



**UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y OCEANOGRÁFICAS
Biología Marina**

**EFFECTO DE LA UTILIZACIÓN DE LEVADURAS MARINAS COMO
ADITIVO ALIMENTICIO EN EL CRECIMIENTO Y ESTADO DE
SALUD DE LA TRUCHA ARCOÍRIS (*ONCORHYNCHUS MYKISS*)
EN CONDICIONES EXPERIMENTALES**

Seminario de Título presentado a la Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas de la Universidad de Concepción para optar al título profesional de Biólogo Marino

POR: MANUEL DAVID GUZMÁN RODRÍGUEZ
Profesor guía: Dr. Marcelo Hernán Gutiérrez Astete
Profesor coguía: Dr. Ariel Edgardo Del Carmen Valenzuela Saldías

12 de agosto 2022
Concepción, Región del Biobío, Chile

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría expresar mi más profundo y sincero agradecimiento a toda mi familia, quienes me han apoyado de manera incondicional no solo a lo largo de toda mi etapa universitaria, sino que también en cada etapa de mi vida. A mi madre y padre quienes han estado ahí cada vez que lo he necesitado y por brindarme siempre la comprensión y amor que hacen de mí una mejor persona, a mi hermana quien ha estado siempre a lo largo de cada etapa y decisión a lo largo de toda mi vida, a mi hermano por darme animo siempre, ante todo. A mi sobrina Tiare, quien ha crecido junto a mi como mi hermana y amiga. A mi pareja María Teresa, quien, con su llegada, ha sido sin lugar a duda un pilar fundamental en mi vida estos últimos años apoyándome y brindando confianza en cada aspecto de mi vida. A mis grandes amigos Carlos y Gabino por apoyarme siempre y por hacer mi vida universitaria uno de los mejores momentos de mi vida. A mis amigas Valentina, Celeste y Jimena, quienes fueron mis primeras amigas en mi estadía en Concepción y siempre me brindaron mucho cariño y sabiduría, la cual agradezco enormemente. A mis compañeros de casa, Jaime y Karina con los cuales he compartido un hogar estos últimos años en un grato ambiente de respeto y apoyo mutuo. A mi amigo David, de quien aprendí un montón de cosas nuevas y a ver el mundo de una manera diferente.

Al Dr. Marcelo Gutiérrez por aceptar ser mi profesor guía, siempre brindando apoyo y contribuyendo a mejorar mi rendimiento en la realización de este seminario de título. Al Dr. Ariel Valenzuela por aceptar se mi profesor co-guía y parte de mi comisión evaluadora, así como también, por abrir sus puertas para poder realizar mi investigación en su laboratorio. A la Dra. Alejandra Llanos por aceptar ser parte de mi comisión evaluadora y por todo el apoyo brindado en las primeras etapas del desarrollo de esta investigación. Deseo agradecer también a todas las personas que conforman el laboratorio de Geoquímica Orgánica Marina, Jeanette, Paulina, Cristóbal, Víctor y Amanda por

siempre tener buena disposición para resolver todas mis dudas y por hacer de mi tiempo en el laboratorio un lugar agradable. Me gustaría agradecer también a todo el equipo del Laboratorio de Piscicultura y Patología Acuática, a Niza por todo el apoyo, consejos y orientación brindada durante el desarrollo de esta investigación, y a Bernardo, por el apoyo brindado. Me gustaría agradecer también a don Ricardo, quien me ayudó en la preparación del alimento utilizado en esta investigación.

Finalmente, agradezco al proyecto Fondecyt 1200252 cuyo financiamiento hizo posible el desarrollo de la investigación realizada en este seminario de título.



ÍNDICE DE CONTENIDOS	
ÍNDICE DE FIGURAS.....	i
INDICE DE TABLAS.....	iii
RESUMEN.....	1
1. INTRODUCCIÓN.....	3
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	10
2.1. Cultivo y crecimiento de la cepa de levadura a utilizar.....	10
2.1.1 Cultivo medio sólido.....	10
2.1.2 Medio líquido de cultivo.....	10
2.2. Preparación de la matriz de alimento.....	12
2.3. Prueba de palatabilidad.....	13
2.4. Peces.....	13
2.5. Toma de muestras.....	15
2.5.1 Parámetros biométricos.....	15
2.5.2 Parámetros hematológicos.....	16
2.6. Parámetros de crecimiento.....	17
2.6.1 Ganancia de Peso.....	17
2.6.2 Ganancia de Talla.....	17
2.6.3 Tasa Específica de Crecimiento.....	18
2.6.4 Factor de conversión de alimento.....	18
2.7. Parámetros morfométricos.....	18
2.8. Parámetros hematológicos:.....	19
2.8.1 Eritrograma.....	19
2.8.2 Leucograma.....	22
2.8.3 Índices Hemáticos.....	22
2.9. Parámetros inmunológicos.....	22
2.9.1 Actividad enzima Lisozima.....	22
2.9.2 Actividad anti proteasa.....	23
2.10. Análisis estadístico.....	24
3. RESULTADOS.....	25
3.1. Condiciones de cultivo.....	25
3.2. Análisis de crecimiento en talla y peso de los peces.....	25
3.2.1 Peso.....	25
3.2.2 Talla.....	26

3.2.3 Factor de conversión alimenticia	27
3.2.4 Relación Peso y Talla.....	28
3.2.5 Tasa de crecimiento específica	29
3.2.6 Factor de condición de Fulton	30
3.3. Morfometría.....	30
3.4. Análisis Hematológico.....	32
3.4.1 Conteo de eritrocitos	32
3.4.2 Conteo de leucocitos.....	32
3.4.3 Hemoglobina	33
3.4.4 Hematocrito.....	33
3.4.5 Índices hemáticos.....	34
3.4.6 Conteo diferencial de leucocitos.....	35
3.5. Análisis inmunológico.....	37
3.5.1 Antiproteasa	37
3.5.2 Enzima lisozima	38
3.6. Pigmentación	39
4. DISCUSIÓN	40
4.1 Condiciones experimentales	40
4.2. Crecimiento	40
4.3. Parámetros hematológicos.....	46
4.4. Análisis Inmunológico.....	52
5. CONCLUSIONES.....	56
6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58



ÍNDICE DE FIGURA

FIGURA 1: REACTIVOS UTILIZADOS PARA LA PREPARACIÓN DEL MEDIO LIQUIDO DE CULTIVO.	11
FIGURA 2: A) MATRACES ERLLENMEYER DE 1000 ML CON 800 ML DE MEDIO DE CULTIVO LÍQUIDO LUEGO DE SER AUTOCLAVADOS, PREVIO A LA INOCULACIÓN. 2B) MATRAZ ERLLENMEYER CON 800 ML DE MEDIO DE CULTIVO LIQUIDO LUEGO DE SER INOCULADO CON RHODOTOTURA SP.	12
FIGURA 3: A) TUBOS FALCON DE 50ML CON LA LEVADURA DECANTADA LUEGO DE SER CENTRIFUGADAS POR CINCO MINUTOS. B) CENTRIFUGA UTILIZADA PARA SEPARAR LA LEVADURA DEL MEDIO LIQUIDO DE CULTIVO.	12
FIGURA 4:A) LEVADURA LIOFILIZADA EN TUBO FALCON. B) MEZCLA DE HARINA INTEGRAL DE TRIGO, MAÍZ Y HARINA DE PESCADO MÁS LA LEVADURA. C) PELETIZADORA DE 2MM UTILIZADA PARA LA FABRICACIÓN DEL PELLET UTILIZADO EN EL EXPERIMENTO.	13
FIGURA 5: SISTEMA DE RECIRCULACIÓN CERRADA UTILIZADA PARA LOS 45 DÍAS DE EXPERIMENTACIÓN. EN DONDE LA COLUMNA 1 DE IZQUIERDA A DERECHA CORRESPONDE AL GRUPO CONTROL, LA COLUMNA 2 AL GRUPO TT1 Y LA COLUMNA 3 AL TT2.	14
FIGURA 6: PREPARACIÓN DEL ESTANQUE DE SEDACIÓN CON BZ-20 PARA LA TOMA DE PARÁMETROS BIOMÉTRICOS.	15
FIGURA 7: BALANZA OHAUS UTILIZADA PARA LAS MEDICIONES DE PESO EN TODOS LOS MUESTREOS.	15
FIGURA 8: FOTOGRAFÍA DE EJEMPLAR DE TRUCHA ARCOÍRIS MIENTRAS ERA MEDIDO EN ICTIÓMETRO DURANTE EL MUESTREO DE PARÁMETROS BIOMÉTRICOS.	16
FIGURA 9: GRILLAS CON TUBOS TIPO EPPENDORF ALMACENANDO LAS MUESTRAS DE SANGRE PARA SU POSTERIOR ANÁLISIS, LA GRILLA NARANJA CONTIENE EL SUERO Y LAS MUESTRAS DE SANGRE SIN HEPARINA, MIENTRAS QUE LA GRILLA BLANCA CONTIENE LA SANGRE PARA EL CONTEO EN LA CÁMARA NEUBAUER.	17
FIGURA 10: PARÁMETROS MORFOMÉTRICOS MEDIDOS A TRAVÉS DE LA PLATAFORMA IMAGEJ. DONDE CADA ABREVIATURA CORRESPONDE A LT (LONGITUD TOTAL), LS (LONGITUD ESTÁNDAR), LCR (LONGITUD DE LA CARCASA), ALCR (ALTURA DE LA CARCASA), LC (LONGITUD DE LA CABEZA) Y AC (ANCHO DE LA CABEZA).	19
FIGURA 11: CENTRIFUGA UTILIZADA PARA EL ANÁLISIS DE HEMATOCRITO, JUNTO CON LA MEDICIÓN IN SITU DEL HEMATOCRITO.	20
FIGURA 12: A) CÁMARA NEUBAUER UTILIZADA PARA EL CONTEO DE ERITROCITOS Y LEUCOCITOS CARGADA CON LA SOLUCIÓN DE SANGRE MÁS LA TINCIÓN RESS-ECKER. B) CUADRANTES UTILIZADOS (EN ROJO) PARA EL CONTEO DE ERITROCITOS.	21
FIGURA 13: CUADRANTE UTILIZADO PARA EL CONTEO DE ERITROCITOS (E) Y LEUCOCITOS (L), ADEMÁS SE PUEDEN OBSERVAR LOS TROMBOCITOS (T)	21
FIGURA 14: VARIACIÓN DE TEMPERATURA EN EL SISTEMA DE CULTIVO DURANTE EL PERIODO DE EXPERIMENTACIÓN COMPRENDIDO ENTRE EL 27 DE DICIEMBRE DE 2021 Y 11 DE FEBRERO DE 2022.	25
FIGURA 15: GANANCIA DE PESO DE LOS TRATAMIENTOS Y CONTROL DURANTE EL TIEMPO DE EXPERIMENTACIÓN. TT1: +RHODOTORULA MUCILAGINOSA 10% EN PELLET; TT2: + RHODOTORULA MUCILAGINOSA 5% EN PELLET. EN EL ÚLTIMO TIEMPO, NO SE EVIDENCIAN DIFERENCIAS ENTRE LOS TRATAMIENTOS Y EL CONTROL. (KRUSKAL-WALLIS, P-VALUE = 0,42).	26

FIGURA 16: PROGRESIÓN DE GANANCIA DE TALLA OBTENIDOS PARA AMBOS TRATAMIENTOS Y CONTROL. TT1: +RHODOTORULA MUCILAGINOSA 10% EN PELLET (VERDE); TT2: + RHODOTORULA MUCILAGINOSA 5% EN PELLET (AZUL). PARA EL ÚLTIMO MUESTREO, NO SE EVIDENCIAN DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS DE LA TALLA PROMEDIO DE LOS INDIVIDUOS ENTRE TRATAMIENTOS Y EL CONTROL. (ANOVA DE UNA VÍA, P-VALUE: 0,52)	27
FIGURA 17: RELACIÓN ENTRE EL PESO (G) Y LA TALLA (CM) DE LAS TRUCHAS PARA CADA TRATAMIENTO Y CONTROL. EN LA ZONA SUPERIOR IZQUIERDA SE MUESTRAN EL COEFICIENTE DE DETERMINACIÓN (R ²) Y FUNCIÓN CORRESPONDIENTE DE CADA CURVA.	28
FIGURA 18: TASA ESPECIFICA DE CRECIMIENTO (SGR) PARA CADA TRATAMIENTO A TRAVÉS DEL TIEMPO PARA CADA MUESTREO Y TRATAMIENTO, Y PROMEDIO DE SRG PARA CADA TRATAMIENTO DURANTE TODO EL PERIODO DE EXPERIMENTACIÓN. PARA EL PROMEDIO DE SGR NO SE ENCONTRARON DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS ENTRE TRATAMIENTOS Y CONTROL. (ANOVA DE UNA VÍA, P>0.05)	29
FIGURA 19: FACTOR DE CONDICIÓN DE FULTON (K) PARA CADA TRATAMIENTO A TRAVÉS DEL TIEMPO (MUESTREO), EN DONDE CADA COLUMNA REPRESENTA EL PROMEDIO DEL FACTOR K DE TODOS LOS PECES DE CADA ESTANQUE (TRATAMIENTO).....	30
FIGURA 20: PROGRESIÓN A TRAVÉS DEL TIEMPO DE LAS MEDICIONES MORFOMÉTRICAS REALIZADAS MEDIANTE IMAGEJ PARA CADA GRUPO EXPERIMENTAL. DONDE, LT CORRESPONDE A: LONGITUD TOTAL, LS: LONGITUD ESTÁNDAR, LC: LONGITUD DE LA CABEZA, AC: ALTURA DE LA CABEZA, ALCR: ALTURA DE LA CARCASA, LCR: LONGITUD DE LA CARCASA.	31
FIGURA 21: PROMEDIO DEL CONTEO DE ERITROCITOS (A) Y DE LEUCOCITOS (B) PROVENIENTE DEL ANÁLISIS HEMATOLÓGICO REALIZADO EN CÁMARA NEUBAUER. LAS LÍNEAS ANARANJADAS PERTENECEN A LOS RANGOS ESTÁNDAR SUPERIOR E INFERIOR PROPUESTOS POR ROZAS ET AL., (2015).	33
FIGURA 22: PROMEDIO DE VALORES DE ANÁLISIS HEMATOLÓGICO DE HEMOGLOBINA (BARRAS VERDES) Y HEMATOCRITO (BARRAS AMARILLAS) PARA TODOS LOS GRUPOS EXPERIMENTALES. LAS LÍNEAS ROJAS REPRESENTAN LOS VALORES NORMALES PROPUESTOS POR ROZAS ET AL., (2015).	34
FIGURA 23: PROMEDIO DE LOS ÍNDICES HEMATOLÓGICOS DEL VOLUMEN CORPUSCULAR MEDIO (VCM), CONCENTRACIÓN DE HEMOGLOBINA CORPUSCULAR MEDIA (CHCM) Y LA HEMOGLOBINA CORPUSCULAR MEDIA (HCM) PARA CADA GRUPO EXPERIMENTAL. LAS BARRAS ROJAS CORRESPONDEN A VALORES DE REFERENCIA (ROZAS ET AL., 2015).	35
FIGURA 24: RECUENTO CELULAR DIFERENCIAL LEUCOCITARIO ABSOLUTO, OBTENIDO DESDE EL FROTIS SANGUÍNEO DE LAS TRUCHAS DE CADA GRUPO EXPERIMENTAL. SE IDENTIFICARON TROMBOCITOS, HETERÓFILOS, LINFOCITOS Y MONOCITOS.	36
FIGURA 25: FOTOGRAFÍAS DEL FROTIS SANGUÍNEO DE LA TRUCHA ARCOÍRIS, DONDE, SE IDENTIFICARON CÉLULAS SANGUÍNEAS TALES COMO: A) HETERÓFILO, B) LINFOCITOS, C) ERITROCITOS, D) TROMBOCITO Y E) MONOCITO.	37
FIGURA 26: PORCENTAJE DE ACTIVIDAD ANTI PROTEASA OBTENIDA DESDE EL SUERO SANGUÍNEO DE CADA POOL SANGUÍNEO DE CADA TRATAMIENTO.....	37
FIGURA 27: ACTIVIDAD DE LA ENZIMA LISOZIMA SÉRICA PROVENIENTE DEL POOL SANGUÍNEO DE GRUPO CADA GRUPO EXPERIMENTAL.	38
FIGURA 28 : MUESTRAS DE FILETE DE LOS EJEMPLARES DE MAYOR TAMAÑO UTILIZADOS PARA COMPARAR EL GRADO DE PIGMENTACIÓN GENERADA POR LA LEVADURA.	39

INDICE DE TABLAS

TABLA 1: FACTOR DE CONVERSIÓN ALIMENTICIA PARA TODOS LOS GRUPOS EXPERIMENTALES AL CABO DE 45 DÍAS DE ALIMENTACIÓN.	27
TABLA 2: RESULTADOS DE LA PRUEBA DE HIPÓTESIS E INTERVALO DE CONFIANZA PARA LA PENDIENTE DE LAS 3 CURVAS DE LA RELACIÓN TALLA/PESO PARA LOS TRATAMIENTOS Y CONTROLES.	29
TABLA 3: RELACIONES MORFOMÉTRICAS DE LOS GRUPOS EXPERIMENTALES AL FINAL DEL PERIODO EXPERIMENTAL. LAS MEDICIONES UTILIZADAS PARA LAS RELACIONES FUERON ALCR (ALTURA DE LA CARCASA), LCR (LONGITUD DE LA CARCASA), LT (LONGITUD TOTAL), LS (LONGITUD ESTÁNDAR) Y LC (LONGITUD DE LA CABEZA)	31



RESUMEN

Investigaciones recientes han evidenciado que los hongos marinos poseen características nutricionales importantes como el contenido de aminoácidos y ácidos grasos esenciales, y un alto contenido energético. La utilización de hongos en la alimentación de peces de cultivo con fines nutricionales es reciente y sigue en vías de desarrollo. En este contexto, el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la adición de levaduras marinas del género *Rhodotorula* a la dieta de la Trucha Arcoíris mediante la medición de parámetros de crecimiento y características hematológicas e inmunológicas. El experimento se realizó en el Laboratorio de Piscicultura y Patología Acuática de la Universidad de Concepción, en 6 estanques de 60 L cada uno con 10 peces por estanque, con tratamientos que incluyeron un contenido de 10% (TT1) y 5% (TT2) de levadura en el alimento bajo un régimen de alimentación basal. Se realizaron muestreos biométricos cada 15 días, y el muestreo hematológico e inmunológico el día 45, al finalizar el experimento. Aunque no se evidenciaron diferencias significativas en el promedio de peso y talla entre tratamientos y control, la relación talla-peso indicó que los peces alimentados con la levadura, obtuvieron una condición de crecimiento simétrico, mientras que el control, un crecimiento alométrico negativo. Los resultados de los parámetros hematológicos indicaron un aumento en el conteo de eritrocitos por sobre el valor normal reportado por otros autores en los grupos experimentales, principalmente en el TT2. El hematocrito no presentó diferencias entre los grupos experimentales, mientras que la hemoglobina aumentó significativamente en ambos tratamientos en comparación al Control. El recuento leucocitario fue significativamente mayor en el TT2 en comparación al TT1, en cambio el VCM y la HCM fueron mayores en el TT1. La actividad de la enzima lisozima fue significativamente mayor en el TT2, mientras que la actividad antiproteasa fue similar en los tratamientos y control. Los

resultados de esta investigación indican que la adición de la levadura bajo una condición de alimentación basal no tiene un impacto directo en el crecimiento promedio de la Trucha Arcoíris, no obstante, los mayores tamaños de peces se encontraron en los tratamientos con alimento complementado con la levadura. Además, se encontró que la condición de salud de las truchas fue óptima al final del experimento, aumentando, además, la hematopoyesis leucocitaria y la actividad de la enzima lisozima, promoviendo de esta manera la actividad inmune. Aunque los resultados no son del todo concluyentes, algunos de los parámetros obtenidos sugieren que la adición de levaduras marinas puede transformarse en una alternativa complementaria para la alimentación de peces de cultivo.



