

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเลี้ยงปลากัด

(*Betta splendens* Regan, 1910) เชิงพาณิชย์

Optimal conditions for commercial production of
Siamese fighting fish (*Betta splendens* Regan, 1910)

ผู้วิจัย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. การุณ ทองประจุกแก้ว (หัวหน้าโครงการ)

รองศาสตราจารย์ ดร. วุฒิพร พรหมขุนทอง (ผู้ร่วมวิจัย)

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากเงินรายได้ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
ประจำปีงบประมาณ 2559 รหัสโครงการ SCI590420S

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณสำนักวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ที่สนับสนุนทุนอุดหนุนการวิจัย (เลขที่สัญญา SCI590420S) และหน่วย Publication Clinic ที่ให้ความช่วยเหลือในการเตรียมต้นฉบับสำหรับตีพิมพ์ ขอขอบคุณภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ และภาควิชาวิทยาศาสตร์ประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ ที่ให้ความอนุเคราะห์สถานที่ เครื่องมืออุปกรณ์ และสารเคมีที่ใช้สำหรับการวิจัย และขอขอบคุณศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่อนุเคราะห์การใช้เครื่องดีฟเฟอเรนเชียลสแกนิงแคลอริมิเตอร์

ผู้วิจัยขอขอบคุณนักศึกษาปริญญาโทที่ทำวิทยานิพนธ์ภายใต้โครงการวิจัยนี้ คือ นายศุภร์เทียนชัย แซ่ไคว้ (รหัสนักศึกษา 5810620024) ที่มีส่วนสำคัญและช่วยเหลือจนทำให้โครงการวิจัยสำเร็จลุล่วงภายในระยะเวลาที่กำหนด

การุณ ทองประจุแก้ว

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. การุณ ทองประจุแก้ว)

สารบัญ

	หน้า
ชื่อโครงการวิจัย	1
คณะนักวิจัย	1
บทคัดย่อภาษาไทยและภาษาอังกฤษ	1
บทสรุปผู้บริหาร	2
ภาคผนวก	6
ก ข้อคิดเห็นและข้อเสนอแนะสำหรับการวิจัยต่อไป	7
ข บทความวิจัยที่นำเสนอในที่ประชุมวิชาการระดับชาติ	9
ค บทความวิจัยที่ตีพิมพ์ในวารสารระดับนานาชาติ	18
ง ต้นฉบับบทความวิจัยสำหรับตีพิมพ์ในวารสารระดับนานาชาติ	30

ส่วนเนื้อหา

1. ชื่อโครงการวิจัย

สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเลี้ยงปลากัด (*Betta splendens* Regan, 1910) เชิงพาณิชย์
Optimal conditions for commercial production of Siamese fighting fish
(*Betta splendens* Regan, 1910)

2. คณะนักวิจัย

2.1 ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. การุณ ทองประจุกแก้ว (หัวหน้าโครงการ)

ภาควิชาวิทยาศาสตร์ประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์

2.2 รองศาสตราจารย์ ดร. วุฒิพร พรหมขุนทอง (ผู้ร่วมวิจัย)

ภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ

3. บทคัดย่อภาษาไทยและภาษาอังกฤษ

การศึกษาค้นคว้าครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบปริมาณน้ำและสภาวะที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงปลากัด (*Betta splendens* Regan, 1910) โดยประเมินจากอัตราการเจริญเติบโต การใช้ประโยชน์จากอาหาร กิจกรรมของเอนไซม์ย่อยอาหาร สีผิว คุณภาพของกล้ามเนื้อ และองค์ประกอบทางเคมีของซาก การศึกษาปริมาณน้ำที่เหมาะสมโดยนำปลากัดตัวผู้สีแดงทั้งตัว (น้ำหนักตัวเริ่มต้น 0.97 ± 0.01 กรัม) มาเลี้ยงแบบเดี่ยวในตู้แก้วที่มีปริมาตรแตกต่างกัน 5 ระดับ (100, 150, 200, 250 และ 300 มิลลิลิตร) จำนวน 15 ตัว/ทริทเมนต์ ($n = 15$) เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าปลาที่เลี้ยงในปริมาณน้ำ 150 มิลลิลิตร มีการเจริญเติบโต การใช้ประโยชน์จากอาหาร และสีผิวดีที่สุด ($P < 0.05$) กิจกรรมของเอนไซม์ย่อยอาหารมีการเปลี่ยนแปลงเนื่องจากปริมาณน้ำที่ใช้เลี้ยง ยกเว้นกิจกรรมของอะไมเลส นอกจากนี้ ปริมาณน้ำ 150 มิลลิลิตร ยังช่วยรักษาคุณภาพกล้ามเนื้อที่ดี แต่ไม่มีผลต่อองค์ประกอบทางเคมีของซาก ยกเว้นปริมาณไขมันที่มีค่าผกผันกับปริมาณน้ำ ปริมาณน้ำดังกล่าวจึงใช้ทดสอบผลของสภาวะที่เหมาะสม โดยนำปลากัดตัวผู้สีแดงทั้งตัว (น้ำหนักตัวเริ่มต้น 1.13 ± 0.01 กรัม) มาเลี้ยงแบบเดี่ยวในตู้แก้วที่มีสภาวะแตกต่างกัน 5 สี (สีใส สีขาว สีแดง สีน้ำเงิน และสีดำ) จำนวน 15 ตัว/ทริทเมนต์ ($n = 15$) เป็นเวลา 8 สัปดาห์ ผลการศึกษาพบว่าปลาที่เลี้ยงในสภาวะสีน้ำเงินมีการเจริญเติบโตและการใช้ประโยชน์จากอาหารดีที่สุด และมีอัตราส่วนของอะไมเลส/ทริปซินสูงที่สุด ขณะที่กิจกรรมของเอนไซม์ย่อยอาหาร สีผิว คุณภาพของกล้ามเนื้อ และองค์ประกอบทางเคมีของซากไม่มีความแตกต่างกับปลาในชุดควบคุม (สีใส) ผลการศึกษาทั้งหมดแสดงให้เห็นว่าสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเลี้ยงปลากัด คือ ปริมาณน้ำ 150 มิลลิลิตร และสภาวะเลี้ยงที่มีสีน้ำเงิน

This study aimed to determine the effects of water volume and aquarium background color on growth, feed utilization, digestive enzyme activities, color coordinates, muscle quality and carcass composition of Siamese fighting fish (*Betta splendens* Regan, 1910). The solid-red male Siamese fighting fish (0.97 ± 0.01 g initial body weight) were distributed individually into aquaria with five alternative water volumes (100, 150, 200, 250 and 300 mL), comprising fifteen fish/treatment ($n = 15$), over eight weeks duration. The fish reared in 150 mL water were superior in growth performance, feed utilization and skin color ($P < 0.05$). Specific activities of the digestive enzymes were variance due to water volume, except for amylase. In addition, 150 mL water preferred treatment maintained muscle quality, but no affected proximate composition of the carcasses, except for the crude lipids that fluctuated with water volume. This preferred water volume was subjected to study the optimal aquarium background color. The solid-red male fish (1.13 ± 0.01 g initial body weight) were distributed individually into aquaria with five alternative background colors (transparent, white, red, blue, and black), comprising fifteen fish/treatment ($n = 15$), over eight weeks duration. The fish reared in blue background were superior in growth performance and feed utilization, and showed highest amylase/trypsin ratio. This preferred treatment maintained the activities of the digestive enzymes as same as in the suite control background, as well as skin color, muscle quality and proximate composition of carcass. The overall results from the current study indicate that the 150 mL water in blue-based aquarium background was suitable for rearing solid-red male Siamese fighting fish.

4. บทสรุปผู้บริหาร

4.1 บทนำ

ปลากัด (*Betta splendens* Regan, 1910) เป็นปลาสวยงามพื้นเมืองของไทยที่นิยมเพาะเลี้ยงกันอย่างแพร่หลาย (การุณ, 2556) และเป็น 1 ใน 3 ของปลาสวยงามที่นิยมเลี้ยงในประเทศไทย ปลาชนิดนี้มีความสำคัญต่อมูลค่าการส่งออกของประเทศไทย โดยในปี พ.ศ. 2553 มีการส่งออกปลากัดไปต่างประเทศประมาณ 15 ล้านตัว คิดเป็นมูลค่า 329 ล้านบาท ถึงแม้จะมีมูลค่าการส่งออกที่สูง แต่ผลกำไรของผู้ประกอบการเฉลี่ยสุทธิน้อยกว่าปลาทอง และปลาหางนกยูง ซึ่งเป็นปลาสวยงามที่มีความสำคัญต่อเศรษฐกิจของไทยเช่นกัน (สำนักวิจัยเศรษฐกิจการเกษตร, 2554) ผลกำไรที่น้อยเกิดจากต้นทุนการผลิตที่สูงเนื่องจากเกษตรกรยังใช้อาหารธรรมชาติในการเพาะเลี้ยง อีกทั้งระบบการเลี้ยงยังเป็นแบบดั้งเดิม ประกอบกับปลากัดเพศผู้มักมีนิสัยก้าวร้าวทำให้ต้องมีการเลี้ยงแยก ซึ่งต้องใช้แรงงานเป็นจำนวนมากในการเปลี่ยนถ่ายน้ำและให้อาหาร

การเลี้ยงสัตว์น้ำแต่ละชนิดมักต้องกำหนดระดับความหนาแน่นในการเลี้ยงให้เหมาะสม เนื่องจากอัตราส่วนของจำนวนปลาต่อปริมาตรน้ำจะมีผลต่อพฤติกรรมของปลาโดยตรง อีกทั้งยังมีผลต่อคุณภาพของน้ำที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง สำหรับในสภาพแวดล้อมตามธรรมชาติปลากัดสามารถครองพื้นที่ได้ไม่เกิน 5 ตัวต่อพื้นที่ 1 ตารางวา (Jaroensutasinee and Jaroensutassinee, 2001) การศึกษาก่อนหน้านี้ในระดับห้องปฏิบัติการพบว่ามีการใช้ปริมาตรน้ำที่แตกต่างกันในการทดลองเลี้ยงปลากัด เช่น ปริมาตรน้ำ 1 ลิตร ในภาชนะขนาด 1.5 ลิตร (Takeuchi *et al.*, 2010) หรือ 2 ลิตร (Karino and Someya, 2007) หรือ ปริมาตรน้ำ 250 มิลลิลิตร ในภาชนะขนาด 500 มิลลิลิตร (Verbeek *et al.*, 2008) เป็นต้น สำหรับปลากัดตัวผู้โตเต็มวัยเมื่อจำหน่ายจะบรรจุในถุงพลาสติกขนาดเล็กมีปริมาตรน้ำประมาณ 60 มิลลิลิตร (ปลากัดครึ่งสั้น) หรือ 120–150 มิลลิลิตร (ปลากัดครึ่งยาว) (Cole *et al.*, 1999) โดยมีอัตราส่วนของน้ำต่ออากาศเท่ากับ 1 ต่อ 3 หรือ 3 ต่อ 5 (Monvises *et al.*, 2009) ข้อมูลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าปลาชนิดนี้สามารถดำรงชีวิตอยู่ได้เป็นระยะเวลานานแม้มีปริมาตรน้ำเพียงเล็กน้อย ดังนั้น การศึกษาปริมาตรของน้ำที่เหมาะสมจึงมีความสำคัญต่อการผลิตปลากัดแบบหนาแน่นในเชิงพาณิชย์

ปลากัดเพศเมียจะจับคู่กับปลากัดเพศผู้ที่มีความเข้มของสีมากกว่า (Blakeslee *et al.*, 2009) และเลือกจับคู่กับปลาเพศผู้ที่มีฟีโนไทป์สีแดงมากกว่าฟีโนไทป์สีน้ำเงิน (Gautier *et al.*, 2008) นอกจากนี้สีมีอิทธิพลต่อการดำรงชีวิตของปลาแล้ว สีของปลาสวยงามยังเป็นปัจจัยสำคัญที่ช่วยเพิ่มความพึงพอใจของลูกค้า การศึกษาในปลาทอง (*Carassius auratus*) ที่เลี้ยงในตู้ที่มีสีแตกต่างกัน (สีดำ สีขาว สีน้ำเงิน และสีแดง) พบว่าปลามีการเจริญเติบโตที่ดีและมีปริมาณคอร์ติซอลในพลาสมาที่สูงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเลี้ยงในตู้สีแดง ส่วนการเลี้ยงในตู้สีขาวพบว่าทำให้ความเข้มของสีปลาลดลง (Eslamloo *et al.*, 2015) สำหรับในปลาคาร์ฟ (*Cyprinus carpio*) พบว่ามีการตอบสนองต่อสีที่ต่างกัน โดยมีปริมาณคอร์ติซอลในพลาสมาสูงที่สุดเมื่อเลี้ยงในภาชนะที่มีสีดำ (Papoutsoglou *et al.*, 2000) ข้อมูลดังกล่าวข้างต้นแสดงให้เห็นว่าสีของภาชนะเลี้ยงก็เป็นตัวแปรหนึ่งที่อาจมีผลต่อการเพิ่มศักยภาพในการผลิตปลากัดให้มีคุณภาพได้ ดังนั้น การศึกษาในครั้งนี้จึงมีจุดประสงค์เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสม (ได้แก่ ปริมาตรของน้ำ และสีของภาชนะเลี้ยง) เพื่อการเลี้ยงปลากัดแบบหนาแน่น ผลที่ได้จากการศึกษาจะเป็นข้อมูลพื้นฐานเพื่อประยุกต์ใช้ในการพัฒนาระบบเลี้ยงปลากัดให้มีประสิทธิภาพในเชิงพาณิชย์

4.2 วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาปริมาตรของน้ำและสีของภาชนะเลี้ยงที่เหมาะสมในการเลี้ยงปลากัดแบบหนาแน่น

4.3 สรุป

ปริมาตรน้ำน้อยที่สุดสำหรับการเลี้ยงปลากัดตัวผู้สีแดงแบบเดี่ยว คือ 150 มิลลิลิตร ซึ่งปลาที่เลี้ยงในปริมาตรน้ำดังกล่าวมีการเจริญเติบโต การใช้ประโยชน์จากอาหาร คุณภาพของกล้ามเนื้อ และสีivid ที่สุด นอกจากนี้ ปริมาตรน้ำนี้ยังไม่ส่งผลเชิงลบต่อองค์ประกอบทางเคมีของซาก ขณะที่สีภาชนะที่ทำให้ปลากัดตัวผู้สีแดงมีการเจริญเติบโต การใช้ประโยชน์จากอาหาร และคุณภาพของกล้ามเนื้อที่ดีขึ้น โดยไม่ส่งผลเชิง

ลบท่อสีผิวและองค์ประกอบทางเคมีของซาก คือ ภาชนะสีน้ำเงิน นอกจากนี้ ปลาที่เลี้ยงในภาชนะสีดังกล่าวยังมีการสำรองพลังงานเพื่อการเจริญเติบโตซึ่งสังเกตได้จากอัตราส่วนของอะไมเลส/ทริปซิน ข้อมูลในการศึกษาครั้งนี้สามารถประยุกต์ใช้ในการเลี้ยงปลากัดตัวผู้สีแดงที่มีอายุ 1.5 เดือน ถึงอายุ 4 เดือน ซึ่งเป็นอายุสำหรับขุนเพื่อจำหน่าย รวมทั้งเป็นข้อมูลเบื้องต้นเพื่อพัฒนาระบบการเลี้ยงปลากัดแบบหนาแน่น

4.4 เอกสารอ้างอิง

- การุณ ทองประจุแก้ว. 2556. ชีววิทยาของปลากัด (*Betta splendens* Regan, 1910). วารสารวิทยาศาสตร์ มข. 41, 1–15.
- สำนักวิจัยเศรษฐกิจการเกษตร. 2554. การศึกษาเศรษฐกิจการผลิตการตลาดปลาสวยงาม. สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, กรุงเทพฯ.
- Blakeslee, C., McRobert, S.P., Brown, A.C., Clotfelter, E.D., 2009. The effect of body coloration and group size on social partner preferences in female fighting fish (*Betta splendens*). Behav. Proc. 80, 157–161.
- Cole, B., Tamura, C.S., Bailey, R., Brown, C., Ako, H., 1999. Shipping practices in the ornamental fish industry. Center for Tropical and Subtropical Aquaculture, Hawaii.
- Eslamloo, K., Akhavan, S.R., Eslamifar, A., Henry, M., 2015. Effects of background colour on growth performance, skin pigmentation, physiological condition and innate immune responses of goldfish, *Carassius auratus*. Aquac. Res. 46, 202–215.
- Gautier, P., Barroca, M., Bertrand, S., Eraud, C., Gaillard, M., Hamman, M., Motreuil, S., Sorci, G., Faivre, B., 2008. The presence of females stimulates the expression of a carotenoid-based sexual signal. Behav. Ecol. Sociobiol. 62, 1159–1166.
- Jaroensutasinee, M., Jaroensutasinee, J., 2001. Bubble nest habitat characteristics of wild Siamese fighting fish. J. Fish Biol. 58, 1311–1319.
- Karino, K., Someya, C., 2007. The influence of sex, line, and fight experience on aggressiveness of the Siamese fighting fish in intrasexual competition. Behav. Proc. 75, 283–289.
- Monvises, A., Nuangsaeng, B., Sriwattanothai, N., Panijpan, B., 2009. The Siamese fighting fish: Well-known generally but little-known scientifically. ScienceAsia 35, 8–16.
- Papoutsoglou, S.E., Mylonakis, G., Miliou, H., Karakatsouli, N.P., Chadio, S., 2000. Effects of background color on growth performances and physiological

responses of scaled carp (*Cyprinus carpio* L.) reared in a closed circulated system. *Aquac. Eng.* 22, 309–318.

Takeuchi, L., Hori, M., Myint, O., Kohda, M., 2010. Lateral bias of agonistic responses to mirror images and morphological asymmetry in the Siamese fighting fish (*Betta splendens*). *Behav. Brain Res.* 208, 106–111.

