

Effect of temperature and salinity on larval survival and development of *Litopenaeus vannamei*

Efecto de temperatura y salinidad sobre la supervivencia y desarrollo larval de *Litopenaeus vannamei*

José Bermudes-Lizárraga¹ M.Sc, Mario Nieves-Soto^{1,2} Ph.D,
Alejandra Medina-Jasso² M.Sc, Pablo Piña-Valdez^{1,2*} Ph.D.

¹Universidad Autónoma de Sinaloa, Programa de Doctorado en Ciencias en Recursos Acuáticos. Facultad de Ciencias del Mar. Av. de los Deportes s/n. Ap. Postal 82146. Mazatlán, Sinaloa, México.

²Universidad Autónoma de Sinaloa, Facultad de Ciencias del Mar. Av. Paseo Claussen s/n. Ap. Postal 610. Mazatlán, Sinaloa, México. *Correspondencia: pablopina@live.com.mx

Received: March 2016; Accepted: December 2016.

ABSTRACT

Objective. The combined effect of salinity (25, 30, 35, and 40psu) and temperature (25, 30, and 35°C) was evaluated on survival and development from nauplii V (NV) larvae until postlarvae (PL1) of *Litopenaeus vannamei*. **Materials and methods.** Four replicates were applied to each combination of salinity and temperature. The larvae were placed in 12 L beakers a density of 100larvae/L. Salinity was increased dissolving commercial salt without iodine, into marine water, whereas fresh filtered tap water was used to decrease the salinity from seawater. The NV were adapted at 35psu and 30°C during 30 minutes. Thereafter, were transferred at each experimental combination of salinity and temperature. Every 24 h, samples of larvae were obtained to determine in vivo their stage of development and survival. All data were analyzed using a two-way ANOVA. **Results.** Survival and larval development were significantly ($p<0.05$) affected by salinity, temperature and interaction of both factors. Maximum ultimate survival to PL1 was obtained at 30°C and 30psu (82.2%) followed by 30 and 35°C at 25psu (71.5 y 71.6%). The highest development at PL1 was found at 30°C and 30psu (6.76). Larval development during experiment was lower at 25°C as compared to 30 and 35°C, regardless of the salinity levels. **Conclusions.** The most adequate conditions for survival and larval development were obtained between 30-35°C and 25-30psu.

Keywords: Aquatic environment, crustacea, larvae, saline waters (Source: DeCS).

RESUMEN

Objetivo. Analizar el efecto combinado de salinidad (25, 30, 35 y 40 ups) y temperatura (25, 30 y 35°C) sobre la supervivencia y el desarrollo de larvas nauplio V (NV) hasta postlarvas (PL1) de *Litopenaeus vannamei*. **Materiales y métodos.** Los experimentos se realizaron por cuadruplicado por cada combinación de salinidad y temperatura. Las larvas se mantuvieron en acuarios de 12 L a una densidad de 100larvas/L. La salinidad se incrementó disolviendo sal granulada libre de yodo, a partir de agua de mar, mientras que para alcanzar las salinidades menores se utilizó agua dulce filtrada. Los NV aclimatados a 35ups y 30°C durante 30 minutos fueron transferidos a cada combinación experimental de salinidad y temperatura. Cada 24 h, se obtuvieron muestras de larvas para determinar in vivo su etapa de desarrollo y supervivencia. Los datos fueron analizados por un ANOVA de dos vías. **Resultados.** La supervivencia y el desarrollo larval fueron significativamente afectadas por la

salinidad, temperatura y su interacción ($p < 0.05$). La máxima supervivencia final a PL1 se obtuvo a 30°C y 30ups (82.2%), seguido por 30 y 35°C a 25ups (71.5 y 71.6%). El desarrollo más alto a PL1 fue encontrado a 30°C y 30ups (6.76). El desarrollo larval durante el experimento fue más bajo a 25°C en comparación con 30 y 35°C, independientemente de los niveles de salinidad. **Conclusiones.** Las condiciones más adecuadas para la supervivencia y desarrollo larval se obtuvieron entre 30-35°C y 25-30ups.