1. INTRODUCCIÓN

Aunque en la última década ha habido avances sobre el conocimiento de hongos marinos, aún falta mucho por conocer sobre su rol ecológico, diversidad e interacción con otros organismos (Gutiérrez *et al.*, 2011; Cunliffe *et al.*, 2017; Amend *et al.*, 2019; Grossart *et al.*, 2019). Así, estudios recientes han revelado información relevante, sobre su distribución, abundancia y rol en el ciclo del carbono a través de la biodegradación de polímeros orgánicos provenientes de materia orgánica marina y terrestre (Amend *et al.*, 2019). Por ejemplo, en 2010, se reportó por primera vez una alta biomasa de hongos marinos filamentosos en la columna de agua del ecosistema de surgencia costera, en la zona central de Chile (Gutiérrez *et al.*, 2010), con valores de carbono tan altos como los que presentan los procariontes durante primavera y verano (Gutiérrez *et al.*, 2011). También, se ha propuesto que la acción de hongos parásitos sobre diatomeas puede llegar a ser un factor adicional de control de sus poblaciones y que pueden tener una influencia en las tramas tróficas pelágicas mediante la liberación de zoosporas al medio, las cuales podrían ser depredadas por eslabones tróficos superiores, tales como el zooplancton (Gutiérrez *et al.*, 2016). En este contexto, el análisis de las características bioquímicas de hongos marinos aislados desde el Pacífico Sur-Oriental (Gutiérrez *et al.*, 2020) evidenció que: 1) su valor nutricional es comparable al de otros organismos planctónicos, 2) hongos marinos como *Rhodotorula mucilaginosa* y algunas cepas de *Penicillium* sp. poseen alto contenido energético (4.2 kcal gdw⁻¹) y altas proporciones de carbono (31%), nitrógeno (4%) y moléculas esenciales (aminoácidos como lisina, alanina, treonina, ácidos grasos esenciales como PUFAs y fosfatidilcolina), lo que sugiere la posibilidad de utilizar las características nutritivas de hongos marinos como una alternativa de alimentación en sistemas productivos acuícolas.

Uno de los grandes desafíos de la nutrición de los peces cultivados es mantenerlos en un estado óptimo, no solo en términos de productividad, sino que también, en términos de bienestar animal. El gran crecimiento en la acuicultura en las últimas décadas y la disminución en los desembarques pesqueros anuales, ha provocado un aumento en la demanda de peces cultivados (Sommer, 2009). En Chile, el cultivo de peces salmónidos es una de las áreas productivas que más toneladas produce durante el año, llegando a ocupar el 70% del total de la producción acuícola (Sernapesca, 2020). La Trucha Arcoíris es un pez no nativo, carnívoro y existen variedades que pueden ser cultivadas solo en agua dulce, y esta ocupa el tercer lugar en ámbitos de cultivo en Chile concentrándose en la región de Aysén y Los Lagos (Sernapesca, 2020). Su cultivo se realiza en aguas frías y templadas, en donde alcanzan ciclos de producción de engorde de 10 hasta 12 meses, llegando a pesar entre 350 a 400 gramos dependiendo de la temperatura, densidad de cultivo y técnicas de manejo (FAO, 2014). La intensificación de los sistemas de producción acuícola promueve que en los sistemas de cultivo los peces estén expuestos a factores estresantes como el cambio en las dietas, el cambio en la calidad de agua, las malas prácticas de manejo y transporte, los cambios en la temperatura del agua (Martínez y Fontanillas, 2017), las variaciones en el oxígeno disuelto y cambios en el pH, lo que puede facilitar la aparición de enfermedades en los peces cultivados (Martínez y Fontanillas, 2017 ; Perán, 2020). Es por esto, que en la acuicultura actual se utilizan métodos para contrarrestar estas problemáticas críticas. Una de las soluciones más utilizadas es la adición de antibióticos en el alimento de los peces (Cabello, 2004), sin embargo, se ha plateado que las bacterias, debido a la constante exposición a estos, pueden generar resistencia, lo que puede afectar la productividad de peces y al ambiente, y así, los ciclos naturales de procesamiento de materia orgánica. Los antibióticos pueden acumularse en el ambiente, llegando a persistir entre un 70% y 80% del total utilizado en el cultivo, manteniendo su capacidad antimicrobiana y pudiendo bioacumularse en

determinadas especies (Escalona *et al.*, 2001). Es más, algunos antibióticos tienen un carácter muy tóxico para algunos organismos marinos que se encuentran cercanos a las zonas de cultivo, tales como anfípodos, estrellas de mar y poliquetos, provocando la parálisis del sistema neuromuscular de estos (Escalona *et al.*, 2001). Además, se ha demostrado un flujo de información genética con respecto a la resistencia bacteriana desde el ambiente en donde se desarrolla la acuicultura hacia otras poblaciones bacterianas que pueden provocar enfermedades en otros animales y humanos (Cabello, 2004). Otra alternativa son las vacunas, las cuales se utilizan como prevención, siendo ampliamente utilizadas en distintas partes del mundo, sin embargo, diversos autores sugieren que la dificultad para inmunizar a toda la población de peces, así como también el alto costo que este requiere, en Chile no es una alternativa viable. (Perán, 2020).

En vista de las consecuencias para el ambiente y el sistema productivo del uso de aditivos químicos en la acuicultura y la ineficacia de estos frente a las problemáticas que surgen en el sistema productivo, se han buscado nuevas alternativas más naturales y menos dañinas, como por ejemplo, el uso de aditivos dietéticos con importantes aportes nutricionales y moléculas esenciales que refuercen y potencien ciertas características en los peces como el crecimiento y el sistema inmune, y así mejoren las probabilidades de supervivencia de los animales cultivados (Rondón, 2004; Tukmechi *et al.*, 2011; Awad y Austin, 2010). Como una de las alternativas a la búsqueda de estos aditivos nutritivos se han investigado las capacidades nutritivas y probióticas de diversos tipos de hongos terrestres macroscópicos. Por ejemplo, hongos como *Pleurotus djamor var. roseus* utilizado como suplemento alimenticio para la tilapia *Oreochromis niloticus* (Cruz, 2020) podría traer beneficios en términos de crecimiento de los peces. La adición de este hongo en la dieta permitió también aumentar la sobrevivencia a efectos adversos como la baja de oxígeno, ya que estimula la producción de eritrocitos y hemoglobina, y a enfermedades al aumentar la producción de

linfocitos, mejorando la respuesta inmune de los peces (Cruz, 2020). En otra investigación, el hongo *Pleurotus ostreatus* se utilizó como suplemento alimenticio para la Trucha Arcoíris *Oncorhynchus mykiss*, comprobándose un efecto sobre los parámetros inmuno-hematológicos de las truchas en presencia de la bacteria patógena *Lactococcus garvieae* (Uluköy y Öntaş, 2016). Se ha hecho bastante referencia a capacidades inmunoestimulantes de hongos terrestres en peces y otros organismos (e.g. Uluköy et al., 2016), siendo los más estudiados con estos fines hongos terrestres tales como *Agaricus subrufescens* Peck, *Cordyceps sinensis* (Berk.) Sacc., *Ganoderma lucidum*, *Grifola frondosa* (Dicks.) Gray, *Hericium erinaceus* (Bull.) Pers., *Inonotus obliquus*, *Lentinula edodes*, *Pleurotus ostreatus*, *Trametes versicolor* y *Wolfiporia cocos* (Peck) Ginns (Ruiz et al., 2018).

Existe también evidencia del beneficio de la utilización de levaduras marinas en dietas de larvas de peces (Tovar et al., 2000; Barra et al., 2017). Las levaduras son hongos unicelulares y poseen una importante capacidad de descomponer moléculas orgánicas como hidrocarburos y azúcares mediante enzimas específicas, produciendo diferentes sustancias, las cuales utilizan para desarrollarse (Ochoa y Juárez, 2004). Tovar et al (2000) evaluaron el efecto de la adición de levaduras marinas en la dieta sobre la maduración del tracto digestivo en la fase larval de dos especies de peces de importancia comercial, la Lubina europea (*Dicentrarchus labrax*) y la Cabrilla arenera (*Paralabrax maculatofasciatus*). Los resultados de esta investigación evidenciaron efectos positivos sobre el crecimiento, supervivencia y maduración digestiva, lo que fue atribuido a las poliaminas liberadas por la levadura *Debaryomyces hansenii* (Tovar et al., 2000). En una línea de investigación similar, Barra et al (2017) evidenciaron que la levadura marina *Rhodotorula* sp., puede ser una fuente alternativa de ácidos grasos poliinsaturados, esto se comprobó a través de la adición de esta levadura a la dieta de larvas del pez cebra. La levadura se adicionó bioencapsulada en *Artemia* sp. en estadio de nauplii, de esta manera,

luego de ser alimentadas los peces mostraron una mejoría en el crecimiento y supervivencia. Para evaluar el efecto de la adición de hongos marinos como complemento alimenticio en la dieta de peces de cultivo es necesario contar con indicadores apropiados, como tamaño y tasas de crecimiento, y para el monitoreo del estado de salud de los peces las características hematológicas de estos pueden ser informativas.

La medición y comparación de las propiedades hematológicas, como el conteo de leucocitos o de hemoglobina, es un buen indicador del metabolismo, y la respuesta a cambios debido a estrés en condiciones de cultivo. Así, el conteo total de células sanguíneas puede entregar información del estado de salud de los peces en respuesta a los cambios en la nutrición, deficiencias nutricionales, enfermedades, calidad de agua, entre otros (Fazio, 2016; Wahli, 2002). Además, el análisis en los cambios del perfil sanguíneo, como el conteo total de células sanguíneas, de células blancas, concentración de hemoglobina, y los perfiles de hematocrito, entre otros, pueden evidenciar la respuesta fisiológica de algunos peces ante el estrés por captura y manejo de peces (Tavares *et al.*, 2001). Sin embargo, se debe tener en cuenta de que estos parámetros se ven fuertemente influenciados por diversos factores, tales como, la especie, la temperatura del agua, edad, estrés, fotoperiodo, maduración sexual, género, la manipulación, transporte, densidades de cultivo y enfermedades. Debido a esto, para hacer una correcta interpretación de estos valores, se hace necesario contar con los valores de referencia apropiados propios de la especie como los demostrados por Rodríguez (1995).

Otro parámetro importante para monitorear la salud de los peces es el sistema inmune, este es un factor importante en todos los vertebrados, ya que permite la supervivencia de los individuos ante agentes infecciosos y mantener sus funciones corporales en el medio ambiente. La respuesta inmune en peces está bien desarrollada, aunque, puede verse afectada cuando las condiciones de salud del individuo son deficientes (Rodríguez, 2016). Factores tanto intrínsecos

inherentes a la especie; como la edad, el tamaño, el estado de desarrollo, condiciones de salud, entre otros, como extrínsecos; como la condición del agua en términos de temperatura, los cambios de estación, entre otros, influyen directamente sobre la respuesta inmune. Estos factores generan un efecto de estrés en los peces, quienes si bien poseen capacidades para poder contrarrestar estos factores, cuando esto no es suficiente, se genera una respuesta negativa en términos de respuesta inmunológica llegando incluso a suprimirla (Olabuenaga, 2000).

El sistema inmune, puede ser dividido en dos: Sistema de Defensa innato, natural o inespecífico y Sistema Inmune adquirido o específico. En el sistema de defensa innato, el cual es un sistema de defensa propio del organismo, participan componentes celulares y humorales. Mientras que el adquirido funciona mediante la generación de anticuerpos a través del reconocimiento de un antígeno y también participan agentes celulares. El sistema inmune innato, es de primordial importancia en la respuesta inmune en peces y se puede dividir en tres componentes, la barrera epitelial o mucosa, los mediadores solubles y las células fagocíticas como los macrófagos y granulocitos. La primera, es una de las más importantes en la respuesta inmediata en los peces, ya que esta proporciona una barrera defensiva entre el pez y el ambiente. Los mediadores solubles y las células son la primera respuesta ante la infección de algún microorganismo patógeno, donde destacan la enzima lisozima y la proteína α -antiproteasa, entre otras (Olabuenaga, 2000; Rodriguez, 2016). La lisozima es una enzima mucolítica con propiedades antimicrobianas y ha sido detectada en el suero, el mucus y en otros tejidos ricos en leucocitos, como el riñón, el bazo y el intestino, tanto en peces de agua de mar como de agua dulce (Lie *et al* 1989). Su función radica en la catálisis de la hidrolización de la pared celular de bacterias, principalmente Gram positivas (Colona *et al.*, 2013)

En vista de las problemáticas actuales en la acuicultura nacional y considerando las potenciales propiedades nutritivas que pueden tener algunos hongos marinos

(Gutiérrez *et al.*, 2020; Vera, 2019) y los desafíos en la nutrición de los peces que enfrentan los sistemas acuícolas, en esta investigación se analizó el efecto de levaduras marinas como aditivo alimenticio sobre el crecimiento y la salud de la Trucha Arcoíris en condiciones de cultivo.

Pregunta científica

¿Cuál es el efecto de añadir levaduras marinas como complemento alimenticio sobre el crecimiento de la Trucha Arcoíris y sus características hematológicas en condiciones de cultivo?

- **Hipótesis 1:** La adición de levaduras marinas, como complemento alimenticio en la dieta de la Trucha Arcoíris aumentará la tasa de crecimiento de esta en un sistema de cultivo experimental.
- **Hipótesis 2:** La adición de levaduras marinas en la alimentación de la Trucha Arcoíris tendrá un impacto positivo sobre la condición de salud del pez, evidenciado a través de cambios en los parámetros hematológicos e inmunológicos de los peces en sistemas de cultivo experimental.

Objetivo general

Evaluar el efecto de la adición de las levaduras marinas a la dieta de la Trucha Arcoíris sobre los parámetros de crecimiento y sanguíneos en condiciones de cultivo.

- **Objetivo específico 1:** Evaluar el crecimiento de las truchas alimentadas con el suplemento fúngico mediante parámetros biométricos.

Objetivo específico 2: Analizar el efecto del suplemento de levaduras marinas sobre las características hematológicas e inmunológicas de la Trucha Arcoíris.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Cultivo y crecimiento de la cepa de levadura a utilizar.

Se cultivó una cepa de *Rhodotorula mucilaginosa* aislada desde aguas profundas cerca de Isla de Pascua, obtenida desde el laboratorio de Geoquímica Orgánica Marina (GOM) del Departamento de Oceanografía de la Universidad de Concepción.

2.1.1 Cultivo medio sólido

El crecimiento de la levadura se realizó inicialmente en un medio de cultivo sólido preparado a partir de 40g de Glucosa, 5g de Peptona, 20 g de Agar y 5 g de extracto de levadura. Una vez preparado y solidificado el medio se procedió a sembrar la levadura en un gabinete de bioseguridad previamente esterilizado con luz UV. Con un asa, se extrajeron pequeñas cantidades de levadura desde un cultivo del cepario del laboratorio GOM, y con movimientos suaves se esparció a través de toda la placa, luego cada placa fue sellada con Parafilm, posteriormente, se dejaron incubar a 20°C por 5 días.

2.1.2 Medio líquido de cultivo

Se preparó a partir de 8g de Glucosa, 1.92 g de sulfato de magnesio (MgSO₄), 0.8 g de extracto de levadura y 0.968 g de buffer TRIS (Figura 1), y se adicionó a 800 mL de agua de mar filtrada por 0.22 micrómetros en un matraz Erlenmeyer de 1000 mL. Para evitar el crecimiento de otros organismos el medio líquido se autoclavó por 30 minutos a 115°C (Figura 2A), una vez frío se inoculó el medio de cultivo, esto se realizó extrayendo con un asa toda la biomasa de levadura generada en las placas, esta luego se diluyó en 40 mL de agua mili-Q en un tubo Falcon de 50 mL y se mezcló bien para homogeneizar. Con una micropipeta se tomaron 12 mL y se añadieron al medio de cultivo líquido. Por cada placa Petri se inocularon 4 matraces con 800 mL de medio líquido. Terminada la inoculación

los matraces fueron puestos en una cámara de incubación con agitador por 7 días a 100rpm. Este proceso se repitió durante varias semanas hasta obtener la cantidad de biomasa requerida para la creación del alimento. Luego de los 7 días de incubación (Figura 2B), las levaduras fueron separadas desde el medio líquido mediante la centrifugación en tubos Falcon de 50mL (Figura 3A), en una centrífuga (Figura 3B) a 3000rpm, durante 5 minutos a 20°C. Una vez extraída toda la levadura se procedió a liofilizar para su posterior uso (Figura 4A). Los valores nutricionales y características bioquímicas de la levadura utilizada se obtuvieron de Gutiérrez *et al* (2020).

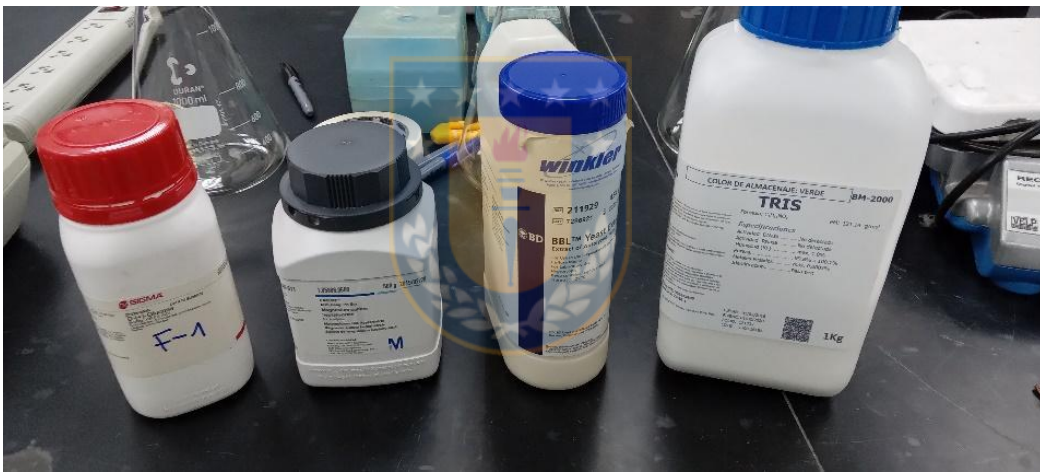


Figura 1: Reactivos utilizados para la preparación del medio líquido de cultivo.



Figura 2: A) Matraces Erlenmeyer de 1000 mL con 800 mL de medio de cultivo líquido luego de ser autoclavados, previo a la inoculación. 2B) Matraz Erlenmeyer con 800 mL de medio de cultivo líquido luego de ser inoculado con *Rhodototura* sp.

