

Effect of the inclusion of *Azolla filiculoides* meal on the growth and survival of red tilapia small fish (*Oreochromis mossambicus* x *O. niloticus*)

Efecto de la inclusión de harina de *Azolla filiculoides* en el crecimiento y supervivencia de alevines de tilapia roja (*Oreochromis mossambicus* x *O. niloticus*)

Y. Méndez-Martínez¹, Y. Pérez³, D.M. Verdecia², E. Cortés-Jacinto³, O.F. Cevallos-Falquez¹ and O. Romero²

¹Facultad de Ciencias Pecuarias, Universidad Técnica Estatal de Quevedo (UTEQ), Quevedo, Los Ríos, Ecuador

²Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de Granma (UDG), Bayamo, Granma, Cuba

³Programa de Acuicultura, Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. (CIBNOR), La Paz, B.C.S., México

Email: ymendezmartinez@gmail.com

An experiment in Acuípaso Station, Granma province, Cuba was carried out to evaluate the effect on growth and survival indicators of inclusion levels (0, 10, 20 and 30 %) of water fern meal (*Azolla filiculoides*) in diets for red tilapia hybrid small fish (*Oreochromis mossambicus* x *O. niloticus*). A completely randomized design with four treatments and three repetitions was used; 120 small fish of 26 days of age were used, which were distributed in four groups of 30, ten small fish per tank (each tank represented a repetition). The chemical composition of meal was determined, and the variables: survival, weight and its increase, average gain and feed conversion factor were studied. The simple classification variance analysis was performed on the data obtained and it the Duncan test was used to compare the means. The chemical composition reported percentages of CP (20.74), CF (19.34) and adequate amino acid balance (1.40, 2.30, 2.65 and 3.14 % of methionine, arginine, lysine and valine, respectively); the oxygen, temperature and pH of the water (5.34 mg/L, 24.33°C and 8.02) were maintained at the optimum average value for this species. For the indicators of growth and survival there were significant differences ($p < 0.05$) between all the treatments, except for the control and 10 % with results of 6.556g, 7.793 g/day, 1.85 g/g, 0.55 and 7.266 cm, for the final live weight, ADG, conversion, food efficiency and final length, respectively. It was concluded that *Azolla filiculoides* have an adequate chemical and amino acid composition so that it could be used in the feeding of red tilapia small fish, with 10 % of inclusion in the diet, results in accordance with the control diet were obtained in the productive indicators, without affecting the water quality.

Key words: *Azolla* meal, red tilapia, average daily gain, conversion and food efficiency

The development of intensive aquaculture requires optimizing the use of nutrients by the cultured species, for this the selection of raw materials is necessary, taking into account the availability of plant-based foods with potential use in diets for omnivorous fish such as tilapia. Therefore, the culture actions from the stages of larva and small fish receive the most attention in aquatic farms (Das *et al.* 2018).

The search for alternative foods for agricultural production emphasizing the use of available natural

Se realizó un experimento en la Estación Acuípaso, provincia de Granma, Cuba, para evaluar el efecto en los indicadores del crecimiento y supervivencia de niveles de inclusión (0, 10, 20 y 30%) de harina del helecho de agua (*Azolla filiculoides*) en dietas para alevines híbridos de tilapia roja (*Oreochromis mossambicus* x *O. niloticus*). Se empleó un diseño completamente aleatorizado con cuatro tratamientos y tres repeticiones; para ello se utilizaron 120 alevines de 26 días de edad los que se distribuyeron en cuatro grupos de 30, diez alevines por tanques (cada tanque representó una repetición). Se determinó la composición química de la harina, y se estudiaron las variables: supervivencia, peso y su incremento, ganancia media y factor de conversión alimenticia. A los datos obtenidos se le realizó análisis de varianza de clasificación simple y se empleó la prueba de Duncan para la comparación de las medias. La composición química informó porcentajes de PB (20.74), FB (19.34) y adecuado balance de aminoácidos (1.40; 2.30; 2.65 y 3.14% de metionina, arginina, lisina y valina, respectivamente); el oxígeno, temperatura y pH del agua (5.34 mg/L, 24.33°C y 8.02) se mantuvieron al valor medio óptimo para esta especie. Para los indicadores del crecimiento y supervivencia existió diferencias significativas ($p < 0,05$) entre todos los tratamientos, excepto para el control y el 10% con resultados de 6.556g, 7.793 g/día, 1.85 g/g, 0.55 y 7.266 cm, para el peso vivo final, GMD, conversión, eficiencia alimentaria y longitud final, respectivamente. Se concluyó que la *Azolla filiculoides* presenta adecuada composición química y aminoacídica por lo que pudiera ser utilizada en la alimentación de alevines de tilapia roja, con 10% de inclusión en la dieta se obtuvieron en los indicadores productivos resultados acordes con la dieta control, sin afectar la calidad del agua.

Palabras clave: harina de *Azolla*, tilapia roja, ganancia media diaria, conversión y eficiencia alimentaria

El desarrollo de la acuicultura intensiva exige optimizar la utilización de los nutrientes por las especies cultivadas, para ello es necesaria la selección de las materias primas, teniendo en cuenta la disponibilidad de alimentos de origen vegetal con potencialidades de empleo en dietas para peces omnívoros como la tilapia. Por lo tanto, las acciones de cultivo desde las etapas de larva y alevín reciben la mayor atención en las granjas acuícolas (Das *et al.* 2018).

La búsqueda de alimentos alternativos para la producción en el campo agropecuario enfatizando como

resources as a main line is an important aspect; one of the greatest challenges has been to find sources of easily acquired proteins (Tacon and Metian 2015).

In this sense there are local products such as aquatic plants (unconventional foods), which are not universally used in animal feeding, but well used can be an important element in sustainable production systems, by virtue of their low cost, recognizing that some of them can turn into environmental contaminants (Abdel-Tawwab 2008).

Several authors have considered the aquatic macrophytes as a plague due to their rapid growth, which sometimes invade lakes and cause several problems. However, if its proliferation power is properly managed, its nutrient absorption capacity and the bioaccumulation of other water compounds make it a useful tool in the wastewater treatment. In the world and particularly in Asia, farmers produce and harvest aquatic plants for different purposes, including green manure and animal food source (Islam and Nishibori 2017).

Therefore, the objective of this study was to evaluate the effect on growth and survival indicators of inclusion levels of water fern meal (*Azolla filiculoides*) in diets for red tilapia hybrid small fish (*Oreochromis mossambicus* x *O. niloticus*).

Materials and Methods

Location and experimental ecology. The experiment was carried out at the Estación Acuícola ACUIPASO, Bartolomé Maso, Granma province, Cuba. In this stage, the following climatic variables were recorded; average temperatures of 24.6 to 28.2°C; relative humidity between 42 and 60 %, average rainfall between 269.40 and 294.42 mm, and light hours from 9.16 to 11.04.

