไนโตรเจนในการส่งเสริมการเพาะเลี้ยงสาหร่ายผักกาดทะเลสำหรับนำไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร เภสัชกรรม และเครื่องสำอางต่อไป

วิธีการศึกษา

การศึกษามูลของปุ๋ยไนโตรเจนต่อการเติบโตและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสาหร่ายผักกาดทะเล แบ่งเป็น 2 การทดลอง คือ การทดลองที่ 1 ศึกษาการเติบโตของสาหร่ายผักกาดทะเลที่เลี้ยงด้วยปุ๋ยไนโตรเจนต่างกัน (สารละลายแอมโมเนียมคลอไรด์ และสารละลายโซเดียมไนเตรท) และการทดลองที่ 2 ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสาหร่ายผักกาดทะเลที่เลี้ยงด้วยปุ๋ยไนโตรเจนต่างกัน

(สารละลายแอมโมเนียมคลอไรด์ และสารละลายโซเดียมไนเตรท) ซึ่งได้ดำเนินการทดลอง ณ ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่งสมุทรสาคร และห้องปฏิบัติการโภชนศาสตร์อาหารสัตว์น้ำ คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน

การทดลองที่ 1 ศึกษาการเติบโตของสาหร่ายผักกาดทะเลที่เลี้ยงด้วยปุ๋ยไนโตรเจนต่างกัน

1. ตัวอย่างสาหร่ายผักกาดทะเล

สาหร่ายผักกาดทะเลที่ใช้ในการทดลองมาจากศูนย์วิจัยและพัฒนาการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่งเพชรบุรี ซึ่งเลี้ยงในน้ำทะเลความเค็ม 31 ส่วนในพันส่วน ในบ่อปูนขนาด 20 ตัน การลำเลียงสาหร่ายจะนำสาหร่ายบรรจุใส่ในกล่องโฟมและขนส่งแบบแห้ง (ไม่ใส่น้ำทะเล) ทำการขนส่งโดยรถยนต์มายังศูนย์วิจัยและพัฒนาการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่งสมุทรสาคร จากนั้นทำความสะอาดสาหร่ายด้วยการนำสิ่งแปลกปลอมและสิ่งที่เกาะติด ได้แก่ เพรียง หอยขนาดเล็ก และสาหร่ายชนิดอื่นที่ปะปนอยู่ออกไปให้หมด แล้วจึงนำสาหร่ายมาพักในถังไฟเบอร์ขนาด 500 ลิตร จากนั้นค่อย ๆ ปรับความเค็มของน้ำในถังพักสาหร่ายแบบวันเว้นวัน โดยปรับความเค็มลงครึ่งละ 2 ส่วนในพันส่วน เพื่อให้ได้ความเค็ม 25 ส่วนในพันส่วน ซึ่งเป็นความเค็มที่ใช้ในการทดลอง โดยพักสาหร่ายในน้ำทะเลที่มีความเค็ม 25 ส่วนในพันส่วน ซึ่งมีแอมโมเนียมรวม 0.21 ± 0.03 มก.-ไนโตรเจน/ล. ไนโตรเจน 0.01 ± 0.00 มก.-ไนโตรเจน/ล. ไนเตรท 0.28 ± 0.03 มก.-ไนโตรเจน/ล. และปริมาณออร์โธฟอสเฟต 0.52 ± 0.01 มก.-ฟอสฟอรัส/ล. เป็นระยะเวลา 7 วัน ก่อนนำมาใช้ในการทดลอง

2. การเตรียมปุ๋ยสำหรับเลี้ยงสาหร่ายผักกาดทะเล

การเตรียมปุ๋ยเพื่อให้ได้ปริมาณแอมโมเนียมรวมสำหรับเติมในน้ำเลี้ยงสาหร่าย นำแอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl) ยี่ห้อ UNIVAR ซึ่งเป็น Analytical reagent grade ไปอบในตู้อบลมร้อน (Hot air oven) ที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แล้วนำไปเก็บไว้ในโถดูดความชื้น (Desiccator) จนกระทั่งอุณหภูมิของสารเท่ากับอุณหภูมิห้อง จากนั้นชั่งแอมโมเนียมคลอไรด์ 10 กรัม ละลายในน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 1 ลิตร ทำการตรวจสอบความเข้มข้นของแอมโมเนียมรวมด้วยวิธี Modified indophenol blue (Sasaki and Sawada, 1980) เพื่อให้ทราบความเข้มข้นของแอมโมเนียมรวมในสารละลายแอมโมเนียมคลอไรด์ที่เตรียมไว้สำหรับนำไปใช้ในการทดลองต่อไป ซึ่งความเข้มข้นของแอมโมเนียมรวมที่ต้องการใช้ในการทดลองคือ 5 มก.-ไนโตรเจน/ล.

การเตรียมปุ๋ยเพื่อให้ได้ปริมาณไนเตรทสำหรับเติมในน้ำเลี้ยงสาหร่าย นำโซเดียมไนเตรท (NaNO_3) ยี่ห้อ UNIVAR ซึ่งเป็น Analytical reagent grade ไปอบในตู้อบลมร้อน (Hot air oven) ที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แล้วนำไปเก็บไว้ในโถดูดความชื้น (Desiccator) จนกระทั่งอุณหภูมิของสารเท่ากับอุณหภูมิห้อง จากนั้นชั่งโซเดียมไนเตรท 10 กรัม ละลายในน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 1 ลิตร ทำการตรวจสอบความเข้มข้นของไนเตรทด้วยวิธี Cadmium-reduction (Strickland and Parsons, 1972) เพื่อให้ทราบความเข้มข้นของไนเตรทในสารละลายโซเดียมไนเตรทที่เตรียมไว้สำหรับนำไปใช้ในการทดลองต่อไป ซึ่งความเข้มข้นของไนเตรทที่ต้องการใช้ในการทดลองคือ 5 มก.-ไนโตรเจน/ล.

