

Consumo de oxígeno, excreción de amonio y capacidad osmorreguladora de *Litopenaeus stylirostris* (Stimpson) expuesto a diferentes combinaciones de temperatura y salinidad

Oxygen consumption, ammonium excretion and osmoregulatory capacity of *Litopenaeus stylirostris* (Stimpson) exposed to different combinations of temperature and salinity

Ana Denisse Re¹
Fernando Díaz^{1*}
Elizabeth Sierra¹
Silvia Gómez-Jiménez²

¹ Departamento de Biotecnología Marina
Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE)
Kilómetro 107 Carretera Tijuana-Ensenada
Ensenada, CP 22860, Baja California, México
* E-mail: fdiaz@cicese.mx.

² Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD)
Apartado postal 1735
Hermosillo, CP 83000, Sonora, México

Recibido en enero de 2004; aceptado en abril de 2004

Resumen

Se determinaron las respuestas fisiológicas del camarón azul al exponer a los organismos a temperaturas de 23, 28 y 33°C y a salinidades de 10, 15, 20, 25, 30, 35 y 40‰. El consumo de oxígeno de *Litopenaeus stylirostris* expuesto a las salinidades experimentales se incrementó en relación directa con la temperatura; sin embargo, a 28°C la tasa metabólica se mantuvo constante. La tasa de excreción de amonio en los juveniles aclimatados a 23°C y 33°C se relacionó con el patrón de osmorregulación ya que cuando los camarones hiperregularon ésta se incrementó, y disminuyó cuando hipo-regularon, mientras que en los mantenidos a 28°C la excreción de amonio permaneció constante. La capacidad osmorreguladora de los juveniles mostró que fueron hiporreguladores e hiperreguladores a salinidades por arriba y por debajo del punto isosmótico, disminuyendo esta capacidad en los organismos mantenidos a 33°C y expuestos a las altas salinidades. El punto isosmótico de los camarones tuvo un intervalo de 676.8–700.7 mmol kg⁻¹ (23.7–24.6‰). Los valores de las pendientes entre la concentración osmótica del medio y la hemolinfa de los camarones aclimatados a 23°C, 28°C y 33°C fueron 0.25, 0.17 y 0.37, obteniéndose el menor valor de la pendiente en los juveniles mantenidos a 28°C, condición en la que el camarón azul se caracterizó como fuerte regulador. Para optimizar el cultivo de *L. stylirostris* en condiciones controladas se proponen salinidades de 25‰ y temperaturas de 28°C, las cuales se consideran condiciones óptimas para tales ambientes en los que los organismos están libres de estrés ambiental y, por ende, se incrementará su crecimiento.

Palabras clave: consumo de oxígeno, excreción de amonio, capacidad osmorreguladora, salinidad y temperatura, *Litopenaeus stylirostris*.

Abstract

The physiological responses of the blue shrimp were determined by exposing the organisms to temperatures of 23°C, 28°C and 33°C, and salinities of 10, 15, 20, 25, 30, 35 and 40‰. Oxygen consumption of *Litopenaeus stylirostris* exposed to experimental salinities increased in direct relationship with temperature, even though at 28°C the metabolic rate was steady. The ammonium excretion rate in juvenile shrimp acclimated at 23°C and 33°C was related to the pattern of osmoregulation, increasing when the shrimp were hyper-regulators and decreasing when they were hypo-regulators. The ammonium excretion rate remained constant in shrimp kept at 28°C. The osmoregulatory capacity of the juveniles indicated that they were hypo-regulators and hyper-regulators in salinities above and below the isosmotic point, this capacity decreasing in organisms kept at 33°C and exposed to higher salinities. The isosmotic point obtained ranged from 676.8 to 700.7 mmol kg⁻¹ (23.7–24.6‰). The values of the slopes between the osmotic concentration of the external medium and the hemolymph of shrimp acclimated at 23°C, 28°C and 33°C were 0.25, 0.17 and 0.3, respectively; the lowest value was obtained for juveniles maintained at 28°C, being strong regulators in this condition. To optimize the culture of *L. stylirostris* under controlled conditions, we propose that it be cultivated

in salinities of 25‰ and temperatures of 28°C, considered the optimum conditions because in these environments the organisms are free of stress and their growth therefore increases.

Key words: oxygen consumption, ammonium excretion, osmoregulatory capacity, temperature and salinity, *Litopenaeus stylirostris*.

Introducción

De acuerdo con Castille y Lawrence (1981) y Claybrook (1983), la capacidad adaptativa de los peneidos es específica y está determinada por diversos factores evolutivos que han causado que las especies de camarones se distribuyan diferencialmente en el gradiente marino-lagunar-estuarino. El ciclo de vida de muchas especies de camarones ocurre entre los ambientes marinos y lagunar-estuarinos. Los adultos dependen de la estabilidad del ambiente marino para la reproducción, en tanto que las postlarvas y los juveniles están adaptados para tolerar las variaciones ambientales cíclicas frecuentes en los sistemas lagunares-estuarinos (Zein-Eldin y Aldrich, 1965; Bishop *et al.*, 1980; Castille y Lawrence, 1981).

El camarón azul *Litopenaeus stylirostris* (Stimpson) se distribuye desde Punta Abreojos, Baja California, en México, hasta Tumbes, Perú. En la porción central y norte del Golfo de California es la segunda especie de mayor abundancia y es la que domina en las lagunas costeras, estuarios y bahías desde el norte de Mazatlán hasta el Río Colorado (Aragón, 2000).

El consumo de oxígeno es una respuesta fisiológica que se puede correlacionar con las variaciones de los factores ambientales, ya que la tasa respiratoria está relacionada con el trabajo metabólico y el flujo de energía que los organismos canalizan hacia los mecanismos del control homeostático (Salvato *et al.*, 2001).

En los decápodos la excreción de amonio-N representa más del 85% de la excreción nitrogenada (Regnault, 1987). La excreción de amonio en los crustáceos es afectada por factores intrínsecos como el tamaño corporal, el estadio del ciclo de muda y por factores extrínsecos como la temperatura, la salinidad y el oxígeno disuelto (Needham, 1957). El efecto de la salinidad y la temperatura sobre la excreción nitrogenada se ha cuantificado en peneidos como *Fenneropenaeus indicus* (Milne Edwards), *Marsupenaeus japonicus* (Bate), *Penaeus monodon* (Fabricius), *F. chinensis* (Osbeck), *Farfantepenaeus aztecus* (Ives) y *Litopenaeus vannamei* (Boone) (Gerhardt, 1980; Chen y Lai, 1993; Chen *et al.*, 1994; Chen y Lin, 1995; Hernández y Díaz, 1995; Jiang *et al.*, 2000; Díaz *et al.*, 2001). La función del amonio en los procesos de osmorregulación ha sido estudiado en dos aspectos, como un constituyente de los aminoácidos libres para la regulación osmótica intracelular (Bishop *et al.*, 1980) y como un ión de intercambio para la regulación del Na⁺ en la hemolinfa de los crustáceos (Mangum *et al.*, 1976; Pressley *et al.*, 1981).

La osmorregulación es un mecanismo importante de adaptación ambiental en especies acuáticas, particularmente en los crustáceos (Péqueux, 1995). Se ha demostrado que cuando los camarones juveniles son expuestos a cambios ambientales hay una modificación en el balance iónico y osmótico (Williams,

Introduction

According to Castille and Lawrence (1981) and Claybrook (1983), the adaptation capacity of penaeids is specific and determined by a number of evolutive factors, which have resulted in the differential distribution of shrimp species in the marine-lagoon-estuarine gradient. The life cycle of many shrimp species occurs within marine and lagoon-estuarine environments. Adults depend on the stability of the marine environment to breed, whereas portlarvae and juveniles are adapted to tolerate the cyclical environmental variations that are frequent in lagoon-estuarine systems (Zein-Eldin and Aldrich, 1965; Bishop *et al.*, 1980; Castille and Lawrence, 1981).

The blue shrimp, *Litopenaeus stylirostris* (Stimpson), is distributed from Punta Abreojos, Baja California, Mexico, to Tumbes, Peru. It is the second most abundant species in the central and northern Gulf of California, and is predominant in the coastal lagoons, estuaries and bays from northern Mazatlán to the Colorado River (Aragón, 2000).

Oxygen consumption is a physiological response that can be correlated with variations in environmental factors, since respiration rate is related to the metabolic work and flow of energy that the organisms channel into homeostatic control mechanisms (Salvato *et al.*, 2001).

