

Trabajo Original

Ecotoxicología

Bioensayo de toxicidad con *Artemia franciscana* (Crustacea-Branchiopoda) en extractos de sedimento superficial del golfo de Guacanayabo, Cuba.

**Onelio Carballo Hondal¹, Gustavo Arencibia-Carballo¹, Mercedes Isla Molledalo¹,
Consuelo González², González Triana², Nereida Mantilla Gattorno²**

¹Centro de Investigaciones Pesqueras. 5ta Ave y 246. Playa.

C.P. 19100. La Habana. Cuba. onelio@cip.telemar.cu

²Centro para la Producción de Animales de Laboratorio. La Habana. Cuba.

Resumen

La determinación de la toxicidad sigue siendo una herramienta importante y determinante para los estudios de la calidad ambiental de los sedimentos marinos y en la selección de sitios para el cultivo de especies marinas en la industria pesquera. En este trabajo se presenta la evaluación de nueve extractos de sedimento superficial colectados de nueve estaciones seleccionadas de la cuenca hidrológica Cauto del golfo de Guacanayabo, provincia Granma, Cuba. Se determinó la toxicidad utilizando el bioensayo de toxicidad con *Artemia franciscana* en 48 horas según la metodología de la norma mexicana NMX-AA-110-1995-SCFI (1996) adaptada a nuestras condiciones. Los resultados obtenidos mostraron toxicidad significativa en sedimento correspondiente a la zona de Yarey del río Cauto con respecto al control, resultando en el grupo cuatro un 96 % de supervivencia, en el grupo cinco un 80 % de supervivencia y en el grupo seis un 50 % de supervivencia en las diferentes concentraciones. En el bioensayo se utilizó como control positivo de referencia el dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$), comportándose en el rango reportado en la literatura. Los resultados abren un nuevo camino para el uso de este organismo en la valoración de la calidad del sedimento en nuestro país.

Palabras claves: Bioensayo, toxicidad, *Artemia*, sedimentos, río Cauto.

Abstract

The determination of toxicity is still an important and determining tool for the studies of environmental quality of marine sediments, as well as for the selection of the sites to harvest marine species within the fishing industry. The present paper shows the assessment of nine extracts of superficial sediment, collected from nine stations that were selected from the Cauto Hydrological Basin in the Guacanayabo Gulf, Granma province, Cuba. Toxicity was determined by means of the toxicity assay with *Artemia franciscana* in 48 hours, according to the methodology of the Mexican regulation, NMX-AA-110-1995-SCFI (1996), adapted to the Cuban conditions. The results showed a significant toxicity in the sediments of the area of Yarey, Cauto river, in relation to control, the group four resulting in a survival rate of 96%, group five with 80%, and group six with 50%, at the different concentrations. During the bioassay potassium dichromate ($K_2Cr_2O_7$) was used as positive control of reference, which behaved in the ranged reported in the literature. The results paved a new way for the use of this organism in the assessment of the quality of the Cuban sediment.

Key words: Bioassay, toxicity, *Artemia*, sediments, Cauto river.

Introducción

El uso de la *Artemia franciscana* se ha extendido en las investigaciones de toxicología aplicada debido a su disponibilidad comercial de quistes secos, los cuales pueden eclosionar en condiciones estandarizadas de un laboratorio de bioensayos de toxicidad (Sogeloos *et al.* 1987, Nunes *et al.* 2006, Carballo *et al.* 2010, Fuentes *et al.* 2011, Kokkali *et al.* 2011). Las investigaciones ecotoxicológicas con *A. franciscana* se iniciaron desde 1975 en Bélgica (Artoxkit, 1990) y a pesar de la abundante literatura relacionada con la relación dosis-efecto de un producto químico aplicado a ella, no es hasta 1981 que se desarrolla el primer ensayo estandarizado de ecotoxicología marina: el ensayo ARC, que es un ensayo de 24 y 48 horas para determinar la concentración letal media (CL₅₀) en nauplios de instares II y III. La confiabilidad y precisión de este ensayo fue investigada durante un extenso ejercicio de calibración donde participaron 80 laboratorios americanos y europeos, dando resultados muy satisfactorios (Artoxkit, 1990).