Verbeek, P., Iwamoto, T., Murakami, N., 2008. Variable stress-responsiveness in wild type and domesticated fighting fish. *Physiol. Behav.* 93, 83–88.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

ข้อคิดเห็นและข้อเสนอแนะสำหรับการวิจัยต่อไป

ข้อคิดเห็นและข้อเสนอแนะสำหรับการวิจัยต่อไป

1. ปริมาณน้ำและสีภานะเป็นเพียงข้อมูลบางส่วนที่จำเป็นต่อการเลี้ยงปลากัดเท่านั้น ดังนั้น การศึกษาข้อมูลเพิ่มเติมเกี่ยวกับปัจจัยที่เกี่ยวข้องในการเพาะเลี้ยง เช่น ระยะเวลาการให้แสง ความเข้มของแสง รูปทรงของภาชนะเลี้ยง หรืออัตราการเปลี่ยนถ่ายน้ำ เป็นต้น มีความจำเป็นในการพัฒนาระบบการเลี้ยงให้เหมาะสม
2. ปลากัดมีสีที่หลากหลายซึ่งอาจมีการตอบสนองต่อปัจจัยที่ศึกษาในครั้งนี้อย่างแตกต่างกัน ดังนั้น ควรมีการศึกษาการตอบสนองของปลากัดสีอื่นเพิ่มเติม

ภาคผนวก ข
บทความวิจัยที่นำเสนอในที่ประชุมวิชาการระดับชาติ

ปริมาตรน้ำที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต การใช้ประโยชน์จากอาหาร
และคุณภาพสีของปลากัด (*Betta splendens* Regan, 1910) เพศผู้

Optimal Water Volume on Growth, Feed Utilization and Coloration of Male Siamese
Fighting Fish (*Betta splendens* Regan, 1910)

ศุภกรเทียนชัย แซ่โค้ว^{1*} การุณ ทองประจุแก้ว² และ วุฒิพิพร พรหมขุนทอง¹

Suktianchai Saekhow^{1*}, Karun Thongprajukaew² and Wuttioporn Promkunthong¹

บทคัดย่อ

ศึกษาปริมาตรน้ำที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงปลากัด (*Betta splendens* Regan, 1910) โดยนำปลากัดทางเดี่ยวครีบยาวเพศผู้สีแดงล้วนอายุ 6 สัปดาห์ (น้ำหนักเริ่มต้นเฉลี่ย 0.97 ± 0.01 กรัม) มาเลี้ยงเดี่ยวในตู้สี่เหลี่ยมผืนผ้า (ความกว้าง 3.5 เซนติเมตร \times ความยาว 8 เซนติเมตร \times ความสูง 20 เซนติเมตร) ที่มีปริมาตรน้ำแตกต่างกัน 5 ระดับ (100, 150, 200, 250 และ 300 มิลลิลิตร) จำนวน 15 ตัวต่อทรีทเมนต์ เป็นเวลา 8 สัปดาห์ และเก็บข้อมูลเมื่อสิ้นสุดการทดลอง ผลการศึกษาพบว่าปลาที่เลี้ยงด้วยปริมาตรน้ำ 150 มิลลิลิตร มีความเหมาะสมที่สุด เมื่อพิจารณาจากอัตราการรอด การเจริญเติบโต การใช้ประโยชน์จากอาหาร และสีของผิว ผลการศึกษาครั้งนี้สามารถประยุกต์ใช้ในการเลี้ยงปลากัดเพื่อจำหน่าย รวมทั้งสามารถต่อยอดเพื่อพัฒนาระบบเลี้ยงที่ใช้ใช้น้ำน้อย

ABSTRACT

The optimal water volume for rearing single-tailed long-finned Siamese fighting fish (*Betta splendens* Regan, 1910) was studied. Six-week-old solid-red male fish (0.97 ± 0.01 g mean initial body weight, $n = 75$) were individually divided into rectangular aquaria (3.5 cm width \times 8 cm length \times 20 cm height) which containing different water volumes (100, 150, 200, 250 and 300 mL). At the end of eight weeks experiment, the suitable treatment in terms of survival, growth performance, feed utilization and skin coloration was 150 mL water. Finding from the current study could be applied for commercial production of Siamese fighting fish, as well as developing an intensive system (with low water volume) for this species.

Keyword: Coloration, Feed utilization, Growth, Siamese fighting fish

* Corresponding author; e-mail address: suktianchaisaekhow@gmail.com

¹ ภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อ. หาดใหญ่ จ. สงขลา 90112

¹ Department of Aquatic Science, Faculty of Natural Resources, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla 90112

² ภาควิชาวิทยาศาสตร์ประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อ. หาดใหญ่ จ. สงขลา 90112

² Department of Applied Science, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla 90112

คำนำ

ปลากัด (*Betta splendens* Regan, 1910) เป็นปลาสวยงามที่มีสีสันหลากหลาย และมีครีบที่เป็นเอกลักษณ์เฉพาะสายพันธุ์ และได้รับความนิยมเลี้ยงไว้เพื่อการต่อสู้และสวยงามทั้งในและต่างประเทศ จึงเป็นปลาสวยงามที่มีการส่งออกและสร้างรายได้เข้าประเทศเป็นอันหนึ่ง โดยในปี พ.ศ. 2553 มีการส่งออกปลากัดคิดเป็นมูลค่า 329 ล้านบาท (สำนักวิจัยเศรษฐกิจการเกษตร, 2554) อย่างไรก็ตาม ผลตอบแทนที่ได้รับของผู้เพาะเลี้ยงยังน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับปลาเศรษฐกิจอื่น เช่น ปลาทอง และปลาหางนกยูง เป็นต้น ซึ่งต่างก็เป็นปลาที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของไทยเช่นกัน (สำนักวิจัยเศรษฐกิจการเกษตร, 2554) ต้นทุนการผลิตที่สูงเป็นปัจจัยสำคัญที่ส่งผลกระทบต่อกำไร ซึ่งปัจจุบันการเพาะเลี้ยงปลากัดยังคงเป็นแบบดั้งเดิม และขาดการนำความรู้และแนวคิดทางด้านวิทยาศาสตร์เข้ามาพัฒนาทำให้ต้นทุนในการผลิตสูง ดังนั้น การนำความรู้ทางวิทยาศาสตร์มาประยุกต์ใช้เพื่อพัฒนาระบบเลี้ยงปลากัดจะเป็นแนวทางหนึ่งที่จะช่วยลดต้นทุนการผลิตและเพิ่มคุณภาพของปลากัดได้

การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำแบบหนาแน่นสูงเป็นทางเลือกหนึ่งของการเพิ่มผลผลิตในการเพาะเลี้ยงเชิงพาณิชย์ การศึกษาก่อนหน้านี้พบว่าปลากัดในธรรมชาติมักอาศัยอยู่ที่ความลึก 2.0–9.4 เซนติเมตร และครอบคลุมพื้นที่ได้ไม่เกิน 5 ตัวต่อตารางเมตร (Jaroensutasinee and Jaroensutasinee, 2001) การมีพฤติกรรมก้าวร้าวทำให้ต้องมีการเลี้ยงปลากัดเป็นแบบเดี่ยว การศึกษาในปลากัดพบว่าการเลี้ยงด้วยปริมาณน้ำที่แตกต่างกันตั้งแต่ปริมาณน้ำมาก เช่น 1 ลิตร (Takeuchi *et al.*, 2010) หรือ 2 ลิตร (Karino and Someya, 2007) หรือปริมาณน้ำน้อย เช่น 250 มิลลิลิตร (Verbeek *et al.*, 2008) เป็นต้น ความหลากหลายของปริมาณน้ำที่ใช้ดังกล่าวข้างต้นแสดงให้เห็นว่าปลากัดสามารถดำรงชีวิตได้ในปริมาณน้ำที่หลากหลายภายในภาชนะรูปทรงแตกต่างกัน

การศึกษาก่อนหน้านี้พบว่าความหนาแน่นในการเลี้ยงส่งผลต่อการเจริญเติบโต (Jha and Barat, 2005) รวมทั้งสีผิวของปลาหลายชนิด (Zeng *et al.*, 2010) ดังนั้น การศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาปริมาณน้ำที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงปลากัด (*B. splendens*) โดยนำปลากัดหางเดี่ยวครีบยาวเพศผู้สีแดงล้วนมาเลี้ยงเดี่ยวในตู้สี่เหลี่ยมผืนผ้าเป็นเวลา 8 สัปดาห์ และประเมินอัตราการรอด การเจริญเติบโต การใช้ประโยชน์จากอาหาร และสีผิวเมื่อสิ้นสุดการทดลอง ข้อมูลจากการศึกษาครั้งนี้จะเป็นประโยชน์สำหรับการประยุกต์ใช้ในการเลี้ยงปลากัดเพื่อจำหน่ายรวมทั้งการต่อยอดและพัฒนาระบบสำหรับการเลี้ยงปลากัดที่ใช้ใช้น้ำน้อย

อุปกรณ์และวิธีการ

การเตรียมและเลี้ยงปลากัด

นำปลากัดหางเดี่ยวครีบบาวเพศผู้สีแดงล้วนอายุ 4 สัปดาห์ จากฟาร์มเพาะเลี้ยงใน จ. นครปฐม มาปรับสภาพนาน 2 สัปดาห์ หลังจากนั้นนำปลาน้ำหนักเฉลี่ยเริ่มต้น 0.97 ± 0.01 กรัม มาเลี้ยงเดี่ยวในตู้สี่เหลี่ยมผืนผ้า (ความกว้าง 3.5 เซนติเมตร \times ความยาว 8 เซนติเมตร \times ความสูง 20 เซนติเมตร) ที่มีปริมาตรน้ำแตกต่างกัน 5 ระดับ ได้แก่ 100, 150, 200, 250 และ 300 มิลลิลิตร (15 ตัวต่อทรีทเมนต์) ทำการทดลองนาน 8 สัปดาห์ ตลอดการเลี้ยงอุณหภูมิของน้ำอยู่ในช่วง 26.00–29.80 องศาเซลเซียส และพีเอช 6.40–6.93 อาหารที่ใช้เลี้ยงเป็นอาหารสำเร็จรูปสำหรับปลากัดที่มีโปรตีน ≥ 46 เปอร์เซ็นต์ (เอ็มซีที อะควาเรียม จำกัด, นครปฐม) โดยให้อัตรา 3 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักตัว จำนวน 2 ครั้งต่อวัน (08.00 และ 17.00 น.) ให้แสงธรรมชาติเป็นเวลา 12 ชั่วโมงต่อวัน และเปลี่ยนน้ำที่ใช้เลี้ยง 80 เปอร์เซ็นต์ ทุก 3 วัน สถานที่และการควบคุมสภาวะในการเลี้ยงทำเช่นเดียวกันทั้งการเลี้ยงเพื่อปรับสภาพและการเลี้ยงเพื่อทดลอง และปฏิบัติตามจรรยาบรรณการใช้สัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ของสภาวิจัยแห่งชาติ (เลขที่ใบอนุญาต U1-06514-2560) เมื่อสิ้นสุดการทดลองให้ปลาอดอาหารเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดจึงสลับปลาด้วยน้ำมันกานพลู แล้วนำไปชั่งน้ำหนัก วัดความยาว และตรวจวัดสี ($n = 15$) สำหรับอัตราการรอดและปริมาณอาหารที่ให้ปลากินจะบันทึกข้อมูลทุกวัน สูตรสำหรับคำนวณอัตราการรอด การเจริญเติบโต และการใช้ประโยชน์จากอาหารมีดังนี้

$$\text{อัตราการรอด (เปอร์เซ็นต์)} = (\text{จำนวนปลาเมื่อสิ้นสุดการทดลอง} / \text{จำนวนปลาเริ่มต้น}) \times 100$$

$$\text{คอนดิชันแฟกเตอร์} = [\text{น้ำหนักเมื่อสิ้นสุดการทดลอง (กรัม)} / \text{ความยาว (เซนติเมตร)}^3] \times 100$$

$$\text{อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (เปอร์เซ็นต์น้ำหนักตัวต่อวัน)} = [\ln \text{ น้ำหนักเมื่อสิ้นสุดการทดลอง (กรัม)} - \ln \text{ น้ำหนักเริ่มต้น (กรัม)}] / \text{ระยะเวลาในการทดลอง (วัน)} \times 100$$

$$\text{อัตราการกิน (เปอร์เซ็นต์น้ำหนักตัวต่อวัน)} = \text{อาหารที่กินในแต่ละวัน} / \text{ระยะเวลาให้อาหาร} \times (\text{น้ำหนักตัวเริ่มต้น} + \text{น้ำหนักตัวสุดท้าย}) / 2 \times 100$$

$$\text{อัตราการแลกเนื้อ (กรัมอาหารต่อกรัมน้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้น)} = \text{น้ำหนักแห้งของอาหารที่กิน (กรัม)} / \text{น้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้น (กรัม)}$$

การตรวจวัดสีผิว

นำปลาที่สลับแล้วไปตรวจวัดสีผิวทันทีโดยใช้เครื่องมือวัดสี (Miniscan EZ, Hunter Associates Laboratory, Reston VA, USA) ในบริเวณส่วนกลางของลำตัว โดยค่าที่ตรวจวัด ได้แก่ ค่าความสว่าง (L^*) ค่าความแดง (a^* และ a^*/b^*) ค่าความเหลือง (b^*) ค่าโครมา (C^*) และค่าฮิว (h°)

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน ($n = 15$) วิเคราะห์โดยใช้โปรแกรม SPSS เวอร์ชัน 14 (SPSS Inc., Chicago, USA) และใช้ Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) เพื่อวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

ผลการทดลอง

อัตราการรอด การเจริญเติบโต และการใช้ประโยชน์จากอาหาร

ปลาทุกทรีทเมนต์มีอัตราการรอด 100 เปอร์เซ็นต์ และมีน้ำหนักสุดท้ายและอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะไม่แตกต่างกัน (ตารางที่ 1, $P > 0.05$) ความยาวมาตรฐานและคอนดิชันแฟกเตอร์มีค่าสูงในปลาที่เลี้ยงด้วยน้ำปริมาตร 150 มิลลิลิตร เมื่อเปรียบเทียบกับทรีทเมนต์อื่นๆ สำหรับการบริโภคอาหาร พบว่าอัตราการกินอาหารไม่แตกต่างกัน แต่อัตราการแลกเนื้อมีค่าต่ำที่สุดในปลาที่เลี้ยงด้วยน้ำปริมาตร 150 มิลลิลิตร และมีค่าสูงสุดในปลาที่เลี้ยงด้วยน้ำปริมาตร 300 มิลลิลิตร ขณะที่ทรีทเมนต์อื่นๆ มีค่าที่ไม่แตกต่างจากปลาทั้ง 2 กลุ่ม

Table 1 Survival rate, growth performance and feed utilization of single-tailed long-finned solid-red male Siamese fighting fish at various water volumes.

Parameter	Water volume (mL)				
	100	150	200	250	300
Survival rate (%)	100	100	100	100	100
FBW (g)	1.06 \pm 0.04	1.16 \pm 0.03	1.09 \pm 0.03	1.08 \pm 0.04	1.10 \pm 0.03
SL (cm)	3.39 \pm 0.04 ^b	3.48 \pm 0.04 ^{ab}	3.52 \pm 0.04 ^{ab}	3.49 \pm 0.06 ^{ab}	3.54 \pm 0.04 ^a
CF	2.73 \pm 0.04 ^a	2.80 \pm 0.04 ^a	2.46 \pm 0.04 ^b	2.47 \pm 0.04 ^b	2.49 \pm 0.04 ^b
SGR (% BW day ⁻¹)	0.38 \pm 0.04	0.36 \pm 0.03	0.36 \pm 0.04	0.37 \pm 0.03	0.34 \pm 0.03
FR (% BW day ⁻¹)	1.17 \pm 0.02	1.09 \pm 0.02	1.10 \pm 0.04	1.17 \pm 0.05	1.15 \pm 0.03
FCR (mg feed mg gain ⁻¹)	2.65 \pm 0.25 ^{ab}	2.28 \pm 0.25 ^b	3.12 \pm 0.28 ^{ab}	2.53 \pm 0.16 ^{ab}	3.41 \pm 0.48 ^a

FBW, final body weight; SL, standard length; CF, condition factor; SGR, specific growth rate; FR, feeding rate;

FCR, feed conversion ratio

Different superscripts in the same row indicate a significant difference ($P < 0.05$)

ความเข้มของสีผิว

ปริมาณน้ำที่แตกต่างกันไม่มีผลต่อความสว่างของสีผิวปลา (ตารางที่ 2) เมื่อพิจารณาทุกพารามิเตอร์ร่วมกันพบว่าค่าความสว่าง ความแดง ความเหลือง โครมา และฮิว มีค่าสูงสุดในปลาที่เลี้ยงด้วยปริมาณน้ำ 150 มิลลิลิตร

Table 2 Color parameters measured from skin of single-tailed long-finned solid-red male Siamese fighting fish at various water volumes.