In decapods, ammonium-N excretion represents more than 85% of nitrogen excretion (Regnault, 1987). Ammonium excretion in crustaceans is affected by intrinsic factors, such as body size and molt cycle stage, and extrinsic factors, such as temperature, salinity and dissolved oxygen (Needham, 1957). The effect of salinity and temperature on nitrogen excretion has been quantified in *Fenneropenaeus indicus* (Milne Edwards), *Marsupenaeus japonicus* (Bate), *Penaeus monodon* (Fabricius), *F. chinensis* (Osbeck), *Farfantepenaeus aztecus* (Ives) and *Litopenaeus vannamei* (Boon) (Gerhardt, 1980; Chen and Lai, 1993; Chen *et al.*, 1994; Chen and Lin, 1995; Hernández and Díaz, 1995; Jiang *et al.*, 2000; Díaz *et al.*, 2001). The role of ammonium in osmoregulation processes has been studied from two viewpoints: as a constituent of free amino acids for intracellular osmotic regulation (Bishop *et al.*, 1980) and as an exchange ion for the regulation of Na⁺ in the hemolymph of crustaceans (Mangum *et al.*, 1976; Pressley *et al.*, 1981).

Osmoregulation is an important environmental adaptation mechanism in aquatic species and in particular crustaceans (Péqueux, 1995). When juvenile shrimp are exposed to environmental changes, a modification occurs in the ionic and osmotic balance (Williams, 1960; Castille and Lawrence, 1981; Hernández and Díaz, 1995; Díaz *et al.*, 2001; Lemaire *et al.*, 2002), respiratory activity (Dalla-Via, 1986; Villarreal *et*

1960; Castille y Lawrence, 1981; Hernández y Díaz, 1995; Díaz *et al.*, 2001; Lemaire *et al.*, 2002), la actividad respiratoria (Dalla Via, 1986; Villarreal *et al.*, 1994; Chen y Lin, 1995; Rosas *et al.*, 1999; Rosas *et al.*, 2001; Villarreal *et al.*, 2003), el crecimiento (Bray *et al.*, 1994; Wyban *et al.*, 1995; Ponce-Palafox *et al.*, 1997; Kumlu *et al.*, 2001; Coman *et al.*, 2002) y la excreción de amonio (Chen y Lai, 1993; Chen y Nan, 1993; Chen y Nan, 1994; Jiang *et al.*, 2000; Díaz *et al.*, 2001). Esos estudios han aportado evidencias de que los camarones peneidos están adaptados a tolerar las fluctuaciones naturales de los factores ambientales. El monitorear la condición fisiológica de los crustáceos mediante la osmorregulación puede tener un uso potencial como biomarcador para evaluar el estado fisiológico de los camarones y, por lo tanto, predecir el efecto del estrés causado por las variaciones de los factores ambientales y los contaminantes, así como para conocer las condiciones óptimas para su cultivo (Lignot *et al.*, 1999, 2000; Brito *et al.*, 2000).

Los estudios ecofisiológicos en el camarón azul son escasos. El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de la temperatura y la salinidad sobre el consumo de oxígeno, la excreción de amonio y la capacidad osmorreguladora de juveniles de *Litopenaeus stylirostris* para determinar las condiciones óptimas para su cultivo.

Materiales y métodos

Los juveniles de *L. stylirostris* se obtuvieron de la granja de producción El Camarón Dorado localizada en el estado de Sonora, México. En el laboratorio, 900 camarones con un intervalo de peso húmedo de 0.8–1.0 g fueron colocados en tres estanques de 500 L provistos de aireación constante, con flujo continuo de agua de mar a una salinidad de 35‰. El fotoperíodo se mantuvo en 12/12 h luz-obscuridad con un periodo de transición de 30 minutos. Los juveniles se aclimataron durante 30 días a 20°C, 28°C y 33°C ± 1, fase en la que los organismos fueron alimentados con alimento proporcionado a 10% de su peso húmedo corporal dos veces al día (10:00 y 18:00 h), con una dieta comercial para camarón con 35% de proteína. Los animales muertos, el alimento remanente y las exuvias fueron extraídos de los estanques diariamente.

Posteriormente se inició la aclimatación de los organismos a salinidades de 10, 15, 20, 25, 30, 35 y 40‰, para lo que se colocaron 20 organismos en recipientes de 20 L realizándose dos repeticiones para cada condición experimental. Las salinidades menores a 35‰ se obtuvieron mediante diluciones con agua de la llave previamente desclorada, salvo la de 40‰ que se obtuvo al adicionar sales sintéticas de mar. La tasa de disminución e incremento de la salinidad fue de 5‰ por día y, una vez alcanzadas las salinidades experimentales, los camarones permanecieron en tales condiciones durante siete días, tiempo suficiente para que estabilizaran su medio interno (Castille y Lawrence, 1981).

El consumo de oxígeno y la excreción de amonio de los organismos fueron medidos en un sistema respirométrico

et al., 1994; Chen and Lin, 1995; Rosas *et al.*, 1999; Rosas *et al.*, 2001; Villarreal *et al.*, 2003), growth (Bray *et al.*, 1994; Wyban *et al.*, 1995; Ponce-Palafox *et al.*, 1997; Kumlu *et al.*, 2001; Coman *et al.*, 2002), and ammonium excretion (Chen and Lai, 1993; Chen and Nan, 1993, 1994; Jiang *et al.*, 2000; Díaz *et al.*, 2001). These studies have shown that penaeid shrimp are adapted to tolerate natural environmental fluctuations. Osmoregulation can be used as a potential biomarker to monitor the physiological condition of crustaceans and, hence, predict the effect of stress caused by variations in environmental factors and pollutants, and determine the optimal culture conditions (Lignot *et al.*, 1999, 2000; Brito *et al.*, 2000).

There are few ecophysiological studies on the blue shrimp. This work aims to evaluate the effect of temperature and salinity on oxygen consumption, ammonium excretion and osmoregulatory capacity of *Litopenaeus stylirostris* juveniles to determine the optimum conditions for its cultivation.

Materials and methods

Litopenaeus stylirostris juveniles were obtained from the El Camarón Dorado production farm located in the state of Sonora, Mexico. In the laboratory, 900 shrimp ranging from 0.8 to 1.0 g wet weight were placed in three 500-L tanks with constant aeration and continuous flow of 35‰ salinity seawater. A 12:12 h light:dark photoperiod was maintained, with a 30-min transition period. Juveniles were acclimated at 20°C, 28°C and 33°C ± 1 for 30 days. During this phase, the organisms were fed a commercial shrimp diet with 35% protein at 10% of their wet body weight, twice a day (10:00 and 18:00 h). The dead animals, leftover food and exuviae were removed daily from the tanks.

Subsequently, the organisms were acclimated at salinities of 10, 15, 20, 25, 30, 35 and 40‰. Twenty organisms were placed in 20-L recipients and two repetitions were made for each experimental condition. Salinities lower than 35‰ were obtained by diluting with previously dechlorinated tapwater and that of 40‰ was obtained by adding synthetic sea salts. The rate of salinity decrease and increase was 5‰ per day and once the experimental salinities had been obtained, the shrimp remained in those conditions for seven days, sufficient time for them to stabilize their internal medium (Castille and Lawrence, 1981).

Oxygen consumption and ammonium excretion were measured in a semi-open respiratory system like the one described by Díaz *et al.* (1989), consisting of 21 chambers of 250 mL each. Twenty shrimp in intermolt stage were individually introduced into the respiratory chambers 24 h before initiating measurements, which were made between 9:00 and 13:00 h. The molt cycle stage was identified according to the procedure described by Huner and Colvin (1979). Water flow in the chambers remained open for 2 h; before closing, two water samples were taken to measure the initial concentration of dissolved oxygen with a YSI 52 oxymeter (Yellow Springs Instruments Co.), equipped with a polarographic sensor, and

semiabierto como el descrito por Díaz *et al.* (1989) el cual consiste de 21 cámaras de 250 mL cada una. De manera individual 20 camarones en estadio de intermuda fueron introducidos en las cámaras respirométricas 24 h antes de iniciar las mediciones que se realizaron entre las 9:00 y las 13:00 h. El estadio del ciclo de muda fue identificado de acuerdo con el procedimiento descrito por Huner y Colvin (1979). El flujo de agua en las cámaras permaneció abierto durante 2 h, pero antes de cerrarlas se tomaron dos muestras de agua para medir la concentración inicial de oxígeno disuelto con un oxímetro YSI 52 (Yellow Springs Instruments Co.) provisto de un sensor polarográfico, y la concentración inicial de amonio por el método del fenolhipoclorito (Rodier, 1981). Las cámaras permanecieron cerradas durante 1 h, ya que de acuerdo a Stern *et al.* (1984), éste es el tiempo adecuado para que el oxígeno disuelto no disminuya por debajo de 30% y no cause estrés en los organismos. Antes de que el flujo de agua en las cámaras se reestableciera se tomaron dos muestras de agua para medir la concentración final del oxígeno disuelto y el amonio producido. La cámara número 21 fue usada como control para medir el consumo de oxígeno y la producción de amonio por los microorganismos y hacer las correcciones necesarias. Se realizaron dos repeticiones de cada prueba.