Meal production. The plants were collected from a reservoir of the Estación de Alevinaje. For the *Azolla filiculoides* production, two concrete pools were built with a dimension of 10 m wide by 20 m long and 1.5 m deep each. A total of 50 g/m² of seed from the fresh plant were sown and later to fertilize, 240 kg of pig excreta were deposited in different parts of the pools at the beginning of the experimental stage (Pérez *et al.* 2014). Later, it was washed three times with distilled water and put to dry in the sun, on polyethylene mat with a total area of 32 m²; four turns were made during the day until 4:00 p.m., for three days; then the dehydrated plant was collected and stored in a cool place (Fasakin *et al.* 2001). A 250 µm hammer mill with a sieve was used to prepare the meal. Once obtained, it was stored in polyethylene bags at room temperature.

Chemical composition. Foods were measured in quadruplicate such as Dry matter (DM), Crude protein (CP), Ashes, Crude Fiber (CF), Ether extract (EE) according to AOAC (2000). The digestible energy (DE)

renglón principal la utilización de recursos naturales disponibles constituye un aspecto importante; uno de los mayores desafíos ha sido encontrar fuentes de proteínas de fácil adquisición (Tacon y Metian 2015).

En este sentido existen los productos locales como las plantas acuáticas (alimentos no convencionales), las cuales no son de uso universal en la alimentación animal, pero bien utilizadas pueden llegar a ser un elemento importante en los sistemas sustentables de producción, en virtud de su bajo costo, reconociendo que algunas de ellas pueden convertirse en elementos contaminantes del ambiente (Abdel-Tawwab 2008).

Las macrófitas acuáticas han sido consideradas por varios autores como una plaga debido a su rápido crecimiento, que en ocasiones llegan a invadir lagunas y ocasionan varios problemas. Sin embargo, si se maneja adecuadamente su poder de proliferación, su capacidad de absorción de nutrientes y la bioacumulación de otros compuestos del agua, las convierten en una herramienta útil en el tratamiento de aguas residuales. En el mundo y en particular en Asia, los granjeros producen y cosechan plantas acuáticas para diferentes propósitos, los que incluyen, abonos verdes y fuente de alimento animal (Islam y Nishibori 2017).

Por lo que el objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto en los indicadores del crecimiento y supervivencia de niveles de inclusión de harina del helecho de agua (*Azolla filiculoides*) en dietas para alevines híbridos de tilapia roja (*Oreochromis mossambicus* x *O. niloticus*).

Materiales y Métodos

Ubicación y ecología experimental. El experimento se llevó a cabo en la Estación Acuícola de ACUIPASO, Bartolomé Maso, provincia Granma, Cuba. En esta etapa se registraron las siguientes variables climáticas; temperaturas promedio de 24.6 a 28.2 °C; humedad relativa entre 42 y 60 %, precipitaciones promedio entre 269.40 y 294.42 mm, y horas luz desde 9.16 hasta 11.04.

Producción de la harina. Las plantas se recolectaron de un embalse de la propia Estación de Alevinaje. Para la producción de *Azolla filiculoides* se habilitaron dos estanques de hormigón con dimensión de 10 m de ancho por 20 de largo y profundidad de 1.5 m cada uno. Se sembraron 50 g/m² de semilla de la planta fresca y posteriormente para fertilizar se depositó al inicio de la etapa experimental, 240 kg de excreta de cerdo en diferentes partes de los estanques (Pérez *et al.* 2014). Posteriormente, se procedió al lavado, tres veces con agua destilada y se pusieron a secar al sol sobre mantas de polietileno con una superficie total 32 m²; se realizaron cuatro volteos durante el día hasta las 4:00 pm, durante tres días; seguidamente la planta deshidratada se recogió y guardó en un lugar fresco (Fasakin *et al.* 2001). Se empleó un molino martillo con criba de 250 µm para la elaboración de la harina. Una vez obtenida se almacenó en bolsas de polietileno a temperatura ambiente.

was estimated theoretically from the conversion factor of 3.80 Kcal/g DM of plant-based food (De Graaf and Janssen 1996).

Determination of amino acids. The total amino acids were quantified by acid hydrolysis with 6 N HCl and the amino acid separation was performed on a Beckman 6300 High Performance Analyzer. The analysis was done in quadruplicate.

Inclusion levels of Azolla filiculoides meal. Formulation, elaboration of the diets and preparation of the experimental diets: For the establishment of inclusion levels of *Azolla filiculoides* meal (table 1), the results obtained by Priyo *et al.* (2011) were taken as a reference, who used meals from *Lemna sp.* and *Azolla mexicana* in the polyculture of tilapia (*Oreochromis sp.*) small fish. Based on this experience, productive results and the literature reviewed, the water fern meal was used at inclusion levels of 10, 20, and 30 %.

Composición química. A los alimentos por cuadruplicado, se les determinó la Materia seca (MS), Proteína bruta (PB), Cenizas, Fibra bruta (FB), Extracto etéreo (EE) según AOAC (2000). La energía digestible (ED) se estimó de forma teórica a partir del factor de conversión de 3.80 Kcal/g MS de alimento de origen vegetales (De Graaf y Janssen 1996).

Determinación de aminoácidos. Se cuantificaron los aminoácidos totales por hidrólisis ácida con HCl 6 N y se realizó la separación de aminoácidos en un analizador Beckman 6300 High Performance Analyzer. El análisis fue hecho por cuadruplicado.

Niveles de inclusión de harina de Azolla filiculoides. Formulación, elaboración de las dietas y preparación de las dietas experimentales: Para el establecimiento de los niveles de inclusión de la harina de *Azolla filiculoides* (tabla 1) se tomaron como referente los resultados obtenidos por Priyo *et al.* (2011) quienes utilizaron harina de *Lemna sp.* y *Azolla mexicana* en el policultivo

Table 1. Experimental diets according to replacement levels by Azolla meal (dry base)

Ingredients, %	<i>Azolla filiculoides</i> , %			
	0	10	20	30
Azolla meal	0	10	20	30
Fish meal	25.0	18.0	16.0	14.0
Soybean meal	33.5	42.5	43.2	43.4
Wheat meal	27.6	15.6	6.9	0.3
Starch	5.0	5.0	5.0	3.4
Fish oil	0.2	0.2	0.2	0.2
Sunflower oil	2.7	2.7	2.7	2.7
P. Minerals ¹	2.0	2.0	2.0	2.0
P. Vitamins ²	2.0	2.0	2.0	2.0
Alginate	2.0	2.0	2.0	2.0
Total	100	100	100	100

¹mg/kg of the diet: (Roche Chemistry Inc.). Magnesium sulfate 5.1; Sodium chloride 2.4; Potassium chloride 2; Ferrous sulfate 1; Zinc sulfate 0.2; Cupric sulfate 0.0314; Manganous sulfate 0.1015; Cobalt sulfate 0.0191; Calcium iodate 0.0118; Chrome chloride 0.051.

