

Toxicidad de nauplios de *Artemia franciscana* a dos piretroides de uso comercial

Nauplios toxicity of franciscan *Artemia* to two pyrethroids of commercial use

Gustavo Arencibia-Carballo, Rafael Antonio Tizol-Correa y René Oscar Rodríguez
Centro de Investigaciones Pesqueras, 5ta. Ave y 246, Santa Fe, Playa,
Ciudad de La Habana, Cuba, CP: 19100, Teléfono: (537) 209-7107,
Fax: (537) 204-5895, E-mail: gustavo@cip.telemar.cu / garen04@gmail.com

RESUMEN

Se presentan los resultados de la determinación de la LC_{50} para 24 h de exposición mediante una prueba de toxicidad aguda en *Artemia franciscana*. Se caracterizó una cepa, la cual según los resultados se evaluó de primera calidad y se aplicaron criterios importantes para el empleo de sus nauplios en dichas pruebas. Se determinó la toxicidad de los insecticidas piretroides, cipermetrina y permetrina reportándose los valores de 4,72 y 26,7 $\mu\text{g/mL}$ de CL_{50} para 24 h respectivamente. El protocolo experimental descrito es apropiado para evaluar el efecto tóxico de compuestos químicos. Los resultados en el uso de pruebas con *Artemia* demuestran su versatilidad práctica y economía para la utilización en las evaluaciones de los mismos tóxicos. Estos experimentos constituyen una línea de trabajo con vistas a optimizar el uso de este organismo en exámenes de toxicidad.

Palabras clave: *Artemia*, nauplios, toxicidad, cipermetrina, permetrina.

ABSTRACT

The results of the determination of the LC_{50} (24 h exposition) for *Artemia franciscana* by means of sharp toxicity test are presented. The *Artemia* cyst were evaluated and characterized as first quality and according to these results and important approaches were applied for the employment of nauplii in these tests. Values of 4,72 and 26,7 $\mu\text{g/mL}$ respectively for LC_{50} at 24 h of exposition to the toxicity of the insecticide pyrethroids, cipermethrin and permethrin were determined. The described experimental protocol is considered appropriate to evaluate the toxic effect of chemical compounds. The results in the use of *Artemia* as test organism showed their practical versatility and economy for the use in evaluations of toxic compounds. These studies constitute a work line with a view to optimizing the use of this organism in toxicity tests.

Keywords: *Artemia*, nauplios, toxicity, cipermethrin, permethrin.

INTRODUCCIÓN

El uso de la *Artemia* se ha extendido a las investigaciones de toxicología aplicada (Sorgeloos *et al.*, 1978; Fairchild y *otros*, 2010; González-Lozano, 2010) dada su disponibilidad comercial de quistes secos, útiles como material vivo de prueba (Meyer *et al.*, 1982).

La investigación en *Artemia* tiene un amplio espectro que va desde la evaluación de compuestos tóxicos o esenciales en los quistes (Arencibia y Tizol, 1996; Rodríguez, 1998) hasta la exposición tóxica aguda a diversos productos químicos (Abdullah *et al.*, 1997), la detección de tóxicos en productos comestibles y farmacéuticos, estudios de modelos de acción

tóxica de sustancias y de transferencia tóxica de contaminantes (Sorgeloos *et al.*, 1987).

Las intoxicaciones agudas originadas por plaguicidas son frecuentes (Machera *et al.*, 1996) y han sido muy estudiadas. Las áreas costeras y los estuarios son particularmente sensibles a la contaminación, porque su facultad para la eliminación de residuos puede ser pequeña e inadecuada para ciertas clases de contaminantes (Sasikumar *et al.*, 1995).

El objetivo de este estudio fue utilizar nauplios de *Artemia* en pruebas de toxicidad aguda y la determinación de la concentración letal media (CL_{50}) en 24 h de exposición de los pesticidas piretroides de uso comercial cipermetrina y permetrina.

