



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

EFFECTO DE METIONINA MICROENCAPSULADA EN DIFERENTES  
CONCENTRACIONES SOBRE POBLACIONES DE *Ceriodaphnia dubia* EN  
CULTIVO.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

B I Ó L O G O

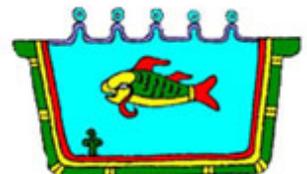
P R E S E N T A:

ALAN PEREZ FUENTES

Asesor:

M. en C. Mario Alfredo Fernández Araiza

LOS REYES IZTACALA, EDO. DE MÉX. 2014





Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Este trabajo se realizó gracias al apoyo de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico de la UNAM a través del proyecto **PAPIIT: IN218313**

## AGRADECIMIENTOS

Por fin ya con esta meta ya cumplida; le agradezco en especial a mi familia quien a pesar de todos los problemas que hemos tenido, hemos salido adelante de alguna forma u otra, y que aun con eso seguimos fuertes y unidos. Le agradezco todo su apoyo incondicional a cada uno y aunque se los digo persona, también aprovecharé este medio para decirles que los quiero mucho.

Empezando con este proyecto, doy gracias a la UNAM por darme la oportunidad de pertenecer a esta gran institución, y en especial a la FES Iztacala donde me pude desarrollar académicamente y personalmente; en esta gran facultad me dio la oportunidad de conocer a grandes personas.

Mis agradecimientos a los profesores del Laboratorio de producción acuícola:

Dr. Héctor Hernández Hernández gracias por sus comentarios y las sugerencias en el proyecto realizado.

Dra. Nandini quien gracias a su apoyo en cada duda que tenía a lo largo del proyecto y de las sugerencias para poder enriquecer el trabajo.

M. en C. Teresa Ramírez quien gracias también a su apoyo, comentarios y sugerencias para cada aspecto del escrito, y gracias por la ayuda también en la parte de la estadística.

M. en C. Mario Alfredo Fernández Araiza, muchísimas gracias por todo el apoyo brindado, quien además de haberme dado la oportunidad de seguir en este laboratorio y poder terminar este proyecto; que además de todas las “canas verdes” que le hice sacar en el transcurso del proyecto, me llevo bastante conocimiento aprendido de usted y más cuando no nos dejaba quedarnos con lo que tenemos sino nos hace investigar más y aprender; así que gracias por todo.

Biol. Omar Angeles, gracias por todo tu apoyo y tu amistad brindada. Además de eso, deberé decirte que cuando nos empezamos a hablar después de sacarte de quicio en más de una ocasión y poder limar esas bronquillas; podré decirte que gracias de nuevo por tu amistad brindada y muy apreciada por mi.

Empezando esta gran etapa de la universidad tuve la fortuna de conocer a grandes personas y amigos; Teo fuiste unas de las personas con quien empecé a hablar en cada cosa que vivimos, cuando hacíamos el tour jaja; Pame, una de mis mejores amigas que nos conocimos desde el CCH y con quien compartimos varias cosas, a ti y a toda tu familia gracias de todo corazón por todo el apoyo brindado. Diana “dianapoda” una gran amiga que también te quiero mucho, y que doy gracias de haber conocido y aunque me regañaras seguido, siempre era para mejorar y alentarme a realizar las cosas.

Al coach de la Selección de Atletismo de la FES-I Flavio Camacho quien fue y es por mucho un gran apoyo, una persona que con cada exigencia que pedía en la pista y entrenamiento, te dejaba una enseñanza dentro y fuera de ellas. Donde te demostraba que había que dar siempre el máximo.

Gracias a usted y a su familia por todo el apoyo brindado; Natis que fuiste una hermanita chiquita jeje y siempre sonriente, Lilian, siempre alegre, muy buena consejera, grandes amigas. Al igual a todo el equipo de atletismo Myrna, “la niña pescadito”, El ronquito, Abbid “torero” jaja, Oscar, el mechudo, Héctor “principito” y cada uno de los elementos de la selección que dimos lo máximo ya que “el entrenamiento de un atleta, debe de ser óooooptimo”.

Agradecer a cada persona y amigo del laboratorio; Lupe, Leydi, Topacio, Felis “chaparro”, Bruno “cachorrin”, Esme, Mirna “las reinitas”, Andy “el guapito” cada aventura realizada como cuando teníamos que coordinar los horarios del laboratorio jajajaja, Dan, que te puedo decir?! Al principio me caías medio mal jaja, pero de verdad muchas gracias por el apoyo brindado y que también aguantaste cada vez que te desesperaba, al igual que la confianza brindada. Aldo al igual, muchas gracias por todo, por alentar y no dejar el proyecto y echarle ganas; Aguillón contigo también encontré un buen amigo y que no dejabas que me cayerá, me apoyaste mucho; como también estar en las buenas y en las malas conmigo.

Gerardo “wero” encontré contigo un gran amigo en toda la extensión de la palabra; ya que siempre estabas cuando te necesitaba, y siempre sabias como alentarme a seguir echándole ganas, a seguir aprendiendo, jamás rendirme; y recordar las desveladas de “noches de estudio” y muchas cosas que podría decirte pero que faltarían palabras para agradecerte todo. Esleban otro “wero” , “tipazo” jaja y un gran amigo cada cosa que nos pasaba y aunque en algunas cosas nos iba mal siempre, siempre le veíamos el lado bueno y siempre apoyándonos. Gracias wero’s por todo y como siempre “Todo relaxs”.

Ernesto “chato” a ti te puedo decir que eres un gran amigo, y que todo se puede “lento pero seguro” , así que a seguir echándole galleta y no decaernos con nada. Gracias por todo apoyo brindado a ti y a tu familia.

Y muchísimas gracias a todas las personas que conocí y que formaron parte de esta gran etapa de la universidad, en donde siempre estuvieron presente con apoyo, cariño y alentar para seguir adelante por más tropiezos que haya; Gracias a todos.

## Contenido

RESUMEN .....	6
INTRODUCCION.....	7
ANTECEDENTES.....	9
OBJETIVOS.....	11
MATERIALES Y METODOS .....	12
RESULTADOS .....	16
DISCUSIÓN .....	23
CONCLUSION.....	25
REFERENCIAS.....	26
ANEXOS.....	30

## RESUMEN

La alimentación de organismos acuáticos en las primeras etapas de vida es fundamental para un adecuado desarrollo y crecimiento de los mismos, en sistemas naturales, los organismos planctónicos cubren la mayor parte de las necesidades nutricionales de larvas y crías de organismos acuáticos, sin embargo, al utilizar cultivos de apoyo en acuicultura, se ha reportado deficiencia de aminoácidos esenciales en algunos casos, por lo que, para la producción de crías o larvas de peces o crustáceos, es necesario utilizar alimentos que cumplan con los requerimientos nutricionales de éstos, y el enriquecimiento con estos nutrimentos del alimento vivo, hará más eficiente su uso. Por lo anterior se evaluó la respuesta del cladócer *Ceriodaphnia dubia* enriquecida con el aminoácido metionina a diferentes concentraciones, a través del crecimiento poblacional y su composición proximal. Las poblaciones de *C. dubia* tuvieron significativamente ( $\alpha = 0.05$ ) las mejores repuestas en la concentración de 40 cel ml<sup>-1</sup> de metionina, en crecimiento, y en composición proximal con el contenido de proteínas. En esta concentración se alcanzó una densidad máxima de 34 org ml<sup>-1</sup> a los 17 días con una tasa de crecimiento de 0.528 org día<sup>-1</sup>; se tuvo concentración de proteína de 81.62%. Las respuestas obtenidas en concentración de lípidos, humedad y cenizas no fueron significativas entre las diferentes concentraciones de metionina utilizadas, teniendo en la concentración de 40 mg ml<sup>-1</sup> metionina, valores de 15%, 85%, 3.77% respectivamente.