²mg/kg of the diet: (Roche Chemistry Inc.). Thiamin 60; Rivo flavin 25; Niacin 40; Vitamin B6 50; Pantothenic acid 75; Biotin 1; Folate 10; Vitamin B12 0.2; Choline 600; Myo inositol 400; Vitamin C 200; Vitamin A 5000 UI; Vitamin E 100; Vitamin D 0.1; Vitamin K 5.

The bromatological composition of the diets used in the experiments is shown in table 2, where the *Azolla filiculoides* meal is included at levels of 10, 20, 30 % for red tilapia small fish. The methodology proposed by (Méndez-Martínez *et al.* 2018a) was taken into account for its formulation and elaboration.

Water quality. During the bioassay, the physical-chemical indicators of the water were recorded: temperature (°C), dissolved oxygen concentration (mg/L) and pH. The flow of this liquid, coming from the supply well, was maintained at 60 L minute (Méndez-Martínez *et al.* 2018a)

Preparation of experimental diets. All the diets

de alevines de tilapia (*Oreochromis sp.*). Sobre la base de esta experiencia, resultados productivos y la literatura revisada se procedió a utilizar la harina del helecho de agua en niveles de inclusión del 10, 20, y 30 %.

La composición bromatológica de las dietas utilizadas en los experimentos se muestra en las tabla 2, donde se incluye la harina de *Azolla filiculoides* en niveles de 10, 20, 30 % para alevines de tilapia roja. Se tuvo en cuenta para su formulación y elaboración la metodología planteada por (Méndez-Martínez *et al.* 2018a).

Calidad del agua. Durante el bioensayo se registraron los indicadores físicos-químicos del agua: temperatura (°C), concentración de oxígeno disuelto (mg/L) y pH. El

Table 2. Composition and contribution of the diets tested according to replacement levels by *Azolla filiculoides* meal

Nutrients	<i>Azolla filiculoides</i> , %				Requirements Small fish
	0	10	20	30	
DM (%)	93.40	93.60	93.70	93.60	-
CP (%)	35.00	35.00	35.00	35.00	35.00
CF (%)	2.20	3.10	4.90	5.70	8
Threo (%)	0.71	0.72	0.76	0.79	1.70
Val (%)	0.92	0.94	1.00	1.06	1.20
Met (%)	0.45	0.40	0.39	0.39	0.75
Iso (%)	0.99	1.02	1.06	1.09	1.39
Leu (%)	1.23	1.34	1.44	1.54	1.46
Lys (%)	1.40	1.30	1.29	1.28	2.20
Hist (%)	0.49	0.48	0.48	0.49	0.75
Arg (%)	0.95	1.04	1.10	1.16	1.81
Tyip (%)	0.93	0.93	0.95	0.98	0.43
DE, MJ/g food	0.0126	0.0117	0.0113	0.011	0.0126

DM: dry matter; CP: crude protein; EE: ether extract, CF: crude fiber; A: ash, FNE: Free Nitrogen Extract; Threo: threonine, Val: Valine, Met: methionine, Iso: Isoleucine, Leu: leucine, Lys: lysine, Hist: histidine, Arg: arginine, Trip: tryptophan. DE: Digestible energy.

(table 2) were formulated using Excel Solver from Windows 2010, in which fish meal was partially replaced by *Azolla filiculoides* meal (10, 20 and 30 %). All the ingredients were sieved through a 250 µm mesh, and each diet was prepared by mixing all the macro-ingredients in an industrial blender until a uniform mixture was obtained. The micro-ingredients were mixed by hand in a plastic container before adding them to the macro-ingredients. Soya lecithin and fish oil were mixed until a homogeneous mixture was obtained and then water was added. The 3 mm granules were extracted with a meat grinder and dried for 8 hours at 45 °C in an airflow oven. Subsequently, the dried granules were packed in plastic bags and kept refrigerated at -4 °C until use. The elaborated diets showed the required compaction, due to the correct process of milling and mixing of each ingredient, in addition the characteristics of the agglutinant were taken into account according to Méndez-Martínez *et al.* (2018a).

Reception of red tilapia small fish. The hybrid red tilapia small fish (*Oreochromis mossambicus* x *O. niloticus*) were acclimatized in a reception tank prepared with water at zero parts per thousand salinity, aerated at 7 m/L and without chlorine. The most important physical-chemical indicators (temperature and pH) were taken, and then the tilapia bags were placed inside the tank with water and the water was tempered at 26 °C until the contents were completely empty, keeping the small fish in acclimation process for 7 days.

Bioassay with small fish. The culture of the organisms was developed for a period of 60 days.

flujo de este líquido, procedente del pozo de suministro, se mantuvo a 60 L/minutos (Méndez-Martínez *et al.* 2018a)

Preparación de las dietas experimentales. Todas las dietas (tabla 2) se formularon utilizando Excel Solver de Windows 2010, en las cuales se sustituye parcialmente a la harina de pescado por harina de *Azolla filiculoides* (10, 20 y 30 %). Todos los ingredientes se tamizaron a través de una malla de 250 µm, y cada dieta se preparó mezclando todos los macro-ingredientes en una licuadora industrial hasta obtener una mezcla uniforme. Los micro-ingredientes se mezclaron a mano en un recipiente de plástico antes de agregarlos a los macro-ingredientes. Se mezclaron lecitina de soja y aceite de pescado hasta obtener una mezcla homogénea y luego se agregó agua. Los gránulos de 3 mm se extrajeron con una picadora de carne y se secaron durante 8 horas a 45°C en una estufa de flujo de aire. Posteriormente, los gránulos secos se empacaron en bolsas de plástico y se mantuvieron refrigerados a -4 °C hasta su uso. Las dietas elaboradas presentaron la compactación requerida, debido al correcto proceso de molinado y mezclado de cada ingrediente, además se tomaron en cuenta las características del aglutinante según Méndez-Martínez *et al.* (2018a).

Recepción de los alevines de tilapia roja. Los alevines híbridos de tilapia roja (*Oreochromis mossambicus* x *O. niloticus*) se aclimataron en un tanque de recepción preparado con agua a cero partes por mil de salinidad, aireada a 7 mg / L y sin cloro. Se tomaron los indicadores físico-químicos más importantes (temperatura y pH), para luego colocar las bolsas con las tilapias en el interior del tanque con agua e ir atemperando las dos aguas a 26 °C hasta vaciar su contenido completamente, manteniéndose los alevines en proceso de aclimatación durante 7 días.