3. การทดลอง

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely randomized design, CRD) โดยแบ่งเป็น 3 ชุดการทดลอง คือ ชุดการทดลองที่ 1 เลี้ยงสาหร่ายในน้ำทะเลโดยไม่เติมสารละลายแอมโมเนียมคลอไรด์ และสารละลายโซเดียมไนเตรท (T1) ชุดการทดลองที่ 2 เลี้ยงสาหร่ายในน้ำทะเลโดยเติมสารละลายแอมโมเนียมคลอไรด์ให้มีความเข้มข้นของแอมโมเนียมรวม 5 มก.-ไนโตรเจน/ล. (T2) และชุดการทดลองที่ 3 เลี้ยงสาหร่ายในน้ำทะเลโดยเติมสารละลายโซเดียมไนเตรทให้มีความเข้มข้นของไนเตรท 5 มก.-ไนโตรเจน/ล. (T3) แต่ละชุดการทดลองมีจำนวน 4 ซ้ำ ใช้ระยะเวลาการทดลอง 21 วัน โดยนำน้ำทะเลความเค็ม 25 ส่วนในพันส่วน ซึ่งมีแอมโมเนียมรวม 0.21 ± 0.03 มก.-ไนโตรเจน/ล. ไนโตรเจน 0.01 ± 0.00 มก.-ไนโตรเจน/ล. ไนเตรท 0.28 ± 0.03 มก.-ไนโตรเจน/ล. และปริมาณออร์โธฟอสเฟต 0.52 ± 0.01 มก.-ฟอสฟอรัส/ล. ที่ผ่านการฆ่าเชื้อและปรับสภาพน้ำแล้วมาใส่ในตู้กระจกขนาด $25 \times 40 \times 30$ เซนติเมตร ใส่น้ำปริมาตร 20 ลิตร จำนวน 12 ตู้ พร้อมติดตั้งอุปกรณ์ให้อากาศ วางตู้กระจกวางบนโต๊ะทดลอง โดยใช้หลอดไฟ LED ขนาด 85 วัตต์ สำหรับให้แสงแก่สาหร่าย (ความเข้มแสง 5,200 - 5,600 ลักซ์) ซึ่งจะให้แสงสว่าง 12 ชั่วโมง และมีมืด 12 ชั่วโมง จากนั้นนำสาหร่ายผักกาดทะเลใส่ตะกร้าพลาสติก พักไว้นาน 5 นาที แล้วชั่งน้ำหนัก 20 กรัม ใส่ในตู้กระจกที่มีน้ำปริมาตร 20 ลิตร (ความหนาแน่น 1 กรัมต่อลิตร) เติมสารละลายแอมโมเนียมคลอไรด์ และสารละลายโซเดียมไนเตรทที่เตรียมไว้ให้มีความเข้มข้นของ

แอมโมเนียรวมและไนเตรทตามที่กำหนดไว้ในแต่ละชุดการทดลอง โดยหาปริมาตรของสารละลายแอมโมเนียมคลอไรด์และสารละลายโซเดียมไนเตรทที่เติมลงไปในตัวเลี้ยงสาหร่าย ได้จากสูตรการคำนวณดังนี้ $N_1V_1 + N_2V_2 = N_3V_3$ ซึ่ง N_1 คือ ความเข้มข้นของสารละลายที่เตรียมไว้ (มก.-ไนโตรเจน/ล.), V_1 คือ ปริมาตรของสารละลายที่เตรียมไว้ (มล.), N_2 คือ ความเข้มข้นที่มีอยู่ในน้ำที่ใช้ในการทดลอง (มก.-ไนโตรเจน/ล.), V_2 คือ ปริมาตรของน้ำที่ใช้ในการทดลอง (มล.), N_3 คือ ความเข้มข้นที่ต้องการใช้ในการทดลอง (5 มก.-ไนโตรเจน/ล.) และ V_3 คือ ปริมาตรของน้ำที่ต้องการใช้ในการทดลอง (20,000 มล.) โดยทุกชุดการทดลองทำการปิดปากตู้กระจกด้วยพลาสติกใสเพื่อป้องกันการระเหยของน้ำและไนโตรเจนกลับสู่อากาศ

4. การเก็บข้อมูลการเติบโตของสาหร่าย

ชั่งน้ำหนักสาหร่ายทุกชุดการทดลองระหว่างการทดลองทุก ๆ 7 วัน เป็นระยะเวลา 21 วัน โดยนำสาหร่ายในแต่ละชามมาพักไว้ในตะกร้าพลาสติกนาน 5 นาที (สุวรรณา และคณะ, 2560) แล้วนำมาชั่งด้วยเครื่องชั่งดิจิตอลทศนิยม 2 ตำแหน่ง และบันทึกผล จากนั้นนำมาหาการเติบโตของสาหร่ายจากน้ำหนักที่เพิ่มขึ้น (Weight gain) และอัตราการเติบโตจำเพาะ (Specific Growth Rate; SGR) โดยมีสูตรการคำนวณ อ้างตาม สุวรรณา และคณะ (2560) ดังนี้

$$\text{Weight gain (g)} = W_t - W_0$$

$$\text{SGR (\%/day)} = 100 \ln (W_t/W_0)$$

เมื่อ W_t คือ น้ำหนัก ณ เวลาที่ใช้คำนวณ
 W_0 คือ น้ำหนัก ณ เวลาเริ่มต้น
 t คือ ระยะเวลาที่คำนวณ

5. การจัดการด้านคุณภาพน้ำระหว่างการทดลอง

ในการศึกษานี้ น้ำในทุกชุดการทดลองมีการเปลี่ยนถ่าย 100% ทุก ๆ 7 วัน โดยมีการเติมสารละลายแอมโมเนียมคลอไรด์ และสารละลายโซเดียมไนเตรทหลังเปลี่ยนถ่ายน้ำให้ได้ความเข้มข้นตามที่กำหนดไว้ในแต่ละชุดการทดลอง ซึ่งจะมีการวัดค่าอุณหภูมิของน้ำและปริมาณออกซิเจนละลายในน้ำ (DO) โดยใช้เครื่อง DO meter ยี่ห้อ YSI รุ่น Pro 20 และวัดความเป็นกรด - ด่าง (pH) โดยใช้เครื่อง pH meter ยี่ห้อ YSI รุ่น Pro 10 ทุกวัน ส่วนการเก็บตัวอย่างน้ำมาวิเคราะห์พารามิเตอร์ต่าง ๆ จะเก็บก่อนและหลังเปลี่ยนถ่ายน้ำทุก ๆ 7 วัน เป็นระยะเวลา 21 วัน คือ ค่าความเค็ม (Salinity) โดยใช้เครื่องวัดความเค็ม (Hand Refractometer) ยี่ห้อ ATAGO รุ่น MASTER-S/MillM ค่าความเป็นด่าง (Alkalinity) ด้วยวิธี Titrimetric Method (American Public Health Association et al., 2017) ปริมาณแอมโมเนียรวม (Total Ammonia Nitrogen; TAN) ด้วยวิธี Modified indophenol blue (Sasaki and Sawada, 1980) ปริมาณไนไตรท์ (Nitrite) ด้วยวิธี Diazotization (Strickland and Parsons, 1972) ปริมาณไนเตรท (Nitrate) ด้วยวิธี Cadmium-reduction (Strickland and Parsons, 1972) และปริมาณออร์โธฟอสเฟต (Orthophosphate) ด้วยวิธี Ascorbic acid (Strickland and Parsons, 1972)

6. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

นำข้อมูลการเติบโตของสาหร่าย (น้ำหนัก และอัตราการเติบโตจำเพาะของสาหร่าย) ในแต่ละชุดการทดลอง มาวิเคราะห์หาค่าความแตกต่างทางสถิติโดยทำการทดสอบความแปรปรวนแบบทางเดียว (One-way analysis of variance; One-way ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระหว่างชุดการทดลองตามวิธีของ Tukey's HSD multiple comparisons test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป

การทดลองที่ 2 ศึกษาฤทธิ์ด้านอนุมูลอิสระของสาหร่ายผักกาดทะเลที่เลี้ยงด้วยปุ๋ยไนโตรเจนต่างกัน

