

La investigación reportada en esta tesis es parte de los programas de investigación del CICESE (Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California).

La investigación fue financiada por el CONAHCYT (Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías).

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México). El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo o titular de los Derechos de Autor.

**Centro de Investigación Científica y de Educación
Superior de Ensenada, Baja California**



**Maestría en Ciencias
en Acuicultura**

**Efecto del polvo de romero (*Rosmarinus officinalis*) en el
crecimiento, actividad enzimática y composición proximal de
juveniles de lobina rayada (*Morone saxatilis*)**

Tesis
para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de
Maestro en Ciencias

Presenta:

Erick Adolfo Barrios García

Ensenada, Baja California, México
2023

Tesis defendida por
Erick Adolfo Barrios García

y aprobada por el siguiente Comité

Dra. Mónica Hernández Rodríguez
Directora de tesis

Dra. Ma. Elena Solana Arellano

Dr. Roberto Cruz Flores

M. en C. Abelardo Campos Espinoza



Dr. Roberto Cruz Flores
Coordinador del Posgrado en Acuicultura

Dra. Ana Denise Re Araujo
Directora de Estudios de Posgrado

Resumen de la tesis que presenta **Erick Adolfo Barrios García** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Acuicultura.

Efecto del polvo de romero (*Rosmarinus officinalis*) en el crecimiento, actividad enzimática y composición proximal de juveniles de lobina rayada (*Morone saxatilis*)

Resumen aprobado por:

Dra. Mónica Hernández Rodríguez
Directora de tesis

La acuicultura intensiva ha experimentado un rápido crecimiento en las últimas décadas. Sin embargo, la intensificación de los cultivos acuícolas ha ocasionado problemas como el estrés en los organismos, desarrollo de enfermedades y un menor crecimiento. Se ha explorado el uso de plantas aromáticas como el romero (*Rosmarinus officinalis*) por su efecto como antibiótico, antiestresante y estimulante de la secreción de enzimas digestivas y el crecimiento. El objetivo de este estudio fue evaluar la adición de polvo de romero en la dieta de la lobina rayada (*Morone saxatilis*) y determinar su efecto en la supervivencia, crecimiento, actividad enzimática (tripsina, quimiotripsina, lipasa, amilasa y proteasas alcalinas totales -PAT-) y composición proximal. Se realizó un bioensayo durante 70 días en un sistema de recirculación de agua de mar donde se probaron cuatro dietas experimentales con diferentes cantidades de polvo de romero: control (TC), 2.5 (T2.5), 5 (T5) y 10 (T10) g kg⁻¹ de dieta. Cada tratamiento se realizó por triplicado con 20 peces por réplica con un peso inicial de 19.59 ± 2.43 g. Las lobinas se alimentaron tres veces al día al 4% de su biomasa. Al final del bioensayo, el peso final de los peces en T5 y T10 fue significativamente menor en comparación con el TC. No se observaron diferencias significativas en parámetros de crecimiento y eficiencia alimenticia. El índice hepatosomático en el T10 fue significativamente mayor en relación con TC. En el intestino, la actividad de la tripsina fue significativamente menor en el T10 y las PAT en T2.5 y T10. En ciegos pilóricos, la actividad de la tripsina fue significativamente menor en el T10, la lipasa en T2.5, T5 y T10 y las PAT en T2.5 y T10. La inclusión de polvo de romero en la dieta de lobina en concentraciones de 5 y 10 g kg⁻¹ disminuye el crecimiento y la actividad de tripsina, PAT y lipasa en intestino y ciegos pilóricos. Se requiere investigar la composición química del romero y su efecto como inhibidor de enzimas digestivas y modulador de la microbiota intestinal, además de incluir otros indicadores para conocer de forma integrada el desempeño fisiológico de la especie.

Palabras clave: lobina rayada, romero, crecimiento, enzimas digestivas, composición proximal

Abstract of the thesis presented by **Erick Adolfo Barrios García** as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Aquaculture

Effect of rosemary powder (*Rosmarinus officinalis*) on growth, enzyme activity, and proximal composition of juvenile striped bass (*Morone saxatilis*)

Abstract approved by:

Dra. Mónica Hernández Rodríguez
Thesis Director

Intensive aquaculture has experienced a very rapid growth in recent years. However, the intensification of aquaculture has led to issues such as stress in organisms, the development of diseases, and reduced growth. The use of aromatic plants, such as rosemary (*Rosmarinus officinalis*), has been explored due to its antibiotic, anti-stress, and digestive enzyme secretion-stimulating effects, as well as its growth-promoting properties. The objective of this study was to evaluate the addition of rosemary powder to the diet of striped bass (*Morone saxatilis*) and determine its effect on survival, growth, enzyme activity (trypsin, chymotrypsin, lipase, amylase, and total alkaline proteases -PAT-), and proximate composition. A 70-day bioassay was conducted in a recirculating seawater system, testing four experimental diets with varying amounts of rosemary powder: control (TC), 2.5 (T2.5), 5 (T5), and 10 (T10) g kg⁻¹ of diet. Each treatment was performed in triplicate with 20 fish per replicate, with an initial weight of 19.59 ± 2.43 g. The striped bass were fed three times a day at 4% of their biomass. At the end of the bioassay, the final weight of fish in T5 and T10 was significantly lower compared to TC. There were no significant differences in growth parameters and feed efficiency. The hepatosomatic index in T10 was significantly higher compared to TC. In the intestine, trypsin activity was significantly lower in T10, and PAT in T2.5 and T10. In the pyloric caeca, trypsin activity was significantly lower in T10, lipase in T2.5, T5, and T10, and PAT in T2.5 and T10. The inclusion of rosemary powder in striped bass diets at concentrations of 5 and 10 g kg⁻¹ reduces growth and the activity of trypsin, PAT, and lipase in the intestine and pyloric caeca. Further research is imperative to delve into the intricate chemical composition of rosemary, explore its role as a potent digestive enzyme inhibitor, and its potential as a modulator of the intestinal microbiota. This endeavor should also encompass the incorporation of various additional indicators, aiming for a holistic grasp of the species' physiological performance.

Keywords: striped bass, rosemary, growth, digestive enzymes, proximal composition

Dedicatoria

A mis padres Josefina y Marco Antonio que me han dado todo su cariño, apoyo, confianza y enseñanzas que me han permitido alcanzar mis metas.

Gracias por todo.

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT) por otorgarme una beca para realizar mis estudios de maestría.

Al Centro de Investigación Científica y Educación Superior de Ensenada, Baja California (CICESE) por permitirme estudiar en sus instalaciones.

A la Empresa Pacifico Aquaculture por facilitarme los organismos de lobina rayada y el alimento para esta investigación.

A la Dra. Mónica Hernández Rodríguez por la paciencia, la motivación y las enseñanzas brindadas. Por tener siempre la disponibilidad para responder mis preguntas, así como hacerme las observaciones adecuadas para mejorar. Admiro su dedicación y experiencia.

A los miembros del comité de tesis Dr. Roberto Cruz Flores, Dra. Ma. Elena Solana Arellano y el M. en C. Abelardo Campos Espinoza por los comentarios, preguntas y observaciones que permitieron que esta investigación se realizara con éxito.

A Sofía por su compañía durante este reto. Por compartir lo más valioso en esta vida, su tiempo. Las pláticas, caminatas, cenas y todos los momentos a tu lado los atesoraré siempre.

Al técnico M. en C. Abelardo Campos Espinoza por el apoyo en las largas sesiones en laboratorio, por aclararme dudas y compartirme su experiencia en el uso de equipos y técnicas de laboratorio.

Al Laboratorio de Nutrición Acuícola por el uso de sus equipos y reactivos para el procesamiento de muestras.

Al técnico Luis Alberto Murillo Valenzuela por su apoyo en las adaptaciones a los sistemas, mantenimiento de organismos, compartir su vasta experiencia, ayuda durante las biometrías y ponerse la camiseta en el concurso de comida.

A Doris, mi compañera y amiga de laboratorio. Por todo el apoyo durante las biometrías, mantenimiento y por las divertidas pláticas. Me llevo una gran amistad.

A Jesica por apoyarme y motivarme durante varios años a realizar mis estudios de posgrado, saludos a la distancia.

A los técnicos Carlos Campos y Francisco Morineau por su apoyo en el funcionamiento del sistema de recirculación del Departamento de Acuicultura.

A los guardias Nancy y Don Mario por su apoyo en notificar el funcionamiento del sistema.

A las asistentes del departamento de Acuicultura Dalila, Cecilia y Bibiana por notificarme los pendientes que cumplir como alumno.

Al Departamento de Acuicultura y a su personal académico, técnico y administrativo por los aprendizajes brindados durante mi estancia.

Tabla de contenido

| | Página |
|--|-----------|
| Resumen en español..... | ii |
| Resumen en inglés..... | iii |
| Dedicatoria | iv |
| Agradecimientos..... | v |
| Lista de figuras..... | ix |
| Lista de tablas | x |
| | |
| Capítulo 1. Introducción..... | 1 |
| 1.1 Uso de fitogénicos en la acuicultura | 2 |
| 1.2 Uso de romero en la acuicultura..... | 3 |
| 1.3 Antecedentes | 6 |
| 1.3.1 Efecto del romero (<i>Rosmarinus officinalis</i>) en la fisiología de peces..... | 6 |
| 1.3.2 Cultivo de lobina rayada (<i>Morone saxatilis</i>)..... | 9 |
| 1.4 Justificación | 10 |
| 1.5 Hipótesis..... | 11 |
| 1.6 Objetivos | 11 |
| 1.6.1 Objetivo general..... | 11 |
| 1.6.2 Objetivos específicos..... | 11 |
| | |
| Capítulo 2. Metodología..... | 13 |
| 2.1 Obtención y aclimatación de peces | 13 |
| 2.2 Polvo de romero..... | 13 |
| 2.3 Preparación de dietas experimentales..... | 14 |
| 2.4 Bioensayo de alimentación | 14 |

| | | |
|---------------------------------------|---|-----------|
| 2.5 | Parámetros de crecimiento y productivos | 15 |
| 2.6 | Toma de muestra | 17 |
| 2.7 | Análisis de composición proximal de dieta y músculo de lobina rayada | 17 |
| 2.8 | Análisis de actividad enzimática..... | 18 |
| 2.9 | Análisis estadístico | 19 |
| Capítulo 3. Resultados | | 21 |
| 3.1 | Supervivencia | 21 |
| 3.2 | Parámetros de crecimiento y producción..... | 21 |
| 3.3 | Análisis proximal de dietas..... | 23 |
| 3.4 | Análisis proximal del músculo | 23 |
| 3.5 | Análisis enzimático | 25 |
| Capítulo 4. Discusión..... | | 27 |
| 4.1 | Efecto del romero en la supervivencia y crecimiento..... | 27 |
| 4.2 | Efecto del romero en la composición proximal del músculo de lobina rayada | 33 |
| 4.3 | Efecto del romero en la actividad enzimática | 34 |
| Capítulo 5. Conclusiones | | 40 |
| Literatura citada | | 41 |

Lista de figuras

| Figura | Página |
|---|--------|
| 1. Supervivencia de lobina rayada alimentada con dietas complementadas con polvo de romero en concentraciones de 0 (TC), 2.5 (T2.5), 5 (T5) y 10 (T10) g · kg ⁻¹ | 21 |
| 2. Crecimiento de lobina rayada alimentada con dieta complementada con polvo de romero. p<0.05..... | 22 |

Lista de tablas

| Tabla | Página |
|--|--------|
| 1. Técnicas utilizadas para la extracción de compuestos activos de plantas..... | 5 |
| 2. Parámetros de calidad de agua por tratamiento durante el bioensayo de alimentación con lobina rayada..... | 15 |
| 3. Crecimiento de juveniles de lobina rayada alimentadas con dietas complementadas con polvo de romero en concentraciones de 0 (TC), 2.5 (T2.5), 5 (T5) y 10 (T10) g · kg ⁻¹ | 23 |
| 4. Análisis proximal de dietas experimentales complementadas con polvo de romero. | 24 |
| 5. Análisis proximal de músculo de lobina rayada alimentada con dietas complementadas con polvo de romero..... | 24 |
| 6. Actividad enzimática en intestino y ciegos pilóricos de juveniles de lobina rayada alimentada con dietas complementadas con polvo de romero..... | 26 |

Capítulo 1. Introducción

En las últimas décadas, la actividad acuícola en el mundo ha experimentado un gran crecimiento en la producción de peces, moluscos y crustáceos. En el año 2020, se registró la mayor producción en la historia con 87.5 millones de toneladas. La acuicultura es una actividad económica importante, con un aporte de 265 mil millones de dólares (FAO, 2022). En los próximos años la acuicultura tendrá un papel fundamental en la seguridad alimentaria a nivel mundial para satisfacer la demanda de organismos acuáticos, además de contribuir a disminuir la presión pesquera en los océanos (Newton *et al.*, 2021).

China es el país con mayor producción acuícola a nivel mundial con el 35% del total de la producción, seguido de India con 8%, Indonesia con el 7%, Vietnam con el 5% y Perú con el 3% (FAO, 2022). En México, las especies de interés acuícola que predominan son de agua dulce, como la tilapia (*Oreochromis sp.*), el bagre (*Ictalurus punctatus*), la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) y la carpa (*Cyprinus carpio*); en cuanto a las especies de agua marina se tiene el camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*), el abulón rojo (*Haliotis rufescens*) y el atún aleta azul (*Thunnus orientalis*) (INAPESCA, 2021). En 2017, la cría y cultivo de estas especies representaron una producción de 404,000 toneladas, con un valor estimado de 17,813 millones de pesos, subrayando la relevancia económica de esta actividad en el país (CONAPESCA, 2018).

La alta demanda de productos acuáticos a nivel mundial ha posicionado a la acuicultura intensiva como protagonista, debido a su aporte de más del 50% del total de la producción. Los desarrollos que han permitido mayor producción acuícola son los sistemas de recirculación, diseño de dietas específicas para cada especie, mejora genética, uso de antibióticos, aireación mecánica y cambios regulares de agua (Henriksson *et al.*, 2018). Sin embargo, los desafíos relacionados con el aumento en los costos de la harina y el aceite de pescado, el impacto ambiental de los antibióticos, la creciente demanda de recursos de agua dulce y el estrés experimentado por los organismos en entornos de acuicultura de alta densidad son temas prioritarios de estudio para el impulso a la acuicultura sostenible (Manage, 2018; Olaussen, 2018).

El cultivo de organismos en condiciones de alta densidad puede resultar en estrés y aumentar la susceptibilidad a enfermedades infecciosas que tienen un impacto negativo en la producción (Hoseini *et al.*, 2019). El estrés desencadena una serie de respuestas a nivel endocrino y como resultado se producen cambios en el metabolismo, osmorregulación y parámetros hematológicos e inmunológicos. Derivado de los cambios en el metabolismo se ha observado en peces la disminución del crecimiento, menor supervivencia y alteraciones en el comportamiento, entre otros (Afonso, 2020; Karataş *et al.*, 2020). Las

consecuencias del estrés en los peces son el deterioro del estado de salud, disminución en la inmunidad, el incremento del contagio de enfermedades, desarrollo de enfermedades infecciosas y la disminución en el crecimiento (Reverter *et al.*, 2014).

1.1 Uso de fitogénicos en la acuicultura

La alta demanda de peces, crustáceos y moluscos ha propiciado que se incremente la producción en sistemas acuícolas intensivos (Tadese *et al.*, 2021). En acuicultura se pierde hasta el 60% de la producción por enfermedades infecciosas (Hernández-Contreras y Hernández, 2020). Para combatir estas enfermedades, se recurre al uso de antibióticos comerciales. Sin embargo, este enfoque conlleva la preocupante consecuencia de fomentar la resistencia en las bacterias del ecosistema y, al mismo tiempo, provoca la acumulación de estos antibióticos en los tejidos de los peces, lo que plantea un riesgo para la salud de los consumidores (Hernández-Contreras y Hernández, 2020). Por tal motivo, se ha propuesto el uso de plantas medicinales como tratamiento preventivo y terapéutico contra enfermedades infecciosas, así como una alternativa a los antibióticos comerciales (Reverter *et al.*, 2014; Zhu, 2020). La ventaja del uso de plantas medicinales se debe a que son de menor costo y de menor impacto en el ambiente, además evita las pérdidas económicas asociadas a la muerte de los organismos y la disminución en el uso de antibióticos (Citarasu, 2010; Reverter *et al.*, 2014).

Las plantas producen un amplio conjunto de metabolitos secundarios cuyas funciones les permiten influenciar actividades celulares y favorecer el crecimiento de estas. Otros metabolitos sirven como atrayentes a los polinizadores y animales dispersores de semillas, repelente contra animales herbívoros, antibacterianos y antifúngicos (Pagare *et al.*, 2015). Algunos de estos metabolitos pueden tener efectos beneficiosos en organismos cultivados cuando se incorporan como aditivo en la dieta, con el objetivo de mejorar el estado fisiológico de los organismos y estimular su crecimiento (Caipang *et al.*, 2021).

Las plantas poseen principios activos como los alcaloides, terpenos, taninos, aldehídos, cetonas, ésteres, saponinas, glucósidos, flavonoides, fenoles, esteroides y aceites esenciales que son responsables de distintos efectos en la fisiología de los organismos acuáticos (Hernández-Contreras y Hernández, 2020; Bellumori *et al.*, 2021). Por este motivo, el uso de plantas medicinales en la acuicultura ha demostrado ser un efectivo antioxidante, en disminuir los niveles de estrés, estimular el apetito y aumentar la ganancia de peso de los organismos, además de estimular el sistema inmune y ser un eficiente antiparasitario.

En acuicultura se ha comenzado a explorar el uso de plantas medicinales, las evidencias documentan que los estudios han incrementado a partir del 2006 aproximadamente (Reverter *et al.*, 2014). En el periodo de 2017 a 2023 se tiene registro de 419 artículos científicos enfocados en el uso de fitogénicos, plantas medicinales y aromáticas en acuicultura. Se han utilizado plantas como la yuca (*Yucca schidigera*), moringa (*Moringa oleifera*), romero (*Rosmarinus officinalis*), sábila (*Aloe vera*), centella (*Centella asiatica*), ajo (*Allium sativum*), mejorana (*Origanum majorana*), orégano (*Origanum vulgare*), menta (*Mentha piperita*) y jengibre (*Zingiber officinale*), entre otras (Yilmaz *et al.*, 2012; Kubiriza *et al.*, 2019; Yousefi *et al.*, 2019; Karataş *et al.*, 2020; Naiel *et al.*, 2020; Tadese *et al.*, 2021). Se han evidenciado beneficios notables en el empleo de fitogénicos en el sistema digestivo de los peces, tales como la reducción de infecciones, una mejora en la eficiencia de la utilización y absorción de nutrientes, la disminución de la producción de metabolitos inhibidores del crecimiento, y la reducción de la inflamación en el tracto digestivo (Caipang *et al.*, 2021).

El uso de aceites esenciales de plantas aromáticas en la nutrición animal tiene un efecto positivo en la digestión, microbiota intestinal, crecimiento y bienestar. Por lo anterior, las dietas complementadas con plantas aromáticas y derivados del ajo, orégano, tomillo, menta y romero han mostrado un efecto positivo en el crecimiento, tasa específica de crecimiento y tasa de eficiencia alimenticia (Hernández-Contreras y Hernández, 2020). La vía de administración más común para los animales acuáticos es mediante el complemento del alimento con extractos y polvos de partes de las plantas; por la forma de administración, es un método que no causa estrés en los organismos (Olusola *et al.*, 2013; Kuebutornye y Abarike, 2020).

1.2 Uso de romero en la acuicultura

El romero (*Rosmarinus officinalis*) es una planta de la familia *Lamiaceae* originaria de la región mediterránea, crece en las zonas costeras en suelos rocosos y arenosos (Avila Sosa *et al.*, 2011). Pertenece al estrato arbustivo, con tallos prismáticos, hojas estrechas, agudas y pequeñas con forma de espigas de color verde oscuro. Su altura varía entre 0.5 a 1 m y la floración ocurre en primavera y otoño; sus flores son de color azul claro. Las hojas y las flores tienen un característico aroma debido al aceite que se acumula en los tricomas (Ribeiro-Santos *et al.*, 2015).

