

Substitution of a high percentage of fishmeal for silages of fishery by-products in extruded diets for *Clarias gariepinus*

Sustitución de alto porcentaje de harina de pescado por ensilados de subproductos pesqueros en dietas extrusadas para *Clarias gariepinus*

J. Llanes¹ and Giuliana Parisi²

¹Empresa de Desarrollo de Tecnologías Acuícolas. Carretera central km 20, Loma de Tierra, Cotorro, La Habana, Cuba

²Universidad de Florencia, Via delle Cascine 5 – 50144. Florence FI, Italia

Email: jose@edta.alinet.cu

J. Llanes: <https://orcid.org/0000-0002-6687-8284>

Giuliana Parisi: <https://orcid.org/0000-0003-4646-6036>

A total of 270 fingerlings (10.7 ± 0.06 g of average weight) were randomly distributed in three treatments with three repetitions, according to a completely randomized design, to evaluate the total substitution of a high fishmeal percentage for silages of fishery by-products in extruded diets for *Clarias gariepinus*. The treatments were catfish fingerling feed with 25 % of fish meal (control) and two alternative diets, with 10% (dry basis) of silage: one prepared with 98 % of sulfuric acid, and the other with formic acid. Animals were fed for 60 d. No differences were found ($P > 0.05$) in the final weights (66.63, 66.27 and 70.71 g) and food conversion (1.18, 1.18 and 1.15). However, there were differences for protein efficiency between the diet with fishmeal (2.34) and the silage of fishery products (3.09 and 3.18). Survival was excellent in all treatments ($> 96.66\%$). The economic analysis showed that the profits with silage (US \$ 2534.22 and 2430.05/t) were superior to control (US \$ 1689.44/t). It is concluded that chemical silages of fishery by-products can replace a high percentage of fishmeal in extruded diets for *Clarias gariepinus* fingerlings with a positive economic effect, by reducing the importation of fishmeal.

Keywords: acids, feeding, catfish, chemical silos

Fishmeal is an important protein source for fish, but the increase of prices and low availability of this resource in the market motivated studies for its partial or total replacement by other protein sources (Guzel *et al.* 2011 and Valenzuela and Morales 2016). In Cuba, as part of import substitution, there is a search for alternative foods that allows to use national raw materials and, thus, contribute to food sustainability and sovereignty. In this context, fishery by-product silages (FS) are considered a practical and economically viable alternative to guarantee sustainable fish production (Perea *et al.* 2018).

The African catfish (*Clarias gariepinus*) is the main freshwater species of intensive culture in Cuba. They are fed with wet food (40 - 45 % of dry matter), consisting of vegetable feed and FS (Toledo and Llanes 2013). Through an international project (AID010713 - IPEPAC) of the Italian Agency for Development Cooperation (AICS, initials in Italian), this feeding methodology has been extended to Sancti Spiritus province, where the extrusion of this food is foreseen.

Un total de 270 alevines (10.7 ± 0.06 g de peso promedio) se distribuyeron al azar en tres tratamientos con tres repeticiones, según diseño completamente aleatorizado, para evaluar la sustitución total de alto porcentaje de harina de pescado por ensilados de subproductos pesqueros en dietas extrusadas para *Clarias gariepinus*. Los tratamientos fueron el pienso para alevinaje de bagres con 25 % de harina de pescado (control) y dos dietas alternativas, con 10% (base seca) de ensilado: uno preparado con ácido sulfúrico al 98 %, y el otro con ácido fórmico. Los animales se alimentaron durante 60 d. No se encontraron diferencias ($P > 0.05$) en los pesos finales (66.63, 66.27 y 70.71 g) y conversión alimentaria (1.18, 1.18 y 1.15). Sin embargo, sí las hubo para la eficiencia proteica entre la dieta con harina de pescado (2.34) y los ensilados de productos pesqueros (3.09 y 3.18). La supervivencia fue excelente en todos los tratamientos ($> 96.66\%$). El análisis económico mostró que las utilidades con los ensilados (US \$ 2534.22 y 2430.05 /t) fueron superiores al control (US \$ 1689.44 /t). Se concluye que los ensilados químicos de subproductos pesqueros pueden reemplazar un elevado porcentaje de harina de pescado en dietas extrusadas para alevines de *Clarias gariepinus* con efecto económico positivo, al disminuir la importación de harina de pescado.

Palabras clave: ácidos, alimentación, bagres, silos químicos.

La harina de pescado es una fuente importante de proteína para peces, pero el incremento de precios y la baja disponibilidad de este recurso en el mercado motivaron investigaciones para su remplazo parcial o total por otras fuentes de proteínas (Guzel *et al.* 2011 y Valenzuela y Morales 2016). En Cuba, como parte de la sustitución de importaciones, se trabaja en la búsqueda de alimentos alternativos que permitan contar con materias primas nacionales y de esta forma, contribuir a la sostenibilidad y soberanía alimentaria. En este contexto, los ensilados de subproductos pesqueros (EP) se consideran una alternativa práctica y económicamente viable para garantizar una producción piscícola sostenible (Perea *et al.* 2018).