Palabras clave: Ambiente acuático, crustáceos, larva, salinidad del agua (*Fuente: DeCS*).

INTRODUCTION

Salinity and temperature variations, in addition to other environmental factors in an aquatic environment, trigger adaptive responses that impact various physiological functions, with an impact on the development, growth and survival of organisms, including shrimp (1-3). Therefore, aquaculture is highly interested in determining the appropriate levels of salinity and temperature for each commercially important shrimp species, especially in larvae or penaeidae, wherein optimum condition studies on these factors have been restricted to only a few species.

Some research studies on penaeidae have found that salinity has a greater influence than temperature on survival during the early larval stages (5,6). Other studies state that salinity and temperature, in addition to various other factors present in water, have an impact on the survival and development of shrimp larvae and post-larvae (7,8). However, some authors state that proper nutrition during the early stages of shrimp larvae favors development, growth and survival (9,10), in addition to resistance to various salinity and temperature conditions during the post-larva stage, when they are moved and planted in shrimp farm tanks.

Conventionally, *Litopenaeus vannamei* larvae breeding (Boone 1931) has generally been done using saltwater (12,13), given that penaeidae larval stages have little tolerance to changes in high and low salinity (6).

L. vannamei is commonly known as the White Pacific Shrimp, it is a species from the Eastern Pacific Ocean and one of most euryhaline among penaeidae, it is spread out from the coasts of the Gulf of California in Mexico to Peru in South America, it has a high commercial value, and it is the most important species for shrimp breeding in Latin America, commonly bred in Mexico (7,14)

At this point, there is little information on the survival of larvae (nauplius, zoea and mysis) of this species and its tolerance to abrupt changes in high and low salinity in commercial post-larva laboratories in northeast Mexico (6). Furthermore, the effect of different temperatures

INTRODUCCIÓN

Las variaciones de salinidad y temperatura, así como de otros factores ambientales en el medio acuático, desatan respuestas adaptativas que impactan diferentes funciones fisiológicas, afectando el desarrollo, crecimiento y supervivencia de los organismos, incluyendo el camarón (1-3). Por tanto, en la acuicultura hay un gran interés por determinar los niveles adecuados de salinidad y temperatura para cada especie de camarón de importancia comercial, sobre todo en sistemas de producción intensivo o de larvas de peneidos, en los cuales los estudios de condiciones óptimas de estos factores se han restringido a pocas especies (4,5).

En algunas investigaciones sobre peneidos han encontrado que la salinidad tiene mayor influencia que la temperatura sobre la supervivencia en las primeras etapas larvarias (5,6). Otros trabajos, indican que la salinidad y la temperatura junto a otros factores en el agua, afectan la supervivencia y el desarrollo de las larvas y postlarvas de los camarones (7,8). No obstante, hay autores quienes señalan que una apropiada alimentación durante las primeras fases larvales del camarón, favorece el desarrollo, crecimiento y supervivencia (9,10), así como su resistencia a diferentes condiciones de salinidad y temperatura en la etapa de postlarva cuando se transporta para ser sembrada en los estanques de granjas de camarón (8,11).

Convencionalmente, la crianza de larvas de *Litopenaeus vannamei* (Boone 1931) generalmente ha sido realizada en agua de mar (12,13), ya que los estadios larvarios de peneidos, en condiciones de cultivo, presentan poca tolerancia a los cambios de alta y baja salinidad (6).

L. vannamei es comúnmente conocido como el camarón blanco del Pacífico, es una especie del Océano Pacífico Oriental y una de las más eurihalinas entre los peneidos, se distribuye desde las costas del Golfo de California en México, hasta Perú en Sudamérica, tiene un alto valor comercial, y es la especie más importante para la camaronicultura en América latina y es comúnmente cultivada en México (7,14).

combined with low and high salinity levels in business breeding tanks has not been properly analyzed during the larval stages of this species (2,6). Therefore, focusing on the variations of these abiotic in large scale breeding (11), in waters with low due to the development of onshore shrimp breeding (12,13), and in waters with high salinity and temperature, where they are vulnerable to disease, have both lead to mortality and difficulties in shrimp production over all sizes and ages bred by different suppliers during the warm or dry season (15,16).