Para determinar la presión osmótica en los organismos provenientes de cada condición experimental se extrajo una muestra de hemolinfa de 10 μL con una pipeta automática a través de la membrana toraco-abdominal (previamente secada con papel absorbente). Las osmolaridades de la hemolinfa y del medio fueron medidas con un osmómetro de vapor Wescor 5520 y los datos se expresaron en mmol kg^{-1} .

Inmediatamente al finalizar los experimentos los camarones fueron muertos por inmersión en agua caliente, se secaron en una estufa a 60°C , se colocaron en un desecador durante 2 h y se pesaron en una balanza (Ohaus Explorer) para determinar su peso seco. Los resultados del consumo de oxígeno de los organismos y de la excreción de amonio se expresaron en $\text{mg O}_2 \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1}$ y $\text{mg NH}_4^+ \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1}$ de peso seco (p.s.), respectivamente.

El consumo de oxígeno y la excreción nitrogenada se graficaron en cajas en paralelo (Tukey, 1977). Dentro de las cajas el 50% de los datos se distribuyó alrededor de la mediana y en los intervalos de confianza. El otro 50% se distribuyó en cada barra. Se utilizó un análisis de varianza de dos vías (Sigma Stat) para determinar el efecto de la temperatura y la salinidad sobre el consumo de oxígeno, la excreción nitrogenada y la osmolaridad de la hemolinfa de *L. stylirostris*. Para describir el efecto de la salinidad y la temperatura sobre la osmolaridad de la hemolinfa se utilizó una regresión lineal (Sigma-Stat). Los valores de los puntos isosmóticos (donde la osmolaridad de la hemolinfa es igual a la osmolaridad del medio) fueron determinados usando la fórmula de Ferraris *et al.* (1986). En los juveniles del camarón azul se calculó la capacidad osmorreguladora como la diferencia entre la osmolaridad de la hemolinfa y la del medio externo (Lignot *et al.*, 2000).

the initial concentration of ammonium by the phenolhypochlorite method (Rodier, 1981). The chambers remained closed for 1 h, because according to Stern *et al.* (1984), during this time dissolved oxygen does not decrease below 30% and does not cause stress to the organisms. Before re-establishing the water flow, two water samples were taken to measure the final concentration of dissolved oxygen and ammonium produced. The 21st chamber was used as control to measure oxygen consumption and ammonium production by the microorganisms and make the necessary corrections. Two repetitions were made of each test.

To determine the osmotic pressure in organisms from each experiment, a 10- μL hemolymph sample was taken with an automatic pipette through the thoraco-abdominal membrane (previously dried with absorbent paper). The osmolarity of the hemolymph and medium were measured with a Wescor 5520 vapor pressure osmometer and the data are given in mmol kg^{-1} .

Immediately following the experiments, the shrimp were put to death by immersion in hot water, dried in an oven at 60°C , placed in a desiccator for 2 h and weighed on an Ohaus Explorer balance to determine dry weight. The results of oxygen consumption and ammonium excretion are given in $\text{mg O}_2 \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1}$ and $\text{mg NH}_4^+ \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1}$ dry weight (d.w.), respectively.

Oxygen consumption and ammonium excretion were plotted using parallel boxplots (Tukey, 1977). Within the boxes, 50% of the data were distributed around the median and in the confidence intervals; the other 50% were distributed in each bar. A two-way analysis of variance was used (Sigma Stat) to determine the effect of temperature and salinity on oxygen consumption, ammonium excretion and osmolarity of the hemolymph of *L. stylirostris*. A linear regression (Sigma Stat) was used to describe the effect of salinity and temperature on hemolymph osmolarity. The values of the isosmotic points (where hemolymph osmolarity is equal to environmental osmolarity) were determined using Ferraris *et al.*'s (1986) formula. Osmoregulatory capacity in blue shrimp juveniles was calculated as the difference between osmolarity of the hemolymph and of the external medium (Lignot *et al.*, 2000).

Results

The rate of oxygen consumption in *L. stylirostris* juveniles maintained at 23°C ranged from 9.0 to 9.7 $\text{mg O}_2 \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1}$ d.w. at salinities of 10–25‰ and from 10.5 to 12.0 $\text{mg O}_2 \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1}$ d.w. at salinities of 30–40‰. In organisms acclimated at 28°C , the oxygen consumption rate was from 14.0 to 16.0 $\text{mg O}_2 \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1}$ d.w., while in those acclimated at 33°C , consumption increased 30–40% at salinities of 10–20‰ and decreased at salinities of 25–40‰ (fig. 1). The analysis of variance indicated that temperature had a significant effect ($P < 0.05$) on oxygen consumption in blue shrimp, but that salinity and the interaction between temperature and salinity was not significant ($P > 0.05$).

Resultados

La tasa de consumo de oxígeno en los juveniles de *L. stylirostris* mantenidos a 23°C y aclimatados a salinidades de 10 a 25‰ fue de 9.0 a 9.7 mg O₂ h⁻¹ g⁻¹ p.s., mientras que en los aclimatados de 30 a 40‰ el consumo se incrementó al intervalo de 10.5 a 12.0 mg O₂ h⁻¹ g⁻¹ p.s. En los organismos aclimatados a 28°C la tasa fue de 14.0 a 16.0 mg O₂ h⁻¹ g⁻¹ p.s. y en los expuestos a 33°C el consumo se incrementó del 30% al 40% en las salinidades de 10 a 20‰, y disminuyó en las de 25 a 40‰ (fig. 1). El análisis de varianza indicó que la temperatura ejerció un efecto significativo ($P < 0.05$) sobre el consumo de oxígeno del camarón azul, la salinidad y la interacción entre temperatura y salinidad no tuvieron efectos significativos ($P > 0.05$).

En el camarón azul *L. stylirostris* aclimatado a 23°C la tasa de excreción de amonio se incrementó a 10‰ de salinidad y disminuyó conforme ésta se aumentó, obteniéndose la tasa de excreción más baja (0.08 mg NH₄⁺ h⁻¹ g⁻¹ p.s.) a salinidades de 35 y 40‰. La tasa de excreción de los camarones mantenidos a 28°C se mantuvo constante con un intervalo de 0.21–0.27 mg NH₄⁺ h⁻¹ g⁻¹ p.s. En los organismos expuestos a 33°C la excreción de amonio se incrementó significativamente en un 350–380% a salinidades de 10–15‰, respecto a la excreción de organismos aclimatados a 23°C y 28°C. Al incrementarse la salinidad la tasa de excreción disminuyó hasta que, a 40‰ se alcanzó una tasa de 0.20 mg NH₄⁺ h⁻¹ g⁻¹ p.s (fig. 2). El análisis de varianza indicó que hubo un efecto significativo de la temperatura y la salinidad sobre la tasa de excreción de amonio ($P < 0.05$), pero el efecto de la interacción entre la temperatura y la salinidad no fue significativo.

En los juveniles aclimatados a 23°C, 28°C y 33°C la osmolaridad de la hemolinfa se relacionó de manera lineal con respecto a la del medio externo, obteniéndose las siguientes ecuaciones:

$$\text{MI a } 23^{\circ}\text{C} = 511.26 + (0.245 \times \text{ME}), r^2 = 0.93$$

$$\text{MI a } 28^{\circ}\text{C} = 546.47 + (0.170 \times \text{ME}), r^2 = 0.96$$

$$\text{MI a } 33^{\circ}\text{C} = 444.27 + (0.366 \times \text{ME}), r^2 = 0.85$$

donde MI es la osmolaridad de la hemolinfa de los camarones y ME es osmolaridad del medio externo. Cuando la salinidad del medio externo se incrementó de 10 a 20‰ (307–563 mmol kg⁻¹) la concentración de la hemolinfa de los camarones fue hiperosmótica con respecto al medio externo en un intervalo de 590 a 654 mmol kg⁻¹, en las salinidades de 25 a 40‰ (752–1186 mmol kg⁻¹) en los organismos mantenidos en 23°C y 28°C la osmolaridad de la hemolinfa fue hiposmótica (671–801 mmol kg⁻¹) con respecto a la del medio externo. Para los camarones aclimatados a 33°C la concentración osmótica de la hemolinfa en ese intervalo de salinidad tuvo un patrón hipoosmoconformador (fig. 3). El análisis de varianza indicó que la salinidad y la temperatura tuvieron un efecto significativo ($P < 0.05$) sobre la concentración osmótica de la hemolinfa de los camarones, así como la interacción entre la temperatura y la salinidad tuvieron un efecto significativo.