El bagre africano (*Clarias gariepinus*) es la principal especie dulceacuícola de cultivo intensivo en Cuba. Su alimentación se realiza con alimento húmedo (40 – 45 % de materia seca), constituido por pienso vegetal y EP (Toledo y Llanes 2013). Por un proyecto internacional (AID010713 - IPEPAC) de la Agencia Italiana de Cooperación para el Desarrollo (AICS, siglas en italiano) esta metodología de alimentación se ha extendido a la

Hence, the need to carry out new studies that allow greater efficiency in the recycling of fishing by-products and finished food.

Studies of Llanes and Parisi (2020) evaluated two extruded diets with 10% (dry basis) of FS in African catfish. These authors obtained better productive and economic indicators with the inclusion of 10 % of fishmeal (FM), with respect to commercial feed (control). Considering this result, the objective of this research was to evaluate the total substitution of high percentage of fishmeal for chemical silage of fishery by-products in extruded diets for *Clarias gariepinus*.

Materials and Methods

The bioassay was carried out in the Laboratorio de Nutrición de la Empresa de Desarrollo de Tecnologías Acuícolas (EDTA), in Cotorro municipality, Havana province.

Animals, experimental design and treatments. *Clarias gariepinus* fingerlings come from the juvenile area of the Unidad de Desarrollo-Innovación El Dique, of the EDTA. They spent a week of adaptation in a 4.5 m² cement pool, where they received the catfish fry feed (35 % crude protein). At the end of this time, 270 fish were caught and selected, with an average weight of 10.4 ± 0.06 g, which were randomly distributed in three treatments with three repetitions, according to a completely randomized design. The experimental units consisted of nine 68 L cement circular tanks, where 30 fish were placed and the water flow was maintained at 0.2 L/min for 24 h.

The treatments were catfish fingerling feed (control) and two alternative diets with chemical silage of fishing by-products: one made with 98 % of sulfuric acid and the other with formic acid (table 1).

Silage preparation. By-products of tilapia meat were used, which were ground in a meat mill (JAVAR 32, Colombia). The resulting paste was divided into two portions: one, with the addition of 2 % of sulfuric acid at 98 % (w/v) and the other, with 2 % of formic acid (w/v). Both were stored in two covered plastic containers for seven days.

Diet preparation. Meals (fish, soybean and wheat) and wheat bran were ground in a hammer mill, to a particle size of 250 µm. It was mixed (HOBART MC-600 mixer, Canada) for 10 min. to form a homogeneous product, and, subsequently, soybean oil, vitamin-mineral mixture and FS were added wet (10 % of inclusion calculated on a dry basis and after neutralization with 2.5 % of calcium carbonate), and continued mixing for 5 min. The agglomeration of diets was performed with an extruder (DGP 70, China) with a diameter of 3 mm and pellets were dried in an oven (Selecta, Spain) at 60 °C for 24 h. The control food was prepared under the same conditions as the experimental ones. The bromatological determinations were carried out according to the methods described

provincia de Sancti Spiritus, donde se prevé la extrusión de este alimento. De ahí, la necesidad de realizar nuevos estudios que permitan mayor eficiencia en el reciclaje de los subproductos pesqueros y el alimento terminado.

En estudios realizados por Llanes y Parisi (2020) se evaluaron dos dietas extrusadas con 10 % (base seca) de EP en bagres africanos. Estos autores obtuvieron mejores indicadores productivos y económicos con la inclusión de 10 % de HP con respecto al pienso comercial (control). Al considerar este resultado, el objetivo de este trabajo fue evaluar la sustitución total de alto porcentaje de HP por ensilados químicos de subproductos pesqueros en dietas extrusadas para *Clarias gariepinus*.

Materiales y Métodos

El bioensayo se realizó en el Laboratorio de Nutrición de la Empresa de Desarrollo de Tecnologías Acuícolas (EDTA), en el municipio Cotorro, en la provincia La Habana.

Animales, diseño experimental y tratamientos. Los alevines de *Clarias gariepinus* proceden del área de alevinaje de la Unidad de Desarrollo-Innovación El Dique, de la EDTA. Estuvieron una semana de adaptación en piscina de cemento de 4.5 m², donde recibieron el pienso de alevines de bagre (35 % de proteína bruta). Finalizado este tiempo, se pescaron y seleccionaron 270 peces, de 10.4 ± 0.06 g de peso promedio, los que se distribuyeron al azar en tres tratamientos con tres repeticiones, según diseño completamente aleatorizado. Las unidades experimentales consistieron en nueve tanques circulares de cemento de 68 L, donde se colocaron 30 peces y se mantuvo el flujo de agua a 0.2 L/min las 24 h.

Los tratamientos fueron el pienso para alevinaje de bagres (control) y dos dietas alternativas con ensilado químico de subproductos pesqueros: uno elaborado con ácido sulfúrico al 98 % y el otro con ácido fórmico (tabla 1).

Preparación de los ensilados. Se utilizaron subproductos del fileteado de tilapias que se molieron en molino de carne (JAVAR 32, Colombia). La pasta resultante se dividió en dos porciones: una, con adición de 2 % de ácido sulfúrico al 98 % (p/v) y la otra, con 2 % de ácido fórmico (p/v). Ambas se almacenaron en dos recipientes plásticos con tapa durante siete días.