1. การเตรียมสาหร่ายผักกาดทะเล

นำสาหร่ายผักกาดทะเลในการทดลองที่ 1 ของทุกชุดการทดลอง มาล้างด้วยน้ำจืดสะอาดและน้ำกลั่น พร้อมทั้งกำจัดสิ่งแปลกปลอมออกจากสาหร่าย จากนั้นนำสาหร่ายในแต่ละชุดการทดลองมาพักไว้ในตะกร้าพลาสติกนาน 5 นาที แล้วจึงเก็บใส่ถุง PE แบบมีซิปล็อคและปิดปากถุงให้สนิท นำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

2. การวิเคราะห์ปริมาณแคโรทีนอยด์

ใช้วิธี UV-VIS Spectrophotometer (Sudhakar et al., 2016) โดยนำสาหร่ายผักกาดทะเลน้ำหนัก 0.2 กรัม มาใส่ในหลอดทดลองและเติมสารละลายอะซีโตน 80 เปอร์เซ็นต์ (80% Acetone) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร แล้วจึงบดปั่นให้ละเอียดด้วยเครื่อง Homogenizer จากนั้นใช้กระดาษกรองใยแก้ว (GF/C) ยี่ห้อ Whatman กรองสาหร่ายที่สกัดด้วยสารละลายอะซีโตนลงในหลอดทดลอง นำสารละลาย 80% Acetone มาเทล้างสาหร่ายที่ติดอยู่ในหลอดทดลองและบนกระดาษกรองใยแก้ว โดยใช้สารละลาย 80% Acetone ปริมาตร 5 มิลลิลิตรต่อครั้ง ล้างจำนวน 2 - 3 ครั้ง แล้วจึงปรับปริมาตรของเหลวสุดท้ายของสารสกัดในหลอดทดลองให้ได้ 25 มิลลิลิตร โดยการเติมสารละลาย 80% Acetone จากนั้นนำของเหลวที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 663, 645 และ 480 นาโนเมตร ซึ่งปริมาณแคโรทีนอยด์ทั้งหมด (Total carotenoids) ที่ได้มีหน่วยเป็นมิลลิกรัมต่อกรัม (น้ำหนักสด) และมีสูตรการคำนวณ อ้างตาม Sudhakar et al. (2016) ดังนี้

$$\text{Total carotenoids (mg/g fresh weight)} = [A_{480} + (0.114 \times A_{663}) - (0.638 - A_{645})] \times (V/1000) \times W$$

เมื่อ A480 คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 480 นาโนเมตร
 A645 คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 645 นาโนเมตร
 A663 คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 663 นาโนเมตร
 V คือ ปริมาตรสุดท้ายของสารสกัดแคโรทีนอยด์
 W คือ น้ำหนักสดของสาหร่ายที่สกัด

3. การเตรียมสารสกัดสาหร่ายเพื่อวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดและทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

การสกัดตัวอย่างสาหร่ายผักกาดทะเลสดจะดัดแปลงจากวิธีของ Zehlila et al. (2017) โดยนำสาหร่ายมาหั่นเป็นชิ้นเล็ก ๆ และบดปั่นสาหร่ายให้ละเอียดด้วยเครื่อง Homogenizer โดยใส่น้ำกลั่น 1 มิลลิลิตรต่อน้ำหนักสาหร่ายสด 1 กรัม จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกตะกอนออกด้วยเครื่อง Centrifuge ที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที จะได้ส่วนของเหลวเหนือตะกอนหรือที่เรียกว่า สารสกัดหยาบ (Crude extract)

4. การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (Total phenolic contents; TPC) ด้วยวิธี Folin-Ciocalteu

ดูดตัวอย่างสารสกัดสาหร่ายที่เตรียมไว้ 1 มิลลิลิตร เติม 10% Folin-Ciocalteu reagent 2.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 3 นาที จากนั้นนำไปเติม 7.5% โซเดียมคาร์บอเนต 1 มิลลิลิตร แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 60 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร จากนั้นนำค่าที่ได้ไปเทียบกับกราฟมาตรฐานของกรดแกลลิก (Gallic acid) ซึ่งดัดแปลงจากวิธีของ Chew et al. (2008) โดยรายงานผลเป็นมิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมสารสกัด (mg GAE/g extract)

5. การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH radical scavenging activity

ดูดตัวอย่างสารสกัดสาหร่ายที่เตรียมไว้ 750 ไมโครลิตร เติมสารละลาย DPPH 0.16 mM ปริมาตร 750 ไมโครลิตร เพื่อทำปฏิกิริยาแล้วนำไปตั้งทิ้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร และนำค่าที่ได้ไปคำนวณเป็นร้อยละความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระ ซึ่งดัดแปลงจากวิธีของ Zhang et al. (2007) ดังนี้

$$\text{Inhibition (\%)} = [1 - (A_{\text{sample}} - A_{\text{sample blank}})/A_{\text{control}}] \times 100$$

เมื่อ A sample คือ ค่าดูดกลืนแสงของสารสกัดที่เติมสารละลาย DPPH
 A sample blank คือ ค่าดูดกลืนแสงของสารสกัดที่ไม่เติม DPPH
 A control คือ ค่าดูดกลืนแสงของ DPPH ที่ไม่ได้เติมสารสกัด

6. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

นำข้อมูลปริมาณแคโรทีนอยด์ ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก และร้อยละความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ในแต่ละชุดการทดลอง มาวิเคราะห์หาความแตกต่างทางสถิติโดยทำการทดสอบความแปรปรวนแบบทางเดียว (One-way analysis of variance; One-way ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระหว่างชุดการทดลองตามวิธีของ Tukey's HSD multiple comparisons test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป

ผลการศึกษาและวิจารณ์

การทดลองที่ 1 การเติบโตของสาหร่ายผักกาดทะเลที่เลี้ยงด้วยปุ๋ยไนโตรเจนต่างกัน

สาหร่ายที่เลี้ยงในน้ำทะเลโดยเติมสารละลายแอมโมเนียมคลอไรด์ให้มีความเข้มข้นของแอมโมเนียมรวม 5 มก.-ไนโตรเจน/ล. (T2) และสาหร่ายที่เลี้ยงในน้ำทะเลโดยเติมสารละลายโซเดียมไนเตรทให้มีความเข้มข้นของไนเตรท 5 มก.-ไนโตรเจน/ล. (T3) ที่ระยะเวลาการทดลอง 21 วัน มีการเติบโตไม่แตกต่างกัน โดยมีน้ำหนักสุดท้ายคือ 56.95 ± 3.99 และ 56.77 ± 7.14 กรัม ตามลำดับ และมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) กับสาหร่ายที่เลี้ยงในน้ำทะเลโดยไม่เติมสารละลายแอมโมเนียมคลอไรด์ และสารละลายโซเดียมไนเตรท (T1) ซึ่งมีน้ำหนักสุดท้าย 32.31 ± 2.74 กรัม (Table 1) การศึกษาครั้งนี้พบว่า สาหร่ายผักกาดทะเลสามารถใช้ปุ๋ยไนโตรเจนจากสารละลายแอมโมเนียมคลอไรด์และสารละลายโซเดียมไนเตรทได้ไม่แตกต่างกัน จึงทำให้สาหร่ายมีการเติบโตไม่แตกต่างกันทั้งในด้านน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นและอัตราการเติบโตจำเพาะ (Figure 1 และ Table 2) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Moustafa et al. (2014) พบว่า สาหร่าย *Ulva* sp. สามารถนำไนโตรเจนในรูปของแอมโมเนียมและไนเตรทไปใช้ในการเติบโตได้ไม่แตกต่างกัน และถ้าเลี้ยงเป็นระยะเวลานานขึ้น (35 วัน) สาหร่ายจะนำไนเตรทไปใช้ในการเติบโตได้ดีกว่าแอมโมเนียม แต่การศึกษาของ Ale et al. (2011) พบว่า สาหร่าย *Ulva lactuca* สามารถดูดซึมแอมโมเนียมไปใช้ในการเติบโตได้ดีกว่าไนเตรท โดยมีอัตราการเติบโตจำเพาะของสาหร่ายที่เลี้ยงด้วยแอมโมเนียมคลอไรด์ และโซเดียมไนเตรทสูงถึง 16.4 ± 0.18 และ 9.4 ± 0.72 %/day ตามลำดับ ซึ่งเป็นการทดลองระยะสั้น (10 วัน)