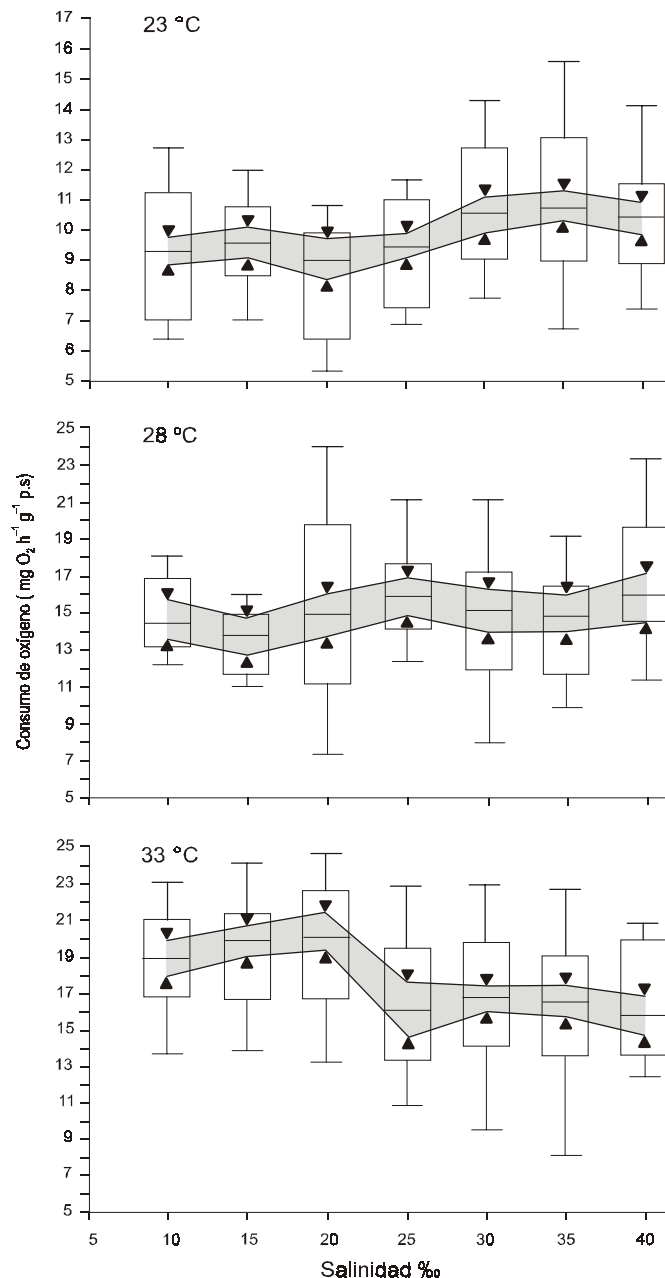


Figura 1. Consumo de oxígeno (mg O₂ h⁻¹ g⁻¹ p.s.) en *Litopenaeus stylirostris* aclimatados a 23°C, 28°C y 33°C y expuestos a diferentes salinidades. La zona sombreada limitada por los triángulos representa el intervalo de confianza de la mediana al 95%. En las barras se encuentra distribuido el 50% de los datos y las líneas representan los cuartiles.

Figure 1. Oxygen consumption (mg O₂ h⁻¹ g⁻¹ d.w.) in *Litopenaeus stylirostris* acclimated at 23°C, 28°C and 33°C, and exposed to different salinities. The shaded area limited by triangles represents the 95% confidence interval of the median; 50% of the data are distributed in the clear bars and the lines represent the quartiles.

In *L. stylirostris* acclimated at 23°C, the rate of ammonium excretion increased at 10‰ and decreased as salinity increased, with the lowest value of 0.08 mg NH₄⁺ h⁻¹ g⁻¹ d.w. at 35–40‰. The rate of excretion in blue shrimp maintained at 28°C

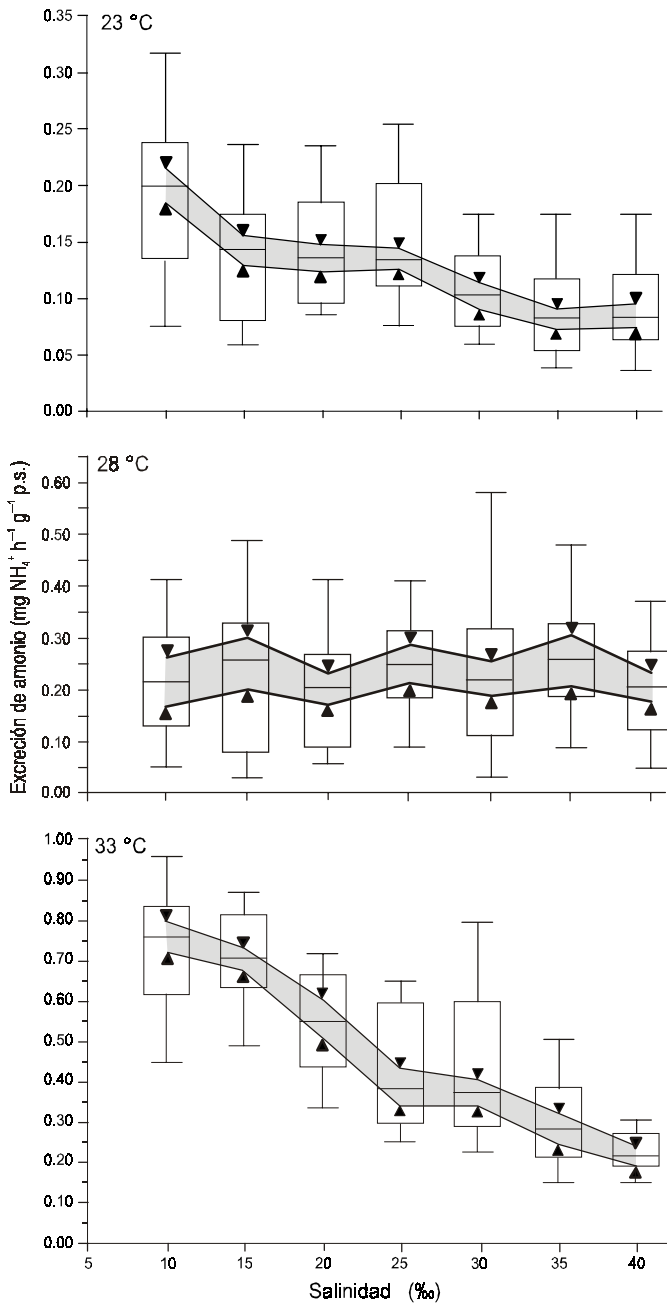


Figura 2. Excreción de amonio ($\text{mg NH}_4^+ \text{h}^{-1} \text{g}^{-1} \text{p.s.}$) en *Litopenaeus stylirostris* aclimatados a 23°C, 28°C y 33°C y expuesto a diferentes salinidades. La zona sombreada limitada por los triángulos representa el intervalo de confianza de la mediana al 95%. En las barras se encuentra distribuido el 50% de los datos y las líneas representan los cuartiles.

Figure 2. Ammonium excretion ($\text{mg NH}_4^+ \text{h}^{-1} \text{g}^{-1} \text{d.w.}$) in *Litopenaeus stylirostris* acclimated at 23°C, 28°C and 33°C, and exposed to different salinities. The shaded area limited by triangles represents the 95% confidence interval of the median; 50% of the data are distributed in the clear bars and the lines represent the quartiles

Los puntos isosmóticos obtenidos en los camarones expuestos a las diferentes salinidades tuvieron un intervalo de 676.8–700.7 mmol kg^{-1} (23.7–24.6‰). La temperatura de aclimatación no afectó significativamente ($P > 0.01$) los

remained constant, ranging from 0.21 to 0.27 $\text{mg NH}_4^+ \text{h}^{-1} \text{g}^{-1} \text{d.w.}$ In organisms exposed to 33°C, ammonium excretion increased significantly by 350–380% at salinities of 10–15‰ relative to that obtained for organisms acclimated at 23°C and 28°C; the rate of excretion decreased as salinity increased until a rate of 0.20 $\text{mg NH}_4^+ \text{h}^{-1} \text{g}^{-1} \text{d.w.}$ was obtained at 40‰ (fig. 2). The analysis of variance indicated a significant effect of temperature and salinity on the rate of ammonium excretion ($P < 0.05$), but the effect of the interaction between temperature and salinity was not significant.