Preparación de las dietas. Las harinas (pescado, soya y trigo) y el salvado de trigo se molieron en molino de martillo, a tamaño de partícula de 250 µm. Se mezcló (mezcladora HOBART MC-600, Canadá) durante 10 min. para conformar un producto homogéneo, y posteriormente se adicionó el aceite de soya, la mezcla vitamino-mineral y los EP en forma húmeda (10 % de inclusión calculada en base seca y previa neutralización con 2.5 % de carbonato de calcio), y se continuó el mezclado durante 5 min. La aglomeración de las dietas se realizó en extrusora (DGP 70, China) con diámetro de 3 mm y el granulado se secó en estufa (Selecta, España) a 60 °C durante 24 h. El alimento control se preparó en iguales condiciones a las experimentales. Las determinaciones bromatológicas

Table 1. Chemical and percentual composition of experimental diets for fingerlings of *Clarias gariepinus* (g/100 g of dry weight)

Ingredients	D-I Control	D-II EPS	D-III EPF
Fishmeal	25.00	-	-
Silage with sulfuric acid (EPS)	-	10.00	-
Silage with formic acid (EPF)	-	-	10.00
Soybean meal	30.00	40.00	40.00
Wheat meal	25.00	25.00	25.00
Wheat bran	15.00	20.00	20.00
Soybean oil	4.00	3.00	3.00
Dicalcium phosphate	-	1.00	1.00
Mineral and vitamin premix	1.00	1.00	1.00
Total	100.00	100.00	100.00
Dry matter, %	88.11	88.46	89.11
Crude protein, %	34.50	27.91	27.39
Ether extract, %	7.54	7.66	7.36
Crude fiber, %	4.55	4.97	4.81
Ashes, %	8.32	7.18	7.13
Digestible energy (MJ/kg)	12.40	12.11	11.96
CP/DE (g/MJ)	27.82	23.04	22.90

*Vitamin-mineral mixture (kg of diet): vitamin A, 500IU; vitamin D, 100 IU; vitamin E, 75,000 mg; vitamin K, 20,000 mg; vitamin B₁, 10,000 mg; vitamin B₃, 30,000 mg; vitamin B₆, 20,000 mg; vitamin B₁₂, 100 mg; vitamin D, 60,000 mg; niacin, 200,000 mg; folic acid, 500 mg; biotin, 0.235 mg; selenium, 0.2 g; iron, 80 g; manganese, 100g; zinc, 80 g; copper, 15g; potassium chloride, 4g; manganese oxide, 0.6g; sodium bicarbonate, 1.5g; iodine, 1.0g; cobalt, 0.25g; EPS: fish silage with sulfuric acid; EPF: fish silage with formic acid

by AOAC (2016) and digestible energy was calculated regarding the caloric coefficients referred by Toledo *et al.* (2015).

Experimental procedure. Values of temperature and dissolved oxygen were daily taken with a digital oximeter (HANNA, Romania), and ammonium levels were determined once a week with a water colorimetric kit (Aquamerck, Germany). Diets were offered in two rations at 6 % of body weight (9:00 and 15:30 h) for 60 d. Every 15 d, rations were fit, and, at the end of the bioassay, all animals were individually weighed with the use of a digital balance (Sartorius, Germany) to calculate the following productive indicators:

-Final mean weight

-Feed conversion (FCN) = added feed/weight gain

-Protein efficiency (PE) = weight gain/ provided protein

-Survival (S) = Number of final animals/number of initial animals x 100

Statistical analysis. The assumptions of normality were verified with Shapiro and Wilk (1965) test and by homogeneity of variance, according to Levene (1960) test. One-way analysis of variance was performed using the statistical package INFOSTAT version 2012 (Di Rienzo *et al.* 2012). When differences were found ($P < 0.05$), means were compared by Duncan (1955) multiple range test.

se realizaron según los métodos descritos por AOAC (2016) y la energía digestible se calculó de acuerdo con los coeficientes calóricos referidos por Toledo *et al.* (2015).

Procedimiento experimental. Diariamente se tomaron los valores de temperatura y oxígeno disuelto con oxímetro digital (HANNA, Rumania), y una vez por semana los niveles de amonio con un kit colorimétrico de aguas (Aquamerck, Alemania). Las dietas se ofrecieron en dos raciones al 6 % del peso corporal (9:00 y 15:30 h) durante 60 d. Cada 15 d, las raciones se ajustaron, y al final del bioensayo se realizó pesaje individual a todos los animales con la utilización de una balanza digital (Sartorius, Alemania) para calcular los indicadores productivos siguientes:

- Peso medio final.

- Conversión alimentaria (FCA) = alimento añadido/ganancia peso

- Eficiencia proteica (EP)= ganancia en peso/ proteína suministrada

- Supervivencia (S)= Número de animales finales/ número de animales iniciales x 100.

