



UNIVERSIDAD DE CHILE

MAGISTER EN CIENCIAS DE LA ACUICULTURA

**EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA ALIMENTACIÓN CON
DIFERENTES DIETAS DURANTE LAS PRIMERAS ETAPAS DE
CULTIVO DE *Crassostrea gigas* Y EL PRIMER MES EN EL MAR**

Tesis para optar al Grado de Magíster en Ciencias de la Acuicultura

ALEJANDRA MURILLO RÍOS

Directores de Tesis
Jurij Wacyk González
Nélsón Félix Díaz Pérez

SANTIAGO - CHILE
2018



UNIVERSIDAD DE CHILE

MAGISTER EN CIENCIAS DE LA ACUICULTURA

EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA ALIMENTACIÓN CON DIFERENTES DIETAS DURANTE LAS PRIMERAS ETAPAS DE CULTIVO DE *Crassostrea gigas* Y EL PRIMER MES EN EL MAR

Tesis para optar al Grado de Magíster en Ciencias de la Acuicultura

ALEJANDRA MURILLO RÍOS

Directores de Tesis
Jurij Wacyk González
Nélsón Félix Díaz Pérez

Profesores consejeros
Natalia Lam Pasten
David Véliz Baeza
Paola Navarrete Wallace
Eduardo Uribe Tapia

SANTIAGO - CHILE
2018

UNIVERSIDAD DE CHILE
MAGISTER EN CIENCIAS DE LA ACUICULTURA

EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA ALIMENTACIÓN CON
DIFERENTES DIETAS DURANTE LAS PRIMERAS ETAPAS DE
CULTIVO DE *Crassostrea gigas* Y EL PRIMER MES EN EL MAR

Tesis presentada como parte de los requisitos para optar al Grado de Magíster en
Ciencias de la Acuicultura

ALEJANDRA MURILLO RÍOS

	Calificaciones	Firma
DIRECTORES DE TESIS		
Nelson Díaz Pérez Profesor de Biología y Ciencias Doctor en Ciencias		_____
Jurij Wacyk González Ingeniero Agrónomo Doctor en Fisiología de Peces		_____
PROFESORES CONSEJEROS		
Natalia Lam Pasten Ingeniero en Acuicultura Doctor en Acuicultura	_____	_____
David Véliz Baeza Biólogo Marino Doctor en Biología	_____	_____
Paola Navarrete Wallace Bioquímico Doctor en Nutrición y Alimentos	_____	_____
Eduardo Uribe Tapia Biólogo Marino Doctor en Biología	_____	_____

Santiago, Chile
2018

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo de investigación y estudio de postgrado se realizó gracias al financiamiento económico de la Organización de Estados Americanos (OEA), con su beca de estudios de Postgrado 2016. La parte experimental se realizó con la colaboración económica y de recursos biológicos y humanos del Laboratorio de Cultivo y Reproducción de Moluscos, de la Estación de Biología Marina (EBM) de la Universidad Nacional de Costa Rica (UNA); dentro de esta institución agradecer a Sidey Arias, Gerardo Zuñiga, Óscar Pacheco Prieto, Oscar Pacheco Urpí, Silvia Ramírez y Rebeca Quesada. En la parte académica, este trabajo se realizó gracias a la asesoría y guía de Jurij Wacyk y Nelson Díaz, académicos de la Maestría en Ciencias de la Acuicultura de la Universidad de Chile.

DEDICATORIA

Este trabajo está
dedicado a mis
padres, que con su
apoyo incondicional
me han enseñado que
con esfuerzo todo es
posible.

A Carlos, por estar
siempre apoyándome
desde la distancia y
dándome ánimos para
seguir adelante y ser
mejor persona.

A mi familia que
siempre me enviaron
buenos deseos y
bendiciones.

A mis amigos que
siempre me apoyaron
y dieron ánimo, y
siempre estuvieron
ahí para sacarme una
sonrisa, brindarme
una mano y sacarme
de la rutina.

Agradezco a la
familia Vivar, que me
recibió y me dio la
comodidad y el
apoyo necesario para
poder concluir con
este proyecto.

Finalmente,
agradezco a los
profesores y
funcionarios del
programa de Magíster
por el apoyo y el
conocimiento dado.

INDICE

Índice de contenidos

	Página
AGRADECIMIENTOS	i
DEDICATORIA	ii
RESUMEN	iii
ABSTRACT	iii
1. INTRODUCCIÓN	1
2. HIPÓTESIS	3
3. HIPÓTESIS	3
3.1. Objetivo general	3
3.2. Objetivos específicos	3
4. MATERIALES Y MÉTODOS	3
4.1. Ubicación del ensayo	3
4.2. Material biológico	4
4.3. Diseño experimental y tratamientos	4
4.4. Manejo del ensayo	5
4.5. Evaluaciones	7
4.6. Análisis estadístico	9
5. RESULTADOS	10
6. DISCUSIÓN	17
7. CONCLUSIONES	21
8. LITERATURA CITADA	22
9. ANEXOS	25
10. APÉNDICES	27

Índice de cuadros

	Página
Cuadro 1. Condiciones de cultivo de las microalgas empleadas durante todo el bioensayo.	5
Cuadro 2. Condiciones de cultivo de las larvas entregadas por el laboratorio para la realización del bioensayo.	5
Cuadro 3. Supervivencia global, día de inicio de fijación y fijación de larvas de <i>C. gigas</i> alimentadas con diferentes dietas.	11
Cuadro 4. Contenido de ácidos grasos (mg/100 mg de grasa) de post-larvas de <i>Crassostrea gigas</i> (inicio) antes de iniciar los tratamientos y de semillas al finalizar el ensayo.	13

Índice de figuras

Página

Figura 1. Esquema de medición de altura (ancho) y longitud en larvas de <i>Crassostrea gigas</i> .	7
Figura 2. Crecimiento en longitud (panel a) y altura (panel b) de larvas de <i>C. gigas</i> a partir del día 10 post-fertilización.	10
Figura 3. Resultados de la sobrevivencia diaria de larvas de <i>C. gigas</i> alimentadas con diferentes dietas.	11
Figura 4. Crecimiento en longitud (panel a) y altura (panel b) de post-larvas de <i>C. gigas</i> durante 24 días.	12
Figura 5. Sobrevivencia final (panel a) y proporción de tamaños (panel b) al final de la etapa de crecimiento en laboratorio de semillas de <i>Crassostrea gigas</i> alimentada con diferentes dietas.	12
Figura 6. Biplot del PCA construido con los contenidos de los distintos ácidos grasos como variables para los distintos tratamientos de semillas de <i>C. gigas</i> antes de ser llevadas al mar.	14
Figura 7. Crecimiento en longitud (panel a) y altura (panel b) de semillas de <i>C. gigas</i> durante el primer mes de siembra en el mar.	15
Figura 8. Sobrevivencia final (panel a) y semanal (panel b) de semillas de <i>Crassostrea gigas</i> durante el primer mes de siembra en el mar.	16
Figura 9. Cambio de peso de semillas de <i>C. gigas</i> durante el primer mes en el mar.	17

ANEXOS

ANEXO 1. NO-PS-IPS-01 Instructivo de producción de semillas. Laboratorio de Cultivo y Producción de Moluscos, EBM, UNA.

ANEXO 2. P-SA-MQ-034 Ácidos grasos saturados, insaturado, trans y omegas por pg. Laboratorio de Análisis Químicos, CITA, UCR.

APÉNDICES

APÉNDICE 1. Representación gráfica del diseño estadístico empleado en este ensayo.

APÉNDICE 2. Valores de medias y errores estándar de las distintas variables medidas a lo largo del ensayo.

APÉNDICE 3. Medidas de resumen de los MLM y AIC empleados durante el análisis de datos del ensayo.

APÉNDICE 4. Abreviaciones.

RESUMEN

La producción de semillas de *Crassostrea gigas* en Costa Rica se realiza exclusivamente en el laboratorio de cultivo y reproducción de bivalvos de la Universidad Nacional de Costa Rica. Con el objetivo de optimizar la calidad de la semilla, se evaluó el efecto del uso de distintas microalgas en la dieta de *Crassostrea gigas* y su efecto sobre parámetros de crecimiento y sobrevivencia. Para esto se realizó un ensayo con distintas dietas, donde se utilizó como control individuos alimentados solamente con *Isochrysis galbana* (I) y como tratamientos combinaciones de esta alga con las especies *Chaetoceros calcitrans* (C) y *Phaedactylum tricorutum* (P) en las etapas de 1) desarrollo larval y fijación, 2) crecimiento de post-larvas a semillas y 3) el primer mes en el mar, evaluándose la sobrevivencia, el crecimiento, la fijación y el contenido de ácidos grasos (post-larvas). Durante la primera etapa las larvas alimentadas con la dieta I:C mostraron el porcentaje de fijación ($77,1 \pm 3,3$ %) mayor que las otras ($p < 0,05$), iniciándose además este proceso un día antes que el control. En la segunda etapa se observó que las dietas I:C e I:P:C generan los mayores crecimientos ($p < 0,05$), mientras que I:C obtuvo la mayor sobrevivencia ($82,0 \pm 5,3$ %, $p < 0,05$). Durante la última parte del estudio en mar, las ostras alimentadas con I:C e I:P:C registraron las mayores sobrevivencias y pesos en relación con el resto de los tratamientos estudiados. Los datos del presente estudio mostraron que la combinación de nutrientes aportados por la mezcla I:C se relacionaría las mejores condiciones para la producción de semillas de *C. gigas*, incluyendo un periodo de un mes en mar.

Palabras clave: *Crassostrea gigas*, dietas, microalgas, sobrevivencia, crecimiento.

ABSTRACT

The production of seeds of *Crassostrea gigas* in Costa Rica is done exclusively in the laboratory of production and reproduction of bivalves of the Universidad Nacional de Costa Rica. In order to optimize the quality of the seed, the effect of the use of different microalgae on the diet of *Crassostrea gigas* and its effect on growth and survival parameters was evaluated. For this, an assay was carried out with different diets, where individuals fed only with *Isochrysis galbana* (I) were used as a control and as combinations of this alga with the species *Chaetoceros calcitrans* (C) and *Phaedactylum tricorutum* (P) in the stages of 1) larval development and fixation, 2) growth of post-larvae to seeds and 3) the first month in the sea, evaluating the survival, growth, fixation and content of fatty acids (post-larvae). During the first stage, the larvae fed the I:C diet showed the fixation percentage ($77.1 \pm 3.3\%$) higher than the others ($p < 0.05$), this process also being initiated one day before the control. In the second stage it was observed that the diets I:C and I:P:C generated the highest growths ($p < 0.05$), while I:C obtained the highest survival ($82.0 \pm 5.3\%$, $p < 0.05$). During the last part of the study at sea, the oysters fed with I:C and I:P:C recorded the highest survivals and weights in relation to the rest of the treatments studied. The data of the present study showed that the combination of nutrients contributed by the mixture I:C would relate the best conditions for the production of seeds of *C. gigas*, including a period of one month at sea.

Key words: *Crassostrea gigas*, diets, microalgae, survival, growth.

1. INTRODUCCIÓN

La ostra japonesa *Crassostrea gigas* es una especie de molusco bivalvo que ha sido ampliamente cultivado a nivel mundial, según estadísticas de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación (FAO). Actualmente, se produce en veinticinco países y Costa Rica se encuentra en la posición veintidós de cantidad producida con 20 toneladas anuales para el 2016. La totalidad de la producción se destina al mercado local y se ha mantenido constante desde el 2013.

El laboratorio de cultivo y reproducción de bivalvos de la Estación de Biología Marina (EBM) de la UNA es el único productor de semilla en el país y en Centroamérica. Este laboratorio provee a la totalidad de productores de Costa Rica, siendo un total de seis granjas ubicadas en la costa Pacífica. Para el año 2017, la cantidad de semillas entregadas a los productores fue de 145000, obteniéndose al final del proceso productivo una sobrevivencia de sólo 30 % con un valor estimado de US \$120000. Mientras que, en países como Chile, la sobrevivencia para este mismo cultivo en una granja durante los primeros meses alcanza 97 % aproximadamente. Esto hace necesario identificar alternativas a las prácticas hoy en uso en Costa Rica para este cultivo y así mejorar la sobrevivencia y productividad.

Uno de los factores que influye fuertemente sobre la sobrevivencia de los bivalvos es la alimentación. Posterior a la fertilización, las primeras horas de desarrollo embrionario se llevan a cabo empleando la energía de reserva que contiene el ovocito (Marshall *et al.*, 2010). A partir de la formación de la primera concha y la culminación de la formación del tracto digestivo (larva D), se inicia una alimentación exógena (Helm y Bourne, 2006), utilizándose para larvas, post-larvas y semillas de bivalvos, dietas que se basan principalmente en microalgas (Guedes y Malcata, 2012). Para que las microalgas puedan ser utilizadas con éxito, deben tener el tamaño y la forma apropiada para que sean consumidas, deben ser fácilmente digeribles, su biomasa debe ser de fácil producción (resistentes a cambios de condiciones ambientales y altas productividades) y deben aportar los nutrientes que los individuos necesitan para su desarrollo (Brown, 2002; Marshall *et al.*, 2010).

La microalgas son las productoras primarias de la cadena trófica y son las fabricantes de una serie de fitonutrientes incluyendo proteínas, carbohidratos y lípidos como ácidos grasos y esteroides, los cuáles son esenciales para la mayoría de los animales marinos que están en niveles más altos de la cadena trófica (Guedes y Malcata, 2012). Dentro de los componentes nutricionales de las microalgas, se ha estudiado que el contenido lipídico resulta de los más importantes durante el desarrollo temprano de bivalvos (Sewell, 2005), esto pues son usados como la principal fuente de energía para funciones metabólicas, seguidas de las proteínas y finalmente los carbohidratos (Marshall *et al.*, 2010). Como en la mayoría de animales acuáticos, los lípidos son usados por los bivalvos como fuente de energía, y dentro de esta fracción lipídica, los ácidos grasos esenciales (EFA) son fundamentales para el crecimiento y la sobrevivencia (Marshall *et al.*, 2010). Se ha descrito que las larvas de especies acuáticas necesitan principalmente de tres tipos de ácidos grasos poliinsaturados de larga cadena (PUFA's): el ácido araquidónico (ARA, 20:4n-6), el ácido eicosapentaenoico (EPA, 20:5n-3) y el ácido docosahexaenoico (DHA, 22:6n-3) (Pettersen *et al.*, 2010). En este sentido, el

EPA y ARA se han estudiado por ser fuente de energía y precursores de eicosanoides, que poseen un rol importante en una gran cantidad de funciones metabólicas (Genard *et al.*, 2011), mientras que los niveles de DHA están relacionados con el mantenimiento de la estructura y la funcionalidad de las membranas celulares (Da Costa *et al.*, 2015).

Otras funciones asociadas a los PUFA's son el efecto que tienen sobre la respuesta reproductiva e inmune de los bivalvos. Se ha observado que durante la etapa reproductiva, los requerimientos de EPA y ARA son altos durante la ovogénesis, el EPA tiene un rol energético/estructural durante la maduración del ovocito; mientras que el ARA se ha asociado a la síntesis de prostaglandinas durante la maduración gonadal y la liberación del ovocito durante la temporada de desove (Hurtado *et al.*, 2009; Fernández-Reiriz *et al.*, 2017). Por otro lado, en relación a la respuesta inmune, la cantidad de ARA está relacionada positivamente con un incremento en la respuesta inmune de *Crassostrea gigas* y *Crassostrea cortizicensis* al incrementar la cantidad de hemocitos, granulocitos y fagocitos (Delaporte *et al.*, 2003; Delaporte *et al.*, 2006; Hurtado *et al.*, 2009). Todas estas investigaciones están basadas en el efecto de la dieta y del contenido de ácidos grasos en las diferentes etapas de desarrollo de los individuos a nivel de laboratorio; sin embargo, ninguna ha evaluado el efecto de la dieta cuando los individuos son trasladados al mar por primera vez.

La producción actual del laboratorio de cultivo y reproducción de moluscos se realiza empleando exclusivamente la especie *Isochrysis galbana* como dieta para larvas, post-larvas y semillas de *C. gigas*. Esta especie se caracteriza por poseer una productividad alta y resistencia elevada a las condiciones de cultivo que se presentan actualmente en el laboratorio, siendo la cepa más estable. Nutricionalmente, *I. galbana* tiene un alto contenido de DHA (26,8 %) y poco EPA y ARA (0,9 % y 0 %, respectivamente) (Rivero-Rodríguez *et al.*, 2007). Se ha visto que en *Crassostrea gigas*, las mayores tasas de crecimiento (> 4,5 $\mu\text{m}/\text{día}$) ocurren cuando se alimenta con raciones multiespecíficas que corresponde a mezclas de una o más microalgas de la clase Prymnesiophyceae (*I. galbana* clon T, *Pavlova* sp, *Pseudoisochrysis paradoxa*) con una de la clase Bacillariophyceae (*Chaetoceros calcitrans* principalmente) (Marshall *et al.*, 2010).

El cepario del laboratorio cuenta con dos microalgas de la clase Bacillariophyceae: *C. calcitrans* y *Phaedactylum tricornutum* que tienen características diferentes de productividad y contenido de ácidos grasos. *C. calcitrans* es difícil y costosa de producir a nivel comercial (Pettersen *et al.*, 2010); al contrario, *P. tricornutum* tiene una alta productividad, con tasas de crecimiento de 0,58 – 0,51 y productividad 1,21 – 2,75 $\times 10^6$ células/mL en volúmenes de 150 – 8000 mL (Rodríguez-Núñez y Toledo-Agüero, 2017). Por otro lado, el contenido de ácidos grasos esenciales de *C. calcitrans* (ARA = 11,3 %; EPA = 26,3 %; DHA = 2,3 %) y de *P. tricornutum* (ARA = 0,9 %; EPA = 35,0 %; DHA = 1,5 %) también es diferente (Rivero-Rodríguez *et al.*, 2007). Es por ello, que en este experimento se evaluará el efecto de diferentes dietas compuestas por *I. galbana* sola o en combinación con *P. tricornutum* y/o *C. calcitrans* sobre la sobrevivencia, crecimiento y fijación de larvas de *C. gigas* y el efecto sobre la sobrevivencia, el crecimiento y el contenido de ácidos grasos de semillas en el laboratorio y durante un mes en el mar. Esto último no ha sido evaluado para *Crassostrea gigas* hasta esta investigación.

2. HIPÓTESIS

La utilización de una dieta mixta en la alimentación de larvas pre-asentamiento aumenta el crecimiento, la sobrevivencia y fijación de larvas de *Crassostrea gigas*.

La utilización de dietas mixtas con diferentes composiciones de ácidos grasos en la alimentación de post-larvas y semillas de *Crassostrea gigas* aumenta su supervivencia en mar.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

Evaluar diferentes mezclas de microalgas en la alimentación sobre el crecimiento y la sobrevivencia durante las diferentes etapas de cultivo temprano de *Crassostrea gigas*, desde larva umbonada hasta el primer mes de siembra en el mar.