This study assessed survival and development in the different larval stages *L. vannamei* in response to the combined effects of three temperatures (25, 30 y 35°C) and four levels of salinity (25, 30, 35 y 40ups) under laboratory conditions to establish the most appropriate shrimp larva breeding conditions.

MATERIALS AND METHODS

Artemia microalgae and nauplii cultivation.

The microalgae cultivated to feed the zoea larvae was *Chaetoceros muelleri*, taken from the Universidad Autónoma de Sinaloa Faculty of Oceanic Sciences Aquatic Organism Ecophysiology and Support Culture Laboratory (Laboratorio de Ecofisiología de Organismos Acuáticos y Cultivos de Apoyo) culture collection, and hatched *Artemia* cyst nauplius supplemented with microalgae was used as feed during the mysis stage, cysts were acquired from a commercial company.

Microalgae culture was carried out in transparent PET (Polyethylene Terephthalate or Ethylene Polyterephthalate) carboys with 16 L of seawater filtered at 1 µm and disinfected for 24 h with 1 mL/L sodium hypochlorite at 5%, residual chlorine was neutralized by adding 0.06 g/L sodium thiosulfate at the time of use. Microalgae was cultivated pursuant to (10) in Guillard's f Medium, with constant aeration, 250-260 µmol/m/s lighting, a temperature of 22 to 25°C, 35ups salinity, pH 8.7-9.6. A $2.04 \pm 0.16 \times 10^6$ cells/mL (Loptik Labor) biomass was harvested, which was estimated through hemocytometer counting (Loptik Labor) with a 0.1 mm deep Neubauer camera.

Artemia cysts hatched with the sodium hypochlorite technique using pre-hydrated cysts. Nauplii eclosion was carried out in a conical container with sea water filtered at 1 µm at a temperature of 30°C which was maintained throughout using a heater and a thermal regulator (FINNEX, HMO-50), with bubbling at the bottom to keep the cysts suspended (17).

Hasta el momento, existe poca información sobre la supervivencia de larvas (nauplio, zoea y mysis) de ésta especie y su tolerancia a los cambios bruscos de alta y baja salinidad en los laboratorios comerciales de postlarvas del noroeste de México (6). Más aún, el efecto de diferentes temperaturas en combinación con bajas y altas salinidades usado en criaderos comerciales, no ha sido bien analizado durante las etapas larvales de esta especie (2,6). Por tanto, es necesario prestar atención a las variaciones de estos factores abióticos durante el cultivo a gran escala (11), en aguas de baja salinidad por el prominente desarrollo de la camaronicultura tierra adentro (12,13), así como, en aguas con altas salinidades y temperaturas, donde su vulnerabilidad a enfermedades, ha provocado mortalidades y dificultades en la producción del camarón en todas las tallas y edades de distintos proveedores durante la estación calurosa o seca (15,16).

En éste trabajo, se evaluó la supervivencia y desarrollo de las etapas larvales de *L. vannamei* en respuesta a los efectos combinados de tres temperaturas (25, 30 y 35°C) y cuatro salinidades (25, 30, 35 y 40ups) en condiciones de laboratorio para determinar las condiciones más adecuadas de cultivo de las larvas de camarón.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivo de microalgas y nauplios de Artemia.

La microalga cultivada para alimentar las larvas zoea fue la diatomea *Chaetoceros muelleri*, obtenida del cepario del Laboratorio de Ecofisiología de Organismos Acuáticos y Cultivos de Apoyo de la Facultad de Ciencias del Mar de la Universidad Autónoma de Sinaloa, la fase de mysis se alimentó con nauplios eclosionados de quistes de *Artemia* complementados con microalgas, los quistes se adquirieron de una empresa comercial.