การที่สาหร่ายใน T1 มีการเติบโตน้อยกว่า T2 และ T3 เนื่องจากในน้ำทะเลที่นำมาทดลองมีสารอาหารที่เป็นสารประกอบไนโตรเจนปริมาณน้อย ทำให้ไม่เพียงพอต่อการเติบโตของสาหร่าย และเมื่อทดลองเลี้ยงสาหร่ายเป็นระยะเวลา 21 วัน สาหร่ายใน T1 มีน้ำหนักลดลงและมีอาการหัลล์สเปื้อน ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ วิรงรอง และวิวรรณ (2561) ที่ศึกษาผลของการเติมปุ๋ยยูเรียต่อการเติบโตของสาหร่ายผักกาดทะเล พบว่า การเติมปุ๋ยยูเรียความเข้มข้น 10 มก./ล. ทุกสัปดาห์ ทำให้สาหร่ายผักกาดทะเลมีการเติบโตสูงกว่าชุดควบคุมที่ไม่เติมปุ๋ยยูเรียอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) และเมื่อเลี้ยงสาหร่ายเป็นระยะเวลา 35 วัน พบว่าสาหร่ายในชุดควบคุมที่ไม่เติมปุ๋ยยูเรียมีน้ำหนักลดลง ทั้งนี้ การเติมสารอาหารลงในน้ำทำให้สาหร่ายมีการเติบโตที่ดีและมีมวลชีวภาพสูงขึ้น (สุวรรณ และคณะ, 2560; Ale et al., 2011; Moustafa et al., 2014; Shakouri and Balouch, 2020)

Table 1 Weight of *Ulva rigida* at different treatments

Time (day)	Weight of <i>U. rigida</i> (g)			P-value
	T1	T2	T3	
0	20.03 ± 0.02^a	20.03 ± 0.02^a	20.03 ± 0.02^a	0.935
7	32.62 ± 1.87^a	39.10 ± 0.99^b	37.81 ± 3.57^b	0.010
14	32.55 ± 2.70^a	47.90 ± 2.27^b	47.91 ± 7.49^b	0.002
21	32.31 ± 2.74^a	56.95 ± 3.99^b	56.77 ± 7.14^b	0.000

Values (mean $\pm$ standard deviation, n = 4) with different superscripts in each row are significantly different ($P < 0.05$)

T1: seawater, T2: seawater supplemented with ammonium chloride to a total ammonia concentration of 5 mg-N/L and T3: seawater supplemented with sodium nitrate to a nitrate concentration of 5 mg-N/L

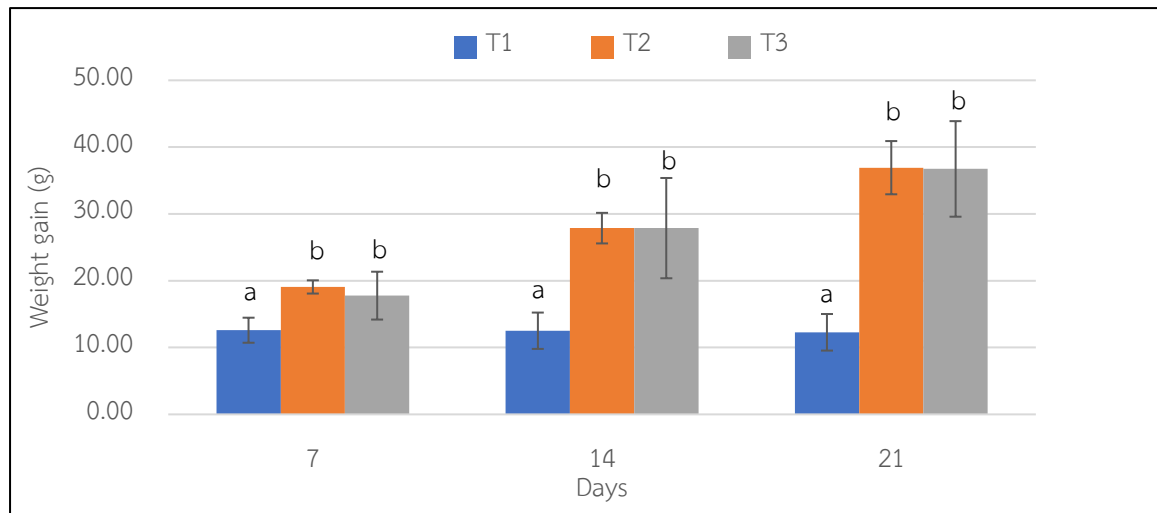


Figure 1 Growth of *Ulva rigida* at different treatments and each bar represents a mean $\pm$ standard deviation (n = 4); letters above the bars reflect significance of differences (P < 0.05)

T1: seawater, T2: seawater supplemented with ammonium chloride to a total ammonia concentration of 5 mg-N/L and T3: seawater supplemented with sodium nitrate to a nitrate concentration of 5 mg-N/L

Table 2 Specific Growth Rate of *Ulva rigida* at different treatments

Time (day)	Specific Growth Rate of <i>U. rigida</i> (%/day)			P-value
	T1	T2	T3	
7	6.95 $\pm$ 0.82 ^a	9.55 $\pm$ 0.36 ^b	9.02 $\pm$ 1.42 ^b	0.010
14	3.45 $\pm$ 0.60 ^a	6.22 $\pm$ 0.35 ^b	6.16 $\pm$ 1.22 ^b	0.001
21	2.26 $\pm$ 0.40 ^a	4.97 $\pm$ 0.33 ^b	4.93 $\pm$ 0.64 ^b	0.000

Values (mean $\pm$ standard deviation, n = 4) with different superscripts in each row are significantly different (P < 0.05)

T1: seawater, T2: seawater supplemented with ammonium chloride to a total ammonia concentration of 5 mg-N/L and T3: seawater supplemented with sodium nitrate to a nitrate concentration of 5 mg-N/L