Parameter	Water volume (mL)				
	100	150	200	250	300
<i>L*</i>	18.61 ± 0.60	20.67 ± 0.67	18.61 ± 0.91	20.41 ± 0.46	20.56 ± 0.13
<i>a*</i>	13.06 ± 0.47 ^a	12.17 ± 0.48 ^a	11.13 ± 0.49 ^b	11.04 ± 0.21 ^b	10.99 ± 0.40 ^b
<i>b*</i>	7.87 ± 0.46 ^a	7.82 ± 0.61 ^a	8.36 ± 0.40 ^a	6.92 ± 0.24 ^{ab}	6.31 ± 0.34 ^b
<i>C*</i>	15.36 ± 0.19 ^a	14.54 ± 0.66 ^{ab}	13.52 ± 0.18 ^{bc}	13.54 ± 0.30 ^{bc}	12.60 ± 0.43 ^c
<i>h*</i>	32.46 ± 1.36 ^a	32.97 ± 0.45 ^a	42.45 ± 0.62 ^b	34.66 ± 1.25 ^a	32.50 ± 1.36 ^a
<i>a*/b*</i>	1.28 ± 0.11 ^b	1.48 ± 0.05 ^a	1.10 ± 0.03 ^c	1.45 ± 0.03 ^{ab}	1.46 ± 0.03 ^{ab}

*L**, lightness; *a** and *a*/b**, redness; *b**, yellowness; *C**, Chroma; *h**, hue

Different superscripts in the same row indicate a significant difference ($P < 0.05$)

วิจารณ์ผลการทดลอง

ความหนาแน่นเป็นปัจจัยสำคัญที่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของปลาหลายชนิด (Jha and Barat, 2005; Niazie *et al.*, 2013) โดยความหนาแน่นสูงทำให้มีการแย่งอาหาร คุณภาพน้ำต่ำลง สัตว์ที่เลี้ยงเกิดความเครียด และใช้พลังงานเพื่อการดำรงชีวิตเพิ่มมากขึ้น (Roo *et al.*, 2010; Manley *et al.*, 2014) ขณะที่ความหนาแน่นต่ำ อาจทำให้ปลาเจริญเติบโตช้าและใช้อาหารได้ต่ำอีกเช่นเดียวกัน เนื่องจากปลาบางชนิดอาจอยู่รวมกันเป็นฝูงและมีพฤติกรรมทางสังคม (Pirozzi *et al.*, 2009; Millán-Cubillo *et al.*, 2016) การเลี้ยงปลากัดแบบเดี่ยวในตู้กระจก และวางตู้ชิดกันเพื่อเลียนแบบการเลี้ยงในฟาร์มในการศึกษาครั้งนี้ทำให้ปลาสามารถมองเห็นกันชัดเจน และด้วยพฤติกรรมก้าวร้าวของปลากัด ทำให้เกิดความเครียดเช่นเดียวกับการเลี้ยงปลาหลายตัวในตู้เดียวกัน (Karino and Someya, 2007) อย่างไรก็ตาม ความหนาแน่นที่เหมาะสมเท่านั้นจึงจะทำให้สัตว์มีความสมดุลทั้งอัตราการเจริญเติบโต การใช้ประโยชน์จากอาหาร และสวัสดิภาพในการเลี้ยง เช่น ความหนาแน่นที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงเต่าตนุ (*Chelonia mydas*) คือ 40 ตัวต่อลูกบาศก์เมตร เมื่อเปรียบเทียบกับที่ระดับ 20, 60 และ 80 ตัวต่อลูกบาศก์เมตร (Kanghae *et al.*, 2016) ดังนั้น การศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับผลของปริมาณน้ำต่อความเครียดของปลากัด (เช่น ระดับของคอร์ติซอล) จึงมีความจำเป็นต่อการเพิ่มสวัสดิภาพในการเลี้ยง การเลี้ยงปลาในปริมาณน้ำน้อยที่สุด (100 มิลลิลิตร) ส่งผลอย่างมีนัยสำคัญต่อการลดลงของความยาวมาตรฐาน ปลากัดในกลุ่มนี้จึงมีค่าคอนดิชันแฟกเตอร์สูง ซึ่งอาจเกิดจากการสะสมพลังงานของอวัยวะภายใน (Lui *et al.*, 2016) หรือการสะสมพลังงานของร่างกาย (Goede and Barton, 1990) เนื่องจากถูกจำกัดพื้นที่ สำหรับค่าคอนดิชันแฟกเตอร์ในการศึกษานี้คำนวณจากน้ำหนักตัวต่อความยาวมาตรฐานซึ่งจะช่วยลดความแปรปรวนจากความยาวครีบกางซึ่งเป็นผลมาจากความแปรผันทางพันธุกรรมได้ ค่าคอนดิชันแฟกเตอร์ที่ต่ำในปลาที่เลี้ยงในน้ำที่มีปริมาตรตั้งแต่ 200 มิลลิลิตรขึ้นไป เกี่ยวข้องกับความยาวของลำตัวที่มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตามปริมาตรของน้ำ ขณะที่น้ำหนักมีอัตราการเปลี่ยนแปลงค่อนข้างคงที่

อัตราการกินอาหารไม่แตกต่างกัน แต่อัตราการแลกเนื้อมีค่าต่ำสุดในปลาที่เลี้ยงด้วยน้ำปริมาตร 150 มิลลิลิตร ผลที่ได้อาจเกิดจากปริมาณน้ำ (ความหนาแน่น) กระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ย่อยอาหารทำให้ใช้ประโยชน์จากอาหารได้ดีขึ้น (Kanghae *et al.*, 2016) นอกจากนี้ ปริมาณน้ำที่แตกต่างกันยังส่งผลโดยตรงต่อความลึกซึ่งเกี่ยวข้องกับความดันของน้ำ และค่าแรงโน้มถ่วงที่มีผลต่อการใช้พลังงาน ดังนั้น ความลึกของน้ำจึงอาจมีผลต่อประสิทธิภาพการใช้อาหารของสัตว์ (Songnui *et al.*, 2017) ข้อมูลจากการศึกษาค้างนี้จึงแสดงให้เห็นว่าปริมาณน้ำและ/หรือความลึกเป็นตัวกระตุ้นที่ส่งผลต่อการย่อยและการดูดซึมอาหารของปลา ทำให้ปลาในแต่ละกลุ่มมีการดูดซึมสารอาหารมาใช้ประโยชน์ได้ต่างกัน

ความเข้มของสีเป็นปัจจัยที่ส่งผลต่อมูลค่าทางการค้าของปลา สำหรับสีแดงในปลากัดถูกควบคุมโดยปัจจัยหลายประการ แต่ปัจจัยที่สำคัญคือปริมาณของแคโรทีนอยด์ที่ปลากินเข้าไป โดยปลากัดเพศเมียชอบจับคู่กับปลากัดเพศผู้ที่มีสีแดงมากกว่าสีน้ำเงิน (Clotfelter *et al.*, 2007) และชอบจับคู่กับปลากัดที่มีสีแดงสดมากกว่าสีแดงอ่อน (Blakeslee *et al.*, 2009) การศึกษาในครั้งนี้พบว่าพารามิเตอร์บ่งชี้ความแดงของสีผิว (a^* และ a^*/b^*) มีค่าสูงที่สุดในปลาที่เลี้ยงในปริมาณน้ำ 150 มิลลิลิตร เช่นเดียวกับค่าโครมาที่ช่วยบ่งบอกถึงความอิ่มตัวของสี และค่าฮิวซึ่งแสดงสีที่มองเห็น (Zeng *et al.*, 2010) ดังนั้น การเลี้ยงปลากัดที่ปริมาณน้ำดังกล่าวอาจสร้างความพึงพอใจต่อสีของผู้ซื้อได้เป็นอย่างดี รวมทั้งช่วยรักษาลักษณะที่ดีต่อการเกี่ยวพาราสีของปลากัดผู้ ในปลา Arctic charr (*Salvelinus alpinus*) พบว่าปลาที่เลี้ยงที่ความหนาแน่น 50 กิโลกรัมต่อลูกบาศก์เมตร มีการสะสมของแคโรทีนอยด์สูงกว่าที่ความหนาแน่น 40 และ 75 กิโลกรัมต่อลูกบาศก์เมตร (Metusalach *et al.*, 1997) เช่นเดียวกับการศึกษาใน darkbarbel catfish (*Pelteobagrus vachelli*) (Zeng *et al.*, 2010) การเปลี่ยนแปลงสีของปลาดังกล่าวอาจเกิดขึ้นจากปัจจัยอื่นๆ นอกเหนือจากปริมาณแคโรทีนอยด์ที่ได้รับจากอาหาร สำหรับ การ ค ี ก ษ า ใน ปล า ก ัด ค รั ง นี้ อ า ห า ร ที่ ใช้ เลี ย ง ปล า ทุก พริทเมนต์เป็นชนิดเดียวกันและปลามีอัตราการกินอาหารที่ไม่แตกต่างกัน ดังนั้น การเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำและ/หรือความลึกของน้ำอาจเป็นตัวกระตุ้นที่มีผลต่อคุณภาพสีของปลากัด ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพของโครมาโทฟอร์ (Kelsh, 2004)

สรุป

ปริมาณน้ำที่เหมาะสมสำหรับการเลี้ยงปลากัดทางเดียวครึ่งยาวเพศผู้สีแดงล้วนแบบเดี่ยว คือ 150 มิลลิลิตร ในภาชนะสี่เหลี่ยมผืนผ้า(ความกว้าง 3.5 เซนติเมตร × ความยาว 8 เซนติเมตร × ความสูง 20 เซนติเมตร) โดยพิจารณาจากอัตราการรอด การเจริญเติบโต การใช้ประโยชน์จากอาหาร และสีผิว ปริมาณน้ำดังกล่าวเหมาะสำหรับการเลี้ยงปลากัดที่มีอายุ 1.5 ถึง 4 เดือน ซึ่งเป็นอายุตั้งแต่เริ่มเลี้ยงแยกจนถึงจำหน่าย อย่างไรก็ตาม การเปลี่ยนแปลงรูปทรงของภาชนะ และ/หรือระดับความลึกของน้ำอาจให้ผลที่แตกต่างกัน รวมทั้งควรมีการศึกษาปลากัดสีอื่น และปัจจัยทางกายภาพอื่นๆ เช่น ความเข้มของแสง หรืออัตราการเปลี่ยนน้ำ เป็นต้น จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการเลี้ยงและเป็นสิ่งจำเป็นต่อการออกแบบระบบการเลี้ยงปลากัดแบบใช้น้ำน้อย

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณสำนักวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ที่สนับสนุนทุนในการวิจัย (เลขที่สัญญา SCI590420S)

เอกสารอ้างอิง

สำนักวิจัยเศรษฐกิจการเกษตร. 2554. การศึกษาเศรษฐกิจการผลิตการตลาดปลาสวยงาม.

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตรกระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพฯ.

Blakeslee, C., S.P. McRobert, A.C. Brown and E.D. Clotfelter. 2009. The effect of body coloration and group size on social partner preferences in female fighting fish (*Betta splendens*). **Behav. Proc.** 80: 157–161.

Clotfelter, E.D., D.R. Ardia and K.J. McGraw. 2007. Red fish, blue fish: trade-offs between pigmentation and immunity in *Betta splendens*. **Behav. Ecol.** 18: 1139–1145.

Goede, R.W. and B.A. Barton. 1990. Organismic indices and an autopsy-based assessment as indicators of health and condition of fish. **Amer. Fish. Soc. Symp.** 8: 93–108.

Jaroensutasinee, M. and J. Jaroensutasinee. 2001. Bubble nest habitat characteristics of wild Siamese fighting fish. **J. Fish Biol.** 58: 1311–1319.

Jha, P. and S. Barat. 2005. The effect of stocking density on growth, survival rate, and number of marketable fish produced of koi carps, *Cyprinus carpio* vr. *koi* in concrete tanks. **J. Appl. Aquac.** 17: 89–102.

Kanghae, H., K. Thongprajukaew, S. Jatupompitukchat and K. Kittiwattanawong. 2016. Optimal rearing density for head-starting green turtles (*Chelonia mydas* Linnaeus, 1758). **Zoo Biol.** 35: 454–461.

Karino, K. and C. Someya. 2007. The influence of sex, line, and fight experience on aggressiveness of the Siamese fighting fish in intrasexual competition. **Behav. Proc.** 75: 283–289.

Kelsh, R.N. 2004. Genetics and evolution of pigment patterns in fish. **Pigment Cell Res.** 17, 326–336.

Lui, Q., Z. Hou, H. Wen, J. Li, F. He, J. Wang, B. Guan and Q. Wang. 2016. Effect of stocking density on water quality and (growth, body composition and plasma cortisol content) performance of pen-reared rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **J. Ocean Univ. China** 15: 667–675.

Manley, C.B., C.F. Rakocinski, P.G. Lee and R.B. Blaylock. 2014. Stocking density effects on aggressive and cannibalistic behaviors in larval hatchery-reared spotted seatrout, *Cynoscion nebulosus*. **Aquaculture** 420–421: 89–94.

- Metusalach, J., A. Brown and F. Shahidi. 1997. Effects of stocking density on colour characteristics and deposition of carotenoids in cultured Arctic charr (*Salvelinus alpinus*). **Food Chem.** 59: 107–114.
- Millán-Cubillo, A.F., J.A. Martos-Sitcha, I. Ruiz-Jarabo, S. Cárdenas and J.M. Mancera. 2016. Low stocking density negatively affects growth, metabolism and stress pathways in juvenile specimens of meagre (*Argyrosomus regius*, Asso 1801). **Aquaculture** 451:87–92.
- Niazie, E.H.N., M. Imanpoor, V. Taghizade and G. Zadmajid. 2013. Effects of density stress on growth indices and survival rate of goldfish (*Carassius auratus*). **Global Veterinaria** 10: 365–371.
- Pirozzi, I. M.A. Booth and P.M. Pankhurst. 2009. The effect of stocking density and repeated handling on the growth of juvenile mulloway, *Argyrosomus japonicus* (Temminck & Schlegel 1843). **Aquac. Int.** 17:199–205.
- Roo, J. C.M. Hernández-Cruz, C. Borrero, D. Schuchardt and H. Fernández-Palacios. 2010. Effect of larval density and feeding sequence on meager (*Argyrosomus regius* Asso, 1801) larval rearing. **Aquaculture** 302:82–88.
- Songnui, A., K. Thongprajukaew, H. Kanghae, J. Satjarak and K. Kittwattanawong. 2017. Water depth and feed pellet type effects on growth and feed utilization in the rearing of green turtle (*Chelonia mydas* Linnaeus, 1758). **Aquat. Living. Resour.** DOI: 10.1051/alr/2017017.
- Takeuchi, Y., M. Hori, M. Myint and M. Kohda. 2010. Lateral bias of agonistic responses to mirror images and morphological asymmetry in the Siamese fighting fish (*Betta splendens*). **Behav. Brain Res.** 208: 106–111.
- Thongprajukaew, K., S. Kovitvadi, U. Kovitvadi and K. Rungruangsak-Torrissen. 2014. Pigment deposition and *in vitro* screening of natural pigment sources for enhancing pigmentation in male Siamese fighting fish (*Betta splendens* Regan, 1910). **Aquac. Res.** 45: 709–719.
- Verbeek, P., T. Iwamoto and N. Murakami. 2008. Variable stress-responsiveness in wild type and domesticated fighting fish. **Physiol. Behav.** 93: 83–88.
- Zeng, W., Z. Li, S. Ye, S. Xie, J. Liu, T. Zhang and M. Duan. 2010. Effects of stocking density on growth and skin color of juvenile darkbarbel catfish *Pelteobagrus vachelli* (Richardson). **J. Appl. Ichthyol.** 26: 925–929.

ภาคผนวก ค

บทความวิจัยที่ตีพิมพ์ในวารสารระดับนานาชาติ

Minimal water volume for intensively producing male Siamese fighting fish (*Betta splendens* Regan, 1910)

Suktianchai Saekhow · Karun Thongprajukaew ·
Wutiporn Phromkunthong · Harit Sae-khoo

Received: 18 November 2017 / Accepted: 21 March 2018
© Springer Science+Business Media B.V., part of Springer Nature 2018

Abstract Water volume is a key parameter affecting the individual rearing of male Siamese fighting fish (*Betta splendens* Regan, 1910). In this study, minimization of water volume was pursued by assessing growth, feed utilization, digestive enzyme activities, color coordinates, muscle quality, and carcass composition. One-month-old solid-red male fish (0.97 ± 0.01 g initial body weight) were distributed individually into glass aquaria with five alternative water volumes (100, 150, 200, 250, and 300 mL), comprising 15 fish per treatment ($n = 15$), over 8 weeks duration. No mortality of the reared fish was found during the study. Growth performance and feed utilization of the fish reared in 150 mL water were superior to the other treatments. The water volume significantly affected specific activities of the digestive enzymes ($P < 0.05$), except for amylase, and

no differences in enzyme activities were observed between fish reared in 150 and in 300 mL water. The preferred treatment maintained skin lightness (L^*) and had the highest redness (a^* and a^*/b^*) among the treatments. Protein synthesis (RNA concentration) and its turnover rate (RNA/protein ratio) and myosin and actin in muscle also benefited from this treatment. Carcass composition, in terms of moisture, crude protein, and crude ash, was maintained, but the amount of crude lipid fluctuated with water volume. Based on our experiments, the preferred minimal water volume for individual rearing of male Siamese fighting fish should be about 150 mL.

Keywords Carcass composition · Color · Growth · Feed utilization · Muscle quality

S. Saekhow · W. Phromkunthong
Department of Aquatic Science, Faculty of Natural Resources,
Prince of Songkla University, Songkhla 90112, Thailand

S. Saekhow
e-mail: suktianchaisaekhow@gmail.com

W. Phromkunthong
e-mail: wutiporn.p@psu.ac.th

K. Thongprajukaew (✉) · H. Sae-khoo
Department of Applied Science, Faculty of Science, Prince of
Songkla University, Songkhla 90112, Thailand
e-mail: karun.t@psu.ac.th

H. Sae-khoo
e-mail: sem_handsome@hotmail.com

Introduction

Siamese fighting fish (*Betta splendens* Regan, 1910) is a commercially produced and exported species of ornamental fish in Thailand (Monvises et al. 2009). It inhabits shallow waters among dense emergent vegetation near the margins of hill streams, swamps, or paddy fields (Jaroensutasinee and Jaroensutasinee 2001) and is native to the Mekong basin of Laos, Cambodia, Vietnam, and Thailand (Froese and Pauly 2016). Only the male fish are popular for their brilliant colors, and solid red is preferred by the fish culturists with solid blue coming in the second place (Thongprajukaew et al. 2014).

In the nature, *B. splendens* has a mean population density of 1.7 fish m⁻² in shallow (about 2–9 cm) waters (Jaroensutasinee and Jaroensutassinee 2001). Under captivity in aquaria, this fish can be reared in small containers with poor quality water (Jaroensutasinee and Jaroensutassinee 2001). Individual rearing of this species can depress its otherwise aggressive behavior under captivity in aquaria (Halperin et al. 1992). Various water volumes have been used for rearing *B. splendens* in laboratory studies (Karino and Someya 2007; Verbeek et al. 2008; Takeuchi et al. 2010), as well as during export logistics. However, the minimal water volume for rearing this species has not been examined, but needs to be assessed.