In juveniles acclimated at 23°C, 28°C and 33°C, the osmolarity of the hemolymph was linearly related to that of the external medium. The following equations were obtained:

$$\text{MI at } 23^\circ\text{C} = 511.26 + (0.245 \times \text{ME}), r^2 = 0.93$$

$$\text{MI at } 28^\circ\text{C} = 546.47 + (0.170 \times \text{ME}), r^2 = 0.96$$

$$\text{MI at } 33^\circ\text{C} = 444.27 + (0.366 \times \text{ME}), r^2 = 0.85$$

where MI is the osmolarity of the shrimp hemolymph and ME the osmolarity of the external medium. When salinity of the external medium increased from 10 to 20‰ (307–563 mmol kg^{-1}) the concentration of the hemolymph was hyperosmotic relative to the external medium, ranging from 590 to 654 mmol kg^{-1} . At salinities of 25–40‰ (752–1186 mmol kg^{-1}) the osmolarity of the hemolymph in organisms maintained at 23°C and 28°C was hypo-osmotic (671–801 mmol kg^{-1}) relative to the external medium. For shrimp acclimated at 33°C, the osmotic concentration of the hemolymph in that salinity range had a hypo-osmoconformer pattern (fig. 3). The analysis of variance indicated that salinity and temperature had a significant effect ($P < 0.05$) on the osmotic concentration of the hemolymph, and that the interaction between temperature and salinity also had a significant effect.

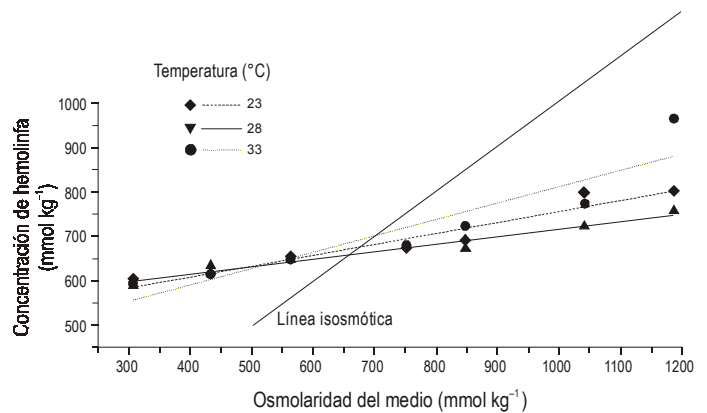


Figura 3. Relación entre la osmolaridad de la hemolinfa y la osmolaridad del medio de *Litopenaeus stylirostris* expuesto a diferentes combinaciones de temperatura y salinidad.

Figure 3. Relation between osmolarity of the hemolymph and osmolarity of the external medium of *Litopenaeus stylirostris* exposed to different combinations of temperature and salinity.

valores de los puntos isosmóticos de los organismos expuestos a las diferentes salinidades.

En los juveniles del camarón azul la capacidad osmorreguladora fue modificada significativamente por la salinidad ($P < 0.05$) de hiper a hiposmótica, ya que en las salinidades de 10–20‰ tuvo un intervalo de 306 a 10, en tanto que en las salinidades de 25–40‰ fue de –22 a –459 (fig. 4). La temperatura afectó de manera significativa ($P < 0.05$) la capacidad osmorreguladora de los organismos particularmente en los aclimatados a 33°C.

Discusión

La tasa respiratoria de los crustáceos es modificada por factores externos como la salinidad, la intensidad luminosa, el oxígeno disuelto y la temperatura (Kutty *et al.*, 1971; Bishop *et al.*, 1980; Dalla-Via, 1986; Kurmaly *et al.*, 1989; Martínez-Palacios *et al.*, 1996). En los juveniles de *L. stylirostris* se obtuvo una relación directa entre la tasa de consumo de oxígeno y la temperatura. Esta misma respuesta fue obtenida por Kutty *et al.* (1971) en *Penaeus indicus*, en *P. monodon* por Kurmaly *et al.* (1989), por Chen y Lai (1993) en *P. japonicus*, por Villarreal y Ocampo (1993) en *P. californiensis* (Holmes) y por Martínez-Palacios *et al.* (1996) en *P. vannamei*. Los camarones que se mantuvieron a 28°C tuvieron una tasa metabólica constante en todo el intervalo de salinidades utilizadas. Venkataramiah *et al.* (1974) han enfatizado que la respiración no puede ser considerada como un buen índice de la tolerancia a la salinidad salvo en casos donde la temperatura experimental corresponda a las características naturales del hábitat de los organismos. La temperatura preferida por el camarón azul, determinada por Re *et al.* (2000), es de 28°C y además está dentro del intervalo medio de temperatura de su ambiente natural, de modo que la respiración puede ser indicativa de tolerancia a la salinidad.

El consumo de oxígeno del camarón azul no se vio afectado por la salinidad. Se ha demostrado para otros decápodos eurihalinos que la salinidad no tiene un efecto pronunciado sobre el consumo de oxígeno si los organismos experimentales son aclimatados a las salinidades de prueba y si éstas no son extremas (Bishop *et al.*, 1980; Gaudy y Sloane, 1981; Díaz-Herrera *et al.*, 1992; Villarreal y Rivera, 1993; Salvato *et al.*, 2001). En los juveniles de *L. stylirostris* el tiempo de aclimatación a cada condición de salinidad fue el suficiente para estabilizar su medio interno (Castille y Lawrence, 1981). Asimismo, el intervalo de salinidades utilizado corresponde a las fluctuaciones naturales a las que la especie está expuesta (Aragón, 2000).

Kinne (1967) describió cuatro tipos de respuesta metabólica en organismos acuáticos que han sido aclimatados a una nueva salinidad: (1) La tasa de consumo de oxígeno no es influenciada por los cambios de salinidad; (2) la tasa metabólica de los organismos se incrementa en salinidades reducidas y disminuye en salinidades altas; (3) la tasa metabólica se incrementa tanto en bajas como en altas salinidades; y (4) la tasa de consumo de oxígeno disminuye tanto en bajas como en altas

The isosmotic points obtained for blue shrimp exposed to different salinities ranged from 676.8 to 700.7 mmol kg⁻¹ (23.7–24.6‰). Acclimation temperature did not significantly affect ($P > 0.01$) the values of the isosmotic points of the organisms exposed to different salinities.

In shrimp juveniles the osmoregulatory capacity was significantly modified by salinity ($P < 0.05$) from hyper- to hypo-osmotic, with a range of 306 to 10 at salinities of 10–20‰ and of –22 to –459 at salinities of 25–40‰ (fig. 4). Temperature had a significant affect ($P < 0.05$) on the osmoregulatory capacity of the organisms, particularly those exposed to 33°C.

Discussion

The respiratory rate of crustaceans is modified by external factors such as salinity, light intensity, dissolved oxygen and temperature (Kutty *et al.*, 1971; Bishop *et al.*, 1980; Dalla-Via, 1986; Kurmaly *et al.*, 1989; Martínez-Palacios *et al.*, 1996). In *L. stylirostris* juveniles a direct relationship was obtained between the rate of oxygen consumption and temperature. This same response was obtained by Kutty *et al.* (1971) for *Penaeus indicus*, by Kurmaly *et al.* (1989) for *P. monodon*, by Chen and Lai (1993) for *P. japonicus*, by Villarreal and Ocampo (1993) for *P. californiensis* (Holmes) and by Martínez-Palacios *et al.* (1996) for *P. vannamei*. Shrimp kept at 28°C had a steady metabolic rate throughout the range of salinities used. Venkataramiah *et al.* (1974) have stressed that respiration cannot be considered a good index of salinity tolerance except in cases where experimental temperature corresponds to natural characteristics of the organisms' habitat. For the blue shrimp, the preferred temperature determined by Re *et al.* (2000) is 28°C, which is also within the mean temperature range of its natural environment; hence, respiration can be indicative of salinity tolerance.