## INTRODUCCION

Los sistemas acuáticos se caracterizan por presentar comunidades de fitoplancton, representado por las algas y el zooplancton representado principalmente en aguas epicontinentales por rotíferos, copépodos y cladóceros (Wetzel, 1981). Siendo estos el alimento fundamental de crías y larvas de peces y crustáceos potencialmente importantes para el hombre ya que responden a las necesidades específicas de éstos cuando reabsorben totalmente sus reservas vitelina (Bernabé, 1991). El alimento de los cladóceros es a base de microalgas de 1 a 25  $\mu\text{m}$ , bacterias de 1  $\mu\text{m}$  y aquellos que aunque estén dentro de este rango, ya sean coloniales o presenten espinas no son consumidas por ellos (Dodson y Frey, 1991).

En acuicultura, las algas de la familia CLOROFICEA como fuente de alimentación tienden a ser las más utilizadas por sus características (Prieto, 2006); por otra parte, el uso de cladóceros como alimento en acuicultura, ha tomado auge debido a que varias crías de peces y larvas de crustáceos muestran una preferencia por ellos (Jhingran y Pullin, 1978), por ser organismos fáciles de cultivar, tener buen aprovechamiento en las crías de peces y crustáceos (Watanabe, 1983); su tamaño pequeño, forma, movimiento, pigmentación, tasa de crecimiento alta, fácil aceptación de dietas con las cuales se puede modificar su valor nutricional, tener alto contenido de enzimas digestivas (Dabrowski, 1984; Prieto, 2006; Muñoz, 2013), que sirven como exoenzimas en el intestino de organismos acuáticos en estadio de cría (Zimmerman, 1998, Prieto, 2001), presentar 60% de proteína en base seca y tener aminoácidos esenciales que cubren los requerimientos nutricionales de larvas y alevines en peces (Rottman, 1999).

Lavens (1996) reporta la utilización de cladóceros en la producción de trucha arcoíris, salmón y robalo; así como también en la reproducción de peces tropicales por el alto contenido de proteínas y niveles de HUFA.

Algunas especies planctónicas no cubren totalmente los requerimientos nutricionales de larvas y crías de organismos acuáticos por lo que es necesaria la incorporación de algunos elementos en estos organismos para enriquecerlos y ser utilizados como vehículo de nutrientes específicos para las primeras etapas de peces (Luizi et al, 1999). El proceso por el que se lleva a cabo el enriquecimiento de plancton se conoce como bioencapsulación (Monroig, 2007) a través de microemulsiones y micropartículas. Algunos de los métodos usados para la elaboración de microencapsulados está la coacervación compleja, la polimerización interfacial, gelificación iónica, incompatibilidad polimérica y el atrapamiento de liposomas (Pedroza-Islas, 2002) que son vesículas constituidas por una membrana fosfolipídica, principalmente y un compartimiento acuoso interno en el cuál se incorporan nutrientes hidrosolubles como los fosfolípidos, ácidos grasos esenciales, retinol (vitamina A), vitamina C, y aminoácidos, p. ej metionina, que es uno de los aminoácidos con azufre lo que les sirve para la formación de proteínas ya que es esencial para los peces en la síntesis de proteína y otras funciones fisiológicas, como intermediario en la síntesis de cisteína y taurina; evita la fragilidad muscular y ósea en los organismos. (Navarro, et al; 1993 García, A. et al. 2010,).

En el presente trabajo, se evaluaron diferentes concentraciones de metionina en el enriquecimiento nutricional del cladóceros *Ceriodaphnia dubia*.

## ANTECEDENTES

Alva (2001) observó que *Ceriodaphnia cornuta* tiene un mejor crecimiento somático y poblacional a una concentración de  $1.5 \times 10^6$  cel ml<sup>-1</sup> de *Chlorella vulgaris*, y en el 2004, una mezcla de *Chlorella vulgaris* y *Mycrosistys aeruginosa* en la alimentación de *Ceriodaphnia dubia* tuvo mejor crecimiento poblacional; comparándola con la combinación de *Scenedesmus acutus* y *Mycrosistys aeruginosa*.

Se ha trabajado con varias especies de cladóceros evaluando su respuesta al suministro de diferentes dietas por ejemplo, Gliwicz (1990) encontró que *Daphnia pulex* y *Daphnia hyalina* presentan una relación inversa entre la concentración suministrada de *Scenedesmus acutus*, con el tamaño de los huevos, contenido de proteína y lípidos en los neonatos.

Michales y De Meester (1998) demostraron que *Daphnia magna* puede alimentarse con combinaciones de *Scenedesmus acutus* y *Saccharomyces cerevisiae* en sustituciones hasta del 75 % de *S. acutus* además de que con la adición de infusorios ciliados, la condición fisiológica de los cladóceros mejora.

Peña (2005) encontró que *Ceriodaphnia dubia* y *Moina macrocopa* crecen más rápido alimentadas con *Chlorella vulgaris* que, con *Scenedesmus* o diferentes combinaciones de *S. cerevisiae* con cada una de las microalgas.

New (1990) propone los mecanismos de la interacción entre los liposomas y las células de los organismos, donde menciona que los liposomas al entrar en contacto con el tejido de cualquier organismo, éste se convierte en un tejido diana, y es cuando los liposomas pueden liberar su contenido.

En una revisión, Luzardo-Álvarez (2010) recomienda el uso de microencapsulados con recubrimiento a base de liposomas para ácidos grasos, proteínas, aminoácidos, bacterias, enzimas, microalgas y algunos probióticos como vacunas como una

alternativa para la sustitución parcial de alimento vivo para diferentes cultivos de especies en la acuicultura. La microencapsulación a través de liposomas en nauplios de *Artemia*, se ha utilizado para adicionar ácidos grasos en peces marinos y peneidos (De la Cruz, 1992; Koven, 1999; Tonheim, 2000; Evjemo, 2001; Ravet, 2003; Olsen, 2004, Rivera, 2008); proteínas en larvas de la dorada (*Sparus aurata*) (Yufer, 1996) metionina en crustáceos y peces marinos (Monroig, 2007), vitaminas A, D y E en guppies, (Esparza, 2006; García-Ortega, 2010; Merchie, 1996).

En el área de sanidad también se han logrado avances a base de microencapsulados como la administración de diferentes probióticos como norfloxacin en *Moina sp* (Khangarot, 1985, Gatesoupe, 1999; Wiwattanapatapee, 2002).

## OBJETIVOS

### GENERAL

Evaluar el efecto de diferentes concentraciones de metionina microencapsulada en poblaciones de *Ceriodaphnia dubia*.

### PARTICULARES

Determinar el crecimiento poblacional de *Ceriodaphnia dubia* con metionina microencapsulada suplementada a diferentes concentraciones.

Determinar la composición proximal de *Ceriodaphnia dubia* alimentada con metionina microencapsulada a diferentes concentraciones.

## MATERIALES Y METODOS

Este trabajo se llevó a cabo en las instalaciones del Laboratorio de Producción Acuícola (Acuario) de la FES Iztacala, en diferentes etapas.

### **Aislamiento, cultivo y mantenimiento de organismos**

#### *Aislamiento y cultivo de Ceriodaphnia dubia.*

Se filtro agua del Vaso Regulador las Carretas, Tlalnepantla, Edo. de México a través de una red planctónica de 50  $\mu\text{m}$  para coleccionar, identificar mediante claves taxonómicas (Elias, 2008) y aislar al cladócero *Ceriodaphnia dubia*. La cepa aislada se mantuvo en medio EPA (Weber, 1993) (Anexo 1), alimentándola con la microalga *Chlorella vulgaris*, en una concentración de  $1.0 \times 10^6$  cel  $\text{ml}^{-1}$ .