A total of 120 small fish of red tilapia hybrid (*Oreochromis mossambicus* x *O. niloticus*) were used with an age of 26 days and initial average weight of $0.7 \text{ g} \pm 0.5 \text{ g}$, weighed on a 0.01 g Sartorius precision scale, and initial average length of 2.1 to 2.7 cm. The small fish were placed in the experimental tanks and 4 groups were formed: the control and 3 diets where the *Azolla filiculoides* meal was included at 10, 20 and 30 %. For each of the treatments, 3 tanks (repetitions) with 10 small fish per each were used, 30 small fish per treatment, for 12 tanks in total. The fish were fed the diet at 8 % of their live weight on a fresh basis and the daily amount offered in each tank was divided into 3 frequencies a day at the following times: 7:30 a.m., 11.30 a.m., and 3:30 p.m.

Controlled productive indicators. The animals were individually weighed on a digital scale ($\pm 0.01 \text{ g}$, PE 3600 Mettler-Toledo) and the total length was determined with a digital vernier gauge ($\pm 0.001 \text{ mm}$, GT-MA15). All calculations were obtained from the means of the three replications. The following formulas were applied to obtain productive and nutritional indicators.

$$\text{Weight gain (g)} = W_x - W_i$$

$$\text{Average daily weight gain (g)} = (W_x - W_i)/t$$

$$\text{Specific growth rate} = [(\ln W_x - \ln W_i)]/t \times 100$$

$$\text{Feed conversion factor (FCF)} = \text{total food intake (g, dry weight)} / \text{total weight gain (g, wet gain),}$$

$$\text{Food efficiency} = \text{total weight gain (g, wet weight)} / \text{total food intake (g, dry weight).}$$

$$\text{Survival rate (\%)} = (\text{final number of small fish} / \text{initial number of small fish}) \times 100$$

Where:

W_x : is the final body weight (g), W_i : is the initial body weight (g) and t : is the duration of the experiment (days) (Arnauld *et al.* 2017).

Experimental design and statistical analysis. A completely randomized design with four treatments and three repetitions was used. A simple classification variance analysis was applied to the obtained results, considering diets as the only variation factor. The difference between the means was quantified by the Duncan(1955) test. For the normal distribution of the data the Kolmogorov-Smirnov (Massey 1951) test was used and for the variances the Bartlett (1937) test.

Results and Discussion

The physical-chemical indicators of the water (oxygen concentration, pH and temperature) were in the optimum average value (3-10 mg/L, 6.5-9, 24-32 °C) in the 47 days that the experiment lasted (table 3).

The dissolved oxygen is an environmental factor that controls metabolic activity since oxidative capacity depends on it, the number of molecules that can be catabolized and the amount of energy obtained to perform metabolic work. The value of the previous

Bioensayo con alevines. El cultivo de los organismos se desarrolló por un período de 60 días. Se utilizó un total de 120 alevines del híbrido de tilapia roja (*Oreochromis mossambicus* x *O. niloticus*) con una edad de 26 días y peso promedio inicial de $0.7 \text{ g} \pm 0.5 \text{ g}$, pesados en una balanza de precisión Sartorius de 0.01 g, y longitud promedio inicial de 2.1 a 2.7 cm. Los alevines se colocaron en los tanques experimentales y se conformaron 4 grupos: el control y 3 dietas donde se incluyó la harina de *Azolla filiculoides* al 10, 20 y 30 %. Para cada uno de los tratamientos se utilizaron 3 tanques (repeticiones) con 10 alevines por cada uno, 30 alevines por tratamiento, para 12 tanques en total. A los peces se le suministró la dieta al 8 % de su peso vivo en base fresca y la cantidad diaria ofrecida en cada tanque fue dividida en 3 frecuencias al día en los siguientes horarios: 7:30 am, 11.30 am, 3:30 pm.

Indicadores productivos controlados. Los animales se pesaron individualmente en una balanza digital ($\pm 0.01 \text{ g}$; PE 3600 Mettler-Toledo) y la longitud total se determinó con un calibrador vernier digital ($\pm 0.001 \text{ mm}$, GT-MA15). Todos los cálculos se obtuvieron de las medias de las tres réplicas. Se aplicaron las siguientes fórmulas para obtener indicadores productivos y nutricionales.

$$\text{Ganancia de peso (g)} = W_x - W_i$$

$$\text{Aumento medio de peso diario (g)} = (W_x - W_i)/t$$

$$\text{Tasa de crecimiento específica} = [(\ln W_x - \ln W_i)]/t \times 100$$

$$\text{Factor de conversión de alimentación (FCA)} = \text{alimento total consumido (g, peso seco)} / \text{ganancia de peso total (g, peso húmedo),}$$

$$\text{Eficiencia alimentaria} = \text{ganancia de peso total (g, peso húmedo)} / \text{alimento total consumido (g, peso seco).}$$

$$\text{Tasa de supervivencia (\%)} = (\text{número final de alevines} / \text{número inicial de alevines}) \times 100$$

Donde:

W_x : es el peso corporal final (g), W_i es el peso corporal inicial (g) y t es la duración del experimento (días) (Arnauld *et al.* 2017).

Diseño experimental y análisis estadísticos. Se empleó un diseño completamente aleatorizado con cuatro tratamientos y tres repeticiones. A los resultados obtenidos se le aplicó un análisis de varianza de clasificación simple considerando a las dietas como único factor de variación. La diferencia entre las medias se cuantificó mediante la prueba de Duncan (1955). Para la distribución normal de los datos se utilizó la prueba de Kolmogorov-Smirnov (Massey 1951) y para las varianzas la prueba de Bartlett (1937).

Resultados y Discusión

Los indicadores físico-químicos del agua (concentración de oxígeno, pH y temperatura) se mantuvieron dentro del valor medio óptimo (3-10 mg/L, 6.5-9; 24-32 °C) en los 47 días que duró el experimento (tabla 3).

El oxígeno disuelto es un factor ambiental controlador de la actividad metabólica ya que, de este, depende la capacidad oxidativa, el número de moléculas que pueden ser catabolizadas y la cantidad de energía obtenida para realizar trabajo metabólico. El valor del indicador antes

Table 3. Physical-chemical indicators of water during the red tilapia small fish culture

Indicators	Mean	SD
Oxygen, mg/L	5.34	0.67
Temperature, °C	24.33	0.46
pH	8.02	0.08

indicator obtained in this study is in the range of that was reported by Llanes *et al.* (2011), 5-7 mg L⁻¹ and explained that the species (*Oreochromis mossambicus* x *O. niloticus*) has the ability to take oxygen on the surface when the concentration in the medium is low (less than +3 mg L⁻¹), although this would lead to a decrease in food intake (Buenaño-Buenaño *et al.* 2018 and Méndez-Martínez *et al.* 2018a).