การทดลองที่ 2 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสาหร่ายผักกาดทะเลที่เลี้ยงด้วยปุ๋ยไนโตรเจนต่างกัน

สาหร่ายผักกาดทะเลใน T2 และ T3 มีปริมาณแคโรทีนอยด์ทั้งหมด (Total carotenoids) สูงกว่า T1 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P < 0.05) (Table 3) เนื่องจากแคโรทีนอยด์จะทำงานร่วมกับคลอโรฟิลล์ในการดูดซับพลังงานจากแสง เพื่อใช้ในกระบวนการสังเคราะห์แสงและทำให้พืชเติบโต โดยพืชที่ได้รับไนโตรเจนในปริมาณสูงจะทำให้มีปริมาณแคโรทีนอยด์สูงขึ้นด้วย (Nouriyani et al., 2012) ซึ่ง T2 และ T3 มีการเติมปุ๋ยไนโตรเจน (สารละลายแอมโมเนียมคลอไรด์ และสารละลายโซเดียมไนเตรท ตามลำดับ) ลงในน้ำจึงทำให้สาหร่ายมีปริมาณแคโรทีนอยด์ทั้งหมดสูงกว่า T1 (ไม่ได้เติมปุ๋ยไนโตรเจน) สอดคล้องกับการศึกษาของ Vega et al. (2020) พบว่าสาหร่าย *Ulva rigida* ที่ได้จากการเลี้ยงในระบบการเพาะเลี้ยงแบบผสมผสานหลายชั้น (Integrated multi-trophic aquaculture; IMTA) ซึ่งเลี้ยงปลา *Sparus aurata* มีปริมาณแคโรทีนอยด์สูงกว่าสาหร่ายที่ได้จากการเก็บเกี่ยวจากธรรมชาติ เนื่องจากในระบบ IMTA มีสารประกอบไนโตรเจนปริมาณมาก แม้ว่าสาหร่ายใน T2 และ T3 จะมีปริมาณแคโรทีนอยด์ทั้งหมดไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P > 0.05) แต่สาหร่ายใน T2 ที่เลี้ยงด้วยน้ำทะเลโดยเติมสารละลายแอมโมเนียมคลอไรด์ให้ความเข้มข้นของแอมโมเนียมรวม 5 มก.-ไนโตรเจน/ล. มีปริมาณแคโรทีนอยด์ทั้งหมดสูงกว่าสาหร่ายใน T3 ที่เลี้ยงด้วยน้ำทะเลโดยเติมสารละลายโซเดียมไนเตรทให้ความเข้มข้นของไนเตรท 5 มก.-ไนโตรเจน/ล. ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Sánchez-Saavedra et al. (2018) พบว่า สาหร่าย

Porphyridium cruentum ที่เลี้ยงด้วยอาหารที่เติมแอมโมเนียมคลอไรด์มีแคโรทีนอยด์ (ในรูปของแคโรทีน) สูงกว่าสาหร่ายที่เลี้ยงด้วยอาหารที่เติมโซเดียมไนเตรท

ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (Total phenolic contents; TPC) ของสาหร่ายในแต่ละชุดการทดลองไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) โดยมีค่าอยู่ในช่วง 0.09 - 0.10 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมสารสกัด (น้ำหนักสด) (Table 3) ซึ่งค่า TPC ที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้จะต่ำกว่าการรายงานของ Yildiz et al. (2011) ที่พบว่า สาหร่าย *Ulva rigida* มีค่า TPC สูงถึง 0.73 ± 0.13 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมสารสกัด (น้ำหนักสด) เนื่องจากแหล่งที่มาของสาหร่ายต่างกัน รวมทั้งใช้วิธีการสกัดและตัวทำละลายที่แตกต่างกัน อย่างไรก็ตาม การศึกษาของ Vega et al. (2020) พบว่า สาหร่าย *Ulva rigida* ที่ได้จากการเก็บเกี่ยวจากธรรมชาติมีค่า TPC สูงกว่าสาหร่ายจากการเลี้ยงในระบบ IMTA ซึ่งเลี้ยงปลา *Sparus aurata* โดยน้ำทิ้งจากการเลี้ยงปลาในระบบ IMTA มีปริมาณสารประกอบไนโตรเจนในรูปของแอมโมเนียม-ไนโตรเจนสูงกว่าน้ำธรรมชาติ สอดคล้องกับการศึกษาของ อุไรวรรณ และคณะ (2562) พบว่า สาหร่าย *Caulerpa lentillifera* ที่เลี้ยงด้วยน้ำทะเลมีค่า TPC สูงกว่าสาหร่ายที่เลี้ยงด้วยน้ำทะเลที่เติมโซเดียมไนเตรทความเข้มข้น 0.5 - 1.0 มก./ล. ซึ่งการสะสมสารประกอบฟีนอลิกจะมีความสัมพันธ์แบบผกผันกับปริมาณไนโตรเจนในทลัสของสาหร่าย โดยในสภาวะที่ขาดไนโตรเจนจะมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกสูงขึ้น (Ilvessalo and Tuomi, 1989) นอกจากนี้ การใช้สารประกอบไนโตรเจนต่างกันเลี้ยงสาหร่ายหรือพืชอาจส่งผลต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิกได้ โดย Certain et al. (2021) ได้ศึกษาการเลี้ยงพืชชนิด 3 ชนิด คือ *Salsola australis*, *Suaeda maritima* และ *Enchylaena tomentosa* ด้วยอัตราส่วนของไนโตรเจน-ไนโตรเจนต่อแอมโมเนียม-ไนโตรเจน ($\text{NO}_3^-:\text{N}:\text{NH}_4^+:\text{N}$) ต่างกัน พบว่า *Salsola australis* และ *Suaeda maritima* ที่เลี้ยงด้วย $\text{NO}_3^-:\text{N}:\text{NH}_4^+:\text{N}$ ที่ระดับ 100:0 และ 0:100 มีค่า TPC ไม่ต่างกัน แต่ *Enchylaena tomentosa* ที่เลี้ยงด้วย $\text{NO}_3^-:\text{N}:\text{NH}_4^+:\text{N}$ ที่ระดับ 0:100 มีค่า TPC สูงกว่าที่ระดับ 100:0 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) และการศึกษาของ Munene et al. (2017) พบว่า การใส่ไนโตรเจนในรูปของแอมโมเนียมในแปลงปลูกผักโขม (*Amaranthus* spp.) สายพันธุ์ Abukusa 6 (AB6) ทำให้ผักโขมมีค่า TPC สูงกว่าการใส่ไนโตรเจนในรูปของไนเตรทอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) แต่การไม่ใส่ไนโตรเจนและการใส่ไนโตรเจนในรูปของแอมโมเนียมในแปลงปลูกผักโขมทำให้ผักโขมมีค่า TPC ไม่แตกต่างกัน ดังนั้นปริมาณสารประกอบฟีนอลิกจะขึ้นอยู่กับชนิดพันธุ์และปัจจัยทางสภาพแวดล้อม ได้แก่ ฤดูกาล รังสียูวี สารอาหาร อุณหภูมิ และความเค็ม รวมทั้งชนิดของตัวทำละลายและวิธีการสกัด ตัวอย่างอีกด้วย (จินทนา และอนงค์, 2558; อุไรวรรณ และคณะ, 2562; Trigui et al., 2013; Mezghani et al., 2016; Vega et al., 2020) โดยสารประกอบฟีนอลิกจะทำหน้าที่ป้องกันอันตรายจากรังสียูวีต่อทลัสของสาหร่าย และทำหน้าที่สร้างสารต้านอนุมูลอิสระ