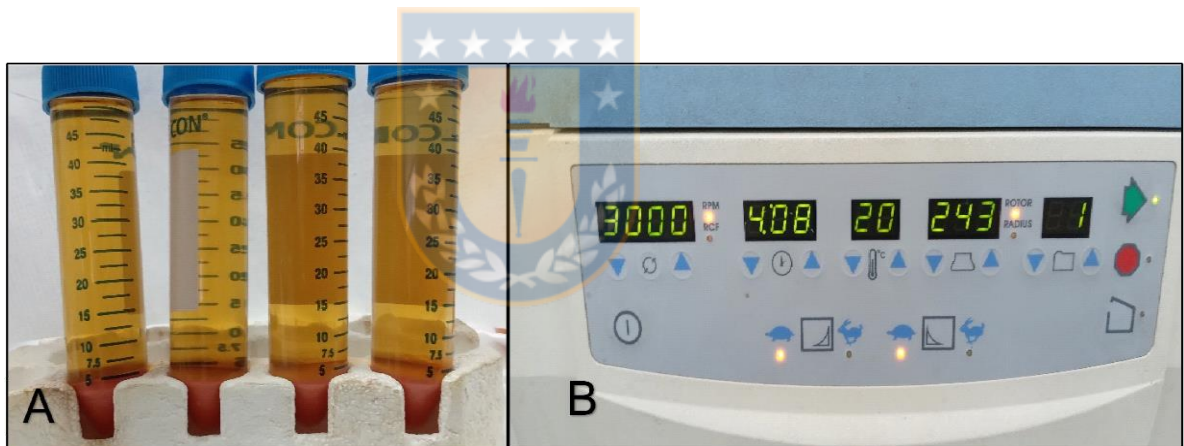


Figura 3: A) Tubos Falcon de 50mL con la levadura decantada luego de ser centrifugadas por cinco minutos. B) Centrifuga utilizada para separar la levadura del medio líquido de cultivo.

2.2. Preparación de la matriz de alimento

El alimento fue preparado en la piscicultura Pangué ubicada en la ruta a la comuna de Florida, región de Biobío, en 2 oportunidades. Se preparó el alimento en base a una matriz de harina integral de trigo (25%), harina integral de maíz (25%) y harina de pescado (50%), se adicionó la levadura en un 5 y 10% del total de alimento a crear y se mantuvo alimento sin levadura a modo de Control (Figura

4B), mediante una peletizadora para tamaño de 2 mm de diámetro (Figura 4C). El proceso de aceitado del alimento se realizó manualmente con un pulverizador, añadiendo a toda la mezcla 15 veces el aceite de pescado para luego mezclar con la mano, este procedimiento fue realizado para las dietas control y de tratamientos por igual.

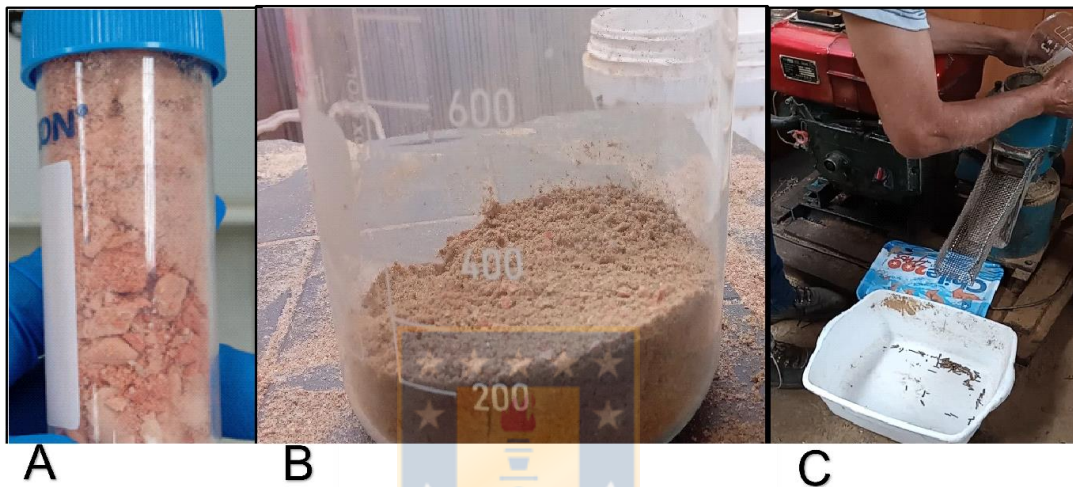


Figura 4: A) Levadura liofilizada en tubo Falcon. B) Mezcla de harina integral de trigo, maíz y harina de pescado más la levadura. C) Peletizadora de 2mm utilizada para la fabricación del pellet utilizado en el experimento.

2.3. Prueba de palatabilidad

Se consideró un periodo de aclimatación al tamaño del alimento de 3 días previos al comienzo de la experimentación, añadiendo raciones bajas de alimento para comprobar así que los peces se alimentaban de ella. La evaluación se realizó de manera visual, en donde adicionando pequeñas cantidades del pellet se verificó que los peces se alimentaran del pellet y que este no provocaba un rechazo en los peces.

2.4. Peces

Se utilizaron 60 ejemplares de *Oncorhynchus mykiss* en estadio juvenil, en buena condición física, con un peso promedio de 17.54 ± 0.3 g y una talla promedio de

11.48±0.07 cm, los cuales fueron obtenidos del Laboratorio de Piscicultura y Patología Acuática (LPPA) del Departamento de Oceanografía UdeC. Estos fueron dispuestos en grupos de a 10 en 6 estanques de cultivos de recirculación de 60 L cada uno. El sistema de recirculación utilizado posee 5 columnas de 3 estanques cada una, en donde cada columna es independiente. Cada sistema estaba conectado a un sistema de filtros, consistiendo en un filtro mecánico denominado “napa”, un biofiltro y finalmente un filtro UV, para luego mediante una bomba de presión volver al sistema (Figura 5). La temperatura es Controlada y mantenida mediante enfriadores de la marca SUNSUN. Los peces fueron alimentados durante 45 días 2 veces por día a una ración del 1% de la biomasa total de cada estanque. La comida fue dosificada diariamente con una balanza electrónica marca Winkler modelo Revel con una precisión del 0.1 g. Todos los procedimientos realizados con los peces fueron regulados mediante un protocolo de manejo y cuidado de peces del LPPA.



Figura 1: Sistema de recirculación cerrada utilizada para los 45 días de experimentación. En donde la columna 1 de izquierda a derecha corresponde al grupo Control, la columna 2 al grupo TT1 y la columna 3 al TT2.

2.5. Toma de muestras

2.5.1 Parámetros biométricos

El registro de parámetros biométricos fue realizado cada 15 días durante la mañana, previo a la primera alimentación. Para el muestreo se sedó mediante inmersión con 1.3 mL de Benzocaína 20% (BZ-20) en un recipiente con 10 a 12lts de agua de su propio estanque con oxigenación constante (Figura 6). Además, se preparó un balde de recuperación en donde se depositaban los peces una vez medidos, para luego ser devueltos a sus respectivos estanques.

Cada peso fue registrado mediante una balanza de la marca OHAUS modelo Valor3000XtremeW (V31XW3) con precisión de 0.5 g (Figura 7). Una vez pesados se midió cada pez mediante un ictiómetro con precisión de 0,1 cm y además se fotografió a cada uno en el ictiómetro (Figura 8).

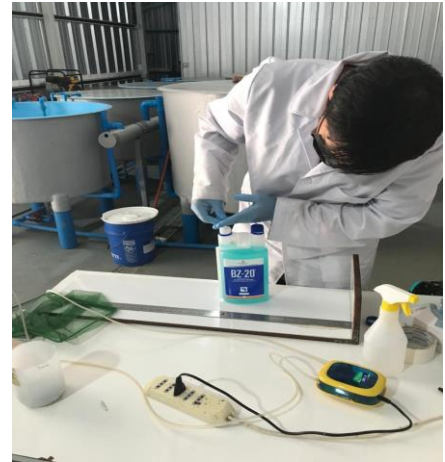


Figura 2: Preparación del estanque de sedación con BZ-20 para la toma de parámetros biométricos.



Figura 3: Balanza Ohaus utilizada para las mediciones de peso en todos los muestreos.



Figura 8: Fotografía de ejemplar de Trucha Arcoíris mientras era medido en ictiómetro durante el muestreo de parámetros biométricos.

2.5.2 Parámetros hematológicos

La toma de parámetros hematológicos se realizó posterior al último día de alimentación, para esto, se sacrificaron a los ejemplares mediante una sobredosis de BZ-20, una vez los peces estuvieron muertos se pesaron, midieron y fotografiaron. Las extracciones sanguíneas se realizaron mediante venopunción de la vena caudal con una jeringa de 3 mL sin heparina. Se obtuvo la sangre de los 5 peces de mayor peso por estanque, esto se realizó debido a la dificultad para la obtención de la cantidad de sangre necesaria para poder realizar los análisis en peces de pequeño tamaño. Posteriormente, la sangre se almacenó por separado en tubos tipo Eppendorf de 1.5 mL con 2 gotas de Heparina, cada uno debidamente rotulados. Los peces faltantes fueron utilizados para crear un pool sanguíneo para el posterior análisis inmunológico, esta sangre fue almacenada en tubos tipo Eppendorf de 1.5 mL sin heparina debidamente rotulados, se dejó sedimentar y se extrajo el suero sobrenadante para ser almacenados en tubos Eppendorf de 2 mL. Ambas muestras (sangre y suero) fueron almacenadas a 4°C y a -15°C, respectivamente (Figura 9).



Figura 9: Grillas con tubos tipo eppendorf almacenando las muestras de sangre para su posterior análisis, la grilla naranja contiene el suero y las muestras de sangre sin heparina, mientras que la grilla blanca contiene la sangre para el conteo en la cámara Neubauer.

Adicionalmente, a los individuos de mayor tamaño de cada estanque se les extrajo una muestra de músculo para analizar visualmente si hubo un cambio de coloración por efecto del complemento de levadura (Figura 25). También, se realizaron 2 frotis sanguíneos por muestra de sangre realizando en total 60 frotis sanguíneos. Estos fueron teñidos mediante una tinción May-Grünwald Giemsa.

2.6. Estimación de parámetros de crecimiento

2.6.1 Ganancia de Peso

La ganancia de peso se obtuvo mediante la siguiente fórmula:

$$GP = PF - PI \text{ (Cruz, 2020).}$$

PF y PI corresponden al peso promedio final e inicial respectivamente.

2.6.2 Ganancia de Talla

La ganancia de talla se obtuvo mediante la fórmula:

$$GT = TF - TI \text{ (Cruz, 2020)}$$

TF y TI corresponden a la talla promedio final e inicial, respectivamente.

2.6.3 Tasa Específica de Crecimiento

Esta es una medida del aumento de peso corporal porcentual por día, la cual se estimó mediante la fórmula:

$$TEC (\%) = ((Ln (PF) - Ln (PI) \times 100) / t \text{ (Cruz, 2020)}).$$

PF y PI corresponde al peso promedio final e inicial, t es el tiempo y Ln es el logaritmo natural.

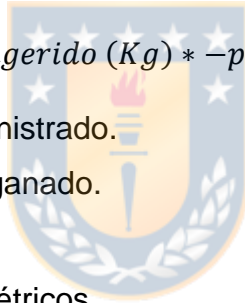
2.6.4 Factor de conversión de alimento

Definido como los gramos de alimento consumido, por cada gramo de peso corporal ganado.

$$\text{Alimento ingerido (Kg)} * -\text{peso ganado (Kg)} **$$

*Como alimento seco suministrado.

** Peso fresco o húmedo ganado.



2.7. Parámetros morfométricos

Durante todos los muestreos se tomaron fotografías con una cámara fotográfica desde el mismo ángulo y distancia a todos los peces muestreados. Cada fotografía fue procesada mediante el programa ImageJ, y se tomaron las siguientes medidas: Longitud Total (LT), Longitud Estándar (LS), Longitud de la cabeza (LC), Ancho de la Cabeza (AC), Longitud de la Carcasa (LCR), Altura de la Carcasa (ALCR). Figura 10.

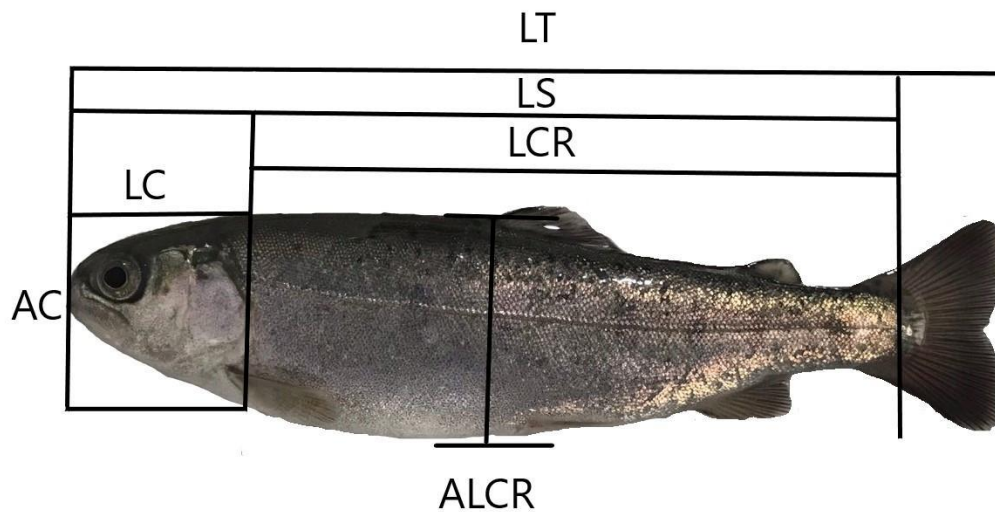


Figura 10: Parámetros morfométricos medidos a través de la plataforma ImageJ. Las abreviaturas corresponden a LT: Longitud total, LS: Longitud estándar, LCR: Longitud de la carcasa, ALCR: Altura de la carcasa, LC: Longitud de la cabeza y AC: Ancho de la cabeza.

2.8. Parámetros hematológicos:

2.8.1 Eritrograma

- I. Hematocrito o VGA (Volumen globular aglomerado): Se utilizó el método estándar del centrifugado de tubos de micro hematocritos. En donde cada tubo capilar de micro hematocrito se centrifugo a 12.000g por 5 minutos (Figura 11). (Valenzuela *et al.*, 2002; Rozas *et al.*, 2015)

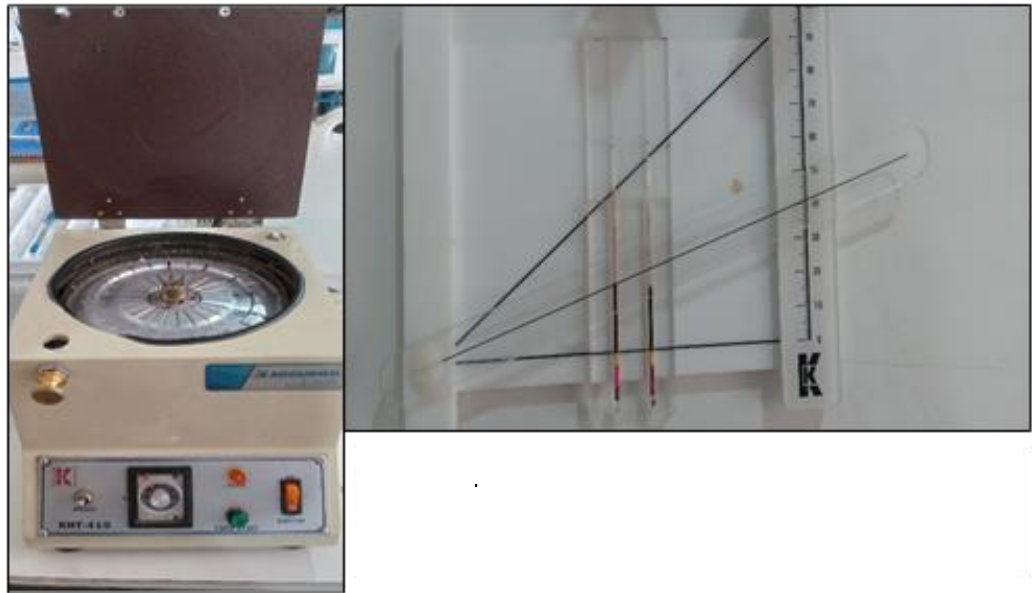


Figura 11: Centrifuga utilizada para el análisis de hematocrito, junto con la medición in situ del hematocrito.

Recuento total eritrocitos: Para el conteo de eritrocitos se preparó una dilución 1:100 de la sangre con una tinción Röss-Ecker. De cada muestra sanguínea se obtuvieron 10 μL y se depositaron en un tubo tipo Eppendorf de 2 mL con 1 mL de la solución Röss-Ecker. Se descargaron 8 μL de la solución en una cámara de Neubauer y se dejó sedimentar por 3 minutos (Figura 12A), para el conteo mediante un microscopio se tomaron en cuenta los 4 cuadrados de las esquinas y el cuadrado central de la cámara en rojo (Figura 12B). El número obtenido en los 5 cuadrantes se multiplicó por 10.000 para calcular el recuento total de glóbulos rojos por microlitro de sangre (Figura 13; Valenzuela *et al.*, 2002)



Figura 12: A) Cámara Neubauer utilizada para el conteo de eritrocitos y leucocitos cargada con la solución de sangre más la tinción Res-Ecker. B) Cuadrantes utilizados (en rojo) para el conteo de eritrocitos.

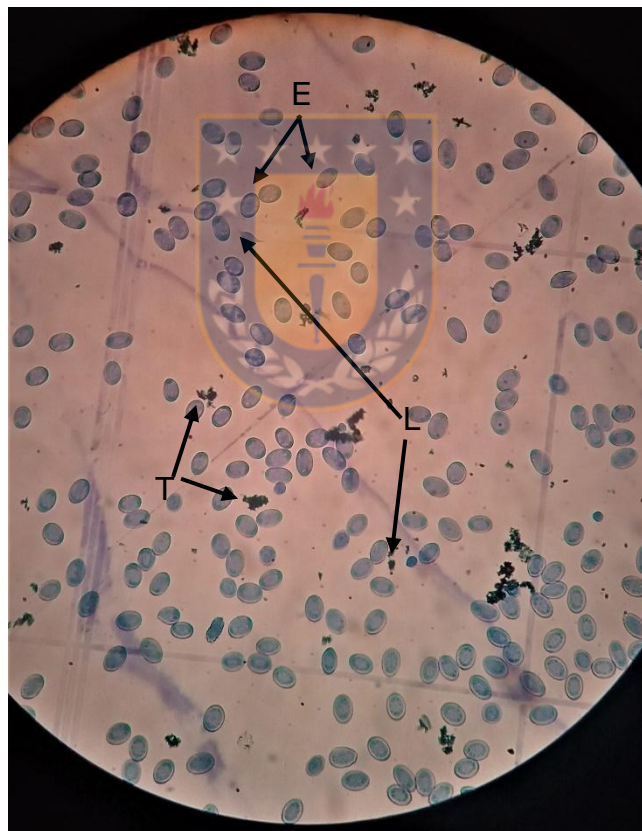


Figura 13: Cuadrante utilizado para el conteo de Eritrocitos (E) y Leucocitos (L), además se pueden observar los trombocitos (T)

- II. Concentración de hemoglobina: La concentración de hemoglobina se obtuvo a través del método de la cianometahemoglobina. (Valenzuela *et al.*, 2002; González *et al.*, 2015; Rozas *et al.*, 2015)

2.8.2 Leucograma

- I. Recuento total de Leucocitos: El recuento total de Leucocitos (Figura 13) se realizó mediante la solución Riss-Ecker 1:100 preparada para el conteo de eritrocitos, para esto se tomaron en cuenta los cuatro cuadrantes externos de la cámara de Neubauer (Figura 12B). A este número se le sumo el 10% y se multiplico por 200.
- II. Conteo diferencial de leucocitos: Se obtuvo un diferencial de leucocitos a partir de los frotis sanguíneos con tinción May-Grünwald Giemsa.