3.2. Objetivos específicos

Evaluar las dietas en base a *I. galbana* y dietas mixtas sobre la sobrevivencia y el crecimiento durante el desarrollo temprano y el asentamiento de *C. gigas*.

Comparar el perfil de ácidos grasos en semillas de *C. gigas* y su relación con las diferentes composiciones dietarias de microalgas sobre la sobrevivencia y el crecimiento de la semilla.

Comparar el efecto de la alimentación previa de semillas de *C. gigas* sobre la sobrevivencia y el crecimiento durante el primer mes en el mar.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Ubicación del ensayo

Todo el desarrollo de los bioensayos se llevó a cabo en el Laboratorio de Cultivo y Reproducción de Moluscos, Estación de Biología Marina (EBM) de la UNA, Puntarenas, Costa Rica. La prueba de sobrevivencia y crecimiento en el mar se realizó en la granja ostrícola Huertos Marinos ubicada en Costa de Pájaros, Golfo de Nicoya, Costa Rica. Y el análisis del perfil de ácidos grasos se llevó a cabo en el laboratorio de Química del Centro de Investigaciones en Tecnología de Alimentos (CITA) de la Universidad de Costa Rica (UCR), Costa Rica.

4.2. Material biológico

Para este diseño experimental se trabajó con *Crassostrea gigas* en dos etapas del desarrollo: individuos de 10 días post-fertilización (dpf) para evaluar el desarrollo larval y asentamiento y semillas de 8 días post-fijación (dpfi) para evaluar el desarrollo post-asentamiento y primer mes en el mar. Todas las ostras fueron obtenidas del Laboratorio de Cultivo y Reproducción de Moluscos, EBM, UNA, Puntarenas, Costa Rica. Las microalgas se obtuvieron del laboratorio de fitoplancton de la EBM, UNA, Puntarenas, Costa Rica.

4.3. Diseño experimental y tratamientos

El bioensayo se realizó en tres secciones: la primera etapa es la evaluación del crecimiento y la sobrevivencia en larvas de 10 días post-fijación (dpf) hasta los 8 días post-fijación (dpfi) con diferentes dietas, la segunda parte consistió en la evaluación del crecimiento y sobrevivencia de post-larvas de 8 dpfi hasta un tamaño de 2,8 mm con diferentes dietas; y finalmente la evaluación del crecimiento y la sobrevivencia de semillas alimentadas con diferentes dietas al ser llevadas al mar. En todas las secciones se evaluó la especie *I. galbana* individualmente y en dietas mixtas, pues es la especie de microalga más estable a las condiciones de cultivo masivo que se tienen en el laboratorio (T = 28 – 31 °C). En el Apéndice 1, se muestran los diseños experimentales de manera gráfica.

La primera fase se realizó por triplicado en donde los tratamientos fueron la alimentación 100 % *I. galbana* (T1), alimentación 1:1 equivalente en volumen celular *I. galbana* : *P. tricornutum* (T2) y alimentación 1:1 equivalente en volumen celular *I. galbana* : *C. calcitrans* (T3). La unidad experimental de esta etapa fueron larvas de 10 dpf suministradas por el laboratorio y el experimento se realizó hasta 8 dpfi. Se evaluó el crecimiento en longitud y altura cada tres días, la sobrevivencia diaria y la fijación se evaluó al final del experimento.

Siguiendo con el bioensayo, la segunda parte se realizó por triplicado y los tratamientos fueron: 100 % *I. galbana* (T1), alimentación 1:1 equivalente en volumen celular *I. galbana* : *P. tricornutum* (T2), alimentación 1:1 equivalente en volumen celular *I. galbana* : *C. calcitrans* (T3) y alimentación 1:1:1 equivalente en volumen celular *I. galbana* : *C. calcitrans* : *P. tricornutum* (T4). La unidad experimental para esta etapa fueron 12000 post-larvas de 8 dpfi entregadas por el laboratorio, y duró un total de 24 días. Se evaluó el crecimiento en longitud y altura cada 3 días y la sobrevivencia y la proporción de tamaños al finalizar el tiempo.

Finalmente, la última etapa del experimento se llevó a cabo por triplicado y es una continuación de la etapa 2, donde los tratamientos fueron los individuos que fueron alimentados con 100 % *I. galbana* (T1), 1:1 equivalente en volumen celular *I. galbana* : *P. tricornutum* (T2), 1:1 equivalente en volumen celular *I. galbana* : *C. calcitrans* (T3) y 1:1:1 equivalente en volumen celular *I. galbana* : *C. calcitrans* : *P. tricornutum* (T4). La unidad experimental fueron 500 individuos de cada tratamiento y réplica colocados en el primer piso de una linterna; cada tratamiento y réplica se colocaron en una linterna diferente a lo largo

de una long-line. El tiempo del experimento fue de 28 días desde la siembra en el agua y se evaluó el crecimiento en longitud, altura y peso cada 3 días y la sobrevivencia cada semana.

4.4. Manejo del ensayo

Cultivo de microalgas

Las microalgas se produjeron en el laboratorio de Fitoplancton de la Estación de Biología Marina de la Universidad Nacional, con las condiciones de cultivo que se muestran en el Cuadro 1, siguiendo lo indicado por Lavens y Sorgeloos (1996).

Cuadro 1. Condiciones de cultivo de las microalgas empleadas durante todo el bioensayo.

Medio de cultivo	Masivo: Nitrato de potasio alcalino, MAP y diatomita ¹ Intermedio: f/2 medio.
Temperatura de cultivo	Masivo: 28 – 30 °C Intermedio: 24 °C
Salinidad	31 – 33 ppm
Fotoperíodo ²	Masivo: 11L:13O (<i>I. galbana</i> y <i>C. calcitrans</i>) Intermedio: 24 L:0O (<i>P. tricornutum</i>)

¹Cultivo de Diatomeas.

²11L:13O = 11 h luz y 12 h oscuridad; 24L:0O = 24 h luz y 0 h oscuridad.

Para las definiciones de la producción, el cultivo masivo se llevó a cabo en una sala con temperatura ambiente e iluminación natural, el cultivo de *Chaetoceros calcitrans* se llevó a cabo en tanques de 500 L, mientras que el cultivo de *Isochrysis galbana* se realizó en tanques de 2.000 L. Por otro lado, el cultivo intermedio se realizó en una sala con condiciones de temperatura controlada a 24 °C, con iluminación artificial las 24 horas del día y en estanques de 30 L.

Obtención de larvas y semillas

Los individuos de ostra fueron producidos en el laboratorio de cultivo y reproducción de moluscos de la Universidad Nacional a los 10 días post fertilización y de post-larvas de 8 días post-asentamiento. Las condiciones de cultivo larval se muestran en el Cuadro 2, en donde se obtienen los datos de las variables ambientales como temperatura, salinidad, oxígeno disuelto del agua y el fotoperíodo como las variables de producción como el tipo de alimentación y los recambios de agua y lavados con agua dulce en el caso de las post-larvas. El procedimiento completo que utiliza el laboratorio se encuentra en el Anexo 1.

Cuadro 2. Condiciones de cultivo de las larvas entregadas por el laboratorio para la realización del bioensayo.

Condiciones	Larvas	Semillas
Temperatura (°C)	28 ± 1	28 ± 1
Salinidad (ppm)	29 ± 1	30 ± 1
Oxígeno disuelto (%)	6 ± 1	6 ± 1

Fotoperíodo ¹	24L:0O	Fotoperíodo natural
Alimentación	100 % <i>I. galbana</i>	100 % <i>I. galbana</i>
Recambio de agua	100 % diario	100 % diario
Lavado	-	Diario con agua dulce

¹24L:0O = 24 h luz, 0 h oscuridad.

Evaluación de la alimentación sobre la sobrevivencia y crecimiento de larvas (10 dpf – 8 dpfi)

El efecto de la alimentación en larvas se realizó de acuerdo a la metodología empleada por Sakamoto *et al.* (1997), en donde larvas de 10 días post-fertilización son filtradas en un tamiz de 70 μm y son transferidas a 9 tanques de 200 L llenados con agua de mar filtrada y purificada (1 μm y UV) para tener una densidad de 10 larvas/mL en cada tanque. Estos se mantuvieron en los tanques a una temperatura de 28 ± 1 °C con aireación leve hasta que apareció la mancha ocular, momento en el cual fueron transferidos a camas de fijación en donde se mantuvieron por 8 días hasta su fijación. La evaluación de la alimentación se llevó a cabo por triplicado en donde el control correspondió a la alimentación con *I. galbana*, la especie de interés y una mezcla de 1:1 equivalentes en volumen celular *I. galbana* : *P. tricornutum* (I:P) e *I. galbana* : *C. calcitrans* (I:C) todas en su fase de crecimiento exponencial.

Las larvas se alimentaron con una densidad inicial de 60 000 células/mL equivalentes en volumen a *I. galbana* y se incrementó la alimentación cada tres días hasta alcanzar las 80 000 células/mL al finalizar el cultivo larval, lo cual ocurrió cuando más del 70 % de los individuos analizados presentaron mancha ocular. El equivalente en volumen se realizó de acuerdo a lo señalado por Helm y Bourne (2006) donde 1 célula *I. galbana* = 2,25 células de *C. calcitrans* y 1 célula de *I. galbana* = 1 célula de *P. tricornutum*.

Durante el período de asentamiento se alimentó a una densidad de 100 000 células/mL por 8 días. Se realizó un recambio total de agua diario y se monitoreó la temperatura, salinidad y oxígeno disuelto cada día. Adicionalmente, se midió la supervivencia diaria y el crecimiento en longitud y altura cada 3 días. Después de 8 días en las camas de fijación se evaluó la cantidad de larvas fijadas en comparación con la densidad de ingreso a las camas y con ello se determinó el porcentaje de fijación como lo describió Vásquez *et al.* (2007). Debido a que esta etapa es donde se presenta la mayor mortalidad de individuos, se llevó en paralelo un cultivo de semillas del mismo lote alimentado sólo con *I. galbana* como medida de seguridad para poder continuar con las partes siguientes del ensayo.

Evaluación de la alimentación en semillas 8 dpfi sobre la sobrevivencia en el mar después de 1 mes.

Las semillas fijadas se mantuvieron con una modificación a lo señalado por Vásquez *et al.*, (2007), en camas de fijación con aireación constante hasta que estas alcancen un tamaño de 2,8 mm. Se le realizó recambio de agua total diario y se alimentaron diariamente iniciando con una densidad de 100.000 células/mL equivalentes a *I. galbana* con incrementos cada 3 días de 20.000 células/mL. En esta etapa se empleó como tratamientos una dieta monoalgal

con el alga de interés e *I. galbana* (I), un mixto de 1:1 equivalente en volumen con *I. galbana*: *P. tricornutum* (I:P) e *I. galbana*: *C. calcitrans* (I:C) y un mixto 1:1:1 equivalente en volumen de *I. galbana*: *P. tricornutum*: *C. calcitrans* (I:P:C) en su fase exponencial por triplicado. Se les realizó un análisis de perfil lipídico a los individuos antes y al finalizar esta etapa.

Adicionalmente, cada tres días se midieron las dimensiones de la concha en longitud y altura; y al finalizar el ensayo se cuantificó la cantidad total de individuos mediante el tamizaje con tres tamaños de tamices, el más pequeño con un tamaño de malla de 800 μm , un intermedio de 2800 μm y el grande de 4800 μm . Con esto se separaron las semillas para evaluar la proporción de tamaños y la cantidad final de individuos para evaluar la sobrevivencia.

El experimento en el mar se montó en 12 linternas en donde se colocaron 500 individuos en el primer piso de cada linterna equivalente a cada tratamiento y réplica distribuidos aleatoriamente. Se evaluaron cada 7 días por un mes la sobrevivencia mediante el conteo de los individuos vivos y se realizó biometría y peso a 50 individuos por linterna cada 3 días. Diariamente, se monitorearon en el campo la temperatura, oxígeno disuelto y turbidez mediante el disco de secchi.

4.5. Evaluaciones

Tamaño de larvas y semillas

El tamaño se evaluó siguiendo la metodología empleada por Sakamoto *et al.* (1997), en donde se obtuvieron muestras de 30 larvas y 50 semillas por tratamiento y réplica y se evaluó la longitud y altura (como se muestra en la figura 1) cada 3 días. Para las larvas se utilizó un microscopio óptico (Olympus, CH2) con una escala graduada; mientras que las post-larvas y semillas se midieron con un estereoscopio (Meiji, EMZ-TR) con escala graduada y las semillas en el mar con un vernier (General, 144mm).

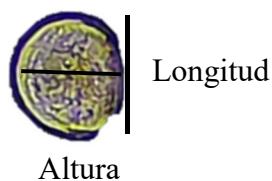


Figura 1. Esquema de medición de altura (ancho) y longitud en larvas de *Crassostrea gigas*.

Sobrevivencia larval

La sobrevivencia de las larvas se evaluó mediante la toma aleatoria y por triplicado de 5 mL de cada tanque. Se realizó un conteo de las larvas y una revisión del estado general. El promedio de larvas total que hay en el tanque y la sobrevivencia se calcularon con las siguientes fórmulas.

$$\text{Cantidad larvas } (C_l) = \frac{\text{Conteo (5 mL)} * 200000 \text{ mL}}{5 \text{ mL}}$$

$$\text{Supervivencia (\%)} = \frac{C_{lt_1} - C_{lt_0}}{C_{lt_0}} * 100$$

Donde:

C_{lt_1} = conteo larval del día de estudio.

C_{lt_0} = conteo larval del día anterior.

Conteo de post-larvas y semillas

La determinación de la densidad de acuerdo a los tamaños se realizó posterior a una separación de tamaños utilizando tamices de 480 μm , 800 μm , 2800 μm y 4800 μm .

Individuos con tamaño $\geq 0,48 \text{ mm}$ y $< 2,8 \text{ mm}$ (Pequeños)

La densidad se estimó mediante un método volumétrico de acuerdo a lo propuesto por Vazquez *et al.* (2007), en donde se utilizó un recipiente de 1 mL graduado cada 0,05 mL. Se tomaron 3 muestras de 0,05 mL y se realizó un conteo de la cantidad de individuos que abarcan ese volumen. Posteriormente, se procedió a medir con una probeta de 10 mL la cantidad total de individuos que posean un tamaño superior a 480 μm ; y se calcularon la cantidad total de individuos de la siguiente manera:

$$C_{\text{individuos}} = \frac{V_{\text{Total}} * C_{\text{ind.muestra}}}{V_{\text{muestra}}}$$

Donde: $C_{\text{individuos}}$ = Cantidad de individuos total

V_{Total} = Volumen total de individuos (mL)

$C_{\text{ind.muestra}}$ = Cantidad de individuos de la muestra

V_{muestra} = Volumen de la muestra (mL)

Individuos con tamaño $\geq 2,8 \text{ mm}$ y $< 4,8 \text{ mm}$ (Intermedios)

Para este caso, la cantidad de individuos se realizó mediante una estimación por peso de la muestra según lo propuesto por Vázquez *et al.* (2007). En donde se contaron 200 individuos por triplicado, se secaron con toallas de papel para eliminar la humedad y se procedió a pesarlos con una balanza granataria (AND, EK-200i). Posteriormente, se tomó toda la población entre esos dos tamaños, se secó con toallas de papel y se procedió a pesarlos. El cálculo de la cantidad de individuos se realizó con la siguiente fórmula:

$$C_{\text{individuos}} = \frac{M_{\text{Total}} * C_{\text{ind.muestra}}}{M_{\text{muestra}}}$$

Donde: $C_{\text{individuos}}$ = Cantidad de individuos total
 M_{Total} = Masa total de individuos (g)
 $C_{\text{ind.muestra}}$ = Cantidad de individuos de la muestra
 M_{muestra} = Masa de la muestra (g)

Individuos con tamaño ≥ 4.8 mm e individuos en el mar (Grandes)

El conteo de estos individuos se realizó de manera directa tomando toda la muestra y contando los individuos uno por uno.

Perfil de ácidos grasos

El perfil de ácidos grasos se realizó en el Laboratorio de Análisis Químicos del Centro de Investigaciones en Tecnología de Alimentos de la Universidad de Costa Rica, de acuerdo al método adjunto (Ver Anexo 2). Para semillas, se tomaron las muestras necesarias para cada réplica y tratamiento. Para las microalgas se procedió con una modificación a lo descrito por Brown *et al.* (1998) mediante una filtración al vacío con una bomba (CAST) con filtros de fibra de vidrio (Advantec) de 47 mm de diámetro y un tamaño de poro de 0,5 μm , con una presión de 60 psi. Todas las muestras se congelaron en un ultracongelador (Thermo Scientific, ULT2186-4-A43) a -80 °C antes de ser llevadas al laboratorio para ser procesadas.

Sobrevivencia de semillas en el mar

La sobrevivencia de los individuos en el mar se evaluó mediante la siguiente ecuación

$$\text{Sobrevivencia (\%)} = \frac{\text{Número de individuos contados}}{\text{Número de individuos al inicio del período}} * 100$$

Peso

Para la medición del peso, se tomaron 50 individuos por réplica y tratamiento y se pesaron en una balanza granataria (AND, EK-200i).

4.6. Análisis estadístico

La evaluación estadística de las variables se llevó a cabo mediante modelos lineales y mixtos (MLM), empleando el software InfoStat y el lenguaje de programación R. Para las variables de crecimiento en longitud y altura en las diferentes etapas y la sobrevivencia diaria de larvas, se tiene como efectos fijos el tiempo y el tratamiento y efecto aleatorio el estanque. Mientras que, para la variable de sobrevivencia global en las tres etapas evaluadas, la fijación y el contenido de ácidos grasos se llevó a cabo tomando el tratamiento como efecto fijo. Finalmente, para la variable de sobrevivencia semanal de semillas en el mar y peso, se analizó tomando en cuenta el tiempo y el tratamiento como efecto fijo. La interacción entre tiempo y tratamiento fue evaluada en los casos que correspondió. Cuando la interacción estaba

presente en los datos, se utilizó el mismo modelo para evaluar el efecto total de los tratamientos en cada tiempo. Los mejores modelos para el análisis de los datos se seleccionaron utilizando el menor valor del criterio de Akaike (AIC). Las diferencias entre los tratamientos fueron evaluadas mediante la prueba de comparación de medias LSD Fisher.

Para reducir el efecto multivariado de la información presentada con el contenido de ácidos grasos estos fueron reducidos a componentes principales mediante el análisis de componentes principales (PCA), mostrado en un gráfico biplot con el objetivo de evaluar las relaciones entre los tratamientos y los contenidos de ácidos grasos.

5. RESULTADOS

Etapa 1. Desarrollo larval y fijación

Durante el desarrollo larval, se obtuvieron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los tratamientos para la sobrevivencia diaria y la fijación, mientras que para las variables longitud, altura y sobrevivencia final no se encontraron diferencias significativas ($p > 0,05$) entre los tratamientos.

La evaluación del crecimiento en longitud y altura de las larvas durante el período de ensayo se muestra en la Figura 2, donde como era de esperar se observa que la longitud y altura de las ostras aumento con el tiempo, no existiendo diferencias significativas entre los tratamientos.