Análisis estadístico. Los supuestos de normalidad se verificaron a partir de la dócima de Shapiro y Wilk (1965) y por homogeneidad de varianza, según la dócima de Levene (1960). Se realizó análisis de varianza de clasificación simple mediante el paquete estadístico INFOSTAT versión 2012 (Di Rienzo *et al.* 2012). Cuando se encontraron

Economic analysis. It was carried out according to Toledo *et al.* (2015). Costs of diets were calculated from the international prices of raw materials for August, 2020 (<http://www.indexmundi.com>) (table 2), plus 45 % of additional expenses for Cuba (transportation, maquila and administrative costs) (table 2). These values were multiplied by food conversions to find out feed costs, which accounted for 60% of total production expenses. The value of the production (US \$ 3400.00/t) and the silage were obtained from the records of the EDTA Department of Economics.

diferencias ($P < 0.05$), las medias se compararon por la d cima de rangos múltiple de Duncan (1955).

Análisis económico. Se realizó según Toledo *et al.* (2015). Se calcularon los costos de las dietas a partir de los precios internacionales de las materias primas para agosto de 2020 (<http://www.indexmundi.com>) (tabla 2), más 45 % por concepto de gastos adicionales para Cuba (transportación, maquila y administrativos) (tabla 2). Estos valores se multiplicaron por las conversiones alimentarias para conocer los costos de alimentación, los que consideraron 60 % de los gastos totales de producción. El valor de la producción (US \$ 3400.00/t)

Table 2. International prices of raw materials used in the formulation of the experimental rations (USD \$ / t)

Raw materials	USD \$
Fish meal	1479.92
Soybean meal	384.55
Wheat meal	198.42
Wheat bran	70.00
Soybean oil	866.94
Dicalcium phosphate	423.10
Mineral-vitamin mix	1975.11

Results and Discussion

During the experimental period, temperature and dissolved oxygen of water in the containers ranged between 25.7 and 26.9  C, and between 5.1 and 6.0 mg/L, respectively. Ammonia level was maintained close to 0.01 mg/L through water circulation. These values are considered comfortable for the good productive performance of the species (Toledo *et al.* 2015).

The fast intake of both diets with FS was observed, which shows its good acceptability by the fish throughout the bioassay. On the contrary, Llanes *et al.* (2017) ensiled meat by-products with 1 % of sulfuric acid at 98 % (w/v) and included the product in an extruded ration for African catfish. As a result, they obtained the highest feed intake and the best productive indicators with commercial feed, which they attributed to the high levels of saturated fat in meat by-products and ration acidity.

It is important to note that the pH value of the silage with 98 % of sulfuric acid was between 3.2 and 3.4 during storage, values higher than those obtained in meat silages, with a pH of 1.81 (Portales *et al.* 2015) and 2.06 (Llanes *et al.* 2017) during the seven days of storage. This could indicate that the concentration of scales and spines of tilapia by-products contributes to the buffering effect on the acidity of silage, which, when subsequently neutralized with calcium carbonate, further reduces the acidity for its inclusion into the extruded diets.

y de los ensilados se obtuvieron de los registros del Departamento de Economía de la EDTA.

Resultados y Discusión

Durante el período experimental, la temperatura y el oxígeno disuelto del agua de los recipientes oscilaron entre 25.7 y 26.9  C, y entre 5.1 y 6.0 mg/L, respectivamente. El nivel de amoníaco se mantuvo cercano a 0.01 mg/L mediante la circulación de agua. Estos valores se consideran de confort para el buen desempeño productivo de la especie (Toledo *et al.* 2015).

Se observó el consumo rápido de ambas dietas con EP, lo que evidencia su buena aceptabilidad por parte de los peces durante todo el bioensayo. Por el contrario, Llanes *et al.* (2017) ensilaron subproductos cárnicos con 1 % de ácido sulfúrico al 98 % (p/v) e incorporaron el producto en una ración extrusada para bagres africanos. Como resultado obtuvieron el mayor consumo de alimento y los mejores indicadores productivos con el pienso comercial, lo que atribuyeron a los altos niveles de grasa saturada de los subproductos cárnicos y a la acidez de la ración.

Es importante señalar que el valor de pH del ensilado con ácido sulfúrico al 98 % estuvo entre 3.2 y 3.4 durante su almacenamiento, valores superiores a los obtenidos en ensilados cárnicos que presentaron pH de 1.81 (Portales *et al.* 2015) y 2.06 (Llanes *et al.* 2017) durante los siete días de almacenamiento. Esto pudiera indicar que la concentración de escamas y espinas de los subproductos de tilapia contribuye con el efecto buffer a la acidez del ensilado, que al neutralizarse posteriormente con

No differences were found in the growth indicators and feed conversion ($P < 0.05$) between control and FS diets (table 3). These results were favorable with respect to those reported by Llanes and Parisi (2020), who managed to substitute 15 % more FM, with the same experimental diets, and they were also favorable in relation to Llanes *et al.* (2017), who worked with meat silage in the same species. They are also superior to those reported by Guzel *et al.* (2011), by substituting 50 % of FM by FS in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), and those of Bringas *et al.* (2018), who only succeeded in substituting 9 % of soybean meal by the inclusion of 5 % of fermented silage of tilapia by-products in American catfish (*Ictalurus punctatus*). These variations may be possible due to the different feeding habits of the species, silage material, ingredients and their inclusion levels in rations, as well as water quality.

carbonato de calcio disminuye más la acidez para su incorporación a las dietas extrusadas.

