ผลของอาหารเสริมยีสต์ (*Saccharomyces cerevisiae*) ต่อประสิทธิภาพการเจริญเติบโตและค่าชีวเคมีของเลือดในปลานิล (*Oreochromis niloticus*) ที่มีระดับการเลี้ยงหนาแน่นต่างกัน

Effects of Yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) Supplements on Growth Performance and Blood Chemical Profiles of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) at Different Stocking Density

นันทพร สุทธิ[1*],สุปราณี วิกรัยบูรณ์[1] และ พันธภรณ์ สุภัคกาญจน์กุล[2]

Nantaporn Sutthi[1*], Supranee Wigraiboon[1] and Pantaporn Supakankul[2]

[1]*สาขาวิชาประมง ภาควิชาเทคโนโลยีการเกษตร คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหาสารคาม*

[2]*สาขาวิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์และทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยพะเยา*

[1]*Division Fisheries, Department of Agricultural Technology, Faculty of Technology, Mahasarakham University*

[2]*Division of Animal Science, School of Agriculture and Natural Resources, University of Phayao*

Received : 20 Feb 2018

Accepted : 10 May 2018

Published online : 21 May 2018

บทคัดย่อ

ยีสต์ (*Saccharomyces cerevisiae*) เป็นหนึ่งในโพรไบโอติก (probiotic) ที่มีประโยชน์ต่อร่างกายสัตว์และที่ถูกนำเอาไปใช้เป็นอาหารเสริมให้กับสัตว์น้ำ งานวิจัยครั้งนี้ต้องการศึกษาผลของการใช้อาหารเสริมยีสต์ที่ 0.5 เปอร์เซ็นต์ต่อประสิทธิภาพการเจริญเติบโตและค่าชีวเคมีของเลือดในปลานิล (*Oreochromis niloticus*) ที่เลี้ยงในระดับความหนาแน่นต่างกัน คือ 12 18 และ 24 ตัวต่อตู้ (218 327และ 436 ตัว/ลบ.ม.) เป็นระยะเวลา 90 วัน พบว่าปลานิลที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริมยีสต์ที่ 0.5 เปอร์เซ็นต์ ในระดับความหนาแน่น 24 ตัวต่อตู้ มีอัตราการรอด (85.53±2.31 เปอร์เซ็นต์) สูงกว่ากลุ่มควบคุม (ไม่เสริมยีสต์) (76.00±4.00 เปอร์เซ็นต์) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) เช่นเดียวกับค่าชีวเคมีของเลือดในปลานิลที่ได้รับอาหารเสริมยีสต์ที่ 0.5 เปอร์เซ็นต์ ในระดับการเลี้ยงที่หนาแน่น 24 ตัวต่อตู้ พบว่ามีระดับของฮอร์โมน cortisol ระดับค่า glucose ในเลือด ระดับเอนไซม์ aspartate aminotransferase (AST) เอนไซม์ alanine aminotransferase (ALT) และค่า malondialdehyde (MDA) มีระดับที่ต่ำกว่ากลุ่มที่ได้รับอาหารควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) เท่ากับ 16.39±2.27 µg/dL 84.07±2.52 mg/dL 65.67±2.52 unit/L 28.33±3.11 unit/L และ 78.45±7.46 µM/L ตามลำดับ จากการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าอาหารที่เสริมยีสต์ 0.5 เปอร์เซ็นต์ ส่งผลทำให้เพิ่มอัตราการรอดและช่วยเสริมสร้างค่าชีวเคมีของเลือดในปลานิลให้ดีขึ้นถึงแม้ว่าจะอยู่ในสภาพการเลี้ยงที่มีความหนาแน่นสูง ซึ่งความหนาแน่นที่เหมาะสมในการเลี้ยงปลานิลคือไม่ควรเกิน 24 ตัวต่อตู้

คำสำคัญ : ยีสต์, ปลานิล, ประสิทธิภาพการเจริญเติบโต, ชีวเคมีของเลือด

***Corresponding author. E-mail** : nantaporn175sutthi@gmail.com / nantaporn.s@msu.ac.th

Abstract

Yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) is a popular probiotic feed additive to promote the health of aquatic animals. Effects of yeast supplements at 0.5% on growth performance and blood chemical profile of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) were studied at different densities 12, 18 and 24 fish/tank (218, 327 and 436 fish/m^3) over 90 days. Results determined that yeast supplement had a significant effect on survival rate ($P<0.05$). Fish fed with 0.5% yeast and reared at a density of 24 fish/tank showed higher survival rate (85.53±2.31%) than the control group (no added yeast) (76.00±4.00%). For blood chemical profiles, levels of cortisol, blood glucose, aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT) and malondialdehyde (MDA) of fish fed with yeast supplement and reared at a density of 24 fish/tank were significantly lower than the control group ($P<0.05$) at 16.39±2.27 µg/dL, 84.07±2.52 mg/dL, 65.67±2.52 unit/L, 28.33±3.11 unit/L and 78.45±7.46 µM/L, respectively. Thus, 0.5% yeast supplement added to the diet improved survival rate and blood chemical profiles of Nile tilapia despite crowding stress, suitable benefit at moderate densities 24 fish/tank.

Keywords : *Saccharomyces cerevisiae*, Nile tilapia, growth performances, blood chemical profiles

บทนำ

ปลานิล (*Oreochromis niloticus*) เป็นปลาน้ำจืดเศรษฐกิจอันดับหนึ่งของประเทศไทยที่ให้ผลผลิตได้เกือบตลอดทั้งปีและมีปริมาณการผลิตต่อปีสูงที่สุดให้บรรดาสัตว์น้ำจืด โดยในปี พ.ศ. 2558 มีการผลิตปลานิลอยู่ที่ 226,000 ตัน (Department of Fisheries, 2017) อย่างไรก็ตามผลผลิตที่ได้รับจะมีปริมาณมากหรือปริมาณน้อยนั้นก็ขึ้นอยู่กับสภาพการเลี้ยงและการจัดการ โดยหนึ่งในปัญหาสำคัญที่ทำให้ผลผลิตลดลงหรือเกิดความเสียหายก็คือการเลี้ยงที่หนาแน่นมากเกินไป (crowding stress) จะส่งผลให้คุณภาพน้ำเสียได้ง่ายและก่อให้เกิดความเครียดแบบเรื้อรังส่งผลกระทบต่อระบบสรีรวิทยาและระบบฮอร์โมนของปลาได้ (Barton and Iwama, 1991) ซึ่งผลที่ตามมาคือประสิทธิภาพการทำงานของร่างกายลดลง ติดเชื้อโรคได้ง่าย และตายในที่สุดโดยปัจจุบันการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำได้มีการนำเอาโพรไบโอติก (probiotic) ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์เข้ามาใช้เพื่อเสริมในอาหารให้กับสัตว์เลี้ยงกันอย่างแพร่หลาย (Irianto and Austin, 2002; Newaj-Fyzul *et al*., 2014) โดยงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่าการใช้อาหารที่เสริมด้วยโพรไบโอติก สามารถช่วยลดการระบาดของโรคในสัตว์น้ำได้ โดยการกระตุ้นสร้างระบบภูมิคุ้มกัน (Wang & Gu, 2010) และสามารถเพิ่มการเจริญเติบโตและประสิทธิภาพการย่อยอาหารได้ (Peterson *et al*., 2012) ยีสต์ (*Saccharomyces cerevisiae*) ถือว่าเป็นหนึ่งในโพรไบโอติกที่สามารถช่วยในเรื่องการเจริญเติบโตและการใช้ประโยชน์ได้ของอาหาร จึงถูกนำไปใช้ในการเลี้ยงสัตว์น้ำกันอย่างแพร่หลาย เช่นในปลา catla carp (Mohanty *et al*., 1996) ปลา mrigal carp (Swain *et al*., 1996) ปลาลูกผสม striped bass (Li & Gatlin, 2003) ปลา Japanese flounder (Taoka *et al*., 2006) ปลา grouper (*Epinephelus coioides*) (Chiu *et al*., 2010) ตลอดจนปลานิล (Lara-Flores *et al*., 2003; Abdel-Tawwab *et al*., 2008; Iwashita *et al*., 2015) และปลา Galilee tilapia (*Sarotherodon galilaeus*) (Abdel-Tawwab *et al*., 2010) เป็นต้นเนื่องจากผนังเซลล์ของยีสต์จะมีสารพวก β-glucans สาร mannan

oligosaccharides (MOS) และสาร nucleic acid ที่เป็นประโยชน์ต่อการเจริญเติบโตของร่างกาย (Li & Gatlin, 2006; Refstie *et al*., 2010; Kühlwein *et al*., 2014) โดยการเสริมสาร β -glucans และสาร MOS ที่ระดับ 0 1.5 และ 3.0 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัมในการเลี้ยงปลานิลเป็นระยะเวลา 60 วันพบว่ากลุ่มปลานิลที่ได้รับการเสริม β -glucans และสาร MOS ที่ระดับ 3.0 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม มีค่าน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นและมีอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อที่ต่ำกว่ากลุ่มการทดลองอื่นๆได้ ($P<0.05$) (Selim& Reda, 2015) นอกจากนี้ยังช่วยกระตุ้นการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันและการทำงานของลำไส้ (Dimitroglou *et al*., 2009; Kühlwein *et al*., 2014) โดยที่สาร β-glucans จะเข้าไปจับกับ receptor บนผิวเซลล์ของ phagocytes และทำการกระตุ้นให้เกิดกระบวนการ phagocytosis เพื่อกำจัดสิ่งแปลกปลอมช่วยเพิ่มระบบภูมิคุ้มกันให้ดีขึ้น และยังมีการควบคุมการหลั่งสาร cytokines (Chansue *et al*., 2000) ส่งผลทำให้เกิดการแสดงออกของกลุ่มยีน interleukins (IL-1β, TNF-α, IL-6, IL-10TGF-β) เพิ่มขึ้น (Hardie *et al*., 1994) เช่นเดียวกันกับการทำงานของสาร MOS ที่จะเข้าไปจับและยับยังการทำงานของ receptor บนผิวเซลล์ของเชื้อจุลินทรีย์เพื่อที่ไม่ให้เชื้อเหล่านี้สามารถเข้าไปจับกับเซลล์เยื่อบุผิวในลำไส้หรือเกิดแบ่งเซลล์ภายในลำไส้ได้และ MOS ยังกระตุ้นให้ตับหลังสาร lectin เกิดเป็น mannose-binding lectin ที่จะเข้าไปจับกับแบคทีเรียและกระตุ้นการเกิดระบบภูมิคุ้มกันแบบระบบคอมพลีเมนต์ (complement system) ในร่างกายขึ้นต่อไป (Fernandez *et al*., 2002) นอกจากนี้การเสริม β -glucans ที่ระดับ 0.01 เปอร์เซ็นต์ของอาหาร โดยทดลองเลี้ยงนาน 21 วัน พบว่าปลานิลมีระดับของเอนไซม์ aspartate aminotransferase (AST) และ alanine aminotransferase (ALT) ที่ไม่มีความแตกต่างกับกลุ่มที่ได้รับอาหารปกติแต่อย่างไรก็กลุ่มปลานิลได้รับอาหารผสมสาร aflatoxin B1ที่ระดับ 200 ไมโครกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัมพบว่าระดับของเอนไซม์ AST และ ALT จะสูงกว่ากลุ่มปลานิลที่ได้รับ β-glucans และกลุ่มที่รับอาหารชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) (EL-Boshy *et al*., 2008) ซึ่งจากข้อมูลดังกล่าวจะเห็นได้ว่าการได้รับสาร β-glucans ที่มาจากยีสต์จะไม่ส่งผลเสียต่อการทำงานของตับ

จากรายงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการเสริมยีสต์ในอาหารสัตว์น้ำของประเทศไทยที่ผ่านมานั้นพบว่าส่วนใหญ่จะใช้ในรูปแบบโพรไบโอติกสำเร็จรูป เช่นการใช้โพรไบโอติกที่มีส่วนผสมของ *S. cerevisiae* ร่วมกับ photosynthetic bacteria และ lactic acid bacteria ที่ 7.5 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม ในการเลี้ยงปลาหมอไทยในกระชังเป็นระยะเวลา 90 วันพบว่ามีค่าอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อและอัตราการรอดสูงกว่ากลุ่มควบคุม ($P<0.05$) (Petjul & Khrueasri, 2016) นอกจากนี้ Rodmongkoldee *et al*. (2017) ได้ใช้โพรไบโอติกสำเร็จรูปที่มีส่วนผสมของ *S. cerevisiae* และ *Bacillus subtilis* ที่ระดับ 0 0.5 1 และ 1.5 เปอร์เซ็นต์ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม พบว่าประสิทธิภาพการเจริญเติบโตของปลาหมอไทยกลุ่มที่ได้รับการเสริมโพรไบโอติกที่ระดับ 0.5-1.5 เปอร์เซ็นต์ ไม่มีความแตกต่างกัน แต่อย่างไรก็ตามหากเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมพบว่ามีค่าน้ำหนักที่เพิ่มขึ้น อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ และอัตราการเจริญเติบโตต่อวันสูงกว่ากลุ่มควบคุม ($P<0.05$) นอกจากนี้มีการศึกษาการใช้เฉพาะยีสต์เพียงอย่างเดียวในการเสริมอาหารสัตว์น้ำเช่น การใช้ยีสต์ (*S. cerevisiae*) ทดแทนโปรตีนจากปลาป่นที่ระดับ 30 45 60 และ 75 เปอร์เซ็นต์ ในการเลี้ยงปลาสวายโมงเป็นระยะเวลา 9 เดือน พบว่ามีระบบภูมิคุ้มกันที่ดีขึ้นโดยมีค่า alternative complement activity ค่า lysozyme activity และค่า total Immunoglobulin ที่สูงกว่ากลุ่มที่ไม่ได้รับยีสต์แต่อย่างไรก็ตามการทดแทนปลาป่นด้วยยีสต์ที่ 45 เปอร์เซ็นต์ จะมีค่าน้ำหนักสุดท้าย น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ และอัตราการเจริญเติบโตต่อวัน สูงกว่ากลุ่มทดลองอื่นๆ (Pongpet, 2014) ขณะที่การทดลองของ Kannika *et al*.

(2012) ทำการเลี้ยงปลานิลด้วยยีสต์ (*S. cerevisiae*) ที่ระดับ 0 2.5 5 และ 10 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม เป็นระยะเวลา 90 วัน พบว่าอาหารเสริมยีสต์ไม่มีผลต่อประสิทธิภาพการเจริญเติบโตของปลานิล ($P>0.05$) แต่อย่างไรก็ตามได้มีการแนะนำว่าปลานิลที่ได้รับยีสต์ที่ 5 กรัม มีการเพิ่มขึ้นของปริมาณเม็ดเลือดแดงตลอดจนเพิ่มขบวนการจับกินสิ่งแปลกปลอม (phagocytosis activity (%)) สูงขึ้นเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ($P<0.05$) แต่อย่างไรก็ตามรายงานของ Longmutcha *et al*. (2015) ได้ศึกษาการเสริมยีสต์ (*S. cerevisiae*) ในอาหารของลูกปลานิลอายุ 30 วัน ที่ระดับ 0 0.1 0.25 และ 0.5 เปอร์เซ็นต์ของอาหาร ที่เลี้ยงเป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์พบว่าประสิทธิภาพการเจริญเติบโต อัตราการรอด และกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ทริปซินและเอนไซม์ไคโมทริปซิน ไม่มีความแตกต่างกันในทุกชุดการทดลอง

จากรายงานการวิจัยของประเทศไทยดังได้กล่าวข้างต้นทำให้เห็นว่าระดับการเสริมยีสต์ในอาหารสัตว์น้ำส่วนใหญ่จะอยู่ในระดับ 0.1-1.5 เปอร์เซ็นต์ของอาหารซึ่งอาจส่งผลต่อประสิทธิภาพการเจริญเติบโตของปลาได้ แต่อย่างไรก็ตามการเสริมยีสต์ที่ระดับ 0.5 เปอร์เซ็นต์นั้นจะส่งผลทำให้ระบบภูมิคุ้มกันดีขึ้น (Kannika *et al*., 2012) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานวิจัยจากต่างประเทศที่ทำการเสริมยีสต์ในอาหารปลาที่ระดับ 0.5 เปอร์เซ็นต์ สามารถช่วยทั้งประสิทธิภาพการเจริญเติบโตและระบบภูมิคุ้มกันของตัวปลา ตลอดจนสามารถเพิ่มอัตราการรอดได้ (Ortuño *et al*., 2002; Mazurkiewicz *et al*., 2005; Abdel-Tawwab *et al*., 2008) นอกจากนี้การเสริมยีสต์ในอาหารให้กับสัตว์น้ำยังช่วยเสริมสร้างค่าชีวเคมีของเลือดให้ดีขึ้นถึงแม้ว่าจะอยู่ในสภาพการเลี้ยงที่มีความหนาแน่นสูงก็ตาม เช่น ค่าเอนไซม์ในตับ aspartate aminotransferase (AST) และ alanine aminotransferase (ALT) ในปลา rohu (*Labeo rohita*) (Pakhira *et al*., 2015) ระดับ glucose ในเลือดของปลา rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)(Trenzado *et al*., 2006) และระดับการเกิดสาร malondialdehyde (MDA) ซึ่งเป็นสารที่เกี่ยวข้องกับภาวะถูกออกซิไดซ์เกินสมดุล (oxidative stress) ของเซลล์ในปลา Atlantic salmon (*Salmo salar*) (Reyes-Cerpa *et al*., 2018) เป็นต้น แต่อย่างไรก็ตามยังไม่พบรายงานการศึกษาเรื่องผลของการเสริมยีสต์ต่อค่าชีวเคมีของเลือดในปลานิลที่ได้รับการเลี้ยงในระดับความหนาแน่นแตกต่างกัน โดยสมมุติฐานในการวิจัยครั้งนี้คาดว่าระดับความหนาแน่นในการเลี้ยงที่เพิ่มขึ้นจะทำให้ปลาเกิดความเครียดส่งผลต่อระดับค่าชีวเคมีในเลือด เช่นฮอร์โมน cortisol ระดับ glucoseในเลือด ค่าเอนไซม์ในตับ (AST และ ALT) และระดับของค่า MDA เพิ่มมากขึ้นแต่อย่างไรก็ตามหากปลานิลได้รับอาหารเสริมยีสต์ก็อาจจะสามารถควบคุมให้ระดับค่าการเปลี่ยนแปลงชีวเคมีในเลือดอยู่ในระดับปกติเท่ากับกลุ่มที่เลี้ยงในระดับความหนาแน่นต่ำได้ ดังนั้นในงานวิจัยครั้งนี้จึงต้องการศึกษาผลของการใช้อาหารเสริมยีสต์ (*Saccharomyces cerevisiae*) ที่ระดับ 0.5 เปอร์เซ็นต์ต่อประสิทธิภาพการเจริญเติบโตและค่าชีวเคมีของเลือดในปลานิลที่เลี้ยงในระดับความหนาแน่นต่างกัน

วิธีดำเนินการวิจัย

การเตรียมสัตว์ทดลอง

ปลานิลดำอายุประมาณ 2 เดือน จากศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืดจังหวัดขอนแก่น ถูกนำมาพักในถังไฟเบอร์กลาสที่มีปริมาตรความจุน้ำ1000 ลิตร ก่อนเริ่มการทดลองเป็นเวลา 14 วัน เพื่อฝึกให้คุ้นเคยกับการกินอาหารและสภาพแวดล้อม โดยให้อาหารเม็ดสำเร็จรูปโปรตีน 32 เปอร์เซ็นต์ กินจนอิ่มวันละ 2 ครั้ง เวลา 9.00 น. และ 16.00 น. จากนั้นสุ่มปลานิลที่แข็งแรงและมีขนาดใกล้เคียงกัน (น้ำหนักเฉลี่ยเท่ากับ 3.64±0.15 กรัม และความยาวเฉลี่ยเท่ากับ 4.66±0.19

เซนติเมตร) จำนวนทั้งหมด 324 ตัว มาเลี้ยงในตู้กระจกขนาด 50×30×38 เซนติเมตร โดยปล่อยปลาที่ความหนาแน่นแตกต่างกันคือ 12 18 และ 24 ตัว/ตู้ หรือคิดเป็น 218 327 และ 436 ตัว/ลบ.ม. (Ran *et al*., 2016) การทดลองละ 3 ซ้ำ และมีการให้อากาศตลอดระยะเวลาในการเลี้ยง โดยปลาที่เลี้ยงในแต่ละความหนาแน่นจะถูกให้อาหารที่ 3 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักตัวต่อวันตลอดระยะ 90 วัน โดยมีรายละเอียดดังนี้

กลุ่มที่เลี้ยงในระดับความหนาแน่น 12 ตัว/ตู้ และได้รับอาหารชุดควบคุม

กลุ่มที่เลี้ยงในระดับความหนาแน่น 18 ตัว/ตู้ และได้รับอาหารชุดควบคุม

กลุ่มที่เลี้ยงในระดับความหนาแน่น 24 ตัว/ตู้ และได้รับอาหารชุดควบคุม

กลุ่มที่เลี้ยงในระดับความหนาแน่น 12 ตัว/ตู้ และได้รับอาหารเสริมยีสต์ 0.5 เปอร์เซ็นต์