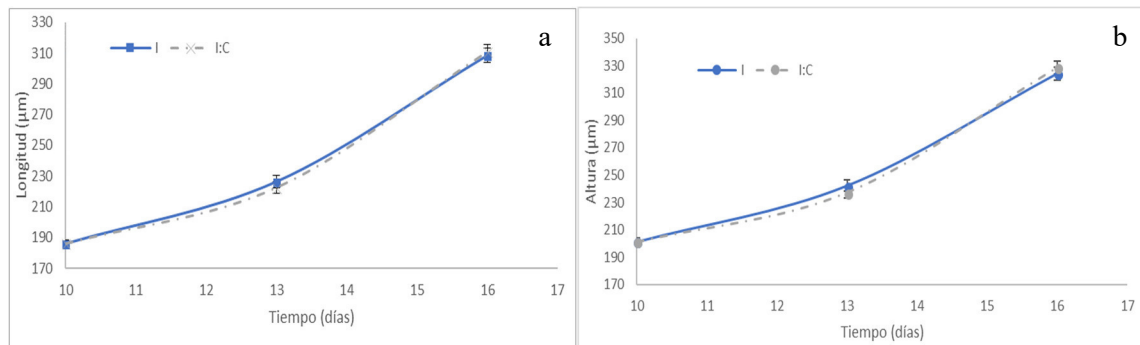


Figura 2. Crecimiento en longitud (panel a) y altura (panel b) de larvas de *C. gigas* a partir del día 10 post-fertilización.

*Los valores son representados como la media \pm error estándar, con $n = 3$ y 30 mediciones por réplica.

La sobrevivencia diaria de las larvas se muestra en la Figura 3. Las larvas que fueron alimentadas con el tratamiento I:P (línea naranja) empezaron a perder la capacidad natatoria apenas fueron alimentadas con esta dieta por lo que se fueron al fondo y no pudieron alimentarse, comportamiento que continuó por dos días, de tal manera que al día 12 ya no quedaban larvas vivas para continuar con este tratamiento.

Por otro lado, las larvas que fueron alimentadas con la mezcla I:C también tuvieron una disminución en la sobrevivencia en el día 11, (pasando de un $100 \pm 0\%$ a $16,7 \pm 10,5\%$), pero a partir de allí tuvo sobrevivencias diarias mayores, de manera que no presentó diferencias significativas con el control en los siguientes puntos de muestreo.

La sobrevivencia final que se obtuvo en esta etapa de desarrollo larval fue de $5,4 \pm 1,4\%$ para el tratamiento control y $4,7 \pm 2,4\%$ para el tratamiento I:C, sin presentar diferencias significativas ($p > 0,05$) entre ellos. Para el tratamiento I:P se obtuvo una sobrevivencia de 0% .

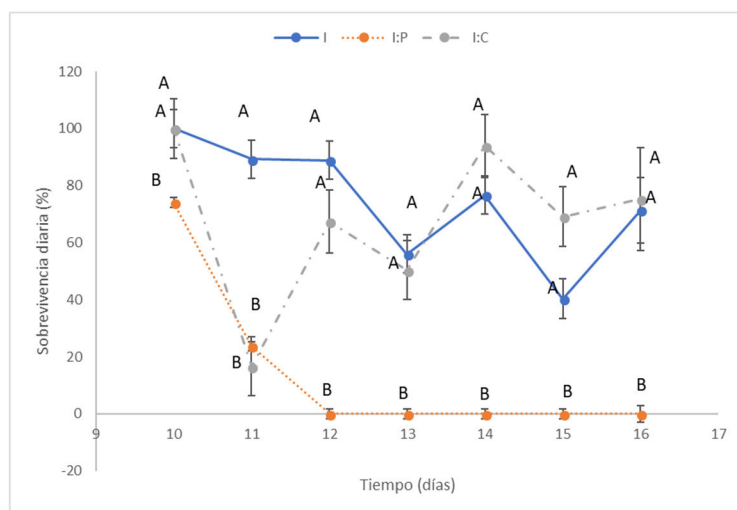


Figura 3. Sobrevivencia diaria (%) de larvas de *C. gigas* alimentadas con diferentes dietas.

*Presentados como la media \pm error estándar, con $n = 3$. Letras distintas en el mismo día representan diferencias significativas en cada tiempo con $p < 0,05$.

El inicio de la fijación ocurrió el día 17 para el tratamiento 1:1 I:C, mientras que para el tratamiento control ocurrió el día 18. Finalmente, los resultados de fijación muestran que el tratamiento I:C presentó una fijación de $77,1 \pm 3,3\%$ a diferencia del control para el cual se observó un $9,9 \pm 3,3\%$, siendo esta diferencia significativa.

Cuadro 3. Sobrevivencia global, día de inicio de fijación y fijación de larvas de *C. gigas* alimentadas con diferentes dietas.

Dieta	Sobrevivencia global (%) ¹	Inicio fijación (días post-fertilización)	Fijación (%) ¹
I	$5,4 \pm 0,8^a$	18	$9,9 \pm 3,3^b$
I:P	0	-	-
I:C	$4,7 \pm 1,4^a$	17	$77,1 \pm 3,3^a$

¹Letras diferentes representan diferencias significativas con $p < 0,0001$.

²Los resultados se muestran como la media \pm error estándar, con $n = 3$.

Etapa 2. Post-larvas hasta semillas en laboratorio.

Los resultados de la evaluación de los MLM de la segunda etapa del ensayo (desde 8 dpfi hasta 32 dpfi) se muestran en el Apéndice 3. Para esta etapa todas las variables medidas

presentaron diferencias significativas entre los tratamientos y la interacción tratamiento*tiempo también fue significativa ($p < 0,05$).

El crecimiento en longitud y altura que tuvieron las post-larvas hasta semillas se observa en la Figura 4. Para el crecimiento en longitud y en altura, se observa que los individuos que más crecieron fueron aquellos alimentados con I:C y I:P:C, obteniendo diferencias significativas ($p < 0,05$) en todos los tiempos entre estos tratamientos y el control I e I:P

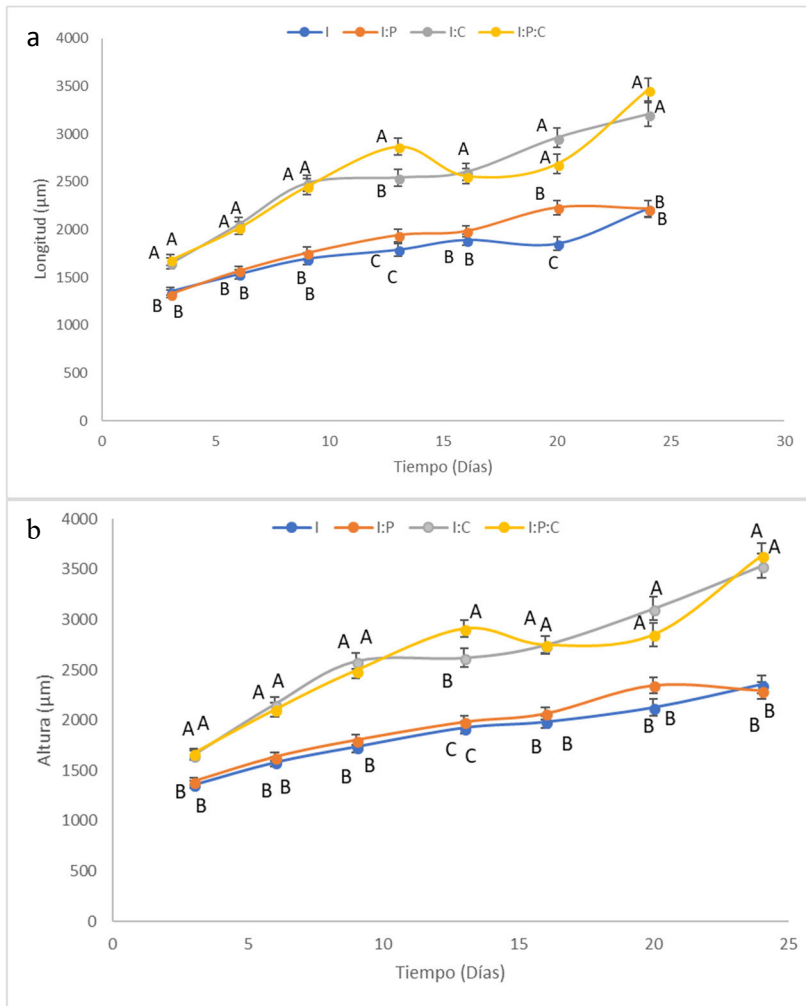


Figura 4. Crecimiento en longitud (panel a) y altura (panel b) de post-larvas de *C. gigas* durante 24 días.

Los valores son representados como la media \pm error estándar, con $n = 3$ y 50 mediciones por réplica. *Letras diferentes representan diferencias significativas con $p < 0,05$. Las letras se leen en sentido vertical (por fecha de evaluación).

Al evaluar la distribución de tamaños y la sobrevivencia global de las semillas se observaron diferencias significativas entre los tratamientos (Figura 5). La mayor sobrevivencia ($82,0 \pm 5,3$ %) se observó para el tratamiento I:C, la que se diferenció ($p < 0,05$) de todos los demás tratamientos. Seguida del tratamiento I:P:C, I e I:P respectivamente, sin presentar diferencias significativas entre ellos.

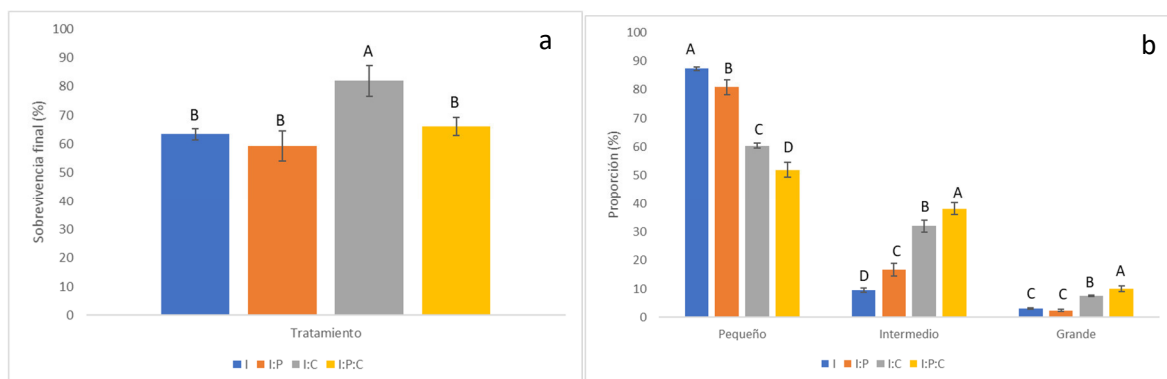


Figura 5. Sobrevivencia final (panel a) y proporción de tamaños (panel b) al final de la etapa de crecimiento en laboratorio de semillas de *Crassostrea gigas* alimentada con diferentes dietas.

*Presentado como la media \pm error estándar, con $n = 3$.

En la misma figura se observa que la distribución de tamaños presenta la misma tendencia para todos los tratamientos, siendo la mayor proporción los individuos pequeños, seguido del tamaño intermedio y con la menor proporción los individuos grandes. A pesar de esto se presentan diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0,05$) en cada tamaño; siendo el tratamiento I:P:C el que presentó mayor proporción de individuos intermedios y grandes con un 48,0 %, seguido del tratamiento I:C con un 37,5 %. Por último, los individuos que presentan menor proporción de estos individuos son el I:P e I con un total de 19,0 % y 12,6 %, respectivamente.

Cuadro 4. Contenido de ácidos grasos (mg/100 mg de grasa) de post-larvas de *Crassostrea gigas* (inicio) antes de iniciar los tratamientos y de semillas al finalizar el ensayo.

Ácido graso (mg/100 mg grasa)	Tratamiento				
	Inicio	I	I:P	I:C	I:P:C
Ácido Mirístico C14:0	5,60 \pm 0,72	5,45 \pm 0,43	5,27 \pm 2,25	3,51 \pm 0,61	7,55 \pm 1,44
Ácido Palmítico 16:0 ¹	19,67 \pm 1,76 ^b	31,38 \pm 3,10 ^a	36,57 \pm 2,60 ^a	29,65 \pm 1,64 ^a	33,72 \pm 2,53 ^a
Ácido Palmitoleico 16:1 ¹	4,81 \pm 0,47 ^{ab}	0,55 \pm 0,31 ^c	3,23 \pm 0,58 ^b	5,67 \pm 0,20 ^a	3,58 \pm 1,21 ^a ^b
Ácido Margárico 17:0	1,91 \pm 1,11	3,39 \pm 2,91	2,12 \pm 1,25	0,84 \pm 0,36	2,85 \pm 1,99
Ácido Estearico 18:0 ¹	5,15 \pm 0,35 ^c	11,26 \pm 1,38 ^{ab}	11,53 \pm 1,09 ^{ab}	9,98 \pm 0,30 ^b	14,03 \pm 1,84 ^a
Ácido Oleico 18:1n-9	17,25 \pm 0,46	20,81 \pm 2,84	17,14 \pm 1,52	12,53 \pm 2,09	12,54 \pm 3,98
Ácido Linoleico 18:2n-6 ¹	13,30 \pm 0,34 ^a	9,13 \pm 1,85 ^{ab}	7,44 \pm 2,15 ^b	5,78 \pm 0,84 ^{bc}	2,95 \pm 0,40 ^c
Ácido γ -linolenico 18:3n-6	2,47 \pm 0,12	2,17 \pm 0,70	2,65 \pm 0,21	4,18 \pm 0,65	2,87 \pm 0,91
Ácido cis-11-eicosenoico 20:1n-9	2,73 \pm 1,13	3,37 \pm 0,76	3,32 \pm 2,10	5,78 \pm 0,59	5,04 \pm 1,50
Ácido araquidónico 20:4n-6 ³	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
Ácido eicosapentaenoico 20:5n-3 ³	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
Ácido docosahexaenoico 22:6n-3 ³	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d

Ácido Tricosanoico 23:0 ¹	3,87 ± 0,33 ^b	4,49 ± 0,97 ^b	3,92 ± 0,65 ^b	8,82 ± 1,29 ^a	5,86 ± 1,94 ^{ab}
Ácido Nervónico 24:1n-9 ¹	6,31 ± 0,54 ^b	2,51 ± 0,16 ^b	5,24 ± 0,47 ^b	10,79 ± 0,94 ^a	8,03 ± 2,66 ^{ab}

¹Letras diferentes en cada fila representan diferencias significativas con $p < 0,05$.

²Representado como la media ± error estándar, con $n = 3$.

³n.d: No detectado.

El análisis de la composición de ácidos grasos en las post-larvas de *Crassostrea gigas* (inicio) y de las semillas que fueron alimentadas con las cuatro dietas antes de ser llevadas al mar se muestra el Cuadro 4. Para los ácidos grasos 16:0 y 18:0 al inicio se presenta una menor cantidad que al final en todos los tratamientos ($p < 0,05$); mientras que para el ácido graso 18:2n-6 presenta el contenido más alto, sin diferencias significativas con el tratamiento control. Respecto al ácido grasos 16:1n-9 el contenido inicial sólo presenta diferencias significativas con el tratamiento control, mientras que para los ácidos grasos 23:0 y 24:1n-9 sólo presenta diferencias significativas con el tratamiento I:C. Los demás ácidos grasos no presentan diferencias significativas entre el inicio y los tratamientos ($p > 0,05$).

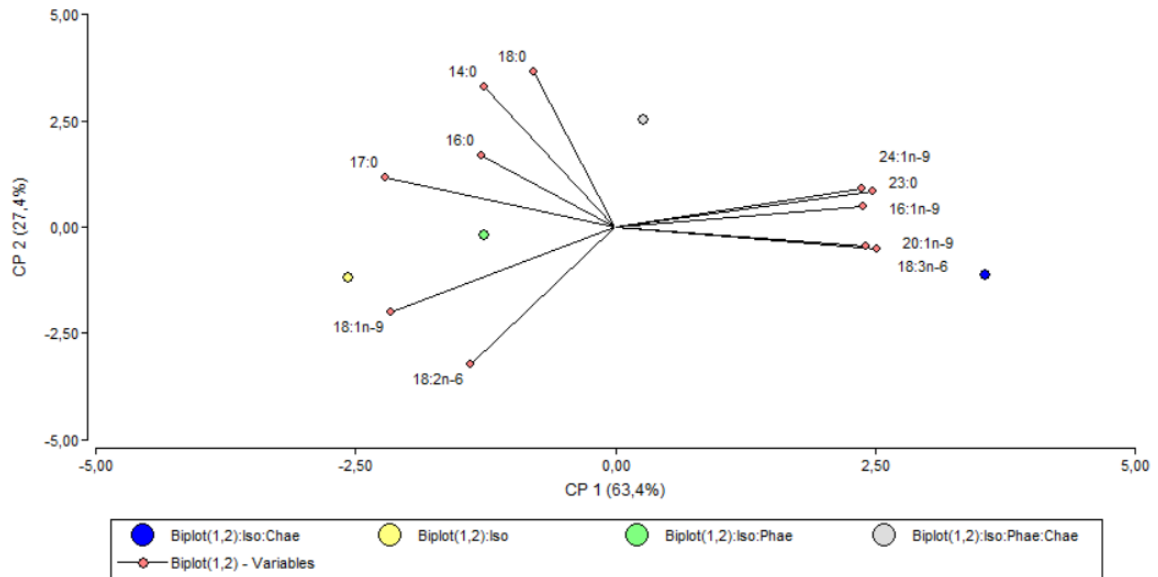


Figura 6. Biplot del PCA construido con los contenidos de los distintos ácidos grasos como variables para los distintos tratamientos de semillas de *C. gigas* antes de ser llevadas al mar. La información de la matriz de autovectores que construyen los componentes principales se encuentra en el Anexo 3.

Por otro lado, en la Figura 6 se presenta un gráfico biplot con los resultados del análisis de componentes principales realizado con los contenidos de los distintos ácidos grasos como variables originales. Juntos el componente principal 1 (CP1) y componente principal 2 (CP2) resumen un 91 % de la variabilidad total (La composición de cada componente se muestra en el Anexo 3). El CP1 se presenta en el eje X y el CP2 en el eje Y de la Figura 6. En él se observa que los individuos alimentados con 1:1 I:C presentan una correlación positiva con las cantidades de los ácidos grasos 24:1n-9, 23:0, 16:1n-9, 20:1n-9 y 18:3n-6, mientras que tiene una correlación negativa con los ácidos grasos 17:0 y 18:1n-9. Por otro lado los individuos de los tratamientos I y 1:1 I:P, presentan, una correlación positiva con el contenido de 17:0 y 18:1n-9 y una correlación negativa con 24:1n-9, 23:0, 16:1n-9, 20:1n-9 y 18:3n-6, a diferencia de los observado para I:C. Finalmente, el tratamiento de la dieta triple

presenta un comportamiento más central respecto al CP1, pero presenta una correlación positiva con los ácidos 14:0 y 18:0, y una correlación negativa con 18:2n-6.

