

**BACTERIAS Y PORCENTAJE DE ECLOSIÓN DE QUISTES DE
Artemia franciscana KELLOGG, 1906, DE CUATRO POBLACIONES
NATURALES DE MÉXICO**

**BACTERIA AND HATCHING PERCENTAGE OF CYSTS OF
Artemia franciscana KELLOGG, 1906, FROM FOUR NATURAL
POPULATIONS IN MEXICO**

Marco Antonio López-Torres¹
Marcial Leonardo Lizárraga-Partida²
Francisco Correa³
Thalía Castro⁴

¹ Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de la
Universidad de Sonora (DICTUS), Unidad Experimental Peñasco
Apartado postal 79, Puerto Peñasco, CP 83550, Sonora, México
E-mail: malopez@guayacan.uson.mx

² Departamento de Acuicultura
Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE)
Apartado postal 2732, Ensenada, CP 22860, Baja California, México
E-mail: lizarra@cicese.mx

³ Laboratorio de Genética, Instituto de Investigaciones Oceanológicas
Universidad Autónoma de Baja California
Apartado postal 453, Ensenada, CP 22800, Baja California, México
E-mail: correa@faro.ens.uabc.mx

⁴ Departamento El Hombre y su Ambiente
Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco
Calzada del Hueso 1100, Colonia Villa Quietud, CP 04960, México, DF
E-mail: cabt7515@cueyatl.uam.mx

Recibido en agosto de 1999; aceptado en febrero de 2000

RESUMEN

Se evaluaron los porcentajes de eclosión de quistes de cuatro poblaciones de *Artemia franciscana* autóctona de México y en los nauplios obtenidos se cuantificaron los niveles de bacterias heterótrofas viables (VHB) y de bacterias con capacidad de crecer en el medio de agar tiosulfato-citrato-sales biliares-sacarosa (TCBSB). La mayor eficiencia de eclosión (71.8%) se dio en los quistes de Texcoco y fue nula en los quistes de Yavaros. Las VHB presentaron niveles de abundancia semejantes en todas las muestras,

de 10^7 a 10^8 CFU mL⁻¹. Las TCBSB presentaron poca variación, con valores de 10^6 a 10^7 CFU mL⁻¹. Los mayores niveles de TCBS correspondieron a bacterias gram positivo, con 97.9% de 96 aislamientos. No se encontraron bacterias del género *Vibrio* en las cepas de *Artemia* analizadas.

Palabras clave: *Artemia franciscana*, nauplios, *Vibrio*, bacterias.

ABSTRACT

In this study, cysts of four Mexican populations of *Artemia franciscana* were analyzed to determine the quality of hatching, and the levels in the nauplii of viable heterotrophic bacteria (VHB) and of bacteria capable of growing in the thiosulfate-citrate-bile salts-saccharose agar (TCBS) medium (TCBSB) were quantified. The hatching percentages fluctuated from 72.8% (Texcoco) to null (Yavaros). The abundance values of the VHB were similar in all the cyst samples, from 10^7 to 10^8 CFU mL⁻¹. The TCBSB showed low variability, with values of 10^6 to 10^7 CFU mL⁻¹. The largest population in the TCBS medium was represented by gram-positive bacteria, with values of 97.9% out of 96 isolations. Bacteria of the genus *Vibrio* were not found in the *Artemia* strains analyzed.

Key words: *Artemia franciscana*, nauplii, *Vibrio*, bacteria.

INTRODUCCIÓN

Los nauplios de *Artemia*, obtenidos de la eclosión de sus quistes, son ampliamente utilizados para el cultivo larvario de crustáceos peneidos y peces (Léger *et al.*, 1986; Sorgeloos *et al.*, 1988). Estos quistes son cosechados en su gran mayoría en el Gran Lago Salado (Utah, EE.UU.), de donde procede aproximadamente el 90% de la demanda mundial para acuicultura (Anónimo, 1994). La población del Gran Lago Salado corresponde a la especie *Artemia franciscana* Kellogg, 1906 (Abreu-Grobois, 1983), y ha sido introducida en salinas y lagos salobres en otras partes del mundo (Persoone y Sorgeloos, 1980; Tackaert y Sorgeloos, 1991). Las poblaciones naturales presentes en las salinas de México también corresponden a la especie *A. franciscana* (Correa y Bückle, 1993; Correa *et al.*, 1993; Correa y de la Rosa, 1996; Correa y Tapia, 1998).