La *A. franciscana* tiene una gran importancia en la industria acuícola por sus resultados en la alimentación de larvas de peces y crustáceos (Delbare *et al.* 1995), pero además ha sido utilizada como un sistema de prueba para medir toxicidad de sustancias químicas, biológicas y para estudios en el desarrollo de la toxicología (Borowitz y McLaughlin 1999, Fuentes *et al.* 2011). Entre los criterios que avalan esta propuesta encontramos que: se puede coleccionar poblaciones homogéneas de nauplios del instar I metanauplial, inmediata caracterización del desarrollo por simples técnicas de medición y demostrar vulnerabilidad diferencial de nauplios durante su desarrollo (Sleet y Brandel 1985). Se afirma que la *A. franciscana* cubre ampliamente todos los requisitos de disponibilidad segura, métodos sencillos de obtención, europlasticidad y versatilidad en el uso, ya que los nauplios son fáciles de obtener a través de quistes secos que se encuentran disponibles en cualquier parte del mundo (Lavens y Sorgeloos 1996, Nunes *et al.* 2006).

Los ensayos de toxicidad con *A franciscana* permiten determinar la letalidad potencial de sustancias químicas puras, aguas residuales domésticas e industriales, lixiviados, aguas superficiales o subterráneas, agua potable y agua de poro de sedimentos, toxinas, entre otros (Barahona y Sánchez-Fortún, 1996, Svensson *et al.* 2005, Pelka *et al.* 2000, Koutsaftis y Aoyama 2007).

El objetivo del presente trabajo es evaluar la calidad de sedimentos superficiales marinos en nueve sitios de muestreo del golfo de Guacanayabo, mediante el empleo de una prueba de toxicidad aguda, utilizando *A franciscana* durante 48 hr.

Materiales y Métodos

Las muestras de sedimento superficial fueron colectadas con nucleador y buceo autónomo en nueve estaciones (fig.1) seleccionadas para el monitoreo ambiental de la cuenca hidrológica del río Cauto y el golfo de Guacanayabo, provincia Granma, Cuba en Noviembre del 2010. Enumeran desde la uno hasta la nueve, la uno (Yarey), la dos (Manajuana), la tres (Desvío), la cuatro (Jutía), la cinco (Carenas), la seis (Buey), la siete (Yara), la ocho (Manzanillo) y la nueve (Frente Cd. Pesquera); correspondiendo a los sitios de muestreo representados en la fig.1.

La decisión de los lugares de muestreo se tomaron a partir de información de estudios precedentes (Pérez-Santos *et al.* 2003).

Para la prueba de toxicidad, se utilizaron 250 mg de quistes de *A franciscana* que fueron incubados en 500 ml de agua de mar con 35 g/l de salinidad, en una copa cónica cilíndrica de 500 ml, a una temperatura de $28 \pm 1^{\circ}\text{C}$ y una iluminación de 500 a 1000 lux, durante una hora en fase de hidratación. Los quistes fueron mantenidos en una suspensión con aireación ligera y continua, obteniendo una población compuesta solamente de nauplios del instar I, cosechados y separados a las 16 hr, estos fueron seleccionados y a las 22-24 hr la mayoría de los nauplios estaban en la fase de instar II o III en algunos casos garantizando el rango de edad más homogéneo, estas fases

fueron las indicadas para el comienzo del bioensayo para esta cepa de *A franciscana* según resultados obtenidos en la curva de eclosión realizada.

Los nauplios utilizados para la prueba fueron sanos, sin malformaciones en su cuerpo. Los quistes de *A franciscana* proceden de los Grandes Lagos, EEUU.

El método de la prueba de toxicidad está diseñado según las buenas prácticas de laboratorio establecidas para este tipo de ensayo, la prueba fue desarrollada según los métodos descritos por González-Lozano et al. 2010, Arencibia-Carballo et. al. 2010 y la norma regulatoria mexicana NMX-AA-110-1995-SCFI (1996), adaptada a las condiciones de laboratorio del Centro de Investigaciones Pesqueras (CIP), de Cuba, según se describe en la tabla 1.