The stocking density has been demonstrated as a variable crucial to growth performance (Sanchez et al. 2010), survival (Jha and Barat 2005), and feed utilization (Niazie et al. 2013) of cultured fishes. The effects of density on these parameters vary by fish species. Negative effects from decreased water volume have been generally reported (Jha and Barat 2005; Ahmadivand et al. 2013); however, also positive effects have been found in some cases (Osofero et al. 2009; Sammouth et al. 2009; Niazie et al. 2013). Varying the stocking density can require adaptations in the fish lifestyle by changes in feed consumption, social interactions, water quality, and stress (Cristea et al. 2012). In addition, the density also affects digestive enzymes that relate to the mechanisms of digestion and the feed utilization (Bolasina et al. 2006; Kanghae et al. 2016).

Stocking density has been reported to affect skin pigmentation in various fish (Ali et al. 2006; Zeng et al. 2010). Therefore, the physiological induction under restricted water volume might alter the skin coloration of captive fighting fish. In addition, studies of the myofibrillar proteins, actin and myosin (Tyska and Warsaw 2002), and protein synthesis capacity (Sunde et al. 2001), appear necessary to observe as indicators of the physiological changes in muscles under captivity. Proximate composition of carcass may also be affected by the stocking density (Osofero et al. 2009; Cretu et al. 2014; Lui et al. 2016), due to accumulation or depletion of energy reserves (Cretu et al. 2014). Therefore, the objective of this study was to minimize the water volume for the individual rearing of male Siamese fighting fish, based on assessment of growth, feed utilization, digestive enzyme activities, skin color, muscle quality, and carcass composition. Only solid-red male fish were chosen as the models, because they have the relatively

high market prices in comparison to other solid colorations (Thongprajukaew et al. 2014). Findings from the current study might be useful for farm management, as well as on developing systems for the intensive rearing of this species.

Materials and methods

Fish preparation and experimental setup

One-month-old solid-red male Siamese fighting fish were purchased from a local farm in Nakhonpathom province of Thailand. The fish were individually acclimatized in cylindrical plastic beakers (7.5 cm diameter × 12.5 cm height) containing 250 mL water, for 2 weeks. The fish with similar size (0.97 ± 0.01 g initial body weight) were distributed individually into glass aquaria (3.5 cm width × 8 cm length × 20 cm height) containing five alternative water volumes (100, 150, 200, 250, and 300 mL), comprising 15 fish per treatment ($n = 15$) as the experimental units. The fish were fed a commercial floating diet (MCT Aquarium, Nakhonpathom, Thailand) for small ornamental fish (containing ≥ 10% moisture, ≥ 46% crude protein, ≥ 6% crude lipid, ≥ 5% crude fiber, and ≥ 12% crude ash) twice daily (08.00 and 17.00 h) at 2% of body weight (BW). The experiment was conducted for 8 weeks with the natural 12 h:12 h light/dark cycle. Survival was recorded daily before beginning the first feeding. Uneaten excess diet was siphoned off 30 min after feeding, dried at 60 °C until constant weight, and the determined weight was used to calculate the feeding rate (FR), feed conversion ratio (FCR), and protein efficiency ratio (PER). At the end of the experiment, all the fish were starved for 24 h and then were anesthetized by clove oil. Measurement of BW and standard length of all the fish was performed at the end of experiment. All these fish were used for subsequent analysis of digestive enzymes, muscle quality, color coordinates, and carcass composition.

Water monitoring

The water was 80% replaced by dechlorinated stock within 3 consecutive days. Water was sampled at the same time (07.30 h) for quality analysis. Water temperature (Hg thermometer) and pH (pH meter) were determined according to standard methods of APHA, AWWA, and WPCF (1998). Ammonia, nitrite, and

alkalinity were determined using a commercial test kit (Merck KGaA, Darmstadt, Germany). Dissolved oxygen was determined by a water analyzer (Multiparameter Display System; YSI 650MDS, YSI Incorporated, Ohio, USA).

Determination of digestive enzyme activity

Extraction of digestive enzymes

The frozen whole visceral organs ($n = 5$) were extracted in 0.2 M Na_2HPO_4 - NaH_2PO_4 buffer (pH 8) at a ratio of 1:15 (w/v), using a micro-homogenizer (THP-220; Omni International, Kennesaw GA, USA). The homogenates were centrifuged at $15,000\times g$ for 30 min at 4°C , and supernatants were collected, and aliquots were kept at -20°C until use. The protein concentration of a crude enzyme extract was compared to a standard curve of bovine serum albumin, according to the standard method of Lowry et al. (1951).

Digestive enzyme assay

The optimal conditions of assaying pepsin (EC 3.4.23.1), trypsin (EC 3.4.21.4), chymotrypsin (EC 3.4.21.1), amylase (3.2.1.1), and lipase (EC 3.1.1.3) in Siamese fighting fish were chosen from Thongprajukaew et al. (2010a, b). Pepsin activity was assayed according to the method of Rungruangsak and Utne (1981), using 2% casein as substrate. The activity was spectrophotometrically measured at 720 nm against the linear range of *L*-tyrosine standard. Trypsin and chymotrypsin activities were determined as described by Rungruangsak-Torissen et al. (2006), using 1.25 mM *N*- α -benzoyl-Arg-*p*-nitroanilide (BAPNA) and 0.10 mM *N*-succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-*p*-nitroanilide (SAPNA) as substrates, respectively. The liberated product of each enzyme was spectrophotometrically measured at 410 nm against the linear range of *p*-nitroanilide standard. Lipase activity was assayed according to the method of Winkler and Stuckmann (1979), using 0.01 M *p*-nitrophenyl palmitate (*p*-NPP) as substrate. The absorbance at 410 nm was measured against *p*-nitrophenol standard. Amylase activity was assayed as described by Areekijsee et al. (2004), using 5% starch soluble as the substrate. The product was measured at 540 nm against maltose standard.

Color measurement

Quantitative values of skin color in terms of lightness (L^*), redness/greenness (a^*), and yellowness/blueness (b^*) were measured using a MiniScan EZ (Hunter Associates Laboratory, Reston VA, USA) with small area view (6 mm port and 5 mm view diameters). The instrument was calibrated to white and black standards before measurement. Each unconscious fish ($n = 15$) was carefully cleaned by soft blotting paper and then the color was measured from the middle part of body. The redness index (a^*/b^*) was also calculated.

Muscle quality

Protein synthesis capacity

The exopial white muscle excluding scale and skin (below dorsal fin) was carefully removed ($n = 5$). Then 50 mg frozen samples were sonicated (VCX; Sonic and Materials Inc., Newtown CT, USA) in TRIzol® reagent (Invitrogen, Carlsbad CA, USA) and the concentrations of RNA and protein were determined as described in Rungruangsak-Torissen (2007). The extinction coefficients for calculating RNA and protein were $E_{260} = 40 \mu\text{g RNA per milliliter}$ and $E_{280} = 2.1 \text{ mg protein per milliliter}$, respectively. The concentration ratio (RNA/protein ratio) from each sample was calculated from the amounts of RNA and protein.

Actin and myosin

Thermal parameters, including onset (T_o), denaturation peak (T_d), and conclusion (T_c) temperatures, and enthalpy (ΔH), were determined using a differential scanning calorimeter (DSC7, Perkin Elmer, Waltham, Massachusetts, USA). Approximately 10 mg of thawed fish muscle ($n = 5$) was placed in an aluminum pan, sealed, allowed to equilibrate at room temperature, and then heated from 20 to 100°C at a rate of 5°C min^{-1} against an empty pan. Identification of myosin and actin peaks was performed as described in Thongprajukaew et al. (2015).

Proximate chemical composition of carcass

The whole body ($n = 5$) was minced and then moisture and crude ash were determined according to standard methods of AOAC (2005). Crude protein was

determined as described in Rungruangsak-Torrissen (2007). Crude lipid was determined by ethyl acetate extraction according to Supannapong et al. (2008).

Statistical analysis and calculations

The experiment followed a completely randomized design (CRD), comprising five treatments and 15 replications each. The data were recorded in Microsoft Excel (Microsoft Corporation, Redmond, Washington, USA) and then subjected to analysis in Statistical Package for Social Science (SPSS) Version 14 (SPSS Inc., Chicago, USA) for all the statistical evaluations. The data are here expressed as mean \pm standard error of mean (SEM). Comparisons of means in the statistical analyses were carried out using Duncan's multiple range test with significance threshold $P < 0.05$. Survival, growth performance, and feed utilization parameters were calculated as described below:

$$\text{Survival (\%)} = [\text{Final fish number}/\text{initial fish number}] \times 100$$

$$\text{Condition factor (CF, g cm}^{-3}\text{)} = \left[\frac{\text{Live body weight (g)}}{\text{body length (cm)}^3} \right] \times 100$$

$$\text{Specific growth rate (SGR, \%BW day}^{-1}\text{)} = \left[\frac{\ln W_t - \ln W_0}{t - t_0} \right] \times 100$$

where W_t = mean weight (g) at day t , W_0 = mean weight (g) at day t_0 .

$$\begin{aligned} \text{Viscerosomatic index (VSI, \%)} \\ = [\text{Wet weight of visceral organ (g)}/\text{wet body weight (g)}] \\ \times 100 \end{aligned}$$

$$\text{FR (\%BW day}^{-1}\text{)} = C/[(W_0 + W_t)/2]/t \times 100$$

where C = daily feed consumption (g), W_0 = initial body weight (g), W_t = final body weight (g), t = feeding duration (day)

$$\begin{aligned} \text{FCR (g feed g gain}^{-1}\text{)} \\ = \text{Dry feed consumed (g)}/\text{wet weight gain (g)} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{PER (g gain g protein}^{-1}\text{)} \\ = \text{Wet weight gain (g)}/\text{protein intake (g)} \end{aligned}$$

Results

Water quality during experiment

There were no significant differences in water temperature, dissolved oxygen, nitrite, or alkalinity between the five treatments ($P > 0.05$, Table 1). The pH values were elevated in the treatments with 250 and 300 mL water ($P < 0.05$), followed by 150 and 200 mL ($P > 0.05$), on comparing to the lowest volume. Ammonia concentration was highest in the 100 mL volume, although without significant difference to the 150 mL treatment.

Table 1 Water quality during male Siamese fighting fish individual rearing. The analysis was performed every 3 days with water change

Water quality	Water volume (mL)				
	100	150	200	250	300
pH	6.44 \pm 0.04 ^b	6.55 \pm 0.06 ^{ab}	6.66 \pm 0.02 ^{ab}	6.79 \pm 0.14 ^a	6.79 \pm 0.12 ^a
Temperature ($^{\circ}$ C)	27.83 \pm 0.16	27.99 \pm 0.20	28.00 \pm 0.25	27.98 \pm 0.25	27.81 \pm 0.27
Dissolved oxygen (mg L ⁻¹)	3.36 \pm 0.17	3.33 \pm 0.15	3.26 \pm 0.11	3.01 \pm 0.14	2.97 \pm 0.09
Ammonia (mg L ⁻¹)	3.73 \pm 0.28 ^a	2.90 \pm 0.45 ^{ab}	2.52 \pm 0.48 ^b	1.85 \pm 0.29 ^b	2.29 \pm 0.06 ^b
Nitrite (mg L ⁻¹)	1.21 \pm 0.24	1.28 \pm 0.52	0.87 \pm 0.11	1.04 \pm 0.55	0.89 \pm 0.17
Alkalinity (mg L ⁻¹)	63.25 \pm 5.50	57.29 \pm 5.54	52.11 \pm 6.52	54.56 \pm 6.77	63.66 \pm 6.44

Data are expressed as mean \pm SEM

Differences between means were tested with Duncan's multiple range test

Different superscripts in the same row indicate a significant difference ($P < 0.05$)

Survival, growth performance, and feed utilization

No mortality of reared fish was observed within the studied period (Table 2). Final body weight, body thickness, body depth, and SGR did not differ significantly between the five treatments. The highest and lowest weight gains were observed in the fish reared in 150 and 300 mL, respectively; the three remaining water volumes were intermediate between those two groups. Standard length was superior in the fish reared in 300 mL water relative to the lowest volume, while no significant differences were observed in the other groups. VSI was significantly decreased in the fish reared in 150 mL relative to the other four treatments. The highest CF values were observed in the fish reared in the two least water volumes. FCR and PER had superior values in the fish reared with 150, 200, or 250 mL water, while the FR showed no significant differences between the treatments.

Specific activities of digestive enzymes

The water volumes had significant effects on the specific activities of digestive enzymes, except for amylase

(Table 3). The fish reared in the least water volume exhibited decreased enzyme activities, except for lipase and A/T ratio, relative to the other treatments. The fish reared in 200 or 250 mL had significant reductions in trypsin- and lipase-specific activities, respectively. There were no differences in any enzyme activity between rearing in 150 and 300 mL.

Color parameters

L^* values of fish skin did not differ among the five treatments (Table 4). Color parameters indicating skin redness (a^* and a^*/b^*) had their highest values in the fish reared in 150 mL water. This treatment also maintained the b^* value, as did the treatments with 100, 200, and 250 mL, but the 300 mL treatment did not.

Muscle quality

Protein synthesis capacity

The highest RNA concentration was achieved by the fish reared in 200 and 250 mL ($P < 0.05$) and followed by 150 mL ($P > 0.05$) relative to 100 and 300 mL

Table 2 Survival, growth performance, and feed utilization of male Siamese fighting fish individually reared in various water volumes. The observed parameters were recorded at the end of 8 weeks duration

Parameter	Water volume (mL)				
	100	150	200	250	300
Survival (%)	100	100	100	100	100
Final body weight (g)	1.06 ± 0.04	1.16 ± 0.03	1.09 ± 0.03	1.08 ± 0.04	1.10 ± 0.03
Weight gain (g)	0.24 ± 0.03 ^{ab}	0.31 ± 0.04 ^a	0.25 ± 0.02 ^{ab}	0.22 ± 0.04 ^{ab}	0.20 ± 0.04 ^b
Standard length (cm)	3.39 ± 0.04 ^b	3.48 ± 0.04 ^{ab}	3.52 ± 0.04 ^{ab}	3.49 ± 0.06 ^{ab}	3.54 ± 0.04 ^a
Body thickness (cm)	0.34 ± 0.01	0.31 ± 0.01	0.32 ± 0.01	0.32 ± 0.01	0.32 ± 0.01
Body depth (cm)	0.87 ± 0.01	0.91 ± 0.01	0.94 ± 0.01	0.92 ± 0.02	0.92 ± 0.01
VSI (%)	6.36 ± 0.28 ^a	5.26 ± 0.24 ^b	6.37 ± 0.33 ^a	6.62 ± 0.28 ^a	7.12 ± 0.62 ^a
CF (g cm ⁻³)	2.73 ± 0.04 ^a	2.80 ± 0.04 ^a	2.46 ± 0.04 ^b	2.47 ± 0.04 ^b	2.49 ± 0.04 ^b
SGR (% BW day ⁻¹)	0.38 ± 0.04	0.36 ± 0.03	0.36 ± 0.04	0.37 ± 0.03	0.34 ± 0.03
FR (% BW day ⁻¹)	1.17 ± 0.02	1.09 ± 0.02	1.10 ± 0.04	1.17 ± 0.05	1.15 ± 0.03
FCR (mg feed mg gain ⁻¹)	2.65 ± 0.25 ^{ab}	2.28 ± 0.25 ^b	3.12 ± 0.28 ^{ab}	2.53 ± 0.16 ^{ab}	3.41 ± 0.48 ^a
PER (mg gain mg protein ⁻¹)	1.22 ± 0.25 ^b	1.65 ± 0.25 ^{ab}	1.45 ± 0.28 ^{ab}	1.85 ± 0.16 ^a	1.48 ± 0.48 ^{ab}

VSI, viscerosomatic index; CF, condition factor; SGR, specific growth rate; BW, body weight; FR, feeding rate; FCR, feed conversion ratio; PER, protein efficiency ratio

Data are expressed as mean ± SEM ($n = 15$)

Differences between means were tested with Duncan's multiple range test

Different superscripts in the same row indicate a significant difference ($P < 0.05$)

Table 3 Specific activity of digestive enzymes in male Siamese fighting fish individually reared in various water volumes. The observed parameters were recorded at the end of the 2-month experiment

Digestive enzyme	Water volume (mL)				
	100	150	200	250	300
Pepsin (U mg protein ⁻¹)	24.77 ± 3.92 ^b	31.94 ± 1.60 ^{ab}	25.43 ± 1.90 ^{ab}	26.92 ± 1.67 ^{ab}	32.82 ± 1.76 ^a
Trypsin (U mg protein ⁻¹)	51.52 ± 2.17 ^b	88.40 ± 6.45 ^a	54.39 ± 6.02 ^b	87.99 ± 8.18 ^a	74.91 ± 8.35 ^a
Chymotrypsin (U mg protein ⁻¹)	18.07 ± 1.91 ^b	23.83 ± 2.39 ^{ab}	21.70 ± 1.88 ^{ab}	21.04 ± 1.38 ^{ab}	25.87 ± 1.12 ^a
Lipase (U mg protein ⁻¹)	18.69 ± 2.47 ^{ab}	19.67 ± 1.94 ^{ab}	15.98 ± 1.30 ^{ab}	14.40 ± 2.61 ^b	22.91 ± 2.78 ^a
Amylase (mU mg protein ⁻¹)	117.45 ± 6.34	107.96 ± 2.58	108.55 ± 6.35	107.24 ± 6.50	101.71 ± 1.41
A/T ratio (× 10 ³)	2.27 ± 0.21 ^b	1.37 ± 0.13 ^a	1.70 ± 0.17 ^a	1.25 ± 0.17 ^a	1.25 ± 0.14 ^a

A/T ratio, amylase/trypsin ratio

Data are expressed as mean ± SEM ($n = 5$)

Differences between means were tested with Duncan's multiple range test

Different superscripts in the same row indicate a significant difference ($P < 0.05$)

treatments (Table 5). There were no differences in protein concentration among the three least volume treatments, followed by statistically significant reduction with the 250 and 300 mL treatments. This trend was opposite to that observed for the RNA/protein ratio.