Los cultivos de microalgas se realizaron en garrafones transparentes de PET (Polietileno Tereftalato o Politereftalato de etileno) con 16 L de agua de mar filtrada a 1 µm y desinfectada por 24 h con 1 mL/L de hipoclorito de sodio comercial al 5%, al momento de su utilización el cloro residual se neutralizó con la adición de 0.06 g/L de tiosulfato de sodio. La microalga se cultivó de acuerdo a (10) en medio f de Guillard, con aireación constante, iluminación de 250-260 µmol/m/s, temperatura de 22 a 25°C, salinidad de 35ups, pH de 8.7-9.6. Bajo estas condiciones se cosechó a las 48 h una biomasa de $2.04 \pm 0.16 \times 10^6$ células/mL que se estimó con conteos en un hematocitómetro (Loptik Labor) con cámara de Neubauer de 0.1 mm de profundidad.

After eclosion (18 h), nauplii were harvested and inactivated in 60°C sea water, they were preserved at -20°C for later use as food within a timeframe no longer than 72 h.

Experimental organism procurement.

Shrimp larvae in nauplius stage IV were procured from the "FITMAR" commercial production laboratory located in Sinaloa, Mexico; they were transported in plastic bags contained in an icebox with sea water at oxygen saturation level and at a temperature from 28 to 29°C. Larvae under controlled conditions (30°C and 35ups) were placed in a 400 L plastic tank with sea water and aeration, both filtered at 1 µm.

Experimental design. Once nauplius stage V was reached at 100%, and to establish larva survival and development, a factorial experiment was conducted on two factors, considering as factor A, with four levels (25, 30, 35 y 40ups), and temperature as B, with three levels (25, 30 and 35°C), each treatment (temperature-salinity interaction) was quadrupled, with a total of 48 trial units (aquariums). 12 L plastic containers with water filtered at 1 µm and at the proposed salinity with an initial density of 100 larvae/L or 1200 larvae per aquarium. Trial temperatures were maintained with a heater and a thermal regulator (FINNEX, HMO-50) for every aquarium. To increase salinity to 40 ups, granulated salt (uniodized) was added to the sea water at a ratio of 5 g/L, and fresh water was added to the sea water to decrease salinity, after which the treatment salinity was measured with a digital refractometer (VITALSINE, SR-6), making any necessary adjustments to achieve the desired salinity levels.

Zoea larvae in each aquarium were fed a daily ration of microalgae, which changed according to their development: 100, 120 y 150×10³ cells/mL for zoea stages I, II and III, respectively. Mysis larvae I, II and III were fed 30, 40 and 50 *Artemia*/larva nauplii, respectively; in each case, there was also a microalgae supplement at a ratio of 50×10³ cells/mL per aquarium. Each day, and before every food ration, feces and the remaining food were removed using syphon protected with a 200 µm nytex mesh, adjusting the volume to 12 L with clean filtered water at the respective temperature and salinity for each aquarium.

Between 25 and 30 larvae were tested *in vivo* every 24 h to establish their development stages, which were then put back in their corresponding container to minimize sampling mortality. The development index (ID) was calculated as: $ID = (\sum i) / N$, where *i* is the absolute value assigned to each larval stage (nauplius V=0; zoea

Los quistes de *Artemia* se descapsularon con la técnica de hipoclorito de sodio usando quistes previamente hidratados. La eclosión de los nauplios se llevó a cabo en un recipiente cónico con agua de mar filtrada a 1 µm a una temperatura de 30°C que se mantuvo con un calentador y un termorregulador (FINNEX, HMO-50), con burbujeo desde el fondo para mantener suspendidos los quistes (17). Después de su eclosión (18 h) los nauplios se cosecharon y se inactivaron en agua de mar a 60°C, se conservaron a -20°C para su posterior uso como alimento en un tiempo no mayor a 72 h.

Obtención de organismos experimentales.

Las larvas de camarón en la fase de nauplio IV, se obtuvieron del laboratorio de producción comercial "FITMAR" ubicado en el sur de Sinaloa, México; fueron transportados en una hielera dentro de bolsas de plástico con agua de mar a saturación de oxígeno y a temperatura de 28 a 29°C. Las larvas bajo condiciones controladas (30°C y 35ups) se colocaron en un tanque de plástico de 400 L con agua de mar y aireación ambos filtrados a 1 µm.