Etapa 3. Semillas en el mar

Para el primer mes en el mar se obtuvo que, para el crecimiento en longitud, altura y peso la interacción tratamiento*tiempo fue significativa, mientras que para la sobrevivencia final existen diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los tratamientos y el tiempo, mientras que la interacción no es significativa.

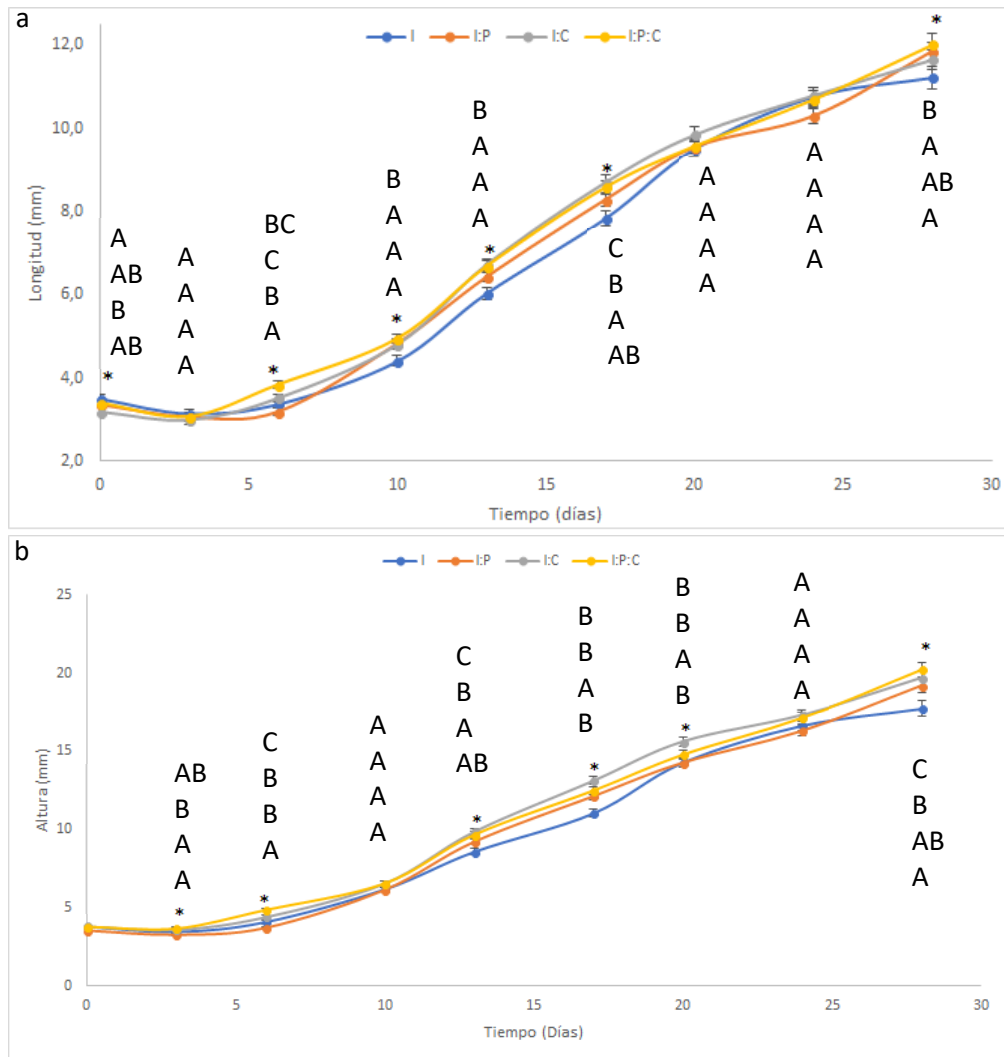


Figura 7. Crecimiento en longitud (panel a) y altura (panel b) de semillas de *C. gigas* durante el primer mes de siembra en el mar.

Los valores son presentados como media \pm error estándar, con $n = 3$ y 50 mediciones por réplica. El * significa los días donde existe diferencia significativa $p < 0,05$ entre los tratamientos en el día, letras diferentes representan diferencias significativas y se presentan los tratamientos de arriba abajo en el orden I, I:P, I:C e I:P:C, respectivamente.

El crecimiento en longitud y altura de las semillas al ser llevadas al mar se muestra en la Figura 7. Tanto con la variable longitud como con la altura, la interacción entre tiempo*tratamiento es significativa con $p < 0,05$ en ambos casos. Para la variable longitud existen diferencias significativas en los días 0, 6, 10, 13, 17 y 28 entre los tratamientos. Mientras que para la variable altura es en los días 3, 6, 13, 17, 20 y 28.

Al final del ensayo, los individuos alimentados con I:P:C tuvieron la mayor altura con $20,19 \pm 0,42$ mm, seguido del tratamiento I:C ($19,48 \pm 0,42$ mm), I:P ($18,99 \pm 0,37$ mm) y finalmente el tratamiento control ($17,82 \pm 0,44$ mm) (Figura 7), existiendo diferencias significativas entre los tratamientos I, I:P e IPC ($p < 0,05$), mientras que el tratamiento I:C no obtuvo diferencias significativas con I:P e I:P:C.

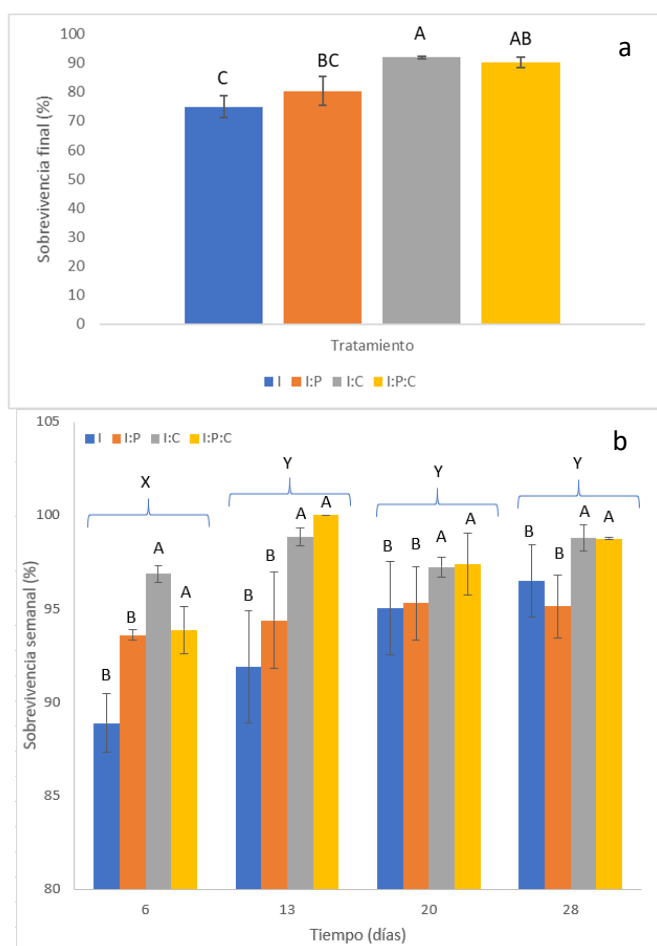


Figura 8. Sobrevivencia final (panel a) y semanal (panel b) de semillas de *Crassostrea gigas* durante el primer mes de siembra en el mar.

Presentados como la media \pm error estándar, con $n = 3$. * Las letras A, B y C representan diferencias significativas ($p < 0,05$) entre tratamientos, y las letras X, Y representan diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los tiempos.

Haciendo el mismo análisis para la variable longitud, los individuos que mayor crecimiento tuvieron al final del ensayo fueron los de los tratamientos I:P e I:P:C, con valores promedio de $12,02 \pm 0,22$ mm y $12,02 \pm 0,24$ mm, respectivamente; seguidos del tratamiento I:C ($11,72$

$\pm 0,24$ mm) y por último los individuos del tratamiento control ($11,16 \pm 0,26$ mm). Se obtuvieron diferencias significativas entre los tratamientos I:P e I:P:C con el control; mientras que el tratamiento I:C no obtuvo diferencias significativas con ningún tratamiento.

La sobrevivencia final se observa en la figura 8, en donde se obtuvo que el tratamiento I:C tiene la mejor sobrevivencia con un $91,93 \pm 0,52$ %, seguido del tratamiento I:P:C ($90,27 \pm 1,79$ %) y el tratamiento I:P ($80,27 \pm 4,98$ %); mientras que la menor sobrevivencia la tuvo el control con $74,87 \pm 3,76$ %. Para este parámetro se presentaron diferencias significativas entre los tratamientos I:C e I:P:C y el control ($p > 0,05$), y entre el tratamiento I:C y el I:P.

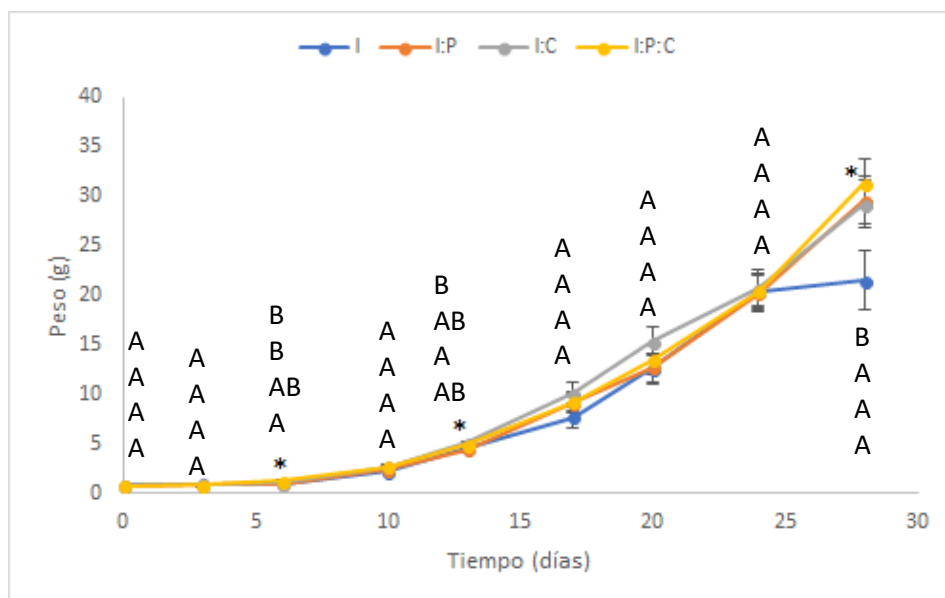


Figura 9. Cambio de peso de semillas de *C. gigas* durante el primer mes en el mar.

Los valores son presentados como media \pm error estándar, con $n = 3$. El * significa los días donde existe diferencia significativa $p < 0,05$ entre los tratamientos en el día, letras diferentes representan diferencias significativas y se presentan los tratamientos de arriba abajo en el orden I, I:P, I:C e I:P:C, respectivamente.

Respecto a la sobrevivencia semanal, la interacción de tiempo*tratamiento no fue significativa. Sin embargo, si hay diferencias significativas ($p < 0,05$) en los efectos individuales de tratamiento y de tiempo. Resultando que la menor sobrevivencia se encontró en la semana 1 con una media de $93,30$ % y es estadísticamente significativo con respecto a las otras 3 semanas. Respecto a los tratamientos, las dietas I:C e I:P:C son los que tienen la sobrevivencia semanal más alta con un promedio de $97,93$ % y $97,50$ % respectivamente, sin encontrarse diferencias significativas entre ellas. Mientras que las otras dos dietas tienen la menor sobrevivencia semanal con $94,60$ % para I:P y $93,06$ % para el control.

El cambio en el peso a lo largo del tiempo de siembra en el mar se muestra en la Figura 9. Durante el período de estudio se encontraron diferencias significativas en el peso entre los tratamientos los días 6, 13 y 28. En el último día, el tratamiento I:P:C presentó el mayor peso con $31,3 \pm 2,4$ g, seguido del I:P ($29,6 \pm 2,4$ g) y el I:C con $29,2 \pm 2,4$ g; mientras que el control presentó el menor valor con $21,5 \pm 3,0$ g. Se presentaron diferencias significativas

entre el control y los tratamientos I:P, I:C e I:P:C; pero no se presentaron diferencias significativas entre los tratamientos I:P, I:C e I:P:C.

6. DISCUSIÓN

Etapa 1. Desarrollo larval y fijación

Los resultados obtenidos en este ensayo durante la etapa de desarrollo larval señalan que la alimentación suministrada tiene efectos en el desarrollo larval en la especie *Crassostrea gigas*. Para esta especie, la dieta que mezcla la especies *Isochrysis galbana* y *Chaetoceros calcitrans* en una proporción 1:1 equivalente en volumen celular resultó en un inicio de fijación de un día antes y un porcentaje de fijación significativamente mayor en comparación con la dieta *I. galbana*. La especie *C. calcitrans* es una de las especies más recomendadas para el cultivo de larvas de bivalvos debido a su composición bioquímica, tamaño y digestibilidad (Pettersen *et al.*, 2010); y ha sido evaluada en diversos estudios de alimentación de larvas de bivalvos obteniendo una mayor fijación, crecimiento y sobrevivencia larval cuando se mezcla con alguna especie de la clase Prymnesiophyte (*I. galbana* y *Tisochrysis lutea*, entre otros) en especies como *Crassostrea gigas* (Rico-Villa *et al.*, 2006), *Mytilus galloprovincialis* (Pettersen *et al.*, 2010) y *Panopea generosa* (Liu *et al.*, 2016). En este caso, las diferencias sólo se observaron en el porcentaje de fijación, pues en la sobrevivencia final y el crecimiento en longitud y altura no se observaron diferencias entre esta dieta mixta y la dieta de *I. galbana* en esta etapa. Esto puede haber ocurrido pues la alimentación se suministró a partir del día 10, cuando ya se encontraban en estado de larva umbonada, mientras que en los estudios anteriores la alimentación inicio cuando las larvas se encontraban en larva D, teniendo más tiempo para que las dietas usadas puedan ejercer su efecto.

La mezcla *Phaedactylum tricornutum* con *Isochrysis galbana* fue la que tuvo el peor desempeño en la etapa de larvas, pues al segundo día de alimentación no había larvas nadando en la superficie para realizar el conteo, lo que significa una pérdida de la capacidad natatoria, que es una señal de que las larvas ya no son viables (Helm y Bourne, 2006). *Phaedactylum tricornutum* se ha utilizado en la alimentación de larvas de otras especies de bivalvos obteniendo resultados positivos en *Anomalocardia brasiliana* con sobrevivencia de 25 %. Mientras que para *Ostrea edulis* y *Crassostrea gigas* no presentó diferencias significativas con el control de *I. galbana* en crecimiento, sobrevivencia y asentamiento (Wilson, 1978), y para *Panopea generosa* la alimentación con esta microalga representó un resultado con crecimiento menor, pero una sobrevivencia sin diferencias significativas con *C. calcitrans* y otras microalgas flageladas (Liu *et al.*, 2016). En todos estos estudios se alimentaron las larvas con la microalga individualmente y no se observaron mortalidades elevadas, por lo que es probable que la mezcla entre *I. galbana* y *P. tricornutum* pueda tener una interacción negativa en el sentido nutricional que afecta la capacidad natatoria de las larvas.

Uno de los efectos que pudo llevar a que esto ocurriera es el tamaño de la microalga *P. tricorutum* pues se ha estudiado que para los bivalvos uno de los factores de selección de alimentos es el tamaño de la partícula (Ren *et al.*, 2015), en este sentido la especie *P. tricorutum* aislada del golfo de Nicoya presentó un tamaño de $10,9 \pm 0,3 \mu\text{m}$ de longitud y $3,1 \pm 0,1 \mu\text{m}$ de ancho (Rodríguez-Núñez *et al.*, 2016). Baldwin y Newell (1995) encontraron en diferentes estudios que para *Crassostrea virginica* individuos de $107 \mu\text{m}$ pudieron consumir partículas de $10 - 16 \mu\text{m}$ en un experimento, pero individuos de $203 \mu\text{m}$ sólo ingirieron partículas de $1 - 10 \mu\text{m}$ en otro. Por otro lado, Cole y Galloway (2015) observaron que larvas de *Crassostrea gigas* de 10 días post-fertilización consumían partículas de microplásticos de $10,4 \mu\text{m}$ con la misma frecuencia y cantidad que de $4,10 \mu\text{m}$. Al iniciar el ensayo el día 10 post-fertilización, las larvas tienen un tamaño promedio de $201,2 \pm 24,3 \mu\text{m}$, por lo que puede que no la hayan podido ingerir. Pero esto queda descartado debido a que en una etapa previa al estudio se comprobó que si la ingerían.

A pesar de lo anterior, en estudios de inanición realizados en larvas de *Crassostrea gigas* se ha observado que las larvas de 10 dpf pueden soportar un periodo de inanición de 4 días sin tener mortalidades masivas (Kheder *et al.*, 2010). Algunas microalgas como la *Caulerpa taxifolia* que fue introducida en el mar mediterráneo genera metabolitos secundarios que provocan la muerte de individuos de erizo de mar (*Paracentrotus lividus*) durante todo su desarrollo larval (Pedrotti *et al.*, 1996). La microalga *P. tricorutum* posee una serie de compuestos bioactivos que la hace interesante para la industria farmacéutica y de biocombustibles que varían de acuerdo a la forma y a la fase de crecimiento en la que se encuentre (Prestegard *et al.*, 2016). Es posible que la combinación de *P. tricorutum* e *I. galbana* generen algunos compuestos que afecten la capacidad natatoria de las larvas y con eso la viabilidad del cultivo. Por lo que esta combinación no es recomendada para la alimentación de larvas de *C. gigas*.

Los efectos individuales de las dietas de *C. calcitrans* y *P. tricorutum* no se evaluaron dentro de este estudio por limitantes espaciales dentro del laboratorio. Sin embargo, para la etapa larval se ha estudiado que la utilización de *C. calcitrans* genera las mejores sobrevivencias para *Ostrea edulis* y *C. gigas* (Marshall *et al.*, 2010). A pesar de esto, la producción de *C. calcitrans* es limitante e inestable bajo las condiciones ambientales de cultivo del laboratorio de microalgas de la EBM, UNA; con densidades celulares máximas de $1\ 000$ células/mL a $24\ ^\circ\text{C}$ en el cultivo intermedio y 700 células/mL en el cultivo masivo. Esto no es suficiente para alimentar a toda la población de individuos durante el proceso de cultivo temprano de larvas y semillas. Por lo tanto, con el fin de adecuar los resultados de este ensayo a las condiciones de proceso, se evaluaron las dietas mixtas.