Para la obtención de la suspensión del sedimento se procedió al secado del sedimento húmedo en una incubadora a 40⁰C, evitando la volatilización de compuestos contaminantes, después fueron maceradas en un mortero, los sedimentos se pasaron por un tamiz de teflón de 63 µm de luz de malla, al mismo tiempo conseguimos la homogenización de las muestras con este método (Salomons y Förstner 1984), en esta fracción de tamaño inferior a 63 µm se concentran la totalidad de la materia orgánica y de los metales pesados según estudios de diversos autores (Förstner y Wittmann 1981, Salomons y Förstner 1984) garantizando los compuestos de interés toxicológico. Se pesaron 40 g de sedimento seco y se le agrego 160 ml de agua de mar esterilizada libre de contaminantes en una proporción 1:4 (w/v), en un enlermeyer de 250 ml de volumen, se procedió a la agitación en una zaranda durante una hora, transcurrido el tiempo se mantuvo en reposo dos hr, tiempo suficiente para obtener una suspensión acuosa del sedimento, la suspensión fue filtrada y lista para ser utilizada en el bioensayo de toxicidad con la *A franciscana*.

Se consideró el criterio de que la toma de la muestra fuera aleatoria, cuidando no dañar al animal con la pipeta a utilizar. La distribución de los nauplios se realizo cumpliendo la carga del peso de los animales de < 1 g/l. Se procedió según protocolo de ensayo resumida en la tabla 1 y los nauplios de *A franciscana* se expusieron a la suspensión de sedimento a diferentes concentraciones durante 48 hr.

El diseño experimental se desarrollo con seis grupos experimentales para cada una de las nueve muestras de sedimentos, con seis réplicas cada uno, cada réplica tuvo cinco animales (nauplios) expuestos en 10 ml de la suspensión de sedimento. Los grupos experimentales se identificaron primero con un grupo control negativo (agua de mar esterilizada), y otros cinco grupos con concentración nominal de la dilución de la suspensión del sedimento o fase de partículas suspendidas (100 %, 50 %, 25 %, 12.5 %, 6.25 %).

En el bioensayo los nauplios de aproximadamente 24 hr de edad (Instar II o III) fueron expuestos a la suspensión de sedimentos, por un período de 48 hr, al término del cual se cuantifica el número de organismos muertos y se establece el porcentaje de mortalidad.

Durante el transcurso del ensayo la respuesta evaluada fue la inmovilización o la muerte cada 24 hr hasta las 48 hr de duración del ensayo. En las primeras 24 hr se observaron los animales cada una hr hasta las 12 hr, después a las 24 hr, se continuó la observación cada 24 hr. Para el control positivo se utilizo dicromato de potasio como tóxico de referencia (Guida *et al.* 2008), usado en cada tiempo en paralelo para chequear la sensibilidad de las larvas y conformidad del procedimiento. El método probit fue usado para determinar la concentración letal media (CL_{50}) si la mortalidad estuviera presente al menos en tres grupos experimentales (Ramírez 1989).

La aceptabilidad de los resultados fue medida según el criterio en cuanto a la mortalidad del control negativo no debe exceder el 10 % y la concentración de oxígeno disuelto debe ser mayor que 2 mg/l para bioensayos de toxicidad en organismos acuáticos (Vanhaecke, *et al.* 1981).

Se realizaron análisis de carbono orgánico en las 9 muestras de sedimento superficiales por el método de la FAO (1975). Se realizo una caracterización bromatológica a los quistes de *A franciscana* donde se cuantifico el contenido de proteína, humedad, cenizas y grasas (A.O.A.C. 2000).

Resultados

Los resultados del análisis químico de carbono orgánico en los sedimentos obtenidos mostraron valores de 0.691 % (muestra 1), 0.571 % (muestra 2), 0.671 % (muestra 3), 0.331 % (muestra 4), 0.691 % (muestra 5), 0.631 % (muestra 6), 1.081 % (muestra 7), 0.691 % (muestra 8) y 0.691 % (muestra 9).

La caracterización bromatológica de los quistes de *Artemia* expreso un contenido de proteína de 44.74 %, grasa 0.35 %, humedad 8.91 % y cenizas de 4.36 %,

En los resultados de los bioensayos con *Artemia* se pudo observar la presencia de mortalidad significativa de los nauplios en una sola muestra evaluada, correspondiente a la muestra uno de la zona de Yarey en la cual se obtuvo un nauplio muerto en el grupo cuatro (25 %) para un 96 % de supervivencia, seis nauplios muertos en el grupo cinco (50 %) para un 80 % de supervivencia y 15 nauplios en el grupo seis (100 %) para un 50 % de supervivencia, en un tiempo de exposición de 48 hr, descritas en la tabla 2.