Los compuestos volátiles responsables del olor y el sabor en el romero son monoterpenos, esteroides, cetonas, fenoles, alcoholes y sesquiterpenos, entre otros. En el romero, los compuestos fenólicos como el carnosol, ácido carnósico, ácido ferúlico y ácido rosmarínico son los más abundantes en el extracto de esta

planta (Jordán *et al.*, 2013). Además, en el aceite esencial de romero se encuentran compuestos como el α -pineno, borneol acetato, alcanfor y eucaliptol, los cuales son responsables de la actividad biológica. Debido a la posibilidad de un efecto sinérgico entre los compuestos, los que se encuentran en menor cantidad pueden tener una influencia potencial en la actividad biológica (Ribeiro-Santos *et al.*, 2015). La cantidad de compuestos puede variar dependiendo del quimiotipo, condiciones de crecimiento, época de la cosecha, tipo de suelo, clima y condiciones geográficas. La actividad biológica reportada en peces para los compuestos presentes en el romero son antibiótica, antioxidante, antiinflamatoria, antitumoral, analgésica y hepatoprotectora (Genena *et al.*, 2008; Andrade *et al.*, 2018; Karataş *et al.*, 2020). Los compuestos responsables de la actividad antibacteriana son el borneol, 1,8-cienol, α -pineno y camfor, entre otros (Genena *et al.*, 2008). El método de administración de romero que frecuentemente se utiliza es a través de su incorporación en distintas concentraciones de extracto de hojas y polvo de hojas en el alimento (Hoseinifar *et al.*, 2020).

El romero es utilizado en la conservación de alimentos debido a su actividad como antioxidante, además de su uso como planta medicinal en contra de infecciones bacterianas. Algunas de las propiedades atribuidas al romero son la función hepatoprotectora, antimicrobiana, diurética, antiinflamatoria y antioxidante (Ribeiro-Santos *et al.*, 2015; Andrade *et al.*, 2018). Los compuestos activos presentes en el romero incluyen flavonoides, terpenos y fenoles, compuestos capaces de inhibir el crecimiento bacteriano y fúngico (Bellumori *et al.*, 2021). Borrás-Linares *et al.* (2014), determinaron la composición química del extracto de hojas de romero, y destacaron los compuestos identificados de acuerdo con su orden de elución, como el ácido quínico, ácido siríngico, galocatequina, 6-hidroxiuteokina-7-glucosido, ácido rosmarínico-3-*O*-glucósido, neptrina, hesperedina, homopantaginina, luteolina-3'-glucurodina y el ácido rosmarínico, ácido carnósico, carnosol, entre otros. La técnica utilizada en el estudio fue la extracción asistida por microondas y la caracterización de los compuestos del extracto de romero fue mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

Las técnicas utilizadas para la obtención de los extractos de plantas son diversas, y se han clasificado en convencionales y no convencionales. En la tabla 1 se resumen algunas de las principales técnicas utilizadas para la extracción de los compuestos activos en plantas (Flores-Villa *et al.*, 2020). Szumny *et al.* (2010) determinaron que el método de secado de hojas de romero que tiene una menor pérdida de compuestos volátiles es un método combinado de pre secado con aire caliente a 60 °C complementado con un secado con microondas al vacío.

Tabla 1. Técnicas utilizadas para la extracción de compuestos activos de plantas.

| Técnicas de extracción | Características del Método | Referencia |
|--|---|---|
| Prensado mecánico | Destrucción mecánica de las hojas, no requiere calor o disolventes | (Ventura <i>et al.</i> , 2017) |
| Maceración | Compuestos transferidos a un disolvente. Requiere largos periodos de extracción | (Pantoja-Chamorro <i>et al.</i> , 2017) |
| Extracción por reflujo | Compuestos transferidos a un disolvente sometido a calentamiento Requiere altas cantidades de solvente y largos periodos de extracción | (Zhang <i>et al.</i> , 2018) |
| Percolación | Compuestos transferidos a un disolvente que mantiene un flujo continuo para evitar la saturación | (Zhang <i>et al.</i> , 2018) |
| Trituración | Destrucción mecánica de las hojas y tallos para obtener los compuestos de interés | (Ventura <i>et al.</i> , 2017) |
| Extracción asistida con fluidos supercríticos | Utiliza disolventes a presiones y temperaturas altas. Es rápida con poco uso de solventes, mantiene la estructura de componentes termolábiles. Es costosa | (Quintana <i>et al.</i> , 2019) |
| Extracción asistida por microondas | Uso de radiaciones electromagnéticas entre 300 MHz y 300 GHz Extracción rápida con poco uso de disolvente | (Altemimi <i>et al.</i> , 2017) |

En acuicultura, el romero se ha utilizado para evitar la oxidación del aceite de pescado en la dieta, como alternativa a la etoxiquina, además a diferencia del antioxidante sintético, el romero no se bioacumula y favorece el crecimiento del trucha ártico (*Salvelinus alpinus*) (Kubiriza *et al.*, 2019). De la misma forma, el alimento complementado con extracto de romero retarda el proceso oxidativo de los lípidos en el filete de trucha arcoíris (*O. mykiss*) (Linhartová *et al.*, 2019). Por otra parte, el extracto de romero en la dieta del pez dorada (*Sparus aurata*) es efectivo como conservador después de cosechar, al garantizar una mayor vida de anaquel y por lo tanto disminuye pérdidas (Hernández *et al.*, 2014).

Asimismo, las hojas secas de romero incorporadas en la dieta demostró ser un eficiente antibiótico contra *Streptococcus agalactiae* en cultivo de tilapia *Oreochromis* sp. (Zilberg *et al.*, 2010). En esta misma especie, el extracto de romero tuvo un efecto positivo al inhibir el crecimiento de *Streptococcus iniae*, por lo que se podría utilizar como una alternativa a los antibióticos comerciales, los cuales causan resistencia en las bacterias del ambiente de cultivo (Abutbul *et al.*, 2004; Roomiani *et al.*, 2013). Además, diversos estudios han documentado el efecto positivo de las plantas medicinales en la fisiología y respuesta inmune en organismos acuáticos (Yilmaz *et al.*, 2012; Reverter *et al.*, 2014; Bulfon *et al.*, 2015; Ebrahimi *et al.*, 2020; Karataş *et al.*, 2020).

1.3 Antecedentes

1.3.1 Efecto del romero (*Rosmarinus officinalis*) en la fisiología de peces

Se ha documentado que el uso de plantas medicinales en cultivos de especies de interés acuícola influyen positivamente en el crecimiento, en la eficiencia alimenticia, estimulan la respuesta inmune, favorecen la expresión génica y confieren mayor resistencia a las enfermedades (Kuebutornye y Abarike, 2020). El romero (*R. officinalis*) es una planta que se ha propuesto como un tratamiento preventivo alternativo contra el estrés en peces de cultivo (Hoseini *et al.*, 2019; Karataş *et al.*, 2020).

La incorporación del extracto de romero en la dieta de peces como el esturión (*Huso huso*) y tilapia (*Oreochromis niloticus*) no influyó directamente en el crecimiento de los organismos en cultivo, más bien el efecto fue como inmunoestimulante (Yılmaz *et al.*, 2019; Ebrahimi *et al.*, 2020). En la tilapia *O. niloticus* se determinó el efecto del romero en su crecimiento cuando se incluyó el extracto de la planta en la dieta en porcentajes de 0.1, 0.25 y 0.5% (Yılmaz *et al.*, 2019). Los autores encontraron que después de 90 días de alimentar a los peces, no se observaron diferencias significativas en el incremento en masa, tasa de crecimiento específico, tasa de conversión alimenticia e índice hepatosomático. Los autores destacaron que las concentraciones de extracto de romero utilizadas no contienen cantidades suficientes de compuestos activos necesarios para evidenciar un efecto en el crecimiento de esta especie.

Naiel *et al.* (2019), demostraron el aumento en el crecimiento y eficiencia alimenticia en tilapia (*O. niloticus*) cuando la dieta era suplementada con romero en proporciones 0.1, 0.25 y 5%. Además, demostró ser un tratamiento efectivo contra el efecto de las aflatoxinas producidas por hongos, mostrando menor daño en hígado y riñón comparado con los peces alimentados con una dieta sin romero. Los autores concluyeron que el romero es una opción viable como complemento alimenticio en cultivos acuícolas donde exista prevalencia de hongos. En un estudio con la misma especie, Naiel *et al.* (2020) investigaron los efectos de diferentes concentraciones de polvo de hojas de romero (0, 2.5, 5 y 10 g · kg⁻¹) en tilapia. Sus hallazgos resaltaron que el aumento en la concentración de polvo de hojas de romero se asoció de manera significativa con un incremento en el crecimiento, la ingesta de alimento y la eficiencia alimenticia de los peces en comparación con el grupo control y los tratamientos de menor concentración. Además, la dieta con mayor concentración de polvo de hoja de romero propició mayor actividad de la enzima antioxidante catalasa y la enzima con actividad inmune lisozima. Asimismo, se registró un aumento en la actividad de la enzima lisozima que tiene una función inmunológica.

Yousefi *et al.* (2019), complementaron una dieta experimental con polvo de hoja de romero en proporción de 0, 1, 2 y 3%, la cual fue proporcionada a la carpa común (*C. carpio*) durante 65 días. Los resultados demostraron un efecto positivo en el crecimiento con el aumento de polvo de hoja de romero en el alimento. Asimismo, el romero contribuyó al incremento de proteínas como la albumina, globulina y lisozima en sangre. Además, la actividad de las enzimas antioxidantes catalasa y superóxido dismutasa se incrementó en los peces que recibieron la dieta con mayor proporción de polvo de hoja de romero.

Hernández *et al.* (2014), analizaron el efecto de diferentes concentraciones del extracto de romero (0.6, 1.2, 1.8 y 2.4 g · kg⁻¹ de dieta) en la dieta de la dorada (*S. aurata*). Los autores no encontraron diferencias significativas en el crecimiento de los peces entre los tratamientos, sin embargo, el análisis histológico evidenció que las dietas complementadas con extracto de romero disminuyeron la cantidad de lípidos en el hígado. Además, los peces que recibieron la dieta con 0.6 g · kg⁻¹ de extracto de romero, disminuyeron la concentración de glucosa y triglicéridos en sangre durante las primeras cuatro semanas.

En el esturión (*H. huso*) se evaluó el efecto del aceite esencial de romero en el sistema inmune de los peces, los cuales fueron alimentados con cuatro dietas complementadas con 0.01, 0.1, 1 y 2% de aceite esencial de romero durante ocho semanas. Aunque no hubo diferencias significativas en cuanto a los parámetros de crecimiento, los parámetros inmunes como la cantidad de proteínas en sangre y los niveles de globulina y albumina, mostraron un incremento en los tratamientos con mayor proporción de aceite esencial de romero (Ebrahimi *et al.*, 2020).

En el estudio de Karataş *et al.* (2020) con trucha arcoíris (*O. mykiss*) alimentada con dietas complementadas con extracto de romero en concentraciones de 0.4, 0.7, 1 y 3 g · kg⁻¹ durante 40 días, se demostró el incremento en la concentración de proteína total, tripsina, amilasa, lipasa, superóxido dismutasa, catalasa, lisozima, inmunoglobulinas y glóbulos blancos en los peces que recibieron la dieta con 1 y 3 g · kg⁻¹ de extracto de romero. Asimismo, posterior a un análisis histológico, observaron una reducción en los lípidos en el hígado. Además, el aumento de la concentración de romero en la dieta también evidenció un mayor crecimiento, incremento en la actividad de enzimas digestivas, antioxidantes y proteínas inmunes. Se ha documentado que la forma en la cual actúan los extractos de plantas medicinales es mediante el incremento de la secreción de enzimas digestivas que permiten mayor eficiencia alimenticia (Tadese *et al.*, 2021).

La digestión es un proceso en el cual los macronutrientes son reducidos a moléculas de menor tamaño por acción de enzimas para facilitar su absorción. Las proteínas se hidrolizan en aminoácidos, los lípidos se

degradan en ácidos grasos y glicerol, y los carbohidratos se descomponen en azúcares simples. En peces teleósteos, la digestión química inicia en el estómago, donde células parietales especializadas producen ácido clorhídrico y pepsinógeno, enzima proteolítica inactiva que se activa en presencia de un pH ácido. El segundo paso de la digestión química ocurre en el intestino, donde las enzimas producidas por el páncreas y las células de la pared intestinal son secretadas y activadas por el pH alcalino. La tripsina es la enzima proteolítica con mayor actividad en el intestino y ciegos pilóricos durante la digestión alcalina. En relación con la lipasa, es una enzima que es secretada por el páncreas y es clave en el metabolismo de los lípidos, su función principal es descomponer los lípidos en ácidos grasos y glicerol, lo que facilita su absorción y utilización por el organismo. En cuanto a la enzima pancreática amilasa, su función es hidrolizar los carbohidratos en oligosacáridos y trisacáridos y su actividad es mayor en el intestino donde existe un pH alcalino (Nolasco-Soria, 2021).

La digestión de los macronutrientes en el tracto digestivo de los peces depende de la cantidad y composición de enzimas secretadas. La actividad enzimática en el tracto digestivo de los peces se utiliza para comprender sus hábitos alimenticios y es un factor por considerar en la evaluación de la composición de macronutrientes en su dieta (Debnath *et al.*, 2007). Además, la composición de las enzimas digestivas puede variar entre especies, etapa de desarrollo y composición nutricional de la dieta (Hofer, 1979). Por lo tanto, el conocimiento de la actividad enzimática permite optimizar la cantidad de los nutrientes en la dieta y de esta manera garantizar que los organismos aprovechen al máximo los nutrientes disponibles (Debnath *et al.*, 2007). La actividad enzimática en el tracto digestivo en peces es un indicador de la fisiología nutricional de los peces y de la capacidad de utilizar los distintos nutrientes del alimento (Gioda *et al.*, 2017). Las principales enzimas digestivas en peces son las proteasas (tripsina, quimiotripsina y pepsina), las carbohidratasas (amilasa y maltasa), las lipasas y las fosfatasas alcalinas (Bone y Moore, 2008). Los peces carnívoros tienen una mayor actividad enzimática proteolítica en el tracto digestivo en comparación con los peces herbívoros y omnívoros. Esto se debe a la menor longitud, la menor capacidad de volumen y el menor tiempo de residencia del alimento en el tracto digestivo de los peces carnívoros en comparación con los peces omnívoros y herbívoros (Hani *et al.*, 2018). Resultado de estas diferencias, el contenido en el tracto digestivo de los peces carnívoros requiere una concentración mayor de enzimas proteolíticas para llevar a cabo la digestión del alimento (Hofer y Schiemer, 1981). Por otro lado, la actividad de la amilasa disminuye con la edad en peces carnívoros, mientras que en peces herbívoros y omnívoros aumenta (Hani *et al.*, 2018). En peces carnívoros esto ocurre debido a un aumento del tamaño del tracto digestivo, mayor cantidad de microvellosidades y mucosa intestinal, comportamiento alimentario y la predominancia de la proteína en la dieta (Kuz'mina, 1996).

El estudio del efecto de romero en el crecimiento en peces se ha enfocado principalmente en especies dulceacuícolas como la tilapia, carpa, trucha arcoíris y esturión. Hasta la fecha, la investigación sobre el uso del romero en la acuicultura marina se ha centrado exclusivamente en la dorada. No obstante, existe un potencial sin explorar en la aplicación de esta estrategia a especies cultivadas en sistemas acuícolas marinos, como la lobina rayada (*Morone saxatilis*). Esta exploración podría contribuir significativamente a mejorar el rendimiento de los peces en condiciones de cultivo, lo que, a su vez, se traduciría en un aumento de la producción y una mejora en los beneficios económicos. Dada la alta demanda y valor de la lobina rayada en los mercados nacionales e internacionales, esta mejora en la producción podría tener un impacto positivo en la economía local, generando divisas y empleo con diversos niveles de especialización.

1.3.2 Cultivo de lobina rayada (*Morone saxatilis*)

Los peces del género *Morone* tienen cuerpo fusiforme con líneas laterales completas, dos aletas dorsales definidas la primera con 9 espinas y la segunda con una espina y de 10 a 14 radios. La aleta anal tiene 3 espinas, la aleta pélvica con una espina y 5 radios, y la aleta caudal tiene 17 radios principales. La membrana branquiostegales tiene 7 radios y el opérculo tiene una espina. El preopérculo es aserrado y las mandíbulas tienen un conjunto de dientes cónicos. El hábitat de esta especie son cuerpos de agua como ríos y zonas costeras, y sus hábitos alimenticios son piscívoros (Etnier y Starnes, 1993).

La lobina rayada (*M. saxatilis*) es una especie anádroma que se distribuye en la zona costera de Estados Unidos que colindan con el océano Atlántico, Golfo de México y el océano Pacífico. La mayor parte de su ciclo de vida ocurre en bahías y estuarios. La etapa reproductiva de la lobina rayada ocurre durante la primavera cuando la temperatura del agua aumenta por encima de 15 °C. Los juveniles se alimentan de larvas de mosquitos y crustáceos planctónicos; cuando alcanzan una talla mayor a 50 mm se alimentan principalmente de peces pequeños (Etnier y Starnes, 1993).

El cultivo de especies marinas ha incrementado en la última década por su alta demanda y alto costo en el mercado nacional e internacional. Esto ha ocasionado que distintas especies tengan potencial acuícola en zonas costeras (Gentry *et al.*, 2017). En la última década, en México se ha desarrollado la acuicultura costera en jaulas flotantes, dicha actividad tiene varias ventajas, entre las cuales se encuentra la alta renovación de agua por los patrones de circulación costera y que no se requiere equipo extra para la aireación (INAPESCA, 2021). Actualmente las especies de peces cultivadas en zonas costeras de México son el atún aleta azul (*Thunnus orientalis*), jurel (*Seriola sp.*), totoaba (*Totoaba macdonaldi*) y lobina rayada

(*M. saxatilis*) (INAPESCA, 2021). La lobina rayada se cultiva con la finalidad de liberarla en cuerpos de agua donde se utiliza para la pesca recreativa (Andersen *et al.*, 2021). La empresa Pacifico Aquaculture ubicada en Ensenada Baja California, realiza el cultivo de lobina rayada en sistemas marinos abiertos (jaulas flotantes) en los alrededores de la Isla de Todos los Santos. La especie alcanza la talla comercial de 1.36 kg en 24 meses (Andersen *et al.*, 2021).

Para obtener un mayor crecimiento de la lobina rayada en cultivo se deben de mantener los requerimientos ambientales óptimos. El intervalo óptimo de temperatura oscila entre 13 y 24 °C, concentración de oxígeno disuelto $>5 \text{ mg L}^{-1}$, salinidad entre 30 y 33.8 ppm, dureza entre 5 y 80 mg L^{-1} , pH entre 7.5 y 8.5, nitrógeno amoniacal total $<1.00 \text{ mg L}^{-1}$, nitritos $<1 \text{ mg L}^{-1}$ y nitrato $<80 \text{ mg L}^{-1}$ (Harrell, 1997; Timmons y Ebeling, 2010). La lobina rayada alimentada con dietas comerciales muestra una tasa de eficiencia alimenticia de 1.5 (Andersen *et al.*, 2021). Además, ha demostrado ser una especie con potencial acuícola en zonas costeras por su tolerancia a agua salobre y marina. Por otra parte, los sistemas de recirculación no requieren adaptaciones especiales para el cultivo de la especie (Harrell, 1997).

En la actualidad, la investigación en el desarrollo del cultivo de lobina se ha enfocado en la mejora de dietas, desove, domesticación y densidad de siembra (Martin-Robichaud y Peterson, 1998; Woods, 2001; de Cruz *et al.*, 2020; Andersen *et al.*, 2021; Araújo *et al.*, 2021; Qiu *et al.*, 2022). El uso de plantas medicinales como el romero y su efecto en el crecimiento, estimulante del sistema inmune y enzimas digestivas no ha sido objeto de estudio en esta especie. Por tal motivo, la presente investigación pretende conocer el efecto del uso del polvo de romero en la supervivencia, el crecimiento, la actividad de enzimas digestivas y composición proximal en juveniles de lobina rayada *M. saxatilis*. La información generada en la presente investigación contribuirá al conocimiento relacionado con el desempeño biológico de la especie bajo condiciones específicas de cultivo.

1.4 Justificación

La lobina rayada (*M. saxatilis*) es una especie de importancia acuícola por su rápido crecimiento, disponibilidad de alimentos comerciales y alto valor comercial a nivel internacional. Se han realizado esfuerzos para realizar un cultivo eficiente de lobina, enfocado en el desarrollo de dietas, desove inducido, densidad de siembra y maduración sexual. No obstante, distintos problemas asociados a la alta densidad de siembra han ocasionado problemas de enfermedades y mortalidad asociados al estrés en los organismos. En la acuicultura de peces dulceacuícolas se ha probado el efecto del romero (*R. officinalis*)

como un estimulante del crecimiento, del sistema inmune y para disminuir el estrés. Sin embargo, en especies marinas los estudios que evalúen el efecto del romero en su fisiología son escasos. Por tal motivo, las investigaciones relacionadas con el uso de romero en la dieta de peces marinos para potenciar el crecimiento en cultivo resultarían en un efecto positivo, por lo que se podría alcanzar una mayor producción y mayores beneficios económicos.

1.5 Hipótesis

La lobina rayada (*M. saxatilis*) alimentada con dietas complementadas con polvo de romero (*R. officinalis*) en concentraciones mayores a $5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ favorecerá el incremento en la actividad de enzimas digestivas (quimiotripsina, tripsina, amilasa, lipasa y proteasas alcalinas totales) y por lo tanto los peces tendrán un mayor crecimiento.

1.6 Objetivos

1.6.1 Objetivo general

- Evaluar la adición del polvo de romero (*R. officinalis*) en la dieta de lobina rayada (*M. saxatilis*) y determinar su efecto en la supervivencia, crecimiento, actividad enzimática y composición proximal.

1.6.2 Objetivos específicos

- Evaluar la supervivencia de lobina rayada alimentada con dietas complementadas con polvo de romero.
- Evaluar los parámetros productivos de ganancia de peso, tasa de crecimiento específica, tasa de conversión alimenticia, coeficiente de crecimiento térmico, tasa de eficiencia proteica, factor de condición e índice hepatosomático en la lobina rayada alimentada con dietas complementadas con polvo de romero.

- Evaluar la actividad de las enzimas digestivas tripsina, quimiotripsina, lipasa, amilasa y proteasas alcalinas totales en la lobina rayada alimentada con dietas complementadas con polvo de romero.
- Evaluar la composición proximal del músculo de la lobina rayada alimentada con dietas complementadas con polvo de romero.

Capítulo 2. Metodología

2.1 Obtención y aclimatación de peces

Se obtuvieron aproximadamente 700 juveniles de lobina rayada *M. saxatilis* de ~10 g, los cuales fueron donados por la empresa Pacifico Aquaculture S.A.P.I de C.V. (Ensenada, Baja California). A su arribo al laboratorio de peces marinos del Departamento de Acuicultura del CICESE, se inspeccionaron visualmente que no presentaran signos de enfermedad, ni lesiones ocasionadas por el transporte. Los peces fueron aclimatados y mantenidos en un sistema de recirculación de agua de mar conformado por dos tanques de fibra de vidrio con fondo negro de 7 m³ durante 15 días a condiciones constantes de temperatura de 23°C, salinidad de 34 ppm, oxígeno disuelto >6 mg L⁻¹ y fotoperiodo natural. Los parámetros de calidad de agua fueron medidos diariamente con un multiparámetro YSI® 2030. La concentración de nitrógeno amoniacal total (0.25 ± 0.01 mg L⁻¹), nitritos (< 0.25 mg L⁻¹) y nitratos (< 5 mg L⁻¹) fue medida dos veces por semana con kits API®. Los peces fueron alimentados tres veces al día con la dieta comercial para juveniles de peces marinos marca Ewos® 52% de proteína y 14% de lípidos a razón del 4% de su biomasa.

2.2 Polvo de romero

Se obtuvieron plantas de romero del proveedor AlfaVid Organics (Rosarito, Baja California) en el supermercado. Las plantas se lavaron con agua destilada y el exceso de agua fue retirado con papel secante. Las ramas y hojas que se encontraban en mal estado no se utilizaron, debido a que sus principios activos se modifican en estas condiciones. Las hojas fueron colocadas en tubos Falcon de 50 ml y almacenadas en un ultracongelador marca Thermo Scientific® modelo Revco EXF durante 24 horas a -80°C a 0.100 mBar de presión. Posteriormente las hojas de romero fueron secadas en una liofilizadora marca Labconco® modelo Freezone 6 Plus durante 24 horas a -85 °C. Las hojas secas de romero fueron trituradas en una licuadora doméstica marca Osterizer® hasta obtener partículas menores de 3 mm. Para la obtención de un polvo fino se utilizó un molidor de tejidos marca IKA® modelo A11 Basic. El polvo obtenido fue tamizado a través de un tamiz con luz de malla de 420 µm y posteriormente se almacenó en frascos de vidrio color ámbar a 25 °C y se mantuvieron en oscuridad.

2.3 Preparación de dietas experimentales

Se utilizó la dieta comercial Ewos 52% de proteína y 14% de lípidos, a la cual se le añadió 2.5 (T2.5), 5 (T5) y $10 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ (T10) de polvo de romero. Estas concentraciones se establecieron con base en la investigación de Naiel *et al.* (2020), las cuales demostraron un efecto positivo en el crecimiento en la tilapia *O. niloticus*. La dieta comercial se trituroó en un molino de mano hasta obtener un polvo fino. A continuación, se mezcló durante 15 minutos a 198 RPM en una mezcladora Hobart® Legacy, en seguida se le agregó la cantidad de polvo de romero para garantizar una mezcla y textura homogénea. A la mezcla se le añadió 30 % agua destilada y 5% de almidón gelatinizado como aglutinante; este procedimiento se repitió para cada dieta T2.5, T5, y T10. La dieta control (TC) también tuvo el mismo procedimiento sin agregar el polvo de romero. La mezcla resultante se pasó por un molino de alimentos Hobart® Legacy y un cedazo con un diámetro de 4 mm. Los pellets obtenidos fueron colocados en charolas de aluminio y secados durante 48 horas a 37.5 °C en la estufa Thermolyne® (Oven serie 9000). Los pellets secos fueron cortados a un largo de ~3 mm y guardados en bolsas selladas y almacenados a 4°C hasta su utilización.

2.4 Bioensayo de alimentación

El bioensayo se realizó en un sistema de flujo continuo de agua de mar en las instalaciones del laboratorio húmedo del Departamento de Acuicultura del CICESE. El sistema se mantuvo a 23 °C con el uso de cajas controladoras de temperatura y calentadores de titanio de 1000 vatios. La concentración de oxígeno disuelto se mantuvo mayor a $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, el nitrógeno amoniacal total $<1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ y un fotoperiodo de 12:12 horas luz:oscuridad. El sistema estuvo conformado por 12 tanques circulares de fibra de vidrio con volumen de 430 L, con recambio de agua de ~350% diario. El monitoreo de los parámetros físicos de calidad de agua de temperatura, salinidad y concentración de oxígeno disuelto se realizó diariamente con el multiparámetro YSI PRO 2030. La concentración de nitrógeno amoniacal total, nitritos y nitratos se midió dos veces por semana con kits marca API®.

Durante el bioensayo de alimentación se registró una concentración de oxígeno disuelto en todos los tratamientos mayor a $6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ y la saturación de oxígeno fue mayor a 89%. La salinidad fue de 33 ppm y la temperatura se mantuvo entre 22.5 y 22.8 °C en todos los tratamientos. La concentración de nitrógeno amoniacal total durante el bioensayo en todos los tratamientos fue menor a $0.29 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ y la concentración de nitritos y nitratos fue menor a 0.25 y 5 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ respectivamente (Tabla 2).

Tabla 2. Parámetros de calidad de agua por tratamiento durante el bioensayo de alimentación con lobina rayada

| | TC | T2.5 | T5 | T10 |
|---|--------------|--------------|---------------|--------------|
| O.D. mg · L⁻¹ | 6.32 ± 0.7 | 6.68 ± 3.89 | 6.68 ± 4.47 | 6.30 ± 0.72 |
| Sat. O.D. % | 89.70 ± 9.23 | 90.57 ± 8.44 | 90.10 ± 10.99 | 89.36 ± 9.48 |
| Salinidad ppm | 33.61 ± 0.91 | 33.62 ± 0.96 | 33.63 ± 0.96 | 33.63 ± 0.97 |
| Temperatura °C | 22.82 ± 0.60 | 22.50 ± 1.12 | 22.84 ± 0.77 | 22.80 ± 0.93 |
| N.A.T. mg · L⁻¹ | 0.25 ± 0.15 | 0.25 ± 0.05 | 0.27 ± 0.10 | 0.29 ± 0.15 |
| NO₂⁻ mg · L⁻¹ | <0.25 | <0.25 | <0.25 | <0.25 |
| NO₃⁻ mg · L⁻¹ | <5 | <5 | <5 | <5 |

El experimento constó de cuatro tratamientos: control (TC), 2.5 (T2.5), 5 (T5) y 10 (T10) g · kg⁻¹ de romero en la dieta, y cada tratamiento se realizó por triplicado. Se colocaron 20 peces con un peso promedio de 19.59 ± 2.43 g seleccionados aleatoriamente en cada uno de los 12 tanques. Los peces fueron alimentados con las dietas experimentales tres veces al día en los horarios de 8:30, 12:00 y 16:00 horas al 4% de su biomasa total durante 70 días, momento en el cual se obtuvo el 200% de incremento en peso con respecto al inicial con referencia al grupo control.

2.5 Parámetros de crecimiento y productivos

Los peces fueron pesados al inicio y final del experimento con una balanza Ohaus® modelo Scout Pro. Al final del experimento fueron medidos con un ictiómetro Aquatic Eco-Systems, Inc®. El registro del crecimiento de los peces se realizó mediante biometrías cada 14 días, para ello las lobinas fueron anestesiadas con una dosis de 10 mg · L⁻¹ de metasulfonato de tricafina (MS-222) marca Western Chemical, Inc®.

La supervivencia (S) se evaluó diariamente hasta finalizar el experimento, tomando en cuenta el número de organismos inicial y final (1). Los datos de peso, talla y peso del hígado se utilizaron para calcular los índices de ganancia de peso (GP) (2), tasa de crecimiento específica (TCE) (3), tasa de conversión alimenticia (TCA) (4), coeficiente de crecimiento térmico (CCT) (5), tasa de eficiencia proteica (TEP) (6), factor de condición de Fulton (K) (7) e índice hepatosomático (IHS) (8).

- Supervivencia

$$S = \left(\frac{\text{número final de organismos}}{\text{número inicial de organismos}} \right) \times 100 \quad (1)$$

- Ganancia de peso

$$GP = \left(\frac{\text{peso final (g)} - \text{peso inicial (g)}}{\text{peso inicial (g)}} \right) \times 100 \quad (2)$$

- Tasa de crecimiento específica

$$TCE = \left(\frac{\ln \text{peso final (g)} - \ln \text{peso inicial (g)}}{\text{tiempo (días)}} \right) \times 100 \quad (3)$$

- Tasa de conversión alimenticia

$$TCA = \frac{\text{alimento ingerido (g)}}{\text{peso ganado (g)}} \quad (4)$$

- Coeficiente de crecimiento térmico

$$CCT = \left(\frac{\text{peso final}^{\frac{1}{3}} \text{(g)} - \text{peso inicial}^{\frac{1}{3}} \text{(g)}}{\text{temperatura (°C)} \times \text{días}} \right) \times 1000 \quad (5)$$

- Tasa de eficiencia proteica

$$TEP = \frac{\text{ganancia de peso (g)}}{\text{proteína cruda en dieta (g)}} \quad (6)$$

- Factor de condición

$$K = \frac{\text{peso del pez (g)} \times 100}{\text{longitud del pez}^3 \text{(cm)}} \quad (7)$$

- Índice hepatosomático

$$IH = \left(\frac{\text{peso del hígado (g)}}{\text{peso del pez (g)}} \right) \times 100 \quad (8)$$

2.6 Toma de muestra

Para el análisis enzimático se obtuvieron muestras de tejido del estómago, intestino y ciegos pilóricos. Además, se colectaron muestras de músculo para análisis proximal y muestra de hígado para calcular el índice hepatosomático. Con ese fin se sacrificaron cinco peces por tanque después de un ayuno de cuatro horas desde su última alimentación. Los peces fueron expuestos a una sobredosis de metasulfonato de tricaína de $150 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ durante 5 minutos y como método secundario se les realizó una punción en el cerebro con una aguja de disección (Canada Department of Fisheries and Oceans, 2004). Para la obtención de los órganos se realizó un corte en diagonal desde el ano hasta las branquias con la finalidad de dejar expuesta la cavidad abdominal. Se retiraron la totalidad de órganos y se extrajeron el estómago, ciegos pilóricos e intestino, los cuales fueron colocados en una bolsa de plástico previamente etiquetada y se mantuvieron en una hielera con nitrógeno líquido. La muestra de músculo y órganos se almacenaron a $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ en un ultracongelador marca Thermo Scientific® modelo Revco EXF hasta su procesamiento en laboratorio. El hígado fue pesado en una balanza analítica marca AND® modelo ER-182a.

2.7 Análisis de composición proximal de dieta y músculo de lobina rayada

Las dietas experimentales y las muestras de músculo de lobina rayada fueron secadas a $135 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 2 horas para determinar el porcentaje de humedad según la norma AOAC 930.15 (AOAC, 1990). La cantidad de cenizas totales (CT) se obtuvo al mantener la muestra a $550 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 4 horas según la norma AOAC 942.05 (AOAC, 1990). La cantidad de proteína cruda se determinó mediante el método Kjeldahl, el cual consistió en tres partes: primero se llevó a cabo la digestión de la muestra con H_2SO_4 para convertir el nitrógeno de la proteína en $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; luego se realizó la destilación donde se libera el amonio, y finalmente la titulación con HCl de acuerdo con la norma AOAC 4.2.11 (AOAC, 2006).

La determinación de la cantidad de lípidos totales se realizó con base en el método de gravimetría de Soxhlet que consistió en disolver los lípidos de la muestra en éter de petróleo según la norma AOAC, 920.39C (AOAC, 1990). La muestra se expuso a un proceso de extracción en el cual se mantuvo en contacto con un flujo recirculante de éter de petróleo durante 4 horas. Posteriormente, se procedió a evaporar el éter de petróleo del recipiente de recuperación, dejando los lípidos extraídos de la muestra. Finalmente se pesó el recipiente para calcular el porcentaje de lípidos presentes en la muestra.

2.8 Análisis de actividad enzimática

Las muestras de estómago, ciegos pilóricos e intestino fueron pesados y colocados en tubos Falcon de 15 mL. Para obtener los extractos enzimáticos, se homogeneizaron los órganos con un moedor de tejidos marca Kinematica AG modelo POLYTRON® PT 1200 en 10 mL de agua desionizada a 4 °C. Posteriormente la muestra se centrifugó a 5000 g durante 50 minutos en una centrifuga Thermo Scientific, se tomaron alícuotas de 0.4 mL del sobrenadante resultante las cuales se mantuvieron en ultracongelación a -80 °C. La actividad enzimática se midió individualmente para estómago, ciegos pilóricos e intestinos y se expresó como unidades de absorbancia por gramo de órgano (U órgano⁻¹).

La actividad de la tripsina se determinó con base en el método Erlanger *et al.* (1961). El método consistió en disolver 21.75 mg de sustrato BAPNA (N α -Benzoil-DL-arginina p-nitroanilida hidrocioruro) en concentración en 500 μ L de dimetilsulfóxido (DMSO). El sustrato diluido en DMSO se aforó a 50 ml con en el buffer Tris-HCl 50 mM con CaCl₂ 20 mM a un pH 8.2. En cada pozo de una microplaca se colocó 25 μ L del extracto enzimático y 175 μ L de la solución buffer con sustrato. Cada muestra se realizó por triplicado. La microplaca se incubó a 37 °C durante 60 minutos en el lector de placas marca Thermo Scientific modelo Varioskan Flash. La reacción se detuvo con 50 μ L de ácido acético al 30 % y después de 10 minutos se leyó la absorbancia a una longitud de onda de 410 nm. Se utilizó como blanco agua destilada y como control positivo la tripsina comercial.

La actividad de la enzima quimiotripsina se evaluó con el método descrito por Hummel (1959) modificado por Applebaum *et al.* (2001). Se disolvió 8.77 mg del sustrato BTEE (N-benzoil-tirosina etil éster) 0.56 mM en 1.39 mL de DMSO. El sustrato diluido en DMSO se aforó a 50 mL con el buffer Tris HCl 100 mM, CaCl₂ 25 mM a un pH de 7.8 y metanol al 2.5 %. En cada pozo de una microplaca se colocó 25 μ L del extracto enzimático y 225 μ L de la solución buffer con sustrato. La microplaca se incubó a una temperatura de 37 °C y se leyó la absorbancia cada minuto durante 20 minutos a 256 nm.

La actividad de la lipasa fue estimada de acuerdo con el método propuesto por Gjellesvik *et al.* (1992). Como sustrato se usó 4-nitrofenil miristato en concentración 0.56 mM disuelto en 0.5 mL de DMSO. El sustrato disuelto en DMSO se aforó a 50 mL con solución buffer Tris-HCl en concentración 150 mM, taurocolato de sodio 15 mM a un pH de 8.5. En una microplaca se colocó 25 μ L de extracto enzimático y 200 μ L de solución buffer y sustrato la cual se incubó a una temperatura de 37 °C y se leyó cada minuto durante 60 minutos a 405 nm.

La actividad de la amilasa se midió de acuerdo con el método descrito por la Worthington Biochemical (1993). Se usó almidón al 1% como sustrato, el cual se disolvió en fosfato de sodio 20 mM, NaCl 6 mM, ácido dinitrosalicílico al 1% y tartrato potásico sódico tetrahidratado al 30% como indicador colorimétrico, y se ajustó el pH a 6.9. Se incubó 0.4 mL del homogeneizado enzimático en baño maría a 25 °C por 4 minutos en tubos de ensayo. Posteriormente se agregó 0.8 mL de almidón y se incubó durante 3 minutos. Por último, se agregó 0.8 mL de ácido dinitrosalicílico cada minuto y se mantuvieron en baño maría a 100 °C durante 5 minutos. Posteriormente, cuando la muestra alcanzó temperatura ambiente se añadió 8 mL de agua destilada y se homogeneizó. En una microplaca se colocó 400 µL de la solución de cada muestra y se leyó la absorbancia a 540 nm.

La actividad de las proteasas alcalinas totales se estimó de acuerdo con el método descrito por Sarath *et al.* (2001). Se utilizó la caseína al 2% como sustrato, la cual se aforó a 50 mL en búfer Tris-HCl 50 mM, CaCl₂ 10 mM a un pH de 9.0. En un tubo Eppendorf de 1.5 mL se colocó 100 µL del extracto enzimático, 150 µL de la solución buffer y sustrato y se incubaron en baño maría a una temperatura de 37 °C durante 10 minutos. Al término de la incubación se detuvo la reacción con 750 µL de ácido tricloroacético al 10 %. Posteriormente las muestras fueron centrifugadas a 14000 g durante 10 minutos a 4 °C. En cada uno de los pozos de una microplaca se colocó 300 µL del sobrenadante y se leyó la absorbancia a 440 nm.

La unidad de actividad enzimática se definió como la cantidad de enzima requerida para incrementar en una unidad la absorbancia por minuto. Para el cálculo de la actividad enzimática se utilizó la siguiente ecuación (9):

$$\text{Actividad enzimática } (U \times \text{órgano}^{-1}) = \frac{\left(\frac{\Delta Abs}{T}\right)(V_{rxn})(V_t)}{\frac{(CE)(V_m)}{PO}} \quad (9)$$

Donde ΔAbs : incremento de absorbancia; T: tiempo de incubación de la reacción (min); V_{rxn} : volumen total de la reacción (mL); V_t : volumen total del extracto enzimático (mL); CE coeficiente de extinción = 1; V_m : volumen de la muestra utilizada en la reacción (mL); PO: peso del órgano (g).

2.9 Análisis estadístico

A los datos de peso, talla, parámetros de crecimiento y productivos, análisis de composición proximal y análisis enzimáticos se les realizó la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk y de homogeneidad de varianza

de Bartlett. De cumplir con estos supuestos se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía. En caso de existir diferencias significativas se realizó la prueba *post hoc* de Tukey para establecer las diferencias entre tratamientos. En los casos donde no se cumplieron los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianza, se realizó la prueba no paramétrica de Kruskal-Walis y la prueba *post hoc* no paramétrica de Dunn. Las diferencias significativas se establecieron con un nivel de significancia de $p < 0.05$. Se calcularon las diferencias en el peso final entre los tratamientos utilizando los promedios de la última biometría. Los análisis estadísticos se realizaron con el software STATISTICA 10 (StatSoft, Inc. 2011).

Capítulo 3. Resultados

3.1 Supervivencia

La supervivencia de las lobinas al final del experimento fue del 100% para TC y T10, mientras que en el T2 fue de 98.33% (± 2.89). La supervivencia del 66.67% (± 57.74) en el T5 se debe a que el día 70 se registró la mortalidad súbita (100%) de una réplica de ese tratamiento (Figura 1).

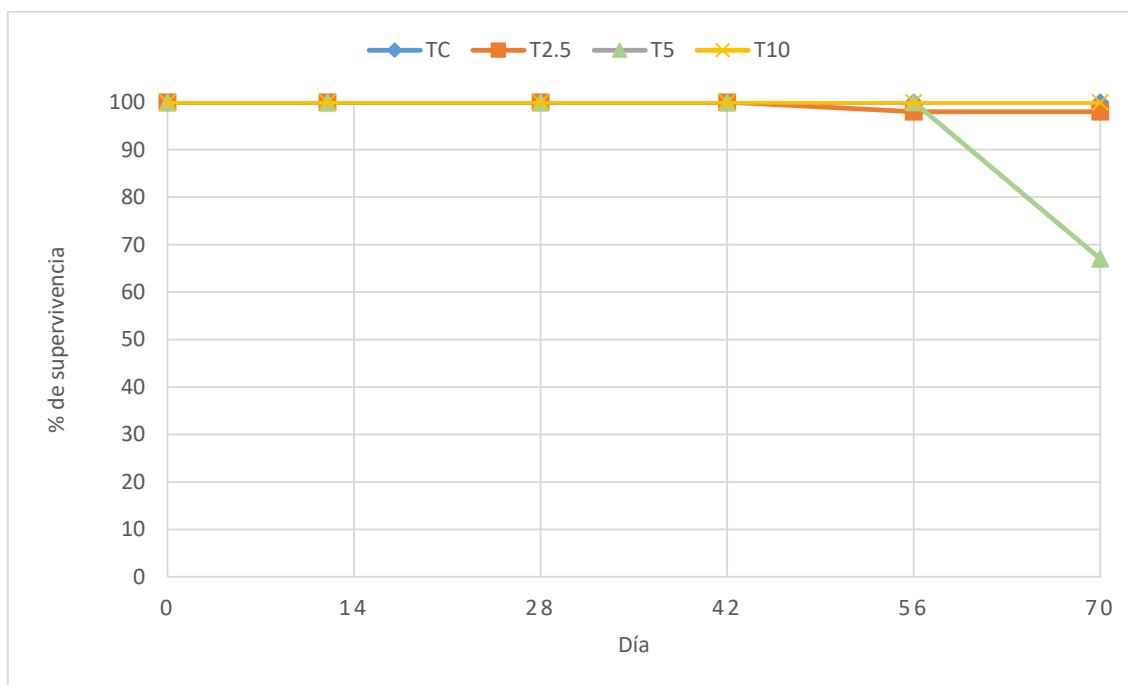


Figura 1. Supervivencia de lobina rayada alimentada con dietas complementadas con polvo de romero en concentraciones de 0 (TC), 2.5 (T2.5), 5 (T5) y 10 (T10) $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$.

3.2 Parámetros de crecimiento y producción

Al concluir el experimento, se observó que el peso final de los juveniles de lobina rayada fue significativamente menor ($p < 0.05$) en los tratamientos con la mayor concentración de polvo de romero en la dieta con respecto al TC, el T5 con un valor promedio de 52.17 ± 12.35 g y T10 con 52.67 ± 9.69 g (Figura 2).

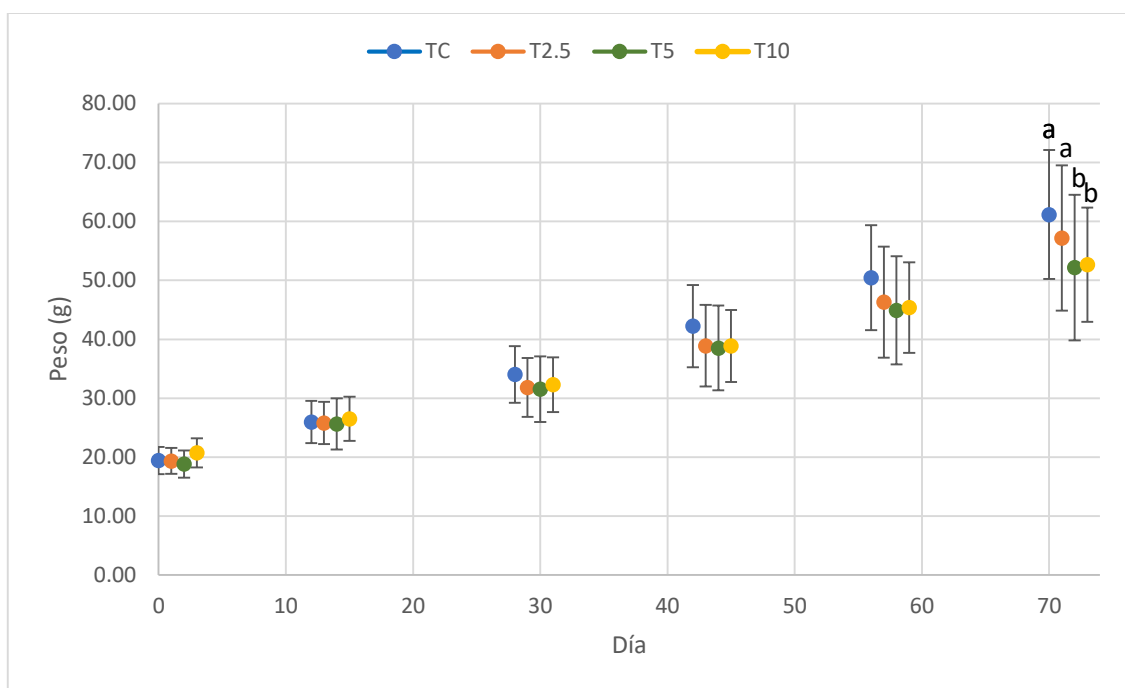


Figura 2. Crecimiento de lobina rayada alimentada con dieta complementada con polvo de romero. Las diferencias fueron calculadas con los promedios de peso final de la última biometría. $p < 0.05$.

En cuanto a la ganancia de peso, no se detectaron diferencias significativas de los tratamientos con respecto al control. Los tratamientos con una mayor ganancia promedio de peso fueron TC y T2.5 con valores promedio de 41.73 ± 3.24 y 37.83 ± 7.71 g respectivamente (Tabla 3). En relación con el porcentaje de peso ganado, no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos. El TC fue el tratamiento con un mayor porcentaje de peso ganado con respecto a los tratamientos con polvo de romero en la dieta con un valor de 215.91 ± 26.88 . Entre los tratamientos con polvo de romero, T2.5 tuvo el mayor porcentaje de peso ganado con 194.16 ± 28.00 (Tabla 3).

Los juveniles de lobina rayada no mostraron diferencias significativas en la tasa de crecimiento específica, la cual tuvo un intervalo de 1.33 ± 0.07 a 1.64 ± 0.12 % \cdot día⁻¹ (Tabla 3). En cuanto a la tasa de conversión alimenticia, los valores promedio se encontraron entre 2.23 ± 0.18 y 2.91 ± 0.23 , sin diferencias significativas entre los tratamientos y el control. De manera similar, el coeficiente de crecimiento térmico no presentó diferencias significativas con valores entre 0.62 ± 0.04 y 0.78 ± 0.05 (Tabla 3). En relación con la tasa de eficiencia proteica, el T10 registró la menor tasa con 0.64 ± 0.05 , mientras que el TC presentó la mayor tasa con un valor de 0.83 ± 0.06 , sin presentar diferencias significativas entre los tratamientos. Respecto al índice de condición de Fulton (K), no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos, el valor más alto se obtuvo en el TC con 1.28 ± 0.11 (Tabla 3). En relación con el índice

hepatosomático, el T10 presentó una diferencia significativamente mayor con respecto al TC, con un valor de 3.28 ± 0.63 . En contraste, el T2.5 y T5 no presentaron diferencias significativas con respecto al TC, con valores que oscilaron entre 2.57 ± 0.31 y 2.80 ± 0.38 respectivamente (Tabla 3).

Tabla 3. Crecimiento de juveniles de lobina rayada alimentadas con dietas complementadas con polvo de romero en concentraciones de 0 (TC), 2.5 (T2.5), 5 (T5) y 10 (T10) g · kg⁻¹.

| | TC | T2.5 | T5 | T10 | p |
|---------------------------------|----------------|-----------------|----------------|----------------|------------------|
| PI (g) | 19.43 ± 2.34ab | 19.37 ± 2.22ab | 18.83 ± 2.34a | 20.73 ± 2.53b | 0.018 |
| PF (g) | 61.17 ± 10.94a | 57.17 ± 12.32ab | 52.17 ± 12.35b | 52.67 ± 9.69b | <0.001 |
| GP (g) | 41.73 ± 3.24 | 37.83 ± 7.71 | 33.33 ± 7.71 | 31.93 ± 2.53 | 0.233 |
| PG (%) | 215.91 ± 26.88 | 194.16 ± 28.00 | 177.05 ± 41.57 | 154.11 ± 12.12 | 0.140 |
| TCE (% · día ⁻¹) | 1.64 ± 0.12 | 1.54 ± 0.14 | 1.45 ± 0.21 | 1.33 ± 0.07 | 0.135 |
| TCA | 2.23 ± 0.18 | 2.52 ± 0.54 | 2.89 ± 0.73 | 2.91 ± 0.23 | 0.311 |
| CCT | 0.78 ± 0.05 | 0.72 ± 0.09 | 0.66 ± 0.12 | 0.62 ± 0.04 | 0.171 |
| TEP | 0.83 ± 0.06 | 0.76 ± 0.15 | 0.67 ± 0.15 | 0.64 ± 0.05 | 0.233 |
| K | 1.28 ± 0.11 | 1.22 ± 0.05 | 1.19 ± 0.05 | 1.22 ± 0.03 | 0.479 |
| IHS | 2.62 ± 0.22a | 2.57 ± 0.31a | 2.80 ± 0.38ab | 3.28 ± 0.63b | 0.006 |

PI, peso inicial; PF, peso final; GP, ganancia de peso; PG, peso ganado, TCE, tasa de crecimiento específica; TCA, tasa de conversión alimenticia; CCT, coeficiente de crecimiento térmico; TEP, tasa de eficiencia proteica; K, índice de condición de Fulton; IHS, índice hepatosomático

Los valores corresponden al promedio de las tres réplicas ± desviación estándar

Las letras diferentes en cada renglón indican diferencias significativas (p<0.05)

3.3 Análisis proximal de dietas

En la composición proximal no se encontraron diferencias significativas (p>0.05) entre tratamientos y el control. El contenido de humedad en las dietas osciló entre 2.06 ± 0.07 % y 4.00 ± 0.17 %. Las cenizas totales mostraron valores entre 8.36 ± 0.01 % y 8.86 ± 0.04 %. El porcentaje de proteína en las dietas se mantuvo en el intervalo entre 50.24 ± 1.34 y 53.12 ± 0.78 %. Los lípidos presentes en las dietas estuvieron entre 13.59 ± 0.14 % y 14.09 ± 0.15 %. El extracto libre de nitrógeno se mantuvo entre 20.60 ± 0.69 % y 24.88 ± 1.22 % (Tabla 4).

3.4 Análisis proximal del músculo

La humedad total en el músculo de las lobinas alimentadas con $5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ de romero en la dieta fue

significativamente menor al TC, con un valor de 72.32 ± 1.40 %. Por otro lado, el T2.5 y T10 no presentaron diferencias significativas en relación con el TC, con valores entre 73.74 ± 0.98 y 74.74 ± 0.84 %. Respecto a las cenizas totales, el T5 y T10 fueron significativamente mayores que el TC, con valores promedio de 1.91 ± 0.13 y 1.96 ± 0.14 % respectivamente. En contraste, el T2.5 no mostró diferencias significativas con el TC. El mayor porcentaje de proteína se obtuvo en los peces del T5 con un valor promedio de 20.54 ± 2.39 , el TC tuvo el menor porcentaje (19.71 ± 2.30 %) sin presentarse diferencias significativas. El porcentaje de lípidos en el músculo de los peces del T5 fue significativamente mayor ($p=0.030$) al TC con un valor de 4.89 ± 2.34 . El TC, T2.5 y T10 no fueron significativamente diferentes. Los valores promedio significativamente ($p<0.001$) más altos para el ELN, se obtuvieron en los tratamientos T5 y T10 en relación con el TC con 6.66 ± 0.07 y 6.28 ± 0.31 % respectivamente (Tabla 5).

Tabla 4. Análisis proximal de dietas experimentales complementadas con polvo de romero.

| | TC | T2.5 | T5 | T10 |
|---------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| HT (%) | 4.00 \pm 0.17 | 3.08 \pm 0.13 | 2.06 \pm 0.07 | 2.93 \pm 0.06 |
| CT (%) | 8.54 \pm 0.02 | 8.74 \pm 0.03 | 8.86 \pm 0.04 | 8.36 \pm 0.01 |
| Proteína (%) | 53.12 \pm 0.78 | 51.60 \pm 0.78 | 50.92 \pm 0.29 | 50.24 \pm 1.34 |
| Lípidos (%) | 13.75 \pm 0.10 | 14.02 \pm 0.12 | 14.09 \pm 0.15 | 13.59 \pm 0.14 |
| ELN (%) | 20.60 \pm 0.69 | 22.56 \pm 0.77 | 24.08 \pm 0.25 | 24.88 \pm 1.22 |

HT, humedad total; CT, cenizas totales; ELN, extractos libres de nitrógeno
Los valores corresponden al promedio de las tres réplicas \pm desviación estándar

Tabla 5. Análisis proximal de músculo de lobina rayada alimentada con dietas complementadas con polvo de romero.

| | TC | T2.5 | T5 | T10 | p |
|---------------------|-------------------|--------------------|-------------------|-------------------|------------------|
| HT (%) | 74.51 \pm 1.73a | 73.74 \pm 0.98ab | 72.32 \pm 1.40b | 74.74 \pm 0.84a | <0.001 |
| CT (%) | 1.73 \pm 0.10a | 1.75 \pm 0.17a | 1.91 \pm 0.13b | 1.96 \pm 0.14b | <0.001 |
| Proteína (%) | 19.71 \pm 2.30 | 20.49 \pm 1.19 | 20.54 \pm 2.39 | 19.84 \pm 1.19 | 0.358 |
| Lípidos (%) | 3.08 \pm 1.09ab | 2.69 \pm 0.87a | 4.89 \pm 2.34b | 2.87 \pm 0.63ab | 0.030 |
| ELN (%) | 5.25 \pm 0.18a | 5.70 \pm 0.19a | 6.66 \pm 0.07b | 6.28 \pm 0.31b | <0.001 |

HT, humedad total; CT, cenizas totales; ELN, extractos libres de nitrógeno
Los valores presentados corresponden al promedio de las tres réplicas \pm desviación estándar
Las letras diferentes en cada fila indican diferencias significativas ($p<0.05$)

3.5 Análisis enzimático

La actividad enzimática de la tripsina en el intestino y ciegos pilóricos de los peces del T10 fueron significativamente menores en relación con el TC, con valores de 9.78 ± 5.95 y 15.16 ± 4.85 U órgano⁻¹ respectivamente (Tabla 6). La actividad de la quimiotripsina en el intestino y ciegos pilóricos de los peces no mostró diferencias significativas. Los valores medios de la actividad enzimática de la quimiotripsina en intestino oscilaron entre 90.31 ± 14.17 y 93.19 ± 12.42 U órgano⁻¹ y en ciegos pilóricos entre 90.42 ± 33.55 y 124.60 ± 25.75 U órgano⁻¹. En ciegos pilóricos se observó una disminución en la actividad de la quimiotripsina en los tratamientos con la inclusión de polvo de romero en la dieta (Tabla 6).

La actividad enzimática de la lipasa en el intestino no mostró diferencias significativas ($p=0.663$). Sin embargo, la actividad de la lipasa en ciegos pilóricos de los peces de los tratamientos T2.5, T5 y T10 fue significativamente menor ($p<0.001$) al TC, con valores promedio entre 61.36 ± 25.78 y 81.43 ± 23.42 U órgano⁻¹. La actividad de la amilasa en intestino y ciegos pilóricos no mostró diferencias significativas entre los tratamientos (Tabla 6).

La actividad de las proteasas alcalinas totales en el intestino de los peces para los tratamientos T2.5 y T10 fueron significativamente menores en relación con el TC, con valores entre 9.00 ± 3.03 y 8.05 ± 2.89 U órgano⁻¹. Por otra parte, en ciegos pilóricos, la actividad de esta enzima fue significativamente menor ($p<0.001$) en las lobinas de los tratamientos de 2.5 y 10 g · Kg⁻¹ de romero en la dieta en relación con el grupo control, con valores promedio de 9.83 ± 2.95 y 6.90 ± 2.04 U órgano⁻¹ respectivamente (Tabla 6).

Tabla 6. Actividad enzimática en intestino y ciegos pilóricos de juveniles de lobina rayada alimentada con dietas complementadas con polvo de romero.

| | | TC U órgano ⁻¹ | T2.5 U órgano ⁻¹ | T5 U órgano ⁻¹ | T10 U órgano ⁻¹ | p |
|-------------------------|----------------|------------------------------|--------------------------------|------------------------------|-------------------------------|------------------|
| Intestino | Tripsina | 19.69 ± 5.55a | 14.29 ± 7.42ab | 17.89 ± 10.18ab | 9.78 ± 5.95b | 0.036 |
| | Quimiotripsina | 90.31 ± 14.17 | 93.19 ± 12.42 | 90.95 ± 11.30 | 91.44 ± 20.29 | 0.981 |
| | Lipasa | 41.05 ± 20.90 | 34.06 ± 15.19 | 47.01 ± 21.16 | 42.82 ± 24.23 | 0.663 |
| | Amilasa | 23.03 ± 15.63 | 28.53 ± 12.38 | 29.11 ± 13.10 | 34.90 ± 19.93 | 0.477 |
| | P.A.T. | 13.25 ± 2.06a | 9.00 ± 3.03b | 10.10 ± 2.78ab | 8.05 ± 2.89b | 0.002 |
| Ciegos pilóricos | Tripsina | 30.82 ± 10.65a | 24.35 ± 5.03ab | 34.70 ± 6.62ac | 15.16 ± 4.85b | <0.001 |
| | Quimiotripsina | 123.99 ± 30.27 | 124.60 ± 25.75 | 105.74 ± 23.37 | 90.42 ± 33.55 | 0.065 |
| | Lipasa | 130.74 ± 28.94a | 74.20 ± 21.24b | 81.43 ± 23.42b | 61.36 ± 25.78b | <0.001 |
| | Amilasa | 70.52 ± 12.88 | 57.84 ± 22.30 | 46.29 ± 25.82 | 45.25 ± 17.64 | 0.050 |
| | P.A.T. | 13.96 ± 3.13a | 9.83 ± 2.95b | 11.14 ± 3.50ab | 6.90 ± 2.04b | <0.001 |

P.A.T.; proteasas alcalinas totales

Los valores corresponden al promedio de las tres réplicas ± desviación estándar

Las letras diferentes en cada renglón indican diferencias significativas ($p < 0.05$)

La muestra Inicial se excluyó del análisis estadístico

Capítulo 4. Discusión

El presente estudio evaluó el efecto del alimento complementado con polvo de romero en el crecimiento, la actividad enzimática en el intestino y ciegos pilóricos, así como en la composición proximal del músculo de juveniles de lobina rayada *M. saxatilis*. La utilización de plantas medicinales y sus derivados en la acuicultura constituye un campo de gran interés, dada su capacidad para aportar diversos beneficios potenciales. Entre estos se incluyen la mejora del rendimiento biológico, el aumento de la actividad de enzimas digestivas y la producción de secreciones intestinales, el control de infecciones bacterianas, la reducción del estrés en los organismos acuáticos y su acción como antioxidantes, entre otros. Es importante identificar las plantas medicinales y aromáticas adecuadas, así como las vías de administración y las cantidades óptimas que deben incluirse en la dieta de los organismos acuáticos debido a los beneficios potenciales que podrían aportar en los cultivos acuícolas. Actualmente, la investigación sobre el uso de romero se ha centrado principalmente en especies dulceacuícolas, por lo que esta investigación es una de las primeras que se enfoca en una especie cultivada en agua de mar. Además, contribuye al conocimiento y las aplicaciones del romero en la acuicultura, lo que podría en un futuro favorecer el desarrollo sostenible de los cultivos acuícolas.

4.1 Efecto del romero en la supervivencia y crecimiento

La supervivencia del 66.67% en el T5 se debe a la mortalidad súbita que se presentó el último día del experimento en una de las réplicas de este tratamiento. En los animales muertos se observó hemorragia en la zona ocular, en hígado y en la mandíbula; la duda que surgió fue si alguno de los compuestos del romero pudo haber ocasionado la muerte de los peces. Algunos autores han reportado que la inclusión de romero en la dieta no causa mortalidad de peces en cultivos acuícolas (Hernandez *et al.*, 2018; Naiel *et al.*, 2019; Ebrahimi *et al.*, 2020). El romero posee compuestos como el carnosol, ácido carnósico, ácido rosmarínico, α -pineno, borneol acetato, alcanfor, eucaliptol, borneol, 1,8-cineol, α -pineno y camfor, entre otros (Genena *et al.*, 2008; Ribeiro-Santos *et al.*, 2015). Zoral *et al.* (2018), advierten que el componente 1-8 cineol presente en cantidades superiores a 2 g kg^{-1} en el extracto de romero, puede ocasionar daño hepático y renal. Sin embargo, los mismos autores mencionan que la concentración de 1-8 cineol fue de 0.186 mg kg^{-1} en el extracto a partir de 10 g de la planta de romero, la cual es una cantidad baja para causar mortalidad. Por otra parte, un problema que se ha vuelto común en cultivos acuícolas es la presencia de hongos del género *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium*. Estos hongos producen micotoxinas como las

aflatoxinas, ocratoxinas y fumonisinas, entre otras, causantes de daño hepático, bajo crecimiento e inmunosupresión (Santos *et al.*, 2010). En la presente investigación se descarta que el romero haya sido el causante de la mortalidad debido a que no se registró un evento de mortalidad en los otros tratamientos ni en dos de las réplicas del T5. Además, las variables de calidad del agua fueron rigurosamente controladas, por lo que tampoco fueron las causantes de la mortalidad debido a que se encontraban en un intervalo óptimo para la especie y el recambio de agua del 300% diario en el sistema fue el mismo para todos los tanques. Por último, no se observaron signos de enfermedad ocasionados por agentes patógenos días previos al evento de mortalidad, además de que los tanques recibían mantenimiento diario, el cual consistía en retirar el alimento no consumido y las heces del fondo, así como observaciones del comportamiento de los peces. Por todo lo mencionado anteriormente, no se pudo determinar el factor causante de la mortalidad de los organismos en la réplica del T5.

Durante el experimento se suministró alimento a los peces en proporción equivalente al 4% de su biomasa. Esta tasa de alimentación es mayor al intervalo recomendado por Hung *et al.* (1993) para lobina rayada que oscila entre el 1 y 1.5 % en peces con un peso promedio de 38.2 g mantenidos a una temperatura de cultivo de 19 °C. En el presente estudio se estableció la temperatura de cultivo en 23°C, la cual corresponde a la condición térmica en que los peces son cultivados por la empresa Pacifico Aquaculture en el laboratorio. Además, tomando en cuenta el efecto del aumento de la temperatura del agua en la fisiología de los peces y su relación con el incremento en la tasa metabólica, la consecuencia de ello es aumentar la ingesta, la digestión, la absorción y la asimilación del alimento por parte de los peces (Volkoff y Rønnestad, 2020). Durante el experimento se observó que una parte del alimento no fue ingerida por los peces, la porción del alimento no consumido se precipitó al fondo del tanque y no fue cuantificada. Por lo anterior, es recomendable realizar este tipo de bioensayos hasta que los organismos muestren saciedad aparente.

En relación con la ganancia de peso, peso ganado, tasa de crecimiento específico, tasa de conversión alimenticia, coeficiente de crecimiento térmico, tasa de eficiencia proteica y factor de condición de los juveniles de lobina rayada, no se encontraron diferencias. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Hernández *et al.* (2015) en el peso final de la dorada *S. aurata* alimentada con dietas complementadas con extracto de romero en concentraciones de 0.6, 1.2, 1.8 y 2.4 g · kg⁻¹. De igual manera, Ebrahimi *et al.* (2020) no detectaron diferencias significativas en el peso final del esturión *H. huso* alimentado con dietas complementadas con aceite esencial de romero en proporciones del 0.01, 0.1, 1 y 2%. Asimismo, se ha reportado que el uso del polvo de romero en la dieta no tuvo efecto en el peso final de otras especies como la trucha arcoíris *O. mykiss*, la carpa común *C. carpio* y la tilapia del Nilo *O. niloticus* (Yilmaz *et al.*, 2019; Yilmaz y Er, 2019; Tasa *et al.*, 2020; Yadollahi *et al.*, 2021). En contraste a los resultados del presente

estudio, Karataş *et al.* (2020) reportaron un peso final significativamente mayor al control con alimento completado con extracto de romero en concentraciones de 1 y 3 g · kg⁻¹ de dieta en trucha arcoíris *O. mykiss*. Naiel *et al.* (2020) documentaron una respuesta similar con una concentración de 10 g de polvo de romero por kg de dieta en la tilapia del Nilo *O. niloticus*, al obtener un mayor peso final. En el estudio de Yousefi *et al.* (2019), también se reportó un aumento significativo en el peso final de la carpa común alimentada con dieta complementada con 3% de polvo de romero. En el trucha ártica *S. alpinus* igualmente se obtuvieron efectos positivos del romero en el crecimiento de los peces (Kubiriza *et al.*, 2019). Las posibles razones por la cual no se presentó un efecto positivo en el crecimiento de lobina rayada en el presente estudio, podrían ser por la especie de pez utilizada y la concentración de compuestos bioactivos del romero. Se ha documentado que la salinidad en el sustrato afecta negativamente la concentración de compuestos con actividad biológica del romero (Ershad-Langroudi *et al.*, 2013). La concentración de iones en el agua de mar utilizada durante el experimento podría afectar la estabilidad de los compuestos del romero, por lo que se recomienda considerar el efecto de la salinidad en los compuestos activos del romero.

Se ha documentado que la composición química del aceite esencial de romero obtenido de las hojas de la planta varía en función de los nutrientes del sustrato, temperatura, periodo de riego y temporada del año, entre otros (Serrano *et al.*, 2002; Mwithiga *et al.*, 2022). Todo el romero utilizado en este estudio fue obtenido con el mismo proveedor, sin embargo, se desconoce la composición química de la planta. Es importante mencionar que los compuestos presentes en la planta de romero pueden variar dependiendo de las condiciones de cultivo, sin embargo, los compuestos presentes en mayor cantidad en el aceite de romero son el 1,8-cineol (26 %), α -pineno (20 %), alcanfor (12 %) y canfeno (11 %) (Jiang *et al.*, 2011) y los compuestos fenólicos presentes en el extracto de romero son carnosol (6 %), ácido carnósico (39 %) y ácido cafeico (Romo-Vaquero *et al.*, 2014). Estos factores son determinantes en la concentración de los compuestos activos con actividad biológica del romero. Por otra parte, Ebrahimi *et al.* (2020) reportaron que la adición de un 2% de aceite esencial de romero en la dieta del esturión *H. huso* podría haber tenido un efecto negativo en el peso final, la tasa específica de crecimiento y el factor de condición de los peces. Esto se debe a que los compuestos presentes en el aceite esencial de romero, podrían haber reducido la palatabilidad del alimento, lo que ocasionó un menor consumo por parte de los peces. La composición química del romero podría haber reducido la palatabilidad del alimento para la lobina, y resultar en una menor ingesta de alimento por parte de los peces. Sin embargo, es importante destacar que, en este estudio, no se observó el rechazo al alimento por parte de los peces.

En lo que respecta al coeficiente de crecimiento térmico (CCT), un indicador utilizado para evaluar el impacto de la temperatura en el crecimiento de los peces y prever cómo este varía a diferentes temperaturas (Jobling, 2003), los resultados del presente estudio revelaron que no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos, manteniéndose en un rango constante que osciló entre 0.62 y 0.78. En cuanto al coeficiente de crecimiento térmico, un indicador que se utiliza para evaluar el efecto de la temperatura en el crecimiento y de esta manera anticipar el crecimiento de los peces a diferentes temperaturas (Jobling, 2003), en el presente estudio los valores del CCT no presentaron diferencias significativas entre los tratamientos y se mantuvo en el intervalo de 0.62 a 0.78. Es importante resaltar, que el uso e interpretación como índice de crecimiento se presta a confusiones. Jobling (2003) menciona los problemas asociados al uso del coeficiente de crecimiento térmico, al resaltar que el crecimiento no es uniforme con el aumento de temperatura, sino que sigue una tendencia en forma de campana. En el límite inferior en un intervalo de temperatura, el crecimiento de los organismos aumenta a medida que se eleva la temperatura hasta una temperatura donde alcanzan su crecimiento óptimo. Una vez que la temperatura supera el punto de crecimiento óptimo, esta respuesta se ve disminuida. En consecuencia, esta herramienta es válida para predecir el crecimiento dentro de un intervalo de temperatura previamente determinado, donde el crecimiento del pez se mantiene estable, por consiguiente, dependerá de cada especie. Además, el uso del coeficiente de crecimiento térmico solo es apropiado para especies de peces cuyo factor de condición se mantenga estable durante el tiempo (Jobling, 2003). En este estudio se evaluó el crecimiento únicamente a 23 °C, sin embargo, para poder utilizar este coeficiente de manera adecuada, se recomienda evaluar el crecimiento de la lobina rayada a diferentes temperaturas e identificar en cuales temperaturas la especie presenta un crecimiento uniforme.

La tasa de crecimiento específico y la tasa de conversión alimenticia no mostraron diferencias significativas, sin embargo, se observó la disminución de la TCE a medida que aumentaba la cantidad de polvo de romero en la dieta. Por el contrario, la TCA aumentaba a medida que incrementaba la cantidad de polvo de romero en la dieta. Los valores de la TCE obtenidos en este estudio (1.33 a 1.64 % · día⁻¹) son similares a los reportados por Small y Soares (2000) de 1.15 y 1.53 % · día⁻¹ para la lobina rayada alimentada al 3% de biomasa con una dieta de 42% de proteína y a una temperatura de 23 °C. Los resultados de la TCE en la lobina de la presente investigación son mayores a los reportados por Kenter *et al.* (2018), para lobina rayada *M. saxatilis* alimentada con una dieta que contenía 50 % proteína y 18% lípidos al 1.5-3 % de la biomasa total a la temperatura de 20-21 °C, registrando una TCE entre 0.93 y 1.33 % día⁻¹. Las diferentes TCE se atribuyen al uso de diferentes etapas de desarrollo, en el presente estudio y el de Small y Soares (2000), se utilizaron juveniles con un peso inferior a 100 g, mientras que Kenter *et al.* (2018) utilizaron

adultos con un peso superior a 300 g. Este comportamiento se debe a que, durante las etapas tempranas de desarrollo, los peces experimentan un crecimiento acelerado, el cual se desacelera al alcanzar la etapa adulta (Chen *et al.*, 2022). Por otra parte, el contenido de proteína, lípidos, contenido energético y palatabilidad de la dieta pudieron ocasionar las diferencias entre las tasas de crecimiento entre los estudios comparados.

El crecimiento diario de la lobina rayada (1.33 a $1.54 \text{ \%} \cdot \text{día}^{-1}$) es menor que el de otras especies dulceacuícolas como la trucha arcoíris $2.3 - 2.6 \text{ \%} \cdot \text{día}^{-1}$ (Karataş *et al.*, 2020), la carpa $1.65 - 1.86 \text{ \%} \cdot \text{día}^{-1}$ (Hayat *et al.*, 2018) y la tilapia $2.05 - 2.42 \text{ \%} \cdot \text{día}^{-1}$ (Naiel *et al.*, 2020), sin embargo, se encuentra por encima de los valores reportados para especies cultivadas en agua de mar como la dorada $0.59 - 0.61 \text{ \%} \cdot \text{día}^{-1}$ (Hernández *et al.*, 2014) y el salmón del atlántico $0.62 - 0.68 \text{ \%} \cdot \text{día}^{-1}$ (Sørensen *et al.*, 2016), y está dentro del intervalo reportado para la lobina europea de $1.43 - 1.53 \text{ \%} \cdot \text{día}^{-1}$ (Yilmaz *et al.*, 2012). Es importante mencionar que las especies con una mayor tasa de crecimiento específico se caracterizan por una mayor fecundidad y ciclos de vida más cortos. Estas características las convierten en candidatas ideales para programas de cría selectiva que tienen como objetivo mejorar las características genéticas relacionadas con un crecimiento más rápido y una mayor eficiencia alimenticia (Gjedrem *et al.*, 2012). Dentro de las especies cultivadas en agua de mar, la lobina rayada es la que tiene un crecimiento más rápido alcanzando la talla comercial de 1.36 kg en 24 meses, además, la alta demanda de peces marinos en el mercado y su mayor valor comercial comparado con otras especies dulceacuícolas, la posicionan como una especie atractiva para potenciar su cultivo.

Los valores de la TCA (2.91 a 2.23) para la lobina rayada en este estudio fueron mayores a los obtenidos por Papatryphon y Soares (2000) cuyos valores de TCA oscilaron entre 1.45 y 1.58, y también con los reportados por Papatryphon *et al.* (1999) con valores entre 1.32 y 1.57; en ambos estudios los peces fueron alimentados a saciedad aparente. El incremento en la TCA se atribuye a un exceso en la cantidad de alimento suministrada en comparación al alimento ingerido por los peces, debido a que la tasa de alimentación fue del 4% al día, sin embargo, la totalidad del alimento no fue consumido y no se cuantificó lo que quedó en el agua. Por otra parte, es importante resaltar que las TCA mayores obtenidas en T5 y T10 podrían indicar que la absorción y asimilación del alimento fue menor en estos tratamientos debido a la menor actividad de las enzimas digestivas.

En la presente investigación, también se evaluó la tasa de eficiencia proteica, la cual indica los gramos de peso ganado por gramo de proteína consumida, y para los diferentes tratamientos no se encontraron diferencias en esta respuesta con respecto al control. Investigaciones previas tampoco detectaron que el

romero afecte positivamente la tasa de eficiencia proteica en trucha arcoíris *O. mykiss* y esturión *H. huso* (Ebrahimi *et al.*, 2020; Yadollahi *et al.*, 2021). Sin embargo, se observó la disminución de la TEP a medida que incrementó el polvo de romero en la dieta. Es posible que los valores menores de la TEP en el T5 (0.67) y T10 (0.64) con respecto al control, se deban a que una parte de la proteína total consumida no fue metabolizada y se perdió a través de las heces. Además, se debe considerar que la TEP se ve influenciada por la cantidad de alimento consumido. En este experimento, no se cuantificó el alimento no consumido, lo que limita el cálculo de la TEP obtenida, ya que se consideró el porcentaje total del alimento, incluyendo tanto el consumido como el no consumido. Para la realización de estos cálculos es recomendable cuantificar el alimento no consumido o alimentar a saciedad aparente.

El factor de condición de los peces del T2.5, T5 y T10 no mostraron diferencias en relación con el TC. Los resultados del factor de condición obtenidos en este estudio fueron superiores a los reportados por Hung *et al.* (1993) quienes obtuvieron valores de 0.92 y 1.07 en alevines de lobina rayada alimentados con una dieta que contenía 45.1 % de proteína y 12.4% lípidos, cultivados a una temperatura promedio de 18.9 °C. Por otra parte, Kenter *et al.* (2018) reportaron valores entre 1.16 y 1.35 en lobina rayada cultivada a una salinidad de 30 ppm a 21°C alimentada con una dieta de 50 % proteína y 18% lípidos. Los resultados obtenidos en este estudio del factor de condición indican un buen estado de salud de los juveniles de lobina rayada alimentados con dieta complementada con polvo de romero (Barnham y Baxter, 1998). El factor de condición es un indicador del bienestar fisiológico y nutricional del pez, asimismo es utilizado para evaluar la eficiencia con la que utilizan los nutrientes y de los cambios en las reservas energéticas.

Los valores medios del índice hepatosomático para juveniles de lobina rayada reportados en este estudio fueron entre 2.57 y 3.28. Berger y Halver (1987) reportaron valores de IHS de 3.00 para la lobina rayada alimentada con una dieta con un contenido de 52 % de proteína. Los valores del IHS en el presente estudio son superiores a los reportados para lobina rayada alimentada con una dieta con el 35 % de proteína y 6% de lípidos al 3 % de biomasa al día (IHS 0.99) por Rawles y Gatlin (1998). Asimismo, los valores son altos comparados con los obtenidos por Hung *et al.* (1993) de 1.20 cuando alimentaron a la lobina rayada con una dieta con 42 % proteína y 12 % de lípidos al 1 % de la biomasa al día. El aumento en el tamaño del hígado ocurre cuando se presenta una mayor acumulación de lípidos o glucógeno en este órgano, especialmente cuando las proteínas almacenadas se han agotado (Berger y Halver, 1987). Por otra parte, los niveles elevados de IHS comparados con otros estudios están relacionados con el alto porcentaje de lípidos (14%) en la dieta y a la alta tasa de alimentación (4%). Cuando la ingesta de energía en forma de lípidos es mayor a la energía utilizada, los peces almacenan el exceso en el músculo, en la cavidad visceral y en el hígado en forma de glucógeno y lípidos (Bowyer *et al.*, 2013). Las observaciones realizadas a simple

vista en el hígado de los peces disectados resaltaron las características propias de la esteatosis como un color blanquecino y una consistencia friable. Es recomendable que en próximos estudios se realice la evaluación de la acumulación de lípidos en el interior de los hepatocitos. Aunque el porcentaje de proteínas (45 – 55 %) y lípidos (15 – 20 %) se encuentran dentro de los niveles recomendados para peces de agua templada, la grasa en la cavidad visceral y el alto IHS indican que se requiere optimizar los niveles de lípidos en la dieta y la tasa de alimentación en el cultivo de lobina rayada.

El IHS de los peces del T10 tuvo el valor más alto (3.28) con respecto al control. Un factor que podría haber contribuido a que el tratamiento con una mayor concentración de polvo romero exhibiera un IHS mayor es el probable efecto del ácido carnósico presente en el romero. Romo Vaquero *et al.* (2012), demostraron que el ácido carnósico contenido en el extracto de romero incrementa el tamaño del hígado, inhibe significativamente la lipasa gástrica, disminuye los niveles de triglicéridos en sangre, reduce la absorción de lípidos y favorece la pérdida de peso en ratas Zucker. Además, se ha documentado que el ácido carnósico es capaz de inhibir *in vitro* las enzimas digestivas amilasa, glucosidasa y lipasa (Ercan y El, 2018). Aunque no se ha documentado el efecto del ácido carnósico sobre la lipasa en peces, las similitudes en la secuencia de aminoácidos de la lipasa en distintos vertebrados sugieren la posibilidad de una respuesta similar en la lipasa de peces (Hide *et al.*, 1992). Por otra parte, cuando los peces tienen menor absorción de lípidos utilizan las reservas energéticas almacenadas en el hígado y movilizan los nutrientes del músculo para cubrir la demanda energética mediante un proceso denominado catálisis muscular (Garnica-Gómez, 2022). En este estudio el mayor IHS se observó en los peces del T10 donde hubo un menor peso final, por lo que el romero podría causar una menor absorción de nutrientes y la consecuente movilización de nutrientes del músculo al hígado. Es importante que en futuros estudios se evalúe el efecto del romero en el hígado de peces carnívoros como la lobina rayada, con el enfoque dirigido en el metabolismo de los lípidos y la actividad de enzimas hepáticas. Esta orientación es esencial debido a la importancia del hígado en el almacenamiento y uso de nutrientes.

4.2 Efecto del romero en la composición proximal del músculo de lobina rayada

Las cenizas totales del T5 y T10 fueron mayores en relación con el TC. El incremento en las cenizas totales se asocia a un incremento en la absorción de minerales, la cual se vincula a la presencia de compuestos fenólicos en el romero, como el ácido carnósico, carnosol, ácido rosmarínico y ácido cafeico que actúan como agentes quelantes (García *et al.*, 2019; Yang *et al.*, 2021). Estos compuestos facilitan la acumulación

de iones de hierro en el hígado y músculo, lo que podría explicar la mayor concentración de cenizas totales en los tratamientos con una mayor inclusión de polvo de romero en la dieta (García *et al.*, 2019).

En relación con el porcentaje de proteína en el músculo, los valores oscilaron entre 19.71 y 20.54% sin mostrar efecto del polvo de romero en la dieta. Estos valores se encuentran dentro de los rangos reportados para la lobina rayada (Hung *et al.*, 1993). Es importante destacar que los porcentajes de proteína en músculo de lobina rayada son superiores a los reportados en peces dulceacuícolas alimentados con dietas complementadas con polvo de romero como el esturión (14.12 - 14.65 %, Ebrahimi *et al.*, 2020), la tilapia (14.86 – 15.06 %, Yılmaz *et al.*, 2019) y la trucha arcoíris (16.93 – 17.82 %, Yılmaz y Er, 2019).

La cantidad de lípidos en el músculo de los peces fue significativamente mayor en T5 con respecto al TC. Los valores de lípidos obtenidos se encuentran por debajo de los obtenidos para lobina rayada por Hung *et al.* (1993) de entre 6 y 8.6 %. Por otra parte, se observó que el contenido de humedad total en el músculo de los peces del T5 fue significativamente menor con respecto al TC. Es importante destacar que no se ha documentado que el romero favorezca la acumulación de lípidos en el músculo de los peces (Yılmaz y Er, 2019). Las diferencias en la cantidad de lípidos en el músculo de lobina rayada del T5 podría explicarse por la alta cantidad de lípidos (9%) observados en un solo pez, lo cual influyó significativamente el promedio del tratamiento. Cabe destacar que el número de organismos muestreados en T5 fue menor en comparación con los demás tratamientos. La diferencia en el tamaño de la muestra ocasiona una mayor variabilidad en la estimación de la media debido a la mayor influencia de los valores atípicos. Esto puede aumentar la incertidumbre en la estimación de la media del tratamiento y la dificultad de la detección de diferencias entre tratamientos. En este estudio la mortalidad de una réplica del T5 disminuyó el tamaño de muestra de este tratamiento. Se considera que las diferencias observadas en estas variables se deben al menor tamaño de la muestra y al mayor efecto de los valores atípicos.

4.3 Efecto del romero en la actividad enzimática

El uso de plantas aromáticas en la nutrición acuícola ha demostrado ser una práctica beneficiosa para el desarrollo y crecimiento de los organismos. Las plantas se utilizan con el propósito de estimular la secreción de enzimas digestivas, mejorar la digestión de los nutrientes, modificar la mucosa y modular la composición de la microbiota intestinal, lo que contribuye positivamente a la disponibilidad y absorción

de nutrientes y al crecimiento de los organismos acuáticos (Tadese *et al.*, 2022). El éxito de los cultivos acuícolas depende en gran medida de conocer los hábitos alimenticios, requerimientos nutricionales y las capacidades digestivas de las especies cultivadas con la finalidad de hacer un uso eficiente del alimento. El estudio del efecto de las plantas aromáticas en la fisiología digestiva y la identificación de los tipos y funciones de las enzimas digestivas, es crucial para el crecimiento de los organismos cultivados (Pujante *et al.*, 2017).

En el estudio de enzimas digestivas en peces existen diversas problemáticas asociadas a la obtención de la muestra. En primer lugar, no hay una estandarización en cuanto a la región del intestino a utilizar para determinar la actividad enzimática. En diferentes investigaciones se utiliza la porción anterior, medio o posterior del intestino, mientras que en otros se utiliza el intestino completo para la preparación de los extractos enzimáticos. Además, el periodo de ayuno previo a la obtención de la muestra no es consistente y puede variar entre 3 y 48 horas después de la última alimentación. Por último, algunos estudios optan por enjuagar el tracto digestivo antes de la preparación del extracto enzimático, mientras que otros utilizan el tracto digestivo junto con su contenido (Hidalgo *et al.*, 1999). Estos aspectos aunados a las diferencias entre las técnicas utilizadas, las condiciones de cultivo y la especie utilizada dificultan comparar los resultados obtenidos en diferentes investigaciones.

Se ha documentado el efecto de distintas plantas aromáticas en la secreción de enzimas digestivas de origen pancreático. El presente estudio es de los primeros en evaluar el efecto del romero en una especie cultivada en agua de mar. La actividad de las enzimas digestivas en la lobina rayada fue mayor en los ciegos pilóricos en comparación con el resto del intestino, lo cual concuerda con las expectativas para una especie carnívora (Xiong *et al.*, 2011). Los ciegos pilóricos son extensiones tubulares ciegas con abundantes células secretoras, dentro de sus funciones digestivas se encuentra el almacenamiento de alimento, una mayor área de digestión y absorción de proteínas, lípidos y carbohidratos, además de facilitar la reabsorción de agua e iones inorgánicos (Harpaz y Uni, 1999). Lo observado en este estudio con lobina rayada, confirma la importancia de los ciegos pilóricos en la secreción enzimática y la digestión de los nutrientes. Por otra parte, la mayor concentración de enzimas digestivas en ciegos pilóricos podría deberse a un menor efecto antagonista de los compuestos presentes en el romero. Además, estas estructuras están rodeadas por tejido pancreático y ductos que depositan directamente los jugos pancreáticos y jugos biliares causando una mayor concentración de enzimas digestivas en esta región (Rust, 2002).

El uso de polvo de romero en la dieta disminuyó significativamente la actividad de las enzimas digestivas en el intestino y ciegos pilóricos. En el intestino se registró la actividad significativamente menor de la

tripsina en el T10 y las proteasas alcalinas totales en T2.5 y T10. En los ciegos pilóricos se observó un efecto negativo en la actividad de la tripsina en el T10, la lipasa en T2.5, T5 y T10 y las proteasas alcalinas totales en T2.5 y T10. Los resultados obtenidos contrastan con los reportados por Karataş *et al.* (2020), quienes reportaron un aumento significativo en la actividad enzimática de la tripsina, lipasa y amilasa en el intestino de trucha arcoíris *O. mykiss* alimentada con una dieta complementada con polvo de romero en concentraciones de 1 y 3 g · kg⁻¹. Los estudios previos han mostrado un efecto positivo de distintas plantas en la actividad de enzimas digestivas. Por ejemplo, se ha observado el efecto positivo en la carpa *C. carpio* alimentada con ajo *A. sativum* (Rahime *et al.*, 2023) y con poleo *Mentha pulegium* (Yousefi *et al.*, 2023), así como en el esturión siberiano *Acipenser baerii* alimentado con cedrón *Aloysia citrodora* (Adel *et al.*, 2021). Estos resultados remarcan la importancia de considerar la especie, concentración de la planta en la dieta y las enzimas digestivas cuando se evalúa el uso de fitogénicos y su impacto en la digestión. En la presente investigación con lobina rayada, la disminución significativa de la actividad de enzimas digestivas como la tripsina y las proteasas alcalinas totales en T10 podría ser causada por el efecto antibiótico de los compuestos del romero sobre bacterias que participan en la digestión. Se ha documentado en peces marinos que los géneros *Clostridium*, *Aeromonas*, *Photobacterium*, *Pseudomonas*, *Enterobacter* y *Vibrio* ayudan en la digestión de proteínas mediante la producción de proteasas y quitinasas (Egerton *et al.*, 2018).

La lipasa pancreática es la enzima encargada de hidrolizar los enlaces éster de los triacilgliceroles, fosfolípidos, colesterol y vitaminas liposolubles (Zhang *et al.*, 2020). Los productos de la acción de la lipasa son diacilgliceroles y ácidos grasos libres (Rueda-López *et al.*, 2017). Ercan y El (2018) reportaron que el ácido carnósico, compuesto activo presente en el romero, inhibe la actividad de la amilasa y lipasa *in vitro*. Asimismo, Romo Vaquero *et al.* (2012) reportaron que el extracto de romero rico en ácido carnósico inhibe la lipasa pancreática en ratas. Además, Ninomiya *et al.* (2004) reportaron que el ácido carnósico y el carnosol tienen un efecto inhibitorio *in vitro* sobre la lipasa pancreática. En este estudio se observó que la actividad de la lipasa en ciegos pilóricos de los peces del T2.5, T5 y T10 fue significativamente menor ($p < 0.001$) con respecto a el control. Eso podría indicar un posible efecto del ácido carnósico como inhibidor de esta enzima. En próximos estudios es recomendable evaluar el contenido de ácido carnósico en la planta de romero y en el alimento, así como bioensayos *in vitro* del efecto de este compuesto sobre la lipasa de los peces.

La disminución de la actividad de la lipasa compromete la digestión y asimilación de lípidos, lo que podría ocasionar una menor absorción de nutrientes en peces. Por lo tanto, se recomienda evaluar otros parámetros como el índice de grasa visceral para evaluar el efecto del polvo de romero en la absorción de

lípidos y su acumulación en el hígado en relación con la inhibición de la lipasa. En peces, la digestión y absorción de lípidos y ácidos grasos es de suma importancia debido a que son el principal estimulante para la liberación de la colecistoquinina (CKK) en los enterocitos (Harden *et al.*, 2012). La CKK es una hormona encargada de regular la digestión, evita el vaciado del tracto digestivo, activa la motilidad del intestino y estimula la contracción de la vesícula biliar y la secreción de enzimas pancreáticas como la amilasa, tripsina, quimiotripsina y proteasas (Le *et al.*, 2019). Por otra parte, la tripsina es una enzima proteolítica, responsable de la cascada de activación de otros zimógenos de enzimas digestivas a su forma activa como la quimiotripsina, elastasa, colagenasa y lipasa (Rust, 2002). Por lo tanto, la disminución de la actividad de la tripsina en la lobina podría afectar directamente la actividad de otras enzimas y en consecuencia reducir la digestión y absorción de nutrientes.

El conjunto de microorganismos que habita el tracto intestinal en los peces se le denomina microbiota intestinal en la que predominan bacterias, hongos, virus y protozoarios (Feng *et al.*, 2018). La microbiota intestinal desempeña diversas funciones como la estimulación en la ingesta de alimento, favorece procesos digestivos y metabólicos y estimula la respuesta inmune (Butt y Volkoff, 2019). La composición y diversidad de la microbiota intestinal de los peces se ven influenciadas por factores intrínsecos como la genética del pez, la edad, el estado nutricional y el estado de salud, y extrínsecos como la temperatura, salinidad y dieta de los peces (Butt y Volkoff, 2019). En especies cultivadas en ambientes marinos como la dorada *S. aurata*, la trucha marina *Salmo trutta trutta*, el salmón del Atlántico *Salmo salar*, la lobina rayada *M. saxatilis*, sardina *Sardinella longiceps* y macarela *Scomber scombrus*, se han identificado los géneros de bacterias predominantes como *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Aeromonas*, *Cytophaga*, *Clostridium*, *Vibrio*, *Flavobacterium* y *Enterobacter* (Egerton *et al.*, 2018). Estos géneros de bacterias en la microbiota intestinal son responsables de producir enzimas hidrolasas de sales biliares encargadas de la desconjugación de estos ácidos biliares primarios (Bourgin *et al.*, 2021). La desconjugación de estos ácidos afecta negativamente el metabolismo de los lípidos, la obtención de energía y la ganancia de peso (Geng y Lin, 2017; Yao *et al.*, 2018). En la lobina rayada se han identificado como dominantes los géneros *Aeromonas*, *Pseudomonas* y *Vibrio* (MacFarlane *et al.*, 1986), sin embargo, no se ha documentado el efecto de algún fitogénico en la microbiota de esta especie. Actualmente no hay estudios que hayan documentado el efecto del romero y sus compuestos en la modulación de la microbiota intestinal de peces. Sin embargo, en un estudio reciente se documentó que la dieta complementada con polvo de ajo (*A. sativum*) en concentraciones de 25 % en el jurel cola amarilla (*Seriola dorsalis*) ocasiona un desbalance de la microbiota, lo que podría ocasionar disbiosis y la proliferación de bacterias patógenas (Valenzuela-Gutiérrez *et al.*, 2023). Asimismo, Rimoldi *et al.* (2020) reportaron que una dieta complementada con ajo y aceite esencial de plantas de la familia *Lamiaceae* causa cambios en la microbiota de la lobina europea

Dicentrarchus labrax. Los autores sugieren que los cambios en la microbiota podrían deberse al efecto antibiótico de los fitogénicos, debido a la disminución en la abundancia de bacterias consideradas patógenas oportunistas como coliformes y Vibrionales. Por último, se ha reportado el efecto del timol y carvacrol en la microbiota responsable de estimular la respuesta inmune de la tilapia *O. niloticus*, así como modificación en la abundancia de Lactobacilos y coliformes (Ran *et al.*, 2016). En futuras investigaciones relacionadas con el uso de fitogénicos en la dieta de peces, se recomienda complementar con análisis de la composición y diversidad taxonómica de la microbiota intestinal.

Los fitogénicos como el romero, han demostrado tener efectos beneficiosos en el intestino de peces como las propiedades antibióticas, la reducción de la intensidad y severidad de infecciones, mejorar la absorción de nutrientes, reducción de la producción de compuestos antinutricionales y la inhibición de la producción de citoquinas pro inflamatorias de las células inmunes del intestino (Caipang, 2020). Además, los compuestos fenólicos presentes en el romero han mostrado ser eficientes antibióticos contra bacterias de los géneros *Listeria*, *Escherichia*, *Salmonella*, *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Pseudomonas* y *Lactobacillus* (Stojiljkovic, 2018). Se ha documentado que la aplicación de fitogénicos reduce las poblaciones de bacterias pertenecientes a los géneros *Aeromonas*, *Plesiomonas*, *Pseudomonas*, *Vibrio* y *Enterobacter* en carpas (Caipang, 2020). Las modificaciones en la microbiota inducidas por el uso de fitogénicos pueden influir en las funciones de los ácidos biliares en el proceso de digestión y absorción de nutrientes

Los ácidos biliares son sintetizados en el hígado a partir del colesterol y aminoácidos como la glicina y taurina, tienen propiedades anfífilas que facilitan la formación de micelas que promueven la digestión de lípidos mediante enzimas digestivas y su posterior absorción (Bourgin *et al.*, 2021). Los ácidos biliares conjugados son eficientes en la emulsificación y absorción de lípidos y nutrientes liposolubles (Geng y Lin, 2017). Es posible que, debido al efecto antibiótico del ácido carnósico presente en el romero, la comunidad microbiana responsable de la desconjugación de ácidos biliares en el intestino haya experimentado cambios, lo que podría resultar en un desequilibrio en la actividad de los ácidos biliares ocasionando una menor digestión y absorción de lípidos y un menor peso final en los peces del T5 y T10. En investigaciones futuras se recomienda evaluar la composición de la microbiota y análisis enzimático de hidrolasas de sales biliares de peces alimentados con polvo de romero y sus compuestos activos, lo que permitirá evaluar su efecto en la digestión de lípidos.

La mucosa intestinal protege al epitelio del quimo ácido (sustancia semifluida que resulta de la digestión parcial de los alimentos en el estómago), enzimas digestivas y patógenos. Asimismo, las secreciones intestinales facilitan el transporte de nutrientes entre el lumen y el torrente sanguíneo a través de las

vellosidades intestinales (Firmino *et al.*, 2021). Se ha documentado que la planta cedrón (*Aloysia citrodora*) estimula la secreción de mucosa intestinal en el esturión siberiano *Acipenser baerii* (Adel *et al.*, 2021). Yang *et al.* (2021), documentaron el efecto positivo del extracto de romero en la longitud de las vellosidades intestinales. Resultados similares fueron obtenidos por Margaret *et al.* (2021) con tilapia *O. niloticus* alimentada con una dieta complementada con fitogénicos como el timol y el limoneno, los cuales también incrementaron la longitud de las vellosidades intestinales. El aumento en el tamaño de estas estructuras se asocia con una mayor superficie disponible para la absorción de nutrientes, ya que están en contacto directo con el quimo en el lumen intestinal. En el contexto de este estudio, es plausible que el efecto de los polifenoles como agentes antibióticos haya tenido un impacto en la microbiota y la mucosa intestinal, lo que a su vez podría haber comprometido la capacidad de absorción de nutrientes en las vellosidades intestinales. Por lo tanto, es esencial considerar las posibles alteraciones en la morfología de las vellosidades intestinales inducidas por los fitogénicos en investigaciones futuras.

El uso de plantas medicinales y aromáticas en acuicultura es un área de estudio de interés reciente. Ha demostrado favorecer el crecimiento, la actividad enzimática, la respuesta inmune y antioxidante, entre otras. Identificar el tipo de compuestos presentes en las plantas, los posibles efectos sinérgicos entre ellos y las cantidades administradas resulta imprescindible para observar respuestas que favorezcan el crecimiento de los peces cultivados. En relación con el uso de romero en la dieta de la lobina rayada *M. saxatilis*, se recomienda complementar con estudios donde se evalúe el efecto del romero en la microbiota intestinal, histología del intestino, el efecto en las enzimas digestivas y otros indicadores que permitan conocer de forma integrada el desempeño fisiológico de la especie.

Capítulo 5. Conclusiones

La supervivencia, el crecimiento, la tasa de conversión alimenticia, la tasa de eficiencia proteica y el factor de condición de la lobina rayada no fueron afectados por la inclusión de polvo de romero en la dieta en concentraciones de 2.5, 5 y 10 g · kg⁻¹.

La inclusión del polvo de romero en la dieta en concentración de 10 g · kg⁻¹ favoreció la acumulación de lípidos en el hígado de lobina rayada, lo que podría indicar la movilización de lípidos del músculo para su uso en la producción de energía.

La inclusión de polvo de romero en la dieta en concentraciones de 10 g · kg⁻¹ disminuyó la actividad de las enzimas digestivas tripsina, lipasa y proteasas alcalinas totales en intestino y ciegos pilóricos, comprometiendo la digestión y absorción de nutrientes ocasionando un menor crecimiento.

El polvo de romero afectó positivamente la cantidad de cenizas totales, lípidos y extractos libres de nitrógeno en el músculo de lobina rayada.

La investigación sobre el impacto de los fitogénicos en la fisiología digestiva de los peces reviste una gran importancia en el ámbito de la acuicultura, ya que podría contribuir significativamente a mejorar el crecimiento, fortalecer la respuesta inmunológica y reducir la incidencia de enfermedades en las especies cultivadas.

Los estudios futuros sobre el efecto de romero en dietas de peces deberán complementarse con análisis en la composición química de la planta, posible efecto inhibitor de enzimas digestivas, efecto en el metabolismo de los lípidos, alteraciones en la morfología de las vellosidades del intestino y en la modulación de la microbiota.

Literatura citada

- Abutbul, S., Golan-Goldhirsh, A., Barazani, O., & Zilberg, D. (2004). Use of *Rosmarinus officinalis* as a treatment against *Streptococcus iniae* in tilapia (*Oreochromis* sp.). *Aquaculture*, 238 (1–4), 97–105. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2004.05.016>
- Adel, M., Dawood, M. A. O., Gholamhosseini, A., & Sakhaie, F. (2021). Effect of the extract of lemon verbena (*Aloysia citrodora*) on the growth performance, digestive enzyme activities, and immune-related genes in Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*). *Aquaculture*, 541 (February), 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.736797>
- Afonso, L. O. B. (2020). Identifying and managing maladaptive physiological responses to aquaculture stressors. En *Fish Physiology* (Vol. 38). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/bs.fp.2020.10.002>
- Altemimi, A., Lakhssassi, N., Baharlouei, A., Watson, D. G., & Lightfoot, D. A. (2017). Phytochemicals: extraction, isolation, and identification of bioactive compounds from plant extracts. *Plants*, 6 (42). <https://doi.org/10.3390/plants6040042>
- Andersen, L. K., Abernathy, J., Berlinsky, D. L., Bolton, G., Booker, M. M., Borski, R. J., Brown, T., Cerino, D., Ciaramella, M., Clark, R. W., Frinsko, M. O., Fuller, S. A., Gabel, S., Green, B. W., Herbst, E., Hodson, R. G., Hopper, M., Kenter, L. W., Lopez, F., Reading, B. J. (2021). The status of striped bass, *Morone saxatilis*, as a commercially ready species for U.S. marine aquaculture. *Journal of the World Aquaculture Society*, 52 (3), 710–730. <https://doi.org/10.1111/jwas.12812>
- Andrade, J. M., Faustino, C., Garcia, C., Ladeiras, D., Reis, C. P., & Rijo, P. (2018). *Rosmarinus officinalis* L.: an update review of its phytochemistry and biological activity. *Future Science*, 4 (4). <https://doi.org/10.4155/fsoa-2017-0124>
- Applebaum, S. L., Perez, R., Lazo, J. P., & Holt, G. J. (2001). Characterization of chymotrypsin activity during early ontogeny of larval red drum (*Sciaenops ocellatus*). *Fish Physiology and Biochemistry*, 25, 291–300. <https://doi.org/10.1023/A:1023202219919>
- Araújo, B. C., Rodriguez, M., Honji, R. M., Rombenso, A. N., del Rio-Zaragoza, O. B., Cano, A., Tinajero, A., Mata-Sotres, J. A., & Viana, M. T. (2021). Arachidonic acid modulated lipid metabolism and improved productive performance of striped bass (*Morone saxatilis*) juvenile under sub- to optimal temperatures. *Aquaculture*, 530 (August 2020), 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735939>
- Association of Official Analytical Chemists (AOAC). (1990). *Official Methods of Analysis of the AOAC* (K. Helrich (ed.); 15a ed.). Association of Official Analytical Chemists. Inc.
- Association of Official Analytical Chemists (AOAC). (2006). *Official Methods of Analysis of AOAC International* (W. Horwitz & G. W. Latimer (eds.); 18a ed.). AOAC International.
- Avila Sosa, R., Navarro Cruz, A. R., Vera López, O., Dávila Márquez, R. M., Melgoza Palma, N., & Meza Pluma, R. (2011). Romero (*Rosmarinus officinalis* L.): una revisión de sus usos no culinarios. *Ciencia y mar*, 43, 23–36. <https://biblat.unam.mx/hevila/Cienciaymar/2011/no43/3.pdf>

- Barnham, C., & Baxter, A. (1998). Condition Factor, K, for Salmonid Fish. *Fisheries Notes, Marzo 1998*. <http://bamboorods.ca/Trout%20condition%20factor.pdf>
- Bellumori, M., Innocenti, M., Congiu, F., Cencetti, G., Raio, A., Menicucci, F., Mulinacci, N., & Michelozzi, M. (2021). Within-plant variation in *Rosmarinus officinalis* L. terpenes and phenols and their antimicrobial activity against the rosemary phytopathogens *Alternaria alternata* and *Pseudomonas viridiflava*. *Molecules*, 26, 1–19. <https://doi.org/10.3390/molecules26113425>
- Berger, A., & Halver, J. E. (1987). Effect of dietary protein, lipid and carbohydrate content on the growth, feed efficiency and carcass composition of striped bass, *Morone saxatilis* (Walbaum), fingerlings. *Aquaculture Research*, 18 (4), 345–356. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.1987.tb00323.x>
- Bone, Q., & Moore, R. H. (2008). Biology of fishes, third edition. En Q. Bone & R. H. Moore (Eds.), *Biology of Fishes* (3a ed.). Taylor & Francis. <https://doi.org/10.4324/9780203885222>
- Borrás-Linares, I., Stojanović, Z., Quirantes-Piné, R., Arráez-Román, D., Švarc-Gajić, J., Fernández-Gutiérrez, A., & Segura-Carretero, A. (2014). *Rosmarinus officinalis* leaves as a natural source of bioactive compounds. *International Journal of Molecular Sciences*, 15 (11), 20585–20606. <https://doi.org/10.3390/ijms151120585>
- Bourgin, M., Kriaa, A., Mkaouar, H., Mariaule, V., Jablaoui, A., Maguin, E., & Rhimi, M. (2021). Bile Salt Hydrolases: at the crossroads of microbiota and human health. *Microorganisms*, 9 (6), 1–12. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9061122>
- Bowyer, J. N., Qin, J. G., & Stone, D. A. J. (2013). Protein, lipid and energy requirements of cultured marine fish in cold , temperate and warm water. *Reviews in Aquaculture*, 5, 10–32. <https://doi.org/10.1111/j.1753-5131.2012.01078.x>
- Bulfon, C., Volpatti, D., & Galeotti, M. (2015). Current research on the use of plant-derived products in farmed fish. *Aquaculture Research*, 46 (3), 513–551. <https://doi.org/10.1111/are.12238>
- Butt, R. L., & Volkoff, H. (2019). Gut microbiota and energy homeostasis in fish. *Frontiers in Endocrinology*, 10 (JAN), 6–8. <https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00009>
- Caipang, C. M. A. (2020). Phyto-genics in aquaculture: a short review of their effects on gut health and microflora in fish. *The Philippine Journal of Fisheries*, 27 (2), 246–259. <https://doi.org/10.31398/tpjf/27.2.2020-0006>
- Caipang, C. M. A., Suharman, I., Avillanosa, A. L., & Gonzales-Plasus, M. M. (2021). Influence of phyto-genic feed additives on the health status in the gut and disease resistance of cultured fish. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 695 (1), 1–9. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/695/1/012024>
- Canada Department of Fisheries and Oceans. (2004). *Euthanasia of finfish* (Sep). https://ccac.ca/Documents/Education/DFO/3_Euthanasia_of_Finfish.pdf
- Chen, X., Liu, B., & Fang, Z. (2022). Age and growth of fish. En X. Chen & B. Liu (Eds.), *Biology of Fishery Resources* (pp. 71–111). Springer Nature Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-16-6948-4_4
- Citarasu, T. (2010). Herbal biomedicines: A new opportunity for aquaculture industry. *Aquaculture International*, 18 (3), 403–414. <https://doi.org/10.1007/s10499-009-9253-7>

- CONAPESCA (Comisión Nacional de Acuicultura y Pesca). (2018). *Produce acuicultura mexicana más de 400 mil toneladas de pescados y mariscos*. <https://www.gob.mx/conapesca/prensa/produce-acuicultura-mexicana-mas-de-400-mil-toneladas-de-pescados-y-mariscos-172466>
- de Cruz, C. R., Yamamoto, F. Y., Castillo, S., & Gatlin, D. M. (2020). Establishing the optimal adenosine 5'-monophosphate level for hybrid striped bass *Morone chrysops* × *Morone saxatilis*: effects on growth performance, nutrient digestibility, and immune modulation during acute and chronic stress. *Aquaculture*, 520 (October), 1–44. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734668>
- Debnath, D., Pal, A. K., Sahu, N. P., Yengkokpam, S., Baruah, K., Choudhury, D., & Venkateshwarlu, G. (2007). Digestive enzymes and metabolic profile of *Labeo rohita* fingerlings fed diets with different crude protein levels. *Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology*, 146 (1), 107–114. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2006.09.008>
- Ebrahimi, E., Haghjou, M., Nematollahi, A., & Goudarzian, F. (2020). Effects of rosemary essential oil on growth performance and hematological parameters of young great sturgeon (*Huso huso*). *Aquaculture*, 521 (December). <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734909>
- Egerton, S., Culloty, S., Whooley, J., Stanton, C., Ross, R. P., & Ross, R. P. (2018). The gut microbiota of marine fish. *Frontiers in Microbiology*, 9 (May), 1–17. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00873>
- Ercan, P., & El, S. N. (2018). International journal of biological macromolecules bioaccessibility and inhibitory effects on digestive enzymes of carnosic acid in sage and rosemary. *International Journal of Biological Macromolecules*, 115, 933–939. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.04.139>
- Erlanger, B. F., Kokowsky, N., & Cohen, W. (1961). The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 95 (2), 271–278. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(61\)90145-X](https://doi.org/10.1016/0003-9861(61)90145-X)
- Ershad Langroudi, M., Sedaghatthoor, S., & Bidarigh, S. (2013). Effect of different salinity levels on the composition of rosemary (*Rosmarinus officinalis*) essential oils. *American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences*, 1, 68–71. [https://www.idosi.org/aejaes/jaes13\(1\)13/11.pdf](https://www.idosi.org/aejaes/jaes13(1)13/11.pdf)
- Etnier, D. A., & Starnes, W. C. (1993). *Fishes of Tennessee* (D. A. Etnier & W. C. Starnes (eds.)). The University Of Tennessee Press / Knoxville.
- FAO (Food and Agriculture Organization). (2022). The State of World Fisheries and Aquaculture 2022. Towards blue transformation. En *In Brief to The State of World Fisheries and Aquaculture 2022*. FAO. <https://doi.org/10.4060/cc0463en>
- Feng, Q., Chen, W. D., & Wang, Y. D. (2018). Gut microbiota: an integral moderator in health and disease. *Frontiers in Microbiology*, 9 (FEB), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00151>
- Firmino, J. P., Galindo-villegas, J., Reyes-lo, F. E., & Gisbert, E. (2021). Phytogetic Bioactive Compounds Shape Fish Mucosal Immunity. *Frontiers in Immunology*, 12 (June). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.695973>
- Flores-Villa, E., Sáenz-Galindo, A., Castañeda-Facio, A. O., & Narro-Céspedes, R. I. (2020). Romero (*Rosmarinus officinalis* L.): su origen, importancia y generalidades de sus metabolitos secundarios. *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 23. <https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2020.0.266>

- Garcia, E. R. de M., Chaves, N. R. B., De Oliveira, C. A. L., Kiefer, C., & De Melo, E. P. (2019). Performance and egg quality of laying hens fed with mineral sources and rosemary oil. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 91 (2), 241–246. <https://doi.org/10.1590/0001-3765201820180516>
- Garnica-Gómez, L. A. (2022). Efecto de las macroalgas como ingrediente funcional en el desempeño biológico, capacidad digestiva y respuesta inmune de la totoaba, *Totoaba macdonaldi*. [Tesis de Maestría en Ciencias. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California.] Repositorio institucional: <https://cicese.repositorioinstitucional.mx/jspui/handle/1007/3672>
- Genena, A. K., Hense, H., Smânia, A., & De Souza, S. M. (2008). Rosemary (*Rosmarinus officinalis*). A study of the composition, antioxidant and antimicrobial activities of extracts obtained with supercritical carbon dioxide. *Ciencia e Tecnologia de Alimentos*, 28 (2), 463–469. <https://doi.org/10.1590/S0101-20612008000200030>
- Geng, W., & Lin, J. (2017). Bacterial bile salt hydrolase : an intestinal microbiome target for enhanced animal health. *Animal Health Research Reviews*, 17 (2), 148–158. <https://doi.org/10.1017/S1466252316000153>
- Gentry, R. R., Froehlich, H. E., Grimm, D., Kareiva, P., Parke, M., Rust, M., Gaines, S. D., & Halpern, B. S. (2017). Mapping the global potential for marine aquaculture. *Nature Ecology and Evolution*, 1 (9), 1317–1324. <https://doi.org/10.1038/s41559-017-0257-9>
- Gioda, C. R., Pretto, A., de Souza Freitas, C., Leitemperfer, J., Lucia Loro, V., Lazzari, R., Ademar Lissner, L., Baldisserotto, B., & Salbego, J. (2017). Different feeding habits influence the activity of digestive enzymes in freshwater fish. *Ciência Rural, Santa Maria*, 47 (03), 1–7. <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20160113>
- Gjedrem, T., Robinson, N., & Rye, M. (2012). The importance of selective breeding in aquaculture to meet future demands for animal protein: A review. *Aquaculture*, 117–129. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.04.008>
- Gjellesvik, D. R., Lombardo, D., & B.T., W. (1992). Pancreatic bile salt dependent lipase from cod (*Gadus morhua*): Purification and properties. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)/Lipids and Lipid Metabolism*, 1124 (2), 123–134. [https://doi.org/10.1016/0005-2760\(92\)90088-D](https://doi.org/10.1016/0005-2760(92)90088-D)
- Hani, Y. M. I., Marchand, A., Turies, C., Kerambrun, E., Palluel, O., Bado-Nilles, A., Beaudouin, R., Porcher, J. M., Geffard, A., & Dedourge-Geffard, O. (2018). Digestive enzymes and gut morphometric parameters of threespine stickleback (*Gasterosteus aculeatus*): influence of body size and temperature. *PLoS ONE*, 13 (4), 1–21. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0194932>
- Harden, C. J., Jones, A. N., Maya-Jimenez, T., Barker, M. E., Hepburn, N. J., Garaiova, I., Plummer, S. F., & Corfe, B. M. (2012). Effect of different long-chain fatty acids on cholecystokinin release in vitro and energy intake in free-living healthy males. *British Journal of Nutrition*, 108 (4), 755–758. <https://doi.org/10.1017/S0007114511006003>
- Harpaz, S., & Uni, Z. (1999). Activity of intestinal mucosal brush border membrane enzymes in relation to the feeding habits of three aquaculture fish species. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 124 (2), 155–160. [https://doi.org/10.1016/S1095-6433\(99\)00106-3](https://doi.org/10.1016/S1095-6433(99)00106-3)

- Harrell, R. M. (1997). Striped Bass and Other Morone Culture, Volume 30. En *Developments in Aquaculture and Fisheries Science* (p. 366). Elsevier.
- Hayat, M., Nugroho, R. A., & Aryani, R. (2018). Influence of different stocking density on the growth, feed efficiency, and survival of Majalaya common carp (*Cyprinus carpio* Linnaeus 1758). *F1000Research*, 7, 1–19. <https://doi.org/10.12688/f1000research.16875.1>
- Henriksson, P. J. G., Belton, B., Murshed-E-Jahan, K., & Rico, A. (2018). Measuring the potential for sustainable intensification of aquaculture in Bangladesh using life cycle assessment. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115 (12), 2958–2963. <https://doi.org/10.1073/pnas.1716530115>
- Hernández-Contreras, Á., & Hernández, M. D. (2020). Application of aromatic plants and their extracts in aquaculture. En *Feed Additives*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814700-9.00014-5>
- Hernández, A., García, B., Caballero, M. J., & Hernández, M. D. (2015). Preliminary insights into the incorporation of rosemary extract (*Rosmarinus officinalis* L.) in fish feed: influence on performance and physiology of gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Fish Physiology and Biochemistry*, 41 (4), 1065–1074. <https://doi.org/10.1007/s10695-015-0069-2>
- Hernández, A., García, B., Jordán, M. J., & Hernández, M. D. (2014). Improved conservation of gilthead seabream (*Sparus aurata*) in ice storage. The influence of doses of rosemary extract added to feed. *Aquaculture*, 426–427, 31–40. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.01.018>
- Hernandez, C., Sanchez-Gutierrez, E. Y., Ibarra-Castro, L., Pena, E., Gaxiola, G., & Calderon De La Barca, A. M. (2018). Effects of different commercial feeds and enrichments on biochemical composition and fatty acid profile of rotifer (*Brachionus plicatilis*, Müller 1786) and *Artemia franciscana*. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 18 (10), 81–90. https://doi.org/10.4194/1303-2712-v18_10_09
- Hidalgo, M. ., Urea, E., & Sanz, A. (1999). Comparative study of digestive enzymes in fish with different nutritional habits. Proteolytic and amylase activities. *Aquaculture*, 170 (3–4), 267–283. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(98\)00413-X](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(98)00413-X)
- Hide, W. A., Chan, L., & Li, W. H. (1992). Structure and evolution of the lipase superfamily. *Journal of Lipid Research*, 33 (2), 167–178. [https://doi.org/10.1016/s0022-2275\(20\)41537-8](https://doi.org/10.1016/s0022-2275(20)41537-8)
- Hofer, R. (1979). The adaptation of digestive enzymes to temperature, season and diet in roach, *Rutilus rutilus* L. and rudd *Scardinius erythrophthalmus* L. 1. Amylase. *Journal of Fish Biology*, 14, 565–572. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1979.tb03556.x>
- Hofer, R., & Schiemer, F. (1981). Proteolytic activity in the digestive tract of several species of fish with different feeding habits. *Oecologia*, 48 (3), 342–345. <https://doi.org/10.1007/BF00346492>
- Hoseini, S. M., Yousefi, M., Hoseinifar, S. H., & Van Doan, H. (2019). Effects of dietary arginine supplementation on growth, biochemical, and immunological responses of common carp (*Cyprinus carpio* L.), stressed by stocking density. *Aquaculture*, 503, 452–459. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.01.031>

- Hoseinifar, S. H., Sun, Y. Z., Zhou, Z., Van Doan, H., Davies, S. J., & Harikrishnan, R. (2020). Boosting immune function and disease bio-control through environment-friendly and sustainable approaches in finfish aquaculture: herbal therapy scenarios. *Reviews in Fisheries Science and Aquaculture*, 28 (3), 303–321. <https://doi.org/10.1080/23308249.2020.1731420>
- Hummel, B. C. W. (1959). A modified spectrophotometric determination of chymotrypsin, trypsin, and thrombin. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 37 (12). <https://doi.org/10.1139/o59-157>
- Hung, S. S. O., Conte, F. S., & Hallen, E. F. (1993). Effects of feeding rates on growth, body composition and nutrient metabolism in striped bass (*Morone saxatilis*) fingerlings. *Aquaculture*, 112 (4), 349–361. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(93\)90395-F](https://doi.org/10.1016/0044-8486(93)90395-F)
- INAPESCA (Instituto Nacional de Pesca y Acuicultura). (2021). Carta Nacional Acuícola. [https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/630145/DOF - Diario Oficial de la Federaci n CNA.pdf](https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/630145/DOF_-_Diario_Oficial_de_la_Federaci_n_CNA.pdf)
- Jiang, Y., Wu, N., Fu, Y., Wang, W., & Luo, M. (2011). Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of Rosemary. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 32 (1), 63–68. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2011.03.011>
- Jobling, M. (2003). The thermal growth coefficient (TGC) model of fish growth: a cautionary note. *Aquaculture Research*, 34 (7), 581–584. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2109.2003.00859.x>
- Jordán, M. J., Lax, V., Rota, M. C., Lorán, S., & Sotomayor, J. A. (2013). Effect of the phenological stage on the chemical composition, and antimicrobial and antioxidant properties of *Rosmarinus officinalis* L essential oil and its polyphenolic extract. *Industrial Crops and Products*, 48, 144–152. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.04.031>
- Karataş, T., Korkmaz, F., Karataş, A., & Yildirim, S. (2020). Effects of rosemary (*Rosmarinus officinalis*) extract on growth, blood biochemistry, immunity, antioxidant, digestive enzymes and liver histopathology of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture Nutrition*, 26 (5), 1533–1541. <https://doi.org/10.1111/anu.13100>
- Kenter, L. W., Kovach, A. I., Woods, L. C., Reading, B. J., & Berlinsky, D. L. (2018). Strain evaluation of striped bass (*Morone saxatilis*) cultured at different salinities. *Aquaculture*, 492, 215–225. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.04.017>
- Kubiriza, G. K., Árnarson, J., Sigurgeirsson, Ó., Hamaguchi, P., Snorrason, S., Tómasson, T., & Thorarensen, H. (2019). Growth and hepatic antioxidant enzyme activity of juvenile arctic charr (*Salvelinus alpinus*) fed on diets supplemented with ethoxyquin, rosemary (*Rosmarinus officinalis*), or bladder wrack (*Fucus vesiculosus*). *Aquaculture International*, 27 (1), 287–301. <https://doi.org/10.1007/s10499-018-0324-5>
- Kuebutornye, F. K. A., & Abarike, E. D. (2020). The contribution of medicinal plants to tilapia aquaculture: a review. *Aquaculture International*, 28 (3), 965–983. <https://doi.org/10.1007/s10499-020-00506-3>
- Kuz'mina, V. V. (1996). Influence of age on digestive enzyme activity in some freshwater teleosts. *Aquaculture*, 148 (1), 25–37. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(96\)01370-1](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(96)01370-1)

- Le, H. T. M. D., Lie, K. K., Giroud-Argoud, J., Rønnestad, I., & Sæle, O. (2019). Effects of cholecystokinin (cck) on gut motility in the stomachless fish ballan wrasse (*Labrus bergylta*). *Frontiers in Neuroscience*, 13 (JUN), 1–20. <https://doi.org/10.3389/fnins.2019.00553>
- Linhartová, Z., Lunda, R., Dvořák, P., Bárta, J., Bártová, V., Kadlec, J., Samková, E., Bedrníček, J., Pešek, M., Laknerová, I., Možina, S. S., Smetana, P., & Mráz, J. (2019). Influence of rosemary extract (*Rosmarinus officinalis*) Inolens to extend the shelf life of vacuum-packed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fillets stored under refrigerated conditions. *Aquaculture International*, 27 (3), 833–847. <https://doi.org/10.1007/s10499-019-00369-3>
- MacFarlane, R. D., McLaughlin, J. J., & Bullock, G. L. (1986). Quantitative and qualitative studies of gut flora in striped bass from estuarine and coastal marine environments. *Journal of wildlife diseases*, 22 (3), 344–348. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-22.3.344>
- Manage, P. M. (2018). Heavy use of antibiotics in aquaculture: Emerging human and animal health problems – A review. *Sri Lanka Journal of Aquatic Sciences*, 23 (1), 13–27. <https://doi.org/10.4038/sljas.v23i1.7543>
- Margaret, A., Euglance, G. M., & Racheal, N. (2021). Diets supplemented with limonene and thymol modify intestinal histomorphology of Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. *Scientific African*, 12. <https://doi.org/10.1016/j.sciaf.2021.e00750>
- Martin-Robichaud, D. J., & Peterson, R. H. (1998). Effects of light intensity, tank colour and photoperiod on swimbladder inflation success in larval striped bass, *Morone saxatilis* (Walbaum). *Aquaculture Research*, 29 (8), 539–547. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2109.1998.00234.x>
- Mwithiga, G., Maina, S., Gitari, J., & Muturi, P. (2022). Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) growth rate, oil yield and oil quality under differing soil amendments. *Heliyon*, 8 (4), 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e09277>
- Naiel, M. A. E., Ismael, N. E. M., Negm, S. S., Ayyat, M. S., & Al-Sagheer, A. A. (2020). Rosemary leaf powder-supplemented diet enhances performance, antioxidant properties, immune status, and resistance against bacterial diseases in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture*, 526, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735370>
- Naiel, M. A. E., Ismael, N. E. M., & Shehata, S. A. (2019). Ameliorative effect of diets supplemented with rosemary (*Rosmarinus officinalis*) on aflatoxin B1 toxicity in terms of the performance, liver histopathology, immunity and antioxidant activity of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture*, 511 (June), 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734264>
- Newton, R., Zhang, W., Xian, Z., McAdam, B., & Little, D. C. (2021). Intensification, regulation and diversification: The changing face of inland aquaculture in China. *Ambio*, 50 (9), 1739–1756. <https://doi.org/10.1007/s13280-021-01503-3>
- Ninomiya, K., Matsuda, H., Shimoda, H., Nishida, N., Kasajima, N., Yoshino, T., & Yoshikawa, M. (2004). Carnosic acid, a new class of lipid absorption inhibitor from sage. *Biorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 14, 1943–1946. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2004.01.091>
- Nolasco-Soria, H. (2021). Amylase quantification in aquaculture fish studies: A revision of most used procedures and presentation of a new practical protocol for its assessment. *Aquaculture*, 538 (February). <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.736536>

- Olaussen, J. O. (2018). Environmental problems and regulation in the aquaculture industry. Insights from Norway. *Marine Policy*, 98 (January), 158–163. <https://doi.org/10.1016/j.marpol.2018.08.005>
- Olusola, S. E., Emikpe, B. O., & Olaifa, F. E. (2013). The potentials of medicinal plant extracts as bio-antimicrobials in aquaculture. *International Journal of Medicinal Aromatic Plants*, 3 (3), 404–412. https://www.researchgate.net/profile/Sunday-Olusola/publication/285897080_The_potentials_of_medicinal_plants_extract_as_bio-antimicrobial_in_aquaculture/links/5b9a251445851531058418f2/The-potentials-of-medicinal-plants-extracts-as-bio-antimicrobial-in-aquaculture.pdf
- Pagare, S., Bhatia, M., Tripathi, N., Pagare, S., & Bansal, Y. K. (2015). Secondary metabolites of plants and their role: Overview. *Current Trends in Biotechnology and Pharmacy*, 9 (3), 293–304. https://www.researchgate.net/profile/Manila-Bhatia/publication/325510295_Secondary_Metabolites_of_Plants_and_their_Role_Overview/links/5b1180484585150a0a60304d/Secondary-Metabolites-of-Plants-and-their-Role-Overview.pdf#page=104
- Pantoja-Chamorro, A. L., Hurtado-Benavides, M. A., & Martinez-Correa, H. A. (2017). Caracterización de aceite de semillas de maracuyá (*Passiflora edulis* Sims.) procedentes de residuos agroindustriales obtenido con CO₂ supercrítico. *Acta Agronómica*, 66 (2), 178–185. <https://doi.org/10.15446/acag.v66n2.57786>
- Papatryphon, E., Howell, R., & Soares, J. H. (1999). Growth and mineral absorption by striped bass *Morone saxatilis* fed a plant feedstuff based diet supplemented with phytase. *Journal of the World Aquaculture Society*, 30 (2), 161–173. <https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.1999.tb00863.x>
- Papatryphon, E., & Soares Jr, J. H. (2000). The effect of dietary feeding stimulants on growth performance of striped bass, *Morone saxatilis*, fed-a-plant feedstuff-based diet. *Aquaculture*, 185, 329–338. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(99\)00348-8](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(99)00348-8)
- Pujante, I. M., Díaz-López, M., Mancera, J. M., & Moyano, F. J. (2017). Characterization of digestive enzymes protease and alpha-amylase activities in the thick-lipped grey mullet (*Chelon labrosus*, Risso 1827). *Aquaculture Research*, 48 (2), 367–376. <https://doi.org/10.1111/are.13038>
- Qiu, S., Manríquez-Hernández, J. A., & Duston, J. (2022). Reducing cannibalism among larval striped bass *Morone saxatilis*: effects of Artemia ration size and stocking density. *Aquaculture*, 551 (October 2021). <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2022.737938>
- Quintana, S. E., Villanueva-bermejo, D., Reglero, G., García-risco, M. R., & Fornari, T. (2019). Supercritical antisolvent particle precipitation and fractionation of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) extracts. *Journal of CO2 Utilization*, 34 (April), 479–489. <https://doi.org/10.1016/j.jcou.2019.07.032>
- Rahime, S., Amri, R., Gholipour, H., Farhangi, M., & Adineh, H. (2023). The Effects of Phytobiotic-Enriched Diet on Immunity Index and Hematological- Biochemical Changes in Common Carp Fish (*Cyprinus carpio*). *Journal of Medicinal Plants and By-products*. <https://doi.org/10.22034/jmpb.2023.362144.1551>
- Ran, C., Hu, J., Liu, W., Liu, Z., He, S., Chau, B., Dan, T., Diem, N. N., Ooi, E. L., & Zhou, Z. (2016). Thymol and carvacrol affect hybrid tilapia through the combination of direct stimulation and an Intestinal microbiota-mediated effect: Insights from a germ-free zebrafish model. *Journal of Nutrition*, 146 (5), 1132–1140. <https://doi.org/10.3945/jn.115.229377>

- Rawles, S. D., & Gatlin, D. M. (1998). Carbohydrate utilization in striped bass (*Morone saxatilis*) and sunshine bass (*M. chrysops* ♀ x *M. saxatilis* ♂). *Aquaculture*, 161 (1–4), 201–212. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(97\)00270-6](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(97)00270-6)
- Reverter, M., Bontemps, N., Lecchini, D., Banaigs, B., & Sasal, P. (2014). Use of plant extracts in fish aquaculture as an alternative to chemotherapy: Current status and future perspectives. En *Aquaculture* 433, 50–61. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.05.048>
- Ribeiro-Santos, R., Carvalho-Costa, D., Cavaleiro, C., Costa, H. S., Albuquerque, T. G., Castilho, M. C., Ramos, F., Melo, N. R., & Sanches-Silva, A. (2015). A novel insight on an ancient aromatic plant: The rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.). *Trends in Food Science and Technology*, 45 (2), 355–368. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2015.07.015>
- Rimoldi, S., Torrecillas, S., Montero, D., Gini, E., Makol, A., Valdenegro, V., Izquierdo, M., & Terova, G. (2020). PLOS ONE dietary supplementation with galactomannan oligosaccharides and phytochemicals on gut microbiota of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fed low fishmeal and fish oil based diet. *PLoS ONE*, 1–30. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0231494>
- Romo-Vaquero, M., Selma, M. V., Larrosa, M., Obiol, M., García-Villalba, R., González-Barrio, R., Issaly, N., Flanagan, J., Roller, M., Tomás-Barberán, F. A., & García-Conesa, M. T. (2014). A rosemary extract rich in carnolic acid selectively modulates caecum microbiota and inhibits β -glucosidase activity, altering fiber and short chain fatty acids fecal excretion in lean and obese female rats. *PLoS ONE*, 9 (4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0094687>
- Romo Vaquero, M., Yañez-Gascón, M.-J., García Villalba, R., Larrosa, M., Fromentin, E., Ibarra, A., Roller, M., Tomás-Barberán, F., Espín de Gea, J. C., & García-Conesa, M.-T. (2012). Inhibition of gastric lipase as a mechanism for body weight and plasma lipids reduction in Zucker rats fed a rosemary extract rich in carnolic acid. *PLoS ONE*, 7 (6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0039773>
- Roomiani, L., Soltani, M., Akhondzadeh Basti, A., Mahmoodi, A., Taheri Mirghaed, A., & Yadollahi, F. (2013). Evaluation of the chemical composition and in vitro antimicrobial activity of *Rosmarinus officinalis*, *Zataria multiflora*, *Anethum graveolens* and *Eucalyptus globulus* against *Streptococcus iniae*; the cause of zoonotic disease in farmed fish. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 12 (3), 702–716. <https://aquadocs.org/handle/1834/11663>
- Rueda-López, S., Martínez-Montañón, E., & Viana, M. T. (2017). Biochemical characterization and comparison of pancreatic lipases from the pacific bluefin tuna, *Thunnus orientalis*; totoaba, *Totoaba macdonaldi*; and striped bass, *Morone saxatilis*. *Journal of the World Aquaculture Society*, 48 (1), 156–165. <https://doi.org/10.1111/jwas.12372>
- Rust, M. B. (2002). Nutritional Physiology. En J. E. Halver & R. W. Hardy (Eds.), *Fish Nutrition* (3ed, pp. 367–452). Academic Press.
- Santos, G. A., Rodrigues, I., Starkl, V., Naehrer, K., & Hofstetter, U. (2010). Mycotoxins in aquaculture : occurrence in feeds components and impact on animal performance. *Avances en Nutricion Acuicola X - Memorias del Decimo Simposio Internacinal de Nutricion Acuicola*, 502–513. <https://nutricionacuicola.uanl.mx/index.php/acu/article/view/118>
- Sarath, G., Zeece, M. G., & Penheiter, A. R. (2001). Protease assay methods. En R. Beynon & J. S. Bond (Eds.), *Proteolytic Enzymes* (pp. 45–76). Oxford University Press.

- Serrano, E., Palma, J., Tinoco, T., Venâncio, F., & Martins, A. (2002). Evaluation of the essential oils of Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) from different zones of "Alentejo" (Portugal). *Journal of Essential Oil Research*, 14 (2), 87–92. <https://doi.org/10.1080/10412905.2002.9699779>
- Small, B. C., & Soares, J. H. (2000). Quantitative dietary lysine requirement of juvenile striped bass *Morone saxatilis*. *Aquaculture Nutrition*, 6 (4), 207–212. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2095.2000.00140.x>
- Sørensen, M., Berge, G. M., Reitan, K. I., & Ruyter, B. (2016). Microalga *Phaeodactylum tricornutum* in feed for Atlantic salmon (*Salmo salar*) -Effect on nutrient digestibility, growth and utilization of feed. *Aquaculture*, 460, 116–123. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.04.010>
- Stojiljkovic, J. (2018). Antibacterial activities of rosemary essential oils and their components against pathogenic bacteria. *Advances in Cytology & Pathology*, 3 (4), 93–96. <https://doi.org/10.15406/acp.2018.03.00060>
- Szumny, A., Figiel, A., Gutiérrez-ortíz, A., & Carbonell-barrachina, Á. A. (2010). Composition of rosemary essential oil (*Rosmarinus officinalis*) as affected by drying method. *Journal of Food Engineering*, 97 (2), 253–260. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2009.10.019>
- Tadese, D. A., Song, C., Sun, C., Liu, B., Liu, B., Zhou, Q., Xu, P., Ge, X., Liu, M., Xu, X., Tamiru, M., Zhou, Z., Lakew, A., & Kevin, N. T. (2021). The role of currently used medicinal plants in aquaculture and their action mechanisms: A review. *Reviews in Aquaculture*, October 2020, 1–32. <https://doi.org/10.1111/raq.12626>
- Tasa, H., Imani, A., Sarvi Moghanlou, K., Nazdar, N., & Moradi-Ozarlou, M. (2020). Aflatoxicosis in fingerling common carp (*Cyprinus carpio*) and protective effect of rosemary and thyme powder: Growth performance and digestive status. *Aquaculture*, 527 (January), 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735437>
- Timmons, M. B., & Ebeling, J. M. (2010). Recirculating Aquaculture 2nd Edition. En M. B. Timmons & J. M. Ebeling (Eds.), *Aquaculture* (2a ed). USDA.
- Valenzuela-Gutiérrez, R., Lago-Lestón, A., Cicala, F., Hernández-Rodríguez, M., Barón-Sevilla, B., Armuelles-Bernal, C. E., Vargas-Albores, F., Garibay-Valdez, E., Gómez-Reyes, R., & Martínez-Porchas, M. (2023). Garlic (*Allium sativum*) as a dietary ingredient can cause dysbiosis in the microbiota of the California yellowtail (*Seriola dorsalis*) at high concentrations. *Aquaculture International*. <https://doi.org/10.1007/s10499-023-01301-6>
- Ventura, S. P. M., Silva, F. A. E., Quental, M. V., Mondal, D., Freire, M. G., & Coutinho, J. A. P. (2017). Ionic-liquid-mediated extraction and separation processes for bioactive compounds: past, present, and future trends. *Chemical Reviews*, 117 (10), 6984–7052. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.6b00550>
- Volkoff, H., & Rønnestad, I. (2020). Effects of temperature on feeding and digestive processes in fish. *Temperature*, 7 (4), 307–320. <https://doi.org/10.1080/23328940.2020.1765950>
- Woods, L. C. (2001). Domestication and strain evaluation of striped bass (*Morone saxatilis*). *Aquaculture*, 202 (3–4), 343–350. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(01\)00783-9](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(01)00783-9)
- Worthington Biochemical. (1993). *Amylase, alpha assay*. <https://www.worthington-biochem.com/products/amylase-alpha/assay>

- Xiong, D. M., Xie, C. X., Zhang, H. J., & Liu, H. P. (2011). Digestive enzymes along digestive tract of a carnivorous fish *Glyptosternum maculatum* (Sisoridae, Siluriformes). *Animal Physiology and Animal Nutrition*, 95, 56–64. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0396.2009.00984.x>
- Yadollahi, F., Soltani, M., Modarresi, M. H., & Akhondzadeh Basti, A. (2021). Efficacy of vitamin E with or without probiotic, astaxanthin or rosemary extract on growth performance, survival, haematological parameters, antioxidant activity and liver enzymes in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture Research*, 52 (11), 5606–5616. <https://doi.org/10.1111/are.15436>
- Yang, M., Yin, Y., Wang, F., Bao, X., Long, L., Tan, B., Yin, Y., & Chen, J. (2021). Effects of dietary rosemary extract supplementation on growth performance, nutrient digestibility, antioxidant capacity, intestinal morphology, and microbiota of weaning pigs. *Journal of Animal Science*, 99 (9), 1–9. <https://doi.org/10.1093/jas/skab237>
- Yao, L., Seaton, S. C., Ndousse-fetter, S., Adhikari, A. A., Dibenedetto, N., Mina, A. I., Banks, A. S., Bry, L., & Devlin, A. S. (2018). A selective gut bacterial bile salt hydrolase alters host metabolism. *eLIFE*, 1–32. <https://doi.org/10.7554/eLife.37182>
- Yilmaz, S., Ergün, S., & Çelik, E. Ş. (2012). Effects of herbal supplements on growth performance of sea bass (*Dicentrarchus labrax*): Change in body composition and some blood parameters. *Journal of BioScience and Biotechnology*, 1, 217–222. https://www.researchgate.net/publication/236215938_Effects_of_herbal_supplements_on_growth_performance_of_sea_bass_Dicentrarchus_labrax_Change_in_body_composition_and_some_blood_parameters
- Yilmaz, E., Çoban, D., Kırım, B., & Güler, M. (2019). Effects of extracts of feed additives including rosemary (*Rosmarinus officinalis*) and aloe vera (*Aloe barbadensis*) on the growth performance and feed utility of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Turkish Journal of Agriculture - Food Science and Technology*, 7 (6), 866–870. <https://doi.org/10.24925/turjaf.v7i6.866-870.2438>
- Yilmaz, E., & Er, M. (2019). Effects of figs and rosemary extracts on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) on growth performance and blood parameters. *Acta Aquatica Turcica*, 15 (1), 19–25. <https://dergipark.org.tr/tr/download/article-file/663045#:~:text=In%20conclusion%2C%20the%20addition%20of,viscerosomatic%20index%20and%20hepatosomatic%20index>
- Yousefi, M., Adineh, H., & Ghadamkheir, M. (2023). Effects of dietary pennyroyal essential oil on growth performance, digestive enzymes activity, and stress responses of common carp, *Cyprinus carpio*. *Aquaculture Reports*, 30 (April), 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2023.101574>
- Yousefi, M., Hoseini, S. M., Vatnikov, Y. A., Kulikov, E. V., & Drukovsky, S. G. (2019). Rosemary leaf powder improved growth performance, immune and antioxidant parameters, and crowding stress responses in common carp (*Cyprinus carpio*) fingerlings. *Aquaculture*, 505, 473–480. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.02.070>
- Zhang, Q. W., Lin, L. G., & Ye, W. C. (2018). Techniques for extraction and isolation of natural products: a comprehensive review. *Chinese Medicine*, 13 (20), 1–26. <https://doi.org/10.1186/s13020-018-0177-x>

- Zhang, Y. X., Jiang, Z. Y., Han, S. L., Li, L. Y., Qiao, F., Zhang, M. L., & Du, Z. Y. (2020). Inhibition of intestinal lipases alleviates the adverse effects caused by high-fat diet in Nile tilapia. *Fish Physiology and Biochemistry*, 46 (1), 111–123. <https://doi.org/10.1007/s10695-019-00701-x>
- Zhu, F. (2020). A review on the application of herbal medicines in the disease control of aquatic animals. *Aquaculture*, 526 (April), 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735422>
- Zilberg, D., Tal, A., Froyman, N., Abutbul, S., Dudai, N., & Golan-Goldhirsh, A. (2010). Dried leaves of *Rosmarinus officinalis* as a treatment for streptococcosis in tilapia. *Journal of Fish Diseases*, 33 (4), 361–369. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2009.01129.x>
- Zoral, M. A., Ishikawa, Y., Ohshima, T., Futami, K., Endo, M., Maita, M., & Katagiri, T. (2018). Toxicological effects and pharmacokinetics of rosemary (*Rosmarinus officinalis*) extract in common carp (*Cyprinus carpio*). *Aquaculture*, 495, 955–960. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.06.048>