During the experimental period, the temperature values obtained, as average of 27.12 °C, were in the normal ranges (24-32 °C). Among the physical factors, one of great importance in the aquatic species culture is the water temperature since it is closely related to the oxygen concentration and vice versa, due to the directly proportional relation between both factors. On the other hand, these variations influence on the fish nutrition since, by decreasing the temperature values below the established limits for each species, the oxygen dissolved in the water also decreases and these animals reduce the intake and adjust their metabolism to changes in the environment, although increasing the temperature within tolerable limits leads to an increase in protein requirements (Cruz-Velásquez *et al.* 2014) aspects to take into account to manage this species during the nursery stage.

This aquatic macrophyte (*Azolla filiculoides*) has a high water content, which has an impact on its use, hence in this research it has been determined to use dehydrated (meal) to reduce the volumes to be used in the diet, and to obtain better use of these, and can be used in minor species of farm, fish and crustaceans. Due to its high biomass production, it is considered promising for its use in the breeding of aquatic species (Gangadhar *et al.* 2015, Pérez *et al.* 2014 and Radhakrishnan *et al.* 2014).

This macrophyte has high water content but the meal obtained in this research showed 91.44 % DM (table 4), an adequate value for the meal of this type of plant since it helps its conservation. These results coincide with Carranco *et al.* (2002) and Yu *et al.* (2016) that when evaluating seven aquatic species found values between 84-92 % DM.

The protein levels were of 20.74 %, results that are below those reported by Carranco *et al.* (2002) and Méndez-Martínez *et al.* (2018a) with 31.26 % in *Azolla mexicana*. The potential value of aquatic plants as food for herbivores has been emphasized more in comparison with terrestrial plants. The

mencionado obtenido en este trabajo está en el rango de lo notificado por Llanes *et al.* (2011), de 5 - 7 mg L⁻¹ y argumentaron que la especie (*Oreochromis mossambicus* x *O. niloticus*) tiene la facultad de tomar oxígeno en la superficie cuando la concentración en el medio es baja (inferior a +3 mg L⁻¹), aunque esto traería consigo la disminución del consumo de alimento (Buenaño-Buenaño *et al.* 2018 y Méndez-Martínez *et al.* 2018a).

Durante el período experimental los valores de temperatura obtenidos, como promedio de 27,12 °C, se mantuvieron dentro de los rangos normales (24-32 °C). Entre los factores físicos, uno que reviste gran importancia en el cultivo de especies acuícolas es la temperatura del agua ya que está íntimamente relacionado con la concentración de oxígeno y viceversa, debido a la relación directamente proporcional existente entre ambos factores. Por otra parte, estas variaciones influyen en la nutrición de los peces ya que al disminuir los valores de temperatura por debajo de los límites establecidos para cada especie, disminuye también el oxígeno disuelto en el agua y estos animales reducen el consumo y ajustan su metabolismo a los cambios del medio, aunque al aumentar la temperatura dentro de los límites tolerables propicia incremento en los requerimientos de proteínicos (Cruz-Velásquez *et al.* 2014) aspectos a tener en cuenta para manejar esta especie durante la etapa de alevinaje.

Esta macrofitas acuáticas (*Azolla filiculoides*) presentan alto contenido de agua lo que repercute en su utilización, de ahí que en la presente investigación se haya determinado emplear deshidratada (harina) para disminuir los volúmenes a emplear en la dieta, y obtener mejor aprovechamiento de estas, y puedan ser empleados en especies menores de granja, peces y crustáceos. Por su alta producción de biomasa se considera promisoría para su utilización en las cría de especies acuícolas (Gangadhar *et al.* 2015, Pérez *et al.* 2014 y Radhakrishnan *et al.* 2014).

Esta macrofita tiene alto contenido de agua pero, la harina obtenida en esta investigación presentó 91.44% MS (tabla 4), valor adecuado para la harina de este tipo de planta ya que ayuda a su conservación. Estos resultados que coinciden con Carranco *et al.* (2002) y Yu *et al.* (2016) que al evaluar 7 especies acuáticas encontraron valores entre 84-92 % MS.

Los niveles de proteínas fueron de 20.74 % resultados que se encuentran por debajo de los reportados por Carranco *et al.* (2002) y Méndez-Martínez *et al.* (2018a) con 31.26% en *Azolla mexicana*. El valor potencial de las plantas acuáticas como alimento para herbívoros se ha

nitrogen content of trees, shrubs and grasses, many intakes as forage, is similar to or lower than aquatic macrophytes and algae. Gangadhar *et al.* (2015) and Brouwer *et al.* (2016) reported tenors between 20 and 30 %, the chemical composition of *Azolla sp.* usually varies according to the place where the plant grows, the change of season and the nutrients content of the water and the one found in this plant was mainly due to the favorable ecological conditions that exist in the water reservoirs.

This approach is based on the plant's ability to rapidly absorb nutrients from the environment due to the degradation of the organic matter carried out by bacteria adhering to their roots.

Regarding the crude fiber content, 19.34 % was obtained, which is considered of great interest due to the impact of this nutrient on the voluntary intake and digestibility of animals, especially monogastric. This value is higher than those reported by Gangadhar *et al.* (2015) and Gökçınar and Bekcan (2015) (13.1 - 16.5 %), so it must be taken into account when preparing the diet, so that it remains within the permissible range for these organisms (Méndez- Martínez *et al.* 2018ab).

enfático más en comparación con los vegetales terrestres. El contenido de nitrógeno de árboles, arbustos y pastos, muchos consumidos como forraje, es similar o menor a las macrofitas acuáticas y algas. Gangadhar *et al.* (2015) y Brouwer *et al.* (2016) informaron tenores entre 20 y 30 %, la composición química de la *Azolla sp.* suele variar según el lugar donde crece la planta, el cambio de estación y el contenido de nutrientes del agua y la encontrada en esta planta se debió fundamentalmente a las condiciones ecológicas favorables que existen en los embalses de agua. Este planteamiento se fundamenta en la capacidad que tiene el vegetal para absorber rápidamente nutrientes del medio por la acción degradativa de la materia orgánica que realizan las bacterias adherida a sus raíces.

Con respecto al contenido de fibra bruta, se obtuvo 19.34% que es considerado de gran interés por la repercusión de este nutriente en el consumo voluntario y digestibilidad de los animales, sobre todo de los monogástricos. Este valor es superior a los notificados por Gangadhar *et al.* (2015) y Gökçınar y Bekcan (2015) (13,1 - 16,5 %), por lo que ha de tenerse en cuenta al momento de elaborar la dieta, para que se mantenga dentro del rango permisible para estos organismos (Méndez-Martínez *et al.* 2018ab).