Todos los parámetros medidos en el bioensayo se comportaron dentro de los rangos establecidos para este tipo de estudio en ecotoxicología acuática (Davoren et al. 2005). El pH se mantuvo en el rango de 7 – 8, la concentración de oxígeno disuelto fue en el rango entre 3 y 4 mg/L; La temperatura se mantuvo entre 27 – 29 °C.

En los resultados obtenidos en la muestra de sedimento uno, se determino la CL_{50} y límites de confianza del 95 %, y se obtuvo una CL_{50} de 97.78 %, en las muestras restantes no pudo ser calculada por no haber mortalidades significativas en las diferentes concentraciones de las curvas. (Tabla 3).

Los resultados de la determinación de la CL_{50} del control positivo ($K_2Cr_2O_7$) en el bioensayo con *Artemia* resulto un valor de 8.41 mg/l, con un límite de confianza del 95 %.

Discusión

Los resultados de carbono orgánico son inferiores a cuatro, correspondiendo con el índice de referencia regulado según la FAO (1975) y se encuentran dentro de los parámetros de calidad reportados en la literatura (Amat-Infante y Casals-Blet 2008, Piñeiro y Arencibia 1993, NC 25, 1999).

Los valores de proteína, lípidos, cenizas y humedad analizados en la muestra de los quistes de *Artemia* son inferiores de los reportados por Sato *et al.* 2004, aunque este autor trabajo con *Artemia persimilis* y reportó valores de proteína de 56.2 ± 1.70 %, lípidos 5.7 ± 1.51 %, cenizas 6.7 ± 0.55 % y humedad 7.9 ± 0.55 %, aunque están inferiores son aceptables y comparables a los quistes que se comercializan actualmente en relación al contenido de proteínas, humedad, cenizas y lípidos totales según lo reportado por la literatura para diferentes cepas de *Artemia* (Leger *et al.* 1986). Estos valores obtenidos expresan un criterio de calidad de los quistes de *Artemia* utilizados en los bioensayos de toxicidad.

En los bioensayos de toxicidad se observó mortalidad solamente en la muestra uno de la zona de Yarey, en las diluciones de esta muestra a las diferentes concentraciones (100 %, 50 %, 25 %, 12.5 % y 6.25) se encontraron diferencias significativas comparados con el grupo control (EPA, 1989), descritas en la Tabla No. 2. En las restantes muestras no se encontraron diferencias significativas con el grupo control. En pocos trabajos descritos en la literatura se ha trabajado con extracciones acuosa de sedimento utilizando la *Artemia salina*, en un trabajo descrito por González-Lozano *et al.* 2010, encontraron efectos tóxicos en los nauplios de *Artemia* expuestos a varias suspensiones de sedimento de la zona de la bahía Salina Cruz de México, causada por concentraciones de metales tóxicos presentes en los sedimentos.

Los resultados de los bioensayos de toxicidad muestran que los extractos acuosos de los sedimentos marinos colectados fueron más tóxicos en la zona de Yarey del río Cauto que los sedimentos evaluados en los otros sitios del estuario del río y la zona costera del golfo de Guacanayabo (Fig.2). El resultado obtenido con este bioensayo en

cuanto al método, es similar al obtenido por otros investigadores (González-Lozano *et al.* 2010), que han reportado a la *Artemia salina* con buena sensibilidad para muestras de extracciones acuosas de sedimentos para el pesquisaje preliminar ecotoxicológico de sedimentos marinos.

Los efectos biológicos adversos observados en las pruebas de toxicidad con *Artemia* en la muestra de sedimento número uno con mortalidades significativas respecto al control, pudiera estar relacionada con actividades humanas en esa área geográfica del río Cauto, o algún residual de la agricultura de la región. En el río Cauto y la zona costera los valores de metales pesados en sedimentos reportados no son preocupantes dado los bajos niveles de los mismos, aunque denotan una influencia antropogénica, pero no un problema de contaminación alta (Arencibia-Carballo *et al.* 1988, Díaz-Rizo *et al.* 2010).