MATERIALES Y MÉTODOS

Las pruebas se realizaron en laboratorios del Centro de Investigaciones Pesqueras (CIP). Para la obtención de los organismos para la prueba de toxicidad fueron utilizados quistes de *Artemia franciscana* pertenecientes a la cepa del Gran Lago Salado (GSL), Utah, USA. Los tóxicos fueron los insecticidas piretroides de uso comercial: cipermetrina 10 % peso/volumen y permetrina 0,2 % peso/volumen suministrados por el Instituto de Sanidad Vegetal.

La composición de estos piretroides comerciales es una mezcla entre la sustancia activa, un emulsificante y un solvente orgánico que en este caso es la ciclohexanona para ambos productos.

El estadio de prueba seleccionado fue el primer instar larval de metanauplio (EI), el cual aparece con la primera muda (Sorgeloos y otros, 1986). Para la caracterización de la cepa GSL se hidrataron los 250 mg de quistes en copas plásticas de 250 mL con 150 mL de agua de mar esterilizada y salinidad de 30 ‰ por 1 h, luego para la incubación se enrasaron las copas a 250 mL. La salinidad se ajustó con ayuda de un refractómetro manual ATAGO (0-100 ‰) de fabricación japonesa; para el pesaje de los quistes se usó una balanza analítica de precisión 0,000 1 g.

La iluminación de 2 000 lux sobre la superficie del agua fue continua durante el proceso de eclosión como recomienda la literatura (Sorgeloos y otros, 1986). La aireación fue suave y constante desde el fondo de las copas para mantener los quistes en suspensión. Se trabajó con temperaturas de 22; 24; 26 y 28 °C, que se chequearon cada 3 h, donde se observó una variación en $\pm 0,5$ °C en local climatizado.

Se determinó la curva de eclosión por el método volumétrico de conteo de nauplios (Castro y Gallardo, 1993) y con el uso de una pipeta automática de 1 mL se tomaron muestras de 0,2 mL que se depositaron en una cámara "Bogoroff" de conteo y a las que se les añadió una gota de Lugol para inmovilizar a los organismos y teñirlos. Se realizaron conteos cada una hora luego del inicio de la eclosión y se dieron por terminados cuando tres lecturas consecutivas para una misma curva dieron números similares. Se realizaron los muestreos hasta las 24 h teniendo en cuenta el comportamiento del porcentaje de eclosión a 28 °C, que fue la temperatura de trabajo para el ensayo.

El porcentaje de nauplios eclosionados por hora fue sacado del número de nauplios eclosionados dividido por el número de quistes hidratados en muestras de 0,2 mL. El conteo de quistes hidratados se hizo una hora después de haber incubado los quistes secos y para calcular la

sincronía de eclosión se aplicó la fórmula propuesta por Sorgeloos y otros (1986).

$$Ts = T_{90} - T_{10}$$

Donde:

T_{90} : tiempo para el 90 % de nauplios eclosionados

T_{10} : tiempo para el 10 % de nauplios eclosionados

La ejecución de la prueba de toxicidad con la cepa de *Artemia* (GSL) siguiendo el protocolo de la Artemia Reference Center (ARC) fue la siguiente: 50 mg de quistes son incubados durante 14,7 h bajo condiciones óptimas (Sorgeloos y otros, 1986) de $28 \pm 0,5$ °C con una aireación e iluminación continua de 2 000 lux en agua de mar a 30 ‰. Se pipetea los nauplios recién eclosionados y se incuban hasta la aparición con la primera muda del estadio metanauplial (EI). La detección del estadio larval de prueba se realizó de manera visual por medio de los cambios morfológicos (Lavens and Sorgeloos, 1996), con muestreos cada 1 h.