Table 4. Chemical and amino acid composition of *Azolla filiculoides* meal

Indicator	Mean, %	SD
Dry matter	91.44	0.04
Crude protein	20.74	0.06
Ether extract	2.95	0.01
Crude fiber	19.34	0.03
Ash	29.8	0.03
FNE	18.6	0.06
Amino acids based on CP		
Threonine	2.30	0.05
Valine	3.14	0.04
Methionine	1.40	0.07
Isoleucine	2.40	0.03
Leusin	3.80	0.104
Lysine	2.65	0.04
Histidine	1.78	0.03
Arginine	2.30	0.2
Tryptophan	0.97	0.05

The Ether Extract reached 2.95 % higher when compared to studies where percentages of 0.78 were found (Méndez-Martínez *et al.* 2018b). It is important to highlight that although amino acids are the main biomolecules for fish, this indicator provides essential fatty acids for organic functionality, as well as material that cannot be saponified characterized by phytosterols and liposoluble vitamins.

The ash content was 29.8 %, higher than those reported by Carranco *et al.* (2002) and Ngugi *et al.*

El Extracto Etéreo alcanzó 2,95 % superior al compararlo con estudios donde se encontraron porcentajes de 0,78 (Méndez-Martínez *et al.* 2018b). Hay que señalar que aunque los aminoácidos son las principales biomoléculas para los peces, este indicador aporta ácidos grasos esenciales para la funcionalidad orgánica, así como material que no se puede saponificar caracterizado por fitoesteroles y vitaminas liposolubles.

El contenido de cenizas fue de 29.8 %, superior a los reportados por Carranco *et al.* (2002) y Ngugi *et al.* (2017)

(2017) who reported values between 8-20 % and argued that the float plants have more of this component compared to the submerged and these, in turn, than the emergent and marginal vegetation. This may be due to contact with water and environmental factors such as dust and residual wastes from the treated water in which they are.

Regarding the amino acid composition Azolla meal is rich in threonine, valine, isoleucine, leucine and lysine, it is essential the presence of ten essential amino acids in the diet of fish: arginine, lysine, histidine, isoleucine, leucine, methionine, phenylalanine, threonine, tryptophan and valine, since they intervene in the growth and development, as well as in the formation of the tertiary structure of protein, constituting the essential amino acids up to 50 % of the protein, results that coincide with Wu *et al.* (2016), who reported that it is important to mention that the values of Azolla were higher in lysine and methionine when compared with those reported for soybean meal and meat and bone meal (Das *et al.* 2018).

Omnivorous fishes such as tilapia have a certain degree of metabolic efficiency of foods from vegetable origin, due to the structural adaptations they have in their digestive system. However, at a global level it is common for fish foods to include fishmeal. Fishmeal is found in almost all commercial diets, because it is very digestible and rich in essential amino acids, mainly lysine, but still efforts are made to find other foods that can be included in fish diets and thus reduce the cost of them (Ochieng *et al.* 2014 and Kollah *et al.* 2015).

The results of the final live weight, ADG and absolute growth rate (table 5) did not show significant differences between the control and 10 % of Azolla, which in turn differed from the rest of the treatments. This indicator (average daily gain) is considered by Abdel-Tawwab (2008) in *Tilapia zilli*, as one of the main criteria for evaluating productivity in this species and in this sense, Cruz-Velásquez *et al.* (2014) showed similar results to those obtained in this research. When evaluating the use of aquatic plants (*Lemna minor*, *Spirodela polyrhiza* and *Azolla filiculoides*) fermented in small fish of Cachama blanca and Tilapia del Nilo, obtained gains of 4.16 -5.84g/day. On the other hand Gökçinar and Bekcan (2015) when replacing fishmeal with Azolla (10, 20 and 30 %) found higher results in final weight, ADG, final length concluding that this plant is a source of protein of vegetable origin that can be used for fish culture.

Results similar to the one obtained this research expressed Gangadhar *et al.* (2015) when using inclusion levels of 10, 20, 30 and 40 % of *Azolla sp.* in rations for *Labeo fimbriatus* and concluded that the good productive performance of the fish was due to the correct formulation of the diet and good zootechnical management.

The best results for the conversion and food

quienes informaron valores entre 8-20 % y argumentaron que las plantas flotadoras presentan mayor cantidad de este componente en comparación con las sumergidas y estas, a su vez, que las emergentes y vegetación marginal. Esto puede deberse al contacto con el agua y a factores ambientales como son el polvo y los desechos residuales de las aguas tratadas en las que se encuentran.

En cuanto a la composición aminoacídica la harina de Azolla es rica en treonina, valina, isoleucina, leucina y lisina, es indispensable la presencia de diez aminoácidos esenciales en la dieta de los peces: arginina, lisina, histidina, isoleucina, leucina, metionina, fenilalanina, treonina, triptófano y valina, ya que intervienen en el crecimiento y desarrollo, así como en la formación de la estructura terciaria de la proteína, constituyendo los aminoácidos esenciales hasta el 50 % de la proteína, resultados que coinciden con Wu *et al.* (2016), quienes notificaron que es importante mencionar que los valores de la Azolla fueron superiores en lisina y metionina si se comparan con los informados para la harina de soya y la harina de carne y huesos (Das *et al.* 2018).

Los peces omnívoros como la tilapia poseen cierto grado de eficiencia metabólica de los alimentos de origen vegetal, debido a las adaptaciones estructurales que presentan en su sistema digestivo. Sin embargo, a nivel mundial se estima que los alimentos para peces incluyan harina de pescado. La harina de pescado se encuentra en casi todas las dietas comerciales, debido a que es muy digerible y rica en aminoácidos esenciales, principalmente lisina, pero aun así se dedican esfuerzos por encontrar otros alimentos que puedan incluirse en las dietas para peces y así disminuir el costo de las mismas (Ochieng *et al.* 2014 y Kollah *et al.* 2015).

Los resultados del peso vivo final, GMD y tasa de crecimiento absoluto (tabla 5) no mostraron diferencias significativas entre el control y 10 % de Azolla, los que a su vez difirieron del resto de los tratamientos. Este indicador (ganancia media diaria) es considerado por Abdel-Tawwab (2008) en *Tilapia zilli*, como uno de los principales criterios para evaluar la productividad en esta especie y en este sentido, Cruz-Velásquez *et al.* (2014) indicaron resultados similares a los obtenidos en esta investigación. Al evaluar el empleo de plantas acuáticas (*Lemna minor*, *Spirodela polyrhiza* y *Azolla filiculoides*) fermentadas en juveniles de Cachama blanca y Tilapia del Nilo obtuvieron ganancias de 4.16 -5.84 g/día. Por su parte Gökçinar y Bekcan (2015) al sustituir harina de pescado por Azolla (10, 20 y 30 %) encontraron resultados superiores en peso final, GMD, longitud final concluyendo que esta planta es una fuente de proteína de origen vegetal que puede ser utilizada para el cultivo de peces.