En los últimos 20 años la producción acuícola de peces, moluscos y crustáceos ha sido afectada de manera importante por enfermedades virales y bacterianas que

INTRODUCTION

Artemia nauplii, obtained from the hatching of their cysts, are widely used in the larval culture of penaeid shrimp and fish (Léger *et al.*, 1986; Sorgeloos *et al.*, 1988). Most of these cysts are harvested at the Great Salt Lake (Utah, USA), which produces approximately 90% of the world's supply for aquaculture (Anonymous, 1994). The population at the Great Salt Lake belongs to the species *Artemia franciscana* Kellogg, 1906 (Abreu-Grobois, 1983), and it has been introduced into saltworks and salt-water lakes in other parts of the world (Persoone and Sorgeloos, 1980; Tackaert and Sorgeloos, 1991). The natural populations found in Mexican saltworks also correspond to the species *A. franciscana* (Correa and Bückle, 1993; Correa *et al.*, 1993; Correa and de la Rosa, 1996; Correa and Tapia, 1998).

Over the past 20 years, the aquaculture of fish, molluscs and crustaceans has been seriously affected by viral and bacterial diseases that generally occur as an epidemic

generalmente ocurren como epidemias y finalmente se constituyen en endémicas (Mialhe *et al.*, 1992). Las infecciones bacterianas, especialmente las generadas por el género *Vibrio*, causan grandes problemas de mortalidad en la etapa de larvicultura. No es posible desarrollar estos cultivos en medios estériles, pero se pueden controlar las fuentes potenciales de contaminación tratando el agua por filtración y por luz ultravioleta (Liltved *et al.*, 1995) y, en la larvicultura de peces y crustáceos, mejorando la calidad sanitaria de los nauplios de *Artemia* usados como alimento debido a que pueden constituirse en un vector importante para la transmisión de *Vibrio* y otras bacterias patógenas (Verdonck *et al.*, 1994; Lizárraga-Partida *et al.*, 1997).

Debido a que se desconoce la flora bacteriana asociada con las poblaciones mexicanas de *Artemia*, en este estudio se analizaron nauplios obtenidos de quistes provenientes de varias localidades de México. Se estimó el porcentaje de eclosión de los quistes, se evaluó la carga de bacterias desarrolladas en el medio de agar tiosulfato-citrato-sales biliares-sacarosa (TCBS) (TCBSB) y de bacterias heterótrofas viables (VHB), y se estableció su morfología.

MATERIALES Y MÉTODOS

Las muestras de quistes fueron recolectadas en las siguientes localidades: Salinas de Hidalgo, San Luis Potosí (22°39'N, 101°43'W); ex-lago de Texcoco (19°32'N, 99°00'W); Yavaros, Sonora (26°40'N, 109°35'W); y Salinas El Marqués, Oaxaca (15°33'N, 95°33'W). Fueron cosechadas en 1985, 1990, 1992 y 1993, respectivamente. Se procesaron de acuerdo con la metodología establecida por Sorgeloos *et al.* (1986) y se almacenaron al vacío a 2°C hasta su análisis bacteriológico. Los quistes se eclosionaron a una densidad promedio de 5 g L⁻¹. El medio y condiciones de

but become endemic (Mialhe *et al.*, 1992). Bacterial infections, especially those generated by the genus *Vibrio*, create serious mortality problems in the culture of larval stages. It is not possible to develop these cultures in sterile media, but the potential sources of contamination can be controlled by treating the water by filtration or UV irradiation (Liltved *et al.*, 1995) and, in the larviculture of fish and crustaceans, by improving the sanitary quality of the *Artemia* nauplii used as food because they can become an important vector for the transmission of *Vibrio* and other pathogenic bacteria (Verdonck *et al.*, 1994; Lizárraga-Partida *et al.*, 1997).

Due to the lack of information regarding the bacterial flora associated with the Mexican populations of *Artemia*, nauplii obtained from cysts from several sites in Mexico were analyzed in this study. The hatching percentage of the cysts was estimated, the viable heterotrophic bacteria (VHB) and bacteria in the thiosulfate-citrate-bile salts-saccharose agar (TCBS) medium (TCBSB) were quantified, and their morphology determined.