#### *Cultivo de microalga Chlorella vulgaris.*

Se cultivó el alga *Chlorella vulgaris*, en medio basal Bold (Borowitzka & Borowitzka, 1988) (Anexo 2); en reactores de plástico de 2.5 litros con 2 litros de medio. Las microalgas se sembraron a una densidad inicial de siembra de  $1 \times 10^6$  cel  $\text{ml}^{-1}$ . Se mantuvieron a una temperatura ambiente de  $24 \pm 1$  °C, con aireación constante e iluminación continua, suministrada por lámparas de luz de día de 5000 K cada una y se cosechó en una densidad de  $25 \times 10^6$  cel  $\text{ml}^{-1}$ , posteriormente se dejó sedimentar, concentrar y mantener las células en refrigeración para su posterior utilización. La determinación de la concentración de células de *Chlorella vulgaris* se llevó a cabo a través de un conteo de la microalga con la cámara de Neubauer y un microscopio óptico Nikon Alphaphot – 2 YS2.

## **Elaboración de microencapsulados**

Se elaboraron microencapsulados de DL-metionina con distintas concentraciones 20, 40, 60, y 80 ( $\text{mg ml}^{-1}$ ) de acuerdo a Bangham y Cols 1965. (Anexo 3).

## **Etapa Experimental**

Se trabajó con 5 tratamientos, cada uno por triplicado, utilizando las siguientes concentraciones de DL-metionina microencapsulada: 0, 20, 40, 60, 80 ( $\text{mg ml}^{-1}$ ). Se utilizaron 15 recipientes de plástico transparentes de 70 ml de capacidad, donde se colocaron 50 ml de medio EPA con la concentración respectiva, en cada recipiente se agregó *C. dubia* con una densidad inicial de  $1 \text{ org ml}^{-1}$ . A partir de ese momento, se registró el crecimiento poblacional contando a los organismos diariamente, cambiando el medio EPA y suministrando microalgas a una concentración de  $1 \times 10^6 \text{ cel ml}^{-1}$  diariamente. Los conteos se realizaron por conteo individual en una cámara para zooplancton, pipetas Pasteur y un microscopio estereoscópico (Marca Nikon SMZ1500). En los primeros días del cultivo con densidad poblacional  $\leq 5 \text{ org ml}^{-1}$ , se realizaron conteos totales y a partir de una densidad de  $6 \text{ org ml}^{-1}$  se tomaron alícuotas de 1 ml haciendo el conteo por triplicado.

Con la finalidad de establecer el sitio de adhesión de los mismos, se registraron fotográficamente a los organismos.

## **ANÁLISIS PROXIMALES**

Se cultivó a *C. dubia* en las concentraciones de DL-metionina en las que se registró el mejor crecimiento poblacional (0, 20 y  $40 \text{ mg ml}^{-1}$ ) para obtener la biomasa necesaria y llevar a cabo los siguientes análisis proximales.

Porcentaje del contenido de humedad (AOAC, 1990).

Se tomo una muestra con peso en base húmeda ( $P_H$ ) conocido, se colocó en crisoles de metal y para su secado se utilizó un horno Prendo HSCF- 46 con una temperatura de  $60 \pm 2$  ( $^{\circ}\text{C}$ ) por 24 horas. Después de ese tiempo se pesó la muestra cada dos horas hasta que el peso de la muestra se estabilizo, indicando que se elimino toda la humedad de la misma.

$$\frac{P_h - P_s}{P_h} \times 100$$

Contenido de cenizas (%).

Se utilizó muestra en base seca ( $P_s$ ) colocándola en crisoles dentro de una mufla a  $550$   $^{\circ}\text{C}$  por  $8 \pm 1$  horas. (tiempo en el que la muestra adquiere un color blanco indicador de que solo se quedan los minerales presentes en la misma), pesando el remanente de los crisoles ( $P_f$ ).

$$\frac{P_s - P_f}{P_s} \times 100$$

Contenido de Proteínas - Método de Lowry %.

Se determinó el contenido de proteína del cladócero *Ceriodaphnia dubia* enriquecido a diferentes concentraciones de metionina, de acuerdo a la técnica de Micro Lowry descrita en el producto "Total Protein Kit, Micro Lowry, Peterson's Modification" (Sigma Diagnostics, MO,EUA) (Anexo4).

## Lípidos Totales. %

El contenido de lípidos totales se determinó con la técnica de extracción por Metanol-Cloroformo reportada por Blight y Dyer (1959) (Anexo 5).

## RESULTADOS

Se logró el enriquecimiento de los organismos a través la ingestión de partículas microencapsuladas además de la adhesión las mismas a la pared corporal de *Ceriodaphnia dubia* como se observa en las figuras 1 y 2.

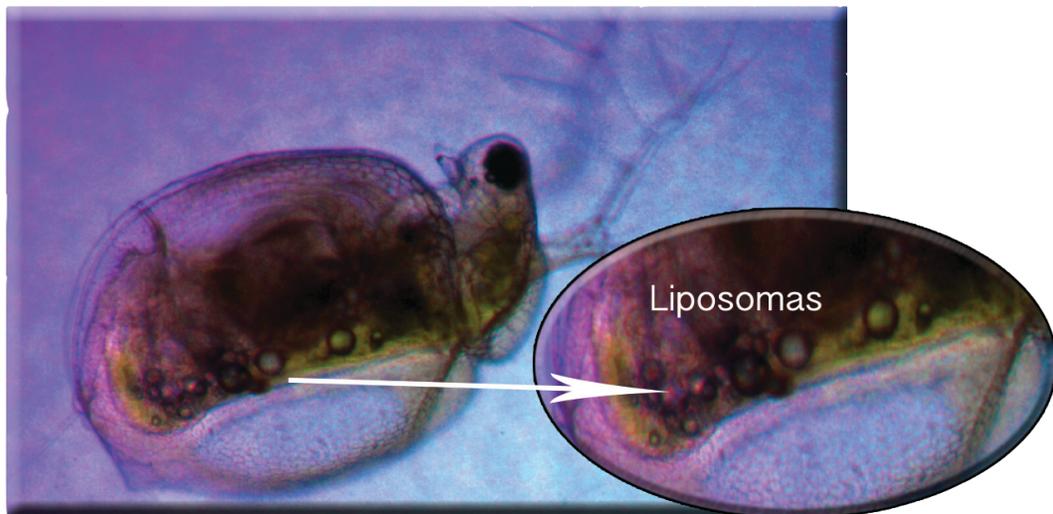


Figura 1.- Microencapsulados a base de liposomas de metionina en el tracto digestivo en *C. dubia*.

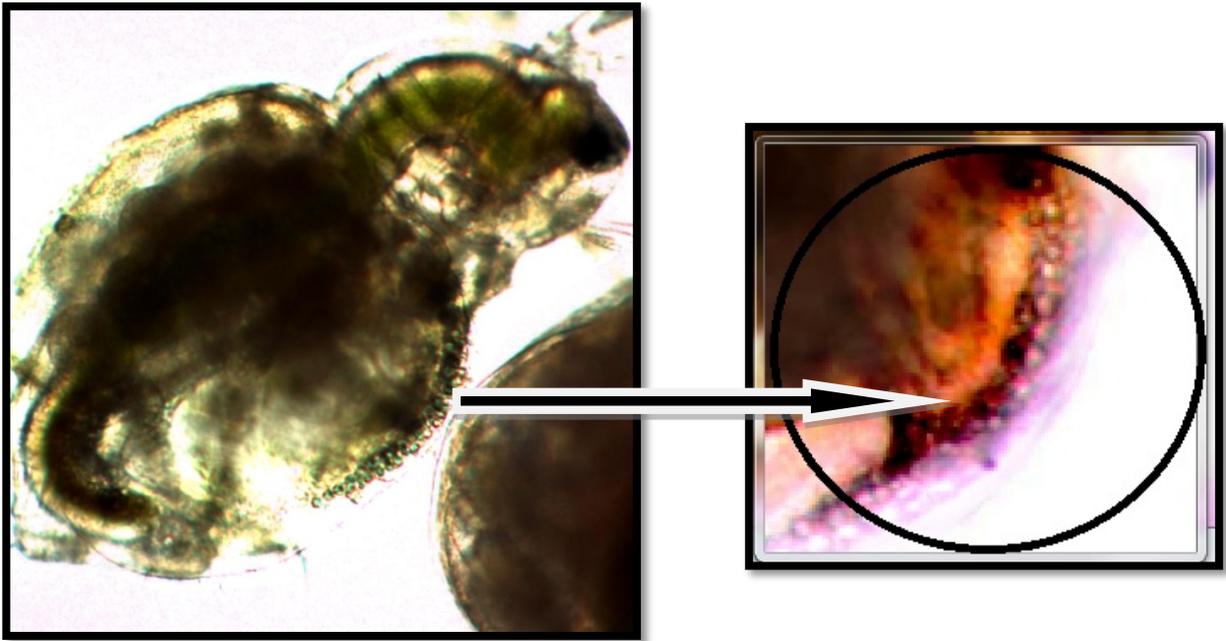


Figura 2.- Microencapsulados de liposomas de metionina adheridos a la pared corporal de *C. dubia*.