Resultados similares al obtenido en la presente investigación expresaron Gangadhar *et al.* (2015) al utilizar niveles de inclusión de 10, 20, 30 y 40 % de *Azolla sp.* en raciones para *Labeo fimbriatus* y concluyeron que el buen comportamiento productivo de los peces se debió a la correcta formulación de la dieta y buen manejo zootécnico.

Table 5. Productive performance of the small fishes that intake *Azolla filiculoides* meal.

Indicators	% <i>Azolla filiculoides</i>				SE ±	P
	0	10	20	30		
Initial weight (g)	0.771	0.763	0.755	0.770	0.001	0.075
Final weight (g)	6.742 ^a	6.556 ^a	5.781 ^b	5.915 ^b	0.026	0.007
Weight gain (g/day)	5.971 ^a	5.793 ^a	5.026 ^b	5.145 ^b	0.015	0.033
Absolute growth rate	3.61 ^a	3.58 ^a	3.39 ^b	3.40 ^b	0.469	0.006
Feed conversion (g/g)	1.840 ^a	1.850 ^a	1.890 ^b	1.880 ^b	0.0023	0.012
Food efficiency	0.551 ^a	0.550 ^a	0.523 ^b	0.521 ^b	0.002	0.041
Initial length (cm)	2.600	2.401	2.525	2.602	0.078	0.083
Final length (cm)	7.242 ^a	7.266 ^a	6.451 ^b	6.455 ^b	0.569	0.004
Survival (%)	100.00 ^a	100.00 ^a	98.00 ^b	95.00 ^c	1.267	0.010

^{ab} Different letters in the same row differ to P < 0.05 (Duncan 1955)

efficiency were for the control treatments and 10 %, without differences between them, where the conversion is below 1.90 g/g and food efficiency varied between 0.52-0.55, so that the conversion index obtained in this study can be attributed to the management and acceptance and nutritional contribution of some aquatic macrophytes such as *Azolla* sp, which covered the nutritional requirements of the small fish.

In this sense, Ngugi *et al.* (2017), showed results similar to those obtained in this research when evaluating *Amaranthus hybridus* meal as a partial substitute of fishmeal for Nile tilapia, obtaining feed conversion values of 1.53 and 1.87g/g and average gains of 3.78-5.55 g, stating that this vegetable product can replace up to 80 % fishmeal in the diet of *O. niloticus*, without compromising the growth, use of nutrients and their digestibility.

Conclusions

The *Azolla filiculoides* have adequate chemical and amino acid composition so that it could be used in the feeding of red tilapia small fish, with 10 % of inclusion in the diet, results in accordance with the control diet were obtained in the productive indications without affecting the water quality.

Los mejores resultados para la conversión y la eficiencia alimentaria fueron para los tratamientos control y 10%, sin diferencias entre sí, donde la conversión se encuentra por debajo 1.90 g/g y la eficiencia alimentaria varió entre 0.52-0.55, por lo que el índice de conversión obtenido en este trabajo se puede atribuir al manejo y a la aceptación y el aporte nutritivo que tienen algunas macrófitas acuáticas como la *Azolla* sp los cuales cubrieron los requerimientos nutritivos de los alevines.

En este sentido, Ngugi *et al.* (2017), indicaron resultados similares a los obtenidos en esta investigación al evaluar harina de *Amaranthus hybridus* como sustituto parcial de la harina de pescado para Tilapia del Nilo obteniendo valores de conversión alimenticia de 1.53 y 1.87g/g y ganancias medias de 3.78-5.55 g, planteando que este producto de origen vegetal puede sustituir hasta el 80 % la harina de pescado en la alimentación de *O. niloticus*, sin comprometer el crecimiento, utilización de los nutrientes y su digestibilidad.

Conclusiones

La *Azolla filiculoides* presenta adecuada composición química y aminoacídica por lo que pudiera ser utilizada en la alimentación alevines de tilapia roja, con el 10% de inclusión en la dieta, se obtuvieron en los indicadores productivos resultados acordes con la dieta control, sin afectar la calidad del agua.

Referencias

- Abdel-Tawwab, M. 2008. The Preference of the Omnivorous-Macrophagous, *Tilapia zillii* (Gervais), to consume a Natural Free-floating Fern, *Azolla pinnata*. Journal of the World Aquaculture Society. 39(1): 104-112.
- AOAC. 2000. Official Methods of Analysis. 17 th Ed. Ass. Off. Anal. Chem. Washington, D.C. USA. 2:777-778.
- Arnauld, S.M.D., Akito, O., Shunsuke, K. & Emile, D.F. 2017. Effect of total replacement of fishmeal by earthworm and *Azolla filiculoides* meals in the diets of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758) reared in concrete tanks. Indian J. Fish. 64(1): 31-36. Available: DOI: 10.21077/ijf.2017.64.1.55317-05. [Consulted: January 18, 2019].
- Bartlett, M. 1937. Properties of sufficiency and statistical tests. Proceedings of the Royal Society of London. Ser. A; 160(2): 268-282.
- Brouwer, P., Van der Werf, A., Schluempmann, H., Reichart, G. & Nierop, K.G.L. 2016. Lipid Yield and Composition of *Azolla filiculoides* and the Implications for Biodiesel Production. Bioenerg. Res. 9(4):369-377. Available. DOI 10.1007/s12155-015-9665-3. [Consulted: January 12, 2019].
- Buenaño-Buenaño, J., Núñez-Torres, P., Barros-Rodríguez, M., Rosero-Peñaherrera, M., Lozada-Salcedo, E., Guishca-Cunuhay, C. & Zurita-Vásquez, H. 2018. Efecto de la inclusión de *Azolla* en la dieta de codornices japonesas sobre el consumo voluntario, digestibilidad aparente y producción de huevos. Revista de Investigaciones Veterinaria Perú. 29(1): 161-168.

