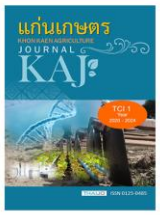
วารสารแก่นเกษตร THAIJO

Content List Available at ThaiJo

Khon Kaen Agriculture Journal

Journal Home Page : https://li01.tci-thaijo.org/index.php/agkasetkaj



# ผลของปุ๋ยไนโตรเจนต่อการเติบโตและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสาหร่ายผักกาดทะเล (*Ulva rigida*)

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

**อัญชลี ตันไชยฮะ[1], พงศ์เชฏฐ์ พิชิตกุล[1]*, อิสริยา วุฒิสินธุ์[1] และ มนทกานติ ท้ามติ้น[2]**

**Anchali Tanchaiha[1], Phongchate Pichitkul[1]*, Idsariya Wudtisin[1] and Montakan Tamtin[2]**

[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 ซ้ำ คือ ชุดการทดลองที่ 1 เลี้ยงด้วยน้ำทะเล (T1) ชุดการทดลองที่ 2 เติมแอมโมเนียมคลอไรด์ให้มีความเข้มข้นของแอมโมเนียรวม 5 มก.-ไนโตรเจน/ล. (T2) และชุดการทดลองที่ 3 เติมโซเดียมไนเตรทให้มีความเข้มข้นของไนเตรท 5 มก.-ไนโตรเจน/ล. (T3) โดยชั่งน้ำหนักสาหร่ายและเปลี่ยนถ่ายน้ำ 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 ± 1.12%) และแตกต่างจากชุดการทดลองอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ดังนั้น เราควรส่งเสริมให้เลี้ยงสาหร่ายผักกาดทะเลด้วยการเติมปุ๋ยไนโตรเจน (แอมโมเนียมคลอไรด์) ในน้ำ เพราะทำให้สาหร่ายเติบโตดี มีปริมาณแคโรทีนอยด์ทั้งหมดสูง และมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH สูงที่สุด ซึ่งสาหร่ายชนิดนี้นำไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร เภสัชกรรม 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 radical

* Corresponding author: ffispcp@ku.ac.th

Received: date; March 31, 2021 Accepted: date; July 7, 2021 Published: date; February , 2022

scavenging activity (85.45 ± 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 และใบหยักคล้ายใบผักกาด สาหร่ายผักกาดทะเลสามารถพบได้บริเวณชายฝั่งทะเลของประเทศไทย ซึ่งเติบโตได้ในช่วงความเค็ม 15 - 40 ส่วนในพันส่วน (สุวรรณา, 2551) โดยสาหร่ายผักกาดทะเลถูกนำมาใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมอาหารและเภสัชกรรม เนื่องจากมีคุณค่าทางโภชนาการสูง ไม่ว่าจะเป็นโปรตีน (กรดอะมิโนต่าง ๆ ได้แก่ ลูซีน อาร์จีนีน ทรีโอนีน วาลีน ฟีนิลอะลานีน ฯลฯ) คาร์โบไฮเดรต (พอลิแซ็กคาไรด์) ไขมัน (กรดไขมันไม่อิ่มตัว ได้แก่ กรดโอลิอิก กรดลิโนเลนิก กรดอะราคิโดนิก ฯลฯ) และแร่ธาตุ (แคลเซียม เหล็ก แมกนีเซียม และไอโอดีน) (สุวรรณา และคณะ, 2552; มนทกานติ และคณะ, 2559; จารุวรรณ และคณะ, 2563; Mahae et al., 2014) นอกจากนี้ สาหร่ายผักกาดทะเลยังมีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระค่อนข้างสูง เช่น สารประกอบฟีนอลิก สารฟลาโวนอยด์ แคโรทีนอยด์ วิตามินซี วิตามินอี เป็นต้น (สิริลักษณ์, 2558; รติยา และคณะ, 2562; Yildiz et al., 2011; Mezghani et al., 2016) โดยสาหร่ายผักกาดทะเลมีสรรพคุณในการรักษาโรคต่าง ๆ ได้แก่ โรคกระดูกผุ โรคท้องผูก กระตุ้นภูมิคุ้มกัน บรรเทาไข้ออกเสบ และต้านการเกิดโรคมะเร็ง สาหร่ายผักกาดทะเลเป็นสาหร่ายที่ไม่มีกลิ่นคาวเหมือนสาหร่ายทะเลชนิดอื่น จึงสามารถนำมาประกอบอาหารได้หลายรูปแบบ ได้แก่ ยำสาหร่าย แกงจืดสาหร่าย สาหร่ายชุบแป้งทอด ใส่ในก๋วยเตี๋ยว ใส่ในสลัด และนำไปรับประทานกับน้ำพริกต่าง ๆ นอกจากการรับประทานสดแล้วยังสามารถนำมาแปรรูปโดยการทำแห้งเพื่อเป็นส่วนประกอบของผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อสุขภาพทั้งอาหารคาวและอาหารหวานได้อีกด้วย (สุวรรณา และคณะ, 2552; จีรภา และคณะ, 2554; วิชมณี และคณะ, 2558; วิชมณี และคณะ, 2559; จารุวรรณ และคณะ, 2563)