2.8.3 Índices Hemáticos

Los índices hemáticos fueron calculados a través de las siguientes ecuaciones:

- I. Volumen Corpuscular Medio (VCM):

$$VCM (fl) = Hematocrito * 10^{15} / Eritrocitos * 10^{12}$$

- II. Hemoglobina Corpuscular Media (MHC)

$$HCM (pg) = Hemoglobina * 10 / Eritrocitos$$

- III. Concentración de Hemoglobina Corpuscular Media (CHCM)

$$CHCM (gdL^{-1}) = Hemoglobina * 100 / Hematocrito$$

2.9. Parámetros inmunológicos

2.9.1 Actividad enzima Lisozima

La actividad de lisozima de los sueros se determinó usando el método basado en la habilidad de la lisozima para lisar la bacteria *Micrococcus lysodeikticus* (Ellis, 1990). En una placa de 96 pocillos (Costar, EE.UU.), se mezclaron 50 μ L de muestra de suero en 10 diluciones seriadas $1/4$ en tampón fosfato 0.05 M, pH 6.2 con 100 μ L de una suspensión de *M. lysodeikticus* a una concentración de 0.4

mg mL⁻¹ (Sigma, EE.UU.) en tampón fosfato. Las muestras se incubaron a 22°C y se midió la absorbancia a 450 nm a los 0, 5,10,15,20,25,30,35,40,45,50,55 y 60 min. Para la curva de calibración las muestras de suero se reemplazaron por lisozima de huevo de pollo (Sigma, EE.UU.). Se realizaron diluciones seriadas 1/2 comenzando por 10 µg mL⁻¹ de lisozima. Para el Control negativo el suero se reemplazó por tampón fosfato. Se consideró como una Unidad (U) de lisozima la variación de 0.001 unidades de absorbancia en un minuto. Las unidades de lisozima de los patrones y de las muestras se determinaron dividiendo la pendiente de la curva ΔDO450nm vs t (min) (en su intervalo lineal) por 0.001. Se hizo la curva de calibración de U lisozima vs µg mL⁻¹ de lisozima donde se interpolaron las unidades de actividad enzimática de las muestras para determinar su concentración. Los resultados se expresaron como U de lisozima por gramo de tejido.

2.9.2 Actividad anti proteasa

Para determinar la actividad anti proteasa en las muestras de suero, se siguió el método descrito por Magnadottir *et al* (1999). Se incubaron 20 µL de suero con igual volumen de una solución estándar de tripsina 5 mg mL⁻¹ (Sigma, EE.UU.) a 22°C durante 10 min. Posteriormente se le adicionaron 200 µL de tampón fosfato 0,1 M pH 7,0 y 250 µL de azocaseína 2% (p/v) (Sigma, EE.UU.) y la mezcla se incubó por 1 h a 22°C. Luego se le adicionaron 500 µL de TCA 10% (v/v) y se incubó a 22°C durante 30 min. La mezcla se centrifugó a 6000g por 5 min. El sobrenadante (100 µL) se transfirió a una placa de 96 pocillos (Costar, EE.UU.) que contenía 100 µL/pocillo de NaOH 1N. La absorbancia se leyó a 450nm en un lector de ELISA (TECAN, Sunrise, Austria). Como Control (100% de actividad de tripsina) se reemplazó la muestra por tampón fosfato y para el Control negativo se reemplazaron la muestra y la tripsina por tampón fosfato. El porcentaje de inhibición de la actividad de tripsina de cada muestra se calculó comparando con

la muestra Control con 100% de actividad de tripsina. Todas las muestras se analizaron por duplicado.

2.10. Análisis estadístico

El análisis estadístico para evaluar diferencias entre los grupos experimentales se realizó utilizando la plataforma R Studio. Se utilizaron diferentes pruebas paramétricas y no paramétricas según el cumplimiento o no de las condiciones de normalidad y homocedasticidad para cada conjunto de observaciones, utilizando pruebas como ANOVA de una vía, Kruskal-Wallis y pruebas de confirmación como TukeyHSD.



3. RESULTADOS

3.1. Condiciones de cultivo

Se observaron variaciones en las condiciones de temperatura durante el día, así la temperatura media durante el periodo de la mañana fue de $13.78 \pm 0.91^\circ\text{C}$, mientras que, en la tarde, esta fue de $16.19 \pm 1.01^\circ\text{C}$. También se observaron variaciones entre días (Figura 14).

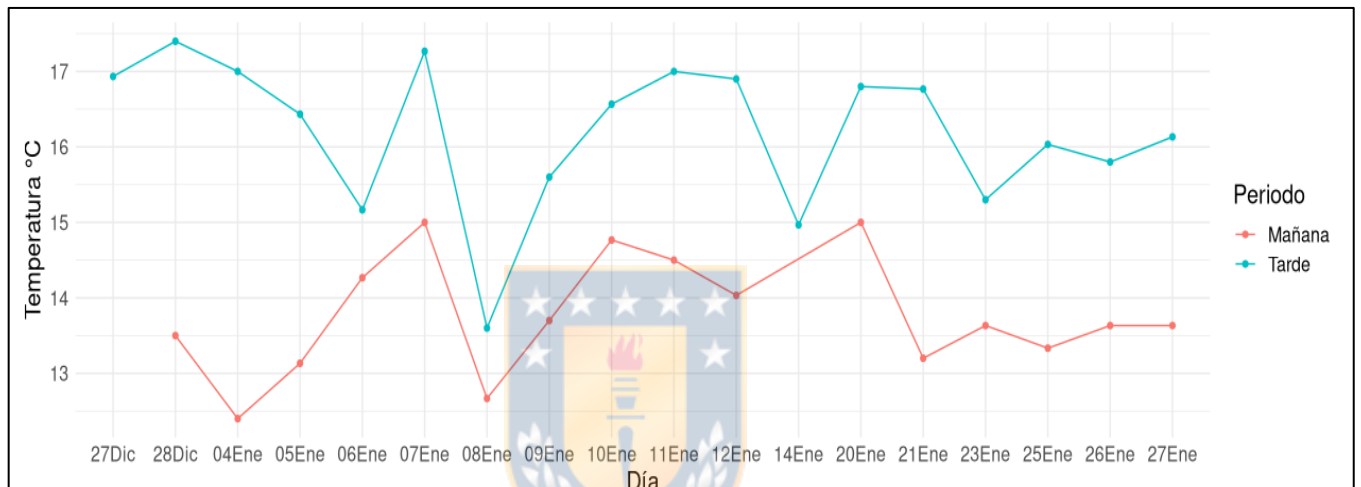


Figura 14: Variación de temperatura en el sistema de cultivo durante el periodo de experimentación comprendido entre el 27 de diciembre de 2021 y 11 de febrero de 2022.

3.2. Análisis de crecimiento en talla y peso de los peces

3.2.1 Peso

Los resultados obtenidos para la ganancia de peso evidenciaron un aumento progresivo del peso promedio de los peces en cada tiempo de muestreo para ambos Tratamientos y el Control, mostrando diferencias significativas (Kruskal-Wallis, $p < 0.05$) entre el primer y el último muestreo. Los valores fluctuaron desde 17-18 g para el día 1, hasta 27-30 g para el día 45 (Figura 15). Además, al cabo de 45 días de experimentación, no se encontraron diferencias significativas ($p > 0,05$) en el aumento de biomasa promedio en los tratamientos con respecto

al control. No obstante, los dos Tratamientos presentaron una mayor dispersión de los datos con respecto al Control, lo que se ve reflejado en el aumento de la varianza, siendo más evidente para el TT2 (Figura 15).

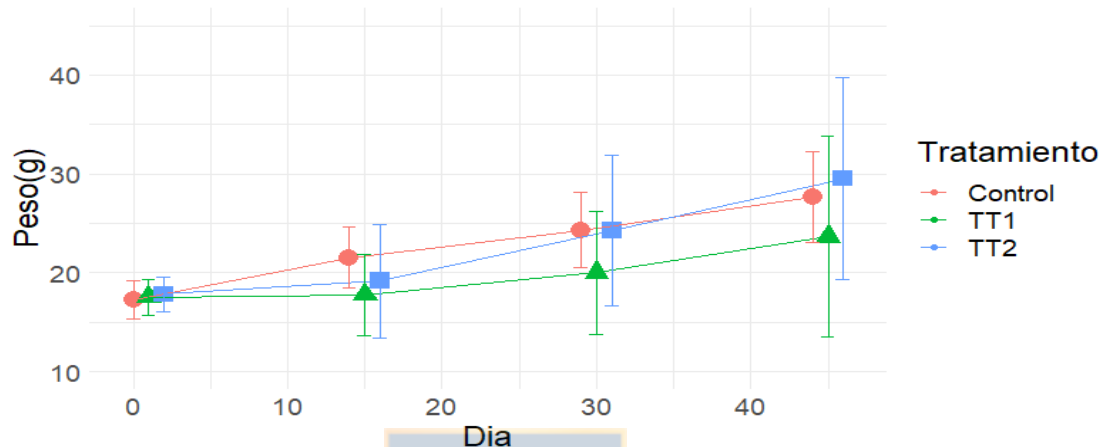


Figura 15: Ganancia de peso de los Tratamientos y Control durante el tiempo de experimentación. TT1: +Rhodotorula mucilaginosa 10% en pellet; TT2: + Rhodotorula mucilaginosa 5% en pellet. En el último tiempo, no se evidencian diferencias entre los Tratamientos y el Control. (Kruskal-Wallis, p-value = 0,42).

3.2.2 Talla

Los resultados obtenidos para la ganancia de talla muestran un aumento progresivo del tamaño promedio de los peces alimentados con dieta de todos los tratamientos, incluido el control, existiendo diferencias significativas entre el primer (día 1) y último (día 45) muestreo, fluctuando desde 11cm hasta 14 cm. Además, para el último muestreo no se encontraron diferencias significativas ($p > 0,05$) del promedio de la talla entre los grupos experimentales (Tabla 2), sin embargo, se aprecia un valor promedio mayor (14 cm) en el TT2 en comparación al Control y el TT1 (Figura 16). También en la etapa final de la experimentación se observó un aumento de la dispersión de los datos en el TT2 en comparación al Control y TT1 en el mismo periodo de tiempo (Figura 16)

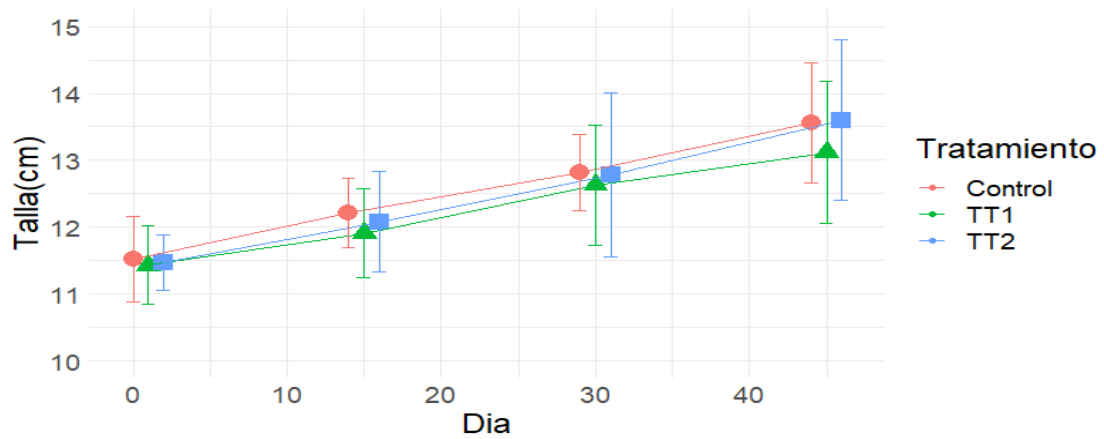


Figura 16: Progresión de ganancia de talla obtenidos para ambos Tratamientos y Control. TT1: +Rhodotorula mucilaginosa 10% en pellet (verde); TT2: + Rhodotorula mucilaginosa 5% en pellet (azul). Para el último muestreo, no se evidencian diferencias significativas de la talla promedio de los individuos entre Tratamientos y el Control. (ANOVA de una vía, p-value: 0,52)



3.2.3 Factor de conversión alimenticia

A continuación, en la Tabla 1 se presenta el factor de conversión alimenticia (FCA) calculado para todos los grupos experimentales, donde se observa que el tratamiento con el menor FCA fue el TT2, mientras que el mayor índice de FCA se observa en el TT1.

Tabla 1: Factor de conversión alimenticia para todos los grupos experimentales al cabo de 45 días de alimentación.

Tratamiento	Biomasa inicial (Kg)	Biomasa final (Kg)	Biomasa ganada (Kg)	Alimento administrado (Kg)	FCA
Control	0.345	0.491	0.146	0.227	1.554
TT1	0.350	0.440	0.124	0.231	2.221
TT2	0.356	0.52	0.164	0.235	1.433

3.2.4 Relación Peso y Talla

A partir de los datos de Peso y Talla, se realizaron las curvas de crecimiento que representan la relación entre la Longitud y el Peso de cada Tratamiento (Figura 16). Se ajustó un modelo potencial a cada curva, la función con la menor pendiente corresponde al Control ($P = a \cdot L^{2.3705}$, $R^2 = 0.712$), seguido del TT1 ($P = a \cdot L^{2.8106}$, $R^2 = 0.8189$) y finalmente la de mayor pendiente corresponde al TT2 ($P = a \cdot L^{2.9533}$, $R^2 = 0.8309$). Los datos representados corresponden a todos los recolectados ($n=240$) durante los 4 muestreos en los 45 días de experimentación.

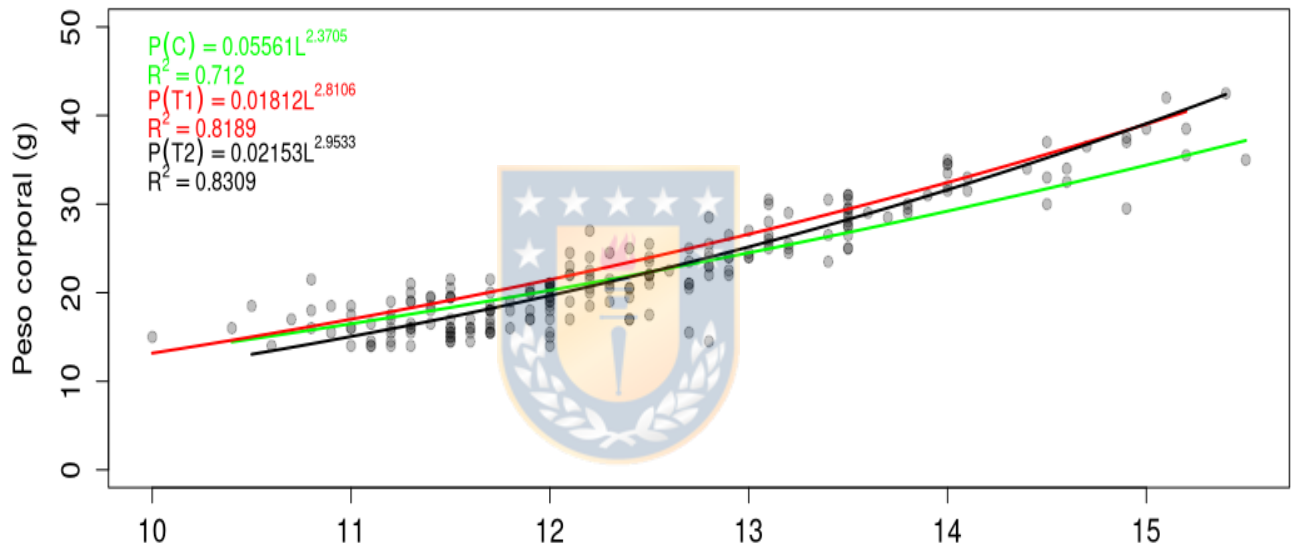


Figura 5: Relación entre el Peso (g) y la Talla (cm) de las truchas para cada Tratamiento y Control. En la zona superior izquierda se muestran el coeficiente de determinación (R^2) y función correspondiente de cada curva.

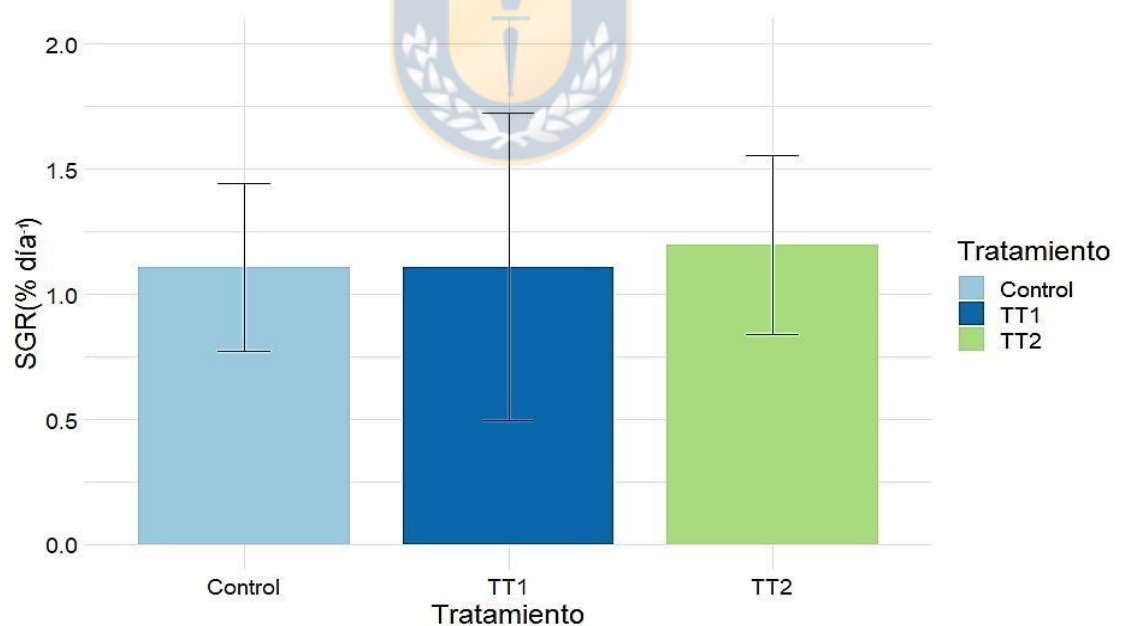
La pendiente obtenida para todos los grupos experimentales fue menor a 3, sin embargo, estadísticamente, solo el control mostró una pendiente significativamente diferente de 3. (Tabla 2).

Tabla 2: Resultados de la prueba de hipótesis e intervalo de confianza para la pendiente de las 3 curvas de la relación talla/peso para los Tratamientos y Controles.

Tratamiento	Pendiente	Std. Error	P-value
Control	2.37	0.17	0.0005
TT1	2.81	0.17	0.26
TT2	2.95	0.16	0.77

3.2.5 Tasa de crecimiento específica

La tasa de crecimiento específica (SGR) fue obtenida para cada grupo experimental (Figura 18). El SGR tomando en cuenta el inicio y el final del periodo experimental, si bien es más alto en el TT2, no presenta diferencias significativas entre los grupos experimentales ($p > 0.05$).



Elaboracion propia

Figura 18: Tasa específica de crecimiento (SGR) para cada Tratamiento a través del tiempo para cada muestreo y Tratamiento, y promedio de SGR para cada Tratamiento durante todo el periodo de experimentación. Para el promedio de SGR no se encontraron diferencias significativas entre Tratamientos y Control. (ANOVA de una vía, $p > 0.05$)

3.2.6 Factor de condición de Fulton

Se obtuvo además el factor de condición de Fulton (K) para cada Tratamiento, considerando cada muestreo realizado (Figura 19). No existen diferencias significativas entre los promedios del factor de condición K para ningún tiempo (ANOVA, $p > 0.05$).