No se encontraron diferencias en los indicadores de crecimientos y la conversión alimentaria ($P < 0.05$) entre el control y las dietas de EP (tabla 3). Estos resultados fueron favorables con respecto a los informados por Llanes y Parisi (2020), quienes lograron sustituir 15 % más de HP, con iguales dietas experimentales, y también lo fueron en relación con los de Llanes *et al.* (2017), que trabajaron con ensilado cárnico en la misma especie. También son superiores a los referidos por Guzel *et al.* (2011), al sustituir 50 % de la HP por EP en truchas arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*), y a los de Bringas *et al.* (2018), quienes solo lograron sustituir 9 % de harina de soya por la inclusión de 5 % de ensilado fermentado de subproductos de tilapias en bagres americanos (*Ictalurus punctatus*). Estas variaciones pueden ser posibles por los diferentes hábitos alimentarios de las especies, el material

Table 3. Productive performance of *Clarias gariepinus* fingerlings when replacing fishmeal by chemical silage of fishery by-products

Indicators	D-I Control	D-II EPS	D-III EPF	±SE	p
Final weight, g	66.63 ± 3.51	66.27 ± 3.08	70.71 ± 3.44	-	0.652
Feed conversion	1.18	1.18	1.15	0.01	0.316
Protein efficiency	2.34 ^a	3.09 ^b	3.18 ^b	0.13	0.001
Survival, %	100.00	100.00	96.66	0.78	0.125

^{a,b} Different letters in the same row indicate differences for $P < 0.05$ according to Duncan (1955)

EPS: fish silage with sulfuric acid

EPF: fish silage with formic acid

It should also be considered that the African catfish is an omnivorous species with carnivorous tendencies (Toledo *et al.* 2015), but it has been exploited for 20 years with a diet based, fundamentally, on plant feed. Taking this condition into account, it could be predicted that, from multiple generations of descendants, there will be an adaptation of the digestive physiology, in terms of the most efficient use of this type of protein, which would allow it to be more effective with protein of animal origin.

Protein efficiency was higher ($P < 0.05$) for diets with FS, due to the fact that, with lower levels of dietary protein, equal weight gains were achieved with respect to control. This is related to greater availability of partially hydrolyzed protein and energy, as well as the acidification offered by FSs, which improve digestibility of nutrients and the availability of minerals such as phosphorus, which means a growth of animals (Toledo and Llanes 2013 and Suárez *et al.* 2018). It is also evidenced, protein savings due to the oil contribution of the FSs. These provide a lower protein/energy ratio compared to control, and the productive indicators are not affected.

Bringas *et al.* (2018) characterized the by-products of tilapia filleting and found all the essential amino acids, and particularly adequate concentrations of lysine (7.29 g/100g of protein) and methionine

ensilado, los ingredientes y sus niveles de inclusión en las raciones, así como por la calidad del agua.

Se debe tener en cuenta, además, que el bagre africano es una especie omnívora con tendencias carnívoras (Toledo *et al.* 2015), pero se explota hace 20 años con una alimentación basada, fundamentalmente, en pienso vegetal. Teniendo en cuenta esta condición, se pudiera predecir que a partir de múltiples generaciones de descendientes haya una adaptación de la fisiología digestiva, en cuanto a la utilización más eficiente de este tipo de proteína, lo que permitiría ser más eficaz con la proteína de origen animal.

La eficiencia proteica fue mayor ($P < 0.05$) para las dietas con EP, debido a que con menores niveles de proteína dietética se alcanzaron iguales ganancias de peso respecto al control. Esto se relaciona con mayor disponibilidad de proteína parcialmente hidrolizada y energía, así como con la acidificación que ofrecen los EP, que mejora la digestibilidad de los nutrientes y la disponibilidad de minerales como el fósforo, lo que se traduce en el crecimiento de los animales (Toledo y Llanes 2013 y Suárez *et al.* 2018). Se evidencia, además, ahorro de proteínas por el aporte de aceite de los EP. Estos proporcionan menor relación proteína/energía respecto al control, y no se perjudican los indicadores productivos.

Bringas *et al.* (2018) caracterizaron los subproductos del fileteado de tilapias y encontraron todos los aminoácidos esenciales, y particularmente concentraciones adecuadas

(3.99 g/100g of protein), which must be quantified in formulations for fish because they are limiting in most protein ingredients (Abdo-de la Parra *et al.* 2017), mainly in plant feed. In addition, the cited authors reported the fatty acid profile, in which the highest concentrations were palmitic acid C16: 0 (25.56 %), palmitoleic acid C16:1 (6.70 %), linoleic acid C18:2n-6 (34.31 %) and linolenic acid C18:3n-3 (11.51 %), and the proportion of fatty acids n-6/n-3 from 2.3 to 1, very favorable values in the nutrition of African catfish.

Raa and Gilberg (1982) reported that chemical silages have high protein hydrolysis coefficients, due to the activity of digestive enzymes, specifically proteases of the fish itself, which increase low molecular weight proteins. The increase in the content of released peptides and free amino acids can generate greater chemoattractant potential, and consequently increase the nutritional stimulus in carnivorous and omnivorous fish (Valenzuela and Morales 2016).

Survival was excellent (superior to 96.66 %), which indicates that the inclusion of chemical fish silage in extruded diets does not promote mortality in fingerlings, and did not affect the productive indicators during the bioassay (table 3).

It was confirmed that there were no differences between the use of sulfuric and formic acids, with respect to growth and feed efficiency indicators (table 3). Therefore, either of the two can be used in the preparation of FS for its inclusion in dry diets, as long as they are neutralized and the pH is verified before their inclusion into the ration.

According to the consulted literature, in fish feeding, the first FSs were made with mineral acids (sulfuric and hydrochloric) and good results were obtained, but silos were not protected against *Aspergillus flavus* fungi, a producer of aflatoxins capable of growing on the lipid surface of FSs (Raa and Gilberg 1982). Hence, to retain bacterial growth with mineral acids, the pH must range between 2 and 3, so a rigorous neutralization will be required for its incorporation into dry rations. A recent study (Perea *et al.* 2018) reported that organic acids are preferred, mainly formic, because although they are more expensive, the price is offset by their antifungal power and by ensuring the preservation of the product for a longer time, without causing excessive decrease pH (close to 4), important issue in the manufacture of extruded feed.

In Cuba, there are productive experiences in the preparation of FS with sulfuric acid, in which an adequate conservation is reported for 8 and 10 days of storage, without previous neutralization, for its use in the preparation of humid rations (40-50 % of dry matter), which supply 20-30 % of the daily diet for African catfish, with good zootechnical results (Toledo *et al.* 2013). This could indicate that, in humid diets, water

de lisina (7.29 g/100g de proteína) y metionina (3.99 g/100g de proteína), que hay que cuantificar en formulaciones para peces por ser limitantes en la mayoría de los ingredientes proteicos (Abdo-de la Parra *et al.* 2017), fundamentalmente en piensos vegetales. Además, los autores citados informaron el perfil de ácidos grasos, en el que las mayores concentraciones fueron el ácido palmítico C16:0 (25,56%), palmitoleico C16:1 (6,70%), linoleico C18:2n-6 (34,31%) y linolénico C18:3n-3 (11,51%), y la proporción de ácidos grasos n-6/n-3 de 2.3 a 1, valores muy favorables en la nutrición de bagres africanos.

Raa y Gilberg (1982) informaron que los ensilados químicos tienen altos coeficientes de hidrólisis proteica, debido a la actividad de las enzimas digestivas, específicamente las proteasas del propio pescado, que aumentan las proteínas de bajo peso molecular. El aumento en el contenido de péptidos liberados y aminoácidos libres puede generar mayor potencial quimioattractante, e incrementar consecuentemente el estímulo nutritivo en peces carnívoros y omnívoros (Valenzuela y Morales 2016).

Las supervivencias fueron excelentes (mayor que 96.66 %), lo que indica que la inclusión de ensilados químicos de pescado en dietas extrusadas no promueve la mortalidad en los alevines, y no influyeron de forma negativa en los indicadores productivos durante el bioensayo (tabla 3).

Se corroboró que no hubo diferencias entre la utilización de los ácidos sulfúrico y fórmico, respecto a los indicadores de crecimiento y eficiencia alimentaria (tabla 3). Por tanto, cualquiera de los dos se puede usar en la elaboración de EP para su incorporación en dietas secas, siempre que se neutralicen y se verifique el pH antes de su incorporación a la ración.

Según la literatura consultada, en la alimentación de peces los primeros EP se elaboraron con ácidos minerales (sulfúrico y clorhídrico) y se obtuvieron buenos resultados, pero los silos no se encontraron protegidos contra hongos *Aspergillus flavus*, productor de aflatoxinas capaces de crecer en la superficie lipídica de los EP (Raa y Gilberg 1982). De ahí que, para retener el crecimiento bacteriano con ácidos minerales, el pH debe oscilar entre 2 y 3, por lo que se necesitará una neutralización rigurosa para su incorporación a raciones secas. Un trabajo reciente (Perea *et al.* 2018) informó que se prefieren los ácidos orgánicos, fundamentalmente el fórmico, porque, aunque son más costosos el precio se contrarresta por su poder antifúngico y por asegurar la conservación del producto por más tiempo, sin provocar descenso excesivo del pH (próximo a 4), cuestión importante en la fabricación de piensos extrusados.

En Cuba existen experiencias productivas en la elaboración de EP con ácido sulfúrico, en las que se informa una conservación adecuada durante 8 y 10 días de almacenamiento, sin previa neutralización, para su utilización en la elaboración de raciones húmedas (40 – 50 % de materia seca), que suplen 20-30 % de la alimentación diaria en bagres africanos, con buenos resultados zootécnicos (Toledo *et al.* 2013). Esto pudiera

percentage in the ration dilutes the acidity concentration, which does not occur in extruded diets, in which extrusion concentrates the ration acidity.

The economic analysis (table 4) showed that diets with FS were less expensive, because FM was not included, which has the highest price of all protein inputs (table 2). Likewise, food costs and total expenses of production were lower with FS, due to the low cost of diets and the similar food conversions with respect to commercial feed. Therefore, they provided the highest profits and savings in the production of one ton of whole fish. Llanes and Parisi (2020) had less savings with equal diets (US \$ 557.65 and 367.35), because commercial feed had 10 % of FM.

indicar que, en dietas húmedas, el porcentaje de agua en la ración diluye la concentración de acidez, lo que no ocurre en dietas extrusadas, en las que la extrusión concentra la acidez de la ración.