กลุ่มที่เลี้ยงในระดับความหนาแน่น 18 ตัว/ตู้ และได้รับอาหารเสริมยีสต์ 0.5 เปอร์เซ็นต์

กลุ่มที่เลี้ยงในระดับความหนาแน่น 24 ตัว/ตู้ และได้รับอาหารเสริมยีสต์ 0.5 เปอร์เซ็นต์

การเตรียมอาหารผสมยีสต์

นำยีสต์ (*S. cerevisiae*)(Perfect®, Thailand) มาเตรียมผสมในอาหารที่ 0.5 เปอร์เซ็นต์ของอาหาร หรือคิดเป็น 5 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม โดยดัดแปลงวิธีการจาก Kannika *et al*. (2012) ทำการบดยีสต์ด้วยโกร่งให้ละเอียด จากนั้นชั่ง 5 กรัม นำมาผสมกับอาหารเม็ดสำเร็จรูปโปรตีน 32 เปอร์เซ็นต์ และผสมแป้งกัวร์กัม (guar gum) 20 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม เพื่อใช้เป็นสารเหนียวยึดเกาะยีสต์เข้ากับอาหารเม็ด จากนั้นทำการพรมน้ำกลั่นให้ทั่วอาหารเม็ดแล้วผสมให้เข้ากัน และตากในที่ร่มประมาณ 1 วัน เก็บอาหารในภาชนะที่มิดชิดแล้วเก็บแช่ที่อุณหภูมิ 4°C

การจัดการระหว่างการเลี้ยง

ให้อาหารวันละ 2 ครั้ง เช้า-เย็น เวลา 9.00 น. และ 16.00 น. โดย ให้อาหาร 3 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักตัว ทำการเปลี่ยนถ่ายน้ำและดูดตะกอนทุก 7 วัน โดยแต่ละครั้งจะเปลี่ยนถ่ายน้ำที่ 50 เปอร์เซ็นต์ของปริมาตรน้ำทั้งหมดตลอดการทดลอง 90 วัน ตรวจวัดคุณภาพน้ำก่อนการเปลี่ยนถ่ายน้ำ ด้วยเครื่องวัดคุณภาพน้ำ EUTECH Instruments PCD650 และวัดค่าแอมโมเนียไนโตรเจนรวม (total ammonia-nitrogen; TAN) โดยใช้ชุดตรวจสำเร็จรูป (Tetra®, Germany) โดยมีค่าอุณหภูมิอยู่ในช่วง 25.32-26. 20°C ค่า pH อยู่ในระหว่าง 7.30-7.53 ค่าออกซิเจนที่ละลายในน้ำอยู่ในช่วง 5.94-7.41 mg/L และค่าแอมโมเนียไนโตรเจนรวม อยู่ในช่วง 0.20-0.45 mg/L ตลอดระยะเวลาการเลี้ยง 90 วัน

การเก็บตัวอย่างเลือด

หลังจากทำการทดลองเป็นระยะเวลา 90 วัน จึงทำการสุ่มเก็บตัวอย่างเลือดปลากลุ่มละ 10 ตัว ทำการสลบด้วยน้ำมันกานพูล (clove oil) ที่ระดับ 100 mg/L (Perdikaris *et al*., 2010) และทำการเจาะเลือดบริเวณ caudal vein โดยเก็บเลือดแบ่งใส่หลอด 2 หลอด คือหลอดแรกที่มีสารป้องกันเลือดแข็งตัวเคลือบอยู่ (lithium heparin) ทำการปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง (High Speed Centrifuges Z383K, Hermle, Germany) โดยใช้ความเร็วที่ 3,000 g นาน 10 นาทีที่อุณหภูมิ 4°C เก็บส่วนใส (plasma) ใส่หลอดแล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20°C ส่วนหลอดที่สองเป็นหลอดที่ไม่มีสารป้องกันเลือดแข็งตัว โดยการเก็บเลือดใสในหลอดจากนั้นนำไปตั้งไว้ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลาข้ามคืน แล้วทำการปั่นเหวี่ยงโดยความเร็ว

3,000 g นาน 10 นาทีที่อุณหภูมิ 4°C จากนั้นเก็บส่วนใส (serum) ใส่หลอดแล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20°C เพื่อนำไปวิเคราะห์ค่าชีวเคมีของเลือดต่อไป

การวิเคราะห์ค่าชีวเคมีของเลือด

นำเอา plasma ของเลือดปลามาตรวจวิเคราะห์ค่าชีวเคมีของเลือดได้แก่ ค่า AST และ ค่า ALT โดยใช้หลักการทำงานแบบ kinetic ด้วยชุดน้ำยาสำเร็จรูป (Stanbio AST/GOT Liqui-UV®และ Stanbio ALT/GOT Liqui-UV®, USA) และตรวจวัดระดับน้ำตาลในเลือด (blood glucose) โดยใช้หลักการทำงานแบบ endpoint ด้วยชุดน้ำยาสำเร็จรูป (Stanbio Glucose LiquiColor®, USA) ทำการอ่านผลของค่า AST ALT และ glucose ด้วยเครื่อง automate chemistry TC6060L (Tecom Science Co., Ltd, China) วิเคราะห์ระดับ MDA ด้วยวิธี thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) assay ตามวิธีการของ Sutthi *et al*. (2018) อ่านผลด้วยค่าการดูดกลืนแสงที่ 532 นาโนเมตร โดยเครื่อง GENESYS™ 20 Visible Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Germany) นอกจากนี้ได้นำเอา serum มาวัดระดับฮอร์โมน cortisol โดยอาศัยหลักการ radio immuno assay (RIA) ด้วยชุดน้ำยาสำเร็จรูป cortisol test kit (Biogenetech, USA) และอ่านผลด้วยเครื่อง automatic gamma counter wizard 1470/2470 (Perkin Elmer, USA)

การเก็บบันทึกข้อมูลและการวิเคราะห์ทางสถิติ

ทำการบันทึกข้อมูลการเจริญเติบโตของปลานิลเมื่อเลี้ยงครบ 90 วัน เพื่อนำมาคำนวณหาค่าประสิทธิภาพการเจริญเติบโตและอัตราการรอด ดังต่อไปนี้ (Panase and Mengumphan, 2015)

ค่าน้ำหนักที่เพิ่มขึ้น (weight gain; WG) = น้ำหนักเมื่อสิ้นสุดการทดลอง –น้ำหนักเริ่มต้นการทดลอง

ค่าความยาวที่เพิ่มขึ้น (length gain; LG) = ความยาวเมื่อสิ้นสุดการทดลอง –ความยาวเริ่มต้นการทดลอง

อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (specific growth rate; SGR)

$$= \frac{(\ln \text{น้ำหนักสิ้นสุดการทดลอง} - \ln \text{น้ำหนักปลาเริ่มต้นการทดลอง}) \times 100}{\text{ระยะเวลาการทดลอง (วัน)}}$$

น้ำหนักที่เพิ่มขึ้นเฉลี่ยต่อวัน (average daily gain; ADG)

$$= \frac{\text{น้ำหนักปลาเมื่อสิ้นสุดการเลี้ยง} - \text{น้ำหนักปลาเริ่มต้น}}{\text{ระยะเวลาการทดลอง (วัน)}}$$

อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ (feed conversion ratio; FCR)

$$= \frac{\text{น้ำหนักอาหารที่ปลากิน}}{\text{น้ำหนักปลาที่เพิ่มขึ้น}}$$

อัตราการรอด (survival rate %)

$$= \frac{\text{จำนวนปลาเมื่อสิ้นสุดการทดลอง} \times 100}{\text{จำนวนปลาที่เริ่มต้นการทดลอง}}$$

วิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูล (analysis of variance: ANOVA) ทางด้านการเจริญเติบโตได้แก่ ค่าน้ำหนักที่เพิ่มขึ้น ค่าความยาวที่เพิ่มขึ้น อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ น้ำหนักที่เพิ่มขึ้นเฉลี่ยต่อวัน อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ และอัตราการรอด รวมไปถึงข้อมูลทางด้านค่าชีวเคมีในเลือด ได้แก่ cortisol AST ALT glucose และ MDA เพื่อทำการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's new multiple range test, DMRT ระหว่างการเลี้ยงที่มีความหนาแน่น 3 กลุ่ม (12 18 และ 24 ตัวต่อตู้) และใช้วิธี student's *t*-test เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มตัวอย่างปลาที่ได้รับอาหาร 2 กลุ่ม (เสริมยีสต์ 0.5 เปอร์เซ็นต์ และควบคุม(ไม่เสริมยีสต์)) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล

ค่าการเจริญเติบโตและอัตราการรอดตาย

ผลของอาหารเสริมยีสต์ที่ 0.5 เปอร์เซ็นต์ ต่อการเจริญเติบโตของปลานิลที่เลี้ยงในระดับความหนาแน่นที่แตกต่างกัน 3 ระดับคือ 12 18 และ 24 ตัว/ตู้ หรือคิดเป็น 218 327 และ 436 ตัว/ลบ.ม. เป็นระยะเวลา 90 วัน (ภาพที่ 1) เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับอาหารควบคุม (ไม่ผสมยีสต์) พบว่ามีค่าน้ำหนักที่เพิ่มขึ้น ค่าความยาวที่เพิ่ม ค่าอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ ค่าน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นเฉลี่ยต่อวัน และค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ ของปลาทั้ง 2 กลุ่มไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05) เช่นเดียวกับการเปรียบเทียบระหว่างความหนาแน่นในแต่ละกลุ่มการให้อาหาร พบว่าค่าดังกล่าวไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05) ข้อมูลเรื่องการเสริมยีสต์ต่อการเจริญเติบของปลานิลในระดับการเลี้ยงด้วยความหนาแน่นแตกต่างกันนั้นมีอยู่อย่างจำกัดยกตัวอย่างเช่น รายงานของ Ran *et al*. (2016) ที่เลี้ยงปลานิลด้วยอาหารเสริมยีสต์ที่ 0.1 เปอร์เซ็นต์ ในระดับความหนาแน่นสูง (จำนวน 436 ตัว/ลบ.ม.) ไม่พบว่ามีความแตกต่างทางสถิติ (P>0.05) ของค่าการเจริญเติบโตเช่น ค่าน้ำหนักเมื่อสิ้นสุดการทดลองค่าน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นและค่าอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่เลี้ยงด้วยความหนาแน่นระดับเดียวกันแต่มีการให้อาหารควบคุม (ไม่ผสมยีสต์) นอกจากนี้ Prado-Rebolle *et al*. (2014) รายงานว่าหากมีการเลี้ยงปลานิลโดยการผสมยีสต์รวมกับจุลินทรีย์ตัวอื่น เช่น กลุ่ม *Bacillus* sp. สามารถช่วยเพิ่มอัตราการเจริญเติบโตของปลานิล เช่น ค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ น้ำหนักที่เพิ่มขึ้นเฉลี่ยต่อวัน และค่าอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อได้ดีกว่ากลุ่มควบคุมในสภาพที่มีความหนาแน่นในการเลี้ยง 100 ตัว/ตร.ม. เนื่องจากประสิทธิภาพการใช้โพรไบโอติกในรูปแบบรวมจุลินทรีย์จะส่งผลดีว่าการใช้จุลินทรีย์แบบรายตัว (Hassaan *et al*., 2014) นอกจากนี้ยังพบว่าระดับความหนาแน่นในการเลี้ยงปลาจะส่งผลทำให้การเจริญเติบโตลดลงโดยเฉพาะกลุ่มที่มีการเลี้ยงหนาแน่นสูง (Ridha, 2006; Ran *et al*., 2016) อย่างไรก็ตามได้มีการแนะนำว่าปลานิลที่เลี้ยงด้วยความหนาแน่นต่ำที่ 218 ตัว/ลบ.ม. จะมีประสิทธิภาพการเจริญเติบโตดีกว่ากลุ่มที่มีความหนาแน่นสูง (Ran *et al*., 2016) นอกจากนี้ผู้วิจัยได้สังเกตเห็นพฤติกรรมของปลาตลอดระยะเวลาการเลี้ยง 90 วันพบว่าปลามีพฤติกรรรมก้าวร้าว (aggressive behavior) โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกลุ่มที่มีการเลี้ยงอย่างหนาแน่น (18 และ24 ตัว/ตู้) ซึ่ง

อาจส่งผลทำให้เกิดความเครียด (crowding stress) ได้ (Barcellos *et al*., 1999) และมีผลกระทบต่อระบบภูมิคุ้มกันและสรีรวิทยา (Wendelaar-Bonga, 1997) รวมไปถึงอัตราการรอดที่ลดลง (Fairchild and Howell, 2001) จากรายงานครั้งนี้ผู้วิจัยพบว่าการเสริมยีสต์ที่ 0.5 เปอร์เซ็นต์ ส่งผลทำให้ปลานิลมีอัตราการรอดสูงกว่ากลุ่มที่ได้รับอาหารควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ในระดับความหนาแน่นที่ 24 ตัว/ตู้ เท่ากับ 85.53±2.31 และ 76.00±4.00 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ (ภาพที่ 1ฉ) สอดคล้องกับรายงานของ Abdel-Tawwab *et al*. (2008) ที่เลี้ยงปลานิลโดยอาหารผสมยีสต์ที่ 0.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นระยะเวลา 12 สัปดาห์ พบว่าปลานิลมีอัตราการรอดสูงกว่ากลุ่มควบคุมทั้งก่อนและหลังการได้รับเชื้อ *Aeromonas hydrophila* อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) จากข้อมูลดังกล่าวจะเห็นได้ว่ายีสต์เป็นโพรไบโอติกตัวหนึ่งที่มีประโยชน์ต่อร่างกายเนื่องจากว่าผนังเซลล์ของยีสต์มีสารพวก β-glucans สาร mannan oligosaccharides (MOS) และสาร nucleic acid ที่เป็นประโยชน์ต่อการเจริญเติบโตของร่างกาย (Li and Gatlin, 2006; Refstie *et al*., 2010; Kühlwein *et al*., 2014) โดยมีรายงานว่าสารพวก β-glucans และสาร mannan oligosaccharides (MOS) จากผนังเซลล์ของยีสต์สามารถเพิ่มความยาวและความหนาแน่นของ microvilli ในลำไส้ปลานิลได้ (Ran *et al*., 2015; 2016) ซึ่งจากผลดังกล่าวจึงทำให้เกิดการกระตุ้นการดูดซึมสารอาหารในลำไส้ได้มากขึ้น ส่งผลทำให้ปลามีการเจริญเติบโตได้ดีขึ้น และยีสต์ยังมีสารกลุ่ม nucleic acid โดยเฉพาะสาร ribonucleic acid (RNA) ซึ่งเป็น peptides สายสั้นๆ ทำให้ย่อยและดูดซึมในลำไส้ได้ง่ายส่งผลทำให้ร่างกายเจริญเติบโตได้ดี (Li *et al*., 2004) นอกจากนี้ยังพบว่าปลานิลที่ได้รับการเสริมโพรไบโอติก (*Bacillus subtilis Aspergillus oryzae* และ *S. cerevisiae*) ที่ 5 และ 10 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ เมื่อทำการหาปริมาณจุลินทรีย์ในลำไส้จะพบว่ายีสต์ (*S. cerevisiae*) เป็นจุลินทรีย์ชนิดเด่นกว่าจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ ในลำไส้ปลานิล (Iwashita *et al*., 2015) ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่ายีสต์ได้เข้าไปแย่งที่อยู่หรือกำจัดจุลินทรีย์อื่นๆที่อยู่ในลำไส้ (Kim *et al*., 2009) จากรายงานที่ได้กล่าวข้างต้นชี้ให้เห็นว่าการเสริมยีสต์ที่ 0.5 เปอร์เซ็นต์ ในอาหารส่งผลทำให้ปลานิลมีอัตราการรอดสูงขึ้นถึงแม้จะอยู่ในสภาวะความหนาแน่นสูง

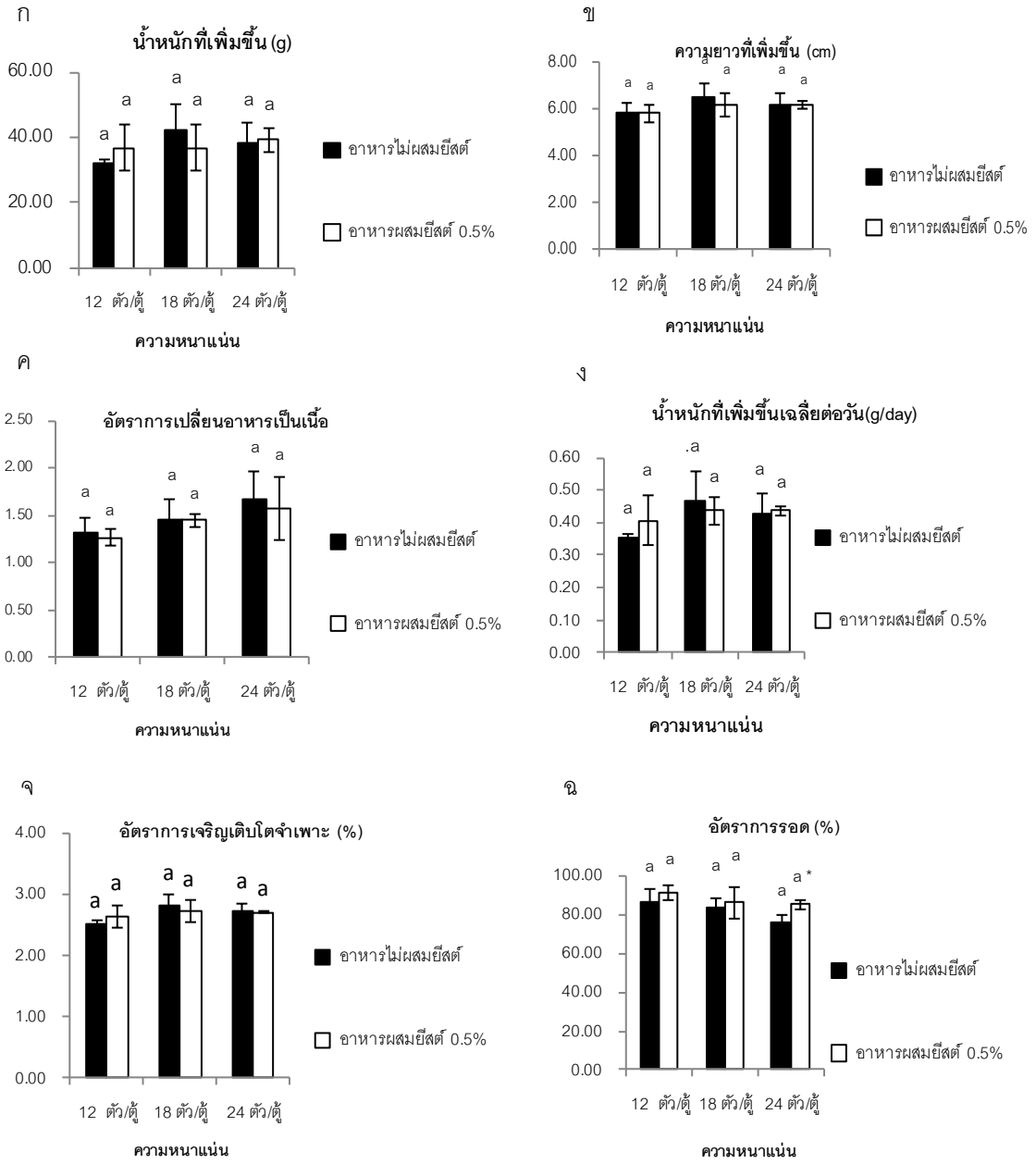
ค่าชีวเคมีของเลือด

ผลการศึกษาการวิเคราะห์ค่าชีวเคมีของเลือดในปลานิลที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริมยีสต์ที่ 0.5 เปอร์เซ็นต์ ที่ระดับความหนาแน่นที่แตกต่างกัน 3 ระดับคือ 12 18 และ 24 ตัว/ตู้ หรือคิดเป็น 218 327 และ 436 ตัว/ลบ.ม. เปรียบเทียบกับกลุ่มได้รับอาหารควบคุมเป็นระยะเวลา 90 วัน (ภาพที่ 2) พบว่าระดับฮอร์โมน cortisol ของปลาที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริมยีสต์ที่ 0.5 เปอร์เซ็นต์ มีระดับต่ำกว่าปลาที่เลี้ยงด้วยอาหารกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ทั้งในระดับความหนาแน่น 18 ตัวต่อตู้ มีค่าเท่ากับ 12.20±1.96 และ 17.82±1.42 µg/dL ตามลำดับ และในระดับความหนาแน่น 24 ตัว/ตู้ มีค่าเท่ากับ 16.39±2.27 และ 21.97±1.48 µg/dL ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าปลาในกลุ่มที่เสริมด้วยอาหารเสริมยีสต์ 0.5 เปอร์เซ็นต์ และกลุ่มควบคุมมีระดับ cortisol สูงขึ้นตามระดับความหนาแน่นที่เพิ่มขึ้น ($P<0.05$) (ภาพที่ 2ก) เช่นเดียวกันกับผลของระดับ glucose พบว่ากลุ่มของปลาที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริมยีสต์ที่ 0.5 เปอร์เซ็นต์ มีระดับ glucose ต่ำกว่าปลาที่เลี้ยงด้วยอาหารกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ที่ระดับความหนาแน่น 24 ตัวต่อตู้ มีค่าเท่ากับ 84.07±2.52 และ 110.56±3.61 mg/dL ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าปลาในกลุ่มที่เสริมด้วยอาหารเสริมยีสต์ 0.5 เปอร์เซ็นต์ และกลุ่มควบคุมมีระดับ glucose สูงขึ้นตามระดับความหนาแน่นที่เพิ่มขึ้น ($P<0.05$) (ภาพที่ 2ข) จากผลการวิจัยดังกล่าวสอดคล้องกับรายงานที่ว่า