Etapa 2. Post-larvas y semillas en el laboratorio

Durante la etapa de crecimiento de semilla en el laboratorio se observó que, para el crecimiento en longitud y altura, los tratamientos con mezclas de *C. calcitrans* tuvieron un crecimiento mayor tanto en longitud como en altura comparados con los otros dos tratamientos. En juveniles de *Crassostrea cortizencis*, las mejores dietas fueron las que tenían *C. calcitrans* en su composición (Rivero-Rodríguez *et al.*, 2007), lo mismo que para

individuos de *Panopea generosa* (Liu *et al.*, 2016) y *Mytilus galloprovincialis* (Pettersen *et al.*, 2010). Por otro lado, para *Crassostrea cortiziensis* individuos alimentados con dieta de *I. galbana* e *I. galbana*: *P. tricornutum* tuvieron los menores crecimientos, siendo estas microalgas consideradas de bajo valor nutricional para la alimentación de juveniles de bivalvos (Rivero-Rodríguez *et al.*, 2007). Sin embargo, para *Panopea generosa* se mejoró el crecimiento con la dieta mixta *I. galbana*: *P. tricornutum* al compararla con una de sólo *I. galbana* (Ren *et al.*, 2015). Los resultados del presente estudio indican que la combinación *P. tricornutum*: *I. galbana* no es significativamente mejor que *I. galbana* para el crecimiento de los individuos. El efecto que esta combinación tiene parece estar asociado al género en donde se realizan los estudios. Por lo que es probable que para el género *Crassostrea* esta dieta no cumpla con los requerimientos nutricionales para un buen desempeño productivo, al igual que la dieta monoalgal de *I. galbana*.

La sobrevivencia también fue mejor en los individuos alimentados con la dieta *I. galbana*: *C. calcitrans*. Las otras tres dietas no presentaron diferencias significativas en la sobrevivencia entre ellas. Con lo observado en este experimento es posible que la presencia de *P. tricornutum* en las dietas I:P:C tenga un efecto negativo sobre esta variable. Esto puede estar asociado a que *P. tricornutum* es una especie con una digestibilidad baja, lo cual se ha reportado anteriormente en varias especies de ostras (*Crassostrea gigas*, *C. cortiziensis*, *C. virginica* y *Ostrea edulis*) y almejas (*Mercenaria mercenaria*) que presentan bajos crecimientos; sin embargo en sobrevivencia no hay efectos significativos en *Panopea generosa* (Ren *et al.*, 2015). Debido a que el proceso digestivo depende de la capacidad de los individuos a sintetizar las enzimas apropiadas para la especie consumida (Ren *et al.*, 2015), los resultados de este estudio señalan que es posible que la especie *C. gigas* no posea las enzimas necesarias para realizar la digestión completa de *P. tricornutum* y que esto tenga un efecto sobre la digestión de las otras especies de microalgas. Por otro lado, también puede deberse a un posible balance inadecuado de nutrientes generado por la especie *P. tricornutum* y que haga que no sea apta para la alimentación de esta especie. Una combinación de ambas opciones podría también explicar los resultados.

A nivel productivo, para clasificar el tamaño de las semillas para ser trasladadas al mar se realiza una separación de tamaños con tamices. La talla de comercialización que se utiliza en Costa Rica son individuos que se encuentran entre 2.800 μm y 4.800 μm . Esta etapa es de suma importancia el tiempo en el que se alcancen esas tallas para reducir los costos productivos (Vásquez *et al.*, 2007). En este sentido, la dieta triple (I:P:C) es la que generó una mayor proporción de individuos con un tamaño mayor a 2.800 μm , seguida por la dieta de I:C. Y las dietas con la menor proporción de individuos de más de 2.800 μm fue la de *I. galbana*, seguida de la I:P. Esto, al contrastarlo con la sobrevivencia puede resultar en que los nutrientes aportados por *C. calcitrans* en la dieta I:P:C están relacionados positivamente con el crecimiento a pesar de la baja sobrevivencia. Por lo tanto, se podría decir que *P. tricornutum* afecta negativamente la sobrevivencia, pero que la presencia de *C. calcitrans* genera un crecimiento elevado a pesar de la baja sobrevivencia. Debido a un posible efecto corrector o de balance de nutrientes que están relacionados con el crecimiento.

En diversos estudios, se ha observado que el crecimiento y la sobrevivencia se han asociado al contenido de ácidos grasos en juveniles de bivalvos (Rivero-Rodríguez *et al.*, 2007; Reis Batista *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2016). Con el análisis de componentes principales de este estudio, se vio que existe una correlación entre el contenido de los ácidos grasos 24:1n-9, 23:0, 16:1, 20:1n-9 y 18:3n-6 con la dieta de *I. galbana* y *C. calcitrans*, los cuáles presentaron las mejores sobrevivencias. De estos ácidos grasos, el tratamiento I:C presentó un mayor contenido de 16:1, lo que indica que la cantidad de este ácido graso está correlacionada positivamente con la sobrevivencia en semillas de *Crassostrea gigas*. Los mecanismos por los cuál este ácido graso genera incrementos en la sobrevivencia podrían estar asociados a que éste es metabolizado en *C. gigas* como precursor de EPA y ARA (Da Costa *et al.*, 2015) Por otro lado, en el contenido de los ácidos grasos 23:0 y 24:1n-9, la dieta I:C e I:P:C obtuvieron los mayores valores, esto se puede asociar al mayor crecimiento obtenido en estos tratamientos. Pero para estos ácidos grasos, no hay ninguna referencia previa de su posible efecto en el crecimiento.

Respecto al contenido de ácidos grasos, se puede observar que en este estudio el contenido de ARA, EPA y DHA no aparece detectado en ninguna especie ni mezcla de alimentación, esto se pudo deber a diversos factores asociados al manejo de la muestra y la metodología empleadas para la detección en el laboratorio. Sin embargo, estos son los ácidos grasos más importantes asociados a la sobrevivencia y el crecimiento de juveniles de bivalvos (Rivero-Rodríguez *et al.*, 2007; Reis Batista *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2016). Si se realiza un ejercicio de estimación de los contenidos de estos ácidos grasos suministrados por la dieta, según lo descrito por Rivero-Rodríguez *et al.* (2007) la cantidad de ARA de las mezclas serían 0; 0,4; 7,8 y 6,2 % del total de ácidos grasos para los tratamiento I, I:P, I:C e I:P:C, respectivamente; mientras que para EPA serían 0,9; 18,0; 18,5; 22,3 % del total de ácidos grasos y para DHA serían 26,8; 14,2; 9,8; 7,9 %, respectivamente. Este ejercicio se realiza con el fin de tratar de explicar ciertas condiciones, con el entendido de que la composición de ácidos grasos de las especies de microalgas varía de acuerdo a la cepa y las condiciones ambientales con las que se cultiven (Zhu *et al.*, 1997).

Analizando el contenido estimado de estos ácidos grasos, se podría decir que el nivel de ARA de las dietas I:C e I:P:C está relacionada positivamente con el crecimiento y el nivel de DHA está relacionado negativamente con el crecimiento para esta especie; mientras que el EPA no tiene efecto en esta variable. Caso contrario de lo ocurrido para *Cerastoderma edule* donde el contenido de ARA y DHA no están relacionados con el crecimiento, pero si el contenido de EPA (Reis Batista *et al.*, 2014). Estudiando la sobrevivencia, se ha observado que dietas que no contienen DHA presentan altas mortalidades en *Cerastoderma edule* (Reis Batista *et al.*, 2014); sin embargo debido a que la especie *I. galbana* se encuentra en todas las dietas, este no es un efecto que se puede asociar a la sobrevivencia. De acuerdo con lo estimado, el contenido de ARA otorgado por la dieta I:C generaría la mayor sobrevivencia en los individuos.

Etapa 3. Semillas en el mar

Cuando se evalúa la sobrevivencia en el mar, también se concluye que las mayores sobrevivencias se obtuvieron cuando los individuos que tenían *C. calcitrans* en su dieta. El

efecto directo que tiene la dieta sobre la sobrevivencia en el mar no se ha estudiado; sin embargo, se ha observado que las dietas que contienen *C. calcitrans*, incrementan la respuesta inmune de *Crassostrea gigas* al incrementar el conteo de granulocitos, porcentaje de granulocitos, tasa de fagocitosis y actividad oxidativa (Delaporte *et al.*, 2003). Una posible explicación para este proceso es que el contenido de ARA produzca una reacción en cadena en la producción de eicosanoides que genera una mejora en la respuesta inmune de las ostras (Delaporte *et al.*, 2006).

Esta capacidad de responder ante patógenos toma relevancia cuando los individuos son trasladados al mar, pues pasan de un ambiente controlado a uno que no lo es (Allam y Raftos, 2015). Respecto a esto, se observa un comportamiento general de una disminución de la sobrevivencia durante la evaluación de la primera semana en el mar. Sin observarse diferencias significantes en la sobrevivencia en las otras tres semanas. Cuando los individuos son trasladados del criadero al mar se encuentran enfrentados a una serie de estresores que los hace más susceptibles a la infección con bacterias y virus que pueden provocar la mortalidad (Allam y Raftos, 2015). A pesar de esto, desde la primera semana los individuos que tuvieron una alimentación con *C. calcitrans* (I:C e I:P:C) tuvieron una mayor sobrevivencia. Esto podría deberse a que los individuos tendrían reservas de ARA mayores y una mejor respuesta inmune para afrontar esa condición (Delaporte *et al.*, 2006).

A nivel comercial, la altura es la medida que se utiliza para definir cuando un individuo ha alcanzado la talla comercial (Helm y Bourne, 2006). En este experimento, se observó que al igual que la sobrevivencia, las dietas que tenían *C. calcitrans*, tuvieron un crecimiento significativamente mayor en altura. Esto comprueba que, a pesar de estar en el mar, donde la alimentación se igualó por condiciones naturales en todos los tratamientos, las reservas generadas durante la alimentación en tierra influyen durante el primer mes en el mar de individuos de *C. gigas*.

Lo innovador de este estudio es que comprobó que la alimentación no es sólo importante para los individuos de *C. gigas* durante su cultivo en el laboratorio, pues afecta la fijación, la sobrevivencia y el crecimiento de post-larvas y semillas; sino que el efecto de esta alimentación se prolonga el primer mes en el mar siendo importante para la sobrevivencia y el crecimiento de los individuos en mar.

7. CONCLUSIONES

La dieta mixta *I. galbana* y *C. calcitrans* genera una mayor fijación; pero no afecta la sobrevivencia y crecimiento larval en individuos de *Crassostrea gigas*. La dieta mixta *I. galbana* y *P. tricornutum* no es apta para la alimentación larval porque genera mortalidad total de la población. La mejor dieta de las estudiadas sería la mezcla *I. galbana* y *C. calcitrans*; sin embargo, falta estudiar la dieta individual de *C. calcitrans* para ver el efecto sobre esta población, pues en la literatura es la dieta que genera mayores sobrevivencias.

La dieta mixta *I. galbana* y *C. calcitrans* genera las mayores sobrevivencias en las post-larvas y semillas tanto en el laboratorio como en el mar. La dieta mixta *I. galbana*, *P. tricornutum*

y *C. calcitrans* genera los mayores crecimientos en ambas etapas. Finalmente, la dieta mixta *I. galbana* y *P. tricornutum* no presentó una mejora significativa con el control en los parámetros medidos en post-larvas y semillas en el laboratorio y en el mar. Por lo que, la mejor dieta de las estudiadas para semillas de *C. gigas* es la mezcla *I. galbana* y *C. calcitrans*. Respecto al perfil de ácidos grasos, sería necesario volver a evaluar utilizando un método más sensible y en un laboratorio que tenga experiencia procesando muestras de microalgas. El próximo paso sería evaluar el efecto de la dieta de *C. calcitrans* sola y, las posibles mejoras en el proceso productivo de esta microalga, para que sea rentable y factible la utilización en mayor proporción en el laboratorio de cultivo y reproducción de moluscos de la EBM, UNA.

8. LITERATURA CITADA

Allam, B., and Raftos, D. 2015. Immune responses to infectious diseases in bivalves. *Journal of Invertebrate Pathology* 131:121–136.

Baldwin, B. S., and Newell, R. I. 1995. Relative importance of different size food particles in the natural diet of oyster larvae (*Crassostrea virginica*). *Marine Ecology Progress Series* 120(1–3):135–146.

Ben Kheder, R., Quéré, C., Moal, J., and Robert, R. 2010. Effect of nutrition on *Crassostrea gigas* larval development and the evolution of physiological indices. Part B: Effects of temporary food deprivation. *Aquaculture* 308(3–4):174–182.

Brown, M. R. 2002. Nutritional value and use of microalgae in aquaculture. In L. E. Cruz-Suárez, D. Ricque-Marie, M. Tapia-Salazar, M. G. Gaxiola-Cortés, and N. Simones (Eds.), *Avances en Nutrición Acuícola VI. Memorias del VI Simposium Internacional de Nutrición Acuícola* (pp. 281–292). Cancún, Quintana Roo, México.

Brown, M. R., McCausland, M. A., and Kowalski, K. 1998. The nutritional value of four Australian microalgal strains fed to Pacific oyster *Crassostrea gigas* spat. *Aquaculture* 165(3–4):281–293.

Cole, M., and Galloway, T. S. 2015. Ingestion of Nanoplastics and Microplastics by Pacific Oyster Larvae. *Environmental Science and Technology* 49(24):14625–14632.

Da Costa, F., Robert, R., Quéré, C., Wikfors, G. H., and Soudant, P. 2015. Essential fatty acid assimilation and synthesis in larvae of the bivalve *Crassostrea gigas*. *Lipids* 50(5):503–511.

Delaporte, M., Soudant, P., Moal, J., Giudicelli, E., Lambert, C., Séguineau, C., and Samain, J. F. 2006. Impact of 20:4n-6 supplementation on the fatty acid composition and hemocyte parameters of the pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Lipids* 41(6):567–576.

- Delaporte, M., Soudant, P., Moal, J., Lambert, C., Quéré, C., Miner, P., Samain, J.F. 2003. Effect of a mono-specific algal diet on immune functions in two bivalve species - *Crassostrea gigas* and *Ruditapes philippinarum*. *Journal of Experimental Biology* 206(17):3053–3064.
- Fernández-Reiriz, M. J., Irisarri, J., and Labarta, U. 2017. Fatty acid composition of female and male clams (*Ruditapes philippinarum*): energy intake and temperature reliance. *Aquaculture Nutrition* 23(1):119–128.
- Genard, B., Pernet, F., Lemarchand, K., Boudry, P., Moraga, D., and Tremblay, R. 2011. Physiological and biochemical changes associated with massive mortality events occurring in larvae of American oyster (*Crassostrea virginica*). *Aquatic Living Resources* 24(3):247–260.
- Guedes, C. A., and Malcata, X. F. 2012. Nutritional Value and Uses of Microalgae in Aquaculture. p.59-79. *In* Muchlisin, Z (ed.). *Aquaculture*. InTech, Kuala, Indonesia.
- Helm, M. M., and Bourne, N. 2006. *Cultivo de bivalvos en criadero: un manual práctico*. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura (FAO), Roma, Italia.
- Hurtado, M. A., Reza, M., Ibarra, A. M., Wille, M., Sorgeloos, P., Soudant, P., and Palacios, E. 2009. Arachidonic acid (20:4n-6) effect on reproduction, immunology, and prostaglandin E2 levels in *Crassostrea corteziensis* (Hertlein, 1951). *Aquaculture* 294(3–4):300–305.
- Lavens, P., and Sorgeloos, P. 1996. *Manual on the production and use of live food for aquaculture*. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura (FAO), Roma, Italia.
- Liu, W., Pearce, C. M., McKinley, R. S., and Forster, I. P. 2016. Nutritional value of selected species of microalgae for larvae and early post-set juveniles of the Pacific geoduck clam, *Panopea generosa*. *Aquaculture* 452:326–341.
- Marshall, R., Mckinley, S., and Pearce, C. M. (2010). Effects of nutrition on larval growth and survival in bivalves. *Reviews in Aquaculture* 2:33–55.
- Pedrotti, M. L., Marchi, B., and Lemee, R. 1996. Effects of *Caulerpa taxifolia* secondary metabolites on the embryogenesis, larval development and metamorphosis of the sea urchin *Paracentrotus lividus*. *Oceanologica Acta* 19:255–262.
- Pettersen, A. K., Turchini, G. M., Jahangard, S., Ingram, B. A., and Sherman, C. D. H. 2010. Effects of different dietary microalgae on survival, growth, settlement and fatty acid composition of blue mussel (*Mytilus galloprovincialis*) larvae. *Aquaculture* 309(1–4):115–124.
- Prestegard, S. K., Erga, S. R., Steinrücken, P., Mjøs, S. A., Knutsen, G., and Rohloff, J. 2016. Specific metabolites in a *Phaeodactylum tricornutum* strain isolated from Western Norwegian fjord water. *Marine Drugs* 14(9):1-17.

- Reis Batista, I., Kamermans, P., Verdegem, M. C. J., and Smaal, A. C. 2014. Growth and fatty acid composition of juvenile *Cerastoderma edule* (L.) fed live microalgae diets with different fatty acid profiles. *Aquaculture Nutrition* 20(2):132–142.
- Ren, Y., Liu, W., Pearce, C. M., Forster, I., and Mckinley, R. S. 2015. Effects of selected mixed-algal diets on growth and survival of early postset juveniles of the Pacific geoduck clam, *Panopea generosa* (Gould, 1850). *Aquaculture Nutrition* 21(2):152–161.
- Rico-Villa, B., Le Coz, J. R., Mingant, C., and Robert, R. 2006. Influence of phytoplankton diet mixtures on microalgae consumption, larval development and settlement of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Aquaculture* 256:377–388.
- Rivero-Rodríguez, S., Beaumont, A. R., and Lora-Vilchis, M. C. 2007. The effect of microalgal diets on growth, biochemical composition, and fatty acid profile of *Crassostrea corteziensis* (Hertlein) juveniles. *Aquaculture*, 263(1–4):199–210.
- Rodríguez-Núñez, K., Toledo, P., and Arias, S. 2016. Isolation of two diatom species with aquaculture potential (Bacillariophyceae) from the Pacific of Costa Rica. *UNED Research Journal*, 8(1):93-98.
- Sakamoto, K., Okimasu, E., and Amenura, A. 1997. Effects of Microalgal Live Foods on the Growth for the Larval Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Suisanzoshoku* 2:527–532.
- Sewell, M. a. 2005. Utilization of lipids during early development of the sea urchin *Evechinus chloroticus*. *Marine Ecology Progress Series* 304:133–142.
- Vásquez, H. E., Pérez, R. J., Pacheco, S. P., and Kani, K. 2007. Manual Técnico de Producción de Semillas de Ostra del Pacífico (*Crassostrea gigas*) y Manual Técnico sobre el Cultivo de Engorde de Ostra del Pacífico (*C. gigas*) en las Comunidades Modelos. JICA, El Salvador.
- Wilson, J. H. 1978. The food value of *Phaeodactylum tricornutum* bohlin to the larvae of *Ostrea edulis* l. and *Crassostrea gigas* Thumberg. *Aquaculture* 13:313–323.
- Zhu, C. J., Lee, Y. K., & Chao, T. M. (1997). Effects of temperature and growth phase on lipid and biochemical composition of *Isochrysis galbana* TK1. *Journal of Applied Phycology*, 9(5), 451–457. <https://doi.org/10.1023/A:1007973319348>

9. ANEXOS

ANEXO 1. NO-PS-IPS-01 Instructivo de producción de semillas. Laboratorio de Cultivo y Producción de Moluscos, EBM, UNA.