El análisis económico (tabla 4) mostró que las dietas con EP fueron menos costosas, por no incluir HP, que tiene el precio más alto de todos los insumos proteicos (tabla 2). De igual forma, los costos de alimentación y gastos totales de producción fueron menores con EP, debido al menor costo de las dietas y a las conversiones alimentarias similares con respecto al pienso comercial. Por tanto, proporcionaron las mayores utilidades y ahorros en la producción de una tonelada de pescado entero. Llanes y Parisi (2020) tuvieron menos ahorros con iguales dietas (\$ US 557.65 y 367.35),

Table 4. Economic analysis of the production of *Clarias gariepinus* with the experimental diets (US \$/t)

Indicator	D-I Control	D-II EPS	D-III EPF
Ration cost	869.78	440.23	506.06
Feeding cost	1026.34	519.47	581.97
Total production expenses	1710.56	865.78	969.95
Profits	1689.44	2534.22	2430.05
Savings	-	844.78	740.61

Production value: \$ US 3,400.00 /t of whole fish

Profits= production value - total expenses

EPS: fish silage with sulfuric acid

EPF: fish silage with formic acid

Regarding FSs, the use of 98 % of sulfuric acid was the most economical alternative because this input is produced in Cuba, while formic acid is imported. Thus, the cost of processing these by-products by silage techniques with 98% of sulfuric acid was US \$ 0.362/kg of dry matter (DM), while it cost US \$0.816/kg of DM with formic acid. These amounts may vary depending on the price of acids and fishery by-products, but the trend is for them to be lower, compared to the use of FM (US \$ 1.47/kg).

It is evident that the substitution of FM for FS in the formulation of aquaculture feeds has repercussions in the reduction of feeding costs and in obtaining higher profits, which coincides with studies by Guzel *et al.* (2011), Perea *et al.* (2018) and Llanes and Parisi (2020). FM is the key protein ingredient in feeds for fish due to its high nutritional value, but its high price does not support the development of intensive fish farming for freshwater species of low commercial value. Furthermore, its production in Cuba is not justified by the limited availability of fishery by-products. Hence, an alternative is FS made with the same raw material, to which quality and digestibility of its protein are added (Valenzuela and Morales 2016).

Conclusions

Chemical silage of fishery by-products substituted a

debido que el pienso comercial tuvo 10 % de HP.

En cuanto a los EP, la utilización del ácido sulfúrico al 98 % fue la más económica porque este insumo se produce en Cuba, mientras que el ácido fórmico es importado. Así, el costo del procesamiento de estos subproductos por técnicas de ensilaje con ácido sulfúrico al 98 % fue de US \$ 0.362/kg de materia seca (MS), mientras que con fórmico fue de US \$ 0.816 /kg de MS. Estos montos pueden variar en dependencia del precio de los ácidos y los subproductos pesqueros, pero la tendencia es a que sea menor, en comparación con el uso de la HP (US \$ 1.47 /kg).

Se evidencia que el reemplazo de la HP por EP en la formulación de alimentos acuícolas repercute en la reducción de los costos de alimentación y en la obtención de mayores utilidades, lo que coincide con estudios de Guzel *et al.* (2011), Perea *et al.* (2018) y Llanes y Parisi (2020). La HP es el ingrediente proteico clave en alimentos acuícolas por su alto valor nutritivo, pero su elevado precio no sustenta el desarrollo de una piscicultura intensiva para especies de agua dulce de bajo valor comercial. Además, su producción en Cuba no se justifica por la poca disponibilidad de subproductos pesqueros. De ahí que una alternativa sea el EP elaborado con igual materia prima, al que se le adiciona su calidad y la digestibilidad de su proteína (Valenzuela y Morales 2016).

Conclusiones

Los ensilados químicos de subproductos pesqueros

high percentage of fishmeal in extruded diets for *Clarias gariepinus* fingerlings, with a positive economic effect, by reducing the importation of fishmeal.

Acknowledgements

The authors would like to thank the National Center for the Production of Laboratory Animals (CENPALAB, initials in Spanish) for the support provided in the acquisition of raw materials for preparing the experimental diets.

Conflict of interest

The authors declare that there are no conflicts of interests among them

Author's contribution

J. Llanes: Original idea, design and conducting the experiment, statistical analyses, manuscript writing

Giuliana Parisi: design and conducting the experiment, statistical analyses, manuscript writing

sustituyeron un alto porcentaje de harina de pescado en dietas extrusadas para alevines de *Clarias gariepinus*, con efecto económico positivo, al disminuir la importación de harina de pescado.

Agradecimientos

Se agradece al Centro Nacional de Producción de Animales de Laboratorios (CENPALAB) por el apoyo brindado en la adquisición de las materias primas para la elaboración de las dietas experimentales.

Conflicto de intereses

Los autores declaran que no existen conflictos de intereses

Contribución de los autores

J. Llanes: : Idea original, diseño y condujo el experimento, realizó los análisis estadísticos, redacción del manuscrito.

Giuliana Parisi: Diseño y condujo el experimento, realizó los análisis estadísticos, redacción del manuscrito.