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

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

**วิธีการศึกษา**

การศึกษาผลของปุ๋ยไนโตรเจนต่อการเติบโตและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสาหร่ายผักกาดทะเล 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 โดยปรับความเค็มลงครั้งละ 2 ส่วนในพันส่วน เพื่อให้ได้ความเค็ม 25 ส่วนในพันส่วน ซึ่งเป็นความเค็มที่ใช้ในการทดลอง โดยพักสาหร่ายในน้ำทะเลที่มีความเค็ม 25 ส่วนในพันส่วน ซึ่งมีแอมโมเนียรวม 0.21 ± 0.03 มก.-ไนโตรเจน/ล. ไนไตรท์ 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

การเตรียมปุ๋ยเพื่อให้ได้ปริมาณแอมโมเนียรวมสำหรับเติมในน้ำเลี้ยงสาหร่าย 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 ทำการตรวจสอบความเข้มข้นของแอมโมเนียรวมด้วยวิธี Modified indophenol blue (Sasaki and Sawada, 1980) เพื่อให้ทราบความเข้มข้นของแอมโมเนียรวมในสารละลายแอมโมเนียมคลอไรด์ที่เตรียมไว้สำหรับนำไปใช้ในการทดลองต่อไป ซึ่งความเข้มข้นของแอมโมเนียรวมที่ต้องการใช้ในการทดลองคือ 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 เลี้ยงสาหร่ายในน้ำทะเลโดยเติมสารละลายแอมโมเนียมคลอไรด์ให้มีความเข้มข้นของแอมโมเนียรวม 5 มก.-ไนโตรเจน/ล. (T2) และชุดการทดลองที่ 3 เลี้ยงสาหร่ายในน้ำทะเลโดยเติมสารละลายโซเดียมไนเตรทให้มีความเข้มข้นของไนเตรท 5 มก.-ไนโตรเจน/ล. (T3) แต่ละชุดการทดลองมีจำนวน 4 ซ้ำ ใช้ระยะเวลาการทดลอง 21 วัน โดยนำน้ำทะเลความเค็ม 25 ส่วนในพันส่วน ซึ่งมีแอมโมเนียรวม 0.21 ± 0.03 มก.-ไนโตรเจน/ล. ไนไตรท์ 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 x 40 x 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 และมืด 12 ชั่วโมง จากนั้นนำสาหร่ายผักกาดทะเลใส่ตะกร้าพลาสติก พักไว้นาน 5 นาที แล้วชั่งน้ำหนัก 20 กรัม ใส่ในตู้กระจกที่มีน้ำปริมาตร 20 ลิตร (ความหนาแน่น 1 กรัมต่อลิตร) เติมสารละลายแอมโมเนียมคลอไรด์ และสารละลายโซเดียมไนเตรทที่เตรียมไว้ให้ได้ความเข้มข้นของ