MATERIALS AND METHODS

The cyst samples were collected at the following sites: Salinas de Hidalgo, San Luis Potosí (22°39'N, 101°43'W); former lake of Texcoco (19°32'N, 99°00'W); Yavaros, Sonora (26°40'N, 109°35'W); and Salinas El Marqués, Oaxaca (15°33'N, 95°33'W). They were harvested in 1985, 1990, 1992 and 1993, respectively. They were processed according to the methodology established by Sorgeloos *et al.* (1986) and stored in a vacuum at 2°C until their bacteriological analysis. The cysts were hatched at an average density of 5 g L⁻¹. The hatching medium and conditions were those proposed by López-Torres (1997). The pH of the water ranged from 7.8 to 8.0. Incubation

eclosión fueron las propuestas por López-Torres (1997). El pH del agua fluctuó entre 7.8 y 8.0. La incubación se llevó a cabo durante 48 ± 2 horas, con iluminación de 1000 lux y aireación constante a una temperatura controlada de 28°C. No se aplicó el tratamiento para descapsular los quistes.

El equipo empleado para eclosionar los quistes se esterilizó. La efectividad de los filtros hidrófobos (Gelman Bacterial Air Vent de 0.2 μm) del sistema de aireación fue comprobada anteriormente por Anguiano-Beltrán (1996), burbujeando aire filtrado en un medio peptonado, donde no se detectaron bacterias en un periodo de 64 horas.

Los quistes se eclosionaron en dos réplicas debido a la escasez de las muestras. Para cada réplica se determinó el número de quistes al inicio de la incubación y el de nauplios al final de la eclosión. Se tomaron cinco alícuotas de 0.1 mL por réplica. Los quistes y los nauplios se fijaron y tñieron en lugol para su cuantificación.

Análisis bacteriológicos

Los nauplios se cosecharon después de la incubación y se analizaron bacteriológicamente según los métodos descritos por López-Torres (1997). Se utilizaron los medios de ZoBell para VHB y de TCBS (Difco®) para TCBSB. Para la siembra en placa se utilizó la técnica de esparcido en superficie (APHA, 1989), sembrando dos placas por repetición (cuatro por muestra) y contabilizando las unidades formadoras de colonia (CFU) por mililitro.

De las TCBSB, se aislaron al azar 24 colonias por muestra (96 en total), se purificaron en agar marino (ZoBell) por resiembra consecutivas y se conservaron en el medio de agar T₁N₁ (FDA, 1992) a temperatura ambiente (20–25°C) hasta su análisis dentro de las 12 horas siguientes.

lasted for 48 ± 2 hours, with illumination of 1000 lux and constant aeration at a controlled temperature of 28°C. The cysts were not decapsulated.

The equipment used to hatch the cysts was sterilized. The efficiency of the hydrophobic filters (Gelman Bacterial Air Vent, 0.2 μm) of the aeration system was previously determined by Anguiano-Beltrán (1996), by bubbling filtered air in a peptonized medium, in which bacteria were not detected for 64 hours.

The cysts were hatched in duplicate due to the scarcity of the samples. The number of cysts at the beginning of the incubation and the number of nauplii at the end of the hatching were determined for each replicate. Five 0.1-mL aliquots were taken per replicate. The cysts and nauplii were fixed and stained in lugol for their quantification.

Bacteriological analysis

The nauplii were harvested after incubation and analyzed bacteriologically according to the methods described by López-Torres (1997). The ZoBell medium was used for VHB and the TCBS (Difco®) medium for TCBSB. The plates were seeded by the spread plate method (APHA, 1989), seeding two plates per replicate (four per sample) and counting the colony-forming units (CFU) per milliliter.

Twenty-four random colonies of TCBSB were isolated per sample (96 in total); they were purified in marine agar (ZoBell) per consecutive reseeded and preserved in T₁N₁ agar medium (FDA, 1992) at room temperature (20–25°C) until their analysis within the next 12 hours.

The strains selected were stained with the Gram method and their coloration was recorded in both quantification media; furthermore, the oxidase and catalase test was applied, according to MacFaddin (1993).