Instructivo Producción de Semilla	Código		
	NO-PS-IPS-01		
	# Versión # Revisión # Página		
	1		1/8
	Rige a partir de Próxima Revisión		

Tabla de contenidos

Introducción.....	2
Objetivos.....	2
Alcance.....	2
Requerimientos.....	2
Responsable.....	3
Definiciones y Conceptos.....	3
Documentos de Referencia	4
Entradas, transformación y salidas del procedimiento.....	5
Descripción de las actividades.....	6
Flujo producción de semilla.....	7
Variables a controlar.....	8
Parámetros / Tolerancias.....	8

_____ Elaborado por:	_____ Revisado por:	_____ Aprobado por:	_____ Fecha aprobación:
-------------------------	------------------------	------------------------	----------------------------

Introducción

La ostra Japonesa (*Crassostrea gigas*) es un molusco que se ha introducido a nuestro país con el fin de mejorar los ingresos económicos de los pescadores, en este instructivo se indicaran una serie de datos requeridos para el cultivo de semilla de la ostra, en donde intervienen, el aspecto biológico asociado directamente a la calidad de los reproductores, y aspectos relacionados con los parámetros físico-químicos (la temperatura, calidad del agua, salinidad, etc.).

Cabe recalcar la importancia de transferir la experiencia teórica práctica y que a la vez sirva de orientación de las necesidades y conocimientos previos que deben tenerse antes de hacerse el cultivo de ostras.

Objetivos

Objetivo general

- Disponer de una serie de métodos que garanticen una semilla viable y de excelente calidad.

Objetivos específicos

- Establecer tecnologías de producción de semillas de ostras
- Garantizar semillas viables y de buena calidad para su cultivo

Alcance

Este procedimiento aplica para las personas que intervienen en el proceso de producción de semilla.

Requerimientos

A continuación se mencionan una serie de requerimientos para la producción de semilla:

Código	Versión	Página
NO-PS-IPS-01	1	2/8

Laboratorio de producción de semilla:

- Reproductores
- Sistema de bombeo de agua marina
- Reservorios de agua marina
- Sistema de tratamiento de agua marina (filtros de arena, sedimentadores, microfiltros y sistema de luz ultravioleta).
- Sistema de acondicionamiento de reproductores (Biofiltro, Chiller, bomba y acuarios)
- Microscopio
- Tanques de mantenimiento larval
- Calentadores de agua
- Sistema de fijación larval (tanques, bandejas, concha molida)
- Balanza digital
- Cristalería
- Tamices
- Termómetro
- Manguera
- Caliper (pie de rey)

Responsable

El personal de la Estación de Biología Marina de la UNA es el responsable de producir la semilla, la transferencia tecnológica a los grupos que inician la actividad y parte del acompañamiento durante el desarrollo de la etapa productiva.

Código	Versión	Página
NO-PS-IPS-01	1	3/8

Definiciones y Conceptos

Reproductores: Ostras seleccionadas y destinadas para la reproducción.

Sistema de acondicionamiento: Dispositivo de aclimatación de los reproductores bajo condiciones controladas.

Biofiltro: Filtro biológico encargado de la extracción de compuestos químicos del agua, con el fin de mantenerla en condiciones óptimas para los organismos

Chiller: Sistema de enfriamiento de agua.

Microscopio: Instrumento utilizado para ver microorganismos.

Tamices: Mallas utilizadas para el desdoble de larvas y semillas de ostra.

Termómetro: Instrumento que sirve para tomar temperatura.

Balanza digital: Instrumento de precisión para determinar el peso y cantidad de semillas.

Documentos de Referencia

Instructivo Producción de Semilla NO-PS-IPS-01: En este instructivo se detallan una serie de requerimientos estructurados para preparar el laboratorio y producir semillas aptas para su cultivo.

Código	Versión	Página
NO-PS-IPS-01	1	4/8

Entradas, transformación y salidas del procedimiento.

Entradas

- Reproductores
- Sistemas de bombeo de agua.
- Reservorios de agua marina.
- Sistema de tratamiento de agua marina.
- Sist. acondicionamiento de reproductores.
- Microscopio
- Tanques
- Calentadores
- Sistemas de fijación
- Instrumentos de medición.
- Instructivo Producción de Semilla NO-PS-IPS-01.**

Transformación

- Acondiona y prepara el sitio para la copulación de los reproductores, y producción de semilla.
- Se da mantenimiento de los reproductores.
- Se induce al desove
- Se da mantenimiento larval.
- Se fijan las larvas

- Según el **Instructivo Producción De Semilla NO-PR-IPS-01.**

Salidas


















- Entrega el producto final (semilla) en condiciones aceptables para el cultivo en las zonas ya establecidas por productores ostrícolas.

Código	Versión	Página
NO-PS-IPS-01	1	5/8

Descripción de las actividades

No.	Actividad	Encargado
	Inicio	
1	Transporte de reproductores desde la unidad experimental hasta el laboratorio.	Encargado de la UNA
2	Alimentación constante de los reproductores en el sistema de acondicionamiento, empleando microalgas producidas en laboratorio.	Encargado de la UNA
3	Monitoreo de parámetros físico-químicos para garantizar condiciones óptimas en el laboratorio.	Encargado de la UNA
4	Limpieza lavado de organismos	Encargado de la UNA
5	Inducción a desove empleando la técnica de choque térmico	Encargado de la UNA
6	Fertilización controlada	Encargado de la UNA
7	Alimentación constante empleando microalgas producidas en laboratorio.	Encargado de la UNA
8	Limpieza periódica de los tanques donde se encuentran las larvas.	Encargado de la UNA
9	Regulación de densidad de larvas.	Encargado de la UNA
10	Preparación de bandejas de fijación.	Encargado de la UNA
11	Adición de concha molida como sustrato para que las larvas se adhieran.	Encargado de la UNA
12	Alimentación constante con microalgas producidas en laboratorio.	Encargado de la UNA
13	Limpieza periódica de los sistemas de fijación.	Encargado de la UNA
14	Control de la densidad de semilla de ostra.	Encargado de la UNA
15	Determinación de cantidad de semillas.	Encargado de la UNA
16	Despacho de semilla a los productores.	Encargado de la UNA
	Fin	

Flujo producción de semilla

Producción de Semilla		
Pasos	Descripción	Encargado de la UNA
	Inicio	
1	Transporte de reproductores desde la unidad experimental hasta el laboratorio.	
2	Alimentación constante de los reproductores en el sistema de acondicionamiento, empleando microalgas producidas en laboratorio.	
3	Monitoreo de parámetros físico-químicos para garantizar condiciones óptimas en el laboratorio.	
4	Limpieza lavado de organismos	
5	Inducción a desove empleando la técnica de choque térmico	
6	Alimentación constante empleando microalgas producidas en laboratorio.	
7	Limpieza periódica de los tanques donde se encuentran las larvas.	
8	Regulación de densidad de larvas.	
9	Preparación de bandejas de fijación.	
10	Adición de concha molida como sustrato para que las larvas se adhieran.	
11	Alimentación constante con microalgas producidas en laboratorio.	
12	Limpieza periódica de los sistemas de fijación.	
13	Control de la densidad de semilla de ostra.	
14	Determinación de cantidad de semillas.	
15	Despacho de semilla a los productores.	
	Fin	

Variables a controlar

- Temperatura
- Tasa de alimentación
- Proporción de gametos para la fertilización
- Densidad de cultivo
- Suministro de aire
- Producción de alimento

Parámetros / Tolerancias

Temperatura: Entre 25 y 27Cº.

Alimentación: Suministro 200 lts diarios de microalgas

Proporción de gametos para fertilización: 100 espermios por ovulo.

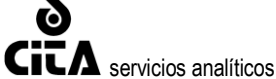
Densidad de cultivo: Se inicia de 10 a 15 larvas por ml y finaliza de 2 a 5 larvas por ml.

Suministro de aire: Constante y leve manteniendo niveles de oxígeno sobre los 4 mg/l.

Producción de alimento: Se cuenta con dos especies (isochrysis y chaetoceros).

Código	Versión	Página
NO-PS-IPS-	1	8/8

**ANEXO 2. P-SA-MQ-034 Ácidos grasos saturados, insaturado, trans y omegas por pg.
Laboratorio de Análisis Químicos, CITA, UCR.**

	P-SA-MQ-034	1 de 13
	Emisión N°: 8	
	Fecha de emisión: 28/11/2016	
ACIDOS GRASOS SATURADOS, INSATURADOS, TRANS Y OMEGAS POR CG	Emitido por: G. Artavia	Aprobado por: C. Cortés

1.0 PRINCIPIO

El método consiste en la extracción y esterificación del aceite vegetal o grasa de la muestra utilizando éter de petróleo y trifluoruro de boro respectivamente. El extracto resultante rico en ésteres metílicos de ácidos grasos se inyecta en el cromatógrafo de gases para su identificación y cuantificación.

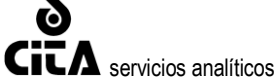
La identificación se realiza inyectando una matriz compuesta por 37 ésteres metílicos de ácidos grasos para verificar el tiempo de retención de cada analito y la cuantificación se efectúa mediante la normalización de áreas.

2.0 OBJETIVO

Determinar los ésteres metílicos de los ácidos grasos por cromatografía de gases.

3.0 EQUIPOS

- Balanza analítica con resolución de 0,1 mg (Ver P-SA-BQ-035 o *P-SA-BQ-071 o P-SA-BQ-082*)⁽¹⁾
- Cromatógrafo gases GC-2014 con auto inyector AOC -20i (Ver P-SA-BQ-064 y P-SA-BQ-065 respectivamente)^(2,3)
- Columna cromatográfica: SPTM – 2560 100 m x 0,25 m x 0,2 μm; alta polaridad, fase estacionaria poli(biscianopropilsiloxano) marca Supelco o equivalente *Varian WCOT Fused Silica 100 m x 0.25 mm coating CP-Sil 88 FAME DF=0.2μm*.
- Calentadores
- Termómetros
- Viales de 15 mL PTFE con septum silicón marca Supelco o equivalente
- Viales de 2 mL para el AOC-20i.
- Micropipetas
- Pipetas pasteur

	P-SA-MQ-034	2 de 13
	Emisión N°: 8	
	Fecha de emisión: 28/11/2016	
ACIDOS GRASOS SATURADOS, INSATURADOS, TRANS Y OMEGAS POR CG	Emitido por: G. Artavia	Aprobado por: C. Cortés

4.0 REACTIVOS

- Patrones de ácidos grasos cuyo porcentaje de pureza es >99% ó *Mix Supelco FAM E C4-C24 100 mg N° 18919 disuelto 10 mg/mL en diclorometano o hexano con BHT, separado en viales 1 mL.*
- Cloroformo grado pesticida
- Éter de petróleo grado A.C.S.
- Éter etílico grado pesticida
- Tolueno grado pesticida
- Hexano grado pesticida
- Pirogalol grado reactivo
- Etanol al 95%
- Ácido clorhídrico (HCl) concentrado (12 mol/L)
- BF₃ con una fracción masa/volumen de 0,14 en metanol
- Na₂SO₄ anhidro grado A.C.S
- Agua grado 1⁽⁴⁾
- *Nitrógeno (N₂) grado industrial (para minimizar posibles oxidaciones de los ácidos grasos)*

5.0 DETERMINACIÓN ^(5, 6 y 7)

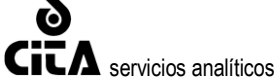
5.1 EXTRACCIÓN

5.1.1 **Extracción Directa**

- *Mida una masa representativa de muestra directamente en un tubo de centrífuga o en una botella, agregue 50 mL de éter de petróleo ó hexano, agite vigorosamente durante un tiempo establecido. Centrifugue durante 10 minutos a 4 000 rpm. Decante el líquido en un balón de 250 mL y repita la operación si la muestra presenta un bajo contenido en grasa.*
- Coloque el balón con el extracto orgánico en un rotavapor a una temperatura de 40 °C hasta que no se perciba el olor del disolvente utilizado.

5.1.2 **Extracción por Hidrólisis ácida**

- En caso de muestras que formen emulsiones a la hora de extraer la grasa o la

	P-SA-MQ-034	3 de 13
	Emisión N°: 8	
	Fecha de emisión: 28/11/2016	
ACIDOS GRASOS SATURADOS, INSATURADOS, TRANS Y OMEGAS POR CG	Emitido por: G. Artavia	Aprobado por: C. Cortés

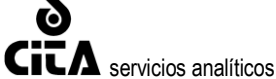
extracción *directa* de un bajo rendimiento, se debe realizar una extracción por *hidrólisis ácida o básica*.

- 5.1.2.1 Homogenice la muestra
- 5.1.2.2 *Pese una masa que contenga aproximadamente 200-400 mg de grasa en una botella de centrífuga de 250 mL.*
- 5.1.2.3 *Agregue una punta de espátula de pirogalol, núcleos de ebullición y 4,0 mL de etanol (95 mL/100 mL), mezcle bien hasta disolver*
- 5.1.2.4 *Añada 20 mL de HCl concentrado y mezcle bien.*
- 5.1.2.5 *Coloque la disolución en un baño de agua entre (70-80) °C asegurándose de tapar ligeramente la botella*
- 5.1.2.6 *Agite constantemente por 40 min.*
- 5.1.2.7 *Después de la digestión, permita que la disolución se enfríe (20 °C a 30 °C), agregue 20 mL de etanol y mezcle gentilmente.*
- 5.1.2.8 *Agregue (25-35) mL de éter de petróleo y agite por 20 minutos.*
- 5.1.2.9 *Centrifugue durante 10 minutos a 4 000 rpm (67 996 x g).*
- 5.1.2.10 *Trasvase el extracto etéreo a un balón de 250 mL provisto de un embudo con papel # 41 o equivalente y Na₂SO₄*
- 5.1.2.11 *Elimine el disolvente en un rotavapor a 40 °C hasta que no se perciba el olor a éter.*

5.1.3 Extracción por Hidrólisis básica

- *En el caso de productos lácteos que contengan un contenido de grasa bajo se puede seguir el siguiente procedimiento*

- 5.1.3.1 Homogenice la muestra
- 5.1.3.2 *Pese una masa que contenga aproximadamente 200-400 mg de grasa en una botella de centrífuga de 250 mL*
- 5.1.3.3 *Agregue una punta de espátula de pirogalol, núcleos de ebullición y 4,0 mL de etanol (95 mL/100 mL), mezcle bien hasta disolver por completo*
- 5.1.3.4 *Añada 12 mL de agua y 8 mL de hidróxido de amonio y mezcle bien.*
- 5.1.3.5 *Coloque la disolución en un baño de agua entre (70-80) °C asegurándose de tapar ligeramente la botella*
- 5.1.3.6 *Agite constantemente durante 10-20 minutos (para el caso del queso se puede añadir 20 mL de HCl 12 mol/L y se calienta por 20 min más).*

	P-SA-MQ-034	4 de 13
	Emisión N°: 8	
	Fecha de emisión: 28/11/2016	
ACIDOS GRASOS SATURADOS, INSATURADOS, TRANS Y OMEGAS POR CG	Emitido por: G. Artavia	Aprobado por: C. Cortés

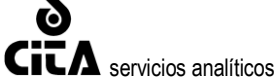
- 5.1.3.7 *Verifique que la disolución esté básica (se agregan unas gotas de fenolftaleína y la disolución debe ser rosada), agregando más hidróxido de amonio de ser necesario.*
- 5.1.3.8 *Después de la digestión, permita que la disolución se enfríe (20 °C a 30 °C), agregue 20 mL de etanol y mezcle gentilmente.*
- 5.1.3.9 *Agregue (25-35) mL de éter de petróleo y agite por 20 minutos.*
- 5.1.3.10 *Centrifugue durante 10 minutos a 4 000 rpm (67 996 x g).*
- 5.1.3.11 *Trasvase el extracto etéreo a un balón de 250 mL provisto de un embudo con papel # 41 o equivalente y Na₂SO₄*
- 5.1.3.12 *Elimine el disolvente en un rotavapor a 40 °C hasta que no se perciba el olor a éter.*

5.2 METILACIÓN

- 5.2.1 Mida exactamente 0,1 g de grasa extraída (ver apartado 5.1.1 5.1.2 ó 5.1.3) o del aceite vegetal en un vial de 15 mL. En el caso de que la muestra contenga muy poca grasa puede realizar los siguientes pasos en la totalidad de la grasa extraída.
- 5.2.2 Adicione a la muestra 2 mL de cloroformo y 2mL de éter etílico (ambos reactivos grado pesticida).
- 5.2.3 Evapore a sequedad en un baño de agua a 40 °C y con ambiente de nitrógeno.
- 5.2.4 Una vez seca la muestra, adicione 2 mL de BF₃ con una fracción de masa/volumen de 0,14 en metanol y 1 mL de tolueno, tape el vial y caliente el mismo vial 45 minutos a 100 °C, agitando cada 10 minutos.
- 5.2.5 Deje enfriar los viales a temperatura ambiente. Adicione 5 mL de agua grado 1, 1 mL de hexano y agite durante 1 minuto.
- 5.2.6 Trasvase la capa orgánica con ayuda de pipeta pasteur a viales de 4 mL y agregue una punta de desecante (Na₂SO₄).
- 5.2.7 Filtre la capa de orgánica a través de un filtro de 0,45 µm o 0,20 µm
- 5.2.8 Trasvase el blanco a un vial de 2 mL e inyecte en el CG. *Si la inyección no es inmediata puede guardar los extractos en congelación*

NOTA 1. Prepare un blanco, utilizando únicamente los reactivos, siguiendo el mismo procedimiento con el que se trató la muestra.

NOTA 2. En caso de tener a disposición un material de referencia, por cada lote de

	P-SA-MQ-034	5 de 13
	Emisión N°: 8	
	Fecha de emisión: 28/11/2016	
ACIDOS GRASOS SATURADOS, INSATURADOS, TRANS Y OMEGAS POR CG	Emitido por: G. Artavia	Aprobado por: C. Cortés

análisis, realice el mismo procedimiento descrito anteriormente.

5.3 CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS

5.3.1 Una vez obtenido el extracto se procede a realizar el análisis por el GC.

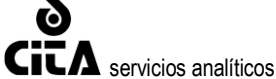
5.3.2 Para ello se abren los cilindros de gases (Helio, Hidrógeno y Aire) verificando el nivel de volumen así como la presión de salida (P-SA-BQ-064).