แอมโมเนียรวมและไนเตรทตามที่กำหนดไว้ในแต่ละชุดการทดลอง โดยหาปริมาตรของสารละลายแอมโมเนียมคลอไรด์และสารละลายโซเดียมไนเตรทที่เติมลงไปในตู้เลี้ยงสาหร่าย 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 โดยนำสาหร่ายในแต่ละซ้ำมาพักไว้ในตะกร้าพลาสติกนาน 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

ในการศึกษานี้น้ำในทุกชุดการทดลองมีการเปลี่ยนถ่าย 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 ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสาหร่ายผักกาดทะเลที่เลี้ยงด้วยปุ๋ยไนโตรเจนต่างกัน**

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

Total carotenoids (mg/g fresh weight) = [A480 + (0.114 x A663) - (0.638 - A645)] x (V/1000) x 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

Inhibition (%) = [1 - (A sample - A sample blank)/A control)] x 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 มาวิเคราะห์หาค่าความแตกต่างทางสถิติโดยทำการทดสอบความแปรปรวนแบบทางเดียว (One-way analysis of variance; One-way ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระหว่างชุดการทดลองตามวิธีของ Tukey's HSD multiple comparisons test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป

**ผลการศึกษาและวิจารณ์**

**การทดลองที่ 1 การเติบโตของสาหร่ายผักกาดทะเลที่เลี้ยงด้วยปุ๋ยไนโตรเจนต่างกัน**

สาหร่ายที่เลี้ยงในน้ำทะเลโดยเติมสารละลายแอมโมเนียมคลอไรด์ให้มีความเข้มข้นของแอมโมเนียรวม 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* สามารถดูดซึมแอมโมเนียมไปใช้ได้ในการเติบโตดีกว่าไนเตรท 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 มีน้ำหนักลดลงและมีอาการทัลลัสเปื่อย ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ วิรงรอง และวิวรรธน์ (2561) ที่ศึกษาผลของการเติมปุ๋ยยูเรียต่อการเติบโตของสาหร่ายผักกาดทะเล พบว่า การเติมปุ๋ยยูเรียความเข้มข้น 10 มก./ล. ทุกสัปดาห์ ทำให้สาหร่ายผักกาดทะเลมีการเติบโตสูงกว่าชุดควบคุมที่ไม่เติมปุ๋ยยูเรียอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) และเมื่อเลี้ยงสาหร่ายเป็นระยะเวลา 35 วัน พบว่าสาหร่ายในชุดควบคุมที่ไม่เติมปุ๋ยยูเรียมีน้ำหนักลดลง ทั้งนี้ การเติมสารอาหารลงในน้ำทำให้สาหร่ายมีการเติบโตที่ดีและมีมวลชีวภาพสูงขึ้น (สุวรรณา และคณะ, 2560; Ale et al., 2011; Moustafa et al., 2014; Shakouri and Balouch, 2020)

**Table 1** Weight of *Ulva rigida* at different treatments

| Time | Weight of *U. rigida* (g) | | | P-value |
|---|---|---|---|---|
| (day) | 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 ± 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