A las cepas seleccionadas se les realizó la tinción de Gram y se registró su coloración en ambos medios de cuantificación; además se les aplicó la prueba de la oxidasa y catalasa, de acuerdo con los protocolos descritos en MacFaddin (1993).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los porcentajes de eclosión de los quistes y los niveles de bacterias hallados en sus nauplios se resumen en la tabla 1. La eclosión más exitosa se obtuvo de la población de Texcoco, con un promedio de 72.80%. Los quistes de la población de Yavaros no eclosionaron bajo las condiciones del experimento debido a la nula calidad de éstos.

Las VHB y TCBSB hallados en los nauplios presentaron concentraciones de 10^7 – 10^8 y 10^6 – 10^7 CFU mL⁻¹, respectivamente. Estos valores se asemejan a los encontrados por López-Torres (1997) en nauplios procedentes de muestras de quistes comerciales.

Las formas bacterianas más abundantes en agar TCBS fueron bacilos gram positivo, presentes en las cuatro muestras analizadas (tabla 2). Únicamente en los nauplios obtenidos de los quistes de San Luis Potosí predominaron cocobacilos gram positivo. Aunque los quistes de Yavaros no eclosionaron y no proporcionaron nauplios, fue posible aislar cocos gram positivo de los propios quistes.

En la tabla 3 se presentan los porcentajes totales de formas bacterianas halladas. El patrón encontrado fue constante ya que los bacilos gram positivo, con colonias amarillas en TCBS, superaron en presencia al resto de las formas, con un 68.70% (66 aislamientos). De acuerdo con la reacción al gram, los bacilos gram positivo alcanzaron el 75% (72 aislamientos) del total de morfologías encontradas. Bacilos gram negativo sólo aparecieron en una colonia y fueron oxidasa negativa y catalasa

RESULTS AND DISCUSSION

The hatching percentage of the cysts and levels of bacteria found in the nauplii are summarized in table 1. The most successful hatching was obtained with the Texcoco population, with an average of 72.80%. The cysts of the Yavaros population did not hatch under the conditions of the experiment due to their poor quality.

The concentrations of VHB and TCBSB found in the nauplii were 10^7 – 10^8 and 10^6 – 10^7 CFU mL⁻¹, respectively. These values are similar to those found by López-Torres (1997) in nauplii from commercial cyst samples.

The most abundant bacterial forms in the TCBS agar were gram-positive bacilli, found in four samples analyzed (table 2). Gram-positive coccobacilli only predominated in the nauplii obtained from the San Luis Potosí cysts. Even though the Yavaros cysts did not hatch and did not produce nauplii, it was possible to isolate gram-positive cocci from the actual cysts.

The total percentages of the bacterial forms found are given in table 3. The gram-positive bacilli with yellow colonies in TCBS were the predominant form, with 68.70% (66 isolations). According to the reaction to the gram stain, the gram-positive bacilli accounted for 75% (72 isolations) of the total of morphologies found. Gram-negative bacilli only occurred in one colony and were oxidase negative and catalase positive. The gram-positive strains found in the cysts accounted for 97.9% and all presented pigmentation in the marine agar (ZoBell) medium.

Several bacterial genera are related to *Artemia* cysts and nauplii (Austin and Allen, 1982; Igarashi *et al.*, 1989; Gómez-Gil, 1993). In aquaculture, the most important is *Vibrio*, which has been recorded in *Artemia* nauplii by Montoya-Rodríguez (1992), Pector *et al.*

Tabla 1. Porcentaje de eclosión (a las 48 horas, promedio de diez datos) de los quistes y niveles de bacterias halladas en nauplios de poblaciones naturales de *Artemia franciscana* de México. En paréntesis, el error estándar. VHB = bacterias heterótrofas viables (unidades formadoras de colonias (CFU); promedio de cuatro datos). TCBSB = bacterias desarrolladas en TCBS (CFU; promedio de cuatro datos). **Table 1.** Hatching percentage (at 48 hours, average of ten data) of the cysts and levels of bacteria found in nauplii of natural Mexican populations of *Artemia franciscana*. The standard error is given in parentheses. VHB = viable heterotrophic bacteria (colony-forming units (CFU); average of four data). TCBSB = bacteria developed in TCBS agar (CFU; average of four data).