ส่วนฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH (DPPH radical scavenging activity) พบว่า สาหร่ายใน T2 ที่เลี้ยงด้วยน้ำทะเลโดยเติมสารละลายแอมโมเนียมคลอไรด์ให้ความเข้มข้นของแอมโมเนียมรวม 5 มก.-ไนโตรเจน/ล. มีเปอร์เซ็นต์การดักจับอนุมูลอิสระ DPPH สูงที่สุด ($85.45 \pm 1.12\%$) และแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) กับสาหร่ายใน T1 และ T3 (Table 3) โดยการศึกษาของ Vega et al. (2020) พบว่า สาหร่าย *Ulva rigida* ที่ได้จากการเลี้ยงในระบบ IMTA ซึ่งเลี้ยงปลา *Sparus aurata* มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ต่ำกว่าสาหร่ายที่ได้จากการเก็บเกี่ยวจากธรรมชาติ แต่สาหร่าย *Caulerpa racemosa* ที่ได้จากการเลี้ยงในระบบ IMTA เช่นเดียวกัน มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH สูงกว่าสาหร่ายที่ได้จากการเก็บเกี่ยวจากธรรมชาติ ซึ่งในระบบ IMTA มีปริมาณแอมโมเนียม-ไนโตรเจนสูงกว่าน้ำธรรมชาติ ส่วนการที่สาหร่ายใน T1 ที่เลี้ยงด้วยน้ำทะเลมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH สูงกว่าสาหร่ายใน T3 ที่เลี้ยงด้วยน้ำทะเลโดยเติมสารละลายโซเดียมไนเตรทให้ความเข้มข้นของไนเตรท 5 มก.-ไนโตรเจน/ล. อาจเกิดจากการใช้ความเข้มข้นของไนเตรท-ไนโตรเจนไม่เหมาะสม ซึ่งจากการศึกษาของ อุไรวรรณ และคณะ (2562) พบว่า สาหร่าย *Caulerpa lentillifera* ที่เลี้ยงด้วยน้ำทะเลที่เติมโซเดียมไนเตรทความเข้มข้น 0.5 มก./ล. มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH สูงกว่าสาหร่ายที่เลี้ยงด้วยน้ำทะเล แต่สาหร่ายที่เลี้ยงด้วยน้ำทะเลที่เติมโซเดียมไนเตรทความเข้มข้น 1.0 มก./ล. มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ต่ำกว่าสาหร่ายที่เลี้ยงด้วยน้ำทะเล นอกจากนี้ การใช้สารประกอบไนโตรเจนต่างกันเลี้ยงสาหร่ายหรือพืชอาจส่งผลต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ได้ โดยการศึกษาของ Munene et al. (2017) พบว่า การใส่ไนโตรเจนในรูปของแอมโมเนียมในแปลงปลูกผักโขม สายพันธุ์ AB6 ทำให้ผักโขมมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH สูงกว่าการไม่ใส่ไนโตรเจนและการใส่ไนโตรเจนในรูปของไนเตรท ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสาหร่ายผักกาดทะเลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้มีค่าสูงกว่าสาหร่าย *Ulva intestinalis* ที่มีความสามารถในการดักจับอนุมูลอิสระ DPPH

เพียง $24.25 \pm 2.45\%$ (พันธุ์ทิพย์ และคณะ, 2556) ดังนั้นฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH จะขึ้นอยู่กับชนิดพันธุ์ และปัจจัยทางสภาพแวดล้อม ได้แก่ ฤดูกาล รังสียูวี สารอาหาร อุณหภูมิ และความเค็ม รวมทั้งชนิดของตัวทำลายและวิธีการสกัดด้วยอีกด้วย (จินทนา และอนงค์, 2558; อุไรวรรณ และคณะ, 2562; Trigui et al., 2013; Mezghani et al., 2016; Vega et al., 2020)

Table 3 Antioxidant activities of *Ulva rigida* at different treatments

Antioxidant activities	Treatments			P-value
	T1	T2	T3	
Total carotenoids (mg/g fresh weight)	0.08 ± 0.02^a	0.23 ± 0.03^b	0.19 ± 0.04^b	0.000
Total phenolic contents (mg GAE/g fresh extract)	0.09 ± 0.01^a	0.10 ± 0.02^a	0.10 ± 0.02^a	0.778
DPPH radical scavenging activity (%)	80.99 ± 0.08^b	85.45 ± 1.12^c	77.37 ± 1.34^a	0.000

Values (mean $\pm$ standard deviation, n = 4) with different superscripts in each row are significantly different (P < 0.05)

T1: seawater, T2: seawater supplemented with ammonium chloride to a total ammonia concentration of 5 mg-N/L and T3: seawater supplemented with sodium nitrate to a nitrate concentration of 5 mg-N/L

ประโยชน์ที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้คือสามารถใช้ปุ๋ยไนโตรเจนทั้งแอมโมเนียมคลอไรด์และโซเดียมไนเตรท สำหรับส่งเสริมการเพาะเลี้ยงสาหร่ายผักกาดทะเลเพื่อนำไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร เกษษกรรม และเครื่องสำอาง เพราะทำให้สาหร่ายมีการเติบโต ปริมาณแคโรทีนอยด์ทั้งหมด และปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดไม่แตกต่างกัน แต่การใช้แอมโมเนียมคลอไรด์ในการเลี้ยงสาหร่าย ทำให้มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH สูงกว่าโซเดียมไนเตรท สำหรับการศึกษาครั้งต่อไปควรลดความเข้มข้นของปุ๋ยไนโตรเจนที่เติมลงในน้ำให้มีความเข้มข้นของแอมโมเนียมรวมหรือไนเตรทต่ำกว่า 5 มก.-ไนโตรเจน/ล. และเพิ่มความถี่ในการเติมปุ๋ยไนโตรเจนแทน เพื่อป้องกันความเป็นพิษที่อาจเกิดขึ้นกับสาหร่าย เนื่องจากการศึกษาครั้งนี้พบว่า สาหร่ายที่เลี้ยงด้วยแอมโมเนียมคลอไรด์ที่มีความเข้มข้นของแอมโมเนียมรวม 5 มก.-ไนโตรเจน/ล. และสาหร่ายที่เลี้ยงด้วยโซเดียมไนเตรทที่มีความเข้มข้นของไนเตรท 5 มก.-ไนโตรเจน/ล. ทำให้เกิดจุดสีน้ำตาลบริเวณท่สัสของสาหร่าย และการเติมปุ๋ยไนโตรเจนในปริมาณสูงจะทำให้เกิดแพลงก์ตอนชนิดอื่นในตู้ทดลอง เมื่อมีการทดลองเป็นระยะเวลานาน นอกจากนี้ ควรมีการวิเคราะห์คุณภาพน้ำก่อนการเลี้ยงสาหร่าย เนื่องจากแหล่งน้ำในแต่ละพื้นที่มีปริมาณสารอาหารแตกต่างกัน อย่างเช่น พื้นที่จังหวัดสมุทรสาครที่ผู้วิจัยได้ทำการศึกษานี้จะมีปริมาณฟอสฟอรัสในน้ำทะเลสูง (ปริมาณออร์โธฟอสเฟต 0.52 ± 0.01 มก.-ฟอสฟอรัส/ล.) จึงไม่จำเป็นต้องเติมแหล่งฟอสฟอรัสให้กับสาหร่าย เป็นต้น