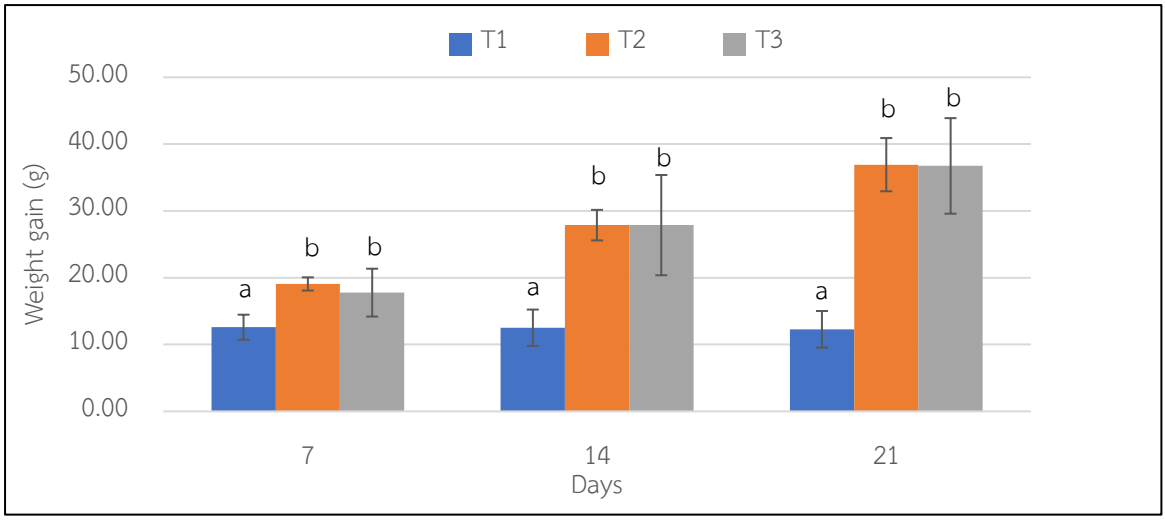



**Figure 1** Growth of *Ulva rigida* at different treatments and each bar represents a mean ± standard deviation (n = 4); letters above the bars reflect significance of differences (P < 0.05)

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

Values (mean ± 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 ที่เลี้ยงด้วยน้ำทะเลโดยเติมสารละลายแอมโมเนียมคลอไรด์ให้มีความเข้มข้นของแอมโมเนียรวม 5 มก.-ไนโตรเจน/ล. มีปริมาณแคโรทีนอยด์ทั้งหมดสูงกว่าสาหร่ายใน T3 ที่เลี้ยงด้วยน้ำทะเลโดยเติมสารละลายโซเดียมไนเตรทให้มี

ความเข้มข้นของไนเตรท 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 สอดคล้องกับการศึกษาของอุไรวรรณ และคณะ (2562) พบว่า สาหร่าย *Caulerpa lentillifera* ที่เลี้ยงด้วยน้ำทะเลมีค่า TPC สูงกว่าสาหร่ายที่เลี้ยงด้วยน้ำทะเลที่เติมโซเดียมไนเตรทความเข้มข้น 0.5 – 1.0 มก./ล. ซึ่งการสะสมสารประกอบฟีนอลิกจะมีความสัมพันธ์แบบผกผันกับปริมาณไนโตรเจนในทัลลัสของสาหร่าย โดยในสภาวะที่ขาดไนโตรเจนจะมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกสูงขึ้น (Ilvessalo and Tuomi, 1989) นอกจากนี้ การใช้สารประกอบไนโตรเจนต่างกันเลี้ยงสาหร่ายหรือพืชอาจส่งผลต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิกได้ โดย Certain et al. (2021) ได้ศึกษาการเลี้ยงพืชทนดินเค็ม 3 ชนิด คือ *Salsola australis*, *Suaeda maritima* และ *Enchylaena tomentosa* ด้วยอัตราส่วนของไนเตรท-ไนโตรเจนต่อแอมโมเนียม-ไนโตรเจน ($NO_3^-$-N:$NH_4^+$-N) ต่างกัน พบว่า *Salsola australis* และ *Suaeda maritima* ที่เลี้ยงด้วย $NO_3^-$-N: $NH_4^+$-N ที่ระดับ 100:0 และ 0:100 มีค่า TPC ไม่ต่างกัน แต่ *Enchylaena tomentosa* ที่เลี้ยงด้วย $NO_3^-$-N:$NH_4^+$-N ที่ระดับ 0:100 มีค่า TPC สูงกว่าที่ระดับ 100:0 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) และการศึกษาของ Munene et al. (2017) พบว่าการใส่ไนโตรเจนในรูปของแอมโมเนียมในแปลงปลูกผักโขม (*Amaranthus* spp.) สายพันธุ์ Abukusa 6 (AB6) ทำให้ผักโขมมีค่า TPC สูงกว่าการใส่ไนโตรเจนในรูปของไนเตรทอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) แต่การไม่ใส่ไนโตรเจนและการใส่ไนโตรเจนในรูปของแอมโมเนียมในแปลงปลูกผักโขมทำให้ผักโขมมีค่า TPC ไม่แตกต่างกัน ดังนั้นปริมาณสารประกอบฟีนอลิกจะขึ้นอยู่กับชนิดพันธุ์และปัจจัยทางสภาพแวดล้อม ได้แก่ ฤดูกาล รังสียูวี สารอาหาร อุณหภูมิ และความเค็ม รวมทั้งชนิดของตัวทำละลายและวิธีการสกัดตัวอย่างอีกด้วย (จันทนา และอนงค์, 2558; อุไรวรรณ และคณะ, 2562; Trigui et al., 2013; Mezghani et al., 2016; Vega et al., 2020) โดยสารประกอบฟีนอลิกจะทำหน้าที่ป้องกันอันตรายจากรังสียูวีต่อทัลลัสของสาหร่าย และทำหน้าที่สร้างสารต้านอนุมูลอิสระ