5.3.3 Se enciende el equipo y se cargan las condiciones de trabajo según el Cuadro I.

Cuadro 1 Condiciones cromatográficas en el software

Parámetro	Condición
AOC-20i	
Volumen de inyección	2,0 µL
Lavados con muestra	2 veces
Lavado con disolvente	2 veces
Columna	
<i>SPTM – 2560 Supelco o CP-Sil 88 FAME Varian</i>	<i>100 m x 0,25 m x 0,2 µm</i>
Temperatura 1	100 °C
Tiempo de equilibrio	3 min
Rampa	<i>3°C/ min 100-200 °C, 5 min</i>
	<i>0,50 °C/ min 200-205 °C, 8 min</i>
	<i>0,75 °C/ min 205-210 °C, 2,5 min</i>
	<i>1,5 °C/ min 210-235 °C, 6 min</i>
Detector de FID	
Temperatura	250 °C
Velocidad de muestreo	8 ms
SPL 1	
Temperatura	225 °C
Modo	Split
Split	200,0
Presión	195,2 kPa
Flujo total	53,8 mL/minuto
Flujo de columna	0,75 mL/minuto
Velocidad lineal	15,2 cm/s
Flujo de purga	3,0 mL/minuto
Make up	75 kPa
Hidrógeno	65 kPa
Aire	60 kPa

5.3.4 Una vez acondicionado el equipo se procede a realizar el batch de análisis en donde la posición 1 corresponde al disolvente de lavado

	P-SA-MQ-034	6 de 13
	Emisión N°: 8	
	Fecha de emisión: 28/11/2016	
ACIDOS GRASOS SATURADOS, INSATURADOS, TRANS Y OMEGAS POR CG	Emitido por: G. Artavia	Aprobado por: C. Cortés

(tolueno o hexano) la posición 2 es el mix de ácidos grasos, la posición 3 es el blanco, luego se inyecta el material o los materiales de referencia y las muestras. Por último se inyecta tolueno como lavado y se carga el método de apagado (Cooldown).

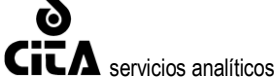
5.3.5 *Se monitorean los tiempos de retención de la columna con la mezcla de ésteres metílicos ácidos grasos permitiendo variaciones no mayores a 1 min con respecto a los tiempos originales (ver R-SA-Q-072).*

5.4 CUANTIFICACIÓN Y EXPRESIÓN DE RESULTADOS

La lista de ácidos grasos que se pueden identificar y cuantificar por este método se encuentra en el cuadro 2.

Cuadro 2. Lista de ácidos grasos que se pueden identificar en las muestras.

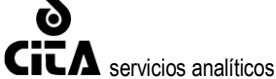
Ácido graso	Abreviatura
Ácido Butírico	C4:0
Ácido Pentanoico*	C5:0
Ácido Caproico	C6:0
Ácido Heptanoico	C7:0
Ácido Caprílico	C8:0
Ácido Nonanoico*	C9:0
Ácido Cáprico	C10:0
Ácido Undecanoico	C11:0
Ácido Undecenoico*	C11:1
Ácido Láurico	C12:0
Ácido 11-dodecenoico*	C12:1
Ácido Tridecanoico	C13:0
Ácido Tridecenoico*	C13:1
Ácido Mirístico	C14:0
Ácido Miristoleico	C14:1
Ácido Pentadecanoico	C15:0
Ácido 10-pentadecenoico	C15:1
Ácido Palmítico	C16:0
Ácido Palmitoleico	C16:1
Ácido trans-palmitoleaidico*	C16:1t

	P-SA-MQ-034	7 de 13
	Emisión N°: 8	
	Fecha de emisión: 28/11/2016	
ACIDOS GRASOS SATURADOS, INSATURADOS, TRANS Y OMEGAS POR CG	Emitido por: G. Artavia	Aprobado por: C. Cortés

Ácido Margárico	C17:0
Ácido Margaroleico	C17:1
Ácido Estearico	C18:0
Ácido trans-9-elaídico	C18:1t
Ácido trans-11-vaccenico*	C18:1
Ácido Petroselenico*	C18:1
Ácido Oleico	C18:1 (ω-9)
Ácido Vaccenico*	C18:1
Ácido linoleaídico	C18:2t
Ácido Linoleico	C18:2 (ω-6)
Ácido Araquídico	C20:0
Ácido γ-linolenico	C18:3 (ω-6)
Ácido cis-11-eicosenico	C20:1 (ω-9)
Ácido α-linolenico	C18:3 (ALA, ω-3)
Ácido heneicosanoico	C21:0
Ácido cis-5-eicosenico*	C20:1
Ácido cis 11,14-eicosadienoico	C20:2 (ω-6)
Ácido Araquidónico*	C20:4 (ω-6)
Ácido Behenico	C22:0
Ácido 8,11,14-eicosatrienoico	C20:3
Ácido Eúrico	C22:1(ω-9)
Ácido 11,14,17-eicosatrienoico	C20:3(ω-3)
Ácido Tricosanoico	C23:0
Ácido cis-5,8,11,14-eicosatetranoico	C20:4 (ω-6)
Ácido cis-13,16-docosadienoico	C22:2
Ácido Lignocérico	C24:0
Ácido cis-5,8,11,14,17-eicosapentaenoico EPA	C20:5 (ω-3)
Ácido Nervórico	C24:1
Ácido Docosahexaenoico	C22:6

*No se encuentran disponibles en el Mix de Supelco pero pueden elucidarse utilizando otros mix de otras marcas

Excepto en casos especiales, asuma que todos los componentes de la muestra están representados en el cromatograma, por lo tanto la suma total de las áreas bajo los picos constituyen el 100 % de los componentes (excluyendo el disolvente de los

	P-SA-MQ-034	8 de 13
	Emisión N°: 8	
	Fecha de emisión: 28/11/2016	
ACIDOS GRASOS SATURADOS, INSATURADOS, TRANS Y OMEGAS POR CG	Emitido por: G. Artavia	Aprobado por: C. Cortés

picos).

Para muestras sin componentes por debajo de los C12, calcule el contenido de constituyentes particulares (expresado en % de esteres de metilo) para determinar el porcentaje representado por área del pico correspondiente relativo a la suma de las áreas de todos los picos. Es decir para el área presente del componente 1, expresado como éster de metilo se calcula:

$$\left(A_i / \sum A_i \right) \times 100 \quad (\text{ecuación 1})$$

Donde $\sum A_i$ es la suma de las áreas por debajo de los picos.

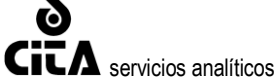
En los casos en que se encuentren presentes componentes por debajo de C12 de manera significativa, las áreas obtenidas del cromatograma deben ser multiplicadas por un factor de corrección, para convertir porcentajes de áreas en porcentajes de masa.

A cada componente se le debe corregir el área debajo del pico para compensar la respuesta del detector de llama de cada componente (FID). El factor de corrección del FID es calculado por el peso molecular, de la siguiente manera:

$$FID_x = \frac{MW_x}{(n_x - 1)(AW_c)(FID_{16:0})} \quad (\text{ecuación 2})$$

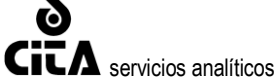
Donde FID_x es el factor FID del componente x, MW_x es el peso molecular del componente x, n_x es el número de átomos de carbono en el componente x, AW_c es el peso del átomo de carbono (12,01) y $FID_{16:0}$ es el factor de corrección FID para el 16:0 (1,407).

Todos los otros factores de corrección están dados por el Cuadro 3.

	P-SA-MQ-034	9 de 13
	Emisión N°: 8	
	Fecha de emisión: 28/11/2016	
ACIDOS GRASOS SATURADOS, INSATURADOS, TRANS Y OMEGAS POR CG	Emitido por: G. Artavia	Aprobado por: C. Cortés

Cuadro 3 Factores de corrección para aquellas muestras que presenten componentes por debajo de C12 de manera significativa.

	M_x	$n_{(x-1)}$	F_x	f_x
<i>Butírico C4:0</i>	102,13	4	2,13	1,51
<i>Pentanoico C5:0</i>	116,15	5	1,93	1,37
<i>Caproico C6:0</i>	130,18	6	1,81	1,28
<i>Heptanoico C7:0</i>	144,20	7	1,72	1,22
<i>Caprílico C8:0</i>	158,23	8	1,65	1,17
<i>Nonanoico C9:0</i>	172,25	9	1,59	1,13
<i>Cáprico C10:0</i>	186,28	10	1,55	1,10
<i>Undecanoico C11:0</i>	200,30	11	1,52	1,08
<i>Undecenoico C11:1</i>	198,29	11	1,50	1,07
<i>Láurico C12:0</i>	214,33	12	1,49	1,06
<i>11-dodecenoico C12:1</i>	212,32	12	1,47	1,05
<i>Tridecanoico C13:0</i>	228,35	13	1,46	1,04
<i>tridecenoico C13:1</i>	226,34	13	1,45	1,03
<i>Mirístico C14:0</i>	242,38	14	1,44	1,02
<i>Miristoleico C14:1</i>	240,36	14	1,43	1,02
<i>Pentadecanoico C15:0</i>	256,40	15	1,42	1,01
<i>Pentadecenoico C15:1</i>	254,39	15	1,41	1,00
<i>Palmítico C16:0</i>	270,42	16	1,41	1,00
<i>trans-Palmitelaidico C16:1 t</i>	268,41	16	1,40	0,99
<i>Palmitoleico C16:1</i>	268,41	16	1,40	0,99
<i>Margárico C17:0</i>	284,45	17	1,39	0,99
<i>Margaroleico C17:1</i>	282,44	17	1,38	0,98
<i>Esteárico C18:0</i>	298,47	18	1,38	0,98
<i>trans-9-elaídico C18:1t</i>	296,46	18	1,37	0,97
<i>trans-11-vaccenico C18:1t</i>	296,46	18	1,37	0,97
<i>Petroselenico C18:1</i>	296,46	18	1,37	0,97
<i>Oleico C18:1 (ω-9)</i>	296,46	18	1,37	0,97
<i>Vaccenico C18:1</i>	296,46	18	1,37	0,97
<i>Trans-trans-linoelaidico C18:2t</i>	294,45	18	1,36	0,97
<i>Nonadecanoico C19:0</i>	312,49	19	1,37	0,97

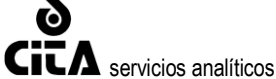
	P-SA-MQ-034	10 de 13
	Emisión N°: 8	
	Fecha de emisión: 28/11/2016	
ACIDOS GRASOS SATURADOS, INSATURADOS, TRANS Y OMEGAS POR CG	Emitido por: G. Artavia	Aprobado por: C. Cortés

<i>Linoleico C18:2 (ω-6)</i>	294,45	18	1,36	0,97
<i>g-linolenico C18:3 (ω-6)</i>	292,43	18	1,35	0,96
<i>α-linolenico C18:3 (ALA, ω-3)</i>	292,43	18	1,35	0,96
<i>Araquidico C20:0</i>	326,52	20	1,36	0,97
<i>Heneicosanoico C21:0</i>	340,54	21	1,35	0,96
<i>Cis-5-eicosenico C20:1</i>	324,51	20	1,35	0,96
<i>cis-11-eicosenico C20:1 (ω-9)</i>	324,51	20	1,35	0,96
<i>Eicosadienoico C20:2 (ω-6)</i>	322,50	20	1,34	0,95
<i>Araquidónico C20:4 (ω-6)</i>	318,47	20	1,33	0,94
<i>8-11,14-Eicosatrienoico C20:3 (ω-9)</i>	320,48	20	1,33	0,95
<i>11,14,17-Eicosatrienoico C20:3 (ω-6)</i>	320,48	20	1,33	0,95
<i>Behenico C22:0</i>	354,56	22	1,34	0,95
<i>Erucico C22:1 (ω-9)</i>	352,55	22	1,33	0,95
<i>Eicosapentaenoico EPA C20:5 (ω-3)</i>	316,46	20	1,32	0,94
<i>Docosadienoico C22:2 (ω-6)</i>	350,54	22	1,33	0,94
<i>Docosatrienoico C22:3</i>	348,53	22	1,32	0,94
<i>Docosatetranoico C22:4 (ω-6)</i>	346,52	22	1,31	0,93
<i>Tricosanoico (C23:0)</i>	368,58	23	1,33	0,95
<i>Lignocérico (C24:0)</i>	382,60	24	1,33	0,94
<i>Nervónico 24:1 (ω-9)</i>	380,59	24	1,32	0,94
<i>Docosapentanoico C22:5 (ω-6)</i>	344,51	22	1,30	0,93
<i>Docosahexenoico DHA C22:6 (ω-3)</i>	342,50	22	1,30	0,92

Una vez corregidas las áreas se calcula el porcentaje relativo de cada componente de la siguiente manera:

$$x = \frac{A_x}{A_t} \quad (\text{ecuación 3})$$

donde A_x es igual al área corregida del componente x y A_t es la suma de las áreas corregidas de todos los componentes, excluido el pico del disolvente.

	P-SA-MQ-034	11 de 13
	Emisión N°: 8	
	Fecha de emisión: 28/11/2016	
ACIDOS GRASOS SATURADOS, INSATURADOS, TRANS Y OMEGAS POR CG	Emitido por: G. Artavia	Aprobado por: C. Cortés

6.0 CÁLCULO DE INCERTIDUMBRES ^(9, 10)

Ver archivo de Excel:

En Mis sitios de red / Equipos próximos /Química Servidor 1 / Registros/REGISTROS QUÍMICA / Métodos / Cálculo incertidumbre ácidos grasos por CG.

7.0 CONTROL DE CALIDAD

7.1 CONTROL DE RÉPLICAS

- Se realiza una réplica de cada muestra y adicionalmente se corre un material de referencia en cada lote de análisis, si se obtiene resultados satisfactorios, el lote se aprueba, en caso contrario se debe repetir todo el lote. En caso de no contar con material de referencia, los análisis se realizan por duplicado. En cada análisis el gerente técnico controla que la diferencia porcentual $\left[\left(\frac{\text{ámbito}}{\text{media}} \right) \times 100 \right]$ sea menor que 10%. Si esto no se cumple, se repite el análisis.

7.2 PRECISIÓN

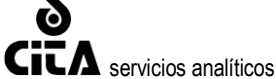
Se realiza *mínimo cada 4 años* al año para determinar la *repetibilidad y/o reproducibilidad* del método para cada analista y sirve para actualizar el cálculo de incertidumbres y verificar que el método y los analistas se mantienen bajo control. Los resultados se presentan en el registro R-SA-Q-073 Resumen de resultados de *repetibilidad y/o reproducibilidad*

7.3 EXACTITUD⁽¹¹⁾

Rondas Interlaboratorios y análisis de materiales de referencia certificados.

Participación en programas de comparaciones interlaboratorios que operen bajo los lineamientos de la Guía 43 de ISO/IEC:

Participación en FAPAS (Food Analysis Performance Assessment Scheme), del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentos del Reino Unido ⁽¹²⁾ o LGC-Standards división del Grupo LGC ⁽³²⁾. Se analiza mínimo una vez cada 4 años. Los resultados obtenidos se presentan en informes de resultados de la ronda. Un resumen de la participación se presenta en el registro R-SA-Q-014 Resumen de resultados obtenidos en ensayos de aptitud.

	P-SA-MQ-034	12 de 13
	Emisión N°: 8	
	Fecha de emisión: 28/11/2016	
ACIDOS GRASOS SATURADOS, INSATURADOS, TRANS Y OMEGAS POR CG	Emitido por: G. Artavia	Aprobado por: C. Cortés

En dichos programas, los organizadores reportan un estadístico de desempeño (Z) que indica:

$$|Z| \leq 2, \text{ satisfactorio}$$

$$2 \leq |Z| \leq 3, \text{ cuestionable}$$

$$|Z| > 3, \text{ insatisfactorio}$$

Si el desempeño es cuestionable, se hace un análisis de cálculos y registros, para detectar el problema y se presta especial atención a la siguiente evaluación, donde un nuevo “cuestionable” (en el mismo sentido) será tratado como un “insatisfactorio”.

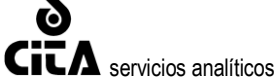
Si el desempeño fue “insatisfactorio”, se inicia un procedimiento para manejo de no conformidades, tal como se describe en MC-Sección 6.

8.0 SEGURIDAD

Mantenga las medidas de seguridad típicas de trabajo en el laboratorio como el uso de gabacha y lentes de seguridad, así como asegurarse que los equipos y cristalería se encuentren en buen estado. Para el uso de cloroformo, éter etílico, tolueno, metanol que corresponden a los disolventes inflamables y volátiles se recomienda su uso lejos de fuentes de calentamiento así como en ambientes con corrientes de aire circulante o en la capilla de extracción.

9.0 REFERENCIAS

- (1) *P-SA-BQ-035: Balanza analítica, P-SA-BQ-071. Balanza Precisa EP 420 A, P-SA-BQ-082: Balanza analítica OHAUS*
- (2) P-SA-BQ-064: Cromatógrafo de gases GC-2014
- (3) P-SA-BQ-065: Auto inyector AOC-20i
- (4) ISO 3696: 1987 (E), Water for analytical laboratory use – Specification and test methods.
- (5) AOAC Official Method 996.06, 2012. Fat (Total, saturated, and unsaturated) in foods.
- (6) AOCS Official Method Ce 1e-91, 2012. Determination of Fatty Acids in Edible Oils and Fats by Capillary GLC. pp 1-3

	P-SA-MQ-034	13 de 13
	Emisión N°: 8	
	Fecha de emisión: 28/11/2016	
ACIDOS GRASOS SATURADOS, INSATURADOS, TRANS Y OMEGAS POR CG	Emitido por: G. Artavia	Aprobado por: C. Cortés

- (7) MONGE, R; CAMPOS, H. 2006. Tabla de composición de alimentos de Costa Rica: Ácidos Grasos. INCIENSA.
- (8) *DE-SA-009*. ECA, ECA-MC-P20 Política de Trazabilidad, en su versión vigente.
- (9) *DE-SA-064*. ECA, ECA-MC-PO02 Política para el cálculo de incertidumbres. en su versión vigente.
- (10) *DE-SA-007*. ECA, ECA-MC-P17 Política de ensayos, en su versión vigente
- (11) *Consultar el alcance de acreditación en <http://fapas.com/iso-accreditation/>*
- (12) *Consultar el alcance de acreditación en <http://www.lgcstandards.com/CN/en/proficiency-testing/accreditations>*.

DOCUMENTO NO CONTROLADO

10. APÉNDICES

APÉNDICE 1. Representación gráfica del diseño estadístico empleado en este ensayo.