- Available: <http://dx.doi.org/10.15381/rivep.v29i1.14081>. [Consulted: February 12, 2019]
- Carranco, M. E., Castillo, R. M., Escamilla, A., Martínez, M., Pérez-Gil, F. & Stephan, E. 2002. Composición química, extracción de proteína foliar y perfil de aminoácidos de siete plantas acuáticas. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*. 36(3): 247-258.
- Cruz-Velásquez, Y., Kijora, C., Vergara-Hernández, W. & Schulz, C. 2014. On-farm evaluation of Cachama blanca and Nile tilapia fed fermented aquatic plants in a polyculture. *Orinoquia Suplemento*. 18(2): 269-277.
- Das, M., Rahim, F.I. & Hossain, A. 2018. Evaluation of Fresh *Azolla pinnata* as a Low-Cost Supplemental Feed for Thai Silver Barb *Barbonymus gonionotus*. *Fishes*. 3(15): 1-11. doi:10.3390/fishes3010015.
- De Graaf, G. & Janssen, H. 1996. Artificial reproduction and podrearing of pondrearing of African catfish *Clarias gariepinus* in sub-Saharan Africa. A Handbook. FAO, Fisheries Technical Paper, 362 (1): 73-83.
- Duncan, D. B. 1955. Multiple Range and Multiple F Tests. *Biometrics*, 11 (1): 1-42, ISSN: 0006-341X, DOI:10.2307/3001478.
- Fasakin, E.A., Balogun, A.M. & Fagbenro, O.A. 2001. Evaluation of Sun-Dried Water Fern, Azolla Africana and Duckweed, *Spirodela polyrrhiza* in Practical Diets for Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus* Fingerlings. *J. Appl. Aquac.* 11(1): 83-92.
- Gangadhar, B., Sridhar, N., Saurabh, S., Raghavendra, C.H., Hemaprasanth, K.P. & Jayasankar, P. 2015. Effect of azolla-incorporated diets on the growth and survival of Labeo fimbriatus during fry-tofingerling rearing. *Cogent Food & Agriculture*. 1: 1055539. Available: <http://dx.doi.org/10.1080/23311932.2015.1055539>. [Cunsulted: February 12, 2019]
- Gökçinar, N.C. & Bekcan, S. 2015. The Effects of Partially Replacing Fishmeal with Azolla (*Azolla sp.*) On Growth Parameters of Shabbout Fish (*Tor grypys* H. 1843). *Journal of Applied Biological Sciences*. 9 (1): 43-46.
- Islam, M.A. & Nishibori, M. 2017. Use of multivitamin, acidifier and Azolla in the diet of broiler chickens. *Asian-Australian Journal of Animal Sciences*. 30(5): 683-689. Available: doi: 10.5713/ajas.16.0395. [Consulted: February 12, 2019.
- Kollah, B., Kumar, A. & Rajan, S. 2015. Aquatic microphylla Azolla: a perspective paradigm for sustainable agriculture, environment and global climate change. *Environ Sci Pollut Res*. 23(5):1-12. Available: DOI 10.1007/s11356-015-5857-9. [Consulted: February 12, 2019].
- Llanes, I.J., Toledo, P.J. & Lazo, V.V.J. 2011. Evaluación del ensilaje de pescado como suplemento proteico de dietas vegetales en el desempeño productivo de *Clarias gariepinus*. *REDVET*. 12(6): 1-10. Available: <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n060611/061114.pdf>. [Cunsulted: January 10, 2019]
- Massey, F. J. 1951. The Kolmogorov-Smirnov test for goodness of fit. *Journal of the American Statistical Association*. 68-78.
- Méndez-Martínez, Y., Chacón-Matos, D., Pérez-Tamames, Y. & Ramírez-De la Ribera, J.L. 2018a. El crecimiento y supervivencia de alevines de *Clarias gariepinus* con la inclusión de Azolla en dieta. *REDVET* 19(4). Available: <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n040418/041824.pdf>. [Consulted: January 08, 2019]
- Méndez-Martínez, Y., Vega-Ramírez I., Pérez-Tamames, Y. & Ramírez-De la Ribera, J. L. 2018b. La inclusión de harina de Elodea densa en la ración de *Clarias gariepinus*. *REDVET*. 19(5). Available: www.veterinaria.org/revistas/redvet/n070718/071802.pdf. [Consulted: January 08, 2019]
- Ngugi, C.C., Oyoo-Okoth, E., Manyala, J.O., Fitzsimmons, K. & Kimotho, A. 2017. Characterization of the nutritional quality of amaranth leaf protein concentrates and suitability of fish meal replacement in Nile tilapia feeds. *Aquaculture Reports*. 5(1): 62-69. Available: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aqrep.2017.01.003>. [Consulted: January 10, 2019]
- Ochieng, E., Mbonge, J., Sakakura, Y. & Hagiwara, A. 2014. Complete Replacement of Fish Meal in the Diet of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) Grow-out with Alternative Protein Sources. A review. *International Journal of Advanced Research*. 2(8): 962-978.
- Pérez, Y., González, R., Méndez, Y. & Ramírez, J.L. 2014. Inclusión de la harina de *Lemna perpusilla* para alimentar alevines *Oreochromis mossambicus* x *Oreochromis niloticus*. *REDVET*. 15(5):1-10. Available: <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n050514/051415.pdf>. [Accessed: January 10, 2019].
- Priyo, N.B., Nurfadhilah, N. & Ekasari, J. 2011. Fermentasi daun mata lele *Azolla sp.* Dan pemanfaatannya sebagai bahan baku pakan ikan nila *Oreochromis sp.*. *Jurnal Akuakultur Indonesia*. 10 (2):137-143.
- Radhakrishnan, S., Saravana, P., Seenivasan, C., Shanthi, R. & Muralisankar, T. 2014. Replacement of fishmeal with *Spirulina platensis*, *Chlorella vulgaris* and *Azolla pinnata* on non-enzymatic and enzymatic antioxidant activities of *Macrobrachium rosenbergii*. *Journal of Basic & Applied Zoology*. 67 (1):25-33. Available: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jobaz.2013.12.003>. [Consulted: January 18, 2019].
- Tacon, A.G.J. & Metian, M. 2015. Feed matters: satisfying the feed demand of aquaculture. *Reviews in Fisheries. Science & Aquaculture*. 23 (1): 1-10.
- Wu, F., Jiang, M., Wen, H., Liu, W., Tian, J., Yang, C. & Huang, F. 2016. Dietary vitamin E effects on growth, fillet textural parameters, and antioxidant capacity of genetically improved farmed tilapia (GIFT), *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture Int*. 25(2): 1-13. Available: DOI 10.1007/s10499-016-0089-7. [Consulted: January 10, 2019].
- Yu, Y.Y., Chen, W.D., Liu, Y.J., Niu, J., Chen, M. & Tian, L.X. 2016. Effect of different dietary levels of *Gracilaria lemaneiformis* dry power on growth performance, hematological parameters and intestinal structure of juvenile Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*), *Aquaculture*. 450 (1):356-362. Available:doi:10.1016/j.aquaculture.2015.07.037. [Consulted: January 10, 2019].

Received: