



UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y
OCEANOGRÁFICAS

**EFFECTO DE LA LEVADURA *RHODOTORULA MUCILAGINOSA*
EN EL CRECIMIENTO Y CONTENIDO LIPÍDICO DE LARVAS DE
MAGALLANA GIGAS PRODUCIDAS EN HATCHERY**

Paloma Soledad Araya Vega

Profesores guía: Alejandra Llanos Rivera - Marcelo Gutiérrez Astete

Seminario de Título presentado al
DEPARTAMENTO DE OCEANOGRAFÍA
DE LA UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN

Para optar al Título de
BIÓLOGA MARINA

Concepción - Chile

2024

ÍNDICE DE CONTENIDOS

0. RESUMEN	5
1. INTRODUCCIÓN	7
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	14
2.1. Cultivo de la levadura <i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	14
2.1.1 Cultivo en medio sólido	14
2.1.2 Cultivo en medio líquido y liofilización.....	16
2.2. Diseño experimental	18
2.2.1 Montaje y manejo del Experimento 1.....	19
2.2.2 Montaje y manejo del Experimento 2.....	21
2.3. Dosificación de biomasa microalgal.....	22
2.4. Dosificación de biomasa de levadura.....	22
2.5. Recambio de agua y medición de crecimiento.....	24
2.6. Procesamiento de imágenes para medir crecimiento.....	24
2.7. Tinción con Rojo Nilo para medir contenido lipídico.....	25
2.8. Procesamiento de imágenes para medir contenido lipídico.....	26
2.9. Tinción de levaduras con rojo neutro.....	27
2.9. Análisis estadístico.....	28
3. RESULTADOS.....	29
3.1. Aceptabilidad de la levadura teñida con rojo neutro.....	29
3.2. Experimento 1.....	30
3.2.1 Análisis de crecimiento.....	30
3.2.2 Análisis de mortalidad.....	32
3.3 Experimento 2.....	32
3.3.1 Análisis de crecimiento.....	33
3.3.2 Análisis de lípidos.....	38
4. DISCUSIÓN.....	40
5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	51

DEDICATORIA

Agradezco al universo
y a todos los seres que contribuyeron de manera significativa
en la realización de este trabajo,
en especial a mis padres, Soledad y Francisco,
y mis hermanos, Daniel, Francisca y David, por su amor eterno.
A mis gatos, Carmen y Violeta, y en especial a mi perra Luna
y a Hans por su amor y compañía.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a todos las personas que contribuyeron de manera significativa en la realización de este trabajo.

En especial a mi profesora guía, Alejandra Llanos; co-guía, Marcelo Gutiérrez; Silvio Pantoja y Carlos Muñoz, por su dedicación, paciencia y motivación. También agradezco a Karina, Nicolás, Piera y demás amigos por ayudarme cuando lo necesitaba.

Además, deseo destacar y agradecer el apoyo brindado por el Fondecyt 1200252 y COPAS Coastal FB210021, el cual fue fundamental para el desarrollo de este proyecto.

RESUMEN

Los criaderos de semillas (hatcheries), responsables de suministrar semillas de bivalvos a los centros de cultivo, se esfuerzan por optimizar sus condiciones de cultivo para lograr organismos sanos con altas tasas de crecimiento. La alimentación es un factor crucial que puede modificar tanto la estructura como la funcionalidad del hatchery. En este contexto, se ha investigado el uso de levaduras como alternativa a las microalgas tradicionales, debido a su alto contenido proteico, rápido crecimiento y bajo costo de producción. Estudios han demostrado que el reemplazo parcial de la dieta con levaduras puede tener impactos positivos en el crecimiento y desarrollo de bivalvos, sin embargo, pocos estudios han abordado esta problemática en estadios larvales. La levadura marina *Rhodotorula mucilaginosa* se destaca por su capacidad de acumular lípidos y su composición alta en nutrientes por lo que la identificación de concentraciones óptimas en la alimentación larval puede mejorar la eficiencia y rentabilidad en la producción de larvas de bivalvos, reduciendo costos y posicionando a las levaduras como una fuente potencial de alimento en la acuicultura.

En este estudio el reemplazo parcial de la levadura *R. mucilaginosa* en la dieta estándar compuesta por las microalgas *Isochrysis galbana* y *Chaetoceros muelleri*, resultó beneficiosa para las larvas de *Magallana gigas*. Se demostró que las mayores tasas de crecimiento de larvas veliger-D y preumbonadas se obtuvieron al reemplazo de un 25% y 50% de levadura en la dieta; siendo un reemplazo de un 25% uno de los más destacado con diferencias significativas respecto al control (100% microalga). Además, el contenido lipídico de las larvas alimentadas con proporciones de 25% y 50% de levadura en la dieta no tuvo diferencias significativas con el control, con una relación lineal positiva entre el índice lipídico y el crecimiento. Esto sugiere que no hubo un uso excesivo de los lípidos neutrales o de reserva, los cuales son importantes en el crecimiento, desarrollo y supervivencia de las larvas.

ABSTRACT

Hatcheries, responsible for supplying bivalve seeds to farms, strive to optimize their growing conditions to achieve healthy organisms and high growth rates. Nutrition is a crucial factor which can modify both the structure and functionality of the hatchery. In this context, the use of yeasts has been investigated as an alternative to traditional microalgae, due to its high protein content, rapid growth and low production cost. Studies have shown that partial replacement of the diet with yeast, can have positive impacts on growth and development of bivalves, however, further studies are necessary in relation to larval stages. The marine yeast *Rhodotorula mucilaginosa* stands out for its ability to accumulate lipids and its nutrient-rich composition. The identification of optimal concentrations of yeast in the feed can improve efficiency and profitability in the production of bivalve larvae, reducing costs and positioning yeasts as a potential food source in aquaculture.

Partial replacement of the standard diet composed of the microalgae *Isochrysis galbana* and *Chaetoceros muelleri* with the yeast *R. mucilaginosa* was proven beneficial for bivalve larvae. It was shown that the largest growth rates of veliger-D and preumbonate larvae of *Magallana gigas* were obtained by replacing a 25% and 50% of algae with yeast. The most significant differences were obtained by replacing a 25% of the diet in comparison to the control fed with 100% microalgae. Furthermore, the lipid content of larvae fed with proportions of 25% and 50% yeast in the diet did not had significant differences with the control, experiencing a linear relationship between the lipid index and growth, also showing that there was no excessive depletion of neutral or reserve lipids, which are important in growth, development and survival of larvae.

INTRODUCCIÓN

La acuicultura de moluscos bivalvos ha ganado reconocimiento en los últimos años ya que se ha encargado de compensar la creciente demanda de alimento. La última proyección realizada por las Naciones Unidas estima que la población mundial llegará a 9.7 billones para el año 2050 (UN World Population Prospects, 2022). Para hacer frente a este incremento de la población y sus necesidades; los productos del mar han ganado reconocimiento al ser considerados un alimento sustentable y de gran valor nutricional (FAO, 2022). Según la FAO, en 2022, el consumo per cápita de productos del mar fue de 20,2 kg, el doble en comparación con 1960 (FAO, 2022). Por lo anterior, se prevé que la demanda mundial de estos productos aumentará entre un 36% y un 74% para 2050 (Costello et al., 2020). Sin embargo, factores como el cambio climático, la sobrepesca, la contaminación y la gestión no sostenible de los recursos están en aumento, lo que complica el panorama actual y futuro del suministro de alimentos (Suplicy, 2018, Costello et al., 2020-).

Los moluscos bivalvos se destacan por su bajo costo y bajo mantenimiento, siendo más accesible que la carne de pescado, principalmente por no requerir de alimentación externa (Costello et al., 2020), y por ser una buena fuente de proteínas, vitaminas y minerales (Suplicy, 2018). Además, contienen compuestos bioactivos con aplicaciones en la industria médica y sus conchas proporcionan carbonato u óxido de calcio para diversos usos en la industria, cosmética, medicina, suplementos para alimentación animal y artesanía (FAO, 2022). Chile en el año 2022 fue el tercer país productor de moluscos, con un total de 406 mil toneladas para el año 2021, siendo China, EEUU, la República de Corea y la Unión Europea los países con mayor demanda (FAO, 2022). Se espera

un significativo crecimiento en el cultivo de bivalvos por lo que es fundamental intensificar los esfuerzos en investigación, desarrollo e innovación para hacer frente a la creciente demanda y mantener a Chile como uno de los principales productores de moluscos bivalvos a nivel mundial.

La maricultura, es el cultivo de organismos marinos en el mar en un tiempo determinado. La maricultura de bivalvos se suele realizar en sitios cercanos a la costa, donde el objetivo principal es el engorde de los ejemplares hasta alcanzar su talla comercial en su etapa adulta (Farías 2008). En Chile, el cultivo de moluscos comenzó en 1960, con la introducción de la ostra *Magallana gigas* (Thunberg, 1793), especie nativa de Japón con una gran capacidad de adaptación, lo que ha permitido su cultivo en diferentes países alrededor del mundo (FAO, 2024). En Chile se cultiva al norte y sur del país en las regiones III, IV y X; donde los cultivadores dependen exclusivamente de la disponibilidad de las llamadas “semillas”, que corresponden a juveniles de ostras de aproximadamente 3-5cm, listas para ser cultivadas en mar y luego cosechadas (Helm et al 2004; SUBPESCA 2020). A pesar de que este cultivo sigue siendo incipiente, la Asociación Gremial de Pescadores Artesanales y Acuicultores de Pequeña Escala están cada vez más dispuestos a iniciar su cultivo de bivalvos en las Áreas de Manejo y Explotación de Recursos Bentónicos (AMERB, SUBPESCA 2020). Las especies cultivables con mayor volumen de exportación en el país corresponden al chorito, ostión del norte, abalones y ostra japonesa; sin embargo, la producción anual de estas últimas experimentó una disminución en 2022 debido a la pandemia del Covid-19. Hasta la fecha se ha trabajado en su recuperación, logrando una cosecha de 24 toneladas para el año 2023 (SUBPESCA, 2020).

Los hatcheries o criaderos abastecen a los centros de cultivos en mar con semillas de diferentes especies de bivalvos. Corresponden a instalaciones en tierra que incluyen distintos procesos; acondicionamiento y desove de reproductores, cría de larvas y semillas, y la producción de alimento para todas las etapas del ciclo de producción (Helm et al., 2004, Farías, 2008). Estos centros han ganado popularidad ya que permiten no depender de la captación desde el medio natural y así disponer de semillas en cualquier fecha del año; ya sea para abastecer al sector industrial como para investigación en ciencias del mar (Helm et al., 2004). Por otra parte, el papel ecológico de los hatcheries es fundamental, ya que evitan la extracción de semillas de los bancos naturales, “hotspot” de biodiversidad los cuales están siendo rápidamente degradados (Suplicy, 2018). Estos ecosistemas enfrentan amenazas no solo por la sobreexplotación, sino también por fenómenos como el calentamiento global y la acidificación del océano, por eso los gobiernos en todo el mundo están proponiendo proyectos de restauración de bancos naturales donde se propone la resiembra con individuos trasplantados o semillas producidas en hatcheries (Ermgassen et al., 2020).

Las ostras, por su parte emergen como protagonistas destacados en acuicultura, no solo como una fuente de alimento sustentable, sino también contribuyendo a la salud de los océanos al mejorar la calidad de las aguas mediante filtración e incluso protegiendo las zonas costeras de la erosión (Ermgassen et al., 2020). Además, mejoran las economías locales generando empleos e ingresos (FAO 2022). Otras ventajas de esta especie es su alta tasa de crecimiento, alta fecundidad, tolerancia a una variedad de condiciones ambientales, una alta demanda en el mercado y por su gran valor nutricional y gastronómico (Helm et al., 2004; Farías, 2008; FAO 2024). Además, de poseer una trayectoria importante como especie domesticada, sigue siendo esencial optimizar las condiciones de

cultivo si se quiere lograr altas densidades y tasas de crecimiento. Variables como la temperatura, densidad de cultivo, pH, fotoperiodo, acondicionamiento de los reproductores, contaminación y en especial la alimentación son factores críticos (Farías 2008; Helm et al., 2004). El alimento en los hatcheries, corresponde a microalga viva de una, dos o tres especies y se realiza en una sala adyacente al cultivo principal manteniendo el suministro constante de biomasa. El aporte nutricional de dietas a base de microalgas ha sido ampliamente estudiado, abordando el aporte nutricional de dietas compuestas y su efecto en el desarrollo y crecimiento de los organismos. Entre las más utilizadas se encuentran *Isochrysis galbana* y *Chaetoceros muelleri* y otras como *C. gracilis*, *C. calcitrans*, *Tetraselmis lutea*, *T. suecica*, *Pavlova gyraus*, *P. lutheri*, *P. salina*, *Skeletonema costatum* y *Rhodomonas lentil* (Moran & Manahan 2004; Rosa & Padilla, 2020; Farías, 2008; Helm et al., 2004). No obstante, el manejo de las variables ambientales y espacio requerido para la obtención de biomasa puede resultar muy laborioso y caro; representando entre un 30% y un 60% del costo total de funcionamiento del hatchery (Ostlander et al., 2020; Coutteau et al., 1992).

Por lo anterior, es que se ha investigado la posibilidad y conveniencia de reemplazar el cultivo de microalgas por otros tipos de alternativas. Dentro de estas podemos encontrar, microalgas secas, emulsiones, microcápsulas, bacterias y levaduras, obteniéndose diversos resultados (Willer et al., 2017; Coutteau et al., 1992; Farías, 2008). Las levaduras, han despertado interés debido a su alto contenido de proteínas de calidad, rápido crecimiento, corto tiempo generacional, alta estabilidad en el agua y su capacidad para utilizar una amplia gama de nutrientes para su crecimiento (Coutteau et al., 1992; Nell et al., 1996). Además, presentan bajos costos de producción, ya que no requieren sustratos costosos ni iluminación adicional; incluso el caldo de fermentación rico en nutrientes puede

ser utilizado como un subproducto valorizable (Liu et al., 2021, Li et al., 2022) y su forma liofilizada facilita su conservación y transporte. Una levadura, para ser considerada un alimento propicio para bivalvos, debe ser inocua, tener un tamaño adecuado para ser ingerida, una pared celular digerible, y de preferencia tener una composición bioquímica rica en ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) y proteínas (Lindeque et al., 2015, Sollow et al., 1990). Diversos estudios se han realizado en cuanto al uso de levaduras en dietas de bivalvos, se destaca el uso de levaduras terrestres como *Saccharomyces cereviceae* y *Candida utilis*, en la alimentación de varias especies como ostras, almejas y choritos. En ellos se ha reportado que un reemplazo de alrededor de un 50% de la dieta de microalgas ha tenido impactos positivos en el crecimiento y desarrollo de larvas. Mientras que, un reemplazo de menos del 50% para levaduras modificadas genética o químicamente y un 15% sin modificar han resultado ser beneficiosa en juveniles (Loor et al., 2020; Brown et al., 1996; Neo et al., 2013; Southgate et al., 1998; Nell et al., 1996). En referencia a la levadura modificada, algunos estudios sugieren que las levaduras no son bien digeridas por bivalvos, principalmente por el grosor y rigidez de su pared celular (Loor et al., 2020; Coutteau et al., 1994). Sin embargo, ha resultado ser favorable en dietas compuestas con microalgas vivas y suministrada en bajas dosis (Georgoulis et al., 2024).

Las etapas del cultivo en hatchery donde se producen las mayores mortalidades son las fases tempranas (Farías, 2008; Powell et al., 2002). El inicio de la alimentación ocurre una vez finalizado el desarrollo embrionario y la formación de larvas lecitotrófica que corresponde a la aparición de la larva D-veliger. Esta larva cuenta con branquias rudimentarias, boca, esófago, estómago, intestino y una glándula digestiva que le permiten alimentarse (Stanton, 2012). Las larvas tienen requerimientos nutricionales definidos por lo que el alimento

debe ser óptimo para evitar altas mortalidades, promover la metamorfosis y un crecimiento rápido y así lograr altas densidades de producción en ambientes controlados (Hoffman et al., 2004). Por lo tanto, un correcto equilibrio de proteínas, lípidos, carbohidratos, vitaminas y otros, ayudan a una correcta salud de las larvas (Farías, 2008). En este estudio se optó por emplear la levadura marina *Rhodotorula mucilaginosa* debido a que su género pertenece al grupo de levaduras oleaginosas, las cuales pueden llegar a acumular entre un 30-70% de su biomasa en lípidos. En contraste con *Saccharomyces cerevisiae* o *Candida utilis* que normalmente acumulan solo entre un 5 y 10% de su biomasa en lípidos, a pesar de ser cultivadas bajo las mismas condiciones (Ratledge et al., 2001). Esta capacidad de *R. mucilaginosa* es debido a su alta capacidad de asimilar nitrógeno y por sobre todo glucosa, para transformarla posteriormente a triglicéridos. Esta levadura ha obtenido reconocimiento en los últimos años por su potencial biotecnológico, siendo probada como complemento alimenticio en animales por su capacidad antioxidante, antitumoral y potenciador del sistema inmune (Li et al., 2022). Dentro de su composición bioquímica podemos encontrar ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs), aminoácidos esenciales, carotenoides (β -caroteno, toruleno, torularhodin, astaxantina), un alto contenido de C y N, y vitaminas A y E (Gutiérrez et al., 2020; Li et al., 2022). Se propone entonces a *R. mucilaginosa* como una opción viable y conveniente para alimentar larvas de bivalvos, ya sea en su forma viva o reconstituida tras ser liofilizada.

PREGUNTA CIENTÍFICA

¿Qué efecto tiene la levadura *R. mucilaginosa* en el crecimiento y contenido lipídico de larvas de *Magallana gigas* cuando es usada como reemplazo parcial de su dieta estándar?

HIPÓTESIS

El reemplazo de menos de un 50% de *Rhodotorula mucilaginosa* en la dieta estándar de larvas de *Magallana gigas* causa un aumento significativo en el crecimiento, en comparación con aquellas alimentadas solo con la dieta estándar a base de microalgas.

El reemplazo de menos de un 50% de *Rhodotorula mucilaginosa* en la dieta estándar de larvas de *Magallana gigas* no causa diferencias significativas en el contenido lipídico en comparación con aquellas alimentadas solo con la dieta estándar a base de microalgas.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de la levadura *Rhodotorula mucilaginosa* en el crecimiento y contenido lipídico de larvas de *Magallana gigas* en un entorno experimental.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Evaluar la aceptabilidad de la levadura *R. mucilaginosa*, teñida con Rojo Neutro, por larvas de *Magallana gigas*.
2. Comparar el crecimiento de las larvas D-veliger y preumbonadas alimentadas con distintas proporciones de *R. mucilaginosa* en su dieta estándar.
3. Comparar el contenido de lípidos de las larvas preumbonadas alimentadas con distintas proporciones de *R. mucilaginosa* en su dieta estándar mediante tinción con Rojo Nilo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivo de la levadura *Rhodotorula mucilaginosa*

Cultivo en medio sólido

Se dispuso de una muestra de *Rhodotorula mucilaginosa* otorgada por el Laboratorio de Oceanografía Biológica Costera del Departamento de Oceanografía de la Universidad de Concepción. Se preparó un stock de levadura en medio sólido que quedó almacenado y a disposición para ser usada a lo largo del trabajo experimental.

El cultivo en medio sólido de la levadura *Rhodotorula mucilaginosa* se realizó en el Laboratorio de Geoquímica del Departamento de Oceanografía de la Universidad de Concepción. El medio de cultivo a utilizar fue descrito por Wickerman en 1951, el cual consiste en la adición de Glucosa como fuente principal de energía, extracto de levadura de cerveza, como una fuente de elementos trazas, vitaminas y aminoácidos, además de peptona como fuente nutricional, capaz de proveer de compuestos nitrogenados que favorecen el crecimiento de las levaduras y agar como agente solidificante. El agua de mar utilizada fue extraída de la Bahía de Coliumo en Concepción, Chile, filtrada por 0.22um e irradiada por luz UV antes de ser utilizada. Las medidas de reactivos utilizados se describen en la Tabla 1.

Tabla 1.- Reactivos utilizados en el cultivo sólido y líquido de *R. mucilaginosa* (Wickerman, 1951, Meyers 1966)

Reactivos Medio Sólido	Reactivos Medio Líquido
<ul style="list-style-type: none"> • 40 g de Glucosa • 5 g de Peptona • 20 g de Agar • 5 g de extracto de levadura • 1 L de agua de mar filtrada 	<ul style="list-style-type: none"> • 5 g de Glucosa • 2.4 g de sulfato de magnesio (MgSO₄) • 1 g de extracto de levadura • Buffer TRIS • 1 L de agua de mar filtrada

El medio de cultivo sólido se realizó adicionando los reactivos de la Tabla 1 en un matraz Erlenmeyer con 1 litro de agua de mar (filtrada a 0.22µm). Se dispuso el matraz Erlenmeyer sobre una placa calefactora y un agitador magnético y se calentó durante aproximadamente 5 minutos o hasta que todo el contenido quedará disuelto en el agua de mar. Transcurrido el tiempo, el líquido se transfirió a una botella de vidrio de tapa rosca y se autoclavó a 120°C por 30 minutos. Luego, bajo cámara de extracción y condiciones de asepsia, se vertió el contenido de la botella a cada una de las placas Petri y se dejó enfriar. Una vez asegurados que el medio estuviera frío, se procedió a inocular, extrayendo con un asa estéril una muestra de aproximadamente 2 mg de levadura, la cual fue dispuesta en el medio de agar de forma suave y con movimientos zigzagueantes. Luego, se tapó y se selló con Parafilm para ser incubada en una cámara de incubación durante 5 días a 20°C en un ambiente aeróbico. Una vez finalizado el tiempo, fue posible visualizar las colonias de levadura de color rojo (color representativo de esta cepa). Las placas Petri con la levadura, fueron almacenadas a 4°C para su posterior uso (Ver Figura 1-A).

Cultivo en medio líquido y liofilización

El cultivo en medio líquido ofrece la ventaja principal de favorecer un crecimiento más rápido y alcanzar densidades celulares más elevadas en comparación con el medio sólido. El cultivo líquido fue realizado en el laboratorio de geoquímica del Departamento de Oceanografía de la Universidad de Concepción. El medio de cultivo líquido se preparó mediante una modificación del protocolo descrito por Meyers (1966). Al igual que el medio sólido, se utilizó glucosa como fuente alimenticia principal, extracto de levadura de cerveza, minerales y buffer TRIS para el ajuste de pH a 7 (Tabla 1).

El medio de cultivo líquido se realizó adicionando los reactivos de la Tabla 1 en un matraz Erlenmeyer con un 1 litro de agua de mar. El agua de mar utilizada fue extraída de la Bahía de Coliumo en Concepción, Chile, pasada por un filtro (0.22µm) irradiada por luz UV antes de ser utilizada. Se aseguró que el medio tuviera un pH 7 y se dispuso el matraz Erlenmeyer sobre una placa calefactora y un agitador magnético y se calentó durante 3-5 minutos o hasta que todo el contenido quedará disuelto en el agua de mar (ver Figura 1-B). Se transfirió el contenido a una botella de vidrio de tapa rosca y se autoclavó a 120°C por 30 minutos. Luego, se dejó enfriar y paralelamente se preparó un tubo Falcon de 15 ml con 10 ml de agua de mar filtrada a 0.22µm y estéril. Con ayuda de un asa estéril, se extrajo aproximadamente 5 mg de levadura del medio sólido y se inoculó en el tubo Falcon con agua de mar. Se realizó vortex durante 3 minutos o hasta que todo el contenido sólido de levadura quede disuelto en el agua. Este paso de homogeneización es importante ya que garantiza una mayor probabilidad de que la levadura unicelular tenga contacto con el medio nutritivo y se pueda desarrollar y multiplicar con mayor eficiencia. La suspensión obtenida de color rosa se utilizó

como inóculo para los medios de cultivo líquidos ya enfriados y dispuestos en matraces Erlenmeyer.

La inoculación se realizó bajo cámara de extracción y los matraces fueron tapados con gasa y papel previamente irradiada por luz UV para eliminar contaminantes. La levadura en medio líquido fue incubada por 14 días a 100 rpm a una temperatura de 20°C. A medida que el tiempo transcurrió se pudo ver el cambio de coloración de amarillo a rosado tenue (ver imagen 1-C); una vez finalizada la fermentación, se tomaron distintas alícuotas y se transfirieron a tubos de centrifugación los cuales fueron centrifugados a 3000 rpm, durante 5 minutos a 20°C. Una vez formado el pellet (ver Figura 1-D) se desechó el sobrenadante y se procedió a liofilizar el contenido en una máquina liofilizadora (Figura 1-E). El producto final fue sellado y almacenado a 4°C en oscuridad para su posterior uso (ver Figura 1-F).



Figura 1: Cultivo en medio sólido, en medio líquido y producto liofilizado de la levadura marina *Rhodotorula mucilaginosa* bajo condiciones de laboratorio

- A) Colonias de *R. mucilaginosa* en medio sólido de agar;
- B) Cultivo en medio líquido inoculado con la levadura al día 0;
- C) Cultivo en medio líquido con levadura al día 14 y listo para ser cosechado;
- D) Aproximadamente 10 ml de Levadura sedimentada; E) Proceso de liofilización;
- F) Aproximadamente 1.5g de levadura liofilizada.

Diseño experimental

Las actividades experimentales se realizaron en las instalaciones de la Unidad Productora de Semillas (UPS) de la Estación de Biología Marina (Universidad de Concepción) Dichato. Se llevaron a cabo dos batches de cultivo de larvas de bivalvos, el primero con larvas de la especie nativa *Choromytilus chorus* y el segundo con larvas de *Magallana gigas*. Las larvas utilizadas en los experimentos correspondieron a estadio de larva veliger-D y veliger-D a pre umbonadas respectivamente. Cada experimento se diseñó con un grupo de control y tres tratamientos con cuatro réplicas cada uno. La condición control consistió en larvas alimentadas con la dieta estándar de dos especies de microalgas; *Isochrysis galbana* y *Chaetoceros muelleri* en una proporción 1:1 a una densidad de 2×10^4 células mL^{-1} (Helm et al., 2004). Los otros tratamientos consideraron la adición de levaduras en distintas proporciones (Figura 2 y Tabla 2).

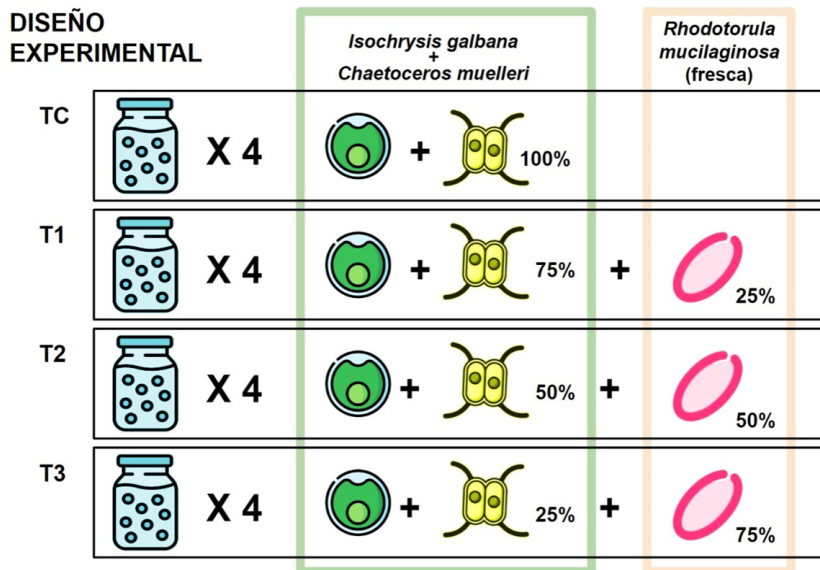


Figura 2: Diseño del experimento 2. Se describen los distintos tratamientos bajo distintas proporciones de dieta estándar (columna 1) y distintas proporciones de *Rhodotorula mucilaginosa* (columna 2).

TC: Tratamiento control con 100% microalga; T1: Tratamiento con 75% microalga y 25% levadura; T2: Tratamiento con 50% microalga y 50% levadura; T3: Tratamiento con 75% levadura y 25% microalga. El experimento 1, tuvo el mismo control y solo cambió las proporciones de alimento para T1: Larvas en inanición, T2: 50% dieta de microalga y 50% levadura, T3: 100% levadura. Cada experimento contó con 4 réplicas

Tabla 2: Resumen de las variables experimentales y tratamientos que se realizaron en el experimento 1 y 2. Las larvas en ambos experimentos corresponden a distintas especies de larvas Veliger-D. Las microalgas utilizadas corresponden a *Isochrysis galbana* y *Chaetoceros muelleri* en estado vivo y en proporciones 1:1. La levadura liofilizada *Rhodotorula mucilaginosa* fue reconstituida con agua de mar antes de administrar. Cada tratamiento y grupo control cuenta con 4 réplicas.

	Experimento 1	Experimento 2
Tiempo duración	7 días	14 días
Especie	<i>Choromytilus chorus</i>	<i>Crassostrea gigas</i>
Densidad de larvas	130 larvas L ⁻¹	1 larva mL ⁻¹
Control	100% Microalga	100% Microalga
Tratamiento 1	0% de alimento	75% Microalga 25% <i>Rhodotorula mucilaginosa</i>
Tratamiento 2	50% Microalga 50% <i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	50% Microalga 50% <i>Rhodotorula mucilaginosa</i>
Tratamiento 3	100% <i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	75% Microalga 25% <i>Rhodotorula mucilaginosa</i>

Montaje y manejo del experimento 1

Los embriones de *Choromytilus chorus* se cultivaron en estanques de 300 litros, a una temperatura de 17°C, salinidad de 28 a 30 PSU, y fotoperiodo de 12hL:12hO. Las larvas se monitorearon y alimentaron diariamente con su dieta estándar y fueron mantenidas bajo estas condiciones durante 4 días previo al experimento.

El experimento se inició con larvas en estadio de larva velíger-D , estas fueron tamizadas del estanque de 300 L (44 um) y recolectadas del tamiz con ayuda

de una piseta y agua de mar filtrada, realizando movimientos zigzagueantes por sobre la malla para dirigir las larvas hacia una placa. Se dispuso la placa con larvas bajo una lupa de luz estereoscópica (Stemi DV4, ZEISS) y rápidamente, con ayuda de una micropipeta de 200ul, se seleccionaron 130 larvas, dentro de ellas las más vigorosas y activas, las cuales fueron transferidas inmediatamente a frascos de vidrio de 1 litro y conectados al sistema de aireación (ver figura 3). Se repitió este último paso aleatoriamente para cada tratamiento. Las larvas se alimentaron diariamente y se efectuó un recambio de agua cada dos días. Durante cada recambio de agua, las larvas fueron fotografiadas para la medición del crecimiento. La mortalidad se evaluó al término del experimento.

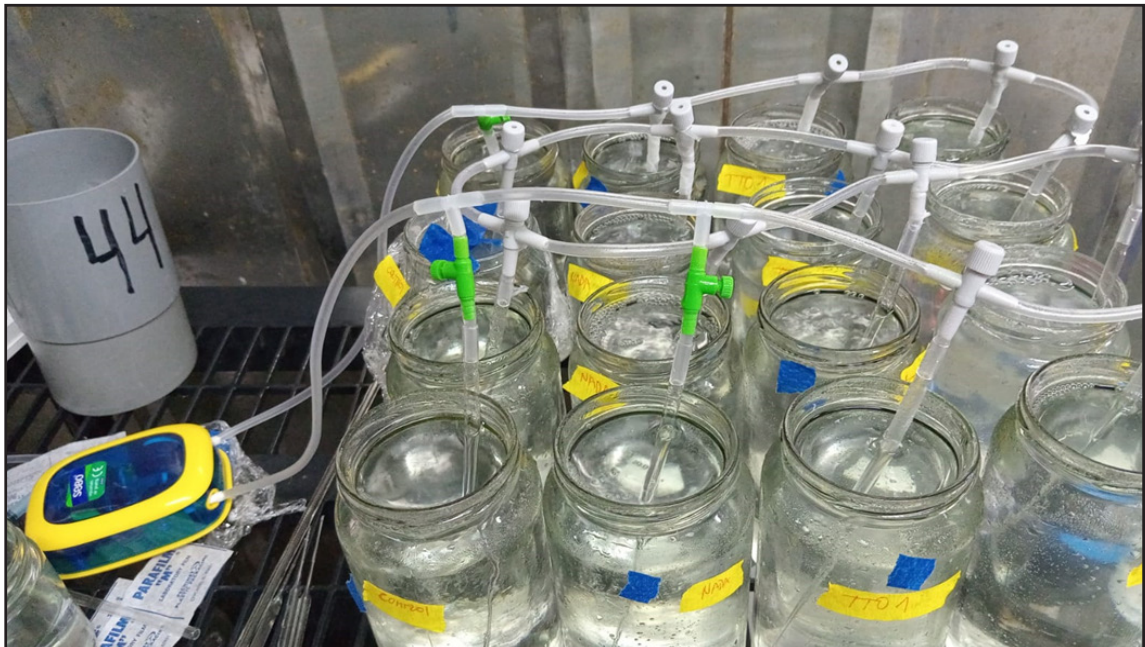


Figura 3: Montaje experimental. En total se realizaron 4 tratamientos (columnas) y 4 réplicas (filas). Se utilizaron frascos de vidrios de 1L, cada uno alimentado con un flujo de aire continuo, mediante una bomba de aire de dos salidas y un sistema de mangueras conectadas a llaves de paso y pipetas Pasteur. Este montaje se realizó para los experimentos 1 y 2.

Montaje y manejo del experimento 2

Los embriones de *Magallana gigas* se cultivaron en estanques de 300L, a una temperatura de 25°C, salinidad de 28 a 30 PSU y fotoperiodo de 12hL:12hO. Las larvas fueron monitoreadas y alimentadas diariamente con su dieta estándar y mantenidas bajo estas condiciones durante 4 días previo al experimento. A partir de la experiencia de manejo del experimento 1 se optó por aumentar la densidad a 1 larva mL⁻¹ en vez de una selección manual de larvas.

Las larvas se recolectaron de forma similar a la descrita para experimento 2 y se depositaron en un frasco de vidrio de 1 L con agua de mar, antes filtrada e irradiada con UV. El contenido se homogenizó con cuidado realizando movimientos circulares con una bagueta, luego se extrajo 1 mL y transfirió a una cámara Sedgewick Rafter donde se contó el número de larvas bajo una lupa de luz estereoscópica (Stemi DV4, ZEISS). Este procedimiento se repitió 10 veces para garantizar un conteo preciso de la densidad larval. Una vez obtenido este valor se extrajo el volumen necesario para dejar en cada unidad experimental la densidad final de 1 larva mL⁻¹; densidad comúnmente utilizada en cultivos en hatchery (Helm et al., 2004). Desde ese día las larvas fueron alimentadas diariamente con un recambio total de agua cada dos días. En cada recambio de agua, las larvas fueron fotografiadas para un posterior análisis de crecimiento.

Dosificación de biomasa microalgal

Se obtuvieron muestras frescas de *Isochrysis galban* y *Chaetoceros muelleri*, desde la UPS Dichato. El conteo celular se realizó en cámara Neubauer bajo microscopio (Optika B-292PLi; objetivo 10x/0.25). Se contabilizó el número de células en los 4 cuadrantes de las esquinas y se calculó la densidad mediante la siguiente fórmula.

$$N = \frac{(C-B) \times 10000}{Q}$$

Donde N es el número total de células; C es el número total de células contadas en la cámara; B es el número de celdas en los bordes que no se cuentan; Q es el número de cuadrantes de la cámara de Neubauer (Extraído de Martínez et al., 2018).

Sobre la base de esta estimación se calculó el volumen de microalgas a agregar para alcanzar las distintas dosis de microalga. Se utilizó una densidad final de 1.5×10^4 células mL⁻¹; para los 5-7 primeros días de desarrollo larval y luego 2.0×10^4 células mL⁻¹; para de esta manera cubrir sus requerimientos metabólicos (Helm et al., 2004).

Dosificación de biomasa de levadura

Se calculó las dosis de levadura *R. mucilaginosa* en cada tratamiento analizando la equivalencia en tamaño y densidad celular de la levadura y las microalgas mencionadas. Para el análisis de equivalencia en tamaño, se utilizó *Rhodotorula mucilaginosa* liofilizada reconstituida con agua de mar filtrada. Bajo un microscopio Leica (modelo icc50w; 100x) una pequeña alícuota de la suspensión de levaduras fue fotografiada. De igual manera se procedió con muestras de *Isochrysis galbana* y *Chaetoceros muelleri*. Desde las fotografías un total de 50 ejemplares de cada especie fueron procesados mediante el software ImageJ.



Figura 4: Fotografías de las especies utilizadas en este estudio como componentes de la dieta de larvas de *Magallana gigas* A) Células de *Isochrysis galbana* B) Células de *Chaetoceros muelleri* C) Células de *Rhodotorula mucilaginosa*

A partir de los resultados de análisis fotográficos (figura 4) y cálculo de la proporción en tamaño (áreas) se obtuvo el promedio de área total y largo de todas las especies analizadas (tabla 3). Esto permitió una comparación de tamaño se obtuvo una proporción de 0.789; lo que significa que, en promedio, el tamaño de una célula de *R. mucilaginosa* es aproximadamente un 78.9% del tamaño de una célula de *I. galbana*.

Tabla 3: Comparación entre el área total promedio (μm^2) y el largo promedio (μm) entre *Rhodotorula mucilaginosa* , *Isochrysis galbana* y *Chaetocero muelleri*.

	<i>R. mucilaginosa</i>	<i>I. galbana</i>	<i>C. muelleri</i>
Área promedio	0.26 μm^2	0.33 μm^2	0.39 μm^2
Largo promedio	3.45 μm	4.35 μm	5.05 μm

Recambio de agua y medición de crecimiento

El recambio de agua se realizó día por medio antes de la administración del alimento. Para esto las larvas fueron tamizadas con malla de 75 μm . Se procuró extraer todas las larvas adheridas en el frasco de vidrio, lavando cuidadosamente de 2 a 3 veces con agua de mar y con ayuda de una piseta. Luego las larvas fueron transferidas a una placa Petri para ser fotografiadas bajo microscopio electrónico (Opttika B-292PLi 10x/0.25). En el experimento 1, se fotografió aproximadamente 25 larvas por réplica y 33 para el experimento 2. Finalmente, las larvas fueron transferidas a un frasco limpio con agua de mar filtrada fresca y conectadas al sistema de aireación.

Procesamiento de imágenes para medir crecimiento

Se empleó el software ImageJ (versión 1.54) para cuantificar el crecimiento larval, utilizando la herramienta de medición circular que fue la que mejor se ajustaba a la forma de las larvas (ver figura 8). Los datos medidos se exportaron a un archivo Excel y posteriormente se procesaron en Matlab (versión r2022b) para generar los gráficos de crecimiento y las tasas de crecimiento. Para calcular las tasas de crecimiento de las larvas durante períodos de 7 y 14 días, con medidas de área en μm^2 , se registró inicialmente el área de las larvas al inicio y al final del periodo. Posteriormente, se aplicó la fórmula de tasa de crecimiento, que consiste en calcular la diferencia entre el área final y el área inicial, dividirla por el área inicial, y luego dividir el resultado por el número de días transcurridos.

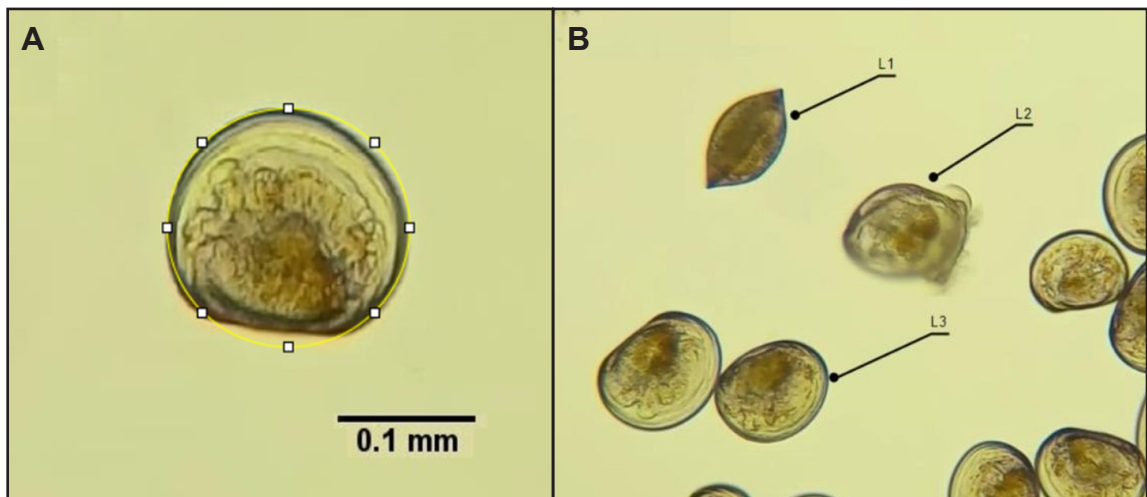


Figura 5: A) Fotografía de una larva de *Magallana gigas*. con un largo de 142 μm y un área de 11.644 μm^2 . Los cuadrados muestran los hitos del trazo que permitió calcular su área B) Campo con varias larvas de ostra. Se midieron sólo las larvas con las valvas cerradas, en reposo y en posición horizontal a la placa (L3), se descartaron las larvas en movimiento o con el velo extendido (L2) y larvas en posición vertical a la placa (L1).

Tinción con Rojo Nilo para medir contenido lipídico

Al finalizar los 14 días de duración del experimento 2 las larvas fueron tamizadas (44 μm) y puestas en tubos de centrifuga que fueron trasladadas en un cooler desde la UPS hasta el Laboratorio de Toxicología Acuática de la Universidad de Concepción. Las larvas se mantuvieron a 4°C y en inanición por 16 horas, con el fin de eliminar cualquier rastro de alimento que pudiera quedar en sus órganos digestivos y que pudiera interferir con las futuras mediciones.

Para realizar la cuantificación de lípidos se procedió a la tinción de las larvas con el colorante Rojo Nilo (Merck 72485) siguiendo el protocolo descrito por Castell & Mann (1994). Se preparó con anterioridad una solución stock, añadiendo 1.25mg de Rojo Nilo en 100 ml de acetona, almacenándose a 4°C y a oscuras hasta su posterior uso. Las larvas fueron tamizadas en una malla de 75 μm y con una micropipeta se procuró obtener la mayor cantidad en un volumen de

100 ul para ser dispuestas en placas de cultivos correctamente rotuladas. Se agregaron 5mL de la disolución del stock diluida previamente en agua filtrada de mar (dilución 1:9). Las muestras se dejaron en reposo durante 1.5 h en una cámara oscura a temperatura ambiente, sin necesidad de ser fijadas. Luego, fueron tamizadas y lavadas con agua filtrada de mar para ser montadas en un portaobjetos excavado y ser visualizadas inmediatamente bajo microscopio de EPI fluorescencia (Nikon Eclipse e200). El proceso completo se realizó alternado para que cada tratamiento recibiera el mismo tiempo de tinción. Este último paso es uno de los más importantes ya que una sobre tinción o la falta de esta puede traer sesgos a las mediciones de fluorescencia.

Procesamiento de imágenes para medir contenido lipídico

Las fotografías fueron tomadas en un microscopio de EPI fluorescencia (Nikon Eclipse e200 con objetivo 10X/0.25). Se utilizó el filtro verde para evidenciar las moléculas de lípidos neutrales (Campbell & Mann 1994). Los parámetros utilizados para la captura de imágenes con cada filtro se especifican en la tabla 4.

Tabla 4: Parámetros utilizados para la toma de fotografías bajo el filtro de luz verde y sin filtro (blanco) en el microscopio de EPI fluorescencia Nikon Eclipse e200

Parámetro	Blanco	Filtro verde
Ganancia	100%	100%
Tiempo de exposición	0.1 seg	2 seg
White balance	T color: 6503 Tinte: 1000	T color: 6503 Tinte: 1000
Black balance	Rojo: 0 Verde: 0 Azul: 0	Rojo: 0 Verde: 6 Azul: 0

Las fotografías fueron procesadas con el software ImageJ, previa calibración. Se escogieron al azar 25 individuos y se midió el área total de la larva con la herramienta circular de medición desde la fotografía sin filtro (ver figura 11-A). Para el tratamiento con 75% levadura se midieron el total de larvas existentes en ese tratamiento (25 individuos). Luego, se midió, para los mismos organismos, lo considerado como gotas lipídicas bajo el filtro verde (ver figura 11-B). Los datos fueron exportados en una planilla Excel para el cálculo del índice lipídico en las larvas mediante la siguiente fórmula: Índice Lipídico = (Área del lípido / Área total de la larva) extraído de Castell & Mann (1994).

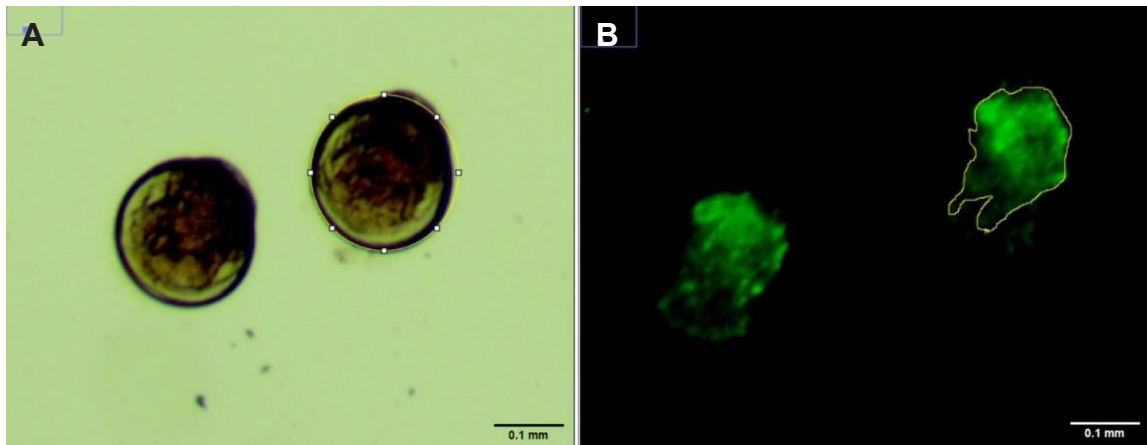


Figura 6.- Larvas de *Magallana gigas* en fase preumbonada vista bajo microscopio de EPI fluorescencia A) Fotografía de las larvas sin filtro, mostrando los hitos para calcular área larval total con el uso de herramienta circular ($2170 \mu\text{m}^2$ de área) B) Larvas bajo el filtro verde donde se aprecia el contenido lipídico fluorescente, y su perímetro con la herramienta de trazo libre ($592.17 \mu\text{m}^2$)

Tinción de levaduras con rojo neutro

Se llevó a cabo un experimento con el fin de determinar si las larvas filtraban activamente las levaduras, utilizando la tinción vital de Rojo Neutro según la metodología propuesta por Corbacho et al. (2010). Para esto, las levaduras disueltas en agua de mar fueron teñidas durante 20 minutos a oscuras y a temperatura ambiente con el colorante. Posteriormente, se pusieron en contacto

con las larvas bajo un microscopio para poder observar las levaduras según las larvas las ingieren y/o hasta notar cambios en la pigmentación de sus órganos digestivos.

Las larvas utilizadas correspondieron a larvas de 18 días mantenidas bajo alimentación estándar y en inanición por 12h. Estas fueron separadas en alícuotas y alimentadas con levaduras teñidas. Tras un periodo de 20, 40 y 60 minutos y luego de 2 horas, las larvas se montaron en microscopio y se fotografiaron para un posterior análisis.

Análisis estadístico

Los datos de crecimiento e índice lipídico fueron analizados para verificar si cumplían con el supuesto de normalidad y homogeneidad de varianza. Dado que el conjunto de datos era relativamente pequeño (<2000 observaciones), se optó por realizar la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk (Shapiro Wilk 1965) y la prueba de Fligner-Killeen (Fligner & Killeen, 1976) para evaluar homocedasticidad. Al no cumplirse estos supuestos se optó por la prueba de Kruskal-Wallis (Kruskal & Wallis, 1952), para finalizar con la prueba de Dunn con corrección de Bonferroni (Dunn, 1961) con el fin de comparar simultáneamente estos grupos y determinar con precisión las diferencias significativas entre ellos. Se consideró, un nivel de significancia de $\alpha=0.05$. Todos los análisis fueron realizados en RStudio versión 4.1.1. Las tasas de crecimiento se calcularon mediante ANOVA y test Tukey Post Hoc. Las gráficas de crecimiento y tasas de crecimientos se realizaron en Matlab versión r2022b. Por último, se realizó una prueba de correlación de Pearson para evidenciar el grado de correlación de las variables de tasas de crecimiento y contenido lipídico en las larvas.

RESULTADOS

Aceptabilidad de la levadura teñida con Rojo Neutro

La observación fotográfica de larvas preumbonadas de *Magallana gigas*, expuestas a la levadura *Rhodotorula mucilaginosa* previamente teñida con Rojo Neutro, revela un cambio en la pigmentación de la zona visceral. En esta zona se observa un ligero oscurecimiento en las larvas alimentadas con levadura teñida, que se vuelve más pronunciado después de 2 horas (ver figura 7-G). Por el contrario, las larvas sometidas a inanición durante los mismos intervalos de tiempo (20, 40 y 60 minutos) exhiben un área visceral más translúcida (figura 7-B,D,F,H). Esto indicaría que existen grandes posibilidades de que la larva se esté alimentando de la levadura.

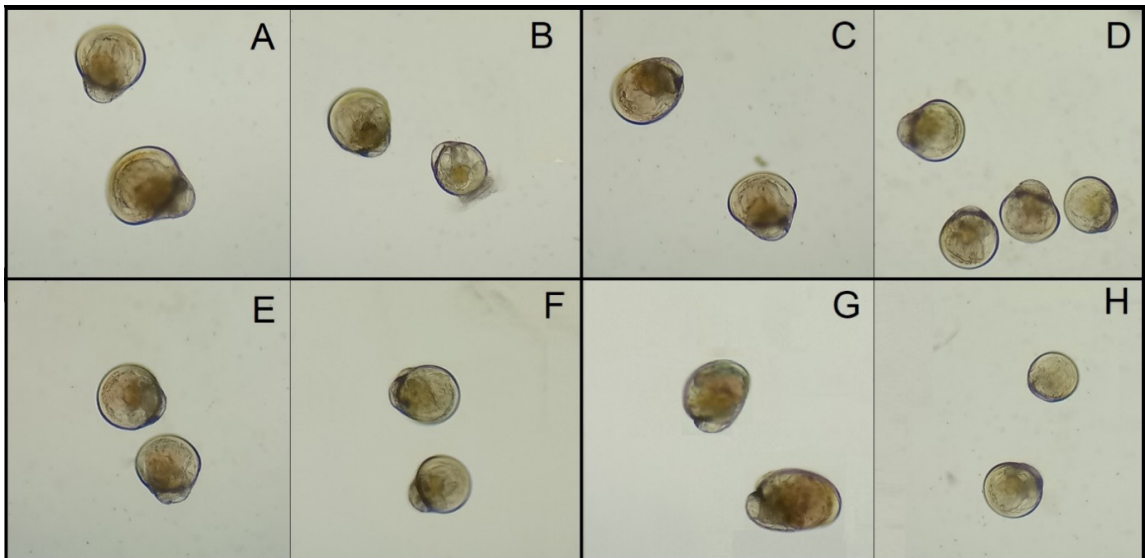


Figura 7.- Larvas preumbonadas de *Magallana gigas* expuestas a levadura teñida con Rojo Neutro (LT) y larvas en inanición (LI) ambas bajo distintos intervalos de tiempo. A) LT, tras 20 min de exposición. B) LI, tras 20 min C) LT, tras 40 min de exposición; D) LI, tras 40 min E) LT, tras 60 min de exposición F) LI, tras 60 min de exposición G) LT, tras 2h de exposición; H) LI, tras 2h.

Experimento 1

Análisis de crecimiento

Durante el montaje y control de este experimento se presentaron algunas dificultades metodológicas que hizo que la obtención de datos no fuera optima. No obstante, lo anterior, en general el crecimiento de la concha de larvas D de *Choromytilus chorus* presentó un aumento constante entre tratamientos en los 7 días que duro el experimento (ver figura 8). Sin embargo, se evidenció un crecimiento atípico para el tratamiento con larvas en inanición que sufrió un decrecimiento del tamaño de la concha a partir del día 4 (ver figura 8-D). Los tratamientos no demostraron tener diferencias en tallas, hasta el día 4 donde fueron evidentes las discrepancias en las tasas de crecimiento entre los tratamientos (ver figura 9). Siendo el control el que presentó el mayor aumento; tendencia que perduró hasta el final del experimento, con una tasa de crecimiento de $0.17 \pm 0.02 \mu\text{m}^2\text{día}^{-1}$, seguido del tratamiento con 50% de levadura con una tasa de crecimiento de $0.10 \pm 0.01 \mu\text{m}^2\text{día}^{-1}$. Mientras que el tratamiento con larvas en inanición y con 100% de levadura quedaron en último lugar con una tasa de crecimiento de $0.08 \pm 0.01 \mu\text{m}^2\text{día}^{-1}$ y $0.07 \pm 0.00 \mu\text{m}^2\text{día}^{-1}$, respectivamente (ver figura 10).

El análisis estadístico de los datos mostró que estos no seguían una distribución normal ni tampoco presentaron homocedasticidad (Shapiro Wilk, $p < 0.5$; Fligner-Killeen $p < 2.2\text{e-}16$). La prueba de Kruskal-Wallis no encontró diferencias significativas ($p > 0.05$).

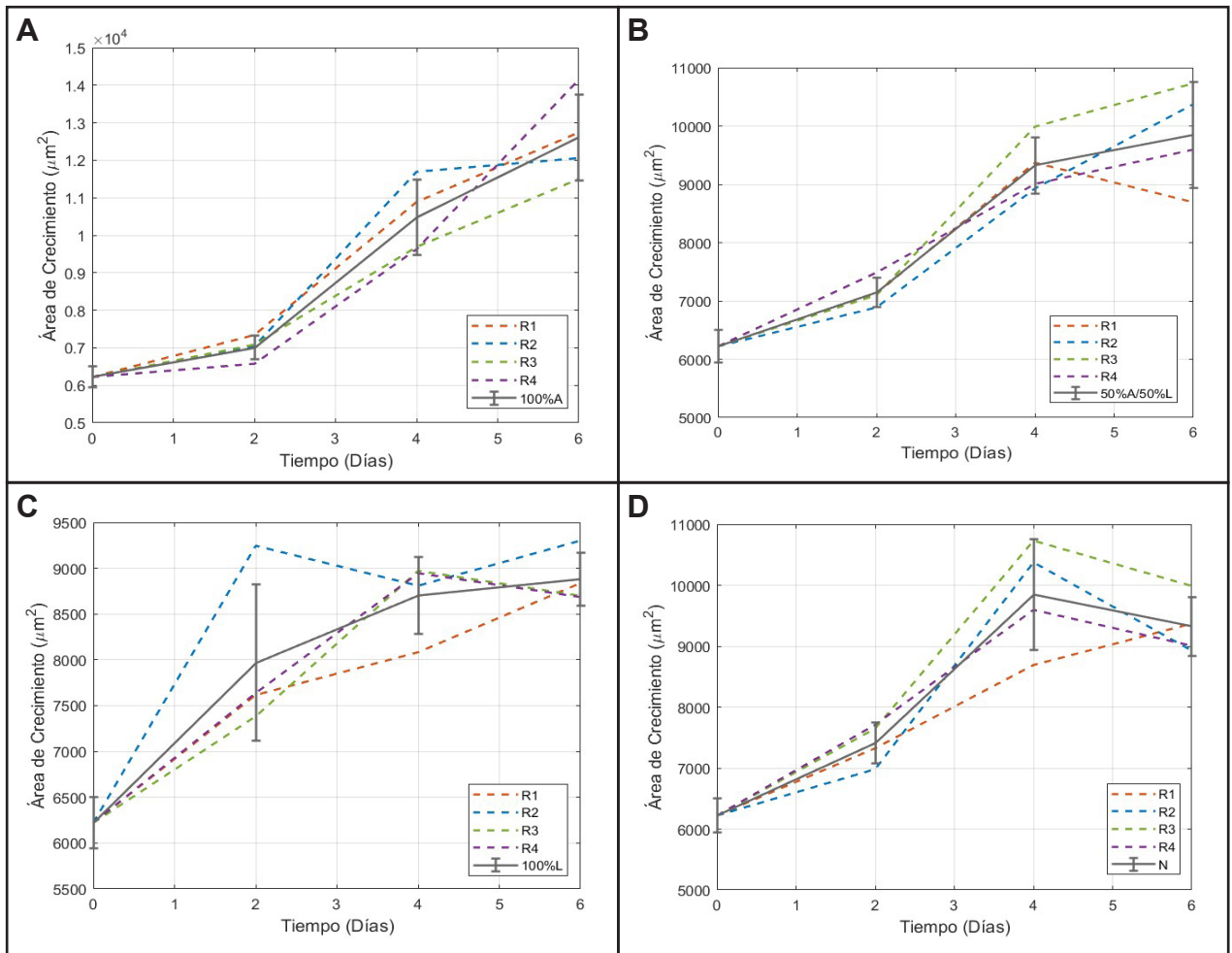
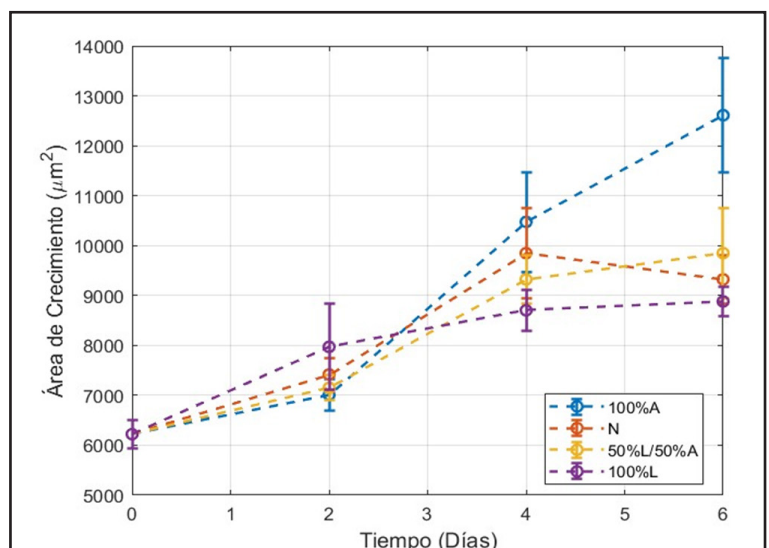


Figura 8: Curva de crecimiento de larvas *Choromytilus chorus* alimentadas con distintas dosis de levadura y microalga más el promedio de todas las réplicas. Tratamiento control con 100% microalga (100%A); Tratamiento con larvas en inanición (N). B Tratamiento con 50% microalga y 50% levadura (50%A/50%L); Tratamiento con 100% levadura (100%L); R1: Réplica 1; R2: Réplica 2; R3: Réplica 3; R4: Réplica 4.

Figura 9: Curva de crecimiento de larvas *Choromytilus chorus* alimentadas con distintas proporciones de levadura durante un periodo de 7 días. Tratamiento control con 100% microalga (100%A); Tratamiento con larvas en inanición (N) Tratamiento con 50% microalga y 50% levadura (50%A/50%L); Tratamiento con 100% levadura (100%L)



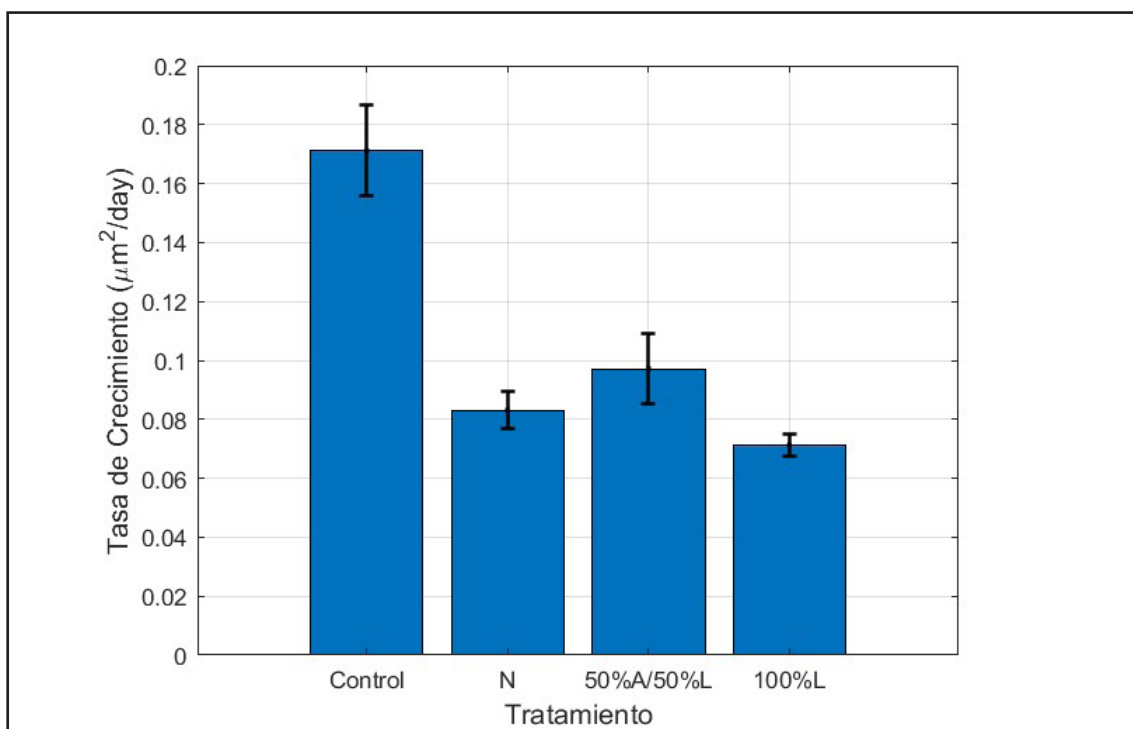


Figura 10: Tasas de crecimiento de larvas *Choromytilus chorus* alimentadas con levadura *Rhodotorula mucilaginosa* bajo distintas dosis durante los 6 días del experimento. Tratamiento control con 100% microalga (Control); Tratamiento con larvas en inanición (N) Tratamiento con 50% microalga y 50% levadura (50%A/50%L); Tratamiento con 100% levadura (100%L)

Análisis de mortalidad

La mortalidad final acumulada se calculó como el porcentaje de larvas muertas al final del experimento de un total de 120 larvas por réplica. Se encontraron diferencias en el porcentaje de mortalidad entre los tratamientos, siendo el tratamiento con 50% levadura (50%A/50%L) uno de los más sobresalientes con una mortalidad del 56%, siendo una de las más bajas del grupo. En cambio, en los tratamientos de larvas alimentadas con 100% microalga (100A) y las larvas en inanición (N) tuvieron tasas de mortalidad muy cercanas entre sí, de un 62% y 60% respectivamente, siendo el tratamiento alimentado con 100% levadura uno de los que presentó una de las mortalidades más altas con un 76% (figura 11) Estos valores podrían estar sobreestimados dadas las posibles pérdidas por manejo de las unidades experimentales.

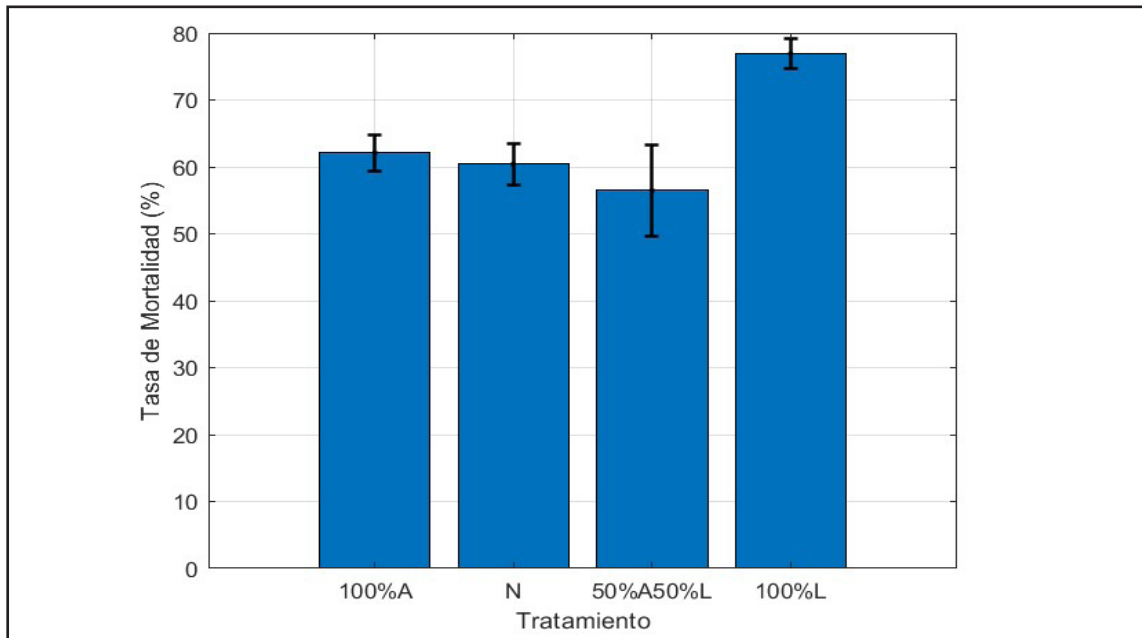


Figura 11: Mortalidad al finalizar el experimento y según tratamiento. Donde: 100%A=Tratamiento control (100% *Isochrysis galbana* y *Chaetoceros muelleri*); Tratamiento nada (larvas en inanición); Tratamiento 50A/50L (50% *Isochrysis galbana* y *Chaetoceros muelleri* más 50% *Rhodotorula mucilaginosa*); Tratamiento 100L (100%

Experimento 2

Análisis de crecimiento

El crecimiento de la concha de larvas D de *Magallana gigas* presentó un aumento constante en todos los tratamientos y cada una de sus réplicas durante los 14 días que duro el experimento (figura 12). Aunque inicialmente los tratamientos parecieron comportarse de forma similar, a partir del día 6 las curvas de crecimiento entre tratamientos comienzan a divergir (figura 13). Se encontraron diferencias significativas al comparar los distintos tratamientos (Kruskall Wallis Chi-cuadrado = 247.5, df = 3, valor-p = 0), lo que indica que la variable respuesta, en este caso el área de la concha cambia como efecto de los tratamientos. El tratamiento con 25% levadura (75%A/25%L) es el que alcanza las mayores tallas (ver tabla 5) con diferencias significativas con el control (Test Dunn < 2.2e-16), junto con el tratamiento 50%A/50%L que también demostró tener diferencias significativas (Test Dunn < 2.2e-16). Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas para el grupo control y el tratamiento con 75% adición de levadura (Test Dunn >0.05, ver figura 12).

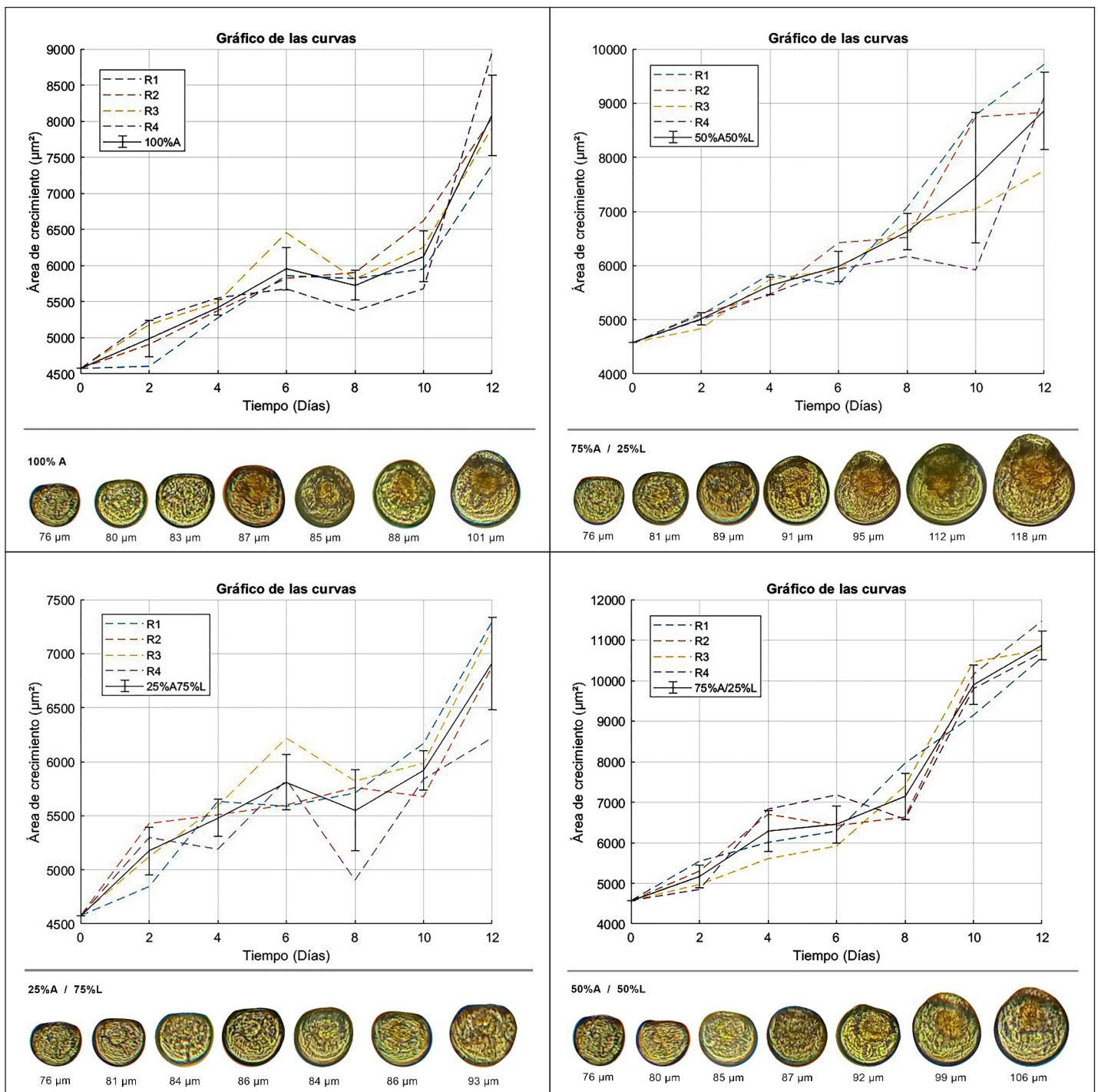


Figura 12: Curva de crecimiento del área de la concha (μm^2) de larvas *Magallana gigas* alimentadas con distintas dosis de levadura *Rhodotorula mucilaginosa* durante un periodo de 14 días.

- Tratamiento control con 100% microalga (100%A);
- Tratamiento con 75% levadura y 25% microalga (75%L/25%A).
- Tratamiento con 50% microalga y 50% levadura (50%A/50%L);
- tratamiento con 75% levadura y 25% microalga (75%L/25%A);
- R1: Réplica 1; R2: Réplica 2; R3: Réplica 3; R4: Replica 4.

En la parte inferior de cada gráfico es posible observar el crecimiento promedio del largo de la concha (μm) de las larvas en el tiempo. Autor de las fotografías: Paloma Araya.

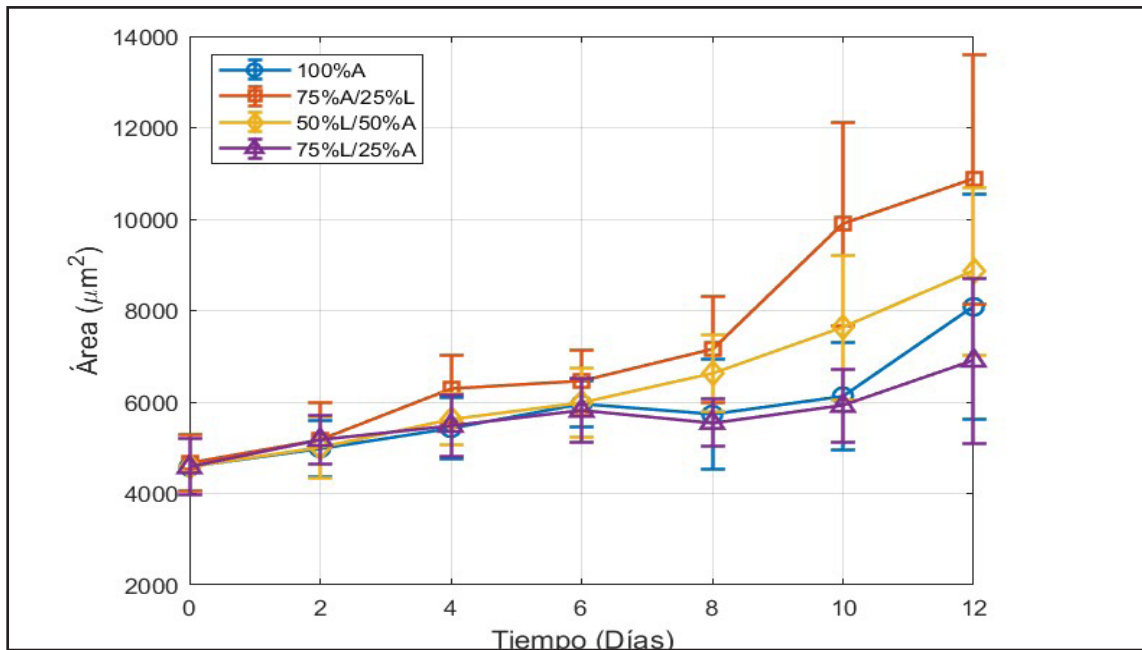


Figura 13: Curva de crecimiento (μm^2) de larvas *Magallana gigas* alimentadas con levadura *Rhodotorula mucilaginosa* bajo distintas dosis durante un periodo de 14 días. Tratamiento control con 100% microalga (Control); Tratamiento con 75% microalga y 25% levadura (75%A/25%L) Tratamiento con 50% microalga y 50% levadura (50%A/50%L); Tratamiento con 75% levadura y 25% microalga (75%L/25%A)

Tabla 5: Tallas finales del área de la concha (μm^2) y longitud de la concha (μm) para larvas de *Magallana gigas*: Tratamiento con 100% microalga (Control); Tratamiento con 75% microalga y 25% levadura (75%A/25%L) Tratamiento con 50% microalga y 50% levadura (50%A/50%L); Tratamiento con 75% levadura y 25% microalga (75%L/25%A).

	Control	75%A/25%L	50%A/50%L	75%L/25%A
Área (μm^2)	8080	10872	8857	6906
Longitud (μm)	101	118	106	94

A partir del día 6, se evidenció una marcada divergencia en las curvas de crecimiento. Para evaluar este cambio, se calcularon las tasas de crecimiento en $\mu\text{m}^2/\text{día}$ durante los primeros y últimos 7 días. Las tasas de crecimiento total mostraron que el tratamiento con larvas alimentadas con un 25% de levadura (75%A/26%L) tuvo el mejor desempeño de todos los tratamientos, con la tasa de crecimiento más alta ($0.115 \pm 0.02 \mu\text{m}^2/\text{día}^{-1}$), presentando diferencias significativas con el control (Test Tukey Post Hoc; p-value < 0.05), seguido del tratamiento con larvas alimentadas con 50% de levadura (50%A/50%L; $0.0778 \pm 0.02 \mu\text{m}^2/\text{día}^{-1}$), sin diferencias significativas al control. Luego, se encuentra el grupo control.

(100%A) con una tasa de crecimiento de $0.0637 \pm 0.02 \mu\text{m}^2\text{día}^{-1}$, y por último el tratamiento con mayor porcentaje de levadura (75%L/25%A) con una tasa de crecimiento de $0.0421 \pm 0.01 \mu\text{m}^2\text{día}^{-1}$ (figura 14), sin diferencias significativas con el control. Aunque en un principio los tratamientos parecían seguir patrones similares en velocidad de crecimiento, el tratamiento con un 25% demostró tener desde un principio (día 4) una tasa de crecimiento mayor, en comparación con los demás (figura 15-A). La tendencia cambia a la segunda mitad del experimento (día 6), donde las tasas de crecimiento se vuelven dispares, siendo el tratamiento con 25% levadura el más acelerado, siendo el único con diferencias significativas con el control (Test Tukey Post Hoc; p-value < 0.05), el tratamiento con 50% levadura ocupa el segundo lugar, mientras que el tratamiento con 75% de levadura y el control obtuvieron los rendimientos más bajos (figura 15-B).

Análisis de lípidos

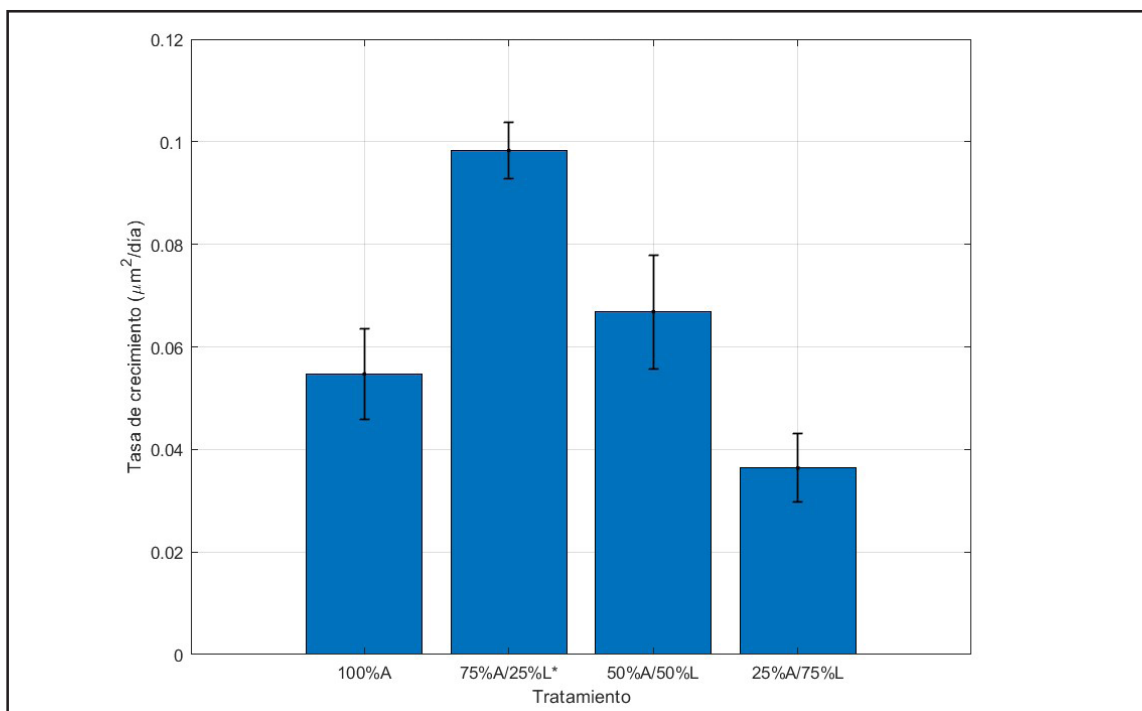


Figura 14: Tasas de crecimiento acumulada total de larvas *Magallana gigas* alimentadas con levadura *Rhodotorula mucilaginosa* bajo distintas dosis durante los 14 días del experimento. Tratamiento control con 100% microalga (Control); Tratamiento con 75% microalga y 25% levadura (75%A/25%L) Tratamiento con 50% microalga y 50% levadura (50%A/50%L); Tratamiento con 75% levadura y 25% microalga (75%L/25%A)

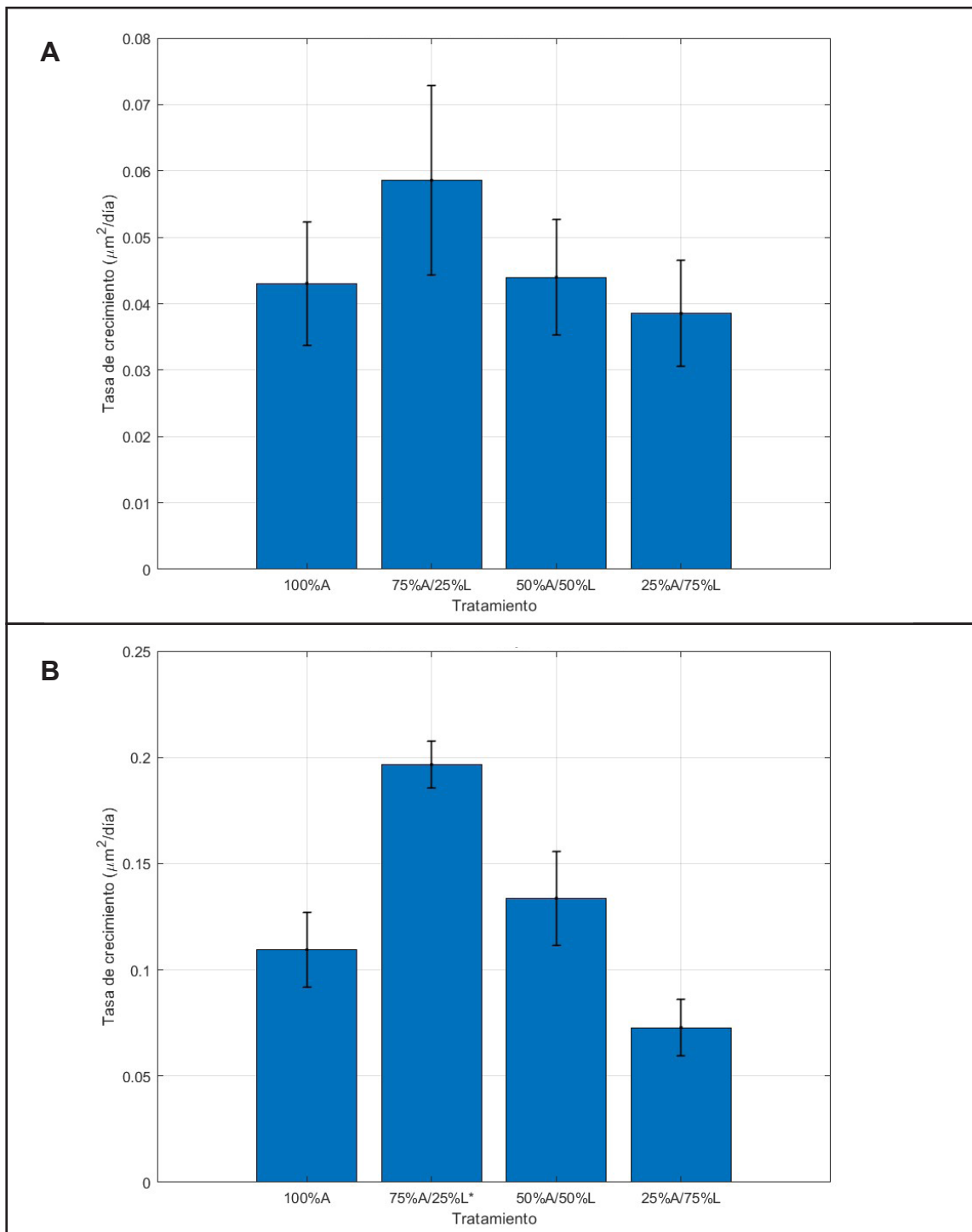


Figura 15: Tasas de crecimiento promedio de larvas *Magallana gigas* alimentadas con levadura *Rhodotorula mucilaginosa* en distintas dosis A) Durante los 7 primeros días del experimento B) Durante los 7 últimos días del experimento. Tratamiento control con 100% microalga (Control); Tratamiento con 75% microalga y 25% levadura (75%A/25%L) Tratamiento con 50% microalga y 50% levadura (50%A/50%L); Tratamiento con 75% levadura y 25% microalga (75%L/25%A). La línea vertical corresponde a ± 1 desviación estándar

El análisis del Índice lipídico de las larvas preumbonadas de *Magallana gigas* sometidas a distintos tratamientos alimenticios mostró diferencias significativas entre tratamientos (Krukall Wallis; chi-cuadrado = 11.095, df = 3, p = 0.01122). Los valores más altos de índice lipídico lo tuvieron las larvas alimentadas con 100 % microalga, pero también el con mayor dispersión de valores (0.18 ± 0.12 ; figura 16). Las variables de tasa de crecimiento e índice lipídico tienen una relación positiva significativa (Correlación de Pearson de 0.64, valor $p < 0.05$); esto quiere decir que a medida que el crecimiento tiende a aumentar, el índice lipídico tiende a aumentar, y viceversa. Luego, es posible observar una relación

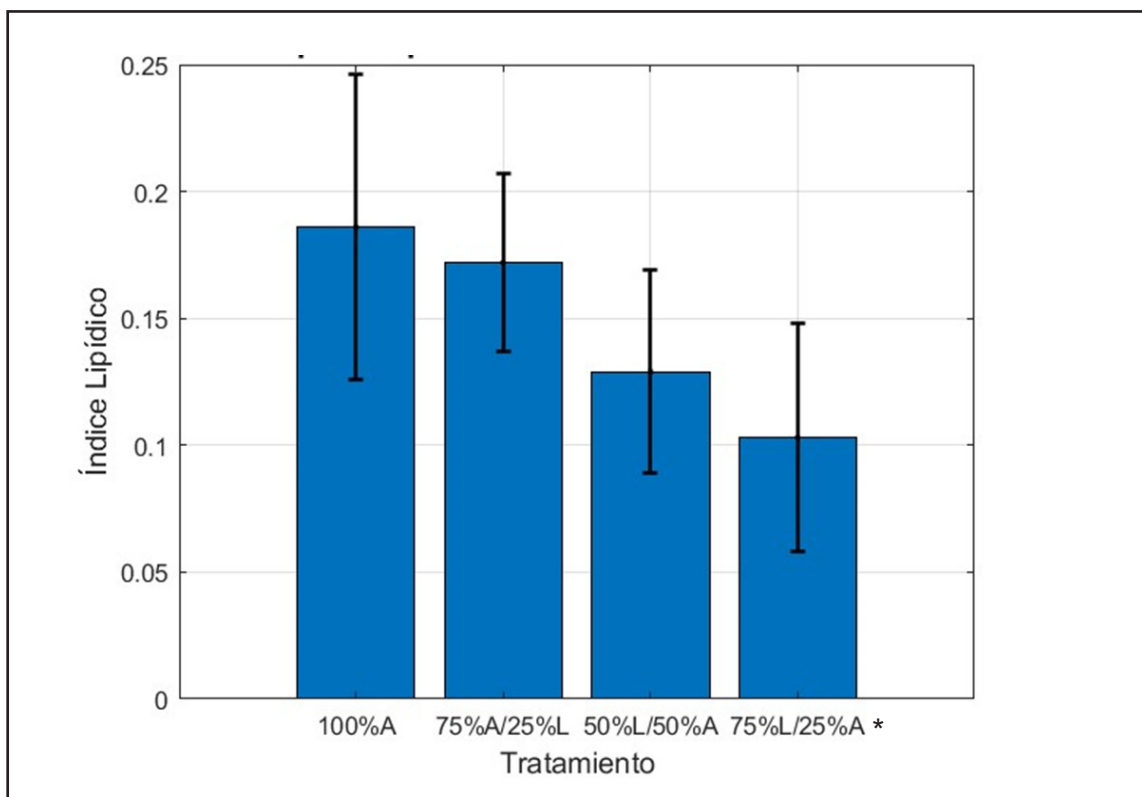


Figura 16: Índice lipídico de larvas de *Magallana gigas* al finalizar el experimento y según tratamiento. Tratamiento control con 100% microalga (100%A); Tratamiento con 75% microalga y 25% levadura (75%A/25%L) Tratamiento con 50% microalga y 50% levadura (50%A/50%L); Tratamiento con 75% levadura y 25% microalga (75%L/25%A). La línea vertical corresponde a ± 1 desviación estándar

lineal inversa entre la cantidad de levadura en la dieta y el índice lipídico para el resto de los tratamientos. A medida que aumenta la proporción de levadura en la dieta, el índice lipídico disminuye. El tratamiento con larvas alimentadas con 25% levadura (75%A/25%L) no tuvo diferencias significativas con el control (Dunn test $p > 0.05$) con un índice lipídico de 0.17 ± 0.07 . Tampoco se encontraron diferencias significativas con el tratamiento con 50% levadura (50%L/50%A) con un índice lipídico de 0.13 ± 0.08 (Dunn test $p > 0.05$). El tratamiento con mayor proporción de levadura en la dieta (75%L/25%A), sí tuvo diferencias significativas con el control, alcanzando el último lugar con un índice lipídico de 0.1 ± 0.09 (Dunn, $p = 0.0124$).

En resumen, los resultados demuestran los efectos positivos en el crecimiento de la concha y contenido lipídico de larvas veliger-D y preumbonadas de *Magallana gigas* al usar la levadura *R. mucilaginosa* como reemplazo en la dieta estándar. En especial para los resultados del experimento 2, que exhibió un crecimiento del área de la concha importante e incluso superior que el control para larvas que recibieron un reemplazo de 25 y 50% en su dieta estándar e incluso resultados óptimos muy cercanos al control para larvas que fueron alimentadas con 75% de levadura. Al final del experimento se pudo observar larvas en estado preumbonadas aparentemente sanas, activas y vigorosas. Además, el contenido lipídico de las larvas fue óptimo para todos los tratamientos, sobre todo para el tratamiento con 25% de levadura que alcanzó valores muy similares al control. El experimento 1 en cambio, nos ayudó a precisar la dosis óptima de levadura para las larvas y rediseñar el experimento 2.