Thermal properties of actin and myosin

The amount of native myosin was relatively high in the fish reared in 150, 200, and 250 mL water volumes (Table 5). The amount of actin showed no significant differences between the five treatments.

Carcass composition

Varying the water volumes did not affect carcass moisture, crude protein, or crude ash (Table 6). Crude lipid

was the highest in fish reared in 100 mL water, followed by 150 mL and the other three treatments.

Discussion

The water quality was significantly affected by the water volume, in the current study. The decrease of pH and increase of total ammonia with higher stocking density (lower water volume per fish) were similar to prior observations in koi carp, *Cyprinus carpio* (Jha and Barat 2005) and seabass, *Dicentrarchus labrax* (Sammouth et al. 2009). The pH in all treatments was higher than in the natural habitat of the wild fighting fish, which is pH 5.28–5.80 (Jaroensutasinee and Jaroensutasinee 2001). However, under laboratory conditions, the pH in all these treatments was within the

Table 4 Color parameters of male Siamese fighting fish individually reared in various water volumes. The observed parameters were recorded at the end of the 2-month experiment

Color parameter	Water volume (mL)				
	100	150	200	250	300
L^*	18.61 ± 0.60	20.67 ± 0.67	18.61 ± 0.91	20.41 ± 0.46	20.56 ± 0.13
a^*	13.06 ± 0.47 ^a	12.17 ± 0.48 ^a	11.13 ± 0.49 ^b	11.04 ± 0.21 ^b	10.99 ± 0.40 ^b
b^*	7.87 ± 0.46 ^a	7.82 ± 0.61 ^a	8.36 ± 0.40 ^a	6.92 ± 0.24 ^{ab}	6.31 ± 0.34 ^b
a^*/b^*	1.28 ± 0.11 ^b	1.48 ± 0.05 ^a	1.10 ± 0.03 ^c	1.45 ± 0.03 ^{ab}	1.46 ± 0.03 ^{ab}

Data are expressed as mean ± SEM ($n = 15$)

Differences between means were tested with Duncan's multiple range test

Different superscripts in the same row indicate a significant difference ($P < 0.05$)

Table 5 Protein synthesis capacity and myosin and actin in white muscle of male Siamese fighting fish individually reared in various water volumes. The observed parameters were recorded at the end of the 2-month experiment

Parameter	Water volume (mL)				
	100	150	200	250	300
RNA ($\mu\text{g g}^{-1}$)	1177 \pm 62 ^c	1218 \pm 86 ^{bc}	1462 \pm 46 ^a	1418 \pm 81 ^{ab}	1106 \pm 54 ^c
Protein (mg g^{-1})	169.80 \pm 4.35 ^a	178.55 \pm 7.96 ^a	182.58 \pm 8.41 ^a	137.81 \pm 4.45 ^b	99.71 \pm 5.52 ^c
RNA/protein ratio ($\mu\text{g mg}^{-1}$)	7.01 \pm 0.52 ^c	7.59 \pm 0.69 ^{bc}	7.91 \pm 0.25 ^{bc}	9.18 \pm 0.70 ^b	12.13 \pm 0.72 ^a
Δ Myosin (J g^{-1})	0.69 \pm 0.01 ^{bc}	0.85 \pm 0.19 ^{ab}	1.56 \pm 0.02 ^a	1.27 \pm 0.41 ^{ab}	0.73 \pm 0.01 ^c
Δ Actin (J g^{-1})	0.33 \pm 0.01	0.34 \pm 0.06	0.35 \pm 0.05	0.32 \pm 0.00	0.24 \pm 0.02

Data are expressed as mean \pm SEM ($n = 5$)

Differences between means were tested with Duncan's multiple range test

Different superscripts in the same row indicate a significant difference ($P < 0.05$)

range for rearing fighting fish, namely pH 6.5–7.5 (Verbeek et al. 2007), except for the slightly low pH with 100 mL water volume (pH 6.44 ± 0.04). Total ammonia was significantly elevated with 100 mL water relative to the other treatments; high-rearing density can cause dramatic changes in water quality from the excreted ammonia wastes. This observed trend in ammonia has been previously reported on rearing some fish (Jha and Barat 2005; Sammouth et al. 2009; Lui et al. 2016). Based on two above parameters, rearing the fighting fish individually in 100 mL water volume appears to be inappropriate, since it provides relatively poor water quality when compared to larger water volumes. However, the water exchange rate naturally affects water quality, and in intensive aquaculture systems, the water is typically changed more often or a recirculating system is used. Regarding the other water quality parameters, no significant differences between the

treatments were observed, and these parameters were within good levels, close to the ranges reported for *B. splendens* aquaculture (Jaroensutasinee and Jaroensutasinee 2001; Mandal et al. 2010).

Stocking density is among the most important rearing parameters affecting fish growth (Jha and Barat 2005; Sanchez et al. 2010; Niazie et al. 2013). Generally, food competition limits fish growth and leads to poor weight gain with high-density rearing (Stickney 1994). On the other hand, the decreased weight increment in the largest water volume of the current study might be associated with increasing swimming activity (Karakatsouli et al. 2010) as well as bubble nest building by this male fish, reducing the energy for growth. A minimal water volume can significantly decrease skeletal growth. Regarding morphometry, only CF was affected by the water volume while body thickness and depth were not. The relatively high CF value observed in the

Table 6 Carcass proximate chemical composition of male Siamese fighting fish individually reared in various water volumes. The observed parameters were recorded at the end of the 2-month experiment

Chemical component	Water volume (mL)				
	100	150	200	250	300
Moisture (% FW)	74.32 \pm 0.57	75.36 \pm 0.74	75.31 \pm 0.82	73.93 \pm 0.52	75.01 \pm 0.54
Crude protein (% FW)	15.62 \pm 0.35	14.99 \pm 0.45	15.02 \pm 0.50	15.86 \pm 0.32	15.21 \pm 0.33
Crude lipid (% FW)	3.27 \pm 0.18 ^a	2.40 \pm 0.13 ^b	1.26 \pm 0.14 ^c	1.48 \pm 0.16 ^c	1.60 \pm 0.27 ^c
Crude ash (% FW)	3.33 \pm 0.46	4.23 \pm 0.34	4.13 \pm 0.48	4.48 \pm 0.30	3.33 \pm 0.31

FW fresh weight

Data are expressed as mean \pm SEM ($n = 5$)

Differences between means were tested with Duncan's multiple range test

Different superscripts in the same row indicate a significant difference ($P < 0.05$)

current study is due to the calculation of body weight per standard length, which reduces the variations from fin shape phenotypes. Lambert and Dutil (2001) have reported negative effects of increasing stocking density on the CF of Atlantic cod (*Gadus morhua*). This conflicts with the results found in this current study, where the male fighting fish were individually reared, reducing the social interactions between the fish. However, similar CF has been reported across different stocking densities when rearing fish (Saoud et al. 2007; Tolussi et al. 2010). The CF and VSI can relate to body energy storage, as observed by Goede and Barton (1990). Increased CF and VSI in the fish reared in the least water volume might be due to viscerosomatic energy storage and to viscerosomatic mass growth processes that reduce growth performance (Lui et al. 2016).

The SGR of fighting fish in this investigation was similar to that in data reported by James and Sampath (2006). Based on our investigation of growth parameters, the minimal water volume for rearing male fighting fish should be about 150 mL. This level had 5.36 cm water depth, which matches well the depth in the preferred natural habitat, 2–9 cm (Jaroensutasinee and Jaroensutassinee 2001). In addition, this volume is below the 250 mL used by the supplying farm and below the volumes reported by various researchers: 250 mL (Verbeek et al. 2008), 1000 mL (Takeuchi et al. 2010), and 2000 mL (Karino and Someya 2007).

Superior feed utilization (FR, FCR, and PER) was also observed in the fish reared in 150 mL water. This finding matches well the increased protease (pepsin, trypsin, chymotrypsin) and lipase activities. Since *B. splendens* are carnivorous fish, up-regulation of the protease activities can improve digestion and utilization of dietary proteins (Chakrabarti et al. 1995) and ditto to lipids and lipase activity. Since glucose is an essential energy source for a number of tissues (Romijn et al. 1990), maintaining the amylase activity is necessary for metabolic homeostasis. This finding is in agreement with the response of turbot, *Scophthalmus maximus*, when subjected to four rearing density levels (Xian et al. 2013). However, feeding habits, as indicated by the A/T ratio (Hofer and Schiemer 1981), were influenced by the water volume. Rearing the fish in 100 mL water can increase the energy requirements, increasing carbohydrate catabolism per amount of protein.

Skin color is another important factor influencing the commercial value of fish. In *B. splendens*, skin redness is controlled by carotenoids and the female fish prefer to

associate with red males over blue males, suggesting a sexually selected advantage to being red (Clotfelter et al. 2007). In addition, within the red phenotype groups, the female fish prefer to associate with the vermilion males over those that are pale red (Blakeslee et al. 2009). In the current study, the skin redness parameters (a^* and a^*/b^*) were the highest in fish reared individually in 150 mL water, suggesting that this treatment contributes to a valuable ornamental trait as well as to courting competency of the male fish. Metusalach et al. (1997) reported stocking density has an effect on carotenoid uptake in Arctic charr (*Salvelinus alpinus*); the highest pigment deposition was observed in the fish stocked at 50 kg m^{-3} , when the other alternatives were lower (40 kg m^{-3}) or higher (75 kg m^{-3}) levels. Similar findings were also reported in darkbarbel catfish, *Pelteobagrus vachelli* (Zeng et al. 2010), and in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Çagiltay et al. 2015). These responses are similar to our observations, but the amount of pigments in *B. splendens* feed and its feeding rate were fixed during this study. Stress is a more important factor affecting skin color than the dietary carotenoid administration, even though carotenoids are important pigments contributing to the red skin of *B. splendens* (Metusalach et al. 1997; Clotfelter et al. 2007). Fluctuations in skin redness might be associated with environmental cues, water volume, and with generating striped patterns of chromatophores (Kelsh 2004).

Increased muscle protein concentration during growth has been observed in rainbow trout (Rungruangsak-Torrissen et al. 2009). In Atlantic salmon (*Salmo salar*), SGR was negatively correlated with muscle RNA and RNA/protein ratio (Sunde et al. 2001). Similarly, significantly lower RNA concentration (protein synthesis) and RNA/protein ratio (protein turnover rate) were also observed in the faster growing males than in the slower growing females of Siamese fighting fish (Thongprajukaew et al. 2013). Based on these previous reports, reduced protein synthesis capacity and protein turnover rate while the protein concentration was maintained suggest continuous growth of the fish individually reared under the preferred conditions, i.e., in 150 mL water. The measured ΔH is linked to the amount of proteins left in their native state and may relate to the physiological exercise by the fish (Thongprajukaew et al. 2015) in a restricted water volume. Myofibrillar protein is the major component of fish muscle (39–56%), followed by sarcoplasmic protein

(21–25%) and stroma or connective tissue proteins (6–21%) (Chaijan et al. 2010); myosin contributes 50–60% of the total (Shahidi 1994). The comparatively elevated ΔH of myosin in fish reared in 150, 200, or 250 mL of water may indicate its increased amount in muscle. This is similar to the findings of Coughlin et al. (2016) that the rearing conditions can directly affect myosin heavy chain expression, causing changes in swimming performance and muscle contractile properties. However, no differences were observed in the ΔH of actin between the five treatment groups of fish, in the current study.

Previous studies have reported effects of fish rearing density on carcass composition, with varying trends (Toko et al. 2007; Osofero et al. 2009; Karakatsouli et al. 2010). In the current study, no significant differences in carcass moisture, protein, and ash content were found between the preferred treatment and the other treatments. This indicates that the fighting fish can maintain their proximate composition in the face of restricted water volume. Similarly, no effects of stocking density on meat composition (moisture, CP, lipid, ash, and nitrogen free extract) were observed in rainbow trout (Cretu et al. 2014). Some improvements in lipid deposition were observed with the preferred treatment when compared to the baseline volume used by the farmer, 250 mL, or to other higher volumes. Higher amount of lipid in fish reared in 100 mL might be caused by decreased swimming activity, reducing energy usage from lipid catabolism (Karakatsouli et al. 2010). This finding is in agreement with the lipid contents observed in African catfish (*Clarias gariepinus*) and in vundu catfish (*Heterobranchus longifilis*), when subjected to increased stocking density (Toko et al. 2007).

Conclusions

Based on our investigation, the preferred minimal water volume for individual rearing of male Siamese fighting fish was 150 mL. This water level gave superior growth performance, feed utilization, skin redness, and muscle quality and had no negative effects on carcass composition. This volume should be applied since the male fish begins aggressive behavior at 1.5 months of age, and it continues until the fish is sold at approximately 4 months of age. Optimization of the other known factors in the physical circumstances, i.e., photoperiod, light intensity, aquarium shape, and water exchange rate, is necessary before designing an intensive aquaculture system for

this species. Subsequent experiments on the effects of aquarium color background on the male fish are currently underway.

Acknowledgements We acknowledge Assoc. Prof. Dr. Seppo Karila and the Publication Clinic, Research and Development Office, PSU, for advice in manuscript preparation.

Funding information Funding was provided by the budget revenue (Contract No. SCI590420S) of the Prince of Songkla University (PSU). The fish samples were kindly provided by Boonrueang Plakat Farm in Nakhonpathom province of Thailand. Research facilities were supported by Kidchakan Supamattaya Aquatic Animal Health Research Center, Faculty of Natural Resources, PSU.

References

- Ahmadivand S, Eagderi S, Imanpour MR (2013) Effects of stocking density on hematological parameters, growth and survival rate of Caspian roach (*Rutilus rutilus caspicus*) larvae. *J Chem Biol Phys Sci* 3:1320–1326
- Ali MS, Stead SM, Houlihan DF (2006) Effects of socking density on ammonia excretion and the growth of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.). *Bangladesh J Fish Res* 10:13–24
- AOAC (2005) Official methods of analysis of AOAC international, 18th edn. Association of Official Analytical Chemists, Maryland
- APHA, AWWA, WPCF (1998) Standard methods for the examination of water and wastewater, 20th edn. American Public Health Association, American Water Works Association and Water Pollution Control Federation, Washington, DC
- Areekijseree M, Engkagul A, Kovitvadhi U, Thongpan A, Mingmuang M, Pakkong P, Rungruangsak-Torrissen K (2004) Temperature and pH characteristics of amylase and proteinase of adult freshwater pearl mussel, *Hyriopsis (Hyriopsis) bialatus* Simpson 1900. *Aquaculture* 234:575–587
- Blakeslee C, McRobert SP, Brown AC, Clotfelter ED (2009) The effect of body coloration and group size on social partner preferences in female fighting fish (*Betta splendens*). *Behav Proc* 80:157–161
- Bolasina S, Tagawa M, Yamashita Y, Tanaka M (2006) Effect of stocking density on growth, digestive enzyme activity and cortisol level in larvae and juveniles of Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture* 259:432–443
- Chaijan M, Jongjareonrak A, Phatcharat S, Benjakul S, Rawdkuen S (2010) Chemical compositions and characteristics of farm raised giant catfish (*Pangasianodon gigas*) muscle. *LWT-Food Sci Technol* 43:452–457
- Chakrabarti I, Gani MDA, Chaki KK, Sur R, Misra KK (1995) Digestive enzymes in 11 freshwater teleost fish species in relation to food habit and niche segregation. *Comp Biochem Physiol* 112A:167–177
- Clotfelter ED, Ardia DR, McGraw KJ (2007) Red fish, blue fish: trade-offs between pigmentation and immunity in *Betta splendens*. *Behav Ecol* 18:1139–1145