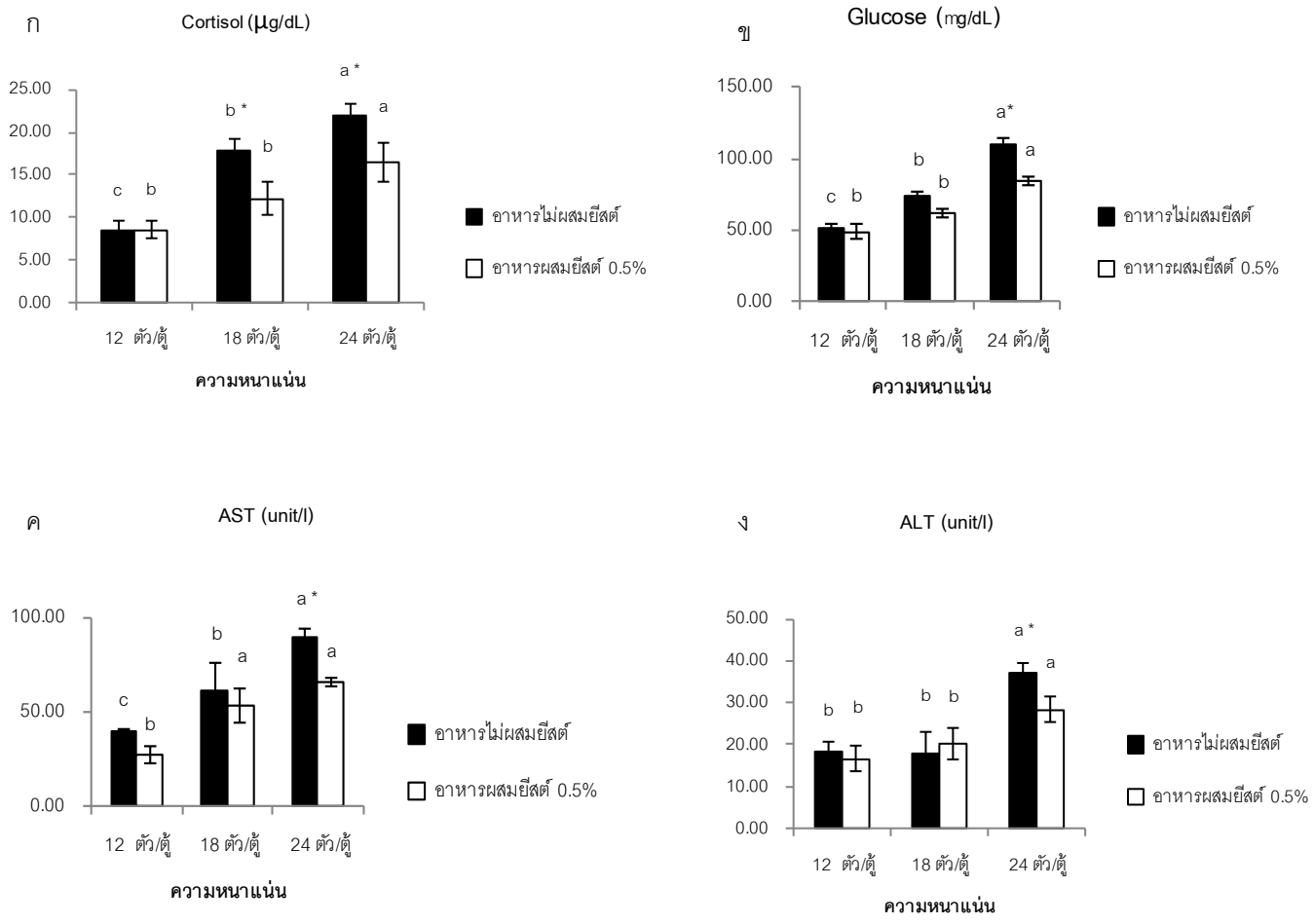
ปลานิลที่เลี้ยงในความหนาแน่นสูง (crowding stress) จะทำให้ปลาอยู่ในสภาวะความเครียดจากทางสังคม (social stressor) ส่งผลทำให้ระดับ cortisol และ glucose เพิ่มขึ้น (Barreto & Volpato, 2006) เช่นเดียวกับรายงานในปลาชนิดอื่นๆเช่น ปลา rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) ที่เลี้ยงในระดับความหนาแน่นสูงจะส่งผลต่อระดับ glucose ที่เพิ่มสูงขึ้นแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่เลี้ยงในระดับความความหนาแน่นต่ำ (Trenzado *et al*., 2006) สอดคล้องกับรายงานของ Pakhira *et al*. (2015) ที่มีการบรรจุปลา rohu (*Labeo rohita*) อย่างหนาแน่นในการระบบขนส่งส่งผลต่อระดับ glucose ที่สูงขึ้น โดยทั่วไปแล้วระดับของ cortisol และ glucose มักถูกนำมาใช้เป็นดัชนีชี้วัดความเครียด (Morgan & Iwama, 1997) ซึ่งการเพิ่มขึ้นของฮอร์โมน cortisol จะส่งผลทำให้ระดับ glucose ขึ้นตาม เนื่องจาก cortisol จะเป็นตัวกระตุ้นกระบวนการเกิด glycogenolysis และ gluconeogenesis ส่งผลทำให้เกิดการเพิ่มขึ้นของระดับ glucose ตามมา (Martinéz-Porchas *et al*., 2009) นอกจากนี้ระดับ cortisol ที่สูงยังส่งผลต่อการเกิดการตายของเซลล์ (apoptosis) ใน B เซลล์ของปลาไนได้ (*Cyprinus carpio*) (Weyts *et al*., 1998) ซึ่งผลการเพิ่มขึ้นของระดับ cortisol และ glucose สอดคล้องกับผลอัตราการรอดของปลานิลในครั้งนี้ โดยจะเห็นได้ว่ากลุ่มปลาที่ได้รับการเสริมยีสต์ที่ 0.5 เปอร์เซ็นต์ มีอัตราการรอดที่สูงกว่ากลุ่มควบคุมในระดับความหนาแน่นการเลี้ยงที่สูง แต่อย่างไรก็ตามมีรายงานว่าการเสริมโพรไบโอติกบางชนิดเช่น การเสริมด้วยเชื้อ *Bacillus subtilis* ที่เลี้ยงปลานิลในระดับความหนาแน่นสูงไม่มีผลตอบสนองต่อระดับของ cortisol และ glucose เมื่อเทียบกับระดับการเลี้ยงที่ความหนาแน่นต่ำ (Telli *et al*., 2014) ซึ่งผลดังกล่าวอาจเป็นไปได้ว่าปลานิลเกิดการปรับตัวกับสิ่งแวดล้อมนั้นๆเพื่อรักษาความสมดุลให้กับร่างกาย (Martinéz-Porchas *et al*., 2009)

ผลการวิเคราะห์ระดับของ AST (ภาพที่ 2ค) และ ระดับของค่า ALT (ภาพที่ 2ง) ของปลานิลในครั้งนี้พบว่าปลานิลที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริมยีสต์ที่ 0.5 เปอร์เซ็นต์ มีระดับค่า AST และ ค่า ALT เท่ากับ 65.67±2.52 และ 28.33±3.11 unit/L ตามลำดับซึ่งมีค่าต่ำกว่าปลาที่เลี้ยงด้วยอาหารกลุ่มควบคุมเท่ากับ 90.00±3.61 และ 37.32±2.07 unit/L ตามลำดับ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ที่ระดับความหนาแน่น 24 ตัวต่อตู้ นอกจากนี้ยังพบว่าระดับค่า AST และค่า ALT ของทั้ง 2 กลุ่มมีระดับที่สูงขึ้นตามระดับความหนาแน่นที่เพิ่มมากขึ้น ($P<0.05$) ผลการวิจัยครั้งนี้สอดคล้องกับผลของระดับฮอร์โมน cortisol ค่า glucose และอัตราการรอด ดังได้กล่าวมาแล้วข้างต้น โดยที่ค่า AST และค่า ALT เป็นเอนไซม์ที่ช่วยบ่งชี้โรคเกี่ยวกับการทำงานของตับ (Benedeczky *et al*., 1984) ระดับของเอนไซม์ทั้ง 2 ตัวนี้จะเพิ่มสูงขึ้นเมื่อตับเกิดการอักเสบหรือเกิดเนื้อตาย (tissue necrosis) ซึ่งเป็นผลมาจากการที่สัตว์อยู่ในสภาวะความเครียดหรือกำลังป่วยและระดับของเอนไซม์จะลดลงเมื่อสัตว์มีสุขภาพดี (Park *et al*., 2012) ระดับความหนาแน่นที่สูงคือหนึ่งปัจจัยที่ทำให้เกิดความเครียด โดยการทดลองบรรจุปลา rohu (*Labeo rohita*) ที่ระดับความหนาแน่นต่ำ กลาง และสูง (67 134 และ 201 g/L) โดยพบว่าระดับค่า AST และค่า ALT ของปลาที่บรรจุระดับความหนาแน่นสูงมีค่าเท่ากับ 32±2.0 และ 35±0.5 IU/L ตามลำดับ ซึ่งสูงกว่ากลุ่มที่บรรจุระดับความหนาแน่นต่ำ (Pakhira *et al*., 2015) แต่อย่างไรก็ตามงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับผลของการเสริมโพรไบโอติกต่อระดับค่า AST และ ALT ในสภาวะที่เลี้ยงอย่างหนาแน่นนั้นมีอยู่จำกัด ซึ่งงานวิจัยครั้งนี้ได้ชี้ให้เห็นถึงความสามารถของการเสริม โพรไบโอติกต่อการลดลงของระดับ AST และ ALT ในปลานิล สอดคล้องกับรายงานของ Sayed *et al*. (2011) ที่เลี้ยงปลานิลด้วยอาหารเสริมโพรไบโอติก (*Lactobacillus acidophilus Bifidobacterium bifidum* และ *S. cerevisiae*) ที่ระดับความหนาแน่นเท่ากับ 15 ตัวต่อน้ำ 120 ลิตร เป็นระยะเวลา 70 วัน พบว่ามีระดับของค่า AST และค่า ALT ที่ต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทาง

สถิติ ($P<0.05$) นอกจากนี้ยังสอดคล้องกับปลาชนิดอื่นๆ ยกตัวอย่างเช่น ปลา rock bream (*Oplegnathus fasciatus*) (Kim *et al*., 2017) และปลา rohu (*Labeo rohita*) (Nandi *et al*., 2017) เป็นต้น ขณะที่งานวิจัยที่ผ่านมาในประเทศไทยยังไม่พบว่ามีรายงานเรื่องผลการเสริมยีสต์ในปลานิลที่เลี้ยงในระดับความหนาแน่นต่างกันต่อค่าชีวเคมีของเลือด โดยส่วนใหญ่จะมีรายงานเรื่องความเหมาะสมต่อการเลี้ยงปลานิลเช่น ปลานิลที่ได้รับวัคซีน จากเชื้อ *Streptococcus agalactiae* ที่เลี้ยงในความหนาแน่นแตกต่างกันคือ 30 50 70 และ 100 ตัว/ตร.ม. ซึ่งพบว่าที่ระดับความหนาแน่น 30 และ 50 ตัว/ตร.ม. เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตมากกว่ากลุ่มอื่นๆ ($P<0.05$) (Imjai *et al*., 2016) นอกจากนี้ Kardsakun *et al*. (2014) รายงานว่าการเลี้ยงปลานิลที่ระดับความหนาแน่น 50 100 และ 150 ตัว/ตร.ม. ร่วมกับการปลูกพืชแบบระบบอควาโปนิกส์ (aquaponics) พบว่าปลานิลที่มีการเลี้ยงระดับความหนาแน่น 50 ตัว/ตร.ม. มีค่าน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นสูงกว่ากลุ่มทดลองอื่นๆ ($P<0.05$) ขณะที่การศึกษาในปลาชนิดอื่น เช่นในปลาโมง (*Pangasius bocourti*) ที่มีการศึกษาการใช้อาหารเสริมจุลินทรีย์ effective microorganisms (EM) ที่ระดับ 0 100 200 300 400 และ 500 มิลลิลิตรต่ออาหาร 1 กิโลกรัม ที่เลี้ยงในระดับความหนาแน่นแตกต่างกันคือ 10 20 30 และ 40 ตัวต่อลิตร เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าการเลี้ยงที่ความหนาแน่น 30 ตัวต่อลิตร มีค่าอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อดีที่สุด ($P<0.05$) แต่อย่างไรก็ตามพบว่าค่าซีรัม (serum) ของปลาทุกชุดการทดลองไม่มีผลต่อการยับยั้งเชื้อ *Aeromonas hydrophila* (Uawonggul *et al*., 2016)



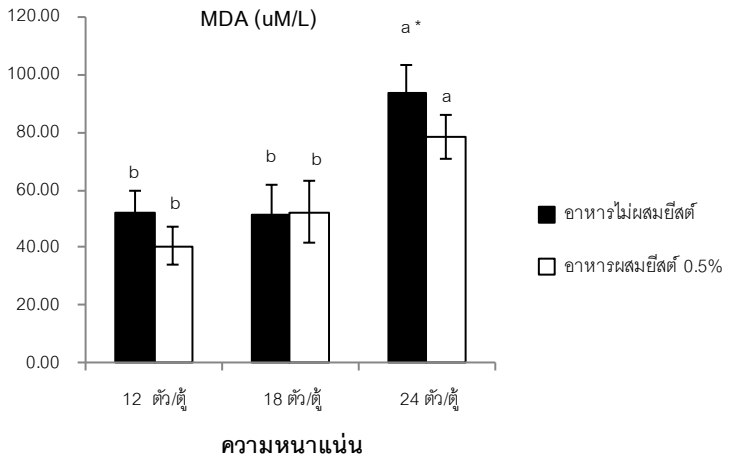
ภาพที่ 1 การเจริญเติบโตของปลานิลที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริมยีสต์ตลอดระยะเวลา 90 วัน (สีดำคือกลุ่มควบคุม (ไม่ผสมยีสต์) และสีขาวคือกลุ่มผสมยีสต์ 0. 5%) ในระดับความหนาแน่น 3 ระดับคือ 12 18 และ 24 ตัว/ตู้ ก. คือค่าน้ำหนักที่เพิ่มขึ้น ข. คือค่าความยาวที่เพิ่ม ค. คือค่าอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ ง. คือค่าน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นเฉลี่ยต่อวัน จ. คืออัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ และ ฉ. คืออัตราการรอด ค่าเฉลี่ย ± SD ตามด้วยตัวอักษร (a, b, c) แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบระหว่างความหนาแน่นในกลุ่มอาหารเดียวกันขณะที่สัญลักษณ์ (*) แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มอาหาร



ภาพที่ 2 ค่าชีวเคมีของเลือดปลานิลที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริมยีสต์ตลอดระยะเวลา 90 วัน (สีดำคือกลุ่มควบคุม (ไม่ผสมยีสต์) และสีขาวคือกลุ่มผสมยีสต์ 0. 5%) ในระดับความหนาแน่น 3 ระดับคือ 12 18 และ24 ตัว/ตู้ ก. ค่าระดับฮอร์โมน cortisol ข. ค่าน้ำตาลในเลือด (glucose) ค. ค่าเอนไซม์ aspartate aminotransferase (AST) ง. ค่าเอนไซม์ alanine aminotransferase (ALT) ค่าเฉลี่ย ± SD ตามด้วยตัวอักษร (a, b, c) แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบระหว่างความหนาแน่นในกลุ่มอาหารเดียวกัน ขณะที่สัญลักษณ์ (*) แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มอาหาร

นอกจากนี้ภาวะถูกออกซิไดซ์เกินสมดุล (oxidative stress) ของเซลล์ เกิดจากผลผลิตของสารอนุมูลอิสระและสารที่เกี่ยวข้องกับอนุมูลอิสระมีเพิ่มมากขึ้น หรือการทำงานของเอนไซม์ในการป้องกันการเกิดออกซิเดชั่นลดลง (Wirasorn *et al*., 2014) จนส่งผลทำให้เกิดปฏิกิริยา lipid peroxidation ได้ผลผลิตเป็น MDA ส่งผลทำให้เซลล์ถูกทำลาย (Reyes-Cerpa *et al*., 2018) โดยในงานทดลองครั้งนี้พบว่าปลานิลที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริมยีสต์ 0.5 เปอร์เซ็นต์ มีระดับค่า MDA ต่ำกว่าปลาที่เลี้ยง

ด้วยอาหารกลุ่มควบคุมในระดับความหนาแน่น 24 ตัวต่อตู้ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) มีค่าเท่ากับ 78.45±7.46 และ 94.07±9.53 uM/L ตามลำดับ (ภาพที่ 3) นอกจากนี้ยังพบว่าระดับ MDA ของปลาทั้ง 2 กลุ่มที่เลี้ยงในความหนาแน่นเท่ากับ 24 ตัว/ตู้ มีค่าสูงกว่ากลุ่มที่เลี้ยงในระดับความหนาแน่น 18 และ 12 ตัว/ตู้ ($P<0.05$) อย่างไรก็ตามรายงานเรื่องการเสริมยีสต์ต่อการลดลงของระดับ MDA ในปลานิลที่เลี้ยงด้วยระดับความหนาแน่นแตกต่างกันนั้นมีอยู่จำกัดเมื่อเร็วๆนี้ Reyes-Cerpa *et al*. (2018) รายงานว่าการเสริมยีสต์ (*Xanthophyllomyces dendrorhous*) ที่ 0.5 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัมสามารถช่วยลดระดับ MDA ได้ ในปลา Atlantic salmon (*Salmo salar*) ลดลงได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ที่อยู่ในสภาวะที่มีความหนาแน่นสูง (20 กิโลกรัม/ลูกบาศก์เมตร) ซึ่งผลการลดลงดังกล่าวเกิดจากการที่ผนังเซลล์ของยีสต์มีสารพวก β-glucan (Vallejos-Vidal *et al*., 2016) ซึ่งสาร β-glucan นี้ มีผลในการลดระดับของ MDA ลง และสามารถยับยังการทำลายภายในเซลล์แบบออกซิไดซ์ (oxidative damage) ได้ (Sener *et al*., 2017) โดยผลดังกล่าวสอดคล้องกับปลาที่ได้รับการเสริมด้วยโพรไบโอติกชนิดอื่นๆ เช่น การเสริม *Lactobacillus plantarum* CCFM8610 ในอาหารให้กับปลานิลที่เลี้ยงในสภาวะของน้ำที่มีการปนเปื้อนสารพิษแคดเมียม (Cd) พบว่ากลุ่มที่ได้รับโพรไบโอติกมีระดับ MDA ต่ำกว่ากลุ่มที่ได้รับอาหารควบคุม (Zhai *et al*., 2017) เช่นเดียวกันกับในปลา rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) พบว่ามีระดับ MDA ที่ลดลงเมื่อได้รับอาหารเสริมโพรไบโอติก (Giannenas *et al*., 2015) เป็นต้น นอกจากนี้ระดับน้ำตาลในเลือดที่สูงขึ้นเป็นปัจจัยหนึ่งที่ทำให้เกิดภาวะ oxidative stress ซึ่งทำให้เกิดการสร้างอนุมูลอิสระ (superoxide anion) มากขึ้นจนเกิดกระบวนการ lipid peroxidation และเพิ่มระดับของ MDA (Ble-Castillo *et al*., 2005) โดยข้อมูลดังกล่าวสอดคล้องกับรายงานของทางผู้วิจัยที่พบว่าปลานิลที่ได้รับอาหารเสริมยีสต์มีระดับ MDA และระดับ glucose ต่ำกว่าปลาได้รับอาหารกลุ่มควบคุม ดังนั้นงานวิจัยในครั้งนี้จึงชี้ให้เห็นว่าการเสริมยีสต์ในอาหารปลาสามารถช่วยลดหรือควบคุมระดับ MDA ในเลือดของปลานิลได้โดยเฉพาะในกลุ่มทีมีการเลี้ยงในระดับความหนาแน่นสูง (24 ตัว/ตู้)