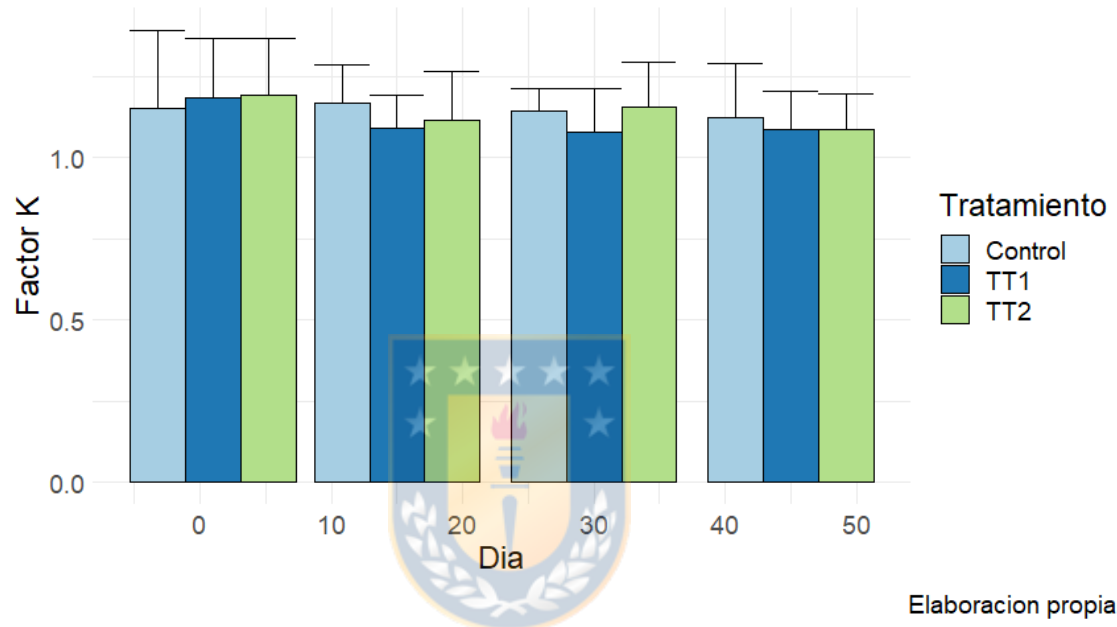


Figura 19: Factor de condición de Fulton (K) para cada Tratamiento a través del tiempo (muestreo), en donde cada columna representa el promedio del factor K de todos los peces de cada estanque (Tratamiento).

3.3. Morfometría

Los valores de las mediciones morfométricas evidenciaron un aumento en los parámetros evaluados a través de los muestreos en relación al inicio del periodo experimental, encontrándose diferencias significativas entre el primer y último muestreo (Figura 20). Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas para el promedio de las mediciones de los Tratamientos en comparación al Control. Además, se calculó la relación entre las variables morfométricas (Tabla 3), las cuales no presentaron diferencias significativas entre tratamientos.

Tabla 3: Relaciones morfométricas de los grupos experimentales al final del periodo experimental. Las mediciones utilizadas para las relaciones fueron ALCR (Altura de la Carcasa), LCR (Longitud de la Carcasa), LT (Longitud Total), LS (Longitud Estándar) y LC (Longitud de la Cabeza)

Relaciones morfométricas	Control		TT1		TT2	
	Promedio	SD	Promedio	SD	Promedio	SD
ALCR/LCR	0.280	0.013	0.273	0.024	0.270	0.026
LCR/LT	0.810	0.011	0.805	0.011	0.811	0.015
ALCR/LT	0.226	0.010	0.220	0.020	0.219	0.022
LC/LS	0.216	0.012	0.223	0.014	0.218	0.017

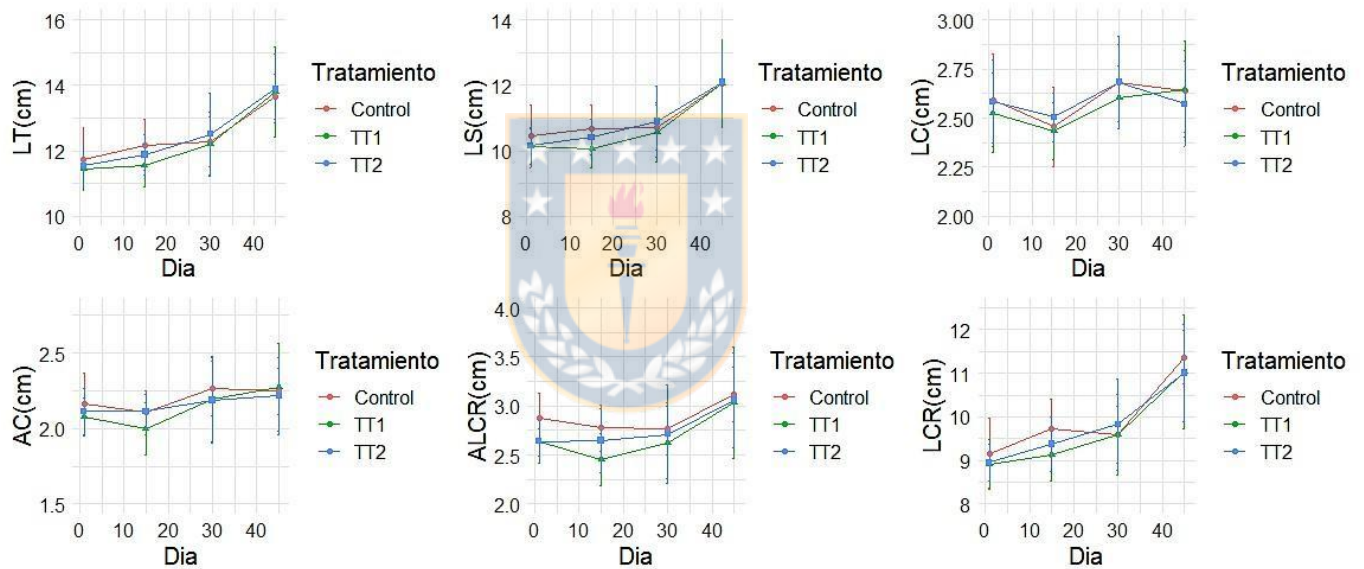


Figura 6: Progresión a través del tiempo de las mediciones morfométricas realizadas mediante ImageJ para cada grupo experimental. Donde, LT corresponde a: Longitud total, LS: Longitud estándar, LC: Longitud de la cabeza, AC: Altura de la cabeza, ALCR: Altura de la carcasa, LCR: Longitud de la carcasa.

3.4. Análisis Hematológico.

3.4.1 Conteo de eritrocitos

El grupo experimental con el mayor valor de recuento eritrocitario corresponde al TT2, seguido por el Control y finalmente el TT1. Según la prueba paramétrica ANOVA de una vía (previamente verificando los supuestos de normalidad y homocedasticidad) y la prueba a posteriori Tukey HSD, se encontraron diferencias significativas entre el TT1 y TT2, mientras que no se encontraron diferencias significativas entre los Tratamientos y el Control. Además, el conteo de eritrocitos para todos los grupos bordeó los 2×10^6 células μL^{-1} en consecuencia, todos los grupos experimentales están por sobre los valores de referencia propuestos por diversos autores para la trucha arcoíris en estado de desarrollo juvenil (Rodríguez, 1995; Rozas *et al.*, 2015), los cuales corresponden a las barras anaranjadas (Figura 21).

3.4.2 Conteo de leucocitos

Para el conteo leucocitario los resultados obtenidos evidencian un patrón similar al de eritrocitos, en donde, el grupo experimental con un valor mayor es el TT2, seguido por el Control y finalmente el TT1 (Figura 21). Los valores promedios fluctuaron entre 20.000 a 26.000 células μL^{-1} . Los valores obtenidos para el TT1 y el Control están dentro del rango normal, mientras que el TT2 se encuentra en un valor por sobre este (Rozas *et al.*, 2015).

La prueba paramétrica ANOVA de una vía (previamente verificando los supuestos de normalidad y homocedasticidad) y la prueba a posteriori TukeyHSD mostró diferencias significativas ($p < 0.05$) entre el tratamiento uno y tratamiento dos, no obstante, no se encontraron diferencias significativas entre los Tratamientos y el Control.

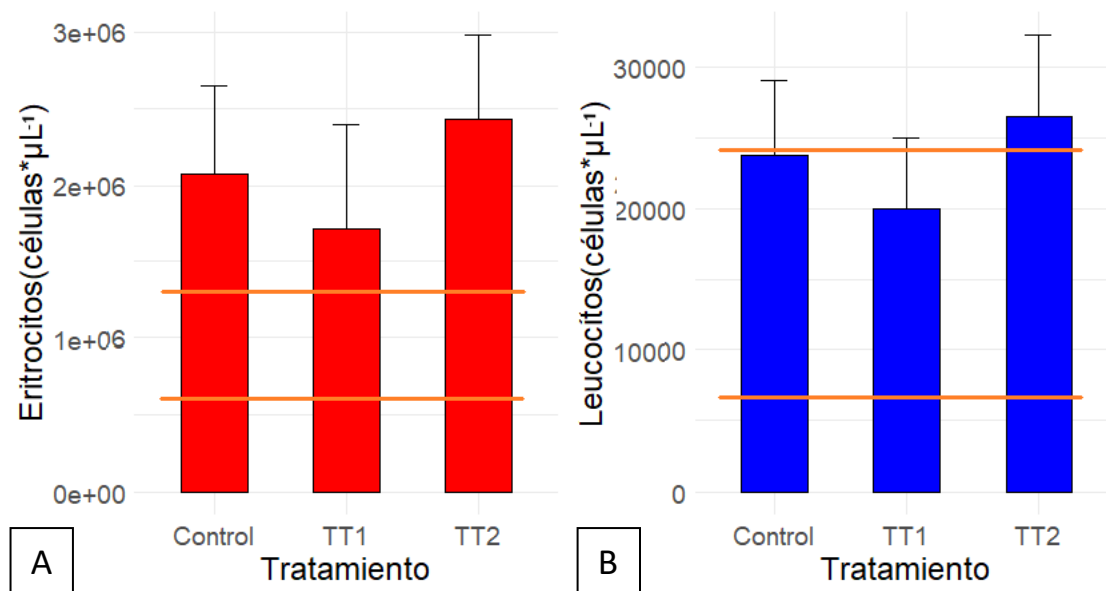


Figura 21: Promedio del conteo de Eritrocitos (A) y de Leucocitos (B) proveniente del análisis hematológico realizado en cámara Neubauer. Las líneas anaranjadas pertenecen a los rangos estándar superior e inferior propuestos por Rozas et al., (2015).

3.4.3 Hemoglobina

Las medidas de Hemoglobina para el TT1 y TT2 mostraron valores similares, y más altos en comparación con el Control (Figura 22). Según la prueba estadística paramétrica ANOVA de una vía (previamente verificando los supuestos de normalidad y homocedasticidad) se encontraron diferencias significativas entre los grupos experimentales, posteriormente con la verificación de la prueba TukeyHSD se encontraron diferencias significativas entre ambos Tratamientos y el Control ($p < 0.05$).

3.4.4 Hematocrito

El hematocrito presentó valores muy similares para los tres grupos experimentales, no encontrándose evidencias de diferencias significativas entre

los grupos experimentales. El hematocrito y la hemoglobina se encontraron dentro de los rangos normales (Rozas *et al.*, 2015).

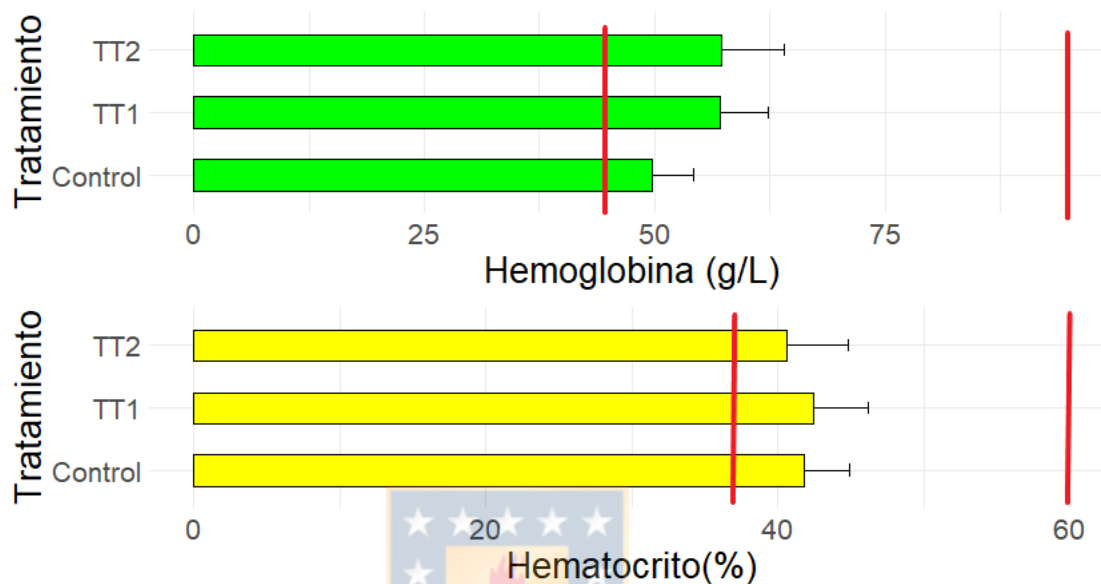


Figura 22: Promedio de valores de análisis hematológico de hemoglobina (barras verdes) y hematocrito (barras amarillas) para todos los grupos experimentales. Las líneas rojas representan los valores normales propuestos por Rozas *et al.*, (2015).

3.4.5 Índices hemáticos

Con los valores obtenidos del análisis hematológico se calcularon los índices hematológicos Volumen Corpuscular Medio (VCM), Concentración de Hemoglobina Corpuscular Media (CHCM) y la Hemoglobina Corpuscular Media (HCM) para los Tratamientos y el Control (Figura 23). Para el VCM el promedio fue mayor en el TT1, seguido por el Control y finalmente el TT2, mientras que para CHCM el valor mayor se encontró en el TT2 el cual presentó un valor similar al TT1, el grupo que presentó el menor valor fue el Control. Según la prueba no paramétrica Kruskal-Wallis, se encontraron diferencias significativas entre todos los grupos experimentales, siendo mayor entre el TT2 y el Control. Para HCM el

mayor valor lo presentó el TT1, mientras que el Control y TT2 presentaron valores similares, sin embargo, la mayor dispersión de datos está en el TT1. Las barras rojas corresponden a los valores normales presentados por (Rozas *et al.*, 2015), en donde la CHCM está dentro de los rangos mientras que la VCM no alcanza el rango mínimo.

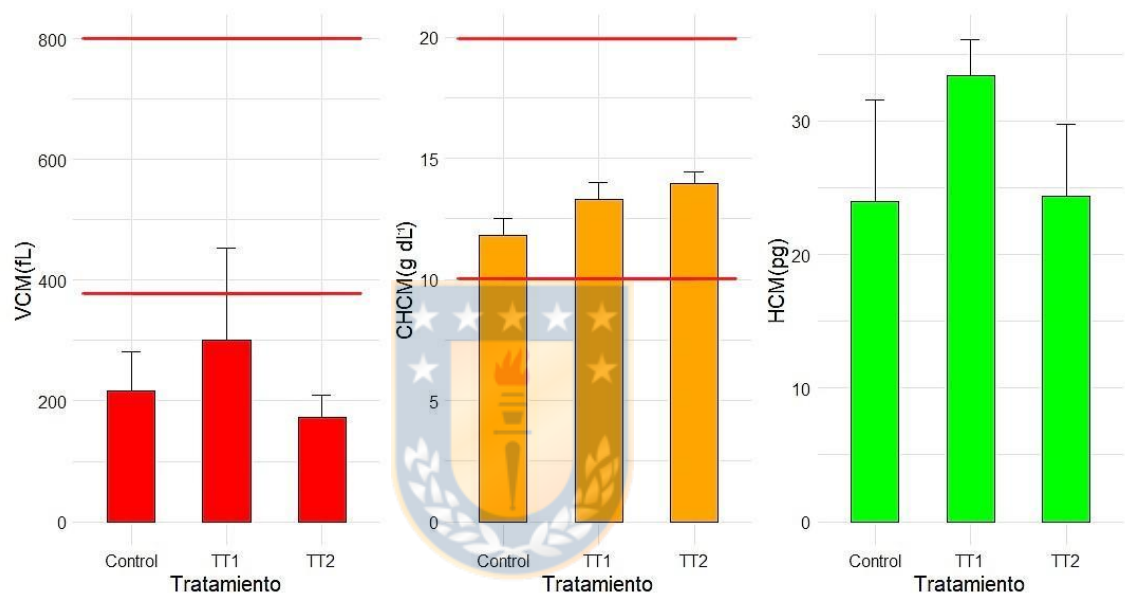


Figura 23: Promedio de los índices hematológicos del Volumen Corpuscular Medio (VCM), Concentración de Hemoglobina Corpuscular Media (CHCM) y la Hemoglobina Corpuscular Media (HCM) para cada grupo experimental. Las barras rojas corresponden a valores de referencia (Rozas *et al.*, 2015).

3.4.6 Conteo diferencial de leucocitos

Para el análisis de recuento diferencial leucocitario se identificaron Heterófilos, Linfocitos y Monocitos (Figura 24), con mayor proporción de Linfocitos y Heterófilos en todos los grupos experimentales, mientras que, en términos absolutos, el TT2 posee valores superiores a los obtenidos en el TT1 y el Control, sin embargo, no existen evidencias de diferencias estadísticamente superiores a los otros grupos experimentales (ANOVA, $p > 0.05$) (Figura 24). Además, se

evaluó la condición morfológica de cada célula, para el Control y los Tratamientos la condición de las células leucocitarias es normal (Figura 25). Se contabilizó la concentración de trombocitos para cada Tratamiento, la que mostró una mayor proporción en el TT2, en comparación al Control.

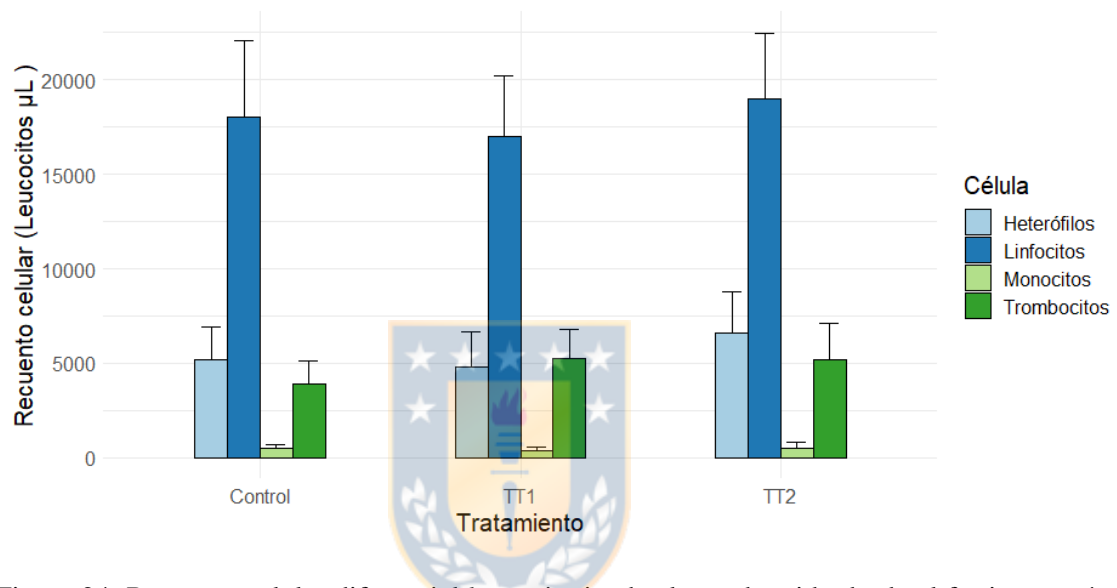
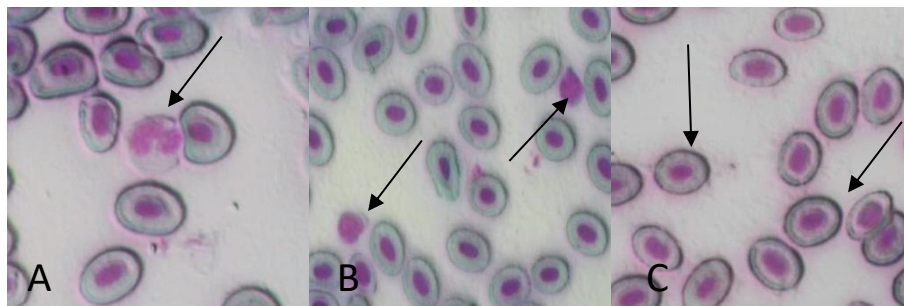


Figura 24: Recuento celular diferencial leucocitario absoluto, obtenido desde el frotis sanguíneo de las truchas de cada grupo experimental. Se identificaron Trombocitos, Heterófilos, Linfocitos y Monocitos.