- Coughlin DJ, Shiels LP, Nuthakki S, Shuman JL (2016) Thermal acclimation to cold alters myosin content and contractile properties of rainbow smelt, *Osmerus mordax*, red muscle. *Comp Biochem Physiol* 196A:46–53
- Cretu M, Cristea V, Dediu L, Petrea SM (2014) The influence of different stocking densities on biochemical composition of rainbow trout meat reared in a recirculating aquaculture system. *Anim Sci Biotechnol* 47: 200–204
- Cristea V, Mocanu MC, Antache A, Docan A, Dediu L, Ion S, Coadă MT (2012) Effect of stocking density on leukocyte reaction of *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792). *Anim Sci Biotechnol* 45:31–36
- Çagiltay F, Erkan N, Ulusoy Ş, Selcuk A, Özden Ö (2015) Effects of stock density on texture-colour quality and chemical composition of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Iranian J Fish Sci* 14:687–698
- Froese R, Pauly D (2016) *Betta splendens* Regan 1910 Siamese fighting fish. <http://www.fishbase.org/summary/4768>. Accessed 10 March 2017
- Goede RW, Barton BA (1990) Organismic indices and autopsy-based assessment as indicators of health and condition of fish. *Am Fish Soc Symp* 8:93–108
- Halperin JRP, Dunham DW, Ye S (1992) Social isolation increases social display after priming in *Betta splendens* but decreases aggressive readiness. *Behav Proc* 28:13–32
- Hofer R, Schiemer F (1981) Proteolytic activity in the digestive tract of several species of fish with different feeding habits. *Oecologia* 48:342–345
- James R, Sampath K (2006) Effect of dietary administration of methyltestosterone on the growth and sex reversal of two ornamental fish species. *Indian J Fish* 53:283–290
- Jaroensutasinee M, Jaroensutasinee J (2001) Bubble nest habitat characteristics of wild Siamese fighting fish. *J Fish Biol* 58: 1311–1319
- Jha P, Barat S (2005) The effect of stocking density on growth, survival rate, and number of marketable fish produced of koi carps, *Cyprinus carpio* vr. *koi* in concrete tanks. *J Appl Aquac* 17:89–102
- Kanghae H, Thongprajukaew K, Jatupornpitukchat S, Kittiwattanawong K (2016) Optimal-rearing density for head-starting green turtles (*Chelonia mydas* Linnaeus, 1758). *Zoo Biol* 35:454–461
- Karakatsouli N, Papoutsoglou ES, Sotiropoulos N, Mourtikas D, Stigen-Martinsen T, Papoutsoglou SE (2010) Effects of light spectrum, rearing density and light intensity on growth performance of scaled and mirror common carp *Cyprinus carpio* reared under recirculating system conditions. *Aquac Eng* 42: 121–127
- Karino K, Someya C (2007) The influence of sex, line, and fight experience on aggressiveness of the Siamese fighting fish in intrasexual competition. *Behav Proc* 75:283–289
- Kelsh RN (2004) Genetics and evolution of pigment patterns in fish. *Pigment Cell Res* 17:326–336
- Lambert Y, Dutil J (2001) Food intake and growth of adult Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) reared under different conditions of stocking density, feeding frequency and size-grading. *Aquaculture* 192:233–247
- Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265–275
- Lui Q, Hou Z, Wen H, Li J, He F, Wang J, Guan B, Wang Q (2016) Effect of stocking density on water quality and (growth, body composition and plasma cortisol content) performance of pen-reared rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J Ocean Univ China* 15:667–675
- Mandal SC, Sahu NP, Kohli MPS, Das P, Gupta SK, Munilkumar S (2010) Replacement of live feed by formulated feed: effect on the growth and spawning performance of Siamese fighting fish (*Betta splendens*, Regan, 1910). *Aquac Res* 41: 1707–1716
- Metusalach J, Brown A, Shahidi F (1997) Effects of stocking density on colour characteristics and deposition of carotenoids in cultured Arctic charr (*Salvelinus alpinus*). *Food Chem* 59:107–114
- Monvises A, Nuangsaeng B, Sriwattanarothai N, Panijjipon B (2009) The Siamese fighting fish: well-known generally but little-known scientifically. *ScienceAsia* 35:8–16
- Niazie EHN, Imanpoor M, Taghizade V, Zadmajid G (2013) Effects of density stress on growth indices and survival rate of goldfish (*Carassius auratus*). *Global Veterinaria* 10:365–371
- Osofero SA, Otubusin SO, Daramola JA (2009) Effect of stocking density on tilapia (*Oreochromis niloticus* Linnaeus 1757) growth and survival in bamboo-net cages trial. *Afr J Biotechnol* 8:1322–1325
- Romijn JA, Godfried MH, Hommes MJT, Ender E, Sauerwein HP (1990) Decreased glucose oxidation during short-term starvation. *Metabolism* 39:525–530
- Rungruangsak K, Utne F (1981) Effect of different acidified wet feeds on protease activities in the digestive tract and on growth rate of rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson). *Aquaculture* 22:67–79
- Rungruangsak-Torrissen K (2007) Digestive efficiency, growth and qualities of muscle and oocyte in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) fed on diets with krill meal as an alternative protein source. *J Food Biochem* 31:509–540
- Rungruangsak-Torrissen K, Moss R, Andresen LH, Berg A, Waagbo R (2006) Different expressions of trypsin and chymotrypsin in relation to growth in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) *Fish Physiol Biochem* 32:7–23
- Rungruangsak-Torrissen K, Stien LH, Daae BS, Vågseth T, Thorsheim GB, Tobin D, Ritola O (2009) Different dietary levels of protein to lipid ratio affected digestive efficiency, skeletal growth, and muscle protein in rainbow trout families. *Scholarly Research Exchange* 2009:1–13. <https://doi.org/10.3814/2009/709529> Article ID 709529
- Sammouth S, D'Orbcastel ER, Gasset E, Breuil G, Marino G, Coeurdacier JL, Fivestad S, Blancheton JP (2009) The effect of density on sea bass (*Dicentrarchus labrax*) performance in a tank-based recirculating system. *Aquac Eng* 40:72–78
- Sanchez P, Ambrosio PP, Flos R (2010) Stocking density and sex influence individual growth of Senegalese sole (*Solea senegalensis*). *Aquaculture* 300:93–101
- Saoud IP, Ghanawi J, Lebbos N (2007) Effects of stocking density on the survival, growth, size variation and condition index of juvenile rabbitfish *Siganus rivulatus*. *Aquac Int* 16:109–116
- Shahidi F (1994) Seafood proteins and preparation of protein concentrates. In: Shahidi F, Botta JR (eds) *Seafood: chemistry, processing technology and quality*. Blackie Academic & Professional, London, pp 3–9

- Stickney RR (1994) Principles of aquaculture. John Wiley & Sons, New York
- Sunde J, Taranger GL, Rungruangsak-Torrissen K (2001) Digestive protease activities and free amino acids in white muscle as indicators for feed conversion efficiency and growth rate in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) Fish Physiol Biochem 25:335–345
- Supannapong P, Pimsalee T, A-komol T, Engkagul A, Kovitvadh U, Kovitvadh S, Rungruangsak-Torrissen K (2008) Digestive enzymes and *in vitro* digestibility of different species of phytoplankton for culture of the freshwater pearl mussel, *Hyriopsis (Hyriopsis) bialatus*. Aquac Int 16:437–453
- Takeuchi Y, Hori M, Myint M, Kohda M (2010) Lateral bias of agonistic responses to mirror images and morphological asymmetry in the Siamese fighting fish (*Betta splendens*). Behav Brain Res 208:106–111
- Thongprajukaew K, Kovitvadh S, Kovitvadh U, Rungruangsak-Torrissen K (2014) Pigment deposition and *in vitro* screening of natural pigment sources for enhancing pigmentation in male Siamese fighting fish (*Betta splendens* Regan, 1910). Aquac Res 45:709–719
- Thongprajukaew K, Kovitvadh U, Engkagul A, Rungruangsak-Torrissen K (2010a) Characterization and expression levels of protease enzymes at different developmental stages of Siamese fighting fish (*Betta splendens* Regan, 1910). Agric Nat Res 44:411–423
- Thongprajukaew K, Kovitvadh U, Engkagul A, Rungruangsak-Torrissen K (2010b) Temperature and pH characteristics of amylase and lipase at different developmental stages of Siamese fighting fish (*Betta splendens* Regan, 1910). Agric Nat Res 44:210–219
- Thongprajukaew K, Kovitvadh U, Kovitvadh S, Engkagul A, Rungruangsak-Torrissen K (2013) Evaluation of growth performance and nutritional quality of diets using digestive enzyme markers and *in vitro* digestibility in Siamese fighting fish (*Betta splendens* Regan, 1910). African J Biotechnol 12: 1689–1702
- Thongprajukaew K, Rodjaroen S, Yoonram K, Somthong P, Hutha N, Tantikitti C, Kovitvadh U (2015) Effects of dietary modified palm kernel meal on growth, feed utilization, radical scavenging activity, carcass composition and muscle quality in sex reversed Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Aquaculture 439:45–52
- Toko I, Fiogbe ED, Koukpode B, Kestemont P (2007) Rearing of African catfish (*Clarias gariepinus*) and vundu catfish (*Heterobranchus longifilis*) in traditional fish ponds (whedos): effect of stocking density on growth, production and body composition. Aquaculture 262:65–72
- Tolussi CE, Hilsdorf AWS, Caneppele D, Moreira RG (2010) The effects of stocking density in physiological parameters and growth of the endangered teleost species piabanha, *Brycon insignis* (Steindachner, 1877). Aquaculture 310:221–228
- Tyska MJ, Warsaw DM (2002) The myosin power stroke. Cell Motil Cyt 51:1–15
- Verbeek P, Iwamoto T, Murakami N (2007) Differences in aggression between wild-type and domesticated fighting fish are context dependent. Anim Behav 73:75–83
- Verbeek P, Iwamoto T, Murakami N (2008) Variable stress-responsiveness in wild type and domesticated fighting fish. Physiol Behav 93:83–88
- Winkler UK, Stuckmann M (1979) Glycogen, hyaluronate and some other polysaccharides greatly enhance the formation of exolipase by *Serratia marcescens*. J Bacteriol 138:663–670
- Xian L, Ying L, Blancheton JP (2013) Effect of stocking density on performances of juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*) in recirculating aquaculture systems. Chin J Oceanol Limnol 31:514–522
- Zeng W, Li Z, Ye S, Xie S, Liu J, Zhang T, Duan M (2010) Effects of stocking density on growth and skin color of juvenile darkbarbel catfish *Pelteobagrus vachelli* (Richardson). J Appl Ichthyol 26:925–929

ภาคผนวก ง

ต้นฉบับบทความวิจัยสำหรับตีพิมพ์ในวารสารระดับนานาชาติ

1 **Blue aquarium background improved the production quality of**
2 **male Siamese fighting fish (*Betta splendens* Regan, 1910)**

3

4 **Running title: Aquarium color for fighting fish**

5

6

7 **Suktianchai Saekhow^a, Karun Thongprajukaew^{b,*}, Wutiporn**

8 **Phromkunthong^a**

9

10

11

12 ^a *Department of Aquatic Science, Faculty of Natural Resources, Prince of Songkla University,*
13 *Songkhla 90112, Thailand*

14 ^b *Department of Applied Science, Faculty of Science, Prince of Songkla University,*
15 *Songkhla 90112, Thailand*

16

17

18

19

20

21 * Corresponding author. Tel.: +66 74879957; fax: +66 74446681.

22 *E-mail address:* karun.t@psu.ac.th (K. Thongprajukaew).

23 **Abstract**

24 Background color can improve the production quality of various fish species. In this
25 study, the effects of five aquarium backgrounds (transparent, white, red, blue and black) on
26 survival, growth, feed utilization, digestive enzyme activities, color coordinates, muscle
27 quality, and carcass composition were investigated in solid red male Siamese fighting fish
28 (*Betta splendens* Regan, 1910). The fish (1.13 ± 0.01 g initial body weight) were distributed
29 individually into glass aquaria varying in color backgrounds ($n = 15$) and were reared over
30 eight weeks duration. There was no mortality of the fish during the study period. The growth
31 performance and feed utilization (feeding rate, feed conversion ratio and protein efficiency
32 ratio) of the fish reared with blue background were superior relative to the other treatments,
33 followed by red background as next best. The fish in this treatment maintained activity of the
34 observed enzymes but had significantly increased ratio of amylase to trypsin, indicating
35 protein sparing effect, relative to the control with transparent background ($P < 0.05$). The
36 preferred treatment also maintained skin lightness, yellowness and redness. Protein synthesis
37 capacity (RNA and protein concentrations) and protein turnover rate (RNA/protein ratio), and
38 enthalpy of the main muscle proteins, myosin and actin, also benefited from this treatment.
39 Carcass lipid was improved with the preferred treatment but crude protein and ash were still
40 maintained comparable to the control treatment. Findings from the current study indicate that
41 the blue-based aquarium background is appropriate for rearing male Siamese fighting fish.

42

43 **Keywords:** Background color; Digestive enzyme; Growth; Feed utilization; Muscle quality

44

45

46

47 **1. Introduction**

48 The male Siamese fighting fish (*Betta splendens* Regan, 1910) is a highly commercial
49 ornamental fish around the world (Froese and Pauly, 2017), while the females are usually
50 sold en masse at very low prices. The fin shape and various desired coloring are the main
51 criteria for consumer satisfaction with the male fish. However, the phenotype with solid red
52 color that is long finned is preferred by the fish culturist, followed in rank by the solid blue
53 (Thongprajukaew et al., 2014). Since this fish becomes aggressive at 1.5 months after
54 hatching, individual rearing is always used until selling the fish (Thongprajukaew et al.,
55 2013).

56 Background color is one factor affecting the fish production, affecting suitability of
57 the rearing conditions. This parameter has significant effects on survival, growth
58 performance, feed utilization and carcass proximate composition of various fish species
59 (Papoutsoglou et al., 2000; McLean et al., 2008; Raghavan et al., 2013). Previous studies
60 indicate that the best color background depends on species and should be separately
61 determined for any species that will be produced (McLean et al., 2008; Maciel and Valenti,
62 2014). Since the background color may interact with light intensity, photoperiod and light
63 color, these environmental changes can cause stress in fish, using up available energy from
64 food digestion (Hochachka and Somero, 2002). Digestive enzymes play an important role in
65 transforming macronutrients into forms easily digested. Previous studies on the above light
66 parameters have reported changes in digestive enzyme activities, including protein-,
67 carbohydrate- and lipid-digesting enzymes (Shan et al., 2008; Wei and Zhao, 2014;
68 Ramzanzadeh et al., 2016). Assessing the feed utilization through digestive enzyme activities
69 is reasonable.

70 In addition, background color can influence the skin color of aquatic animals
71 (Papoutsoglou et al., 2000; Doolan et al., 2009; Qin et al., 2012). In Siamese fighting fish,

72 redness of the skin is controlled by carotenoids, and the female fish prefer red males over
73 blue males, suggesting a sexual-selection advantage from being red (Clotfelter et al., 2007).
74 Therefore, physiological induction by various backgrounds may alter the skin coloration in
75 captive fighting fish, impacting their commercial value.

76 Therefore, the aim of this study was to determine the effects of various aquarium
77 color backgrounds in individually reared male Siamese fighting fish. The production quality
78 of reared fish was assessed based on growth performance, feed utilization, digestive enzyme
79 activities, skin color, muscle quality, and carcass composition. The optimal color from the
80 current study might be used by fish culturists, as well as on developing systems for the
81 intensive rearing of this species.

82

83 **2. Materials and methods**

84 **2.1. Fish acclimatization and preparation**

85 One-month-old solid-red male Siamese fighting fish were collected from a local farm
86 in Nakhonpathom province of Thailand. They were individually acclimatized in transparent
87 cylindrical plastic beakers (7.5 cm diameter × 12.5 cm height) containing 150 mL water, for
88 two weeks. They were fed a commercial floating diet (10% moisture, 35% crude protein, 4%
89 crude fat, 5% crude fiber and 12% ash) for small ornamental fish twice daily (08.00 and
90 17.00 h) at 2% of body weight (BW). The acclimatization was conducted for two weeks with
91 the natural 12 h:12 h light/dark cycle.

92

93 **2.2. Fish rearing**

94 Each fifteen screened fish with similar size (1.13 ± 0.01 g initial body weight) were
95 distributed individually into glass aquaria (3.5 cm width × 8 cm length × 20 cm height)
96 varying in color backgrounds (transparent, white, red, blue and black). These individual fish

97 were designated as the experimental units. The feeding regimen and rearing conditions were
 98 as described above. The water content was 80% replaced by dechlorinated stock within three
 99 consecutive days, maintaining the standard ranges of pH (6.54 ± 0.07) and temperature
 100 ($28.90 \pm 0.13^\circ\text{C}$). Survival of the reared fish was recorded daily before beginning the first
 101 feeding. Uneaten excess diet was siphoned off 30 min after feeding, dried at 60°C until
 102 constant weight, and the determined weight was used to calculate the feeding rate (FR), feed
 103 conversion ratio (FCR), and protein efficiency ratio (PER). At the end of the experiment, all
 104 the fish were starved for 24 h and then were anaesthetized by clove oil. Measurement of BW
 105 and length of all the fish was performed. All these fish were used for subsequent analysis of
 106 digestive enzymes, muscle quality, color coordinates, and carcass composition. Survival,
 107 growth performance and feed utilization parameters were calculated as described below:

108
$$\text{Survival (\%)} = [\text{Final fish number}/\text{initial fish number}] \times 100$$

109
$$\text{Condition factor (CF, g cm}^{-3}\text{)} = [\text{Live body weight (g)}/\text{body length (cm)}^3] \times 100$$

110
$$\text{Specific growth rate (SGR, \% BW day}^{-1}\text{)} = [(\ln W_t - \ln W_0)/(\text{t} - \text{t}_0)] \times 100$$

111 where W_t = mean weight (g) at day t, W_0 = mean weight (g) at day t_0 .

112
$$\text{Viscerosomatic index (VSI, \%)} = [\text{Wet weight of visceral organ (g)}/\text{wet body}$$

 113
$$\text{weight (g)}] \times 100$$

114
$$\text{FR (\% BW day}^{-1}\text{)} = \text{C}/[(W_0 + W_t)/2]/\text{t} \times 100$$

115 where C = daily feed consumption (g), W_0 = initial body weight (g), W_t = final body weight
 116 (g), t = feeding duration (day)

117
$$\text{FCR (g feed g gain}^{-1}\text{)} = \text{Dry feed consumed (g)}/\text{wet weight gain (g)}$$

118
$$\text{PER (g gain g protein}^{-1}\text{)} = \text{Wet weight gain (g)}/\text{protein intake (g)}$$

119

120

121

122 **2.3. Determination of digestive enzyme activity**

123 *2.3.1. Digestive enzyme extraction and protein quantification*

124 The whole visceral organs of individual fish ($n = 5$ per treatment) were extracted in
125 0.2 M Na_2HPO_4 - NaH_2PO_4 buffer (pH 8) at a ratio of 1: 15 (w/v), using a micro-homogenizer
126 (THP-220; Omni International, Kennesaw GA, USA). The homogenates were centrifuged at
127 $15,000\times g$ for 30 min at 4°C and supernatants were collected, and kept at -20°C until use. The
128 protein concentration of a crude enzyme extract was determined according to the standard
129 method of Lowry et al. (1951), using bovine serum albumin as protein standard.

130

131 *2.3.2. Digestive enzyme assay*

132 The protocols for assaying activities of pepsin, trypsin, chymotrypsin, amylase and
133 lipase are summarized in Table 1. The optimal conditions for Siamese fighting fish were
134 chosen from Thongprajukaew et al. (2010a, b). Each measured product was compared against
135 the linear range of its standard curve. One unit (U) of enzyme is defined as the amount that
136 catalyzed the conversion of 1 μmol of substrate per minute. Specific activities of enzymes are
137 expressed as U (or mU) mg protein^{-1} . Ratio of amylase to trypsin (A/T ratio) was quantified
138 by dividing the specific activities from the same sample.