Oxygen consumption of blue shrimp was not affected by salinity. In other euryhaline decapods salinity was not found to significantly affect oxygen consumption if the experimental organisms were acclimated to the test salinities and if these were not extreme (Bishop *et al.*, 1980; Gaudy and Sloane, 1981; Díaz-Herrera *et al.*, 1992; Villarreal and Rivera, 1993; Salvato *et al.*, 2001). For *L. stylirostris* juveniles, the time of acclimation to each salinity condition was sufficient for them to stabilize their internal medium (Castille and Lawrence, 1981); moreover, the range of salinities used corresponds to the natural fluctuations to which the species is exposed (Aragón, 2000).

Kinne (1967) described four types of metabolic response in aquatic organisms exposed to a new salinity: (1) the rate of oxygen consumption is not influenced by changes in salinity, (2) the metabolic rate of the organisms increases in reduced salinities and decreases in high salinities, (3) the metabolic rate increases in both low and high salinities, and (4) the rate of oxygen consumption decreases in both low and high salinities. The blue shrimp exhibited type 1 response because oxygen consumption was not significantly modified in those organisms

salinidades. El camarón azul exhibió la respuesta tipo 1, ya que el consumo de oxígeno no se modificó significativamente en los organismos mantenidos en 28°C, al ser expuestos a las diferentes salinidades. En los organismos aclimatados a 23°C y 33°C se obtuvo una tendencia no significativa a incrementar su metabolismo en altas y bajas salinidades.

La tasa de excreción nitrogenada cuantificada en *L. stylirostris* se incrementó al exponerlo a las diferentes temperaturas de aclimatación, respuesta que ha sido descrita en otros crustáceos (Spaargaren *et al.*, 1982; Chen y Lai, 1993; Jiang *et al.*, 2000).

En peneidos como *P. japonicus*, *F. chinensis*, *P. monodon*, *F. aztecus* y *L. vannamei*, se ha reportado un incremento de la excreción nitrogenada cuando se disminuye la salinidad (Spaargaren *et al.*, 1982; Chen y Lin, 1992; Chen y Lai, 1993; Chen *et al.*, 1994; Hernández y Díaz 1995; Jiang *et al.*, 2000; Díaz *et al.*, 2001). En este estudio la tasa de excreción de amonio en los camarones aclimatados a 23°C y 33°C se incrementó cuando la salinidad se disminuyó de 40 a 10‰. Esta respuesta posiblemente está relacionada con un incremento en el catabolismo de los aminoácidos ya que, de acuerdo con Chen (1998), los camarones, en bajas salinidades, utilizan proteínas como fuente primaria para la obtención de energía.

En los juveniles de camarón azul expuestos a las diferentes salinidades la tasa de excreción de amonio se relacionó con los procesos de osmorregulación, ya que la excreción se incrementó cuando los camarones fueron hiper-reguladores y disminuyó cuando hiporegularon. Mangum *et al.* (1976) y Pressley *et al.* (1981) demostraron que, después de la transferencia de los organismos a medios diluidos, hay un incremento en la captación activa de Na⁺, lo que fue relacionado con un incremento en la excreción de amonio. La absorción de sodio es requerida para compensar su pérdida debido a la operación de la bomba de intercambio Na⁺/NH₄⁺. Estos mecanismos fueron utilizados por los camarones para balancear la concentración osmótica de la hemolinfa al ser expuestos a medios hiperosmóticos.

El patrón de osmorregulación de los juveniles del camarón azul *L. stylirostris* obtenido fue el típico de muchos crustáceos que habitan en sistemas lagunares estuarinos, fueron hiporeguladores e hiperreguladores en salinidades por arriba y por debajo del punto isosmótico respectivamente (Vernberg y Vernberg, 1972; Mantel y Farmer, 1983).

Los puntos isosmóticos para los juveniles del camarón azul aclimatados a las tres temperaturas tuvieron un intervalo de 676.8–700.7 mmol kg⁻¹ (23.7–24.6‰). Estos valores están dentro del intervalo de puntos isosmóticos reportados para diferentes especies de peneidos (Díaz *et al.*, 2001), y son mayores que los reportados por Rodríguez (1981) y Castille y Lawrence (1981) de 610 y 680 mmol kg⁻¹, respectivamente, y menores al reportado por Lemaire *et al.* (2002), de 735 mmol kg⁻¹ para el camarón azul. Las diferencias se pueden atribuir a las diferentes condiciones experimentales utilizadas en estos estudios, ya que se conoce que factores como el estadio del ciclo de muda, el tamaño de los organismos y el estado

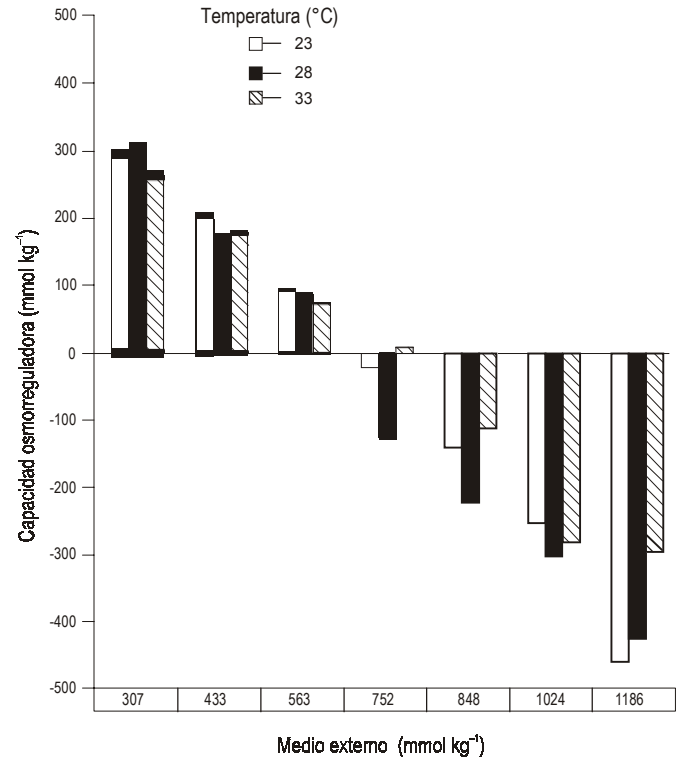


Figura 4. Capacidad osmorreguladora del camarón azul *Litopenaeus stylirostris* aclimatado a 23°C, 28°C y 33°C y a diferentes salinidades.
Figure 4. Osmoregulatory capacity of blue shrimp *Litopenaeus stylirostris* acclimated at 23°C, 28°C and 33°C and at different salinities.

kept at 28°C and exposed to different salinities; a non-significant trend was obtained for those organisms acclimated at 23°C and 33°C, their metabolism increasing in high and low salinities.

The ammonium excretion rate quantified in *L. stylirostris* increased on exposure to different acclimation temperatures. This response has been described for other crustaceans (Spaargaren *et al.*, 1982; Chen and Lai, 1993; Jiang *et al.*, 2000).

Nitrogenated excretion has been found to increase in *P. japonicus*, *F. chinensis*, *P. monodon*, *F. aztecus* and *L. vannamei* when salinity decreases (Spaargaren *et al.*, 1982; Chen and Lin, 1992; Chen and Lai, 1993; Chen *et al.*, 1994; Hernández and Díaz 1995; Jiang *et al.*, 2000; Díaz *et al.*, 2001). In this study, the rate of ammonium excretion in shrimp acclimated at 23°C and 33°C increased when salinity decreased from 40 to 10‰; this response may be related to an increase in the catabolism of the amino acids because, according to Chen (1998), shrimp at low salinities use proteins as the main source of energy.

In blue shrimp juveniles exposed to different salinities the rate of ammonium excretion was associated with osmoregulatory processes, since excretion increased when the shrimp were hyper-regulators and decreased when they were hypo-regulators. Mangum *et al.* (1976) and Pressley *et al.* (1981)

nutricional tiene una influencia sobre la osmolaridad de la hemolinfa.

Los valores de las pendientes de la relación entre la concentración osmótica del medio y de la hemolinfa de los juveniles del camarón azul aclimatados a 23°C, 28°C y 33°C y expuestos a las diferentes salinidades fueron 0.25, 0.17 y 0.37, respectivamente. Una desviación de la pendiente de la línea isosmótica refleja el grado de la capacidad de regulación (pendiente = 0 osmorregulador, pendiente = 1 osmoconformador). Organismos con pendientes altas, como los mantenidos a 23°C y 33°C, tuvieron una regulación hiperosmótica débil. El valor de la pendiente para los organismos mantenidos a 28°C reflejó que, en tal condición, los camarones pueden caracterizarse como fuertes reguladores.