ส่วนฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH (DPPH radical scavenging activity) พบว่า สาหร่ายใน T2 ที่เลี้ยงด้วยน้ำทะเลโดยเติมสารละลายแอมโมเนียมคลอไรด์ให้มีความเข้มข้นของแอมโมเนียรวม 5 มก.-ไนโตรเจน/ล. มีเปอร์เซ็นต์การดักจับอนุมูลอิสระ DPPH สูงที่สุด (85.45 ± 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 ที่เลี้ยงด้วยน้ำทะเลโดยเติมสารละลายโซเดียมไนเตรทให้มีความเข้มข้นของไนเตรท 5 มก.-ไนโตรเจน/ล. อาจจะเกิดจากการใช้ความเข้มข้นของไนเตรท-ไนโตรเจนไม่เหมาะสม ซึ่งจากการศึกษาของอุไรวรรณ 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 ของ

สาหร่ายผักกาดทะเลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้มีค่าสูงกว่าสาหร่าย *Ulva intestinalis* ที่มีความสามารถในการดักจับอนุมูลอิสระ DPPH เพียง 24.25 ± 2.45% (พันธุ์ทิพย์ และคณะ, 2556) ดังนั้นฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH จะขึ้นอยู่กับชนิดพันธุ์ และปัจจัยทางสภาพแวดล้อม ได้แก่ ฤดูกาล รังสียูวี สารอาหาร อุณหภูมิ และความเค็ม รวมทั้งชนิดของตัวทำละลายและวิธีการสกัดตัวอย่างอีกด้วย (จันทนา 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 ± 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 เภสัชกรรม และเครื่องสำอาง เพราะทำให้สาหร่ายมีการเติบโต ปริมาณแคโรทีนอยด์ทั้งหมด และปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดไม่แตกต่างกัน แต่การใช้แอมโมเนียมคลอไรด์ในการเลี้ยงสาหร่ายทำให้มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH สูงกว่าโซเดียมไนเตรท สำหรับการศึกษาครั้งต่อไปควรลดความเข้มข้นของปุ๋ยไนโตรเจนที่เติมลงในน้ำให้มีความเข้มข้นของแอมโมเนียรวมหรือไนเตรทต่ำกว่า 5 มก.-ไนโตรเจน/ล. และเพิ่มความถี่ในการเติมปุ๋ยไนโตรเจนแทน เพื่อป้องกันความเป็นพิษที่อาจเกิดขึ้นกับสาหร่าย เนื่องจากการศึกษาครั้งนี้พบว่า สาหร่ายที่เลี้ยงด้วยแอมโมเนียมคลอไรด์ที่มีความเข้มข้นของแอมโมเนียรวม 5 มก.-ไนโตรเจน/ล. และสาหร่ายที่เลี้ยงด้วยโซเดียมไนเตรทที่มีความเข้มข้นของไนเตรท 5 มก.-ไนโตรเจน/ล. ทำให้เกิดจุดสีน้ำตาลบริเวณทัสลัสของสาหร่าย และการเติมปุ๋ยไนโตรเจนในปริมาณสูงจะทำให้เกิดแพลงก์ตอนชนิดอื่นในตู้ทดลองเมื่อมีการทดลองเป็นระยะเวลานาน นอกจากนี้ ควรมีการวิเคราะห์คุณภาพน้ำก่อนการเลี้ยงสาหร่าย เนื่องจากแหล่งน้ำในแต่ละพื้นที่มีปริมาณสารอาหารแตกต่างกัน อย่างเช่น พื้นที่จังหวัดสมุทรสาครที่ผู้วิจัยได้ทำการศึกษาครั้งนี้จะมีปริมาณฟอสฟอรัสในน้ำทะเลสูง (ปริมาณออร์โธฟอสเฟต 0.52 ± 0.01 มก.-ฟอสฟอรัส/ล.) จึงไม่จำเป็นต้องเติมแหล่งฟอสฟอรัสให้กับสาหร่าย เป็นต้น