El volumen usado en las placas de pruebas con metanauplios (EI) fue de 10 mL y se emplearon 20 animales para cada cámara, las cuales se montaron por triplicado. Se seleccionan cinco concentraciones en el orden de los μg dentro del rango crítico de mortalidad para la especie (Durakovic *et al.*, 1987) comprobado con ensayos exploratorios. Las concentraciones de prueba fueron 0,2; 1,15; 4,2; 6,1 y 10 mg/mL de cipermetrina y 15,5; 21, 28, 37 y 42 mg/mL de permetrina, según método descrito en APHA (1992).

Conociéndose las características de los piretroides cipermetrina y permetrina (Tomlin, 2006) se premezclaron a razón de 1:10 y se diluyó posteriormente en el volumen total como recomiendan los métodos de preparación (Rice, 1997), el diluyente fue agua de mar.

Para la prueba se prepararon placas Petri con el agua de mar (9,6 mL), después se agregaron las diluciones (0,2 mL) y luego de la homogeneización del medio, se adicionaron los metanauplios de *Artemia* (0,2 mL). El criterio para considerar la muerte fue la inmovilidad por más de 10 s (Smayda and Shimizu, 1993).

Como control fueron utilizados metanauplios (EI) en el agua de mar sin dilución del tóxico (APHA, 1992). La calidad del agua de mar para todos los usos se comprobó con la determinación de nitrato, amonio total y fosfato, según las técnicas descritas por Valderama (1995).

El valor de la CL_{50} y los límites de confianza para las 24 h, se determinaron por el método Probit (Finney, 1971). En la TABLA 2 se reflejan los resultados, donde las réplicas triplicadas están rotuladas con un número decimal, donde la primera cifra representa a la réplica, y la segunda señala el número del experimento. Se realizaron dos experimentos para la permetrina y cuatro para la cipermetrina.

El flujo para la preparación de la prueba a 28 °C de temperatura y 30 ‰ de salinidad, fue:

Hidratación de quistes (2 h) > Incubación 14-15 h > Cosecha de nauplios > Incubación de nauplios hasta alcanzar el estadio EI (7 h) > Comienzo de la prueba de toxicidad (24 h) > Cálculo de CL₅₀ a las 24 h.

Para el uso de *Artemia* en las pruebas toxicológicas y cualquier otro crustáceo pequeño el número de 20 animales es lo recomendado (Reish and Oshida, 1987), además de consideraciones estadísticas y como regla general se plantea (APHA, 1992) que no se deben usar menos de diez organismos de prueba por concentración si son de tamaño pequeño.

Durante las pruebas de toxicidad no hubo cambios en la salinidad, iluminación y temperatura según lo recomendado (APHA, 1992; Anthony *et al.*, 1996).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La calidad del agua experimental según los resultados de la evaluación, muestran que es adecuada para este uso; los valores de nitrato fueron < 1,0 µg·L⁻¹, el fosfato < 1,5 µg·L⁻¹ y los de amonio < 30 µg·L⁻¹.

La caracterización de la cepa se consideró como el primer paso de importancia para reconocer la calidad de los quistes a utilizar y poder establecer criterios de uso para realizar la prueba. Este paso permite obtener la cantidad de organismos necesaria con una talla y tiempo de vida uniformes. Vale destacar que no existe reporte o recomendación en trabajos de investigación donde refirieran este paso previo para el uso de la *Artemia* que permite alcanzar una respuesta con un menor grado de variación. Ni aún en las pruebas toxicológicas similares descritas en la literatura (Sorgeloos y otros, 1978; Amiard, 1983; Collins *et al.*, 1991; Castro *et al.*, 1996; Machera *et al.*, 1996).

El número de nauplios eclosionados evaluados para 22, 24, 26 y 28 °C son mostrados en las tablas: 1, y 2 todos los demás factores que pueden incidir fueron controlados de manera constante. En concordancia con dicha variación, se presentó para cada experiencia un comportamiento diferencial de la curva representada por el número de nauplios eclosionados por gramo de quistes secos en volumen de 250 mL (Fig. 1), variando en el inicio y durante la eclosión, comportamiento éste antes descrito por Sorgeloos y otros (1978) bajo tales diferencias de condiciones.