Se recomienda que para optimizar el cultivo del camarón azul en condiciones controladas, éste se haga a temperaturas alrededor de 28°C y, dado que la salinidad no ha sido determinada experimentalmente, nosotros proponemos que 25‰ se considere como la óptima para esta especie, ya que esta salinidad corresponde con el punto isosmótico determinado para el camarón azul que, de acuerdo con Pannikar (1968), en estas condiciones los camarones gastarían menos energía en el mantenimiento del gradiente osmótico y, por lo tanto, el crecimiento de los organismos se incrementará al estar en un ambiente libre de estrés ambiental.

Agradecimientos

Agradecemos a la granja de producción El Camarón Dorado, ubicada en Sonora, Mexico, la donación de los ejemplares utilizados en esta investigación; a SIMAC-CONACYT el apoyo económico dado a los proyectos 980111106004 y 200017509; y a José M. Domínguez y Francisco Javier Ponce, del Departamento de Dibujo de CICESE, la elaboración del material gráfico.

Referencias

- Aragón, N.E.A. (2000). Ecología del reclutamiento del camarón azul *Litopenaeus stylirostris* (Stimpson, 1871) en el alto Golfo de California. Tesis doctoral, CICESE, Ensenada, Baja California, México, 117 pp.
- Bishop, J.M., Gosselink, J.G. and Stone, J.H. (1980). Oxygen consumption and hemolymph osmolarity of brown shrimp *Penaeus aztecus*. Fish. Bull., 78: 741–757.
- Bray, W.A., Lawrence, A.L. and Leung-Trujillo, J.R. (1994). The effect of salinity on growth and survival of *Penaeus vannamei*, with observations on the interaction of IHNV virus and salinity. Aquaculture, 122: 133–146.
- Brito, R., Chimal, M.E. and Rosas, C. (2000). Effect of salinity in survival, growth and osmotic capacity in early juveniles of *Farfantepenaeus brasiliensis* (Decapoda: Penaeidae). J. Exp. Mar. Biol. Ecol., 244: 252–263.
- Castille, F.L. Jr. and Lawrence, A.L. (1981). The effect of salinity on the osmotic, sodium and chloride concentrations in the hemolymph of euryhaline shrimp of the genus *Penaeus*. Comp. Biochem. Physiol., 68A: 75–80.

have reported an increase in the active capture of Na⁺ following the transfer of organisms to diluted media, and this was related to an increase in ammonium excretion. The absorption of sodium is necessary to compensate its loss due to the operation of the Na⁺/NH₄⁺ exchange pump. These mechanisms were used by shrimp to balance the osmotic concentration of the hemolymph when exposed to hyper-osmotic media.

The osmoregulatory pattern of *L. stylirostris* juveniles obtained was typical of many crustaceans that inhabit lagoon-estuarine systems: they were hypo-regulators and hyper-regulators in salinities above and below the isosmotic point, respectively (Vernberg and Vernberg, 1972; Mantel and Farmer, 1983).

The isosmotic points for blue shrimp juveniles acclimated at three temperatures ranged from 676.8 to 700.7 mmol kg⁻¹ (23.7–24.6‰). These values are within the range of isosmotic points reported for different penaeid species (Díaz *et al.*, 2001). They are higher than those reported by Rodríguez (1981) and Castille and Lawrence (1981) of 610 and 680 mmol kg⁻¹, respectively, and lower than those reported by Lemaire *et al.* (2002) of 735 mmol kg⁻¹ for blue shrimp. The differences can be attributed to the different experimental conditions used in these studies, considering that factors such as the molt cycle stage, organism size and nutritional state influence the osmolarity of the hemolymph.

The slope values of the relation between the osmotic concentration of the external medium and the hemolymph of blue shrimp juveniles acclimated at 23°C, 28°C and 33°C and exposed to different salinities were 0.25, 0.17 and 0.37, respectively. A deviation of the slope of the isosmotic line reflects the degree of regulatory capacity (slope = 0, osmoregulator; slope = 1, osmoconformer); organisms with high slopes like those maintained at 23°C and 33°C had a weak hyperosmotic regulation. The value of the slope for organisms kept at 28°C indicated that shrimp can be characterized as strong regulators in this condition.

To optimize the culture of blue shrimp under controlled conditions, we recommend that temperatures of around 28°C be used. Also, as salinity has not been experimentally determined, we suggest that 25‰ be considered optimum for this species because it corresponds to the isosmotic point determined for blue shrimp and, according to Pannikar (1968), in this condition shrimp expend less energy on maintaining the osmotic gradient and, therefore, growth will increase since the organisms will be in a stress-free environment.

Acknowledgements

We thank the El Camarón Dorado farm in Sonora, Mexico, for donating the specimens used in this research; SIMAC-CONACYT for financial support of projects 980111106004 and 200017509; and José M. Domínguez and Francisco Javier Ponce (Graphics Department, CICESE) for preparing the figures.

English translation by Christine Harris.