Por otra parte el río y el tramo costero presentan dos grandes fuentes de contaminación que son en el caso del río la propia cuenca con escurrimientos y aportes directos de fuentes de residuales al cauce del río y que provienen en su mayoría de la ciudad de Bayamo y otras poblaciones e industrias, los aportes de grandes volúmenes de agua usada proveniente de la Empresa de Cultivo de Camarón CALISUR (fig.1). El tramo costero tiene otras fuentes de aportes que es la ciudad de Manzanillo y que es básicamente un ambiente marino con otras características en lo que influye los aportes de residuales domésticos, urbanos, rurales, etc.

La contaminación por hidrocarburos no está determinada en sedimento de esta área de estudio, pero no se descarta pequeñas concentraciones de estos compuestos que puedan presentar toxicidad.

En cuanto a plaguicidas en el río y la zona costera se ha determinado endosulfán en sedimentos sin presencia alguna, aunque si se reportó trazas de endosulfán en sedimentos en el sistema lagunar (Arencibia-Carballo *et al.* 2008).

Los valores de la CL₅₀ del control positivo (K₂Cr₂O₇) en el bioensayo con *Artemia* de 8.41 mg/l, se encuentran en el rango cuando son comparados con los valores reportado por la literatura para pruebas de toxicidad aguda en invertebrados acuáticos

(0.067-59.9 mg/l), y también se encuentra en el rango reportados por otros investigadores (UNEP 1988, González *et. al.* 2001).

Las pruebas de ecotoxicidad con *Artemia* provee información sobre los posibles efectos del ambiente acuático sobre el cual se evalúa la aceptabilidad de la calidad ambiental, con buena calidad de los resultados, rapidez y bajos costos de análisis.

El uso de la *Artemia* como organismo de ensayo para evaluar la toxicidad de sedimentos en un área específica ha sido utilizado en otros estudios (Bustos-Obregon *et al.* 2010). El resultado de este estudio con la *Artemia* abre un camino para el uso de este organismo como una especie de referencia para la valoración de la calidad del sedimento en estudios de selección de sitios en cultivos marinos y en la evaluación de la toxicidad en ecosistemas marinos.

Conclusiones

Los sedimentos de la estación del Yarey resultaron ser los de mayor toxicidad, supuestamente debido a concentraciones relativamente altas o medianas de concentraciones de compuestos contaminantes de naturaleza antropogénica.

Los resultados del trabajo dan evidencia de la aplicación del bioensayo de toxicidad con *Artemia* para la evaluación de la calidad de sedimentos superficiales marinos con una buena sensibilidad. La *Artemia* salina demuestra ser un bioindicador ecotoxicológico apropiado para ambientes acuáticos contaminados y es una importante herramienta para estudios toxicológicos futuros.

Fig.1. Localización de los sitios del muestro en el golfo de Guacanayabo.



Fig. 2. Porcentaje de supervivencia en la prueba de toxicidad con *Artemia franciscana* de las extracciones de sedimentos marinos.