Región	Fecha de cosecha	Quistes g ⁻¹	Nauplios g ⁻¹	% eclosión	VHB CFU mL ⁻¹	TCBSB CFU mL ⁻¹
San Luis Potosí	08/1985	273,555 (6,153)	35,479 (4,512)	13.13 (1.8)	4.2 × 10 ⁸	1.2 × 10 ⁷
Texcoco	11/1990	379,428 (13,864)	284,762 (17,162)	72.8 (2.8)	1.8 × 10 ⁸	3.0 × 10 ⁷
Yavaros*	10/1992	365,333 (9,406)	0	0	4.1 × 10 ⁷	3.8 × 10 ⁶
Oaxaca	05/1993	324,833 (12,859)	34,417 (2,703)	10.66 (1.0)	2.0 × 10 ⁸	1.2 × 10 ⁷

* Bacterias halladas en quistes que no eclosionaron.

Tabla 2. Porcentaje de morfología de bacterias desarrolladas en TCBS (TCBSB), presentes en nauplios obtenidos de la eclosión de quistes de *Artemia franciscana* de poblaciones naturales de México. En paréntesis, el número de aislamientos; 96 aislamientos en total (24 por muestra).

Table 2. Percentage of morphology of bacteria developed in the TCBS medium (TCBSB), found in nauplii obtained from the hatching of *Artemia franciscana* cysts from natural Mexican populations. The number of isolations is given in parentheses; 96 isolations in total (24 per sample).

Morfología	Reacción al gram	Color en TCBS	Oaxaca	San Luis Potosí	Texcoco	Yavaros*
Bacilo		Amarillo	79.2 (19)	33.3 (8)	87.5 (21)	75.0 (18)
	+	Verde	4.2 (3)	12.5 (3)	4.2 (1)	4.2 (1)
	-	Amarillo	0	0	4.2 (1)	0
Cocobacilo		Amarillo	16.6 (4)	8.3 (2)	0	0
	+	Verde	0	45.8 (11)	0	0
	-	Amarillo	0	0	4.2 (1)	0
Coco		Amarillo	0	0	0	4.2 (1)
	+	Verde	0	0	0	16.6 (4)

* Bacterias halladas en quistes que no eclosionaron.

Tabla 3. Resumen de bacterias halladas en nauplios procedentes de la eclosión de quistes de *Artemia franciscana* de poblaciones naturales de México, según su reacción al gram. En paréntesis, el número de aislamientos.

Table 3. Summary of the bacteria found in nauplii obtained from the hatching of *Artemia franciscana* cysts from natural Mexican populations, according to their reaction to the gram stain. The number of isolations is given in parentheses.

Morfología	Gram	Color en TCBS	% (N) ΣN = 96	% por grupo
Bacilo	+	Amarillo	68.75 (66)	75.00 (72)
	+	Verde	6.25 (6)	
	–	Amarillo	1.04 (1)	1.04 (1)
	–	Verde	0	
Cocobacilo	+	Amarillo	6.25 (6)	17.70 (17)
	+	Verde	11.46 (11)	
	–	Amarillo	1.04 (1)	1.04 (1)
	–	Verde	0	
Coco	+	Amarillo	1.04 (1)	5.20 (5)
	+	Verde	4.17 (4)	
	–	Amarillo	0	0
	–	Verde	0	

% total gram positivo: 97.9; % total gram negativo: 2.1.

positiva. Las cepas gram positivas presentes en los quistes sumaron 97.9%, y todas presentaron pigmentación en el medio de agar marino (ZoBell).

Existe una gran variedad de géneros bacterianos relacionados con los quistes y nauplios de *Artemia* (Austin and Allen, 1982; Igarashi *et al.*, 1989; Gómez-Gil, 1993). El de mayor importancia para la acuicultura es *Vibrio*, que ha sido registrado por Montoya-Rodríguez (1992), Pector *et al.* (1994), Verdonck *et al.* (1994), Lizárraga-Partida *et al.* (1997) y López-Torres (1997) en nauplios de *Artemia*. En la Bahía de San Francisco, Straub y Dixon (1993) encontraron una gran variedad de géneros bacterianos en nauplios de *A. franciscana*, y observaron que la composición específica cambia conforme aumenta la salinidad del agua,