Con una temperatura y salinidad óptima de 28 °C y 30 ‰ e iluminación de 2000 lux para la eclosión, el inicio se presentó sobre las 14 h con sincronía (Ts) equivalente a 6 h, categorizando a los quistes como de primera calidad (Argent Aquaculture, 1989).

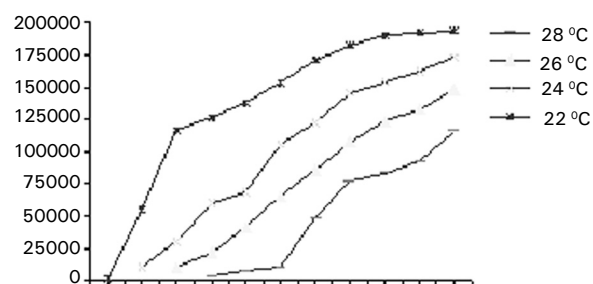


Fig. 1 Efecto de la temperatura sobre la eclosión de quistes de *Artemia franciscana*.

Se tomó como patrón el comportamiento de la curva a 28 °C para determinar que la cantidad de horas muestreadas durante la caracterización en todas las demás temperaturas fuera también de 24 h debido a que en este tiempo se alcanzó el máximo número de nauplios eclosionables cuando tres lecturas consecutivas dieron valores aproximados a 195 000 nauplios.

Las primeras 3 h de eclosión, el crecimiento del número de nauplios eclosionados tiene un comportamiento más abrupto a medida que la temperatura aumenta acercándose al rango óptimo para la especie y la cepa en particular entre 26 y 28 °C (Royan *et al.*, 1990). Esto es debido a que la eclosión de los quistes durante las primeras horas es cada vez más sincrónica a medida que la temperatura es mayor (Lavens y Zorruelos, 1996).

Por esta misma razón para la temperatura de 28 °C probada en el intervalo de 14; 15 y 16 h es donde se reporta un inicio de eclosión desde 1 833 hasta 116 417 nauplios eclosionados que representó la mayor diferencia entre las primeras 3 h de inicio de eclosión si lo comparamos con las demás experiencias a otras temperaturas inferiores. Este valor correspondió con el 59,6 % del total de nauplios eclosionables para 24 h a esa temperatura, este resultado corrobora la respuesta de sincronía anterior.

Con el objetivo de seleccionar una muestra de nauplios de *Artemia* lo más homogénea posible para el ensayo a la temperatura de 28 °C, solo fueron incubados para alcanzar el estadio metanauplio (EI) aquellos nauplios presentes hasta 20 % de eclosión. La elección de este porcentaje se basa en que mientras más pequeño sea este, existe mayor probabilidad de encontrar nauplios cuya eclosión ha sido casi sincrónica. Este criterio de homogeneidad que se ha tenido en cuenta para la experimentación no ha sido descrito anteriormente por ningún otro autor en la literatura para este tipo de pruebas toxicológicas con *Artemia*.

Se observa que los intervalos de tiempo para alcanzar determinados valores de números de nauplios eclosionados

varían de forma inversa al aumento de temperatura, de esta manera la diferencia de tiempo desde el inicio de la eclosión hasta alcanzar los 50 000 nauplios/g de quistes a 28 °C es de 42 min, mientras que para 22; 24 y 26 °C fue de aproximadamente 3; 2.5 y 2 h respectivamente. Así podemos decir que para 20 % de eclosión, habrá una muestra más homogénea en 28° C que en las temperaturas inferiores. Bajo tales circunstancias se consideró al 20 % en 28 °C como la más recomendable para obtener homogeneidad en la muestra.

No se puede descartar la posibilidad de escoger los nauplios que correspondan con 1 o 5 % de eclosión en 28 °C donde la homogeneidad debe ser mayor. Trabajar con porcentajes de eclosión menores que 20 % depararía ventajas no solo para alcanzar muestras homogéneas de metanauplios (EI) sino también para acortar el tiempo de preparación para su utilización en las pruebas de toxicidad.