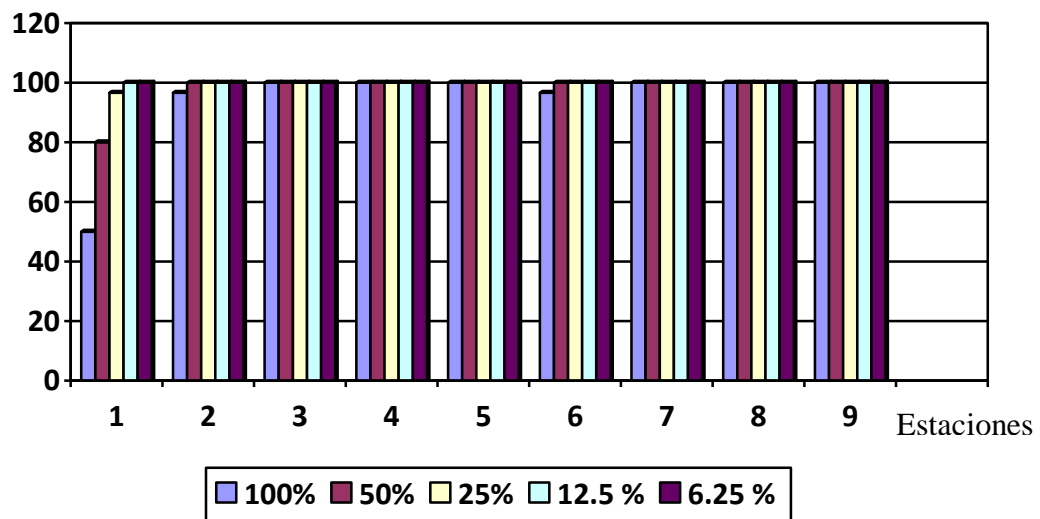


TABLA 1. Parámetros y condiciones para la prueba de toxicidad de la suspensión de sedimento con la Artemia franciscana.

Parámetro	Condiciones
Tipo de prueba	Estática sin renovación de la soln. de prueba; sobre suspensión de sedimento
Duración de la prueba	48 hr
Luminosidad	600 – 1000 Luxes
Fotoperiodo	16 h Luz/8 hr oscuridad
Temperatura	25 °C ± 2 °C
Salinidad	30-35 ‰
Alimentación	NO
Volumen de los recipientes de prueba	12 ml
Volumen de de suspensión de sedimento	10 ml
Agua de dilución	Agua de mar artificial o agua de mar filtrada de calidad
Concentración nominal de la suspensión del sedimento.	6.25 %, 12.5 %, 25 %, 50 %, 100 %.
Renovación de agua	NO
Número de organismos por réplica	5
Número de réplicas	6
Edad de los organismos (<i>Artemia</i>)	Aproximadamente 24 hr
Estadios de los nauplios en la prueba	Instar II y III
Aireación	NO
Determinaciones fisicoquímicas en la prueba.	pH, temp., salinidad y oxígeno disuelto al inicio y al final de la prueba
Puntos finales	Inmovilidad o mortalidad, LC ₅₀ (mg/L), calculado por Probit (EPA, 1989)
Tóxico de referencia	K ₂ Cr ₂ O ₇
Criterio de aceptación de la prueba	Supervivencia igual o mayor al 90 % en el grupo control negativo

TABLA 2. Registro de mortalidad de la muestra número uno

<i>Tiempo del ensayo</i>	<i>24 h</i>	<i>48 h</i>	<i>TOTAL</i>
<i>Grupos experimentales</i>			
<i>Grupo 1 (Control negativo)</i>	<i>0/30</i>	<i>0/30</i>	<i>0/30</i>
<i>Grupo 2 (6.25 %)</i>	<i>0/30</i>	<i>0/30</i>	<i>0/30</i>
<i>Grupo 3 (12.5 %)</i>	<i>0/30</i>	<i>0/30</i>	<i>0/30</i>
<i>Grupo 4 (25 %)</i>	<i>0/30</i>	<i>1/30</i>	<i>1/30</i>
<i>Grupo 5 (50 %)</i>	<i>0/30</i>	<i>6/30</i>	<i>6/30</i>
<i>Grupo 6 (100 %)</i>	<i>4/30</i>	<i>11/30</i>	<i>15/30</i>

TABLA 3. Resultados de la prueba de toxicidad de sedimentos con Artemia franciscana de las extracciones acuosas de sedimentos marinos de los nueve sitios del golfo de Guacanayabo.

Prueba de toxicidad (% m/v) con un límite de confianza de 95 %.	
Sitio	CL _{50r} 48-hr.
1	97.78 (76.21 - 153.94)
2	NC
3	NC
4	NC
5	NC
6	NC
7	NC
8	NC
9	NC

NC= CL₅₀ no puede ser calculada por no haber mortalidad significativa.