## สรุป

สาหร่ายผักกาดทะเลที่เลี้ยงด้วยปุ๋ยไนโตรเจนต่างกัน (แอมโมเนียมคลอไรด์ และโซเดียมไนเตรท) เป็นระยะเวลา 21 วัน มีการเติบโตและปริมาณแคโรทีนอยด์ทั้งหมดไม่แตกต่างกัน และมีค่าสูงกว่าสาหร่ายที่เลี้ยงด้วยน้ำทะเล ส่วนปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสาหร่ายทุกชุดการทดลองมีค่าไม่แตกต่างกัน แต่สาหร่ายที่เลี้ยงด้วยแอมโมเนียมคลอไรด์มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH สูงกว่าสาหร่ายที่เลี้ยงด้วยน้ำทะเลและสาหร่ายที่เลี้ยงด้วยโซเดียมไนเตรท ดังนั้นควรใช้ปุ๋ยไนโตรเจน (แอมโมเนียมคลอไรด์) เติมลงในน้ำ เพราะทำให้สาหร่ายผักกาดทะเลมีการเติบโตดี มีปริมาณแคโรทีนอยด์ทั้งหมดสูง และมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH สูงที่สุด โดยสาหร่ายผักกาดทะเลเหมาะสมที่จะพัฒนาเป็นแหล่งของสารต้านอนุมูลอิสระเพื่อใช้ทดแทนสารสังเคราะห์ซึ่งอาจเป็นอันตรายต่อร่างกายได้

**คำขอบคุณ**

ขอขอบพระคุณศูนย์วิจัยและพัฒนาการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่งเพชรบุรีที่ให้ความอนุเคราะห์พันธุ์สาหร่ายผักกาดทะเลสำหรับใช้ในการศึกษาครั้งนี้ และขอขอบพระคุณห้องปฏิบัติการโภชนศาสตร์อาหารสัตว์น้ำ คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน ที่ให้ความอนุเคราะห์สถานที่ สารเคมี และอุปกรณ์ต่าง ๆ สำหรับการตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

**เอกสารอ้างอิง**

จันทนา ไพรบูรณ์, และอนงค์ จีรภัทร์. 2558. ปริมาณฟีนอลิกและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดด้วยตัวทำละลายจากสาหร่ายทะเล. แหล่งข้อมูล: https://www.lib.ku.ac.th/KUCONF/2558/KC5204022.pdf. ค้นเมื่อ 2 ธันวาคม 2563.

จารุวรรณ สุพรรณพยัคฆ์, ปาริสุทธิ์ เฉลิมชัยวัฒน์, และทัศนีย์ ลิ้มสุวรรณ. 2563. ผลของการอบแห้งสาหร่ายผักกาดทะเล (*Ulva rigida*) ต่อคุณภาพและการนำไปใช้ประโยชน์ในข้าวเกรียบ. วารสารวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น. 48(2): 227-235.