Como se ha mencionado la homogeneidad de los animales para estas pruebas con *Artemia* es de importancia primaria para la validación de los resultados, ya que se ha demostrado que existe sensibilidad diferencial para sus nauplios en los diferentes niveles de desarrollo. Además se analiza el paso de nauplio a metanauplio (EI) estadios donde se reportan las mayores diferencias en cuanto al comportamiento por la exposición de tóxicos para larvas de *Artemia* (Sleet y Brendel, 1985).

En el diagrama de flujo para una prueba de toxicidad con *Artemia* descrito por Persoone y Wells (1987) al paso previo de incubación de quistes y obtención de los nauplios para otra incubación subsiguiente, se utiliza un período de 18 a 24 h bajo condiciones óptimas de iluminación, temperatura y salinidad, pero no se especifica la cepa. Si en el presente trabajo se tomase esa consideración de hasta 24 h, se hubieran encontrado nauplios con una diferencia aproximada de 4 a 10 h de edad y de ser probados en un bioensayo los resultados tendrían poca precisión para estudios de toxicología, debido a la heterogeneidad de diferentes estadios, lo que introduciría errores en el análisis (APHA, 1992; Anthony *et al.*, 1996).

El protocolo experimental utilizado y propuesto tiene similitud con otros descritos en la literatura, como es el de Persoone y Wells (1987) y el de Smayda y Shimizu (1993). Se considera al igual que estos autores como un protocolo ventajoso debido a que utiliza el menor número de pasos para la ejecución de la prueba toxicológica, en este caso la significación radica en que se logró acortar el tiempo entre los pasos de preparación previa y se introducen criterios que dan más rigor a la prueba de toxicidad.

A pesar de que los mejores resultados de eclosión se obtienen a bajas salinidades, se trabajó con 30‰ debido a que los nauplios recién eclosionados deberían incubarse

hasta metanauplio (EI) y según Castro y Gallardo (1993), el desarrollo óptimo del nauplio no queda asegurado hasta que la composición iónica del medio sea similar a la del agua de mar, además se elimina la aclimatación de los animales que implicaría más tiempo y el objetivo es desarrollar una prueba rápida y segura que evalúe toxicidad.

El tiempo de incubación desde nauplios recién eclosionados hasta la primera muda también varío de acuerdo con la temperatura, de esta forma para 22; 24; 26 y 28 °C fueron: 8; 7; 7; 6 h respectivamente como se muestra a continuación en la TABLA 1. Estos datos corresponden a promedio de tres experiencias para cada temperatura.

TABLA 1. Tiempo en que según la temperatura, los nauplios eclosionados de *Artemia franciscana* alcanzan el estadio de metanauplio (EI)

Temperatura (°C)	22	24	26	28
Experiencia I (h)	9	8	7	6
Experiencia II (h)	8	6	7	6
Experiencia III (h)	7	7	7	6
Promedio (h)	8	7	7	6

Estos resultados presentan similitud a lo referido por Lavens y Sorgeloos (1996) donde plantean que para la cepa de *Artemia* (GSL) el advenimiento del estadio (EI) es aproximadamente a las 8 h después que hayan emergido los nauplios libres nadadores a una temperatura que correspondió al rango entre 22 y 25 °C.

Después de haber detectado el estadio (EI) a través de los cambios morfológicos en los nauplios incubados, principalmente se observa un alargamiento de la región abdominal (Lavens and Sorgeloos, 1996). Para el uso de los animales en el ensayo se esperó una hora más, de forma que todos completaran su muda, pues como reportaron Reish y Oshida (1987) los crustáceos son especialmente sensibles durante el estadio de muda. Con esta precaución se garantiza mayor homogeneidad y que no se introduzcan en el ensayo elementos de error.