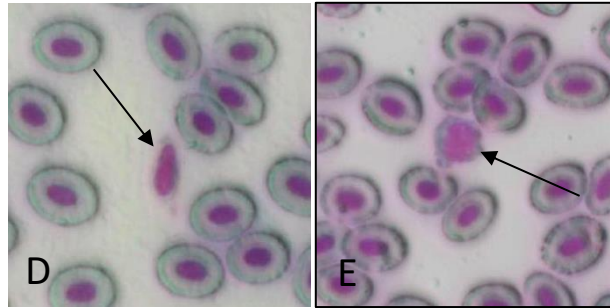


Figura 25: Fotografías del frotis sanguíneo de la Trucha Arcoíris, donde, se identificaron células sanguíneas tales como: A) Heterófilo, B) Linfocitos, C) Eritrocitos, D) Trombocito y E) Monocito.

3.5. Análisis inmunológico

3.5.1 Antiproteasa

Con el suero obtenido se realizó un análisis de la actividad inmunológica sérica para cada grupo experimental. La actividad antiproteasa como % de inhibición de tripsina fue similar en todos los grupos experimentales, con valores promedios que fluctuaron entre 77.5 y 78.0% (Figura 26). Según la prueba paramétrica ANOVA de una vía no se encontraron diferencias entre los Tratamientos y el Control.

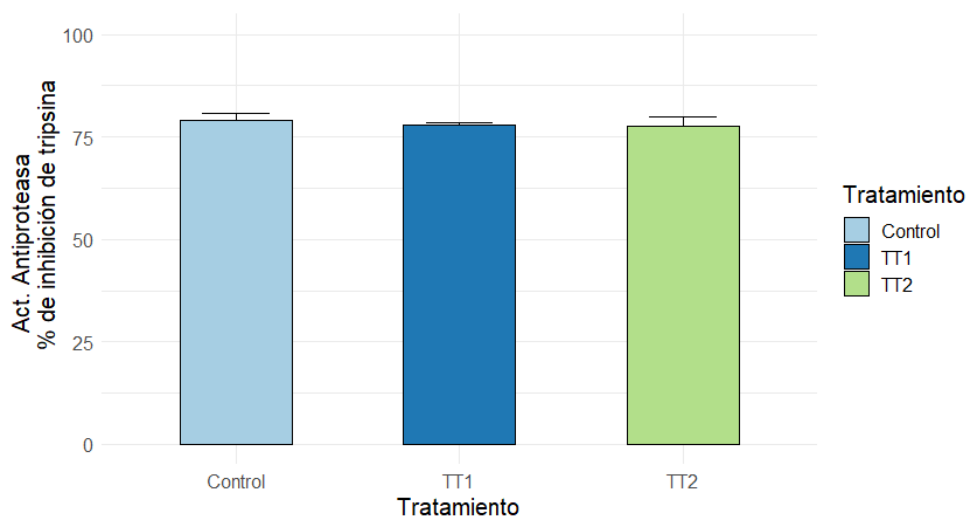


Figura 7: Porcentaje de actividad anti proteasa obtenida desde el suero sanguíneo de cada pool sanguíneo de cada Tratamiento.

3.5.2 Enzima lisozima

La actividad de la enzima lisozima en cambio presenta diferencias significativas entre los grupos experimentales (Figura 27), (ANOVA 1 vía, $p < 0.05$) en donde el Tratamiento que presenta mayor actividad es el TT2 ($61.96 \pm 1.33 \text{ U mL}^{-1}$) seguido por el TT1 ($58.32 \pm 1.14 \text{ U mL}^{-1}$) y finalmente el Control ($50.25 \pm 5.48 \text{ U mL}^{-1}$). La prueba a posteriori TukeyHSD para la verificación de que grupos presentaron diferencias, evidenció que existen diferencias estadísticamente significativas entre el Control y el TT2.

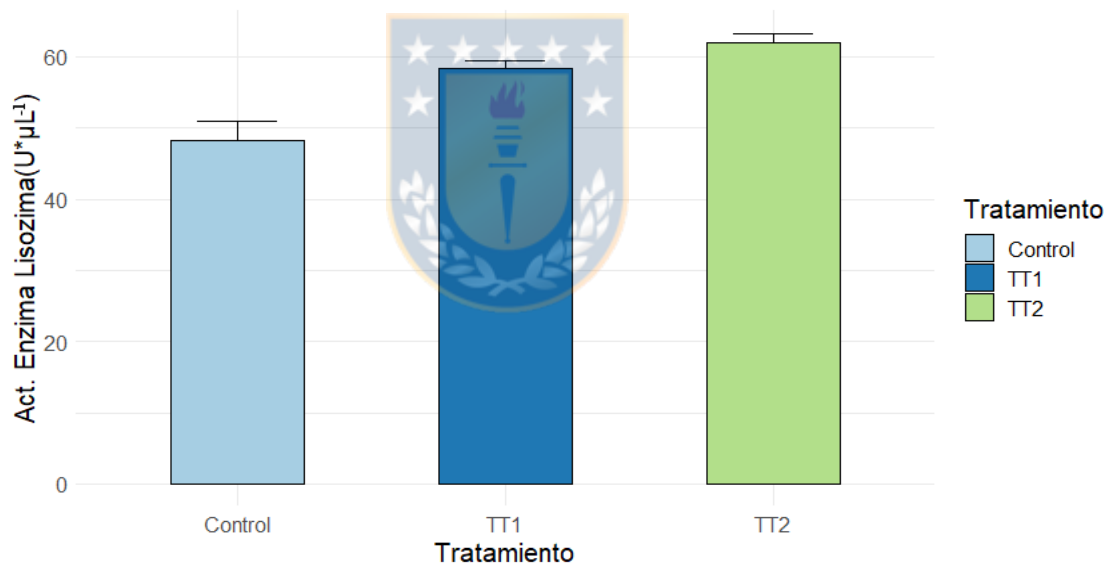


Figura 27: Actividad de la enzima lisozima sérica proveniente del pool sanguíneo de grupo cada grupo experimental.

3.6. Pigmentación

El grado de pigmentación de las muestras obtenidas desde los tratamientos no mostró diferencias visualmente significativas, siendo este, el único método de evaluación para el grado de pigmentación aplicado.

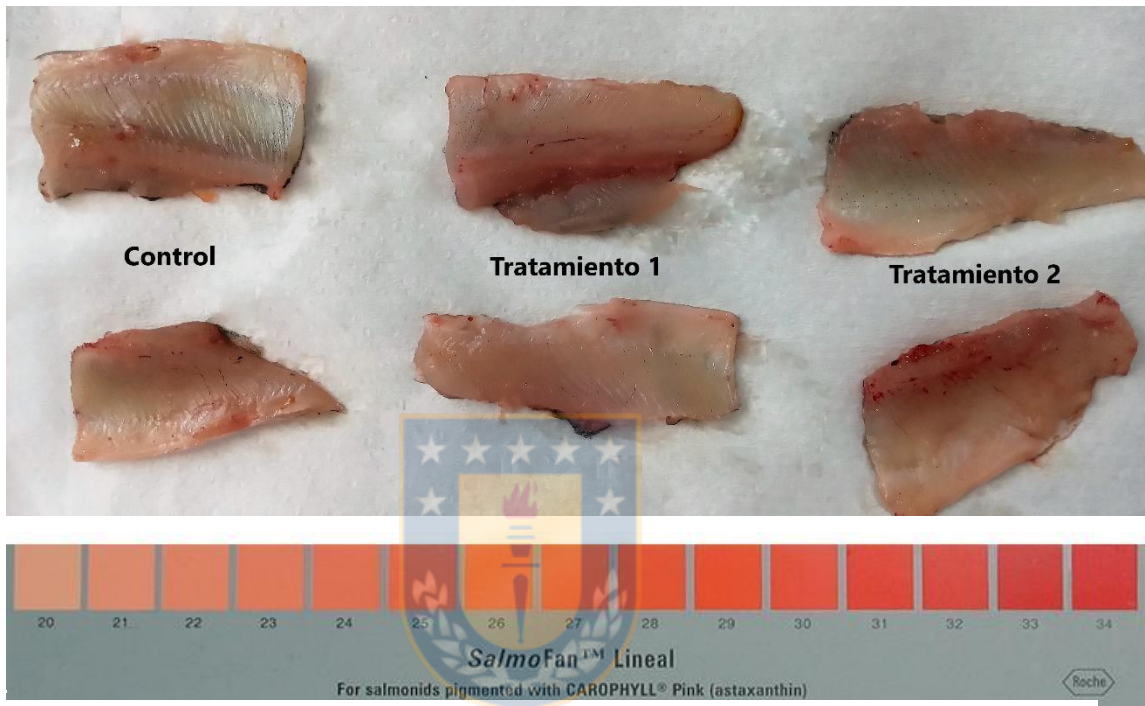


Figura 8 : Muestras de filete de los ejemplares de mayor tamaño utilizados para comparar el grado de pigmentación generada por la levadura.

4. DISCUSIÓN

4.1 Condiciones experimentales

Se observaron variaciones en las condiciones de temperatura durante el periodo experimental, sin embargo las variaciones de temperatura obtenidas durante el día, están dentro de los rangos óptimos de cultivo indicados en el Manual práctico para el cultivo para la Trucha Arcoíris publicado por Recalde (2014), donde se indica que el rango óptimo de cultivo varía entre 13 a 18°C, mientras que la temperatura optima de cultivo es de 15°C. Otros autores como Eya *et al* (2017) probaron el efecto de la dieta y la temperatura en ciertos parámetros de crecimiento de la Trucha Arcoíris, concluyendo que a 14°C se obtiene un mayor crecimiento de la Trucha Arcoíris, lo que está dentro del rango de fluctuación de este estudio. No obstante, los cambios de temperatura durante el mismo día es un factor que se debe tener en consideración para análisis posteriores.

4.2. Crecimiento

La comparación de los parámetros de crecimiento es un factor muy importante a la hora de probar el efecto de ciertas condiciones propias del cultivo de peces (como por ejemplo la alimentación) o para comprender la biología de la especie. Sin embargo, los aspectos de crecimiento de la Trucha Arcoíris se ven afectados por una serie de factores, donde destacan la temperatura del agua, (debido a que la trucha es un animal poiquiloterma), la alimentación y la disponibilidad de oxígeno, necesaria para satisfacer las necesidades metabólicas. Es por esto que la comparación entre diferentes estudios se hace más complicada, ya que existen condiciones experimentales diferentes para cada estudio, en donde puede variar la talla inicial, el peso inicial, el estado de desarrollo, la temperatura, entre otros. Sin embargo, la comparación se hace necesaria ya que esto puede demostrar ciertos rangos o patrones a esperar en los resultados que se pueden obtener en esta investigación.

Los resultados obtenidos en esta investigación respecto a la ganancia de peso (GP) de la Trucha Arcoíris fueron de un aumento en de 29% a 56% de biomasa promedio al cabo de 45 días de experimentación, sin embargo, no existieron diferencias significativas en el peso promedio de las truchas entre el Control y los Tratamientos. Arvizu (2014) encontró resultados positivos en la GP de truchas arcoíris alimentadas con una dieta experimental a base de soya y levaduras, siendo este tratamiento el que presentó un aumento del 513% en comparación al control, el cual presentó un aumento del 396% al cabo de 75 días de experimentación. En otro estudio, Tukmechi *et al* (2011) alimentó truchas arcoíris con la levadura *Saccharomyces cerevisiae* para luego evaluar el crecimiento, la respuesta inmune y la resistencia a enfermedades, luego de 30 días de alimentación, la GP de las dietas Tratamientos fueron significativamente mayores que el Control, aumentando en un 175% y 118% respectivamente. Por su parte, Rodríguez (2016) evaluó el efecto de carotenoides y probióticos sobre los parámetros de crecimiento, entre otros, en donde la GP varió entre 203 a 214% en un periodo de alimentación de 45 días.

Contrario a los resultados presentados anteriormente, Mocanu *et al* (2013) no encontró diferencias significativas en la GP de la Trucha Arcoíris alimentadas con bacterias probióticas a diferentes concentraciones durante un periodo de 30 días. Las diferencias entre los resultados presentados anteriormente y los de la presente investigación podrían deberse a que existieron diferentes condiciones experimentales entre cada investigación, así como también en el estado de desarrollo de los peces y los aditivos utilizados en la alimentación de los peces. Particularmente en esta investigación, se pueden observar valores de ganancia o crecimiento bastante discretos, que pueden estar relacionado directamente con la ración de alimentación que se utilizó, siendo esta, una ración de mantenimiento (~1%). Esto propicia que los peces obtengan energía limitada para el crecimiento, enfocándose principalmente en mantener el metabolismo basal. En este sentido, Morales y Quirós (2007) evaluaron el desempeño productivo de la Trucha Arcoíris

bajo diferentes estrategias de alimentación, probando raciones a saciedad, de crecimiento y de mantenimiento, en donde esta última fue una ración al 1% de la biomasa total del estanque, de esta manera los resultados obtenidos evidenciaron una clara diferencia entre los tratamientos, siendo este último el que presentó las menores variaciones o los cambios más discretos, similar a lo observado en este estudio. En este sentido, la cantidad de alimento que debe ser administrada varía en función de la temperatura del agua y el tamaño inicial del pez. Según Hinshaw (1999), a temperaturas de 3°C los peces necesitan de entre un 0.5 a 1.8% del peso corporal al día, pero de esta manera se obtiene una baja conversión alimenticia. Aumentando la temperatura por sobre los 3°C hasta los 18°C el metabolismo de los peces aumenta, permitiendo alimentar a los peces con una tasa de alimentación superior al 1.5%. Debido a que los alevines y juveniles poseen tasas metabólicas altas, estos requieren una cantidad mayor de alimento en relación al peso corporal, que los adultos. Para esta investigación, la temperatura varió en un rango de 12,4°C por la mañana a 17,4 °C por la tarde (Figura 14), por lo que se considera que la temperatura se mantuvo en un rango óptimo de crecimiento, aunque autores como Eya *et al* (2017) indican que el valor óptimo de temperatura para el cultivo es de 14°C. Además, en los resultados de esta investigación, se logra apreciar una gran variabilidad en los datos al final de la etapa de alimentación, principalmente en los tratamientos con adición de levadura, esto puede deberse de igual manera a la poca disponibilidad de alimento, generando competencia, y, por ende, una mala distribución del alimento entre peces del mismo estanque, lo que generó un crecimiento muy dispar dentro de los tratamientos. No obstante, si tomamos en cuenta los cuartiles más altos en todos los grupos experimentales se puede observar que en el TT2, se concentran los peces más grandes en donde al menos un 25% de los datos obtenidos están por sobre el rango máximo de peso obtenido para el Control (Figura 15).

Los resultados obtenidos para la Ganancia de Talla (GT) no presentaron diferencias significativas entre los grupos experimentales hacia el final del periodo de alimentación, sin embargo, tomando en cuenta el primer y último día, si existieron diferencias para cada grupo experimental a través del tiempo. La GT promedio aumentó en 0.6mm por día, resultados similares a lo reportado por Tukmechi *et al* (2011), donde el crecimiento fue de 0.6mm por día.

Rodríguez (2016) por su parte, encontró resultados donde los valores de GT fueron superiores a los obtenidos en esta investigación, obteniendo una GT de entre 1.32 y 1.66mm por día en un transcurso de 45 días de experimentación.

Se determinó el tipo de crecimiento según la pendiente de la relación talla/peso, donde, si el valor de la pendiente es igual a 3, se asume que el individuo posee un crecimiento de tipo simétrico, en cambio, si este es diferente de 3, se establece que el individuo posee un crecimiento de tipo alométrico, ya sea positivo (>3) o negativo (<3). Para el Control, se puede observar un crecimiento alométrico negativo, donde los peces crecieron más en proporciones de talla que en peso. Autores como Perdomo *et al* (2013) indican que el crecimiento de los individuos de Trucha Arcoíris alimentados a diferentes raciones y ritmos de alimentación puede llegar a ser alométrico negativo independiente de las estrategias alimenticias empleadas, a las formulaciones nutricionales aplicadas y sistemas de producción. Sin embargo, al contrario del Control, los peces del TT1 y TT2 crecieron a un ritmo de crecimiento simétrico, ya que, si bien el valor de la pendiente es menor a 3, estadísticamente, los valores de 2.95 y 2.81 no son diferentes de 3. Esto podría indicar que los peces crecieron tanto en talla como peso a un ritmo similar, lo que puede ser considerado como aspecto positivo en el crecimiento de peces de cultivo debido a que, mediante ese crecimiento los peces tenderían a aumentar tanto en talla como en peso, en comparación al Control el cual aumenta más en talla que en peso (Pedromo *et al.*, 2013). La talla aumenta de manera exponencial, creciendo más rápido en peces juveniles y disminuyendo esta velocidad a medida que van llegando a la talla máxima,

mientras que, el peso, sigue una relación sigmoide, debido a que los peces en una etapa más temprana de vida presentan un incremento de peso más lento. Esto podría indicar que las dietas con *Rhodotorula* sp potenció la ganancia de peso en los tratamientos.

La tasa de crecimiento específica (SGR % día⁻¹) registradas para esta investigación para el Control, TT1 y TT2 fueron de 1.10 ± 0.33 , 1.11 ± 0.61 y 1.2 ± 0.3 respectivamente. Estos resultados fueron inferiores a los reportados por Tukmechi *et al* (2011), quienes al adicionar a la dieta de la Trucha Arcoíris células enteras de levadura de cerveza (*S. cerevicae*) obtuvieron un valor de SGR de 1.46% día⁻¹. Rodriguez (2016) obtuvo valores que variaron entre 1.40 a 1.70 % día⁻¹ al evaluar el efecto de carotenoides y probióticos sobre el desempeño del crecimiento de la Trucha Arcoíris. Arvizu (2014) al probar la adición de levaduras a la dieta de la Trucha Arcoíris en base a proteína de soya, encontró que la SGR para el tratamiento con levadura fue de 2.41% día⁻¹, resultado muy superior al encontrado en esta investigación.