Con respecto a la dinámica del crecimiento poblacional de *C. dubia* en los diferentes tratamientos, se observa que durante los primeros 5 días, hay una etapa de estabilización en todos ellos, y a partir del 6° día comienza un crecimiento exponencial en los tratamientos de 20 y 40 mg ml<sup>-1</sup> de metionina así como en el grupo control (Fig 3, a,b, e). En estas figuras, se observa que la máxima densidad poblacional en 20 y 40 mg ml<sup>-1</sup> de metionina se alcanzó a los 17 días de cultivo con 32 y 33 org ml<sup>-1</sup> respectivamente; y en el grupo control al día 18 con 35 org ml<sup>-1</sup>.

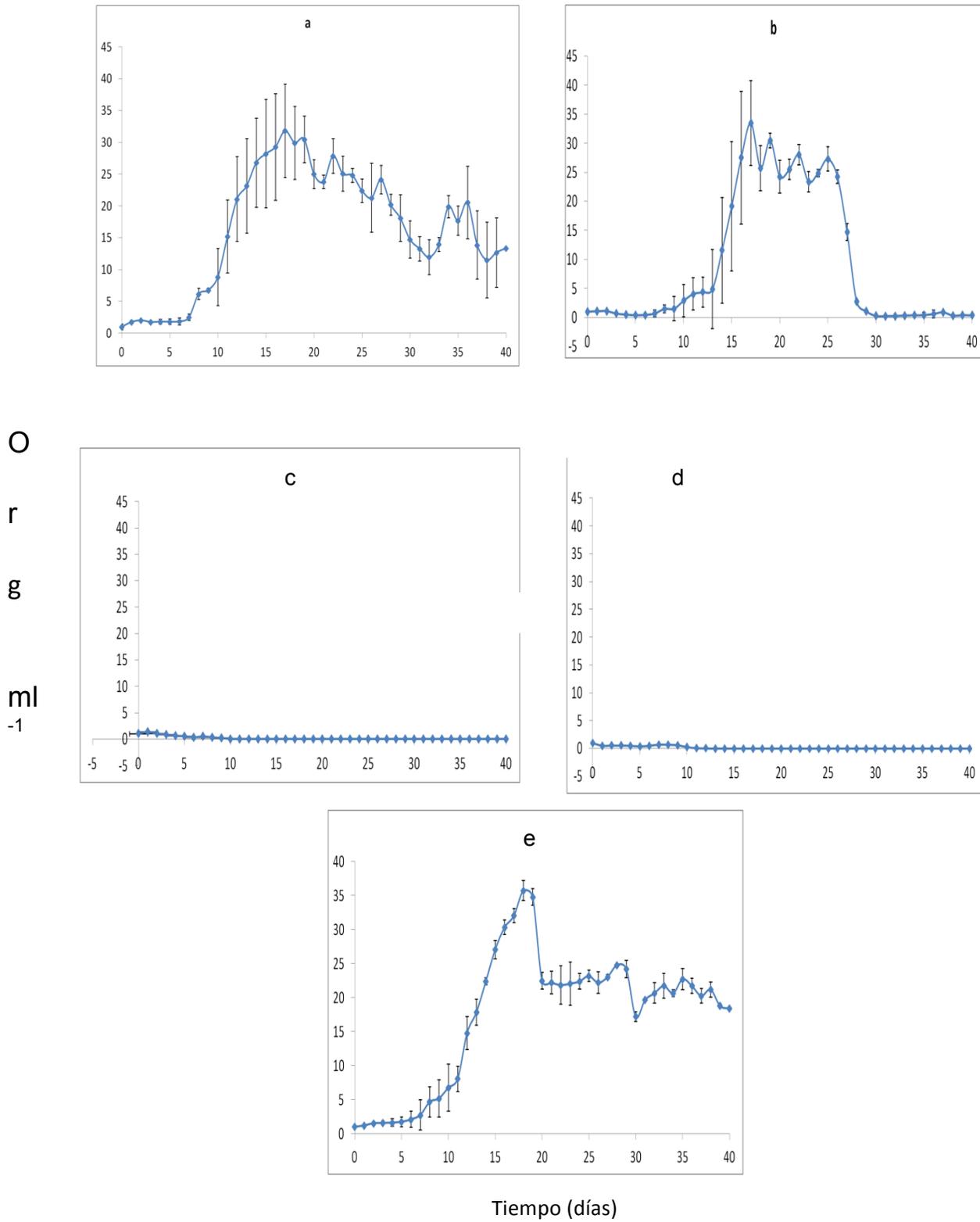


Figura 3.- Crecimiento poblacional de *C. dubia* con diferentes concentraciones de metionina microencapsulada a) 20 mg ml<sup>-1</sup>, b) 40 mg ml<sup>-1</sup>, c) 60 mg ml<sup>-1</sup> d) 80 mg ml<sup>-1</sup>, e) control alimentando con una concentración de 1 X 10<sup>6</sup> cel ml<sup>-1</sup> de *Chlorella vulgaris*.

Por otra parte, en figura 4 se muestran las tasas de crecimiento poblacional de *C. dubia* en las diferentes concentraciones de metionina. Correspondiendo a lo observado en la figura anterior, en las concentraciones de 60 y 80 mg ml<sup>-1</sup> de metionina, hay tasas de crecimiento negativas, ya que en ambos casos, en las poblaciones respectivas no hay un crecimiento de la población y finalmente, en ambas se tuvo una mortalidad total (Figura 4).

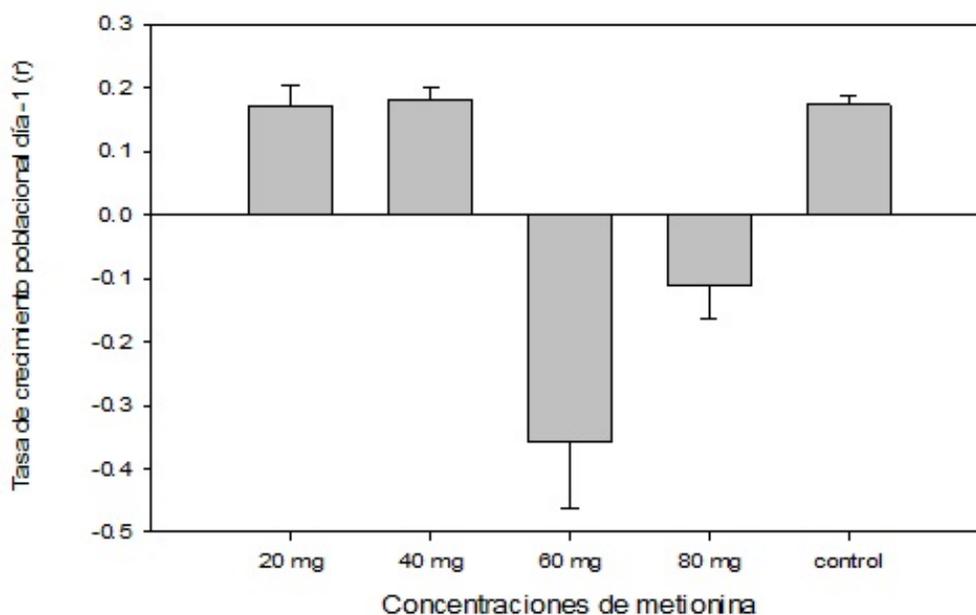


Figura 4.- Tasa intrínseca de crecimiento poblacional (r) de *C. dubia* con diferentes concentraciones de metionina microencapsulada.