El tiempo de preparación previa a la prueba de la cepa *Artemia* (GSL) con salinidad mantenida en 30‰, la iluminación de 2000 lux y la temperatura en 28 °C, fue de 21,7 h. Si a este tiempo le sumamos las 24 h del bioensayo sumarían 45,7 h para que se obtengan resultados del efecto de un tóxico. La rapidez de una prueba de este tipo capaz de evaluar el efecto del tóxico, es un criterio de calidad del agua para la protección del entorno acuático (Reish and Oshida, 1987) y para diferentes usos presenta una relevante importancia.

Como efecto subletal se observó dificultad en la actividad natatoria sin encontrar diferencias de comportamiento entre cada compuesto, contrario a lo que ocurría en los controles. La mortalidad en los controles para todos los casos fue menor o igual al 5 %, lo cual indica un resultado adecuado (APHA, 1992) por debajo de 15 % para larvas de crustáceos.

Al finalizar cada prueba se observó que los nauplios supervivientes correspondían al estadio de metanauplios en su tercer instar (EIII), lo que indica que para las concentraciones de prueba no se inhibe la muda como efecto secundario.

Los valores de la CL_{50} y los límites de confianza para 95 % en la permetrina y la cipermetrina calculados por el método Probit (Finney, 1971), se muestran a continuación en la TABLA 2.

TABLA 2. Resultados de las LC_{50} ($\mu\text{g/mL}$) y límites de confianza de permetrina para *Artemia* franciscana

Permetrina	LC_{50}	L. sup.	L. inf.
Replica 1.1	26,3	31,3	22,1
Replica 2.1	27,0	31,5	23,1
Replica 3.1	29,2	35,3	24,1
Replica 1.2	26,8	31,1	23,1
Replica 2.2	25,2	28,7	22,1
Replica 3.2	25,7	29,6	22,3
Promedio	26,7		
Cipermetrina	LC	L. sup.	L. inf.
Réplica 1.1	5,62	18,1	1,75
Réplica 2.1	3,98	10,31	1,54
Réplica 3.1	3,16	9,42	1,06
Réplica 1.2	6,92	17,78	2,69
Réplica 2.2	3,63	8,09	1,63
Réplica 3.2	5,01	13,73	1,83
Réplica 1.3	4,47	10,95	1,82
Réplica 2.3	3,55	8,27	1,52
Réplica 3.3	4,79	10,3	2,23
Réplica 1.4	7,08	13,59	3,69
Réplica 2.4	3,98	9,35	1,69
Réplica 3.4	4,47	9,3	2,15
Promedio	4,72	-	-

La CL_{50} obtenida para la cipermetrina demuestra es más tóxica que la permetrina al tener un efecto letal medio sobre la *Artemia* a concentraciones 5,6 veces menor, en iguales condiciones de prueba.

Los límites de confianza no describen la variabilidad del valor de las concentraciones letales media 4,72 y 26,7 $\mu\text{g/mL}$ de cipermetrina y permetrina respectivamente bajo otras condiciones, sino que indican la exactitud de estos estimados para las réplicas en 24 h a 28 °C y 30 ‰ de salinidad. Estos límites al no poderse promediar, se determinaron registrar al mayor calculado como superior y el menor como inferior, de esta forma se presentan entre 18,1 y 1,06 $\mu\text{g/mL}$ para la cipermetrina mientras que para la permetrina fue entre 35,3 y 22,1 $\mu\text{g/mL}$.

Los límites de confianza de la CL_{50} para la permetrina son realmente satisfactorios en seguridad si nos apoyamos en lo recomendado por APHA (1992), donde plantea que el 95 % del intervalo de confianza debe ser menor que ± 30 % de la CL_{50} .

Sin embargo, para la cipermetrina no es así, los límites de confianza guardan incertidumbre al no cumplir con lo recomendado, lo cual pudiera deberse a algún comportamiento fisiológico diferencial que pudo haber tenido la *Artemia* frente al tóxico.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

La *Artemia* utilizada presentó una primera calidad a 28 °C, un inicio de eclosión sobre las 14 h y durante la eclosión una sincronía igual a 6 h.