จีรภา หินซุย, อุษา มากช่วย, และวิภาวรรณ โว้ยสิ้น. 2554. การผลิตสาหร่ายผักกาดทะเล (*Ulva rigida*) แผ่นทอดกรอบ. น. 517-526. ในประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 49 สาขาประมง 1-4 กุมภาพันธ์ 2554. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

พันธุ์ทิพย์ วิเศษพงษ์พันธุ์, พลชา จิตรมิตรสัมพันธ์, ชัชรี แก้วสุรลิขิต, และอรรถวุฒิ กันทะวงศ์. 2556. ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากสาหร่ายทะเล. ในประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 51 สาขาสัตวแพทยศาสตร์, สาขาประมง. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

มนทกานติ ท้ามติ้น, ชัชวาลี ชัยศรี, ประพัฒน์ กอสวัสดิ์พัฒน์, จีรรัตน์ เกื้อแก้ว, และนฏา ไล้ทองคำ. 2559. คุณค่าทางโภชนาการของสาหร่ายผักกาดทะเล (*Ulva rigida*) และการประยุกต์ใช้เป็นวัตถุดิบในอาหารกุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei* Boone, 1931). กองวิจัยและพัฒนาการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง กรมประมง, กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

รติยา ธุวพาณิชยานันท์, ดลฤดี ใจสุทธิ์, และจันทนา ไพรบูรณ์. 2562. ผลของอุณหภูมิอบแห้งที่มีต่อจลนพลศาสตร์การอบแห้ง การใช้พลังงานในการอบแห้ง และสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสาหร่ายผักกาดทะเล. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร. 50(2): 157-160.

วิชมณี ยืนยงพุทธกาล, สุวรรณา วรสิงห์, และพรนภา น้อยพันธ์. 2559. การเพิ่มมูลค่าสาหร่ายผักกาดทะเลโดยใช้เป็นส่วนประกอบในผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อสุขภาพ. มหาวิทยาลัยบูรพา, ชลบุรี.

วิชมณี ยืนยงพุทธกาล, สุวรรณา วรสิงห์, อาภัสรา แสงนาค, และนิสานารถ กระแสร์ชล. 2558. โครงการการพัฒนาผลิตภัณฑ์ขนมขบเคี้ยวจากสาหร่ายผักกาดทะเลสำหรับเด็กวัยเรียน. มหาวิทยาลัยบูรพา, ชลบุรี.

วิรงรอง เลิศประเสริฐ, และวิวรรธน์ สิงห์ทวีศักดิ์. 2561. ผลของปุ๋ยยูเรียต่อการเติบโตของสาหร่ายผักกาดทะเล (*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.

สุวรรณา วรสิงห์. 2551. ผลของความเค็มที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของสาหร่ายผักกาดทะเล (*Ulva rigida* C. Agardh, 1823). สำนักวิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่ง กรมประมง, กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

สุวรรณา วรสิงห์, ธวัช ศรีวีระชัย, อรุณ ศรีอนันต์, และภาคภูมิ วงศ์แข็ง. 2552. สัณฐานวิทยา การเลี้ยงและการนำมาใช้ประโยชน์ของสาหร่ายผักกาดทะเล *Ulva rigida* C. Agardh, 1823. สำนักวิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่ง กรมประมง, กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

สุวรรณา วรสิงห์, วนัสบดี นัยนิติกุล, 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.

เอกธิดา ทองเด็จ. 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. Seechamnanturakit. 2014. Nutritional value of green seaweeds *Ulva rigida* and *Ulva intestinalis*." Kasetsart University Fisheries Research Bulletin (Thailand). 38(1): 20-29.

Mezghani, S., C. Dezs**ő**, I. Bourguiba, J. Hohmann, A. Mohamed, and M. Bouaziz. 2016. Characterization of Phenolic Compounds of *Ulva rigida* (Chlorophycae) 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.