En lo correspondiente al análisis proximal de *C. dubia*, el contenido de humedad en los organismos no varió significativamente ( $\alpha = 0.05$ ), en todos los casos se registraron valores cercanos al 80% de contenido de agua (Figura 5).

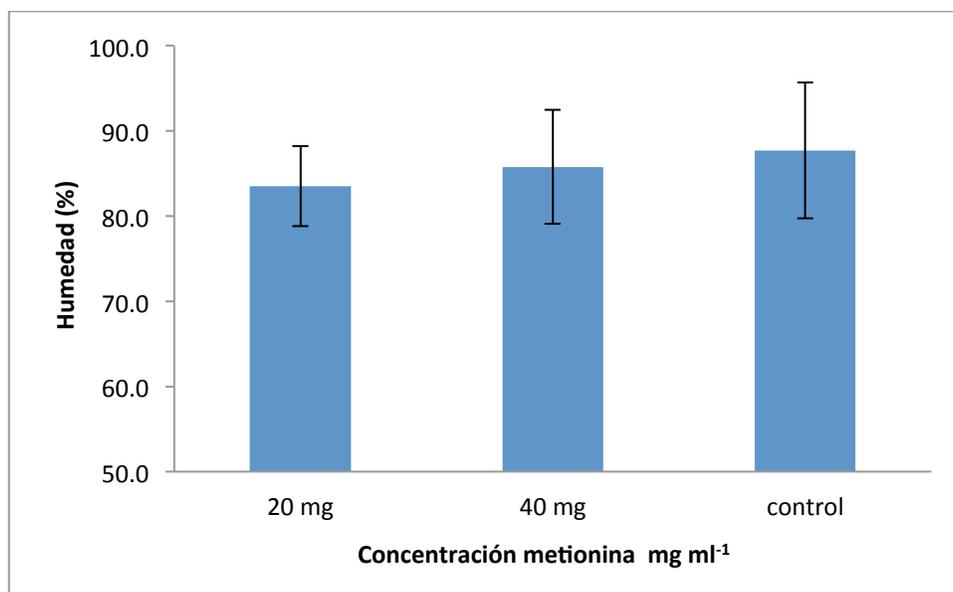


Figura 5.- Porcentaje de humedad de *C. dubia* con diferentes concentraciones de metionina microencapsulada.

#### CONTENIDO DE CENIZAS.

En la figura 6 se muestra el porcentaje en el contenido de cenizas de los diferentes tratamientos, sin variaciones significativas ( $\alpha=0.05$ ) oscilando entre el 3 y 4.5% de contenido de cenizas.

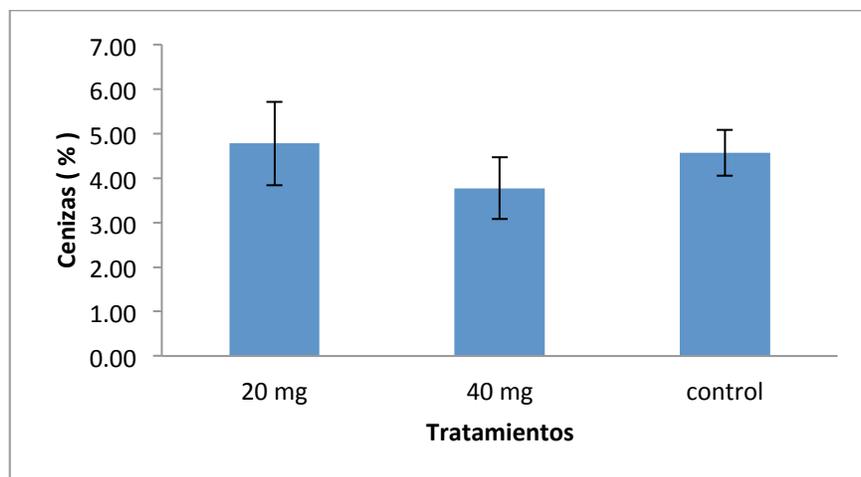


Figura 6.- Porcentaje del Contenido de cenizas de *C. dubia* enriquecida con metionina microencapsulada en concentraciones de 20 y 40 mg ml<sup>-1</sup> y el grupo control.

En la figura 7 se muestra el contenido de proteína entre los diferentes tratamientos, registrando variaciones significativas ( $\alpha = 0.05$ ) entre la concentración de 40 mg ml<sup>-1</sup> y el grupo control, no así entre los tratamientos de 40 mg ml<sup>-1</sup> y de 20 mg ml<sup>-1</sup>

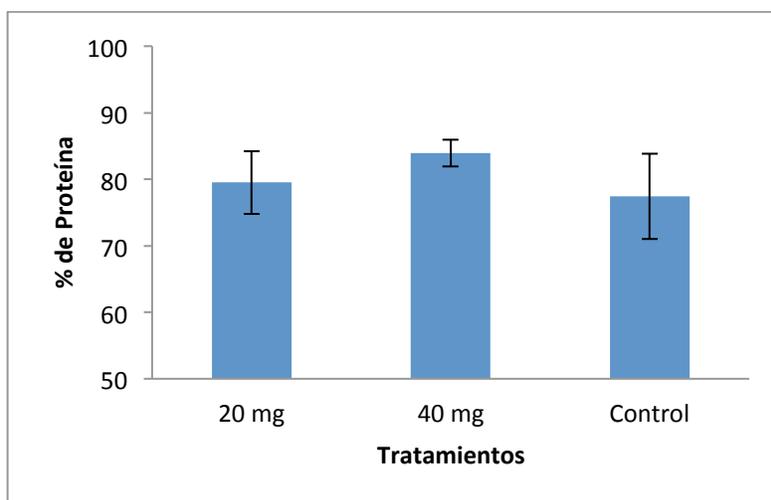


Figura 7.- Contenido de proteína (%) de *C. dubia* enriquecida con metionina micro encapsulada en concentraciones de 20 y 40 mg ml<sup>-1</sup> y el grupo control.

## Contenido de lípidos

En la figura 8 se muestran los valores de contenido de lípidos. El valor más alto en el grupo control seguido de las concentraciones de 20 y 40 mg ml<sup>-1</sup>, sin embargo estas diferencias no son significativas ( $\alpha = 0.05$ ).

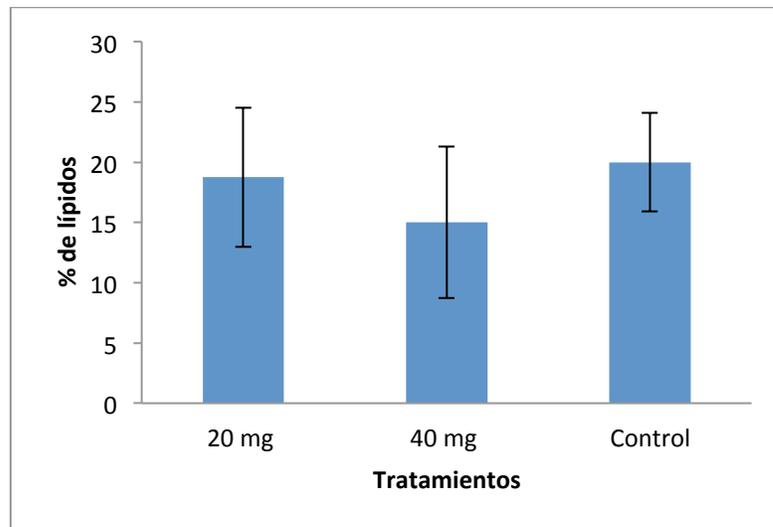


Figura 8.- Contenido de lípidos (%) de *C. dubia* enriquecida con metionina microencapsulada en concentraciones de 20 y 40 mg ml<sup>-1</sup> y el grupo control.