References

- Abdo-de la Parra, M.I., Rodríguez, G.A., Rodríguez, L.E., Domínguez, P., Román, J.C., Velasco, G. & Ibarra, L. 2017. "Composición proximal y perfil de aminoácidos de estadios tempranos del pargo flamenco *Lutjanus guttatus*". Revista de Biología Marina y Oceanografía, 52(2): 325-332, ISSN: 0718-1957, DOI: <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-19572017000200011>.
- AOAC (Association of Official Analytical Chemists). 2016. Official Methods of Analysis of AOAC International. 20th Ed. Latimer Jr, G.W. (ed). Ed. AOAC International, Rockville M.D, U.S.A., ISBN: 9780935584875.
- Bringas, L., Zamorano, A., Rojo, J., González, M.L., Pérez, M., Cárdenas, J.L. & Navarro, G. 2018. "Evaluación del ensilado fermentado de subproductos de tilapias y su utilización como ingrediente en dietas para bagre del canal". Revista de Ciencias Biológicas y de la Salud, 20(2): 85-94, ISSN: 1665-1456, DOI: <https://doi.org/10.18633/biotecnica.v20i2.604>.
- Di Rienzo, J.A., Casanoves, F., Balzarini, M.G., González, L., Tablada, M. & Robledo, C.W. 2012. InfoStat. Version 2012 [Windows]. Grupo InfoStat, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. Available: <http://www.infostat.com.ar>.
- Duncan, D.B. 1955. "Multiple Range and Multiple F Tests". Biometrics, 11(1): 1-42, ISSN: 0006-341X, DOI: <https://doi.org/10.2307/3001478>.
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). 2020. El estado Mundial de la Pesca y Acuicultura. La sostenibilidad en acción. Rome, Italy, p. 243, ISBN: 978-92-5-132756-2, DOI: <https://doi.org/10.4060/ca9229es>.
- Guzel, S., Yaslak, H., Gullu, K., Ozturk, E. 2011. "The effect of feed made from fish processing waste silage on the growth of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)". African Journal of Biotechnology, 10(25): 5053-5059, ISSN: 1684-5315, DOI: <https://doi.org/10.5897/AJB11.367>.
- Levene, H. 1960. Robust tests for the equality of variance. Contributions to Probability and Statistics. 1st Ed. Ed. Stanford University Press, Palo Alto, California, U.S.A., pp. 278-292.
- Llanes, J. & Parisi, G. 2020. "Productive and economic indicators of *Clarias gariepinus*, fed with fishery byproducts ensiled with sulfuric and formic acids". Pastos y Forrajes, 43(3): 163-167, ISSN: 0864-0394.
- Llanes, J.E., Toledo, J., Portales, A. & Sarduy, L. 2017. "Partial replacement of fishmeal by meat silage in extruded diets for *Clarias gariepinus*". Cuban Journal of Agricultural Science, 51(1): 1-7, ISSN: 2079-3480.
- Perea, C., Garcés, Y.J., Muñoz, L.S., Hoyos, J.L. & Gómez, J.A. 2018. "Valoración económica del uso de ensilaje de residuos piscícolas en la alimentación de *Oreochromis spp.*". Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial, 16(1): 43-51, ISSN: 1692-3561, DOI: <http://dx.doi.org/10.18684/bsaa.v16n1.623>.
- Portales, A., Llanes, J.E. & Toledo, J. 2015. "Chemical characterization of pig meat by-products silage for fish". Revista Cubana de Investigaciones Pesqueras, 32(1): 36-39, ISSN: 0138-8452.
- Raa, J. & Gildberg, A. 1982. "Fish Silage: A review". CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 16(4): 383-419, ISSN: 1549-7852, DOI: <https://doi.org/10.1080/10408398209527341>.
- Shapiro, S. & Wilk, B. 1965. "An analysis of variance test for normality (complete samples)". Biometrika, 52(2): 591-611, ISSN: 1464-3510, DOI: <http://dx.doi.org/10.2307/2333709>.
- Suarez, L., Montes, J. & Zapata, J. 2018. "Optimización del Contenido de Ácidos en Ensilados de Vísceras de Tilapia Roja (*Oreochromis spp.*) con Análisis del Ciclo de Vida de los Alimentos Derivados". Información Tecnológica, 29(6): 83-94, ISSN: 0718-0764, DOI: <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-07642018000600083>.
- Toledo, J. & Llanes, J. 2013. Alternativas para la alimentación de organismos acuáticos. Experiencias con agregados de ensilado realizadas en Cuba. In: Nutrición y Alimentación para la Acuicultura de Recursos limitados. Depello, G., Witchiensky, E. & Wicki, G. (eds.). Secretaria de Agricultura, Ganadería y Pesca, Buenos Aires, Argentina, pp. 57-79.

Toledo, J., Llanes, J. & Romero, C. 2015. "Nutrición y alimentación de peces de aguas cálidas". *AcuaCUBA*, 17(1): 5-29, ISSN: 1608-0467.

Valenzuela, C. & Morales, M.S. 2016. "Ensilado de pescado seco: una alternativa tentadora para alimentación animal". *SalmonExpert*, 41(6): 55-58.

Received: December 8, 2020

Accepted: February 5, 2021