- Chen, H.Y. (1998). Nutritional requirements of the black tiger shrimp: *Penaeus monodon*. Rev. Fish. Sci., 6: 79–80.
- Chen, J.C. and Lin, C.Y. (1992). Oxygen consumption and ammonia-N excretion of *Penaeus chinensis* juveniles exposed to ambient ammonia at different salinity levels. Comp. Biochem. Physiol., 102C: 287–291.
- Chen, J.C. and Lai, S.H. (1993). Effects of temperature and salinity on oxygen consumption and ammonia-N excretion of juvenile *Penaeus japonicus* Bate. J. Exp. Mar. Biol. Ecol., 165: 161–170.
- Chen, J.C. and Nan, F.H. (1993). Changes of oxygen consumption and ammonia-N excretion by *Penaeus chinensis* Osbeck at different temperature and salinity levels. J. Crust. Biol., 13: 706–712.
- Chen, J.C. and Lin, C.Y. (1995). Responses of oxygen consumption, ammonia-N excretion and urea-N excretion of *Penaeus chinensis* exposed to ambient ammonia at different salinity and pH levels. Aquaculture, 136: 243–255.
- Chen, J.C. and Nan, F.H. (1994). Comparisons of oxygen consumption and ammonia-N excretion of five penaeids. J. Crust. Biol., 14: 289–294.
- Chen, J.C., Chen, C.T. and Cheng, S.Y. (1994). Nitrogen excretion and changes of hemocyanin, protein and free amino acid level in the hemolymph of *Penaeus monodon* exposed at different concentrations of ambient ammonia-N at different salinity levels. Mar. Ecol. Prog. Ser., 110: 85–94.
- Claybrook, D.L. (1983). Nitrogen metabolism. In: L.H. Mantel (ed.), The Biology of Crustacea: Internal Anatomy and Physiology Regulation. Vol. 5. Academic Press, New York, pp. 163–213.
- Coman, G.J., Crocos, P.J., Preston, N.P. and Fielder, D. (2002). The effects of temperature on the growth, survival and biomass of different families of juvenile *Penaeus japonicus* Bate. Aquaculture, 214: 185–199.
- Dalla-Via, G.J. (1986). Salinity responses of the juvenile penaeid shrimp *Penaeus japonicus*. I. Oxygen consumption and estimations of productivity. Aquaculture, 55: 297–306.
- Díaz, F., Espina, S., Rosas, C., Sánchez, A., Vanegas, C. y Díaz-Iglesias, E. (1989). Ritmo respiratorio y amplitud metabólica del camarón café *Penaeus aztecus* con ablación de los pedúnculos oculares. Rev. Invest. Mar., X: 27–39.
- Díaz-Herrera, F., Pérez-Cruz, E., Luna-Figueroa, J., Tapia-Gamas, A. and Rosas-Vázquez, C. (1992). Oxygen consumption, ammonia excretion and osmoregulation of *Callinectes similis* juveniles (Crustacea: Portunidae) exposed to fluctuating salinities. Cienc. Mar., 18: 93–104.
- Díaz, F., Farfán, C., Sierra, E. and Re, A.D. (2001). Effects of temperature and salinity fluctuation on the ammonium excretion and osmoregulation of juveniles of *Penaeus vannamei*, Boone. Mar. Freshwat. Behav. Physiol., 34: 93–104.
- Ferraris, R.P., Parado-Esteva, F.E., Ladja, J.M. and De Jesús, E.G. (1986). Effect of salinity on the osmotic, chloride total protein and calcium concentrations in the hemolymph of the prawn *Penaeus monodon* (Fabricius). Comp. Biochem. Physiol., 83A: 701–708.
- Gaudy, R. and Sloane, L. (1981). Effect of salinity on oxygen consumption in postlarvae of the penaeid shrimps *Penaeus monodon* and *P. stylirostris* without and with acclimation. Mar. Biol., 65: 297–301.
- Gerhardt, H.V. (1980). Nitrogen excretion by juvenile prawn *Penaeus indicus* Milne Edwards at various temperatures. S. Afr. J. Sci., 76: 39–40.
- Hernández, R.M. y Díaz, H.F. (1995). Interacción de la temperatura y la salinidad sobre la excreción de amonio y osmorregulación en *Penaeus aztecus* (Crustácea, Penaeidae). Caribb. J. Sci., 31: 284–288.
- Huner, J.V. and Colvin, L.B. (1979). Observation of the molt cycles of two species of juvenile shrimp *Penaeus californiensis* and *Penaeus stylirostris* (Decapoda: Crustacea). Proc. Nat. Shell. Assoc., 69: 77–84.
- Jiang, D.H., Lawrence, A.L., Neill, W.H. and Gong, H. (2000). Effects of temperature and salinity on nitrogen excretion by *Litopenaeus vannamei* juveniles. J. Exp. Mar. Biol. Ecol., 253: 193–209.
- Kinne, O. (1967). Physiology of estuarine organisms with special reference to salinity and temperature. In: G.H. Lauff (ed.), Estuaries. AAAS Publ. No. 53, Washington, DC, pp. 525–540.
- Kumlu, M., Eroldogan, O.T., Aktas, M. and Sařlamtimur, B. (2001). Larval growth, survival and development of *Metapenaeus monodon* (Fabricius) cultured in different salinities. Aquacult. Res., 32: 81–86.
- Kurmaly, K., Yule, A. and Jones, D.A. (1989). Effects of body size and temperatures on the metabolic rate of *Penaeus monodon*. Mar. Biol., 103: 25–30.
- Kutty, M.N., Murugapopathy, G. and Krishnan, T.S. (1971). Influence of salinity and temperature on oxygen consumption in young juveniles of the Indian prawn *Penaeus indicus*. Mar. Biol., 11: 125–131.
- Lemaire, P., Bernard, E., Martinez-Paz, J.A. and Chim, L. (2002). Combined effect of temperature and salinity on osmoregulation of juvenile and subadult *Penaeus stylirostris*. Aquaculture, 209: 307–317.
- Lignot, J.H., Cochrad, J.C., Soyez, C., Lemaire, P. and Charmantier, G. (1999). Osmoregulatory capacity according to nutritional status, molt stage and body weight in *Penaeus stylirostris*. Aquaculture, 170: 79–92.
- Lignot, J.H., Spaniengs-Pierrot, C. and Charmantier, G. (2000). Osmoregulatory capacity as a tool in monitoring the physiological condition and the effect of stress in crustaceans. Aquaculture, 191: 209–245.
- Mangum, C.P., Silverthorn, S.V., Harris, J.L., Towle, D.W. and Krall, A.R. (1976). The relationship between blood pH, ammonia excretion and adaptation to low salinity in the blue crab *Callinectes sapidus*. J. Exp. Zool., 195: 129–136.
- Mantel, L.H. and Farmer, L.L. (1983) Osmotic and Ionic Teguulation. The Biology of Crustacea. Vol. 5. Academic Press, New York, pp. 53–161.
- Martínez-Palacios, C.A., Ross, G.L. and Jiménez, V.L. (1996). The effect of temperature and body weight on the oxygen consumption of *Penaeus vannamei*, Boone, 1931. J. Aquacult. Trop., 11: 59–65.
- Needham, A.E. (1957). Factors affecting nitrogen excretion in *Carcinus maenas*. Physiol. Comp. Oecol., 4: 209–239.
- Pannikar, N.K. (1968). Osmotic behaviour of shrimps and prawns in relation to their biology and culture. FAO Fish. Rep., 57: 527–538.
- Péqueux, A. (1995). Osmotic regulation in crustaceans. J. Crust. Biol., 15: 1–60.
- Ponce-Palafox, J., Martínez-Palacios, C.A. and Ross, G.L. (1997). The effects of salinity and temperature on the growth and survival rates of juvenile white shrimp *Penaeus vannamei* Boone, 1931. Aquaculture, 157: 107–115.
- Pressley, T.A., Graves, J.S. and Krall, A.R. (1981). Amiloride sensitive ammonium and sodium ion transport in the blue crab. Am. J. Physiol., 241: 370–378.
- Re, A.D., Díaz, F., Sierra, E., Aguilar, M. y Granados, A. (2000). Efecto de la salinidad sobre la temperatura preferida y la tolerancia térmica de *Litopenaeus stylirostris*. Stimpson. 5to Congreso de Ciencias del Mar, Marcuba 2000. Resumen. 36 pp.
- Regnault, M. (1987). Nitrogen excretion in marine and freshwater crustacea. Biol. Rev., 62: 1–24.
- Rodier, J. (1981). Análisis de las aguas: Aguas naturales, aguas residuales y agua de mar. Omega, Barcelona, pp. 134–138.
- Rodríguez, G.A. (1981). Osmoregulation and total serum proteins of two species of penaeidean shrimps from the Pacific coast of Mexico. J. Crust. Biol., 1: 392–400.

- Rosas, C., Ocampo, L., Gaxiola, G., Sánchez, A. and Soto, L.A. (1999). Effect of salinity on survival, growth and oxygen consumption of postlarvae (PL10-PL21) of *Litopenaeus setiferus*. *J. Crust. Biol.*, 19: 244–251.
- Rosas, C., López, N., Mercado, P. and Martínez, E. (2001). Effect of salinity acclimation on oxygen consumption of juvenile of the white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *J. Crust. Biol.*, 21: 912–922.
- Salvato, B., Cuomo, V., Di Muro, P. and Beltramini, M. (2001). Effects of environmental parameters on the oxygen consumption of four marine invertebrates: A comparative factorial study. *Mar. Biol.*, 138: 659–668.
- Spaargaren, D.H., Richard, P. and Ceccaldi, H.J. (1982). Excretion of nitrogenous products by *Penaeus japonicus* in relation to environmental osmotic conditions. *Comp. Biochem. Physiol.*, 72A: 673–678.
- Stern, S., Borut, A. and Cohen, D. (1984). The effect of salinity and ion composition on oxygen consumption and nitrogen excretion of *Macrobrachium rosenbergii* (De Man). *Comp. Biochem. Physiol.*, 79A: 271–274.
- Tukey, J.W. (1977). *Exploratory Data Analysis*. Addison-Wesley, Massachusetts, 688 pp.
- Venkataramiah, A., Lakshmi, G.J. and Gunter, G. (1974). Studies on the effects of salinity and temperature on the commercial shrimp, *Penaeus aztecus* Ives, with special regard to survival limits growth, oxygen consumption and ionic regulation. Gulf Coast Research Lab., Ocean Springs, Mississippi. 134 pp.
- Vernberg, B.W. and Vernberg, F.J. (1972). *Environmental Physiology of Marine Animals*. Springer-Verlag, New York, 346 pp.
- Villarreal, H. and Ocampo, L. (1993). Effect of size and temperature on the oxygen consumption of the brown shrimp *Penaeus californiensis* (Holmes, 1900). *Comp. Biochem. Physiol.*, 106A: 97–101.
- Villarreal, H. and Rivera, J.A. (1993). Effect of temperature and salinity on the oxygen consumption of laboratory produced *Penaeus californiensis* postlarvae. *Comp. Biochem. Physiol.*, 106A: 103–107.
- Villarreal, H., Hinojosa, P. and Naranjo, J. (1994). Effect of temperature and salinity on the oxygen consumption of laboratory produced *Penaeus vannamei* postlarvae. *Comp. Biochem. Physiol.*, 108A: 331–336.
- Villarreal, H., Hernández-Llamas, A. and Hewitt, R. (2003). Effect of salinity on growth, survival and oxygen consumption of juvenile brown shrimp *Farfantepenaeus californiensis* (Holmes). *Aquacult. Res.*, 34: 187–193.
- Williams, A.B. (1960). The influence of temperature on osmotic regulation in two species of estuarine shrimps (*Penaeus*). *Biol. Bull.*, 119: 560–571.
- Wyban, J., Walsh, W.A. and Godin, D.M. (1995). Temperature effects on growth, feeding rate and feed conversion of the Pacific white shrimp (*Penaeus vannamei*). *Aquaculture*, 138: 267–279.
- Zein-Eldin, Z.P. and Aldrich, D.V. (1965). Growth and survival of postlarval *Penaeus aztecus* under controlled conditions of temperature and salinity. *Biol. Bull.*, 129: 199–216.