ภาพที่ 3 ค่า malondialdehyde (MDA) ของปลานิลที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริมยีสต์ตลอดระยะเวลา 90 วัน (สีดำคือกลุ่มควบคุม (ไม่ผสมยีสต์) และสีขาวคือกลุ่มผสมยีสต์ 0. 5%) ในระดับความหนาแน่น 3 ระดับคือ 12 18 และ24 ตัว/ตู้ ค่าเฉลี่ย ± SD ตามด้วยตัวอักษร (a, b, c) แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบระหว่างความหนาแน่นในกลุ่มอาหารเดียวกัน ขณะที่สัญลักษณ์ (*) แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มอาหาร

สรุปผลการวิจัย

ผลการเสริมอาหารโดยยีสต์ที่ 0.5 เปอร์เซ็นต์ ต่อการเจริญเติบโตและค่าชีวเคมีของเลือดบางประการในปลานิลที่เลี้ยงในระดับความหนาแน่นที่แตกต่างกัน 3 ระดับคือ 12 18 และ 24 ตัว/ตู้ หรือคิดเป็น 218 327 และ 436 ตัว/ลบ.ม. เป็นระยะเวลา 90 วัน พบว่ากลุ่มที่เลี้ยงในระดับความหนาแน่น 24 ตัว/ตู้ และเสริมอาหารด้วยยีสต์ที่ 0.5 เปอร์เซ็นต์ สามารถช่วยเพิ่มอัตราการรอด และเสริมสร้างค่าชีวเคมีของเลือดในปลานิล เช่น ระดับฮอร์โมน cortisol ระดับ glucose ระดับเอนไซม์ AST ระดับเอนไซม์ ALT และระดับค่า MDA ได้ดีขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับอาหารควบคุม (ไม่เสริมยีสต์) แต่อย่างไรก็ตามความหนาแน่นที่เหมาะสมในการเลี้ยงปลานิลคือไม่ควรเกิน 24 ตัวต่อตู้ ซึ่งการศึกษาครั้งนี้เป็นการศึกษาในระดับห้องปฏิบัติการหากจะนำไปใช้จริงในระดับอุตสาหกรรมควรที่จะต้องมีการศึกษาอีกครั้งในสถานที่มีการเลี้ยงจริงเช่น ในกระชังหรือบ่อดินเป็นต้น เพื่อให้ได้ข้อมูลที่ถูกต้องและแม่นยำมากยิ่งขึ้น

กิตติกรรมประกาศ

ขอบคุณสาขาวิชาประมง ภาควิชาเทคโนโลยีการเกษตร คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหาสารคาม ที่ให้การสนับสนุนอุปกรณ์และสถานที่ใช้ทำการทดลอง ขอขอบคุณศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืดจังหวัดขอนแก่น ที่สนับสนุนลูกพันธุ์ปลานิล และขอขอบคุณ คุณเดือนเพ็ญ ดวงจันทรา และคุณนัฏธิดา เพิ่มพูน ที่ช่วยให้การดำเนินงานวิจัยในครั้งนี้สำเร็จไปได้ด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

Abdel-Tawwab, M., Abdel-Rahman, A.M., & Ismael, N.E.M. (2008). Evaluation of commercial live bakers' yeast, *Saccharomyces cerevisiae* as a growth and immunity promoter for Fry Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*(L.) challenged in situ with *Aeromonas hydrophila*. *Aquaculture*, *280*, 185–189.

Abdel-Tawwab, M., Mousa, M.A.A., & Mohammed, M.A. (2010). Use of live baker's yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, in practical diet to enhance the growth performance of Galilee tilapia, *Sarotherodon galilaeus* (L.), and its resistance to environmental copper toxicity. *Journal of the World Aquaculture Society*, *41*, 214–223.

Barcellos, L.J.G., Nicolaiewsky, S., de Souza S.M.G., & Lulhier, F. (1999). The effects of stocking density and social interaction on acute stress response in Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (L.) fingerlings. *Aquaculture Research*, *30*, 887–892.

Barreto, R.E., & Volpato, G.L. (2006). Stress responses of the fish Nile tilapia subjected to electroshock and social stressors. *Brazilian journal of medical and biological research*, *39*(12), 1605-1612.

Barton, B.A. & Iwama, G.K. (1991). Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effect of corticosteroids. *Annual Reviews of Fish Diseases*, *10*, 3-26.

Benedeczky, I., Biro, P., & Schaff, Z. (1984). The effect of 2,4-D-containing herbicide (Dikonirt) on the ultrastructure of carp (*Cyprinus carpio*) liver cells. *Acta Biologica Hungarica*, *30*, 107-125.

Ble-Castillo, J.L., Carmona-Díaz, E., Méndez, J.D., Larios-Medina, F.J., Medina-Santillán, R., Cleva-Villanueva, G., & Díaz-Zagoya, J.C. (2005). Effect of a-tocopherol on the metabolic control and oxidative stress in female type 2 diabetes. *Biomedicine & pharmacotherapy*, *59*, 290-295.

Chansue, N., Endo, M., Kono, T., & Sakai, M. (2000). The stimulation of cytokine-like protein in tilapia (*Oreochromis niloticus*) orally treated with β-1,3 glucan. *Asian Fisheries Science*, *13*, 271–278.

Chiu, C.H., Cheng, C.H., Gua, W.R., Guu, Y.K., & Cheng, W. (2010). Dietary administration of the probiotic, *Saccharomyces cerevisiae* P13, enhanced the growth, innate immune responses, and disease resistance of the grouper, *Epinephelus coioides*. *Fish & Shellfish Immunology*, *29*(6), 1053–1059.

Department of Fisheries. (2017). *Fisheries Statistics of Thailand 2015*. Retrieved February 19, 2018, from http://www.fisheries.go.th/strategy-stat/themeWeb/books/2558/1/yearbook2558_Rev060960.pdf

Dimitroglou, A., Merrifield, D.L., Moate, R., Davies, S.J., Spring, P., Sweetman, J., & Bradley, G. (2009). Dietary mannan oligosaccharide supplementation modulates intestinal microbial ecology and improves gut morphology of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Journal of Animal Science*, *87*, 3226–3234.

EL-Boshy, M.E., EL-Asheram, A.M.M., & EL-Ghany, N.A.A. (2008). Effect of dietary beta-1, 3 glucan on immunomodulation on diseased *Oreochromis niloticus* experimentally infected with aflatoxin B1. In *Proceeding* 8th International Symposium on Tilapia in Aquaculture. (pp. 1109-1127). Egypt: Cairo.

EL-Khaldi, A.T.F. (2010). Effect of different stress factors on some physiological parameters of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Saudi Journal of Biological Sciences*, *17*, 241-246.

Fairchild, E.A. & Howell, W.H. (2001). Optimal stocking density for juvenile winter flounder *Pseudopleuronectes americanus*. *Journal of the World Aquaculture Society*, *32*(3), 300-308.

Fernandez, F., Hinton, M. & Van Gils, B. (2002). Dietary mannan-oligosaccharides and their effect on chicken caecal microflora in relation to *Salmonella enteritidis* colonization. *Avian Pathology*, *31*(1), 49–58.

Giannenas, I., Karamaligas, I., Margaroni, M., Pappas, I., Mayer, E., Encarnação, P., & Karagouni, E. (2015). Effect of dietary incorporation of a multi-strain probiotic on growth performance and health status in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish Physiology and Biochemistry*, *41*,119-128.

Hardie, L.J., Chappell, L.H., & Secombes, C.J. (1994). Human tumor necrosis factor **α** influences rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* leukocyte responses. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, *40*(1), 73–84.

Hassaan, M.S., Soltan, M.A. & Ghonemy, M.M.R. (2014). Effect of synbiotics between *Bacillus licheniformis* and yeast extract on growth, hematological and biochemical indices of the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Egyptian Journal of Aquatic Research*, *40*, 199-208.

Imjai, P. Chaiyara, A. & Thowanna, C. (2016). Efficiency of *Streptococcus agalactiae* vaccine in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) with different stocking density. *Prawarun Agricultural Journal*, *13*(1), 79-87.

Irianto, A. & Austin, B. (2002). Probiotics in aquaculture. *Journal of Fish Diseases*, *25*(11), 633-642.

Iwashita, M.K., Nakandakare, I.B., Terhune, J.S., Wood, T., & Ranzani-Paiva, M.J. (2015). Dietary supplementation with *Bacillus subtilis*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Aspergillus oryzae* enhance immunity and disease resistance against *Aeromonas hydrophila* and *Streptococcus iniae* infection in juvenile tilapia *Oreochromis niloticus*. *Fish & Shellfish Immunology*, *43*(1), 60-66.

Kannika, K., Panprommin, D., Whangchai, N., & Chitmanat, C. (2012). Effects of brewer's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) supplementary diet on growth performance and immune response in Nile tilapia. In *Proceedings of 49th Kasetsart University Annual Conference: Fisheries* (pp. 408-415.) Bangkok. (in Thai)

Kardsakun, P., Chaibu, P., Chitmanat, C. & Mangumphan, K. (2014). Appropriate density of recirculating system Nile tilapia culture in aquaponic. *Journal of Fisheries Technology Research*, *8*(1), 23-32.

Kim, D.H., Subramanian, D., & Heo, M.S. (2017). Dietary effect of probiotic bacteria, *Bacillus amyloliquefaciens*-JFP2 on growth and innate immune response in rock bream *Oplegnathus fasciatus*, challenged with *Streptococcus iniae*. *Israeli Journal of Aquaculture–Bamidgeh*, *1354*, 1-11.

Kim, S.S., Galaz, G.B., Pham, M.A., Jang, J.W., Oh, S.H., Yeo, I.K., & Lee, K.J. (2009). Effects of dietary supplementation of a meju, fermented soybean meal, and *Aspergillus oryzae* for juvenile parrot fish (*Oplegnathus fasciatus*). *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, *22*(6), 849-856.

Kühlwein, H., Merrifield, D.L., Rawling, M.D., Foey, A.D., & Davies, S.J. (2014). Effects of dietary β-(1,3)(1,6)-D-glucan supplementation on growth performance, intestinal morphology and haemato-immunological profile of mirror carp (*Cyprinus carpio* L.). *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, *98*(2), 279–289.

Lara-Flores, M., Olvera-Novoa, M.A., Guzmán-Méndez, B.E., & López-Madrid, W. (2003). Use of the bacteria *Streptococcus faecium* and *Lactobacillus acidophilus*, and the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as growth promoters in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture*, *216*, 193-201.