Discusión

La alimentación de larvas de bivalvos ha sido objeto de extensos estudios y debates tanto en su entorno natural como en condiciones de cultivo en criaderos. Una alimentación adecuada no solo permite un crecimiento y desarrollo óptimo de las larvas hasta la adultez, sino que también determina la capacidad de resiliencia del organismo, preparándolo para enfrentar circunstancias adversas. (Moran & Manahan 2004; Rosa & Padilla, 2020; Labarta et al., 1999; Rodriguez et al., 1990). Entendiendo la fisiología del bivalvo como también la interacción con su fuente primaria el “plancton” es que se pueden proponer mejoras de cultivo. Este último ha sido un desafío para los cultivadores, puesto que son muchas las variables que determinan que un alimento sea óptimo para un bivalvo. Reconociendo la alimentación como un elemento esencial tanto en entornos naturales como artificiales, junto con la necesidad de abaratar los costos asociados al cultivo de microalgas es que surge la idea de innovar en términos de alimentación.

Este estudio tuvo la finalidad de proponer una alternativa a la alimentación en larvas de ostra *Magallanica gigas*, mediante el reemplazo de distintas dosis de levadura a su dieta estándar. Si bien, estudios anteriores han intentado documentar nuevas formas de alimentación, la mayoría se ha centrado en estadios de vida posteriores donde los mecanismos de alimentación y los requerimientos nutricionales son diferentes (Rosa & Padilla, 2020; Stanton, 2012). Las larvas de bivalvo tienen un velo con cilios muy eficientes que les ayuda a nadar y a la misma vez filtrar el alimento. Una vez extendido el velo, los movimientos pulsantes y repetitivos de sus cilios crean una corriente que empuja el alimento hacia la cavidad oral donde algunas de estas partículas son retenidas por los cilios presentes también en este (Qiu et al., 2015; Stanton, 2012). En este estudio, si bien el proceso de ingesta

no se pudo visualizar bajo microscopio, sí se pudo observar un comportamiento semejante al anteriormente descrito. Al exponer a la larva a la levadura, pareciera haber un reconocimiento por parte de esta al alimento, se ve salir del estado de reposo para dirigirse a la levadura, abrir el velo y mover los cilios a la vez que nada. El uso del colorante Rojo Neutro para la tinción de las levaduras, nos ayudó a evidenciar un cambio en la pigmentación de los órganos digestivo; así a medida que pasa el tiempo pareciera haber un oscurecimiento de la zona visceral. El mismo tipo de oscurecimiento se vio al comparar los tratamientos una vez finalizado el experimento 2, un oscurecimiento más notorio en el grupo control y el tratamiento con 25% de levadura que además fueron los tratamientos con mayor crecimiento.

En el medio natural, antes que la larva de ostra metamorfosee y se fije en el sustrato rocoso, esta nada de forma libre, coincidiendo muchas veces con los blooms de alimentos, para alimentarse de una variedad de microorganismos como bacterias, fitoplancton, materia orgánica (disuelta y particulada) y protozoos, realizando por lo general movimientos verticales y nocturnos, y teniendo que competir muchas veces por ello (Lagarde, 2017). Los hongos marinos, en especial las levaduras, se caracterizan por su ubicuidad en el ambiente marino, terrestre e incluso dentro de organismos vivos como simbioses (Gladfelter, 2019). Las levaduras por su parte cumplen un rol específico en el loop microbiano, principalmente como descomponedores de la materia orgánica, llegando a igualar casi a las bacterias en número en estos ambientes (Gutierrez et al., 2011). El compartir el mismo nicho, hace más probable su interacción y por consiguiente la probabilidad de que las larvas se puedan alimentar eventualmente de las levaduras. A pesar de que recientemente se ha estudiado la dieta de las larvas mediante análisis molecular del contenido intestinal (Lindeque et al., 2015), aún falta considerar

a las levaduras en estos estudios. Desde un punto de vista alimenticio, se destaca la importancia de entender la interacción entre las larvas de ostra, los microorganismos planctónicos y en especial las levaduras marinas en el ambiente natural para poder tener un acercamiento a su alimentación en hatchery.

En este estudio, se consideró a las variables de crecimiento y el contenido lipídico de las larvas como indicadores de éxito en el cultivo experimental, ya que estudios afirman una correlación entre estas variables y altas tasas de supervivencia y el éxito de asentamiento (Moran & Manahan 2004; Rosa & Padilla, 2020; Labarta et al., 1999; Rodrigues et al., 1990). En cuanto al crecimiento, el experimento 1 se enfocó en explorar dietas extremas. Estas dietas incluyeron, dosis de levadura al 100%, al 50% y larvas en inanición. En la relación con la inanición, estudios anteriores indican que las larvas de *Magallana gigas* tienen una alta capacidad para resistir tiempos prolongados sin alimento y sin cambios bruscos en la mortalidad pasados los 14 días, e inclusive pudiendo mantenerse en actividad hasta pasado 33 días (Moran & Manahan 2004). Otro estudio, indica que una larva bajo este tipo de estrés puede llegar a experimentar un punto de no retorno desde el día 4 (His & Seaman, 1992) que corresponde justamente al día de nuestro estudio en el que las larvas sufrieron una baja en crecimiento. Aunque no se puede descartar el hecho de que la alimentación que recibieron previo al experimento haya influenciado su desempeño como también su alimentación lecitotrófica (Stanton, 2012). En cuanto a los demás tratamientos, debido a la corta duración del experimento (7 días) no se pudo realizar una inferencia estadística como para asegurar si una dieta al 50% o 100% es beneficiosa para las larvas. En consecuencia, se rediseñó el experimento 2 utilizando un 25%, 50% y 75% de levadura en la dieta para cada tratamiento y aumentando el tiempo de duración a 14 días.

En cuanto al experimento 2, uno de los hallazgos más importante fue encontrar que al término del experimento, el tratamiento con 25% de levadura *Rhodotorula mucilaginosa* en la dieta, sobrepasaba de manera significativa al control en cuanto a crecimiento del área de la concha al final del experimento y la tasa de crecimiento. Lo mismo para el tratamiento con 50% de adición de levadura en el que las larvas demostraron un buen desempeño con valores muy cercanos al control e incluso superiores. No así para el tratamiento con 75% de levadura, que obtuvo resultados cercanos al control sin diferencias significativas. Esto sugiere que la levadura puede tener un efecto beneficioso en el desarrollo y crecimiento de los estadios tempranos de *Magallanica gigas*. Sin embargo, dosis cercanas al 75% parecieran no ser beneficiosas, pudiendo existir una relación no lineal entre concentraciones de levadura cercanas al 75% y el rendimiento de las larvas. En relación a esto es importante resaltar el uso de un 25% de levadura como una dosis recomendada cuya adición en la dieta maximiza el rendimiento de las larvas en cuanto a crecimiento en área final de la concha y tasa de crecimiento.

El uso de levaduras como alimentación larval no es reciente; uno de los primeros estudios que se realizó fue con Epifanio en 1979 el cual utilizó 50% de levadura *Candida utilis* como reemplazo en la dieta de juveniles de *Argopecten irradians*, *Mercenaria mercenaria*, y *Mytilus edulis*, demostrándose que estos bivalvos crecían más rápidamente en comparación con el grupo de control alimentado únicamente con microalgas. Recientemente se reporta el uso de *Saccharomyces cerevisiae* en la alimentación de juveniles de *Ostrea edulis* y *Ruditapes decussatus* donde se demostró un crecimiento acelerado en un reemplazo de un 15% de levadura en la dieta de ambas especies (Georgoulis et al., 2024). En un estudio, donde se utilizó juveniles de *Magallanica gigas* y una mutante de *Saccharomyces*

cerevisiae de pared celular más digerible, demostró que un reemplazo del 50% de levadura no afecta el desempeño normal de los juveniles (Loor et al., 2020). En otra investigación, se examinó un reemplazo del 80% de la dieta de juveniles, con 6 especies de levaduras, incluyendo *Rhodotorula rubra* y *R. glutinis*, lo que resultó en un aumento del 46% en la tasa de crecimiento en comparación con el grupo control (Nell et al., 1996) En resumen, se ha evidenciado que un reemplazo de menos del 50% para levaduras modificadas y un 15% sin modificar en bivalvos juveniles ha resultado ser beneficiosa. En cuanto al contenido nutricional de las levaduras se sabe que estas se encuentran en desventajas en cuanto al contenido lipídico en comparación con las microalgas. En el año 1996 se investigó sobre el contenido nutricional de levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*, *Candida sp* y *Debaromyces sp.*) para su uso en alimentación en larvas y juveniles de *Saccostrea commercialis*, donde se evidenció un contenido similar de proteínas y menor contenido en lípidos que las microalgas comúnmente usadas en cultivo, aunque 2 a 3 veces más contenido de carbohidratos y un 8-12% más ácidos nucleicos que estas últimas, enfatizando en la capacidad de los bivalvos de metabolizar ácidos nucleicos gracias a la enzima uricasa y la necesidad de dietas compuestas con el fin de suplementar las deficiencias que una dieta solo a base de levaduras podría otorgar (Brown et al., 1996).

En relación a estudios realizados con larvas, se demostró que la almeja *Tridacna squamosa* alimentada con 1:1 de *T. suecica*, *C. mulleri* y *Saccharomyces cerevisiae* demostró tener una sobrevivencia de aproximadamente el doble que el control a base microalgas luego de las primeras 24h sin diferencias significativas luego de 48h (Neo et al., 2013). En nuestro estudio, resultados similares se presentaron al finalizar el experimento 1, donde el tratamiento alimentado con las mismas proporciones de levadura en la dieta evidenció mortalidades muy

cercanas al control, no así para el tratamiento con 100% levadura en la dieta que sí presentó diferencias significativas con el control. Otro estudio, realizado con larvas de *Pinctada margaritifera*, demostró que una dieta 1:1 a base de levadura comercial y un mix de 3 especies de microalgas, tuvo un incremento en la tasa de crecimiento de un 86.9% (Southgate et al., 1998), mientras que, en otro estudio, dosis mayores de la misma levadura comercial, demostró tener un incremento de un 72.3% en comparación con el control con 100% microalga (Nell et al., 1996). En nuestro estudio las larvas alimentadas con 50% de levadura evidenciaron tasas de crecimiento superiores al control. Mientras que las alimentadas con 100% levadura tuvieron una tasa de crecimiento medianamente aceptable. Sin embargo, estudios anteriores ya han descrito que es recomendado administrar las levaduras en bajas dosis (Loor et al., 2020, Nell et al., 1996).

Recientemente se ha estudiado el mecanismo de selectividad que tienen las ostras por las microalgas. Este proceso de selección estaría mediado por señales químicas de moléculas llamadas lectinas, presente en el mucus de las branquias, las cuales reconocen carbohidratos específicos ubicados en la superficie de las microalgas, lo que en efecto produciría la abertura de las valvas. (Espinosa et al., 2009). En otro estudio se hipotetiza que este mecanismo de reconocimiento por parte del bivalvo y la baja selección de este por las levaduras permitiría que estas últimas ingresen por la misma vía que las microalgas para ser consumidas (Loor et al., 2020). Esto explicaría por qué resultaría beneficioso el uso de dietas mixtas y bajas proporciones de levadura para juveniles. Si bien las larvas también producen mucus por las microvellosidades presente en la base de sus cilios (Stanton 2012), lectinas u otro tipo de molécula encargada de la señalización química entre larva-alimento no han sido descritas aún para este estadio de vida. Aun así, se han investigado otros factores que intervienen en la selección

de alimentos, entre los cuales se incluyen: la calidad del alimento según su composición bioquímica, preferencia por partículas con cargas negativas, forma redondeada y partículas en el rango de 0.2 a 30 μm (Rosa & Padilla, 2020; Sollow & Gallager, 1990).

En cuanto al contenido lipídico en larvas, un reemplazo de 25 y 50% de levadura en la dieta no tuvo diferencias significativas con el control, además de experimentar una relación lineal entre el índice lipídico y el crecimiento. Estos resultados sugieren que un reemplazo menor al 50% de levadura en la dieta de las larvas podría estimular el crecimiento y desarrollo de las larvas sin un excesivo uso de sus lípidos neutrales. Los lípidos neutrales, que se visualizaron mediante la tinción con colorante Rojo Nilo, fueron lípidos como triglicéridos, ésteres de colesterol y vitaminas liposolubles. Los lípidos neutros en especial los triglicéridos cuya función principal es actuar como reserva energética, es de vital importancia en periodos de inanición (Labarta et al., 1999). Además, son importante en otras funciones como componentes de las membranas lipídicas y promoviendo crecimiento larval (Gallager & Mann, 1986). Por lo tanto, su conservación es esencial para garantizar el adecuado crecimiento, desarrollo y supervivencia de las larvas, proporcionándoles energía, contribuyendo a la estructura celular y facilitando los procesos metabólicos necesarios para su desarrollo óptimo.

Por otra parte, que las larvas alimentadas por 25 y 50% de levadura no alcanzara los mismos niveles de contenido lipídico que el control, sea posiblemente debido a la baja cantidad de lípidos en la dieta. Sin embargo, esto no fue un impedimento para que las larvas presentaran un crecimiento acelerado y por sobre el control, posiblemente debido al aporte nutricional de otras moléculas como carbohidratos, ácidos nucleicos presentes en *Rhodotorula mucilaginosa*. Además, esta especie se describe como una levadura con alto contenido en lípidos y carotenoides,

a diferencia de las levaduras *S.cerviceae* y *Candida sp.* comúnmente usadas en estudios experimentales (Rehm & Reed,1997). También, se reconocen estos compuestos como altamente antioxidantes, potenciador del sistema inmune, antitumoral y probiótico (Liu et al., 2021, Li et al., 2022), pudiendo contribuir a una buena salud de las larvas.