## DISCUSIÓN

Los resultados muestran que puede emplearse metionina microencapsulada para enriquecer a *C. dubia* en concentraciones no mayores de  $40 \text{ mg ml}^{-1}$  ya que en concentraciones mayores, las poblaciones no crecen y en concentraciones menores, si bien es cierto hay un buen desarrollo poblacional, desde el punto de vista nutricional, concentraciones menores a  $40 \text{ mg ml}^{-1}$  no tienen la misma calidad.

El crecimiento poblacional en las concentraciones más altas de metionina microencapsulada ( $60$  y  $80 \text{ mg ml}^{-1}$ ) no se dio, posiblemente a una saturación de liposomas en el cuerpo de *C. dubia* provocando en los organismos efectos adversos, al obstruir el movimiento de los organismos, y posiblemente la ingesta de alimento y la reproducción al mantener al organismos en condiciones de estrés (Krebs, 1985; Dodson 1991 y Begon (1995).

El tiempo en el que se alcanzó la abundancia máxima en las concentraciones de  $20$  y  $40 \text{ mg ml}^{-1}$  de metionina (17 días), y el control (18 días) es más corto que el reportado por Peña (2005) en *C. dubia* alimentado con *Chlorella*.

El enriquecimiento de *C. dubia* con metionina a  $40 \text{ mg ml}^{-1}$ , se ve reflejado en el valor nutricional de los mismos con una concentración de proteína de 83%, valor que supera a los reportados por Luna-Figueroa (2010) para *Moina wierzejski*, (50%) y *Artemia franciscana* (57.26 %); por Watanabe y cols. (1983). En *Moina* sp. (68.75 %) alimentada con *Chlorella* sp. y por Torrentera y Tacon, (1988) para *Daphnia* sp. (70.09 %) y *Moina* sp. (68.75%), valor compartido por Romero (2009).

En lo que respecta a la cantidad de humedad de *C. dubia* obtuvimos un rango de 83 a 87%; mientras que Torrentera (1988) reporta que el análisis proximal de cladóceros como *Daphnia* sp. y *Moina* sp. tienen una humedad de 89.3 y 87.2% respetivamente.

El porcentaje de lípidos se obtuvo un rango de 15 a 20 % de lípidos para *C. dubia* los cuales concuerdan con lo reportado por Torrentera (1988) quien para el cladóceros *Moina* sp. obtuvo una cantidad de 22.65%, mientras que por Luna-Figueroa (2010) para *Moina wierzejski* fue de 19.37%.

En lo que respecta a la cantidad obtenida de cenizas tuvimos valores con rangos de 3.37% a 4.77 %. Torrentera (1988) demostró valores de 6.54% siendo más altas que con lo obtenido nosotros; pudiéndose inferir por la posibilidad del tipo de alimento suministrado.

Estos resultados son importantes para su aplicación en la acuicultura, ya que el conocer el tiempo de máxima densidad poblacional, es importante para determinar tiempos y densidades de cosecha en los programas de alimentación de crías o larvas de organismos acuáticos. Además de incrementar el valor nutricional de el organismo, objeto de enriquecimiento. Por otra parte, estudios posteriores podrían arrojar información relativa a la utilización de microencapsulados en organismos no solamente para el enriquecimiento de ellos, sino para la administración de diferentes sustancias como antibióticos, promotores de crecimiento, vitaminas, entre otras para el desarrollo óptimo de los organismos cultivados.

## CONCLUSION

La metionina microencapsulada en las concentraciones  $< 40 \text{ mg ml}^{-1}$  de metionina no afecto el crecimiento poblacional de los *Ceriodaphnia dubia*.

La metionina microencapsulada tuvo efectos en la composición nutricional de *Ceriodaphnia dubia*.

La metionina microencapsulada tuvo diferencias en el contenido de proteínas en *Ceriodaphnia dubia* en las concentraciones de  $40 \text{ mg ml}^{-1}$  de Metionina con el grupo control.

El análisis proximal de metionina microencapsulada a diferentes concentraciones no obtuvo diferencias en humedad, lípidos y contenido de cenizas.

La metionina microencapsulada es adherida en el tracto digestivo y el caparazón de *Ceriodaphnia dubia*.

## REFERENCIAS

- Alva M. A. F., S. S. S. Sarma, & S. Nandini. 2001. Comparative population dynamics of three species of Cladocera in relation to different levels of *Chlorella vulgaris* and *Microcystis aeruginosa*. *Crustaceana*. 74:749-764.
- AOAC, 1990. Official Methods of Analysis, 15<sup>th</sup> ed. Association of Anal. Chem., Virginia, USA, pp. 69 – 78.
- Araya, J. M., Zuñiga, L. R. Manual taxonómico del zooplancton lacustre de Chile. Copepods. Boletín Informativo Limnológico, [In Spanish.] 8, 1 1 1985.
- Arnold, D. E. 1971. Ingestion, assimilation, survival and reproduction by *Daphnia pulex* fed seven species of blue-green algae. *Limnology & Oceanography* 16: 906-920.
- Begon, M, Harper JL y Townsend CR. (1995). Ecología. Individuos, poblaciones y comunidades. Ediciones Omega, S. A. España. 886.
- Bernabé G. 1991. Acuicultura. Ediciones Omega. Barcelona. 478 pp.
- Borowitzka, M. A. & L. J. Borowitzka. 1998. *Micro-algal biotechnology*. Cambridge University Press, London. 477 p
- Dabrowski, K., Rusiecki, M., 1983. Content of total and free amino acids in zooplanktonic food of fish larvae. *Aquaculture* 30, 31-42.
- De la Cruz, A. (1992). Pruebas de resistencia a baja salinidad de las postlarvas de *Penaeus schmitti*. *Rev. Inv. Mar.*, 13:152-158
- Dodson S. I. & D. G. Frey, 1991. Cladocera and other branchiopoda in ecology and classification of North American Freshwater invertebrates. Edited by Thorp J. H. and Covich A.P. Academy Press, Inc. San Diego. 786 pp.
- Dole O. M. J., D. M. P. Galassi, P. Marmonier & C.M. Des Chatelliers. 2000. The biology and ecology of lotic microcrustaceans. *Freshwater Biology*. 44:63-91.
- Elias, G. M., Suarez, M. E. Gutierrez, A. M. A, Silva, B. M, Granados, R. J. G., Garfias, E. T. (2008). Cladóceras y Copépodos Guía Ilustrada. México.

Esparza, S. 2006. Efecto de dietas enriquecidas con vitaminas A, D y E en alevines de *Poecilia reticulata* (Guppy). Tesis de licenciatura. UNAM.

Evjemo, J. O., Danielsen, T. L., and Olsen, Y. 2001. Losses of lipid, protein and n-3 fatty acids in enriched *Artemia Franciscana* starved at different temperatures. *Aquaculture* 193: 65-80.

García, A. *et al.* 2010. Uso de ingredientes de origen vegetal como fuentes de proteína y lípidos en alimentos balanceados para peces marinos carnívoros. *Avances en Nutrición Acuícola X - Memorias del Décimo Simposio Internacional de Nutrición Acuícola*, 8-10 de Noviembre, San Nicolás de los Garza, N. L., México. Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, México, pp. 321-340.

Gilbert, J. J. 1983. Sexual dimorphism in zooplankton (Copepoda, Cladocera, and Rotifera). *Annual Review of Ecology and Systematics* 14: 1-33.