Referencias

1. Amat-Infante, P.D & I. Casals-Blet. 2008. Impactos ocasionados al medio ambiente en la zona costera de la Bahía de Manzanillo, Cuba. Revista Futuros. 2008. Vol. VI (Disponible en línea: www.revistafuturos.info).
2. A.O.A.C. 2000. Official Methods of Analysis. Association of Analytical Chemist. EUA.
3. Arencibia-Carballo, G., R. A. Tizol-Correa & O. Rodríguez. 2010. Toxicidad de nauplios de *Artemia franciscana* a dos piretroides de uso comercial. Revista Cubana de Investigaciones Pesqueras Enero-diciembre, Vol. 27, pp. 41-47.
4. Arencibia-Carballo, G., M. Isaac & H. González. 1988. Distribución de metales en sedimentos costeros del golfo de Guacanayabo. Rev. Cubana de Química. Vol. IV. 39-45.
5. Arencibia-Carballo, G., L. Orta-Arrazcaeta, N. Capetillo-Pinar, G. Dierksmeier, R. Hernandez, J. Concepción-Villanueva & M. Isla Molleda. 2008. Organochlorine insecticide residues in Cauto river, Cuba. Congreso MarCuba.
6. Artoxkit, M. 1990. *Artemia* toxicity screening test for estuarine and marine waters. Standard Operational Procedure. Creasel, Deinze, Bélgica. 22 pp.
7. Barahona, M.V. & S. Sánchez-Fortún. 1996. Comparative sensitivity of three age classes of *Artemia salina* larvae to several phenolic compounds. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 56: 271-278.
8. Borowitz, J.L. & J.L. McLaughlin. 1999. Evidence for calcium channels in brine shrimp: Diltiazem protects shrimp against cadmium. In: *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* Prudue Univ., Sch Phar. And Pharm. Sci., USA. 48 : 435-440.

9. Bustos-Obregon, E. & Vargas, A. 2010. Chronic toxicity bioassay with populations of the crustacean *Artemia salina* exposed to the organophosphate diazinon. *Biol. Res.* 43: 357-362.
10. Carballo, O., G. Arencibia-Carballo, J. Concepción, M. Isla. 2010. Los bioensayos de toxicidad en sedimentos marinos. *Retel*; 32: 33-67. (Disponible en línea: www.sertox.com.ar/retel).
11. Davoren, M., J.O'Halloran, M. Hartl, D. Sheehan, N. O'Brien, F.N Van Pelt & C.A. Mothersill 2005. Test battery approach for the ecotoxicological evaluation of estuarine sediments. *Ecotoxicology*, 14: 741-755.
12. Delbare, D., P. Lavens & P. Sorgeloos. 1995. Clownfish as a reference model for nutritional experiments and determination of egg/larval quality. In: Larvi'95-Fish and Shellfish larviculture symposium. P Laven, E.jaspers and I. Roelants (Eds): 22-25.Gent, Belgium.
13. Díaz Rizo, O., S. Olivares Reumont, J. Viguri Fuente, O. Díaz Arado, N. López Pino, K. D'Alessandro Rodríguez, D. de la Rosa Medero, A. Golen Rudnikas & G. Arencibia-Carballo. 2010. Copper, Zinc and Lead Enrichments in Sediments from Guacanayabo Gulf, Cuba, and Its Bioaccumulation in Oysters, *Crassostrea rhizophorae*. *Bull Environ Contam Toxicol.* 84:136-140.
14. Environmental Protection Agency. 1989. Dunett. Programa version 1.5 Ecological Monitoring Research /s.l/; EPA.
15. F.A.O. 1975. Manual of methods in aquatic environmental research. Methods for detection, measurement and monitoring of water pollution. *FAO Fish. Tech. Pap.*, (137): 238 pp.
16. Förstner, U. & G.T.W. Wittmann. 1981. *Metal Pollution in the Aquatic Environment*. Springer-Verlag, Berlin - Heidelberg.