El factor de condición de Fulton (K) de los peces no mostró diferencias significativas entre los grupos experimentales. Tukmechi *et al* (2011) encontraron valores similares entre el grupo control y el tratamiento con la levadura, además no encontraron diferencias significativas entre el control y los tratamientos, junto con señalar que el factor de condición K es un buen indicador del estado de salud de los peces, debido a que este indicador entrega información de la relación volumétrica en función al peso. Arvizu (2014) por su parte, mediante la alimentación a base de soya con aditivos de levadura y fitasa reportó resultados similares, no encontrando diferencias significativas al final del periodo de alimentación, sin embargo, el factor K aumentó a través del tiempo, aumentando de 1.1 a 1.4 al final de la experimentación, concluyendo que los peces con un factor de 1.1 son peces delgados y alargados, mientras que al 1.4 son peces que se encuentran simétricos en términos de peso y talla. El FCA en el TT2 fue el menor obtenido, indicando que para obtener 1 Kg de trucha se debe administrar

1.43 Kg de alimento. Según Morales y Quiroz (2007) un FCA se considera eficiente cuando su índice es de 1 a 1.1, este factor se obtuvo alimentando truchas *ad libitum* a una temperatura de 15°C, a diferencia de la estrategia de alimentación de mantención utilizada en este estudio. En esta investigación no se obtuvieron valores de FCA eficientes, los que fluctuaron entre 1.4 y 2.2. Las diferencias existentes entre los estudios mencionados anteriormente y el presente, se pueden deber a diferencias entre las condiciones experimentales, por ejemplo, la ración de alimentación utilizada por biomasa del estanque en los otros experimentos no se vio limitado, mientras que en la presente investigación la cantidad de alimento a suministrar dependió directamente de la velocidad de producción de biomasa de levadura que se generó previamente, además de limitaciones logísticas y de equipamiento. Otro factor que pudo influenciar sobre los resultados de estos parámetros fue el tiempo de alimentación de 45 días, mientras que, en otros estudios, las mayores diferencias de crecimiento se vieron en lapsos de más de 45 días, llegando incluso a 90 días.

Los parámetros morfológicos medidos no mostraron diferencias entre los grupos experimentales, estos parámetros son fundamentales para comparar las dimensiones corporales de diferentes linajes o individuos, y de esta manera identificar que individuo tiene mejores rendimientos a nivel de producción (Saaverdra, 2019).

En resumen, según lo expuesto anteriormente, los parámetros de crecimiento en los grupos que se alimentaron con el aditivo de *Rhodotorula* sp. no presentan diferencias en comparación al Control. Esto podría indicar que no existe una acción promotora, sin embargo, se debe destacar que tampoco generó un efecto adverso sobre el crecimiento a partir de la levadura utilizada. Sin embargo, si se toman en cuenta los cuartiles más altos en términos de peso, el rango de peces más grande fue el encontrado en el TT2 con la adición del 5% de levadura en la dieta, lo que sugiere un potencial efecto positivo sobre el crecimiento de los peces.

4.3. Parámetros hematológicos.

Los resultados obtenidos en esta investigación relacionados a los parámetros hematológicos para la serie roja, como el recuento de eritrocitos, evidenciaron diferencias no significativas entre el Control y los Tratamientos, no obstante, se encontraron diferencias significativas entre el TT2 y el TT1. Los valores obtenidos de eritrocitos 2.43×10^6 células μL^{-1} para el TT2 y 2.04×10^6 células μL^{-1} para el Control, están por sobre la media en relación a otros estudios realizados para la Trucha Arcoíris, incluso en otros países; 1.41×10^6 células μL^{-1} en Colombia (Rodríguez, 1995), 1.6×10^6 células μL^{-1} en Ecuador (Buenaño, 2010), 1.3×10^6 células μL^{-1} en Chile (Rozas *et al.*, 2015), mientras que el TT1 posee un conteo eritrocitario similar a los encontrado en estudios previos. Esto sugiere que la adición de la levadura *Rhodotorula sp* induciría la acción eritropoyética de las truchas aumentando el nivel de eritrocitos circundantes. Sin embargo, los resultados de los análisis estadísticos revelaron que no existen diferencias significativas entre el Tratamiento con mayor número de eritrocitos (TT2) y el Control. El conteo de eritrocitos elevado para todos los grupos experimentales, puede estar siendo condicionado por otros factores, asociados a las condiciones experimentales o el estrés por manipulación (Rozas *et al.*, 2015). Rozas *et al* (2015) indican que los valores del hematocrito o VGA pueden verse afectados significativamente aumentando su valor hasta en un 25% debido a la manipulación para realizar el análisis mediante venopunción, aumentando directamente según el tiempo de manipulación. Además, este valor puede llegar a relacionarse con la actividad normal del pez, siendo más bajo en peces menos activos.

Los eritrocitos, juegan un papel importante en el correcto funcionamiento metabólico de los peces, esto, a partir de la hemoglobina, proteína encargada del transporte de oxígeno. En términos de aditivos alimenticios, diferentes

investigaciones se han realizado evidenciando diferencias significativas para el conteo de eritrocitos. Por ejemplo, Mocanu *et al* (2010) evaluaron el efecto de la adición de probióticos comerciales en la dieta de la Trucha Arcoíris. Basándose en los perfiles de crecimiento y hematológicos, para esto, compararon 3 concentraciones de probióticos administrados en la dieta con una dieta Control sin probióticos, el conteo de eritrocitos luego de 4 semanas de alimentación, fue mayor para aquellos grupos tratados con probióticos que en el Control, encontrando valores de 1.2×10^6 células μL^{-1} , pero estadísticamente no existieron diferencias significativas. Otras investigaciones han probado diferentes aditivos sobre los parámetros hematológicos. Por ejemplo, Nya y Austin (2010), evaluaron el desarrollo y duración de la respuesta inmune de la Trucha Arcoíris infectadas con la bacteria *Aeromonas hydrophila* utilizando extracto de ajo como inmunoestimulante. Luego de 28 días de exposición y alimentadas con 1g ajo 100g^{-1} , la cantidad de eritrocitos alcanzo un valor de 6.7×10^6 células μL^{-1} . Awad y Austin (2010) evaluaron el efecto de la adición de lupino, mango y ortiga a la dieta de Trucha Arcoíris, sobre la mortalidad de esta expuesta a la bacteria *Aeromonas hydrophila*, encontrando valores de eritrocitos que fluctuaron entre 1.2 a 1.6×10^6 células μL^{-1} . Yeganeh *et al* (2015) evaluaron el efecto de la adición de la microalga, *Spirulina platensis* hasta en un 10% en la dieta sobre los parámetros hematológicos y bioquímicos del suero de la Trucha Arcoíris. De los resultados obtenidos, el Tratamiento con un 10% de la microalga incrementó significativamente los niveles de eritrocitos en comparación con el grupo Control y los otros Tratamientos, con un valor de 2.73×10^6 células μL^{-1} . Estos resultados concuerdan con los obtenidos en esta investigación.

El hematocrito y la hemoglobina, presentaron valores similares a los reportados por diversos autores (Rodríguez, 1995; Buenaño, 2010; Rozas *et al.*, 2015; Esmaeili y Khara, 2014; Mocanu *et al.*, 2010). Un hematocrito aumentado por sobre 45% puede indicar, usualmente, una condición de deshidratación de los

peces, mientras que un hematocrito inferior a 20% indicaría una condición anémica de los peces. Para esta investigación, los valores de hematocritos fueron similares en todos los grupos experimentales, lo que indicaría un estado de salud similar entre los grupos, los cuales están dentro de los rangos normales propuestos por diferentes autores (Rodríguez, 1995; Buenaño, 2010; Rozas *et al.*, 2015; Esmaeili y Khara, 2014; Mocanu *et al.*, 2010), lo que indicaría que los peces se encontraron en un estado de salud óptimo al menos al final del periodo de experimentación. Para la hemoglobina, proteína encargada del transporte de oxígeno, en esta investigación se encontraron diferencias significativas entre el Control y los Tratamientos ($p < 0.05$), siendo mayor en el TT2 que en el TT1, sin embargo, la desviación estándar fue también mayor en el TT2. Los valores de hemoglobina fueron similares a los encontrados en investigaciones como Esmaeili y Khara (2014), donde probaron el efecto en el crecimiento, características inmunológicas y los parámetros hematológicos de la Trucha Arcoíris alimentada con diferentes niveles de ácido fólico y vitamina E, en donde, los valores de hemoglobina para el Control fueron de 6.3 g dL^{-1} , mientras que el Tratamiento con mayor valor de hemoglobina (con 8.9 g dL^{-1}) fue el Tratamiento con adición de 2.5mg de ácido fólico. Sin embargo, en otras investigaciones los resultados obtenidos difieren con los de esta investigación, por ejemplo, Awad y Austin (2010), mediante la adición de lupino, mango y ortiga, reportaron valores de hemoglobina de entre 9.8 g dL^{-1} hasta 11.8 g dL^{-1} . Mocanu *et al* (2010) por su parte, mediante la adición de un probiótico comercial en la dieta, evaluaron el efecto de este sobre los parámetros de crecimiento y hematológicos de la Trucha Arcoíris. Los valores reportados en términos de hemoglobina mostraron evidencias de diferencias estadísticamente significativas, en donde los peces que fueron tratados con probióticos, presentaron valores de 8 g dL^{-1} . Las diferencias presentadas entre esta investigación y las mencionadas anteriormente podrían ser explicadas por las condiciones experimentales, como, por ejemplo, la ración de alimentación, la cual superaba el 3% de la biomasa de peso vivo, en

comparación a esta investigación donde se utilizó una ración de alimentación del 1% debido a la limitación de biomasa de levadura. Los peces sometidos a esta ración de alimentación, obtienen la energía nutritiva mínima para mantener el metabolismo basal, mientras que a una ración del 3 o 4 %, los peces poseen energía y la calidad nutricional óptima para un aumento en tamaño y actividad (ejercicio), lo que aumentaría la tasa metabólica, por ende, un mayor requerimiento de oxígeno, aumentando la hemoglobina (Aatland y Bjerknes, 2009; De la Gándara, 2003).

Dentro de los índices eritrocitarios obtenidos, el VCM (202.70 fl para el Control, 250.58fl para el TT1 y 168.31fl para el TT2) difiere a lo reportado por Rozas *et al* (2015), Rodríguez (1995) y Buenaño (2015), donde se registran valores de 376.5 fl, 294.2 fl y 373.44 fl respectivamente. Los valores de HCM obtenidos para todos los grupos experimentales se encuentran por debajo de lo reportado por diferentes investigaciones realizadas con Trucha Arcoíris (Rodríguez, 1995; Buenaño, 2010; Esmaeili y Khara, 2014; Mocanu *et al.*, 2010; Řehulka, 2003; McCarthy *et al.*, 1971), aunque se ubicaron dentro de los rangos propuestos por Miller *et al.*, 2003 (14-70 pg). En el CHCM por su parte, los valores obtenidos para esta investigación están por debajo de los resultados obtenidos por diversos autores (Rodríguez, 1995; Buenaño, 2010; Esmaeili y Khara, 2014; Mocanu *et al.*, 2010; Řehulka, 2003; Valenzuela *et al.*, 2002), sin embargo, están dentro de los valores reportados como normales (McCarthy *et al.*, 1971, Miller *et al.*, 2003; Rozas *et al.*, 2015). Estos valores pueden verse afectados por diferentes razones, tales como, sexo, edad (Buenaño, 2010), calidad del ambiente (i), fotoperiodo, temperatura (Valenzuela *et al.*, 2007), oxígeno disuelto (Valenzuela *et al.*, 2002), estrés por manipulación (Rozas *et al.*, 2015), estado de salud (Řehulka, 2003) y calidad de alimentación (Rodríguez, 2016; Mocanu *et al.*, 2010; Esmaeili y Khara, 2014).

Los resultados de esta investigación, muestran que el TT2 posee un conteo alto de eritrocitos (2.43×10^6 células μL^{-1}), sin embargo, el volumen corpuscular medio (VCM) para este Tratamiento, es el más bajo (168.31fL), mientras que el TT1, si bien, posee un conteo eritrocitario menor (1.71×10^6 células μL^{-1}), el volumen corpuscular medio es mayor (250.58fL) en comparación al TT2 y al Control. Esto indica que, si bien el TT2 tenía una mayor cantidad de eritrocitos circundantes, estos eran más pequeños. Esto se condice con el índice de hemoglobina corpuscular media (HCM), en donde el peso medio, medido en picogramos de hemoglobina por eritrocito, es mayor en el TT1, sin embargo, la hemoglobina por volumen de sangre (CHCM), fue más alta en el TT2, debido a una mayor cantidad de eritrocitos en la sangre. Estos resultados podrían indicar una condición de estrés ya sea nutricional o por falta de oxígeno, lo que estaría demostrado por el aumento de la cantidad de eritrocitos y el bajo volumen de estos (Valenzuela *et al.*, 2002). Las fluctuaciones de temperatura durante la experimentación y las condiciones de oxígeno disuelto en el sistema de cultivo, las cuales no fueron controladas, es un posible efecto sobre estos resultados que no se debe descartar.

Los leucocitos son la primera línea de defensa del sistema inmune, el aumento de su concentración puede deberse a causas como infecciones, estrés, deficiencias alimenticias, el estado de desarrollo y enfermedades (Rozas *et al.*, 2015). Los resultados del conteo leucocitario obtenidos en esta investigación se encuentran dentro de los rangos obtenidos por otros autores, en donde, el Control presentó valores de 2.3×10^4 células μL^{-1} , el TT1 2.0×10^4 células μL^{-1} y finalmente el TT2 presentó valores de $2.6 \pm 0.56 \times 10^4$ células μL^{-1} . Yeganeh *et al.* (2015) evaluaron el efecto de la microalga *Spirulina platensis*, sobre los parámetros hematológicos y bioquímicos del suero de la Trucha Arcoíris, donde encontraron que el uso de la microalga al 10% aumenta significativamente, entre otros, el conteo de leucocitos en la sangre, con valores de 10.31×10^3 células μL^{-1} . Estos

autores concluyeron que la inclusión de *Spirulina platensis* aumentó la respuesta inmunológica debido al aumento de los parámetros hematológicos. Por otro lado, Buenaño (2015) evaluó los hemogramas de la Trucha Arcoíris en tres periodos de producción en la cuenca de la alta provincia del Napo en Ecuador, donde encontró que los recuentos leucocitarios variaban significativamente según el estado de desarrollo y el sexo. Los resultados obtenidos correspondientes al conteo de leucocitos variaron en un rango desde 1,89 y 2,62 x10⁴ células μL⁻¹. Estos resultados concuerdan con la presente investigación en donde el conteo de leucocitos varió en un rango de 2.0± 0.50 y 2.6± 0.56 x10⁴ células μL⁻¹. En investigaciones relacionadas, Awad y Austin (2010), probaron el efecto preventivo del lupino, mango y la ortiga como aditivo alimenticio. Los resultados obtenidos por estos autores, en relación al conteo leucocitario son significativamente mayores a los encontrados en este trabajo, donde los valores del conteo de leucocitos variaron en un rango de 3.5 x10⁴ células μL⁻¹ para el Control a 12.5 x10⁴ células μL⁻¹ en los tratamientos. Tukmechi *et al* (2011) experimentaron durante 30 días con la Trucha Arcoíris, suministrando alimento con una levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) como aditivo nutricional. Estos autores encontraron una mejor respuesta leucocitaria para el Tratamiento con la levadura tratada con beta-mercapto-etanol (2ME), aumentando el conteo leucocitario a 4.13x10⁴ células μL⁻¹. Los resultados obtenidos en la presente investigación, están por debajo a lo reportado en las investigaciones previamente nombradas, las razones por la cual se generó esta diferencia pueden estar relacionadas a la ración de alimentación utilizada, ya que esta fue del 3% de la biomasa total del estanque, al contrario de esta investigación en donde se utilizó un 1%. En este mismo sentido, tanto el aditivo utilizado, como su concentración en el alimento fue diferente entre investigaciones, por lo que la respuesta ante estos agentes es diferente. Además, la temperatura se mantuvo más estable durante la etapa de experimentación, variando hasta 2°C durante el día, mientras

que en esta investigación las fluctuaciones de temperatura fueron superior a los 4°C durante el día.

Los trombocitos, son células sanguíneas encargadas de la coagulación y de mantener la homeostasis (Valenzuela *et al.*, 2003). Para esta investigación, el conteo de trombocitos muestra un aumento aproximadamente del 26% en los Tratamientos cuando los comparamos con el Control (3.905 células μL^{-1}). Rodríguez (2016) reporta para el conteo de trombocitos un valor de 14.375 células μL^{-1} en las dietas donde se incluyeron los carotenoides y probióticos.

Los linfocitos en esta investigación, para todos los grupos experimentales fueron las células leucocitarias con mayor predominancia tanto en términos relativos (>70%), seguida por los heterófilos (~25%) y los monocitos (~3%). Estos son consistentes por lo reportado por Rozas *et al* (2014), Tukmechi *et al* (2011) y Awad y Austin (2010) que reportan valores similares a los reportados por esta investigación. Los linfocitos participan activamente en la actividad humoral (Linfocito B) y la inmunidad mediada por células (Linfocito T), mientras que los heterófilos participan en la respuesta inflamatoria, y que los monocitos son fagocitos por naturaleza, pudiendo convertirse en macrófagos (Rozas *et al.*, 2014). Los resultados obtenidos indicarían un estado de salud dentro del rango normal u óptimo, (Rozas *et al.*, 2014, Awad y Austin., 2010; Tukmechi *et al.*, 2011).

4.4. Análisis Inmunológico

La lisozima sérica es una de las principales y más estudiadas enzimas que participan en la respuesta inmune innata en los peces (Colona *et al.*, 2013). Cumple funciones principalmente antibióticas, donde su mecanismo de acción radica principalmente en catalizar la hidrolisis del enlace β (1-4) de la pared celular de las bacterias y hongos, estimulando su fagocitosis; siendo muy importante en la prevención de enfermedades e infecciones. (Jha *et al.*, 2007; Gálvez *et al.*, 2020; Colona *et al.*, 2013; Nya y Austin, 2011). En el presente

estudio, ambos Tratamientos muestran una mayor actividad de la enzima lisozima en comparación al grupo Control, sin embargo, estadísticamente, solo el TT2 presenta diferencias significativas. Consistentemente, Tukmechi *et al* (2011) probaron la administración de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* en la dieta de la Trucha Arcoíris, determinando que, aquellas truchas que fueron alimentadas con la levadura, aumentaron la actividad de la enzima lisozima sérica. Además, encontraron que un aumento de las células leucocitarias heterófilas se relacionaba con el aumento de la actividad de lisozima. Resultados similares fueron encontrados por Jha *et al* (2007), quienes probaron la respuesta hemato-inmunologica del pez *Catla catla* alimentados con levaduras, ácidos grasos omega 3 y beta carotenos, encontrando un patrón similar relacionado a un mayor conteo de leucocitos y de la actividad de la enzima lisozima, además de una mayor actividad fagocítica. De acuerdo a lo expuesto anteriormente, el aumento del conteo leucocitario, por ejemplo, en la cantidad de heterófilos en la sangre, las que son el tipo de célula principal en la producción de lisozima, se condice con el aumento de la actividad de esta (Tukmechi et al., 2011). Estos resultados, son consistentes con los encontrados en esta investigación, donde, en términos absolutos, se encontró una mayor proporción de heterofilos en el TT2 en comparación al Control. Esto podría indicar una posible activación del sistema inmune innato de la Trucha Arcoíris debido a la adición de *Rhodotorula* sp. en la dieta de las truchas. Sin embargo, se debe considerar también que existen otras razones por las cuales puede aumentar la actividad de la lisozima, como enfermedades, infecciones y estrés. No obstante, al tomar en cuenta que el conteo diferencial leucocitario se mantuvo en los rangos normales se podría descartar la acción de microorganismos patógenos sobre la condición de salud de las truchas. Para determinar concretamente esta respuesta, otros factores deberían tomarse en cuenta, por ejemplo, si el aumento de la actividad va acompañado de una mejora en la función de la enzima. Esto podría ponerse a

prueba exponiendo las truchas a algún microorganismo patógeno y analizar el efecto sobre estas.