(1994), Verdonck *et al.* (1994), Lizárraga-Partida *et al.* (1997) and López-Torres (1997). In San Francisco Bay, Straub and Dixon (1993) found a wide variety of bacterial genera in nauplii of *A. franciscana*, and they noted that the specific composition changes as the salinity of the water increases, since *Vibrio* species predominate in greater salinities. However, in this study that included the analysis of 96 strains of bacteria obtained from cyst-hatched nauplii, the genus *Vibrio* was not found. The bacterial composition in the nauplii of the natural populations analyzed can be compared to that found by López-Torres (1997) in nauplii from canned commercial cysts, in which *Vibrio* was also absent.

Few studies have been conducted to determine the bacterial flora associated with the

dado que las especies de *Vibrio* predominaron en las mayores salinidades. Sin embargo, en el presente estudio que incluyó el análisis de 96 cepas bacterianas recuperadas de los nauplios eclosionados de sus quistes, el género *Vibrio* no fue encontrado. La composición bacteriana presente en los nauplios de las diferentes muestras de las poblaciones naturales analizadas se puede comparar con la hallada por López-Torres (1997) en nauplios procedentes de quistes comerciales enlatados, en los cuales tampoco se encontró *Vibrio*.

Se han realizado pocos estudios para conocer la flora bacteriana asociada con los quistes y los nauplios de las poblaciones naturales mexicanas de *Artemia*, en su mayoría aún no explotadas comercialmente. Este conocimiento puede ser muy interesante para el desarrollo comercial de este recurso natural que, de acuerdo con el creciente mercado de la acuicultura de crustáceos en México, origina una gran demanda en su forma de quistes, que aún provienen en su totalidad del extranjero.

REFERENCIAS

- Abreu-Grobois, F.A. (1983). Population genetics of *Artemia*. Ph.D. thesis, University of Wales, Swansea, UK, 438 pp.
- Anguiano-Beltrán, C. (1996). Patogenicidad de *Vibrio alginolyticus* sobre larvas del mejillón europeo *Mytilus galloprovincialis* y larvas y postlarvas del abulón rojo, *Haliotis rufescens*. Tesis de maestría, CICESE, Ensenada, BC, México, 60 pp.
- Anonymous (1994). Brine shrimp eggs. The bargain days are over. *Shrimp News Int.*, 19(7): 2–4.
- APHA (1989). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 17th ed. L. Clescer, A.E. Greenberg and R.R. Trussell (eds.), Washington, DC, pp. 9–61.
- Austin, B. and Allen, D.A. (1982). Microbiology of laboratory-hatched brine shrimp (*Artemia*). *Aquaculture*, 26: 369–383.
- Correa, S.F. y Bückle, L.F. (1993). Morfología y biometría de cinco poblaciones de *Artemia* cysts and nauplii of natural Mexican populations of *Artemia* that, for the most part, have still not been commercially exploited. This knowledge will be of use in the commercial development of this natural resource, since the growing market for cultured crustaceans in Mexico is creating a large demand for these cysts, which are still being obtained entirely from abroad.
- English translation by Christine Harris.
-
- franciscana* (Anostraca: Artemiidae). *Rev. Biol. Trop.*, 41: 103–110.
- Correa, S.F. and de la Rosa, J. (1996). Allozymatic variation in three populations of *Artemia franciscana* from Mexico. In: G. Guajardo and P. Coutteau (eds.), Improvement of the Commercial Production of Marine Aquaculture Species. Proc. Workshop on Fish and Mollusc Larviculture, Santiago, Chile, pp. 165–171.
- Correa, S.F. y Tapia, O. (1998). Comportamiento reproductivo de *Artemia franciscana* (Kellogg, 1906) de San Quintín, Baja California, México. *Ciencias Marinas*, 24(3): 295–301.
- Correa, S.F., Bückle, L.F. y de la Rosa, J. (1993). Hibridación en algunas poblaciones de *Artemia franciscana* (Anostraca: Artemiidae). *Rev. Biol. Trop.*, 41: 97–101.
- FDA (Food and Drug Administration) (1992). Bacteriological Analytical Manual. 7th ed. AOAC, Arlington, USA, 529 pp.
- Gómez-Gil, R.S.B. (1993). Estudio bacteriológico de quistes y nauplios de *Artemia franciscana* Kellogg, 1906, del Gran Lago Salado, EE.UU. Tesis de maestría, Universidad Nacional Autónoma de México, 75 pp.
- Igarashi, M.A., Segugita, H. and Deguchi, Y. (1989). Microflora associated with eggs and nauplii of *Artemia salina*. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 55(11): 20–45.
- Léger, P., Bengtson, D.A., Simpson, K.L. and Sorgeloos, P. (1986). The use and nutritional value of *Artemia* as food source. *Oceanogr. Mar. Biol. Ann. Rev.*, 24: 521–623.