สรุป

สาหร่ายผักกาดทะเลที่เลี้ยงด้วยปุ๋ยไนโตรเจนต่างกัน (แอมโมเนียมคลอไรด์ และโซเดียมไนเตรท) เป็นระยะเวลา 21 วัน มีการเติบโต และปริมาณแคโรทีนอยด์ทั้งหมดไม่แตกต่างกัน และมีค่าสูงกว่าสาหร่ายที่เลี้ยงด้วยน้ำทะเล ส่วนปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสาหร่ายทุกชุดการทดลองมีค่าไม่แตกต่างกัน แต่สาหร่ายที่เลี้ยงด้วยแอมโมเนียมคลอไรด์มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH สูงกว่าสาหร่ายที่เลี้ยงด้วยน้ำทะเลและสาหร่ายที่เลี้ยงด้วยโซเดียมไนเตรท ดังนั้นควรใช้ปุ๋ยไนโตรเจน (แอมโมเนียมคลอไรด์) เติมนลงในน้ำ เพราะทำให้สาหร่ายผักกาดทะเลมีการเติบโตดี มีปริมาณแคโรทีนอยด์ทั้งหมดสูง และมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH สูงที่สุด โดยสาหร่ายผักกาดทะเลเหมาะสมที่จะพัฒนาเป็นแหล่งของสารต้านอนุมูลอิสระเพื่อใช้ทดแทนสารสังเคราะห์ซึ่งอาจเป็นอันตรายต่อร่างกายได้

คำขอบคุณ

ขอขอบพระคุณศูนย์วิจัยและพัฒนาการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่งเพชรบุรีที่ให้ความอนุเคราะห์พันธุ์สาหร่ายผักกาดทะเลสำหรับใช้ในการศึกษาครั้งนี้ และขอขอบพระคุณห้องปฏิบัติการโภชนาการศาสตร์อาหารสัตว์น้ำ คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน ที่ให้ความอนุเคราะห์สถานที่ สารเคมี และอุปกรณ์ต่าง ๆ สำหรับการตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

เอกสารอ้างอิง

- จันทนา ไพรบูรณ์, และอนงค์ จีระภัทร์. 2558. ปริมาณฟีนอลิกและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดด้วยตัวทำละลายจากสาหร่ายทะเล. แหล่งข้อมูล: <https://www.lib.ku.ac.th/KUCONF/2558/KC5204022.pdf>. ค้นเมื่อ 2 ธันวาคม 2563.
- จารุวรรณ สุพรรณพยัคฆ์, ปาริสุทธิ์ เณลิมชัยวัฒน์, และทัศนีย์ ลิ้มสุวรรณ. 2563. ผลของการอบแห้งสาหร่ายผักกาดทะเล (*Ulva rigida*) ต่อคุณภาพและการนำไปใช้ประโยชน์ในข้าวเกรียบ. วารสารวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น. 48(2): 227-235.
- จิรภา หินชุย, อุษา มากช่วย, และวิภาวรรณ ไวยสัน. 2554. การผลิตสาหร่ายผักกาดทะเล (*Ulva rigida*) แผ่นทอดกรอบ. น. 517-526. ในประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 49 สาขาประมง 1-4 กุมภาพันธ์ 2554. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.
- พันธุ์ทิพย์ วิเศษพงษ์พันธุ์, พลชา จิตรมิตรสัมพันธ์, ชัยรี แก้วสุริยิต, และอรรณภูมิ กันทะวงศ์. 2556. ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากสาหร่ายทะเล. ในประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 51 สาขาสัตวแพทยศาสตร์, สาขาประมง. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.
- มนทกานติ ท้ามตัน, ชัชวาลิ ชัยศรี, ประพัฒน์ กอสวัสดิ์พัฒน์, จีระรัตน์ เกื้อแก้ว, และนงา ไถทองคำ. 2559. คุณค่าทางโภชนาการของสาหร่ายผักกาดทะเล (*Ulva rigida*) และการประยุกต์ใช้เป็นวัตถุดิบในอาหารกุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei* Boone, 1931). กองวิจัยและพัฒนาการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง กรมประมง, กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.
- รติยา ธูพานิชยานันท์, ดลฤดี ใจสุทธิ์, และจันทนา ไพรบูรณ์. 2562. ผลของอุณหภูมิอบแห้งที่มีต่อจุลินทรีย์และการอบแห้ง การใช้พลังงานในการอบแห้ง และสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสาหร่ายผักกาดทะเล. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร. 50(2): 157-160.
- วิชมณี ยืนยงพุทธกาล, สุวรรณ วรสิงห์, และพรนภา น้อยพันธ์. 2559. การเพิ่มมูลค่าสาหร่ายผักกาดทะเลโดยใช้เป็นส่วนประกอบในผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อสุขภาพ. มหาวิทยาลัยบูรพา, ชลบุรี.
- วิชมณี ยืนยงพุทธกาล, สุวรรณ วรสิงห์, อาภัสรา แสงนาค, และนิสานารถ กระแสร์ชล. 2558. โครงการการพัฒนาผลิตภัณฑ์ขนมขบเคี้ยวจากสาหร่ายผักกาดทะเลสำหรับเด็กวัยเรียน. มหาวิทยาลัยบูรพา, ชลบุรี.
- วิรงรอง เลิศประเสริฐ, และวิวรรณ สิงห์ทวีศักดิ์. 2561. ผลของปุ๋ยเร่งการเติบโตของสาหร่ายผักกาดทะเล (*Ulva rigida* C. Agardh, 1823). แหล่งข้อมูล: https://www4.fisheries.go.th/local/index.php/main/view_activities/1228/14767. ค้นเมื่อ 2 ธันวาคม 2563.
- สิริลักษณ์ แก้วมณี. 2558. ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งของเปปไทด์จากสาหร่ายผักกาดทะเล *Ulva rigida*. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ.
- สุวรรณ วรสิงห์. 2551. ผลของความเค็มที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของสาหร่ายผักกาดทะเล (*Ulva rigida* C. Agardh, 1823). สำนักวิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่ง กรมประมง, กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.
- สุวรรณ วรสิงห์, ธวัช ศรีวีระชัย, อรุณ ศรีอนันต์, และภาคภูมิ วงศ์แข็ง. 2552. สันฐานวิทยา การเลี้ยงและการนำมาใช้ประโยชน์ของสาหร่ายผักกาดทะเล *Ulva rigida* C. Agardh, 1823. สำนักวิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่ง กรมประมง, กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.
- สุวรรณ วรสิงห์, วันสบดี นัยนิตกุล, และกวิน กลมกล่อม. 2560. ผลของความเข้มแสง อุณหภูมิ ปริมาณไนโตรเจนและฟอสเฟตที่มีต่อการเจริญเติบโตของสาหร่ายผักกาดทะเล (*Ulva rigida* C. Agardh, 1826). กองวิจัยและพัฒนาการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง กรมประมง, กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