El advenimiento del primer estadio metanauplial con la primera muda se produjo a las 8; 7; 7 y 6 h en incubaciones de 22; 24; 26 y 28 °C respectivamente con condiciones estándar de salinidad e iluminación.

La CL_{50} en 24 h de cipermetrina para la *Artemia franciscana* fue de 4,72 $\mu\text{g/mL}$ con límites de seguridad de 18,1 y 1,06 $\mu\text{g/mL}$, y la CL_{50} en 24 h de Permetrina fue de 26,7 $\mu\text{g/mL}$ con límites de seguridad de 35,3 y 22,1 $\mu\text{g/mL}$.

El protocolo experimental descrito para *Artemia* es apropiado para contaminantes con una alta toxicidad y demuestra la versatilidad, práctica y economía del método en evaluaciones de compuestos tóxicos y de calidad de agua.

Se recomienda realizar pruebas de toxicidad con nauplios de *Artemia* extraídos de porcentajes de eclosión entre 1 y 5 % para obtener una mayor homogeneidad de los animales y menor tiempo para la prueba de toxicidad.

REFERENCIAS

- Abdullah, A.R. *et al.* (1997): Ecotoxicology of pesticides in the tropical paddy field ecosystem. Environmental toxicology and chemistry, vol. 16, No. 1, pp. 59-70.
- American Public Health Association (1992): *Standard methods for examination of water and waste-water*, 18th edition, Edited by Mary Ann Franson, Washington, D. C., 1207 pp.
- Amiard, C. (1983): "Acute toxicity in aquatic environment: Methodology and standardization, interpretation, application limits", in: *Physiological and ecophysiological impacts of pollutants on marine organisms*, 1st Part, 9(6): 451-463, Univ. Nantes, France.
- Anthony, P. *et al.* (1996): *Preservation of viable biological samples for experiments in space laboratories*, Univ. of Nottingham, Netherlands. pp. 377-393.
- Arencibia, G. y R. Tizol (1996): "Determinación de metales pesados en quistes de *Artemia*", en: *Rev. Cub. Invest. Pesq.*, pp. 69-72, Centro de Investigaciones Pesqueras, La Habana.
- Argent Aquaculture (1989): Prospecto comercial, Florida, USA.
- Castro, M. G.; J. M. Castro, S. A. Malpica y B. T. Castro (1996): "Aspectos del comportamiento biológico de *Artemia franciscana* de la población de Yavanos, Sonora, cultivada en diferentes salinidades", en: *Oceanología*, 4(12), Univ. Autónoma Met., Xochimilco, México.
- Castro, T. y C. Gallardo (1993): *Artemia* sp., Univ. Autónoma Met., Xochimilco. División Ciencias Biológicas y de la Salud, México, 54 pp.
- Collins, G. B., D. A. Bengtson and J. C. Moore (1991): "Characterization of reference *Artemia* III for marine toxicological studies", in: *14 ASTM Symp. on Aquatic Toxicology and Risk Assessment*, pp. 315-323, San Francisco, USA.
- Durakovic, S. *et al.* (1987): "*Artemia salina* larvae as a test organism in research on mycotoxin synergism", in: *ARCH. IND. TOXICOL.*, 38(4): 307-313, Zagreb, Yugoslavia.
- Fairchild, W. L. y otros (2010): Toxicidad aguda y crónica de dos formulaciones del plaguicida Piretroide Deltametrina ante anfípodos, camarones y larvas de langosta. Los océanos y Subdivisión de Ciencia Pesca y Océanos de Canadá. Informe Técnico Pesca y Ciencias Acuáticas 2876.
- Finney, D. J. (1971): *Probit analysis. Published by the syndies of the Cambridge*, Third edition, University Press, New York, 333 pp.
- González-Lozano, M. C. *et al.* (2010): "Evaluation of toxicity of polluted marine sediments from Bahía Salina Cruz, México", *Journal of Environmental Science and Health Part A*, 45, 121-127.
- Lavens, P. and P. Sorgeloos (1996): *Manual on the production and use of live food for aquaculture*, Artemia Reference Center, Univ. Gent, Belgium, 380 pp.
- Machera, K., E. Cotou and P. Anastassiadou (1996): "Febutatin acute toxicity on *Artemia nauplii*: Effects of sublethal concentrations on ATPase activity", in: *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 56(1): 159-164. Athens, Greece.
- Meyer, B. N. *et al.* (1982): "Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents", in: *Journal of Medicinal Plant Research*, (45): 31-34, USA.
- Persoone, G. and G. Wells (1987): "*Artemia* in aquatic toxicology: a review", in: *Artemia research and its applications*, Sorgeloos, P.; D. A. Bengtson, W. Declair, and E. Jaspers (Eds.), vol. 1, Univ. Press, Belgium.
- Reish, D. and P. Oshida (1987): *Manual of methods in aquatic environment research*. Part 10-Short-term static bioassays, FAO Fisheries Technical Paper 247, Rome, 62 pp.
- Rice, P. J. (1997): "Acute toxicity and behavioral effects of chlorpyrifos, permethrin, phenol, strychnine, and 2,4-dinitrophenol to 30-day old Japanese medaka (*Oryzias latipes*)", in: *Environ. Toxicol. and Chemistry*, 16(4): 696-704, Univ. Iowa State, USA.
- Rodríguez, R. (1998): "El uso de nauplios de *Artemia franciscana* en pruebas de toxicidad. Trabajo de Diploma", Universidad de La Habana, Facultad de Biología, 37 pp.
- Royan, J. P.; S. Vijayaraghavan and L. Krishnakumari (1990): "Biomass production of *Artemia* in air-water-lift raceway system", in: *Mahasagar*, 23(2): 163-168, India.
- Sasikumar, N. *et al.* (1995): "Comparative toxicities of selected compounds to nauplii of *Balanus amphitrite* Darwin and *Artemia* sp.", in: *Saline Water Conversion Corp.*, 54(2): 289-296, Arabia.
- Sleet, R. B. and K. Brendel (1985): "Homogeneous population of *Artemia nauplii* and their potential use for *in vitro* testing in developmental toxicology", in: *Teratog. Carcinog. Mutag*, 5(1): 41-54, Inst. Toxicol., USA.
- Smayda, T. J. and Y. Shimizu (1993): "Toxicity of *Chrysochromulina* species (Prymnesiophyceae) to the