- Liltved, H., Hektoen, H. and Efraimsen, H. (1995). Inactivation of bacterial and viral fish pathogens by ozonation or UV irradiation in water of different salinity. *Aquacult. Eng.*, 14: 107–122.
- Lizárraga-Partida, M.L., Rodríguez-Montoya, L., and Gendrop-Funes, V. (1997). The use of bacterial counts in two Mexican shrimp hatcheries. *Ciencias Marinas*, 23(1): 129–140.
- López-Torres, M.A. (1997). Bacterias asociadas con quistes comerciales de *Artemia franciscana* cultivadas en el medio selectivo TCBS. Tesis de maestría, CICESE, Ensenada, BC, México, 113pp.
- MacFaddin, J.F. (1993). Pruebas Bioquímicas para la Identificación de Bacterias de Importancia Clínica. Editorial Médica Panamericana, México, DF, 301 pp.
- Mialhe, E., Boulo, V., Bachere, E., Hervio, D., Cousin, K., Noel, D., Noel, T., Ohresser, M., Deuff, R.M. and Gendreau, S. (1992). Development of new methodologies for diagnosis of infectious diseases in mollusc and shrimp aquaculture. *Aquaculture*, 107: 155–164.
- Montoya-Rodríguez, L. (1992). Caracterización e identificación de bacterias del género *Vibrio* en sistemas de acuicultura de Ensenada, Baja California, mediante el establecimiento de un conjunto mínimo de pruebas taxonómicas. Tesis de maestría, Universidad Nacional Autónoma de México, 89 pp.
- Pector, R., Tackaert, W., Abellin, P., Ollivier, F. and Sorgeloos, P. (1994). A comparative study of the use of different preparations of decapsulated *Artemia* cysts as food for rearing African catfish (*Clarias ganepinus*) larvae. *J. World Aquacult. Soc.*, 25(3): 366–370.
- Persoone, G. and Sorgeloos, P. (1980). General aspects of the ecology and biogeography of *Artemia*. In: G. Persoone, P. Sorgeloos, O. Roels and E. Jasper (eds.), *The Brine Shrimp Artemia*. Vol. 3. Universa Press, Wetteren, Belgium, pp.3–24.
- Sorgeloos, P., Léger, P., Lavens, P., Tackaert, W. and Versichele, D. (1986). Manual for the culture and use of the brine shrimp *Artemia* in aquaculture. *Artemia* Reference Center, State University of Ghent, Belgium, 319 pp.
- Sorgeloos, P., Léger, P. and Lavens, P. (1988). Improved larval rearing of European and Asian seabass, seabream, mahi-mahi, sigonid and milk fish using enrichment diets for *Brachionus* and *Artemia*. *World Aquacult.*, 19(4): 78–79.
- Straub, D.V. and Dixon, B.A. (1993). Bacteriological flora of brine shrimp (*Artemia franciscana*) from a hypersaline pond in San Francisco Bay, California. *Aquaculture*, 118: 309–313.
- Tackaert, W. and Sorgeloos, P. (1991). Semi-intensive culturing in fertilized ponds. In: R.A. Browne, P. Sorgeloos and C.N.A. Trotman (eds.), *Artemia* Biology. CRC Press, Boston, pp.287–312.
- Verdonck, L., Swings, J., Kerters, K., Dehasque, M., Sorgeloos, P. and Léger, P. (1994). Variability of the microbial environment of rotifer *Brachionus plicatilis* and *Artemia* production systems. *J. World Aquacult. Soc.*, 25(1): 55–59.