Gore, R. S. 2006. Nutritional support of fish. *Journal of Exotic Pet Medicine*, 15(4): 264-268.

Helland, S., Triantaphyllidis, G.V., Fyhn, H.J., Evjen, M.S., Lavens, P., Sorgeloos, P., 2000. Modulation of the free amino acid pool and protein content in populations of the brine shrimp *Artemia* spp. *Mar. Biol.* 137, 1005-1016.

Koven, Barr, Hadas, Ben-Atia, Chen, Weiss and Tandler (1999), The potential of liposomes as a nutrient supplement in first-feeding marine fish larvae. *Aquaculture Nutrition*, 5: 251–256. doi: 10.1046/j.1365-2095.1999.00121.

Krebs, C. J. (1985). *Ecology: The experimental analysis of distribution and abundance*. New York: Harper and Row [800 pp.].

Lavens P. y Sorgeloos P. Introduction. In: -(eds). *Manual on the production and use of live food for aquaculture*. FAO Fisheries Technical Paper No 361. Rome: FAO, 1996; 1, p. 1-6.

Lim, L. C.; Sho, A.; Dhert, P. and Sorgeloos, P. 2001. Production and application of on-grown *Artemia* in freshwater ornamental fish farm. *Aquac. Econ. Manage.* 5: 211-228

Luizi, S. F., Gara, B., Shields, R. J., Bromage, N.R. 1999. Further description of the development of the digestive organs in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) larvae, with notes on differential absorption of copepod and *Artemia* prey. *Aquaculture* **176**, 101-116.

Luna Figueroa, J., Vargas, Z. T. de J. y Figueroa, T. J. 2010. Alimento vivo como alternativa en la dieta de larvas y juveniles de *Pterophyllum scalare* (Lichtenstein, 1823). *Avances en Investigación Agropecuaria*. 14 (3): 63-72.

Luzardo-Alvarez A., Otero-Espinar F J and Blanco-Mendez J. 2010. Microencapsulation of diets and vaccines for cultured fishes, crustaceans and bivalve mollusks. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 20, 277-288.

Merchie G., 1996. Use of nauplii and meta-nauplii. In: *Manual on the Production and Use of Live Food for Aquaculture*. (eds. P. Lavens, P. Sorgeloos.). pp. 137-163. FAO Fisheries Technical Paper 361. FAO, Rome. 295 pp.

Monroig, O. 2006, Diseño y optimización de liposomas para su uso como sistema de suministro de nutrientes a larvas de peces marinos. Memoria para optar el grado de Doctor. Departamento de Biología y Antropología Física. Universidad de Valencia. pp. 114.

Navarro, J.C., Ireland, J., Tytler, P., 1993. Effect of temperature on permeability and drinking rates of the metanauplii of the brine shrimp *Artemia* sp. *Mar. Biol.* 116, 247-250.

New, R.R.C. (Ed.), 1990. Liposomes. A practical approach. IRL Press, Oxford (U.K.) 301 pp.

Ocampo, L. 2010. .Evaluación del crecimiento de un cultivo de *Daphnia magna* alimentado con *Saccharomyces cerevisiae* y un enriquecimiento con avena soya. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, Vol. 23. Num. 1. pp. 78 – 85.

Olsen, Y. 2004. Live food technology of cold water marine fish larvae. In "Culture of cold-water marine fish. Moksness, E., Kjørsvik, E. and Olsen, Y. (eds). Blackwell. Pp 73-128.

Pedroza-Islas, R., 2002. Alimentos microencapsulados: particularidades de los procesos para la microencapsulacion de alimentos para larvas de especies acuícolas. En : Cruz-Suárez, L. E., Ricque-Marie, D., Tapía-Salazar, M., Gaxiola-Cortés, M. G. y Simoes, N. (Eds.). *Avances en nutrición acuícola VI. Memorias del VI Simposium Internacional de Nutricion Acuicola*. 3 al 6 de Septiembre del 2002. Cancún, Quintana Roo, México.

Peña-Aguado, F.; Nandini, S.; Sarma, S.S.S. 2005. Differences in population growth of rotifers and cladocerans raised on algal diets supplemented with yeast. *Limnologica*. 35:298-303.

Prieto, M. 2006. Cultivo experimental del cladócero *Moina* sp. alimentado con *Ankistrodesmus* sp y *Saccharomyces cerevisiae*. *Revista MVZ Cordoba*. 705-714 pp.

Ravet, J. L., M. T. Brett, and D. C. Muller-Navarra. 2003. A test of the role of polyunsaturated fatty acids in phytoplankton food quality for *Daphnia* using liposome supplementation. *Limnol. Oceanogr.* 48: 1938–1947

Rottman R. 1999. Técnicas de la cultura de Moina: El Daphnia ideal para alimentar peces de agua dulce. 601 pp.

Shields, R.J., Bell, J.G., Luizi, F.S., Gara, B., Bromage, N.R., Sargent, J.R., 1999. Natural copepods are superior to enriched *Artemia* nauplii as feed for halibut larvae (*Hippoglossus hippoglossus*) in terms of survival, pigmentation and retinal morphology: relation to dietary essential fatty acids. J. Nutr.129, 1186-1194.

Tonheim S. K., Koven, W., Ronnestad I., 2000. Enrichment of *Artemia* with free methionine. *Aquaculture*, 190: 223–235

Torrentera L, Tacon A. La producción de alimento vivo y su importancia en acuicultura. Una diagnosis. FAO-Italia. 1988; [Fecha de acceso: 10 de marzo de 2008] URL:<http://www.fao.org/docrep/field/003/AB473S/AB473S00.htm>.

Uddin M.S., Hawlader M.N.A., Zhu H.J. – Microencapsulation of ascorbic acid: effect of process variables on product characteristics. J. Microencapsulated, 18, 199-209, 2001.

Watanabe, T., Kitajima, C., Fujita, S., 1983. Nutritional value of live organisms used in Japan for mass propagation of fish: a review. *Aquaculture* 34, 115-143.

Wetzel R. G. 1981. Limnología. Omega. Madrid. España. 379 pp.

Wiwattanapataptee R, Padoongsombat N, Choochom T, Tang S, Chaimongkol A. 2002. Water flea *Moina macrocopa* as a novel biocarrier of norfloxacin in aquaculture. *Journal Control Release* 83: 23–28

Yufera, M.; Sarasquete, MC.; Fernandez-Diaz, C., 1996: Testing protein-walled microcapsules for the rearing of first-feeding gilthead sea bream *Sparus aurata* L. larvae. *Marine and Freshwater Research*, 472: 211-216 (Special issue).

Zimmermann S, Jost H. 1998. Recents Avancos na Nutricao de Peixes: a Nutricao por Fases em Piscicultura Intensiva In: Simposio sobre manejo e nutricao de peixes 2. 1998. Piracicaba. p. 123-162

## ANEXOS

### ANEXO 1

MEDIO EPA: (EPA, 2000).

El medio es preparado con agua libre de cloro, y ajustado a una dureza adecuada.

Bicarbonato de Sodio:	(NaHCO <sub>3</sub> )	1.9g/20L
Sulfato de Calcio	(CaSO <sub>4</sub> )	1.2g/20L
Sulfato de Magnesio	(MgSO <sub>4</sub> )	1.2g/20L
Cloruro de Potasio	(KCl)	0.04g/20L

## ANEXO 2

MEDIO BOLD BASAL (Borowiska, 1988).

Se prepararon 6 soluciones con las siguientes sustancias en 1 litro de agua destilada:

NaNO<sub>3</sub> 25.0 g.

CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O 2.5 g.

MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 7.5 g.

K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 7.5 g.

NaCl 2.5 g.