- brine shrimp, *Artemia salina*", in: *Toxic Phytoplankton Blooms in the Sea*, pp. 681-686, Univ. of Oslo, Norway.
- Sorgeloos, P.; C. R. Der Wielen y G. Persoone (1978): "El uso de nauplios de *Artemia* para pruebas de toxicidad, un análisis crítico", *Ecotoxicología y Seguridad Ambiental*, 2(3-4): 249-255.
- Sorgeloos, P. y otros (1986): *Manual para el cultivo y uso de Artemia en acuicultura*, Documento de campo No. 10, Univ Gent, Bélgica, 301 pp.
- Sorgeloos, P.; D. A. Bengtson, W. Declair, and E. Jaspers (Eds.) (1987): *Artemia research and its applications*, Morphology, Genetics. Strain characterization, Toxicology, Universa Press, Belgium, 380 pp.
- Tomlin, CDS (2006): *The pesticide manual, a world compendium*, 14th edition, British Crop Council Production (BCCP), Surrey, UK 1344 pp.
- Valderama, J. C. (1995): "Methods of nutrient analysis", in: *Manual on harmful marine microalgae*, Hallegraeff, G. M., Anderson, D. M., Cembella, A. D. (Eds.), IOC. Manual and Guides, (33): 251-268, UNESCO.