Li, P. & Gatlin III, D.M. (2003). Evaluation of brewer's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) as a feed supplement for hybrid striped bass (*Moronechrysops* x *M. saxatilis*). *Aquaculture*, *219*, 681-692.

Li, P., & Gatlin III, D.M. (2006). Nucleotide nutrition in fish: current knowledge and future applications. *Aquaculture*, *251*, 141–152.

Li, P., Lewis, D.H., & Gatlin III, D.M. (2004). Dietary oligonucleotides from yeast RNA influence immune response and resistance of hybrid striped bass (*Morone chrysops* × *Morone saxatilis*) to *Strepococcus iniae* infection. *Fish & Shellfish Immunology*, *16*(5), 561-569.

Longmutcha, N. Phichai, K. Hanmoungjai, W. &Rojtinnakorn, J. (2015). Use of yeast supplemental diet for Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Journal of Fisheries Technology Research*, *9*(2), 1-11.

Martinéz-Porchas, M., Martínez-Córdova L.R., & Ramos-Enriquez, R. (2009). Cortisol and glucose: reliable indicators of fish stress?. *Pan-American Journal of Aquatic Sciences*, *4*(2), 158-178.

Mazurkiewicz, J., Przybyl, A., & Mroczyk, W. (2005). Supplementing the feed of common carp (*Cyprinus carpio* L.) juveniles with the biosaf probiotic. *Archives Polish Fisheries*, *13*(2), 171-180.

Mohanty, S.N., Swain, S.K., & Tripathi, S.D. (1996). Rearing of catla (*Catla catla* Ham) spawn on formulated diets. *Journal of Aquaculture in the Tropics*, *11*, 253-258.

Morgan, J.D., & Iwama, G.K. (1997). Measurement of stress states in the field. In G.K. Iwama, A.D. Pickering, J.P. Summer, & Schreck, C.B. (Eds.), *Fish stress and health in aquaculture*. (pp. 247-270). Cambridge: Cambridge University Press.

Nandi, A., Banerjee, G., Dan, S.K., Ghosh, K., & Ray, A.K. (2017). Evaluation of in vivo probiotic efficiency of *Bacillus amyloliquefaciens* in *Labeo rohita* challenged by pathogenic strain of *Aeromonas hydrophila* MTCC 1739. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*. Retrieved February 17, 2018, from https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28744833

Newaj-Fyzul, A., Al-Harbi A.H., & Austin, B. (2014). Review: developments in the use of probiotic for disease control in aquaculture. *Aquaculture*, *431*, 1-11.

Ortuño, J., Cuesta., A., Rodríguez, A., Esteban, M.A., & Meseguer, J. (2002). Oral administration of yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, enhances the cellular innate immune response of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Veterinary Immunology and Immunopathology*, *85*, 41-50.

Pakhira, C., Nagesh, T.S., Abraham, T.J., Dash, G., & Behera, S. (2015). Stress responses in rohu, *Labeo rohita* transported at different densities. *Aquaculture Reports*, *2*, 39-45.

Panase, P. & Mengumphan, K. (2015). Growth performance, length-weight relationship and condition factor of backcross and reciprocal hybrid catfish reared in net cages. *International Journal of Zoological Research*, *11*, 57-64.

Park, I.S., Hur, J.W., & Choi, J.W. (2012). Hematological responses, survival, and respiratory exchange in the olive flounder, *Paralichthys olivaceus*, during starvation. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, *25*, 1276–1284.

Perdikaris, C., Nathanailides, C., Gouva, E., Gabriel, U.U., Bitchava, K., Athanasopoulou, F., Paschou, A., & Paschos, I. (2010). Size-relative effectiveness of clove oil as an anaesthetic for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792) and goldfish (*Carassius auratus* Linnaeus, 1758). *ActaVeterinaria Brno*, *79*, 481-490.

Peterson, B.C., Booth, N.J. & Manning, B.B. (2012). Replacement of fish meal in juvenile channel catfish, *Ictalurus punctatus*, diets using a yeast-derived protein source: the effects on weight gain, food conversion ratio, body composition and survival of catfish challenged with *Edwardsiella ictaluri*. *Aquaculture Nutrition*, *18*, 132-137.

Petjul, K. & Khrueasri, T. (2016). Dietary probiotic and effective microorganisms (EM) supplementation on growth performance and survival rate of climbing perch, *Anabas testudineus* in cage culture. KhonKaen Agriculture Journal, *44* (1), 29-34.

Pongpet, J. (2014). The replacement of fishmeal by brewer's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) in diets of Thai Panga. Animal Production Technology, Suranaree University of Technology, 93 p. Retrieved May 10, 2018, from http://sutir.sut.ac.th:8080/sutir/bitstream/123456789/5205/2/Fulltext.pdf

Prado-Rebolle, O.F., García-Márquez, L.J., Macedo-Barragánet, R.J., García-Curiel, J.L., Sánchez-Barajas, M. & Téllez-Isaías, G. (2014). Effects of probiotic and stocking density on Nile tilapia fingerlings (*Oreochromis niloticus*) productive performance. *Revista Científica FCV- LUZ*, *24*, 180-184.

Ran, C., Huang, L., Hu, J., Tacon, P., He. S., Li, Z., Wang, Y., Liu, Z., Xu, L., Yang, Y., & Zhou, Z. (2016). Effect of dietary live and heat-inactive baker's yeast on growth, gut health, and disease resistance of Nile tilapia under high rearing density. *Fish & Shellfish Immunology*, *56*, 263-271.

Ran, C., Huang, L., Liu, Z., Xu, L., Yang, Y., Tacon, P., Auclair, E., & Zhou, Z. (2015). A comparison of the beneficial effects of live and heat-inactivated baker's yeast on Nile tilapia: suggestions on the role and function of the secretory metabolites released from the yeast. *PLoS ONE*, *10*(12), e0145448.

Refstie, S., Baeverfjord, G., Seim, R.R., & ElvebØ, O. (2010). Effects of dietary yeast cell wall β-glucans and MOS on performance, gut health, and salmon lice resistance in Atlantic salmon (*Salmo salar*) fed sunflower and soybean meal. *Aquaculture*, *305*, 109–116.

Reyes-Cerpa, S., Vallejos-Vidal, E., Gonzalez-Bown, M.J., Morales-Reyes, J., Pérez-Stuardo, D., Vargas, D., Imarai, M., Cifuentes, V., Spencer, E., Sandino, A.M., & Reyes-López, F.E. (2018). Effect of yeast (*Xanthophyllomyces dendrorhous*) and plant (Saint John's wort, lemon balm, and rosemary) extract based functional diets on antioxidant and immune status of Atlantic salmon (*Salmo salar*) subjected to crowding stress. *Fish & Shellfish Immunology*, *74*, 250-259.

Ridha, M.T. (2006). Comparative study of growth performance of three strains of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, L. at two stocking densities. *Aquaculture Research*, *37*(2), 172-179.

Rodmongkoldee, M., Leelapatra, W., & Thaimuangphol, W. (2017). Effect of probiotics on growth performance and survival rate in *Anabas testudineus*. *Journal of Science & Technology*, special issue, 82-89.

Sayed, S.H., Zakaria, A., Mohamed, G.A., & Mohamed, K.K. (2011). Use of probiotics as growth promoter, anti-bacterial and their effects on the physiological parameters and immune response of *Oreochromis niloticus* Lin. fingerlings. *Journal of the Arabian aquaculture society*, *6*, 201-222.

Selim, K.M. & Reda, R.M. (2015). Beta-glucans and mannan oligosaccharides enhance growth and immunity in Nile tilapia. *North American Journal of Aquaculture*, 77, 22–30.

Sener, G., Toklu, H., Ercan, F., &Erkanli, G. (2005). Protective effect of beta-glucan against oxidative organ injury in a rat model of sepsis. *International immunopharmacology*, *5* (9),1387-1396.

Sutthi, N., Thaimuangphol, W., Rodmongkoldee, M., Leelapatra, W., & Panase, P. (2018). Growth performances, survival rate, and biochemical parameters of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) reared in water treated with probiotic. *Comparative Clinical Pathology*, *24*, 597-603.

Swain, S.K., Rangacharyulu, P.V., Sarkar, S., & Das, K.M. (1996). Effect of a probiotic supplement on growth, nutrient utilization and carcass composition in mrigal fry. *Aquaculture*, *4*, 29-35.

Taoka, Y., Maeda, H., Jo, J.Y., Jeon, M.J., Bai, S.C., Lee, W.J., Yuge, K., & Koshio, S. (2006). Growth, stress tolerance and non-specific immune response of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* to probiotics in a closed recirculating system. *Fisheries Science*, *72*(2), 310-321.

Telli, G.S., Ranzani-Paiva, M.J.T., Dias D.C., Sussel, F.R., Ishikawa, C.M., & Tachibana, L. (2014). Dietary administration of *Bacillus subtilis* on hematology and non-specific immunity of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* raised at different stocking densities. *Fish & Shellfish Immunology*, *39*, 305-311.

Trenzado, C.E., Morales, A.E., & de la Higuera, M. (2006). Physiological effects of crowding in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, selected for low and high stress responsiveness. *Aquaculture*, *258*, 583–593.

Uawonggul, N., Rattanamalee, C. & Daduang, S. (2016). Effects of dietary probiotic supplementation on growth enhancement and immune against Aeromonas in *Pangasius bocourti*. *KKU Science Journal*. *44*(3) 505-517.

Vallejos-Vidal, E., Reyes-Lopez, F., Teles, M., & MacKenzie, S. (2016). The response of fish to immunostimulant diets, Fish. *Fish & shellfish immunology*, *56*, 34–69.

Wang, Y.B. & Gu, Q. (2010). Effect of probiotic on white shrimp (*Penaeus vannamei*) growth performance and immune response. *Marine Biology Research*, *6*(3), 327-332.

Wendelaar-Bonga, S.E. (1997). The stress response in fish. *Physiological Reviews*, *77*(3), 591-625.

Weyts, F.A., Flik, G., Rombout, J.H., & Verburg-van, K.B.M. (1998). Cortisol induces apoptosis in activated B cell, not in other lymphoid cell of the common carp, *Cyprinus carpio* L. *Developmental and comparative immunology*, *22*, 551-562.

Wirasorn, K., Klarod, K., Hongsprabhas, P., & Boonsiri, P. (2014). Oxidative Stress, Antioxidant and Cancer. *Srinagarind Medical Journal*, *29*(2), 207-219. (in Thai)

Zhai, Q., Yu, L., Li, T., Zhu, J., Zhang, C., Zhao, J., Zhang, H., & Chen, W. (2017). Effect of dietary probiotic supplementation on intestinal microbiota and physiological conditions of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) under waterborne cadmium exposure. *Antonie Van Leeuwenhoek*, *110*, 501-513.