Los lípidos neutrales son una de las principales fuentes energéticas en larvas, seguido de las proteínas y los carbohidratos. Se ha estudiado que en periodos de inanición la larva metabolizará un 50% de energía proveniente principalmente de lípidos de reserva, seguido de proteínas (30–40%) y carbohidratos (<10%) (Gallager & Mann, 1986). En cambio, en el proceso de metamorfosis, no se puede descartar la importancia de las proteínas, que contrario a lo que se ha expuesto en otros estudios, estas serían la principal fuente de energía para poder llevar a cabo este proceso irreversible, siendo metabolizadas en un 69%, seguido de los lípidos en un 19% y carbohidratos en un 10%. (Rodriguez et al., 1990). Los lípidos neutrales por lo tanto son beneficiosos para el crecimiento, vigor y supervivencia de las larvas, y estos serían mayormente obtenidos de las microalgas. Mientras que las proteínas, que son importantes para la metamorfosis, serían obtenidas gracias a la dieta compuesta levadura microalga. También, no se debe descartar la leve influencia de aporte endógeno de lípido, en un estudio realizado con *M. gigas*, donde se expusieron a una dieta microalgal alta en PUFAs de cadena corta, se evidencio la capacidad de estos organismos de desaturar y elongar PUFAs, obteniendo así ácidos grasos omega-3 de cadena larga (PUFAs n-3) como ácido eicosapentaenoico (20:5n-3(EPA)) y ácido docohexanoico (22:6n-3 (DHA)) (Waldock & Holland, 1984). Además de la capacidad algunas levaduras en potenciar la sobreexpresion de genes relacionados a la elongación de PUFAs (Loor et al., 2020)

Actualmente, varios estudios investigan las condiciones de cultivo de la levadura *Rhodotorula mucilaginosa* con el fin de mejorar la producción y facilitar la síntesis de compuestos específicos, especialmente de lípidos neutrales y polares para su uso como biocombustible y uso en alimentación. Por ejemplo, se tiene evidencia que la melaza de caña de azúcar y licor de maíz, productos provenientes de desecho agroindustrial, al ser usados como medio de cultivo, para llegar a producir una mayor cantidad de lípidos totales y carotenoides, un 43.2% y 121.4 $\mu\text{g g}^{-1}$ respectivamente en un periodo de 96h (Rodrigues et al. 2022). Si bien esto parece más rentable de ser implementado en Brasil, donde fue hecho este estudio, otras alternativas se sugieren para poder implementarse en Chile, como, por ejemplo, poder cultivar *R. mucilaginosa* mediante desechos de la industria de la remolacha, uva, manzanas u otro producto de desecho local, con el fin de abaratar los costos de producción y a la vez poder tener cultivos de levadura altos en lípidos, carotenoides u otro subproducto de importancia alimenticia.

En este estudio, el cultivo de levadura *R. mucilaginosa* no requirió del control de muchas variables, siendo la temperatura, el medio nutritivo y el tiempo de incubación una de las más importantes ya que modifican directamente la densidad final de levadura, al igual que un control adecuado de las medidas de asepsia para evitar contaminación. En cuanto a los resultados finales, no fueron necesarios grandes volúmenes de levadura, puesto que, para realizar este estudio experimental, solo se necesitaron 200 mg aproximados de levadura, lo que equivale a menos de un litro de medio líquido cultivable. El producto final de levadura liofilizada fue perfectamente almacenable y fácilmente transportado de un lugar a otro de forma segura, lo que la hace un organismo atrayente para trabajar. La practicidad de la levadura como alimento animal radica en que no requiere ser mantenida en un sistema de cultivo para mantenerla viva,

ni tampoco ser medida a diario para saber su densidad, como en el caso de las microalgas usadas en cultivo. Si no que, solo requiere ser pesada y luego reconstituida para que las levaduras se activen y sirvan como biomasa viva y de buena calidad, puesto que la técnica de liofilizado conserva sus propiedades nutricionales y fisiológicas, haciendo el proceso de suministro de alimento mucho más expedito, eficiente y seguro. Se sugiere, por lo tanto, explorar el efecto del reemplazo de *R. mucilaginosa* en estadios postlarvales. Aunque pueda existir cierta incertidumbre sobre si este grupo de levaduras podría causar algún tipo de tinción en los tejidos, especialmente en etapas postlarvales, se sugiere seguir un protocolo de depuración. Este proceso no solo puede eliminar cualquier posible pigmentación, sino que también contaminantes, garantizando un producto final de buena apariencia, de excelente sabor, seguro y que cumpla con todas las regulaciones de higiene y calidad (Dubert et al., 2016).

Conclusiones

1. Las mayores tasas de crecimiento se obtuvieron al reemplazo de un 25% y 50% de levadura en la dieta de larvas veliger-D y preumbonadas de *Magallana gigas*. Siendo un reemplazo de un 25% uno de los más destacado con diferencias significativas al control alimentado con 100% microalga.
2. El contenido lipídico de las larvas alimentadas con proporciones de 25% y 50% de levadura en la dieta no tuvo diferencias significativas con el control, además de experimentar una relación lineal entre el índice lipídico y el crecimiento.
3. La identificación de concentraciones óptimas de levadura en la alimentación podría ayudar a mejorar la eficiencia y la rentabilidad de la producción de larvas de *Magallana gigas* en los criaderos de semilla de bivalvos.
4. La mayoría de los estudios realizados hasta ahora corresponden al uso de levaduras en bivalvos como almejas, ostras y choritos en estadio juvenil, por lo tanto, mejorar la eficiencia en su manejo podría reducir considerablemente los costos de alimentación en la instalación de cultivo. Además de ampliar nuestro conocimiento sobre las levaduras y posicionarlas como una potencial fuente de alimento en acuicultura.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Brown, M. R., Barrett, S. M., Volkman, J. K., Nearhos, S. P., Nell, J. A., & Allan, G. L. (1996). Biochemical composition of new yeasts and bacteria evaluated as food for bivalve aquaculture. *Aquaculture*, 143(3-4), 0–360. doi:10.1016/0044-8486(96)01286-0
- Castell L.L., Mann R. (1994) Optimal staining of lipids in bivalve larvae with Nile Red. *Aquaculture*, 119(1), 89-100. doi:10.1016/0044-8486(94)90445-6.
- Corbacho, I., Teixidó, F., Velázquez, R., Hernández, L. M., & Olivero, I. (2010). Yeast vacuole staining using quinacrine and neutral red. In *Microorganisms in Industry and Environment: Proceedings of the III International Conference on Environmental, Industrial and Applied Microbiology* (pp. 659–661). https://doi.org/10.1142/9789814322119_0142
- Costello, C., Cao, L., Gelcich, S., et al. (2020). The future of food from the sea. *Nature*, 588, 95–100. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2616-y>
- Coutteau, P., & Sorgeloos, P. (1992). The use of algal substitutes and the requirement for live algae in the hatchery and nursery rearing of bivalve molluscs: an international survey. *J. Shellfish Res.*, 11, 467-476.
- Dunn, O. J. (1961). Multiple comparisons among means. *Journal of the American Statistical Association*, 56(293), 52-64. <https://doi.org/10.1080/01621459.1961.10482090>
- Dubert, J., da Costa, F., Aranda-Burgos, J. A., Martínez-Patiño, D., Prado, S., & Barja, J. L. (2016). Beneficial effects of carpet shell clam (*Ruditapes decussatus*) depuration during short periods of conditioning in shellfish hatchery: Role of the temperature and phytoplankton on reduction and diversity of vibrios. *Aquaculture*, 459, 65–72. doi:10.1016/j.aquaculture.2016.03.030
- Ermgassen, Philine S. E.; Thurstan, Ruth H.; Corrales, Jorge; Alleway, Heidi; Carranza, Alvar; Dankers, Norbert; DeAngelis, Bryan; Hancock, Boze; Kent, Flora; McLeod, Ian; Pogoda, Bernadette; Liu, Qing; Sanderson, William G. (2020). The benefits of bivalve reef restoration: A global synthesis of underrepresented species. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater*

Ecosystems, 30(11), 2050–2065. doi:10.1002/aqc.3410

- Espinosa, E. P., Perrigault, M., Ward, J. E., Shumway, S. E., & Allam, B. (2009). Lectins associated with the feeding organs of the oyster *Crassostrea virginica* can mediate particle selection. *Biological Bulletin*, 217(2), 130-141. doi:10.1086/BBLv217n2p130
- FAO. (2022). El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2022. Hacia la transformación azul. Roma, FAO. <https://doi.org/10.4060/cc0461es>
- Farías, A. (2008). Nutrición y alimentación en moluscos bivalvos. En A. Lovatelli, A. Farías e I. Uriarte (Eds.), *Estado actual del cultivo y manejo de moluscos bivalvos y su proyección futura: factores que afectan su sustentabilidad en América Latina*. Taller Técnico Regional de la FAO. Roma, FAO. pp. 297–308.
- Fligner, M. A., & Killeen, T. (1976). Distribution-free two-sample tests for scale. *Journal of the American Statistical Association*, 71(353), 210-213. <https://doi.org/10.2307/2286301>
- Gallager, S., & Mann, R. (1986). Individual variability in lipid content of bivalve larvae quantified histochemically by absorption photometry. *Journal of Plankton Research*, 8(5), 927–937. <https://doi.org/10.1093/plankt/8.5.927>
- Georgoulis, I., Papadopoulos, D. K., Lattos, A., Michaelidis, B., Feidantsis, K., & Giantsis, I. A. (2024). Increased seawater temperature triggers thermal, oxidative and metabolic response of *Ostrea edulis*, leading to anaerobiosis. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 271, 110943. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2024.110943>
- Gladfelter, Amy S.; James, Timothy Y.; Amend, Anthony S. (2019). Marine fungi. *Current Biology*, 29(6), R191–R195. doi:10.1016/j.cub.2019.02.009
- Gutiérrez, M. H., Pantoja, S., Tejos, E., & Quiñones, R. A. (2011). The role of fungi in processing marine organic matter in the upwelling ecosystem off Chile. *Marine Biology*, 158(1), 205–219. doi:10.1007/s00227-010-1552-z
- Helm, M. M., Bourne, N., & Lovatelli, A. (2004). *Hatchery culture of bivalves, a practical manual*. FAO Fisheries Technical Paper 471. Food and Agriculture Organization of the United Nations.

- His, E., & Seaman, M. N. L. (1992). Effects of temporary starvation on the survival, and on subsequent feeding and growth, of oyster (*Crassostrea gigas*) larvae. *Marine Biology*, 114, 277–279. <https://doi.org/10.1007/BF00349530>
- Hofmann, E; Powell, E; Bochenek, E; Klinck, J (2004). A modelling study of the influence of environment and food supply on survival of *Crassostrea gigas* larvae. *ICES Journal of Marine Science*, 61(4), 596–616. doi:10.1016/j.icesjms.2004.03.029
- Labarta, U., Fernández-Reiriz, M.-J., & Pérez-Camacho, A. (1999). Larvae of *Ostrea edulis* (L.) during starvation: Growth, energy and biochemical substrates. *Hydrobiologia*, 405, 125-131. <https://doi.org/10.1023/A:1003851220515>
- Lagarde F, Roque d'orbcastel E, Ubertini M, Mortreux S, & others. (2017). Recruitment of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* in a shellfish-exploited Mediterranean lagoon: discovery, driving factors and a favorable environmental window. *Mar Ecol Prog Ser*, 578, 1-17. <https://doi.org/10.3354/meps12265>
- Liu, C., Hu, B., Cheng, Y., Guo, Y., Yao, W., & Qian, H. (2021). Carotenoids from fungi and microalgae: A review on their recent production, extraction, and developments. *Bioresource Technology*, 337, 125398. doi:10.1016/j.biortech.2021.125398
- Li, Z., Li, C., Cheng, P., & Yu, G. (2022). *Rhodotorula mucilaginosa*-alternative sources of natural carotenoids, lipids, and enzymes for industrial use. *Heliyon*, 8(11), e11505. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e11505> . - DOI - PubMed – PMC
- Lindeque, P. K., Dimond, A., Harmer, R. A., & et al. (2015). Feeding selectivity of bivalve larvae on natural plankton assemblages in the Western English Channel. *Marine Biology*, 162(2), 291–308. <https://doi.org/10.1007/s00227-014-2580-x>
- Martínez, J., García, A., & López, M. (2018). Simple cell counting method using a Neubauer chamber and a conversion factor. In *Cell Counting Techniques*. DOI: 10.1234/cct.2018.123456

- Meyers, S. P. (1966). Variability in growth and reproduction of the marine fungus, *Lulworthia floridana*. *Helgolander Wiss. Meeresunters*, 13, 436–443. <https://doi.org/10.1007/BF01611960>
- Moran A.L ; Manahan D.T (2004). Physiological recovery from prolonged 'starvation' in larvae of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*.306(1),17–36. doi:10.1016/j.jembe.2003.12.021
- Neo, M. L., Todd, P. A., Teo, S. L.-M., & Chou, L. M. (2013). The effects of diet, temperature and salinity on survival of larvae of the fluted giant clam, *Tridacna squamosa*. *Journal of Conchology*, 41(3), 369.
- Nell, J. A., Diemar, J. A., & Heasman, M. P. (1996). Food value of live yeasts and dry yeast-based diets fed to Sydney rock oyster *Saccostrea commercialis* spat. *Aquaculture*, 142(3-4), 279-293.
- Qiu, T., Liu, Y., Zheng, J., Zhang, T., & Qi, J. (2015). A feeding model of oyster larvae (*Crassostrea angulata*). *Physiology & Behavior*, 147, 169–174. doi:10.1016/j.physbeh.2015.04.043
- Rehm, H.-J., & Reed, G. (1997). *Biotechnology Volume 8 || Microbial Lipids*. 133–197. doi:10.1002/9783527620890.ch4
- Rodriguez J. L.; Sedano F. J.; García-Martín L. O.; A. Pérez-Camacho; J. L. Sánchez (1990). Energy metabolism of newly settled *Ostrea edulis* spat during metamorphosis. , 106(1), 109–111. doi:10.1007/bf02114680
- Rodrigues, T. V. D., Teixeira, E. C., Macedo, L. P., Dos Santos, G. M., Burkert, C. A. V., & de Medeiros Burkert, J. F. (2022). Agroindustrial byproduct-based media in the production of microbial oil rich in oleic acid and carotenoids. *Bioprocess and Biosystem Engineering*, 45(4), 721–732. doi:10.1007/s00449-022-02692-1
- Rosa, M., & Padilla, D. K. (2020). Changes in Food Selection through Ontogeny in *Crassostrea gigas* Larvae. *Biol Bull*, 238(1), 54-63. doi:10.1086/706821
- Shapiro, S. S., & Wilk, M. B. (1965). An analysis of variance test for normality (W test). *Biometrika*, 52(3/4), 591-611. <https://doi.org/10.1093/>

biomet/52.3-4.591

- Solow, A. R., & Gallager, S. M. (1990). Analysis of capture efficiency in suspension feeding: Application of nonparametric binary regression. *Mar Ecol Prog Ser*, 107(2), 341–344. doi:10.1007/bf01319834
- Southgate, P. C., Beer, A. C., Duncan, P. F., & Tamburri, R. (1998). Assessment of the nutritional value of three species of tropical microalgae dried *Tetraselmis* and a yeast-based diet for larvae of the blacklip pearl oyster, *Pinctada margaritifera* (L.). *Aquaculture*, 162, 249–259.
- Stanton, S. A. (2012). Structure and function of the external ciliation of larval bivalves with different life history strategies. School of Biology of Science, Marine Biology.
- SUBPESCA. (2020). INFORME SECTORIAL DE PESCA Y ACUICULTURA CONSOLIDADO 2020 Departamento de Análisis Sectorial.
- Suplicy, F. M. (2018). A review of the multiple benefits of mussel farming. *Reviews in Aquaculture*. doi:10.1111/raq.12313
- United Nations, Department of Economic and Social Affairs, Population Division (2022). *World Population Prospects 2022: Summary of Results*.
- Waldock, M. J., & Holland, D. L. (1984). Fatty acid metabolism in young oysters, *Crassostrea gigas*: Polyunsaturated fatty acids. *Marine Biology*, 19(5), 332–336. doi:10.1007/bf02534783
- Wickerman, L. J. (1951). Taxonomy of yeasts. US Department of Agriculture, Washington DC, Technical Bulletin No.1029, 1-56.