139

140 **2.4. Color measurement**

141 The unconscious fish ($n = 15$) were carefully cleaned by soft blotting paper and then
142 the color was measured from the middle parts of bodies. A MiniScan EZ (Hunter Associates
143 Laboratory, Reston VA, USA) was calibrated to white and black standards before measuring
144 the color parameters. The skin lightness (L^*), redness/greenness (a^*), yellowness/blueness
145 (b^*) and redness index (a^*/b^*) were measured and automatically recorded.

146

147 **2.5. Muscle quality**

148 *2.5.1. Protein synthesis capacity and its turnover rate*

149 Concentrations of RNA and protein from the frozen epaxial white muscle ($n = 5$)
150 were determined as described in Rungruangsak-Torrissen (2007). The extinction coefficients
151 for calculating RNA and protein were $E_{260} = 40 \mu\text{g RNA mL}^{-1}$ and $E_{280} = 2.1 \text{ mg protein}$
152 mL^{-1} , respectively. The concentration ratio (RNA/protein ratio) for each sample was
153 calculated from the amounts of RNA and protein.

154

155 *2.5.2. Enthalpy of myosin and actin*

156 Onset (T_o), denaturation peak (T_d), and conclusion (T_c) temperatures, and enthalpy
157 (ΔH) of myosin and actin, were determined using a differential scanning calorimeter (DSC7,
158 Perkin Elmer, Waltham, Massachusetts, USA). Ten milligrams of epaxial white muscle ($n =$
159 5) was placed in an aluminum pan, sealed, allowed to equilibrate at room temperature, and
160 then heated from 20 to 100°C at a rate of $10^\circ\text{C min}^{-1}$ against an empty pan. Peaks of myosin
161 and actin were identified from the reported thermal properties of fish muscle protein (Matos
162 et al., 2011; Thongprajukaew et al., 2015).

163

164 **2.6. Proximate chemical composition of carcass**

165 The moisture and crude ash of the whole body ($n = 5$) were determined according to
166 standard methods of AOAC (2005). Crude protein was determined as described in
167 Rungruangsak-Torrissen (2007). Crude lipid was determined by ethyl acetate extraction
168 according to Supannapong et al. (2008).

169

170

171

172 **2.7. Statistical analysis**

173 The five treatments, each with fifteen replicate fish, followed a completely
174 randomized design. The data were subjected to analysis in Statistical Package for Social
175 Science Version 14 (SPSS Inc., Chicago, USA) for all the statistical evaluations. The arc sine
176 transformation was applied to percentage values prior to analysis. The data are here expressed
177 as means, with the standard error of mean (SEM) expressing the variability. Comparisons of
178 means in the statistical analyses were carried out using Duncan's multiple range test at $\alpha =$
179 0.05 significance level ($P < 0.05$).

180

181 **3. Results**

182 **3.1. Survival, growth performance and feed utilization**

183 No mortality of reared fish occurred within the 2 months study period (Table 2). Fish
184 reared with black background had inferior growth performance and feed utilization relative to
185 the other treatments. Superior characteristics, namely higher growth, lower feed consumption
186 (FR and FCR) and higher PER, were observed in the fish reared with the blue background,
187 followed by the red background as second best. Transparent background was the third in
188 order with FR values significantly lower than with white background ($P < 0.05$). The highest
189 values of VSI and CF were found in fish reared with white background, and with blue or
190 black background, respectively.

191

192 **3.2. Specific activities of digestive enzymes**

193 The aquarium background had significant effects on the specific activities of digestive
194 enzymes, except for chymotrypsin (Table 3). Pepsin specific activity was higher in fish
195 reared with black background than with red background; the other three treatments were
196 intermediate. The fish reared with white background exhibited superior trypsin specific

197 activity. Lipase specific activity was highest in the fish reared with white background. The
198 fish reared with white or black background were higher in amylase specific activity than with
199 the control treatment (transparent), but not so with red or blue background. Regarding the
200 A/T ratio, it was significantly increased only in the fish reared with blue background, relative
201 to the control.

202

203 **3.3. Color parameters**

204 a^* -values of the fish skin did not differ between the five treatments (Table 4). Fish
205 reared with blue or white background were superior in three of the color parameters (L^* , b^*
206 and a^*/b^*). Significantly decreased b^* and a^*/b^* were observed in the fish reared with
207 transparent or red background, respectively. Inferior traits (decreased L^* and b^*) were
208 exhibited by the fish reared with black background.

209

210 **3.4. Muscle quality**

211 *3.4.1. Protein synthesis capacity and its turnover rate*

212 The lowest RNA concentrations were achieved with black background (Table 5). This
213 trend was opposite to that observed for the protein concentration. RNA/protein ratio was
214 similar in the fish reared with transparent, white, red or blue background, but lower with the
215 black background.

216

217 *3.4.2. Enthalpy of myosin and actin*

218 The amounts of native myosin and actin were similar across the five treatments (Table
219 5). The myosin/actin ratio was highest with the blue treatment, followed by white, transparent,
220 black and red treatments in this order.

221

222 3.5. Carcass composition

223 Varying the color background did not affect crude ash (Table 6). Decreased moisture
224 content was observed in the fish reared with blue and black backgrounds relative to control
225 (transparent) treatment; the other treatments were intermediate. There were significant
226 differences in crude protein between most actual treatments and the control. Crude lipid was
227 the highest in fish reared with blue background, followed by red, while the other treatments
228 did not significantly differ from the control.

229

230 4. Discussion

231 The response to background color may be species specific, and the effects of
232 background color on growth performance and feed utilization of fish are varied
233 (Papoutsoglou et al., 2000; Karakatsouli et al., 2007; McLean et al., 2008). In the present
234 study, growth performance and feed utilization of solid red fighting fish were superior when
235 reared with the blue backgrounds while the black background had negative impact relative to
236 control (transparent). Similar findings were reported for the white sea bream (*Diplodus*
237 *sargus*) when reared with blue tank color (Karakatsouli et al., 2007) as well as for scaled
238 carp, *Cyprinus carpio* (Papoutsoglou et al., 2000) or Eurasian perch, *Perca fluviatilis*
239 (Tamazouzt et al., 2000) when reared with black color. The SGR of fighting fish in this
240 investigation (0.69–0.97% BW day⁻¹) was within the range reported by James and Sampath
241 (2006). The CF and VSI can relate to body energy storage and to viscerosomatic mass growth
242 (Goede and Barton, 1990). Increases in these parameters in the fish reared with black and
243 white backgrounds, respectively, might be due to viscerosomatic energy storage (Lui et al.,
244 2016), changing the visceral mass and body morphometrics.

245 In the current study, the highest FR in fish reared with the white aquarium might be
246 the strong color contrast with floating feed (mixed red, green and black pellets), improving

247 food detection and consumption. Improved feed consumption due to sharp contrast between
248 feed and background has been reported by a number of authors (Dowing and Litvak, 1999;
249 Papoutsoglou et al., 2000; El-Sayed and El-Ghobashy, 2011). In contrast, fish reared in the
250 red, green or black tanks and fed by the same feeds were inferior in FR; a third of the feed
251 was the same color as the tank. In some larval fish, rearing in a black walled tank and feeding
252 by live diet (rotifers and *Artemia* nauplii) can improve the food perception (Hinshaw, 1986;
253 Martin-Robichaud and Peterson, 1998). Differences in the above results might be due to the
254 colors of water column, tank wall or feed. However, lower FR with the preferred treatment
255 (blue background), as well as with red, was not negative, as there was also superior feed
256 utilization in terms of FCR and PER. The results indicate that rearing fighting fish with blue
257 backgrounds improved productivity and lowered feed consumption, improving economic
258 viability. Sufficient nutrition can reduce the feed intake per weight gain as reported by
259 Wattanakul et al. (2017).

260 The effects of color backgrounds on digestive enzyme activities are poorly known.
261 Increased FR with high specific activity of digestive enzymes in the fish reared with the
262 white background, suggest high capacity of the fish to digest excess food. This might be due
263 to the white wall reflecting more light and attracting phototaxis, which may have increased
264 competition for food and space, and consequently energy expenditure (Hayd et al., 2010).
265 Therefore, high FR may not indicate good rearing conditions in the current study, similar to
266 the observations on Amazon river prawn (*Macrobrachium amazonicum*) reported by Maciel
267 and Valenti (2014). Low activity of enzymes might be due to energy saving, since nutritional
268 requirements are satisfied. Regarding the A/T ratio, this marker is linked to fish feeding
269 habits (Hofer and Schiemer, 1981; Thongprajukaew et al., 2011). Different trends in the fish
270 reared with blue background, relative to the other enzymes, indicates high capacity to utilize

271 carbohydrates per amount of protein. Increased proportion of carbohydrates in the artificial
272 feed of this carnivorous fish is possible when reared with blue background.

273 The color backgrounds could lead to darkening or paling of fish skin by either
274 dispersion or concentration of pigments in the dermal melanophores (Szisch et al., 2002;
275 Rotllant et al., 2003). Fighting fish females prefer to associate with the vermilion males over
276 those that are pale red (Blakeslee et al., 2009), suggesting sexual selection advantage from
277 body color. In addition, skin color influences the acceptability and commercial value of this
278 fish by consumers, especially in males. Based on the four measured color parameters, white
279 and blue backgrounds are suitable since they maintained lightness and redness of the skin (a^*
280 and a^*/b^*) similar to the control fish, while the red and black backgrounds had negative
281 effects. No improvement of skin coloration was achieved in the current study, probably
282 because the fish reared with transparent background are constitutively aggressive, enhancing
283 physiological response of the chromatophores; thus causing high level of skin coloration in
284 the baseline treatment. Diminishing lightness when reared with black background might be
285 due to the dispersion of pigments in the dermal melanophores of the skin, caused by secretion
286 of α -melanocyte-stimulating hormone (Baker et al., 1984; Szisch et al., 2002; Rotllant et al.,
287 2003). Decreasing a^*/b^* value of skin in solid red male fish when reared with red
288 background might have improved the distinction of fish from its surrounding environment.
289 The responses of various fish species to color backgrounds are species specific.

290 The concentration of RNA per cell reflects the rate of growth in herring (*Clupea*
291 *harengus*) larvae (Mathers et al., 1994). Maintained protein synthesis (RNA concentration) and
292 its turnover rate (RNA/protein ratio) in fish reared with white, red and blue backgrounds in
293 the current study indicate the growth phase of Siamese fighting fish. Significantly increased
294 protein in the fish reared with black background indicated unsuitable alternative, and all the
295 growth performances measures and protein synthesis capacity were inferior. The amount of

296 proteins left in their native state is reflected in ΔH (Matos et al., 2011). The enthalpic
297 response of myosin and actin in the current study indicated no significant effects by the color
298 backgrounds on amounts of myosin and actin, which relate to the physiological exercise by
299 the fish (Thongprajukaew et al., 2015). Coughlin et al. (2016) reported the effects of rearing
300 conditions on myosin heavy chain expression, causing changes in swimming performance
301 and muscle contractile properties. In addition, intense exercise can promote partial
302 denaturation of muscle myosin, leading to lower ΔH actin/myosin ratio (Matos et al., 2011).
303 Therefore, the elevated ΔH actin/myosin ratio with the blue background treatment suggests
304 the color backgrounds decreased partial denaturation of myosin. The effects on exercise and
305 stress response should be further investigated for improving the welfare of this reared fish.

306 Varying trends in carcass composition caused by tank color background have been
307 previously reported in various fish species. No significant differences in composition were
308 observed in scaled carp (*Cyprinus carpio*) reared in black, white or green tanks
309 (Papoutsoglou et al., 2000); or in beluga (*Huso huso*) reared in black, white, green, red or
310 blue tanks (Banan et al., 2011); nor in thinlip mullet (*Liza ramada*) reared in black, white,
311 green, red, yellow or blue tanks (El-Sayed and El-Ghobashy, 2011). In the current study,
312 some improvements in lipid deposition were observed with the preferred treatment, while the
313 amount of moisture was inversely affected, when compared to the other treatments. This
314 finding is in agreement with the observations in Caspian Kutum (*Rutilus frisii*) when reared in
315 yellow tank, compared to black, white, red, yellow or blue tanks (Imanpoor and Abdollahi,
316 2011). Higher amount of lipid in fish reared with blue background might be caused by
317 decreased swimming activity, reducing energy usage from lipid catabolism (Karakatsouli et
318 al., 2010). Differences in energy allocation caused by the color background should be of
319 interest, although with species specific details.

320

321 **5. Conclusions**

322 Based on our investigations of five alternative color backgrounds (transparent, white,
323 red, blue and black), the solid red male Siamese fighting fish had generally superior growth
324 performance, feed utilization, and muscle quality, without negative effects on carcass
325 composition and skin coloration, when reared with blue background. This preferred treatment
326 exhibited protein sparing effect, as indicated by the activity ratio of amylase to trypsin. This
327 background color should be applied since the solid red male fish begins aggressive behavior
328 at 1.5 months of age, and continues it until the fish are sold at approximately 4 months of age.
329 Optimization of the other lighting factors, i.e., photoperiod, light spectral characteristics, light
330 position and light intensity (or their combined effects), is necessary for the optimal design of
331 an intensive aquaculture system for this species. In addition, since Siamese fighting fish have
332 varied body colors and these fish are significantly responsive to color backgrounds, specific
333 backgrounds should be further investigated for the other color phenotypes, or to determine
334 colors overall suited across the fighting fish.

335

336 **Acknowledgements**

337 Funding was provided by the budget revenue (Contract No. SCI590420S) of the
338 Prince of Songkla University (PSU). We acknowledge Assoc. Prof. Dr. Seppo Karrila and the
339 Publication Clinic, Research and Development Office, PSU, for advice in manuscript
340 preparation.

341

342 **References**

343 AOAC, 2005. Official Methods of Analysis of AOAC International, 18th ed. Association of
344 Official Analytical Chemists, Maryland.

- 345 Areekijserree, M., Engkagul, A., Kovitvadhi, U., Thongpan, A., Mingmuang, M., Pakkong, P.,
346 Rungruangsak-Torrissen, K., 2004. Temperature and pH characteristics of amylase and
347 proteinase of adult freshwater pearl mussel, *Hyriopsis (Hyriopsis) bialatus* Simpson
348 1900. *Aquaculture* 234, 575–587.
- 349 Baker, B.I., Wilson, J.F., Bowley, T.J., 1984. Changes in pituitary and plasma levels of MSH
350 in teleosts during physiological colour change. *Gen. Comp. Endocrinol.* 55, 142–149.
- 351 Banan, A., Kalbassi, M.R., Bahmani, M., Sadati, M.A.Y., 2011. Effects of colored light and
352 tank color on growth indices and some physiological parameters of juvenile beluga
353 (*Huso huso*). *J. Appl. Ichthyol.* 27, 565–570.
- 354 Blakeslee, C., McRobert, S.P., Brown, A.C., Clotfelter, E.D., 2009. The effect of body
355 coloration and group size on social partner preferences in female fighting fish (*Betta*
356 *splendens*). *Behav. Proc.* 80, 157–161.
- 357 Clotfelter, E.D., Ardia, D.R., Mcgraw, K.J., 2007. Red fish, Blue fish: trade-offs between
358 pigmentation and immunity in *Betta splendens*. *Behav. Ecol.* 18, 1139–1145.
- 359 Coughlin, D.J., Shiels, L.P., Nuthakki, S., Shuman, J.L., 2016. Thermal acclimation to cold
360 alters myosin content and contractile properties of rainbow smelt, *Osmerus mordax*, red
361 muscle. *Comp. Biochem. Physiol.* 196A, 46–53.
- 362 Doolan, B.J., Booth, M.A., Allan, G.L., Jones, P.L., 2009. Changes in skin colour and
363 cortisol response of Australian snapper *Pagrus auratus* (Bloch & Schneider, 1801) to
364 different background colours. *Aquac. Res.* 40, 542–550.
- 365 Downing, G., Litvak, M.K., 1999. The influence of light intensity on growth of larval
366 haddock. *North Amer. J. Aquac.* 61, 135–140.
- 367 El-Sayed, A.F.M., El-Ghobashy, A.E., 2011. Effects of tank colour and feed colour on
368 growth and feed utilization of thinlip mullet (*Liza ramada*) larvae. *Aquac. Res.* 42,
369 1163–1169.