En 940 ml de agua destilada, agregar 10 ml de cada solución stock y 1.0 ml de cada solución stock que se preparó de la siguiente manera:

- A) 50 g. de EDTA y 31 g. de KOH y disolverlo en 1 litro de agua destilada.
- B) 4.98 g. de FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O disuelto en un litro de agua acidificada (agua acidificada: 1 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> disuelta en 1 litro de agua destilada).
- C) 11.42 g. de H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> disuelto en 1 litro de agua destilada.
- D) En 1 litro de agua destilada disolver lo siguiente:

\*ZnSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 8.82 g.

\*MnCl<sub>2</sub> · 4H<sub>2</sub>O 1.44 g.

\*MoO<sub>3</sub> 0.71 g.

\*CuSO<sub>4</sub> · 5H<sub>2</sub>O 1.57 g.

\*Co(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O 0.49 g.

## **ANEXO 3**

TECNICA de MICROENCAPSULACION por hidratación simple (Banghan y Cols, 1965)

### **Solución de Metionina**

1. Diferentes cantidades de metionina (20, 40, 60, 80 mg).
2. 3 ml de agua destilada por cada concentración de metionina.
3. Se disuelven la metionina en 3 ml de agua destilada.

### **Membrana del liposoma**

1. En un tubo de cristal de base redondeada se mezclan 0.003 mg de colesterol + 0.030 mg fosfatidilcolina.
2. Se disuelven con 3 ml de cloroformo.
3. Se procederá a la evaporación total del disolvente (cloroformo) mediante la aplicación de un flujo de aire, hasta conseguir una fina película en la base del tubo de cristal.

### **Formación de Liposomas**

1. A la película formada, se le adiciona la solución de metionina en forma independiente cada concentración para dar paso al proceso de hidratación de los componentes de la membrana.
2. La hidratación y la formación de los liposomas se favorecerán mediante una agitación constante por 30 min del tubo en un sonificador (Figura 9) (Bangham y cols., 1965).

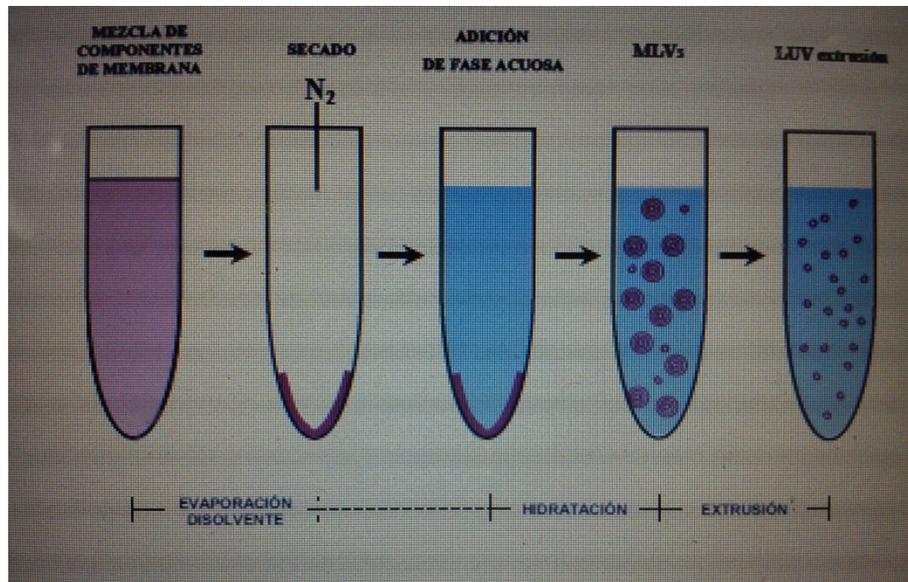


Fig 9.- Procedimiento de preparación de hidratación simple, de liposomas multilaminares (MLVs) y liposomas unilamelares de extrusión (LUVextrusión).

## **ANEXO 4**

### **Contenido de Proteínas - Método de Lowry.**

1. Colocar 50 mg de muestra en un tubo de ensaye.
2. Agregar 1 ml de agua destilada y homogenizar durante 2 minutos.
3. Agregar 1 ml de reactivo de Lowry y dejar reposar por 20 minutos.
4. Agregar 5 ml de folín y dejar reposar por 30 minutos.
5. Aforar con agua destilada a 10 ml y centrifugar 1 minuto a 5000 rpm.
6. Leer a 540 nm, en un espectrofotómetro Hach.

## **ANEXO 5.**

### **Determinación de porcentaje de lípidos (Blight y Dyer, 1959).**

1. Pesar 200 mg de muestra y colocarla en un tubo de ensaye.
2. Agregar 3 ml de metanol y 1.5 ml de metanol y 1.5 ml de cloroformo.
3. Homogenizar por un periodo de 2 minutos dentro de un recipiente con hielo, para evitar la oxidación de los lípidos.
4. Agregar 1.5 ml de cloroformo y homogenizar por 2 minutos dentro de un recipiente con hielo.
5. Centrifugar las muestras por un periodo de 10 minutos a 5000 rpm.
6. Pesar 200 mg de muestra y colocarla en un tubo de ensaye.
7. Agregar 3 ml de metanol y 1.5 ml de cloroformo.
8. Homogenizar por un periodo de 2 minutos dentro de un recipiente con hielo, para evitar la oxidación de los lípidos.
9. Agregar 1.5 ml de cloroformo y homogenizar por 2 minutos dentro de un recipiente con hielo.
10. Centrifugar las muestras por un período de 10 minutos a 5000 rpm.

## ANEXO 6.

Los cladóceros, crustáceos de la clase Brachiopoda, comprenden aproximadamente 620 especies y se considera que alrededor de 200 se encuentran en la región Neotropical (Fuentes- Reines; et al, 2012).

Son organismos que se reproducen por partenogénesis, en condiciones favorables y generalmente de manera sexual cuando las condiciones ambientales son adversas como la temperatura baja, fotoperiodo corto, falta de alimento, sobrepoblación y acumulación de metabolitos. (Gilbert, 1983). En su proceso de digestión, los desechos son transportados al intestino posterior por medio de movimientos peristálticos para ser expulsados por el ano localizado en la parte terminal del postabdomen (Dodson y Frey, 1991).

*Ceriodaphnia dubia* tiene una longitud de 900 mm.(Fig 10); no presenta rostro pero tiene un seno cervical bien marcado, que delimita la cabeza pequeña de un cuerpo grande y redondeado. El margen dorsal de la cabeza tiene una ligera concavidad en la parte media y otra más suave en la parte posterior. El post-abdomen tiene 8-10 espinas anales fuertes, con numerosos fascículos de sedas laterales (Araya, J. 1985).

Clasificación taxonómica del cladóceros *C. dubia*.

Superclase Crustacea

Clase Brachiopoda

Superorden Cladocera

Orden Anomopoda

Familia DAPHNIIDAE

Género *Ceriodaphnia*

Especie *Ceriodaphnia dubia* (Richard, 1984)

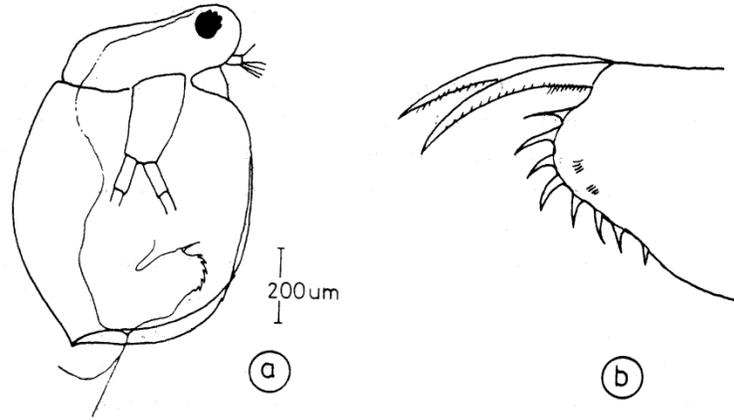


Figura 10.- *Ceriodaphnia dubia*.

a) Vista lateral, b) Post-abdomen