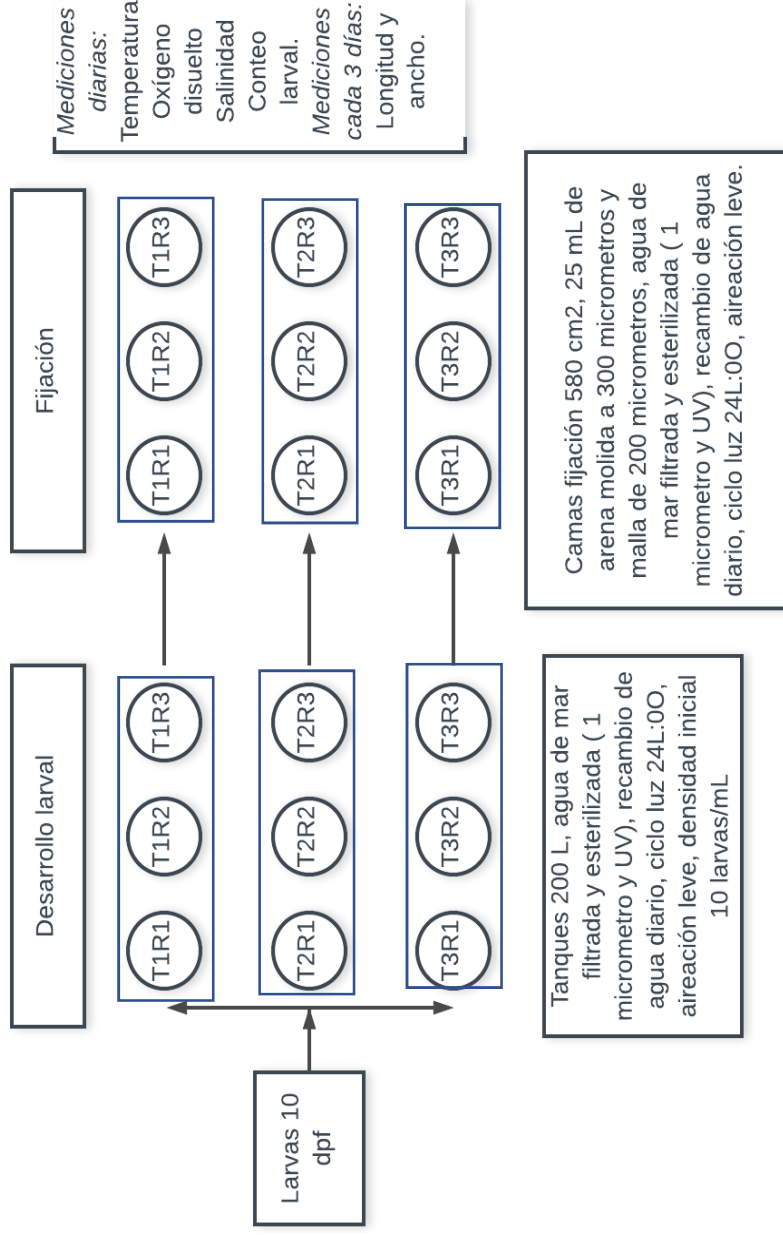


Figura A1. Esquema del diseño experimental de la primera parte del experimento, en donde se evaluará el desarrollo larval a partir de los 10 dpf hasta los 8 dpfi. Donde T1 = 100 % *I. galbana*; T2 = 1:1 *I. galbana*; T3 = 1:1 *I. galbana* : *C. calcitrans*.

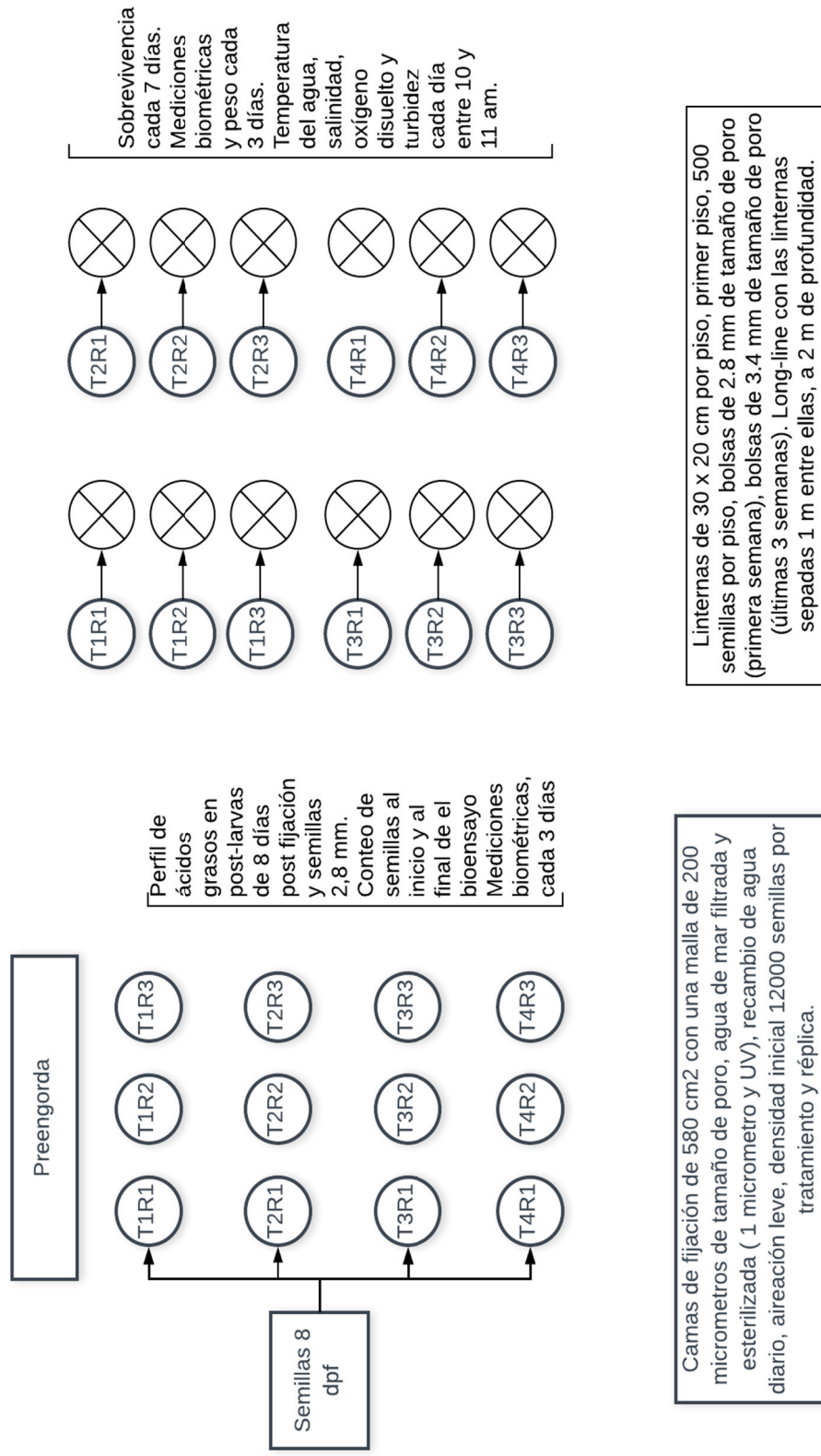


Figura A2. Descripción gráfica del diseño experimental en las etapas 3 y 4, desde post-larvas hasta el primer mes en el mar. Donde T1 = 100 % *I. galbana*; T2 = 1:1 *I. galbana* : *P. tricornutum*; T3 = 1:1 *I. galbana* : *C. calcitrans* y T4 = 1:1:1 *I. galbana* : *P. tricornutum* : *C. calcitrans*.

APÉNDICE 2. Valores de medias y errores estándar de las distintas variables medidas a lo largo del ensayo.

Cuadro B1. Supervivencia y distribución de tamaños de semillas después de 24 días de alimentación en el laboratorio. Datos presentados como media \pm error estándar, con $n=3$.

Dieta	Supervivencia (%) [*]	Proporción de tamaños ^{**}		
		Pequeño	Intermedio	Grande
I	63,4 \pm 1,9 ^b	87,3 \pm 0,6 ^a	9,6 \pm 0,8 ^d	3,0 \pm 0,2 ^c
I:P	59,4 \pm 5,2 ^b	80,9 \pm 2,6 ^b	16,6 \pm 2,2 ^c	2,4 \pm 0,5 ^c
I:C	82,0 \pm 5,3 ^a	60,5 \pm 0,8 ^c	32,0 \pm 0,6 ^b	7,5 \pm 0,2 ^b
I:P:C	66,1 \pm 3,1 ^b	52,0 \pm 2,6 ^d	38,0 \pm 1,9 ^a	10,0 \pm 0,9 ^a

^{*}Letras diferentes representan diferencias significativas con $p < 0,05$

Cuadro B2. Supervivencia global y semanal de semillas de *C. gigas* sembradas en el mar y evaluadas por 28 días.

Tratamiento	Supervivencia (%) [*]	Supervivencia semanal (%) ^{**}			
		Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4
I	74,87 \pm 3,76 ^c	88,87 \pm 1,57 ^{s,y}	91,89 \pm 3,01 ^{r,y}	95,02 \pm 2,48 ^{r,y}	96,48 \pm 1,94 ^{r,y}
I:P	80,27 \pm 4,98 ^{bc}	93,60 \pm 0,31 ^{s,y}	94,38 \pm 2,59 ^{r,y}	95,30 \pm 1,95 ^{r,y}	95,12 \pm 1,67 ^{r,y}
I:C	91,93 \pm 0,52 ^a	96,87 \pm 0,44 ^{s,x}	98,83 \pm 0,48 ^{r,x}	97,22 \pm 0,52 ^{r,x}	98,78 \pm 0,68 ^{r,x}
I:P:C	90,27 \pm 1,79 ^{ab}	93,87 \pm 1,27 ^{s,x}	100,0 \pm 0,0 ^{r,x}	97,38 \pm 1,66 ^{r,x}	98,76 \pm 0,06 ^{r,x}

Los datos presentados como la media \pm error estándar, con $n = 3$

^{*} Letras diferentes representan diferencias significativas con $p < 0,05$.

^{**}Las letras *r* y *s*, presentan el efecto del tiempo, mientras que *x* y *y* representan el efecto del tratamiento. Letras diferentes representan diferencias significativas con $p < 0,05$.

APÉNDICE 3. Medidas de resumen de los MLM y AIC empleados durante el análisis de datos del ensayo.

Cuadro C1. Resumen de los resultados de los modelos lineales mixtos para las variables medidas durante el desarrollo larval considerando tres tratamientos (I, I:P e I:C). Valores p significativos ($p < 0,05$) son resaltados con negrita.

Variable		dF	F	P
<i>Longitud</i>	Tratamiento	1	0,01	0,9403
	Tratamiento*Tiempo	2	0,75	0,4731
<i>Altura</i>	Tratamiento	1	0,02	0,8866
	Tratamiento*Tiempo	2	0,34	0,7114
<i>Sobrevivencia diaria</i>	Tratamiento	2	291,65	< 0,0001
	Tratamiento*Tiempo	12	8,78	< 0,0001
<i>Sobrevivencia global</i>	Tratamiento	1	0,18	0,6902
<i>Fijación</i>	Tratamiento	1	209,91	0,0001

Cuadro C2. Resumen de los resultados de los modelos lineales mixtos para las variables medidas durante el desarrollo de semillas en el laboratorio (desde 10 dpfi hasta 34 dpfi) considerando cuatro tratamientos (I, I:P, I:C e I:P:C). Valores p significativos ($p < 0,05$) son resaltados con negrita.

Variable		dF	F	P
<i>Longitud</i>	Tratamiento	3	150,53	< 0,0001
	Tratamiento*Tiempo	18	7,20	< 0,0001
<i>Altura</i>	Tratamiento	3	239,71	< 0,0001
	Tratamiento*Tiempo	18	7,53	< 0,0001
<i>Sobrevivencia global</i>	Tratamiento	3	5,73	0,0216
<i>Proporción de tamaños</i>				
Pequeño	Tratamiento	3	74,81	< 0,0001
Intermedio	Tratamiento	3	74,96	< 0,0001
Grande	Tratamiento	3	43,62	< 0,0001

Cuadro C3. Resumen de los resultados de los modelos lineales mixtos para las variables medidas durante el primer mes en el mar de semillas de *C. gigas* considerando cuatro tratamientos (I, I:P, I:C e I:P:C). Valores p significativos ($p < 0,05$) son resaltados con negrita.

Variable		dF	F	P
<i>Longitud</i>	Tratamiento	3	2,54	0,1298
	Tratamiento*Tiempo	24	5,93	< 0,0001
<i>Altura</i>	Tratamiento	3	10,65	0,0036
	Tratamiento*Tiempo	24	5,66	< 0,0001
<i>Sobrevivencia global</i>	Tratamiento	3	5,73	0,0216
<i>Sobrevivencia semanal</i>	Tratamiento	3	9,05	0,0060
	Tratamiento*Tiempo	9	1,40	0,2421
<i>Peso</i>	Tratamiento	3	2,93	0,0998
	Tratamiento*Tiempo	24	1,70	0,0491

Cuadro C4. AIC de los modelos empleados para evaluar la sobrevivencia global en las tres etapas del bioensayo. El modelo elegido está resaltado en negrita.

Modelo	AIC Sobrevivencia larvas	AIC Sobrevivencia semillas en laboratorio	AIC Sobrevivencia semillas en mar
Tratamiento	25,09	68,59	64,77
Tratamiento VarIdent (tratamiento)	26,50	72,27	63,32
Tratamiento+ <i>Tanque</i>	27,09	70,59	66,77
Tratamiento+ <i>Tanque</i> , VarIdent (Tratamiento)	28,50	74,27	65,32

Cuadro C5. AIC de los modelos empleados para evaluar el crecimiento en longitud, altura y peso durante las distintas etapas del bioensayo. El modelo elegido está resaltado en negrita.

Modelo	AIC Longitud larvas	AIC Altura larvas	AIC Sobrevivencia diaria larvas	AIC Longitud semi lab	AIC Altura semi lab	AIC Longitud semi mar	AIC Altura semi mar
Tiempo+Tratamiento+Tiempo*Tratamiento+ <i>Tanque</i>	5011,40	5019,97	1529,63	44449,09	39344,73	21259,93	24936,89
Tiempo+Tratamiento+Tiempo*Tratamiento+ <i>Tanque</i> , VarIdent (Tiempo)	4838,08	4851,23	1374,34	400091,15	39103,32	17558,00	21182,27
Tiempo+Tratamiento+Tiempo*Tratamiento+ <i>Tanque</i> , VarIdent (Tratamiento)	48877,31	4879,82	1317,76	39922,10	39188,60	19822,09	29940,98
Tiempo+Tratamiento+Tiempo*Tratamiento+ <i>Tanque</i> , VarIdent (Tratamiento)(Tiempo)	4839,34	4852,88	-	38812,17	38942,15	17472,78	21153,34

Cuadro C6. AIC de los modelos empleados para evaluar la sobrevivencia diaria de larvas y semanal de las semillas en el mar. El modelo elegido está resaltado en negrita.

Modelo	AIC Sobrevivencia semanal semillas	AIC Peso mar
Tiempo+Tratamiento+Tiempo*Tratamiento	207,20	412,01
Tiempo+Tratamiento+Tiempo*Tratamiento VarIdent (Tiempo)	209,25	228,49
Tiempo+Tratamiento+Tiempo*Tratamiento VarIdent (Tratamiento)	197,47	408,00
Tiempo+Tratamiento+Tiempo*Tratamiento VarIdent (Tratamiento)(Tiempo)	201,88	229,64
Tiempo+Tratamiento+Tiempo*Tratamiento+ <i>Tanque</i>	208,03	423,76
Tiempo+Tratamiento+Tiempo*Tratamiento+ <i>Tanque</i> , VarIdent (Tiempo)	211,25	220,90
Tiempo+Tratamiento+Tiempo*Tratamiento+ <i>Tanque</i> , VarIdent (Tratamiento)	199,47	399,01
Tiempo+Tratamiento+Tiempo*Tratamiento+	203,88	231,64

Tanque,
 VarIdent (Tratamiento)(Tiempo)

Cuadro C7. AIC de los modelos estadísticos empleados para evaluar la distribución de tamaños de las semillas antes de ser llevadas al mar. El modelo elegido está resaltado en **negrita**.

Modelo	AIC Pequeño	AIC Intermedio	AIC Grande
Tratamiento	56,37	52,61	36,26
Tratamiento VarIdent (tratamiento)	56,61	54,78	36,39
Tratamiento+ <i>Tanque</i>	58,37	54,61	38,26
Tratamiento+ <i>Tanque,</i> VarIdent (Tratamiento)	58,61	56,78	38,39

Cuadro C8. Resumen de los resultados de los modelos lineales generales y mixtos para las variables del contenido de ácidos grasos de post-larvas y semillas de *C. gigas* considerando cuatro tratamientos (I, I:P, I:C e I:P:C) y el inicio. Valores p significativos ($p < 0,05$) son resaltados con **negrita**.

Variable		dF	F	P
14:0	Tratamiento	4	1,25	0,3505
16:0*	Tratamiento	4	7,25	0,0052
16:1n-9*	Tratamiento	4	8,80	0,0036
17:0	Tratamiento	4	0,31	0,8659
18:0*	Tratamiento	4	8,01	0,0037
18:1n-9	Tratamiento	4	2,03	0,1659
18:2n-6*	Tratamiento	4	100,12	<0,0001
18:3n-6	Tratamiento	4	1,67	0,2316
21:1n-9	Tratamiento	4	0,97	0,4701
23:0	Tratamiento	4	3,73	0,0469
24:1n-9*	Tratamiento	4	35,25	<0,0001

Cuadro C9. AIC de los modelos estadísticos empleados para evaluar el contenido de ácidos grasos de las muestras. El modelo elegido está resaltado en **negrita**.

Modelo/ Variable	Tratamiento	Tratamiento VarIdent (tratamiento)
14:0	61,83	62,93
16:0*	74,27	81,14
16:1n-9*	44,93	45,71
17:0	68,06	69,03
18:0*	59,78	59,89
18:1n-9	75,03	76,05
18:2n-6*	62,76	61,70
18:3n-6	46,63	46,67
21:1n-9	56,96	61,18
23:0*	58,34	55,98
24:1n-9*	58,21	54,54

Cuadro C10. Autovectores asociados al análisis de componentes principales del contenido de ácidos grasos de semillas de *Crassostrea gigas* alimentados con cuatro dietas distintas.

Variable	E1	E2
14:00	-0,19	0,49
16:00	-0,19	0,25
16:01	0,36	0,07
17:00	-0,33	0,17
18:00	-0,12	0,54
18:1n-9	-0,32	-0,3
18:2n-6	-0,21	-0,48
18:3n-6	0,37	-0,08
21:1n-9	0,36	-0,07
23:00	0,37	0,13
24:1n-9	0,35	0,13

APÉNDICE 4. Abreviaciones

ARA = Ácido araquidónico.

C = *Chaetoceros calcitrans*.

CITA = Centro de Investigación en Tecnología de Alimentos.

DHA = Ácido docosahexaenoico.

EBM = Estación de Biología Marina de la Universidad Nacional de Costa Rica.

EFA = Ácidos grasos esenciales.

EPA = Ácido eicopentaenoico.

FAO = Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación.

I = *Isochrysis galbana*.

I:C = Dieta mixta 1:1 en proporción de volumen celular *I. galbana*: *C. calcitrans*.

I:P = Dieta mixta 1:1 en proporción de volumen celular *I. galbana*: *P. tricornutum*.

I:P:C = Dieta mixta 1:1:1 en proporción de volumen celular *I. galbana*: *P. tricornutum*: *C. calcitrans*.

P = *Phaedactylum tricornutum*.

PUFA = Ácidos grasos poliinsaturados.

UCR = Universidad de Costa Rica.

UNA = Universidad Nacional de Costa Rica.