- 370 Froese, R., Pauly, D., 2017. *Betta splendens* Regan, 1910 Siamese fighting fish.
371 <http://www.fishbase.org/summary/4768> (accessed 10 March 2017).
- 372 Goede, R.W., Barton, B.A., 1990. Organismic indices and an autopsy-based assessment as
373 indicators of health and condition of fish. Amer. Fish. Soc. Symp. 8, 93–108.
- 374 Hayd, L.A., Lemos, D., Valenti, W.C., 2010. Ontogenetic variation in ammonia excretion
375 during the early life stages of the Amazon river prawn, *Macrobrachium amazonicum*.
376 J. World Aquac. Soc. 41, 107–115.
- 377 Hinshaw, M., 1986. Factors affecting survival and growth of larval and early juvenile perch
378 *Perca flaesccens* Mitchill.. Ph.D. thesis, 80 pp. North Carolina State University, USA.
- 379 Hochachka, P.W., Somero, G.N., 2002. Biochemical adaptation: mechanism and process in
380 physiological evolution. Oxford University Press, New York.
- 381 Hofer, R., Schiemer, F., 1981. Proteolytic activity in the digestive tract of several species of
382 fish with different feeding habits. Oecologia 48, 342–345.
- 383 Imanpoor, M.R., Abdollahi, M., 2011. Effects of tank color on growth, stress response and
384 skin color of juvenile Caspian Kutum *Rutilus frisii* Kutum. Global Veterinaria 6, 118–
385 125.
- 386 James, R., Sampath, K., 2006. Effect of dietary administration of methyltestosterone on the
387 growth and sex reversal of two ornamental fish species. Indian J. Fish. 53, 283–290.
- 388 Karakatsouli, N., Papoutsoglou, S.E., Manolessos, G., 2007. Combined effects of rearing
389 density and tank colour on the growth and welfare of juvenile white sea bream
390 *Diplodus sargus* L. in a recirculating water system. Aquac. Res. 38,
391 1152–1160.
- 392 Karakatsouli, N., Papoutsoglou, S.E., Sotiropoulos, N., Stigen-Martinsen, T.D.N., Sofronios
393 E., Papoutsoglou, E.S., 2010. Effects of light spectrum, rearing density and light

- 394 intensity on growth performance of scaled and mirror common carp *Cyprinus carpio*
395 reared under recirculating system conditions. *Aquac. Eng.* 42, 121–127.
- 396 Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with
397 Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265–275.
- 398 Lui, Q., Hou, Z., Wen, H., Li, J., He, F., Wang, J., Guan, B., Wang, Q., 2016. Effect of
399 stocking density on water quality and (growth, body composition and plasma cortisol
400 content) performance of pen-reared rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J. Ocean*
401 *Univ. China* 15, 667–675.
- 402 Maciel, C.R., Valenti, W.C., 2014. Effect of tank colour on larval performance of the
403 Amazon river prawn *Macrobrachium amazonicum*. *Aquac. Res.* 45, 1041–1050.
- 404 Martin-Robichaud, D.J., Peterson, R.H., 1998. Effects of light intensity, tank colour and
405 photoperiod on swimbladder inflation success in larval striped bass, *Morone saxatilis*
406 (Walbaum). *Aquac. Res.* 29, 539–547.
- 407 Mathers, E.M., Houlihan, D.F., Burren, L.J., 1994. DNA and protein concentrations in fed
408 and starved herring *Clupea harengus* larvae. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 107, 223–231.
- 409 Matos, E., Silva, T.S., Tiago, T., Aureliano, M., Dinis M.T., Dias, J., 2011. Effect of
410 harvesting stress and storage conditions on protein degradation in fillets of farmed
411 gilthead seabream (*Sparus aurata*): A differential scanning calorimetry study. *Food*
412 *Chem.* 126, 270–276.
- 413 McLean, E., Cotter, P., Thain, C., King, N., 2008. Tank color impacts performance of cultured
414 fish. *Croatian J. Fish.* 66, 43–54.
- 415 Papoutsoglou, S.E., Mylonakis, G., Miliou, H., Karakatsouli, N.P., Chadio, S., 2000. Effects
416 of background color on growth performances and physiological responses of
417 scaled carp (*Cyprinus carpio* L.) reared in a closed circulated system. *Aquac.*
418 *Eng.* 22, 309–318.

- 419 Qin, G., Lin, Q., Gu, N., Lin, J., Huang, L., 2012. Effect of broodstock origin, background
420 and substrate color on skin coloration of three-spotted seahorses *Hippocampus*
421 *trimaculatus* Leach, 1814. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 416–417, 129–134.
- 422 Raghavan, P.R., Xiao-ming, Z., Wu, L., Dong, H., Yun-xia, Y., Shou-qi, X., 2013. Rearing
423 tank color influences survival and growth of the early larvae of the yellow catfish,
424 *Pelteobagrus fulvidraco*, Richardson. Acta Hydrobiologica Sinica 37, 177–184.
- 425 Ramzanzadeh, F., Yeganeh, S., JaniKhalili, K., Babaei, S.S., 2016. Effects of different
426 photoperiods on digestive enzyme activities in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)
427 alevin and fry. Canadian J. Zool. 94, 435–442.
- 428 Rotllant, J., Tort, L., Montero, D., Pavlidis, M., Martinez, M., Wendelaar Bonga, S.E.,
429 Balme, P.H.M., 2003. Background colour influence on the stress response in cultured
430 red porgy *Pagrus pagrus*. Aquaculture 223, 129–139.
- 431 Rungruangsak, K., Utne, F., 1981. Effect of different acidified wet feeds on protease
432 activities in the digestive tract and on growth rate of rainbow trout (*Salmo gairdneri*
433 Richardson). Aquaculture 22, 67–79.
- 434 Rungruangsak-Torrissen, K., 2007. Digestive efficiency, growth and qualities of muscle and
435 oocyte in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) fed on diets with krill meal as an alternative
436 protein source. J. Food Biochem. 31, 509–540.
- 437 Rungruangsak-Torrissen, K., Moss, R., Andresen, L.H., Berg, A., Waagbo, R., 2006.
438 Different expressions of trypsin and chymotrypsin in relation to growth in Atlantic
439 salmon (*Salmo salar* L.). Fish Physiol. Biochem. 32, 7–23.
- 440 Shan, X.J., Xiao, Z.Z., Huang, W., Dou, S.Z., 2008. Effects of photoperiod on growth,
441 mortality and digestive enzymes in miiuy croaker larvae and juveniles. Aquaculture
442 281, 70–76.

- 443 Supannapong, P., Pimsalee, T., A-komol, T., Engkagul, A., Kovitvadhi, U., Kovitvadhi, S.,
444 Rungruangsak-Torrissen, K., 2008. Digestive enzymes and *in vitro* digestibility of
445 different species of phytoplankton for culture of the freshwater pearl mussel,
446 *Hyriopsis (Hyriopsis) bialatus*. Aquac. Int. 16, 437–453.
- 447 Szisch, V., Van der Salm, A.L., Wendelaar Bonga, S.E., Pavlidis, M., 2002. Physiological
448 colour changes in the red porgy, *Pagrus pagrus*, following adaptation to blue lighting
449 spectrum. Fish Physiol. Biochem. 27, 1–8.
- 450 Tamazouzt, L., Chatain, B., Fontaine, P., 2000. Tank wall colour and light level affect growth
451 and survival of Eurasian perch larvae (*Perca fluviatilis* L.). Aquaculture 182, 85–90.
- 452 Thongprajukaew, K., Kovitvadhi, S., Kovitvadhi, U., Rungruangsak-Torrissen, K., 2014.
453 Pigment deposition and *in vitro* screening of natural pigment sources for enhancing
454 pigmentation in male Siamese fighting fish (*Betta splendens* Regan, 1910). Aquac.
455 Res. 45, 709–719.
- 456 Thongprajukaew, K., Kovitvadhi, U., Engkagul, A., Rungruangsak-Torrissen, K., 2010a.
457 Characterization and expression levels of protease enzymes at different
458 developmental stages of Siamese fighting fish (*Betta splendens* Regan, 1910). Agric.
459 Nat. Res. 44, 411–423.
- 460 Thongprajukaew, K., Kovitvadhi, U., Engkagul, A., Rungruangsak-Torrissen, K., 2010b.
461 Temperature and pH characteristics of amylase and lipase at different developmental
462 stages of Siamese fighting fish (*Betta splendens* Regan, 1910). Agric. Nat. Res. 44,
463 210–219.
- 464 Thongprajukaew, K., Kovitvadhi, U., Kovitvadhi, S., Engkagul, A., Rungruangsak-Torrissen,
465 K., 2013. Evaluation of growth performance and nutritional quality of diets using
466 digestive enzyme markers and *in vitro* digestibility in Siamese fighting fish (*Betta*
467 *splendens* Regan, 1910). African J. Biotechnol. 12, 1689–1702.

- 468 Thongprajukaew, K., Kovitvadhi, U., Kovitvadhi, S., Somsueb, P., Rungruangsak-Torrissen,
469 K., 2011. Effects of different modified diets on growth, digestive enzyme activities
470 and muscle compositions in juvenile Siamese fighting fish (*Betta splendens* Regan,
471 1910). *Aquaculture* 322–323, 1–9.
- 472 Thongprajukaew, K., Rodjaroen, S., Yoonram, K., Sornthong, P., Hutcha, N., Tantikitti, C.,
473 Kovitvadhi, U., 2015. Effects of dietary modified palm kernel meal on growth, feed
474 utilization, radical scavenging activity, carcass composition and muscle quality in sex
475 reversed Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture* 439, 45–52.
- 476 Wattanakul, W., Thongprajukaew, K., Songnui, A., Satjarak, J., Kanghae, H., 2017. Pre-
477 soaking feed pellet significantly improved feed utilization in Asian seabass (*Lates
478 calcarifer*). *Aquaculture* 471, 106–112.
- 479 Wei, Z.Z., Zhao, W., 2014. Effect of light intensity on the growth and digestive enzyme
480 activity of juvenile sea cucumber *Apostichopus japonicas* under two kinds of culture
481 methods. *Chinese J. Appl. Ecol.* 25, 237–242 (in Chinese with English abstract).
- 482 Winkler, U.K., Stuckmann, M., 1979. Glycogen, hyaluronate and some other polysaccharides
483 greatly enhance the formation of exolipase by *Serratia marcescens*. *J. Bacteriol.* 138,
484 663–670.
- 485

Table 1 Protocols used for determination of digestive enzyme specific activity.

Digestive enzyme	Optimal conditions*	Substrate	Observed product	References
Pepsin	pH 2 at 40°C	Casein	<i>L</i> -Tyrosine (A_{720})	Rungruangsak and Utne (1981)
Trypsin	pH 8 at 50°C	BAPNA	<i>p</i> -Nitroanilide (A_{410})	Rungruangsak-Torrissen et al. (2006)
Chymotrypsin	pH 8 at 50°C	SAPNA	<i>p</i> -Nitroanilide (A_{410})	Rungruangsak-Torrissen et al. (2006)
Lipase	pH 8 at 40°C	<i>p</i> -Nitrophenyl palmitate	<i>p</i> -Nitrophenol (A_{410})	Winkler and Stuckmann (1979)
Amylase	pH 8 at 50°C	Starch soluble	Maltose (A_{540})	Areekijsee et al. (2004)

* The optimal conditions were chosen from previous reports on characteristics of the main digestive enzymes in Siamese fighting fish, as observed by Thongprajukaew et al. (2010a, b).

BAPNA, benzoyl-*L*-Arg-*p*-nitroanilide; SAPNA, *N*-succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-*p*-nitroanilide.

Table 2 Survival, growth performance and feed utilization of male Siamese fighting fish individually reared with various color backgrounds. The observed parameters were recorded at the end of the two-month experiment.

Parameter	Background color				
	Transparent	White	Red	Blue	Black
Survival (%)	100	100	100	100	100
Final body weight (g)	1.89 ± 0.06 ^{ab}	1.92 ± 0.05 ^{ab}	1.96 ± 0.05 ^a	2.06 ± 0.06 ^a	1.77 ± 0.06 ^b
Standard length (cm)	4.03 ± 0.07 ^a	4.03 ± 0.04 ^a	4.00 ± 0.04 ^a	4.02 ± 0.04 ^a	3.54 ± 0.08 ^b
Total length (cm)	6.64 ± 0.13	6.68 ± 0.11	6.53 ± 0.15	6.44 ± 0.15	6.30 ± 0.11
VSI (%)	6.37 ± 0.28 ^b	9.82 ± 0.24 ^a	6.87 ± 0.33 ^b	7.30 ± 0.28 ^b	7.76 ± 0.62 ^b
CF (g cm ⁻³)	0.50 ± 0.03 ^b	0.54 ± 0.02 ^b	0.58 ± 0.03 ^b	0.71 ± 0.03 ^a	0.69 ± 0.03 ^a
SGR (% BW day ⁻¹)	0.88 ± 0.05 ^a	0.88 ± 0.05 ^a	0.86 ± 0.05 ^a	0.97 ± 0.04 ^a	0.69 ± 0.03 ^b
FR (% BW day ⁻¹)	1.58 ± 0.02 ^b	1.85 ± 0.08 ^a	1.49 ± 0.02 ^{bc}	1.42 ± 0.02 ^c	1.46 ± 0.03 ^c
FCR (mg feed mg gain ⁻¹)	1.87 ± 0.11 ^b	1.83 ± 0.04 ^b	1.50 ± 0.06 ^c	1.60 ± 0.06 ^{bc}	2.67 ± 0.16 ^a
PER (mg gain mg protein ⁻¹)	1.37 ± 0.11 ^b	1.39 ± 0.10 ^b	1.71 ± 0.12 ^a	1.83 ± 0.07 ^a	1.11 ± 0.07 ^b

VSI, viscerosomatic index; CF, condition factor; SGR, specific growth rate; BW, body weight; FR, feeding rate; FCR, feed conversion ratio, PER, protein efficiency ratio.

Data are expressed as mean ± SEM ($n = 15$).

Differences between means were tested with Duncan's multiple range test.

Different superscripts in the same row indicate a significant difference ($P < 0.05$).

Table 3 Specific activity of digestive enzymes in male Siamese fighting fish individually reared with various color backgrounds. The observed parameters were recorded at the end of the two-month experiment.

Digestive enzyme	Background color				
	Transparent	White	Red	Blue	Black
Pepsin (U mg protein ⁻¹)	13.85 ± 0.45 ^{ab}	11.31 ± 1.17 ^{ab}	8.69 ± 2.58 ^b	14.28 ± 1.14 ^{ab}	16.19 ± 2.43 ^a
Trypsin (U mg protein ⁻¹)	15.57 ± 1.78 ^{ab}	17.00 ± 0.70 ^a	12.67 ± 0.94 ^b	12.68 ± 1.36 ^b	12.86 ± 1.18 ^b
Chymotrypsin (U mg protein ⁻¹)	30.20 ± 0.40	31.20 ± 2.60	32.65 ± 1.24	28.52 ± 2.54	32.54 ± 2.85
Lipase (U mg protein ⁻¹)	1.45 ± 0.07 ^b	2.27 ± 0.12 ^a	1.67 ± 0.06 ^b	1.77 ± 0.12 ^b	1.51 ± 0.08 ^b
Amylase (mU mg protein ⁻¹)	1.78 ± 0.08 ^c	3.03 ± 0.11 ^a	2.12 ± 0.57 ^{bc}	2.06 ± 0.04 ^{bc}	2.39 ± 0.15 ^b
A/T ratio (× 10 ⁻⁴)	0.13 ± 0.01 ^b	0.16 ± 0.01 ^{ab}	0.14 ± 0.01 ^b	0.19 ± 0.04 ^a	0.16 ± 0.01 ^{ab}

A/T ratio, amylase/trypsin ratio.

Data are expressed as mean ± SEM ($n = 5$).

Differences between means were tested with Duncan's multiple range test.

Different superscripts in the same row indicate a significant difference ($P < 0.05$).

Table 4 Color parameters of skin of male Siamese fighting fish individually reared with various color backgrounds. The observed parameters were recorded at the end of the two-month experiment.

Color parameter	Background color				
	Transparent	White	Red	Blue	Black
L^*	23.17 ± 0.60^{ab}	23.66 ± 0.64^{ab}	22.88 ± 0.67^a	24.38 ± 0.39^{ab}	24.83 ± 0.43^b
a^*	11.79 ± 0.51	11.69 ± 0.33	11.98 ± 0.33	12.25 ± 0.36	11.91 ± 0.44
b^*	5.68 ± 0.52^b	7.06 ± 0.52^a	6.02 ± 0.31^{ab}	6.03 ± 0.23^{ab}	5.83 ± 0.19^b
a^*/b^*	1.88 ± 0.06^{ab}	1.88 ± 0.10^{ab}	1.74 ± 0.07^b	2.11 ± 0.07^a	1.97 ± 0.06^{ab}

Data are expressed as mean \pm SEM ($n = 15$).

Differences between means were tested with Duncan's multiple range test.

Different superscripts in the same row indicate a significant difference ($P < 0.05$).

Table 5 Protein synthesis capacity and myosin and actin in white muscles of male Siamese fighting fish individually reared with various color backgrounds. The observed parameters were recorded at the end of the two-month experiment.

Parameter	Background color				
	Transparent	White	Red	Blue	Black
RNA ($\mu\text{g g}^{-1}$)	$1,387 \pm 119^a$	$1,504 \pm 99^a$	$1,302 \pm 161^a$	$1,432 \pm 83^a$	861 ± 75^b
Protein (mg g^{-1})	260.12 ± 22.67^b	281.31 ± 12.57^b	298.57 ± 24.78^b	280.91 ± 19.14^b	385.60 ± 32.01^a
RNA/protein ratio ($\mu\text{g mg}^{-1}$)	4.89 ± 0.49^a	5.31 ± 0.40^a	4.99 ± 0.24^a	4.12 ± 0.60^{ab}	2.31 ± 0.27^b
Δ Myosin (J g^{-1})	0.44 ± 0.01	0.39 ± 0.04	0.53 ± 0.02	0.37 ± 0.05	0.40 ± 0.11
Δ Actin (J g^{-1})	0.35 ± 0.02	0.33 ± 0.03	0.34 ± 0.01	0.34 ± 0.02	0.38 ± 0.03
Δ Actin/Myosin	0.81 ± 0.06^{bc}	0.89 ± 0.01^b	0.67 ± 0.06^c	1.13 ± 0.01^a	0.74 ± 0.07^{bc}

Data are expressed as mean \pm SEM ($n = 5$).

Differences between means were tested with Duncan's multiple range test.

Different superscripts in the same row indicate a significant difference ($P < 0.05$).

Table 6 The chemical composition of carcass of male Siamese fighting fish individually reared with various color backgrounds. The observed parameters were recorded at the end of the two-month experiment.

Chemical component	Background color				
	Transparent	White	Red	Blue	Black
Moisture (% FW)	73.05 ± 0.57 ^a	71.98 ± 0.95 ^{ab}	72.05 ± 0.63 ^{ab}	70.43 ± 0.82 ^b	72.85 ± 0.47 ^b
Crude protein (% FW)	16.26 ± 0.33 ^{ab}	17.08 ± 0.34 ^a	16.88 ± 0.15 ^a	16.71 ± 0.46 ^{ab}	15.72 ± 0.27 ^b
Crude lipid (% FW)	2.99 ± 0.33 ^c	3.47 ± 0.32 ^{bc}	4.45 ± 0.29 ^b	5.77 ± 0.24 ^a	3.92 ± 0.48 ^{bc}
Crude ash (% FW)	5.07 ± 0.27	5.22 ± 0.14	5.13 ± 0.12	4.92 ± 0.42	5.26 ± 0.15

FW, fresh weight.

Data are expressed as mean ± SEM ($n = 5$).

Differences between means were tested with Duncan's multiple range test.

Different superscripts in the same row indicate a significant difference ($P < 0.05$).