- สุวรรณา วรสิงห์, สุภาพร ตั้งสิทธิวัฒน์, วันดี ผกามาศ, และภาคภูมิ วงศ์แข็ง. 2555. การเจริญเติบโตของสาหร่ายผักกาดทะเล (*Ulva rigida* C. Agardh, 1823) ที่เลี้ยงร่วมกับปลากะพงขาว (*Lates calcarifer* Bloch, 1970). สำนักวิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่ง กรมประมง, กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.
- อุไรวรรณ วัฒนกุล, วัฒนา วัฒนกุล, และมาโนช ขำเจริญ. 2562. คุณค่าทางโภชนาการ และสารพฤกษเคมีที่สำคัญในสาหร่ายพวงองุ่น (*Caulerpa lentillifera*) ที่เลี้ยงด้วยระดับธาตุอาหารต่างกัน. คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการประมง มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย, ตรัง.
- เอกธิตา ทองด้ง. 2553. ผลของไนโตรเจนและฟอสฟอรัสต่อการเติบโตและองค์ประกอบทางชีวเคมีของสาหร่ายทะเล สกุล *Caulerpa*, *Ulva* และ *Gracilaria*. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ.
- Ale, M., J. D. Mikkelsen, and A. Meyer. 2011. Differential growth response of *Ulva lactuca* to ammonium and nitrate assimilation. *Journal of Applied Phycology*. 23: 345-351.
- American Public Health Association, American Water Works Association and Water Environment Federation. 2017. Standard methods for the examination of water and wastewater. 23rd Edition. American Public Health Association. Washington, D.C.
- Chew, Y. L., Y. Lim, M. Omar, and K. S. Khoo. 2008. Antioxidant activity of three edible seaweeds from two areas in South East Asi. *LWT - Food Science and Technology*. 41: 1067-1072.
- Certain, C., L. D. Patrona, P. Gunkel-Grillon, A. Léopold, P. Soudant, F. Le Grand, and S. Camposeo. 2021. Effect of Salinity and Nitrogen Form in Irrigation Water on Growth, Antioxidants and Fatty Acids Profiles in Halophytes *Salsola australis*, *Suaeda maritima*, and *Enchylaena tomentosa* for a Perspective of Biosaline Agriculture. *Agronomy*. 11(3): 449.
- Ilvessalo, H., and J. Tuomi. 1989. Nutrient availability and accumulation of phenolic compounds in the brown alga *Fucus vesiculosus*. *Marine Biology*. 101(1): 115-119.
- Mahae, N., W. Chankaew, and V. Seechamnaturakit. 2014. Nutritional value of green seaweeds *Ulva rigida* and *Ulva intestinalis*. *Kasetsart University Fisheries Research Bulletin (Thailand)*. 38(1): 20-29.
- Mezghani, S., C. Dezső, I. Bourguiba, J. Hohmann, A. Mohamed, and M. Bouaziz. 2016. Characterization of Phenolic Compounds of *Ulva rigida* (Chlorophyceae) and Its Antioxidant Activity. *European Journal of Medicinal Plants*. 12: 1-9.
- Moustafa, Y. T. A., G. Bougaran, M. Callier, and J.-P. Blancheton. 2014. Bio-physiological response of biofilter algal candidate *Ulva* sp. to different nitrogen forms and fluxes. *International journal of plant physiology and biochemistry*. 6(7): 71-79.
- Munene, R., E. Changamu, N. Korir, and J. Gweyi. 2017. Effects of different nitrogen forms on growth, phenolics, flavonoids and antioxidant activity in amaranth species. *Tropical Plant Research*. 4(1): 81-89.
- Nouriyani, H., E. Majidi, S. Seyyednejad, S. Siadat, and A. Naderi. 2012. Effect of Paclobutrazol under Different Levels of Nitrogen on Some Physiological Traits of Two Wheat Cultivars (*Triticum aestivum* L.). *World Applied Sciences Journal*. 16(1): 1-6.
- Sánchez-Saavedra, M. d. P., F. Y. Castro-Ochoa, V. M. Nava-Ruiz, D. A. Ruiz-Güereca, A. L. Villagómez-Aranda, F. Siqueiros-Vargas, and C. A. Molina-Cárdenas. 2018. Effects of nitrogen source and irradiance on *Porphyridium cruentum*. *Journal of Applied Phycology*. 30(2): 783-792.

- Sasaki, K., and Y. Sawada. 1980. Determination of ammonia in estuary. Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries. 46(3): 319-321.
- Shakouri, A., and G. M. Balouch. 2020. The effects of nitrate and phosphate on growth of algae, *Ulva rigida*. IFRO 19(1): 59-66.
- Strickland, J. D. H., and T. R. Parsons. 1972. A practical handbook of seawater analysis, Ottawa, Fisheries Research Board of Canada.
- Sudhakar, P., P. Latha, and P. V. Reddy. 2016. Chapter 15 - Plant pigments. In Phenotyping Crop Plants for Physiological and Biochemical Traits (pp. 121-127). Academic Press.
- Trigui, M., L. Gasmi, I. Zouari, and S. Tounsi. 2013. Seasonal variation in phenolic composition, antibacterial and antioxidant activities of *Ulva rigida* (Chlorophyta) and assessment of antiacetylcholinesterase potential. Journal of Applied Phycology. 25(1): 319-328.
- Vega, J., F. Álvarez-Gómez, L. Güenaga, F. L. Figueroa, and J. L. Gómez-Pinchetti. 2020. Antioxidant activity of extracts from marine macroalgae, wild-collected and cultivated, in an integrated multi-trophic aquaculture system. Aquaculture. 522: 735088.
- Yildiz, G., S. Celikler, O. Vatan, and S. Dere. 2011. Determination of the Anti-Oxidative Capacity and Bioactive Compounds in Green Seaweed *Ulva rigida* C. Agardh. International Journal of Food Properties. 15(6): 1182-1189.
- Zehlila, A., A. Schaumann, A. B. Mlouka, I. Bourguiba, J. Hardouin, O. Masmoudi, P. Cosette, M. Amri, and T. Jouenne. 2017. Glioprotective effect of *Ulva rigida* extract against UVB cellular damages. Algal Research. 23: 203-215.
- Zhang, W.-W., X.-J. Duan, H.-L. Huang, Y. Zhang, and B.-G. Wang. 2007. Evaluation of 28 marine algae from the Qingdao coast for antioxidative capacity and determination of antioxidant efficiency and total phenolic content of fractions and subfractions derived from *Symphyocladia latiuscula* (Rhodomelaceae). Journal of Applied Phycology. 19(2): 97-108.