17. Fuentes, H., *et al.* 2011. Distribución, comportamiento y toxicidad de metales y azufre en el agua de poro de los sedimentos superficiales del Saco del Golfo de Cariaco, Estado Sucre, Venezuela. *Rev. Int. Contam. Ambie.* 27:5-17.
18. González, Y. & P. Apórtela. 2001. Determinación de la toxicidad aguda del dicromato de potasio en larvas de *Artemia salina*. *Anuario Toxicología*; 1:104-8.
19. González-Lozano, M.C. *et al.* 2010. Evaluation of toxicity of polluted marine sediments from Bahía Salina Cruz, Mexico. *Journal of Environmental Science and Health Part A*: 45, 121-127.
20. Guida, M., M. Inglese & S. Meric. 2008. A Multi-battery toxicity investigation on fungicides. *Desalination*; 226: 262-270.
21. Kokkali, V., I. Katramados & J.D Newman. 2011. Monitoring the effect of metal ions on the mobility of *Artemia salina* nauplii. *Biosensors*, 1, 36-45.
22. Koutsaftis, A. & I. Aoyama. 2007. Toxicity of four antifouling biocides and their mixtures on the brine shrimp *Artemia salina*. *Sci. Total Envir.* 387, 166-174.
23. Lavens, P & P. Sorgeloos. 1996. Manual on the production and use of line food for aquaculture. Artemia Reference Center. Unive. Gent, Belgium. 380 pp.
24. Leger, P, D.A Bengtson, K.L Simpson & P. Sorgeloos. 1986. The use and nutritional value of *Artemia* as a food source. *Oceanogr. Mar. Biol. Ann. Rev.*, 24.521-623.
25. NC 25: 1999. Comité Estatal de Normalización. Sistema de Normas para la Protección del Medio Ambiente Hidrosfera. Especificaciones y procedimiento para la evaluación de los objetos hídricos de uso pesquero. (NC 25: 1999), 9 pp. Cuba.
26. Nunes, B. S. *et al.* 2006. Use of the genus *Artemia* in ecotoxicity testing. *Environmental Pollution* 144; 453-462.

27. Official Federation Journal (Diario Oficial de la Federación), 1996. NMXAA-110-1995-SCFI. Análisis de agua. Evaluación de toxicidad aguda con *Artemia franciscana* Kellogg (Crustacea-Anostraca). Método de prueba, Dirección General de Normas. México, D.F.
28. Pelka, M., C. Danzl, W. Distler & A. Petschelt. 2000. A new screening test for toxicity testing of dental materials. *J. Dentistry* 2000, 28, 341-345.
29. Pérez-Santos, I. E., G. Arencibia-Carballo, N. Capetillo-Piñar & M. Isla-Molleda. 2003. Influencia del cultivo del camarón blanco (*Litopenaeus schmitti*) sobre los ecosistemas costeros. *Fopcana* 2:11-20.
30. Piñeiro, R. & G. Arencibia. 1993. Calidad de agua en las fuentes de abasto de la estación de cultivo de camarón en río Cauto, Cuba. *Rev. Inv. Mar.* 14 (2-3):160-166.
31. Ramírez, E. 1989. *DORES-Programa de cómputo*. Curso regional sobre ensayos biológicos y pruebas de toxicidad. INDERENA/ PAC/PNUMA/FAO/COI. Cartagena de Indias: Colombia, 1989; 3-28.
32. Salomons W.U. & Förstner. 1984. *Metals in the Hydrocycle*. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg.
33. Sato, N.E, J.C Mallo & J.I Fenucci. 2004. Calidad de los quistes de *Artemia permisilis* (Piccinelli & Prosdocimi) (Crustacea: Branchiopoda) de diferentes zonas de Argentina, como alimento en acuicultura. *Revista de Biología Marina y Oceanografía* 39: 79-92.
34. Sleet, R.B. & K. Brandel. 1985. Homogeneous population of *Artemia* nauplio and their potential use for "in vitro" testing in developmental toxicology in: *Teratology in: Teratog. Carcinog. Mutag.* 5: 41-54. Inst. Toxicol. USA.
35. Sorgeloos, P. *et al.* 1987. *Artemia* research and it applications. Morphology, genetics. Strain characterization, toxicology. Universa Press. Belgium. 300 pp.

- 36.** Svensson, B., L. Mathiasson, L. Mårtensson & S. Bergström. 2005. *Artemia salina* as test organism for assessment of acute toxicity of leachate water from landfills. *Environ. Monit. Assess.*, 102, 309-321.
- 37.** United Nation Environment Programme (UNEP), International Labour Organization (ILO), World Health Organization (WHO). 1988. International Programme of Chemical Safety (IPCS). Environmental Health Criteria (EHC) 61, Chromium.
- 38.** Vanhaecke, P., G. Persoone, C. Claus & P. Sorgeloos. 1981. Proposal for a short-term toxicity test with *Artemia* nauplii. *Ecotoxicol. Environ. Safety*, 5, 382-387.

Recibido: 19/06/12
Aceptado: 18/07/12