La pigmentación de la carne de los peces salmónidos llega a ser uno de los factores clave a la hora de la elección de que producto consumir, superando incluso características como el tamaño, frescura, sabor y precio (Sinnot, 1989). El grado de pigmentación proporciona un nivel de alimento elite, factor clave para la comercialización del producto independiente del procesamiento previo por el que pueda haber pasado el producto final. En esta investigación se evaluó cualitativamente la coloración de la carne de las Trucha Arcoiris alimentada con la levadura adicionada, sin embargo, no se observó diferencias entre el Control y los Tratamientos (Figura 28). La característica de pigmentación se obtiene a través de la absorción de pigmentos adicionados en la alimentación de los peces (Torrissen *et al.*, 1989). Si bien la *Rhodotorula mucilaginosa* posee un grado de pigmentación, dado por la presencia de carotenos (Frengova y Beshkova, 2009), aparentemente estos pigmentos no fueron procesados para aportar esta coloración a la carne del pez. Probablemente, las concentraciones utilizadas de levadura pueden no ser suficientes para generar un impacto significativo en la coloración del músculo de la Trucha Arcoiris.

Con el continuo crecimiento de la acuicultura y la creciente demanda de productos marinos provenientes de esta a nivel mundial, se han hecho más frecuentes problemas de seguridad alimenticia, sustentabilidad y nutrición, provocando serios problemas no solo al desarrollo acuícola, sino que al medio ambiente y a la población que se alimenta de estos productos. Muchos de estos problemas radican en la mala administración de alimento y en la calidad nutricional de estos. En vista de esta problemática, se han realizado muchas investigaciones para desarrollar mejores estrategias alimenticias, algunas como la inclusión de microorganismos inmunoestimulantes (Tewary y Patra, 2011),

reemplazo de aceites animales (Barra et.al, 2017), utilización de hongos para mejorar el crecimiento y la respuesta inmune de peces (Cruz, 2020; Ruiz, 2018; Uluköy et.al, 2016) para reducir y minimizar las problemáticas actuales en la alimentación y salud de los peces. En este sentido, el presente estudio contribuye con información que sugiere un potencial uso de levaduras marinas como complemento alimenticio para peces de cultivo.



5. CONCLUSIONES

- La adición de la levadura *Rhodotorula mucilaginosa* como aditivo alimenticio en una dieta de mantención (1%) no provocó un aumento en los parámetros de crecimiento de la Trucha Arcoíris, sin embargo, tampoco generó una disminución de estos a lo largo del periodo de alimentación, esto sugiere que todavía existen posibilidades de utilizar esta levadura bajo diferentes condiciones experimentales como aditivo alimenticio.
- La ración de alimentación al 1% bastó solo para generar cambios muy discretos en los parámetros de crecimiento tales como GP, GT y SGR, pero sí promovió un crecimiento más simétrico (peso/talla) comparado al control.
- Se observó una gran variabilidad en los tamaños de las truchas alimentadas con *Rhodotorula mucilaginosa*, registrándose los individuos con mayores tamaños en los tratamientos en relación al control. Se sugiere que, la ración de alimentación al 1% generó competencia dentro de cada tratamiento debido a la baja disponibilidad de alimento.
- La adición de la levadura *Rhodotorula mucilaginosa* no generó condiciones de baja salubridad dentro de cada tratamiento y no propició la aparición de ninguna enfermedad en los peces alimentados con ella.
- De acuerdo a los parámetros hematológicos, la Trucha Arcoíris alimentada con la levadura se mantuvo en un estado de salud óptimo.
- El Tratamiento 2 (5% de *Rhodotorula mucilaginosa*) presentó una mejoría en el conteo leucocitario y en el conteo diferencial leucocitario, lo que tendería a activar el sistema inmune innato de la Trucha Arcoíris y podría permitir que reaccionen de una manera más eficiente ante enfermedades.
- El Tratamiento 2 (5% de *Rhodotorula mucilaginosa*) fue también el que obtuvo la actividad de lisozima más alta, lo que induciría a una mejor respuesta inmune ante agentes patógenos e infecciosos.

- Aunque los resultados de esta investigación no son aún del todo concluyentes, contribuyen en una primera etapa a considerar el potencial de microorganismos marinos tales como levaduras como fuentes alternativas de aditivos alimenticios. En una etapa posterior se podrían mejorar ciertas condiciones experimentales como la medición y control completo de todas las variables de calidad de agua y la cantidad de alimento suministrada, de manera de observar cambios menos discretos en los resultados. También se podrían aumentar el tiempo de experimentación y la cantidad de levadura a utilizar, la cual puede ser aumentada mediante el incremento de la cantidad de alimento suministrado o la concentración de levadura en este. De esta manera, se pueden realizar experimentos dirigidos para conseguir resultados más concluyentes en aquellos aspectos que fueron identificados como positivos en esta investigación, como por ejemplo aspectos inmunológicos, poniendo a prueba la respuesta y sobrevivencia de la Trucha Arcoíris alimentada con la levadura al exponerla ante agentes patógenos.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aatland A. & Bjerknes V. 2009. Calidad de Agua para el cultivo de Smolts en Chile. NIVA Chile. 139 pp.
- Amend, A., Burgaud, G., Cunliffe, M., Edgcomb, V., Ettinger, C., Gutiérrez M., Heitman, J., Hom, E., Ianiri, G., Jones, A., Kagami, M., Picard, K., Quandt, C., Raghukumar, S., Riquelme, M., Stajich, J., Vargas, J., Walker, A., Yarden, O., Gladfelter, A. (2019). Fungi in the marine environment: open questions and unsolved problems. *mBio* 10: e01189-18. <https://doi.org/10.1128/mBio.01189-18>.
- Arvizu, E. (2014). "Evaluación del crecimiento y respuesta inmune de juveniles de trucha arco iris, *Oncorhynchus mykiss*, alimentados con fuentes de proteína de soya bajo condiciones prácticas de cultivo". (Tesis de Maestría). Universidad Nacional Autónoma de México, México. Recuperado de <https://repositorio.unam.mx/contenidos/67983>
- Awad, E., and Austin, B. (2010). Use of lupin, *Lupinus perennis*, mango, *Mangifera indica*, and stinging nettle, *Urtica dioica*, as feed additives to prevent *Aeromonas hydrophila* infection in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Journal of fish diseases*, 33(5), 413-420.
- Barra, M., Llanos, A., Cruzat, F., Pino, N., and González, R. (2017). The marine fungi *Rhodotorula* sp. (Strain CNYC4007) as a potential feed source for fish larvae Nutrition. *Marine drugs*, 15(12), 369.

- Buenaño, V. (2010). Hemograma de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) en tres etapas de producción en la cuenca alta de la provincia del Napo, Ecuador. *Boletín Técnico, Serie Zoológica*, 9(6).
- Cabello, F. (2004). Antibióticos y acuicultura en Chile: consecuencias para la salud humana y animal. *Revista médica de Chile*, 132(8), 1001-1006. <https://dx.doi.org/10.4067/S0034-98872004000800014>
- Chávez, M. (2008). Influencia de la alimentación suplementaria en el crecimiento de truchas (*Oncorhynchus mykiss*) de estadio juvenil de la laguna Mismycocha en las comunidades Misme–Chuicón.
- Colona, V., Herrera, M., de Amat Herbozo, C., Gonzales, L, Paredes, J., Del Valle, R., y de la Guarda, R. (2013). Actividad del Complemento y de la Lisozima Sérica en juveniles de *Oncorhynchus mykiss* inmunizados con fracciones de membrana externa de una cepa nativa de *Flavobacterium psychrophilum*. *REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria*, 14(1), 1-10.
- Cunliffe M, Hollingsworth A, Bain C, Sharma V, Taylor JD. 2017. Algal polysaccharide utilisation by saprotrophic planktonic marine fungi. *Fungal Ecol* 30:135–138.
- Cruz, L. (2020). Evaluación del efecto del hongo *Pleurotus djamor var. Roseus* como suplemento alimenticio en la respuesta hematológica y crecimiento de la tilapia *Oreochromis niloticus*. Tesis de Maestro en manejo de recursos naturales. UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

- de la Gándara, F. (2003). *Efecto de diversos factores sobre el consumo de oxígeno de juveniles de Seriola (Seriola dumerili risso, 1810) en condiciones de cultivo* (Doctoral dissertation, Universidad de Murcia).
- Escalona, A., Pajuelo, G., Falcón, M., Ramos, J. G., Henríquez, S., y Otxoa, E. (2001). La acuicultura. Efectos ambientales.
- Ellis, A. I. (1990). Lysozyme assays. *Techniques in fish immunology*, 1, 101-103.
- Esmaeili, B., and Khara, H. (2014). Growth performance, hematology and immunological parameters of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, fed with diets containing different levels of vitamin E and folic acid. *Irán. J. Fish. Sci.* 13 (4), 931–943.
- Eya, J., Yossa, R., Perera, D., Okubajo, O., and Gannam, A. (2017). Combined effects of diets and temperature on mitochondrial function, growth and nutrient efficiency in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 212, 1-11.
- FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación). 2014. Manual práctico para el cultivo de la trucha arcoíris, <http://www.fao.org/3/abc354s.pdf>
- Fazio, F. (2019). Fish hematology analysis as an important tool of aquaculture: a review. *Aquaculture*, 500, 237-242.

- Frengova, G., and Beshkova, M. (2009). Carotenoids from *Rhodotorula* and *Phaffia*: yeasts of biotechnological importance. *Journal of industrial microbiology and biotechnology*, 36(2), 163–180. <https://doi.org/10.1007/s10295-008-0492-9>
- Gálvez-Iriqui, A. C., Plascencia-Jatomea, M., and Bautista-Baños, S. (2020). Lysozymes: characteristics, mechanism of action and technological applications on the control of pathogenic microorganisms. *Revista mexicana de fitopatología*, 38(3), 360-383.
- González, M., Otero, Y., García, Y., Gómez, M., García, M., & Llamas, J. (2015). Validación de la técnica de cianometahemoglobina en la determinación de hemoglobina al trofín® deshidratado. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, 46(2), 182-190.
- Grossart, P., Van den Wyngaert, S., Kagami, M., Wurzbacher, C., Cunliffe, M., and Rojas, K. (2019). Fungi in aquatic ecosystems. *Nature Reviews Microbiology*, 17(6), 339-354.
- Gutiérrez, M., Jara, A., Pantoja, S. (2016). Fungal parasites infect marine diatoms in the upwelling ecosystem of the Humboldt Current System off central Chile. *Environ. Microbiol.* 18, 1–24. Doi:10.1111/1462-2920.13257
- Gutiérrez, M., Pantoja, S., Quiñones, R., and González, R. (2010). First record of filamentous fungi in the coastal upwelling ecosystem off central Chile/Primer registro de hongos filamentosos en el ecosistema de surgencia costero frente a Chile central. *Gayana*, 74(1), 66.

- Gutiérrez, M., Pantoja, S., Tejos, E., Quiñones, R., 2011. The role of fungi in processing marine organic matter in the upwelling ecosystem off Chile. *Mar. Biol.* 158, 205–219. Doi:10.1007/s00227-010-1552-z
- Gutiérrez, M., Vera, J., Srain, B., Quiñones, R., Wörmer, L., Hinrichs, K., and Pantoja, S. (2020). Biochemical fingerprints of marine fungi: implications for trophic and biogeochemical studies. *Aquatic Microbial Ecology*, 84, 75-90.
- Hinshaw, J. M. (1999). Trout production: feeds and feeding methods. *SRAC publication (USA)*.
- Jha, A., Pal, K., Sahu, P., Kumar, S., and Mukherjee, C. (2007). Haemato-immunological responses to dietary yeast RNA, ω -3 fatty acid and β -carotene in *Catla catla* juveniles. *Fish and shellfish immunology*, 23(5), 917-927.
- Jiménez, N., Coll, J., Estepa, A., y Tafalla, C. (2016). Futuro de las vacunas ADN frente a virus en Acuicultura. *Revista AquaTIC*, (23).
- Kurtzman, C, and J. W. Fell.1998. The yeasts a taxonomic study, 4th ed. Elsevier Science, Amsterdam, The Netherlands.
- Lie, O., O. Evensen, A. Sorensen and E. Frogsadal. 1989. Study on lysozyme activity in some fish species. *Diseases of Aquatic Organisms*. 6:1-5.

- Manríquez, E. (2015). Evaluación de un prebiótico a base de levaduras naturales *Saccharomyces cerevisiae* adicionado a un alimento balanceado para pollo de engorde (Doctoral dissertation, Universidad de San Carlos de Guatemala).
- Martínez, L., y Fontanillas, F. (2017). Terapéutica en acuicultura. *Panorama actual del medicamento*, 41(404), 579-588.
- McCarthy, D., Stevenson, J., and Roberts, M. (1973). Some blood parameters of the rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson) I. The Kamloops variety. *Journal of Fish Biology*, 5(1), 1-8.
- Miller III, W., Hendricks, A., and Cairns Jr, J. (1983). Normal ranges for diagnostically important hematological and blood chemistry characteristics of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 40(4), 420-425.
- Mocanu, M., Cristea, V., Dediu, L., Bocioc, E., Grecu, R. I., Ion, S., and Vasilean, I. (2010). The effect of probiotic diet on growth and hematology parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum 1792). *Lucrari Stiintifice-Sera Zootheniie*, 59, 258-263.
- Morales, G. A., y Quiros, R. (2007). Desempeño productivo de la trucha arco iris en jaulas bajo diferentes estrategias de alimentación. *Archivos Latinoamericanos de Producción Animal*. 15(4).119-127.

- Nya, E. J., y Austin, B. (2011). Development of immunity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) to *Aeromonas hydrophila* after the dietary application of garlic. *Fish and shellfish immunology*, 30(3), 845-850.
- Ochoa, L., y Juárez, V. (2004). Las levaduras marinas como herramientas científica y biotecnológica. *Universidad y Ciencia*, (I), 39-50.
- Olabuenaga, S. E. (2000). Sistema inmune en peces. *Gayana (Concepción)*, 64(2), 205-215.
- Parada, G. (2010). Tendencias de la acuicultura mundial y las necesidades de innovación de la acuicultura chilena. Santiago de Chile: CNIC.
- Perán, C. (2020). Estrés en acuicultura: una visión actualizada para mejorar el bienestar animal en especies de interés comercial. Trabajo de Fin de Grado en Ciencias del Mar. Universidad de Cádiz.
- Perdomo, D., Castellanos, K., González, M., & Perea, F. (2013). Efecto de la estrategia alimenticia en el desempeño productivo de la trucha Arco Iris (*Oncorhynchus mykiss*). *Revista Científica*, XXIII (4), 341-349.
- Rehulka, J. (2003). Haematological analyses in rainbow trout *Oncorhynchus mikiss* affected by viral haemorrhagic septicemia (VHS). *Diseases of aquatic organisms*, 56(3), 185-193.

- Recalde, D. (2014). Manual práctico para el cultivo de Trucha arco iris. *La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura*, 44.
- Rodríguez, A. (1995). Determinación de algunos aspectos hematológicos de *Oncorhynchus mykiss* (Salmonidae), en Cundinamarca, Colombia. *Revista de Biología Tropical*, 283-288.
- Rodríguez, A. (2016). Efecto de los carotenoides y los probióticos sobre los parámetros de desempeño, hematológicos, bioquímicos, color del filete, carotenoides totales y estrés térmico en la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*). [Tesis de maestría, Universidad autónoma de aguascalientes] <http://hdl.handle.net/11317/486>
- Rondón, I. (2004). Inmunoestimulantes en medicina veterinaria. Orinoquia, 8(2),56-75. ISSN: 0121-3709. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=89680206>
- Rozas, M., Walker, R., Müller, A., Bittencourt, P. (2015). Manual de patología clínica de peces salmónidos. <http://www.pathovet.cl/wp-content/uploads/2018/07/MANUAL-DE-PATOLOGI%CC%81A-CLI%CC%81NICA.pdf>
- Ruiz, E., Rio, O., Tintos, A., Hernández, M., Guzmán, L., Badillo, D., y Vega-Villasante, F. (2018). El uso de hongos macroscópicos como

inmunoestimulantes en peces teleósteos: estado del arte al 2018. *Hidrobiológica*, 28(2), 209-217.

- Saavedra, I. (2019). *Performance Productiva y Relaciones Morfométricas de Truchas (Oncorhynchus mykiss) Cabeza de Acero y Arco Iris en Etapa de Engorde en Raceways* (Doctoral dissertation, Tesis de pregrado). Universidad Nacional Agraria la Molina. Facultad de Pesquería. 64Pp. <http://repositorio.lamolina.edu.pe/bitstream/handle/UNALM/4238/saavedrahidalgo-issac.pdf>.
- Sernapesca, 2020. Informe sectorial de pesca y acuicultura, 4-5.
- Sinnot, R. 1989. Keep them in the pink to stay competitive. *Fish Farmer* 12: 23, 26.
- Sommer, M. (2009). Acuicultura insostenible en Chile. *REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria*, 10(3), 1-23.
- Tavares, M., Sandrim, E., Moraes, F y Carneiro, F. (2001). Boletim do Instituto de Pesca, 27(1), 43-48.
- Tewary A, Patra BC (2011) Oral administration of baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) acts as a growth promoter and immunomodulator in *Labeo rohita* (Ham.). *J Aquac Res Development* 2:109. doi:10.4172/2155-9546.1000109

- Torrissen, O., Hardy, R., y Shearer, K. Pigmentation of Salmonids—Carotenoid Deposition and Metabolism. *CRC Crit. Rev. Aquat. Sci.* 1: 209-225.
- Tovar, D., Zambonino, J., Cahu, C., Gatesoupe, F. y Vázquez, R. (2000). Efecto de la administración de levaduras en el proceso de maduración del tracto digestivo de peces. *Avances en Nutrición Acuícola. V memorias del V Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. Mérida, Yucatán, México.*
- Tukmechi, A., Andani, R., Manaffar, R., y Sheikhzadeh, N. (2011). Dietary administration of beta-mercapto-ethanol treated *Saccharomyces cerevisiae* enhanced the growth, innate immune response and disease resistance of the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Fish and shellfish immunology*, 30(3), 923-928.
- Uluköy, G., Baba, E., and Öntaş, C. (2016). Effect of oyster mushroom, *Pleurotus ostreatus*, extract on hemato-immunological parameters of Rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Journal of the World Aquaculture Society*, 47(5), 676-684.
- Valenzuela, A. E., Silva, V. M., y Klempau, A. E. (2008). Effects of different artificial photoperiods and temperatures on haematological parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish physiology and biochemistry*, 34(2), 159-167.
- Valenzuela, A., Alveal, K. y Tarifeño, E. (2002). Respuestas hematológicas de truchas *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792) a estres hipoxico

agudo: serie roja. *Gayana (Concepción)*, 66(2), 255-261. <https://dx.doi.org/10.4067/S0717-65382002000200024>

- Vera, J., (2019). Diversidad, viabilidad e implicancias tróficas y biogeoquímicas de hongos aislados desde el Océano Pacífico Sur-Oriental. Tesis para optar al grado de Doctor en Oceanografía. Universidad de Concepción.
- Wahli, T. (2002). Approaches to investigate environmental impacts on fish health. *BULLETIN-EUROPEAN ASSOCIATION OF FISH PATHOLOGISTS*, 22(2), 126-132.
- Yeganeh, S., Teimouri, M., y Amirkolaie, A. K. (2015). Dietary effects of *Spirulina platensis* on hematological and serum biochemical parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Research in Veterinary Science*, 101, 84-88.