Diseño experimental. Una vez alcanzada la fase de nauplio V en un 100%, y para determinar la supervivencia y el desarrollo de las larvas, se realizó un experimento factorial para dos factores, considerando la salinidad como factor A, con cuatro niveles (25, 30, 35 y 40ups) y la temperatura como B, con tres niveles (25, 30 y 35°C), cada tratamiento (interacción de temperatura y salinidad) se hizo por cuatuplicado, con un total de 48 unidades experimentales (acuarios). Para esto se utilizaron recipientes de plástico con 12 L de agua filtrada 1 µm y a las salinidades propuestas con una densidad inicial de 100 larvas/L ó 1200 larvas por acuario. Las temperaturas experimentales se mantuvieron con un calentador y un termorregulador (FINNEX, HMO-50) por acuario. Para incrementar la salinidad a 40ups se añadió sal granulada (sin yodo) al agua de mar a una razón de 5 g/L, y para disminuirla se agregó agua dulce al agua de mar, después se determinó la salinidad en los tratamientos con un refractómetro digital (VITALSINE, SR-6), haciendo los ajustes necesarios hasta alcanzar las salinidades deseadas.

Las larvas zoea en cada acuario fueron alimentadas con una ración diaria de microalgas, que cambió según su desarrollo: 100, 120 y 150×10³ células/mL para los estadios de zoea I, II y III, respectivamente. Las larvas mysis I, II y III recibieron de manera respectiva diariamente 30, 40 y 50 nauplios de *Artemia*/larva, en cada

I to III: 1 to 3; mysis I to III: 4 to 6; PL1=7), n_i is the number of larvae in stage I, and N is the total number of larvae in the sample.

ID data was used to determine the respective food rations, which were modified simultaneously in all the aquariums when larvae started entering the next development stage in at least three replicas of the same treatment.

In addition, survival (S) was assessed, for which the larvae in each trial unit were counted in daily live larva counts in samples with a 0.5 L volume and the number of surviving larvae were calculated in the total volume of their respective aquarium, using the equation: $S = (NT/N0) \times 100$, where S is survival expressed as a percentage, NT is the number of remaining larvae at any point during the experiment, and it is NOT the initial larvae amount.

The experiment ended when 50% of the organisms reached stage PL1 in at least one of the temperature-salinity interactions.

Statistical analysis. Normality (Liliefors) and variance equality (Bartlett) tests were conducted on survival data (transformed into arcsene) and larva development index data. Subsequently, they were analyzed using a two-way ANOVA, considering salinity (ups) as factor A and temperature ($^{\circ}\text{C}$) as factor B as variables to which survival and the development index respond. After the two-way ANOVA proved to be meaningful, Tukey multi-comparison tests were then conducted; an (α) of 0.05 (18) significance level was used in all cases.

RESULTS

In general, regardless of salinity, survival percentages were better at 30°C than at 35 and 25°C . Survival rates above 50% were achieved in treatments of 25 and 30ups in all the temperatures under study. The greatest survival percentage was at 30°C and 30ups (82.2%), followed by 25 ups at 30 and 35°C (71.5 and 71.6%). Organisms kept at 25°C and 40ups had the lowest survival rate throughout the trial period (Figure 1)

Nauplius V metamorphosis until the PL1 stage was successful in some salinity and temperature combinations during the trial (25-35 ups at 30 and 35°C). On the seventh day, the experiment carried out at a temperature of 30° had the highest DI value (6.76) with a salinity level of 30 ups, followed by a DI of 6.74 at a temperature of 35°C and 25 ups salinity). Nevertheless, the

caso además se complementó con microalgas a razón de 50×10^3 células/mL por acuario. Todos los días y antes de cada ración de alimento se eliminaron las heces y el alimento sobrante con un sifón protegido por una malla nytex de 200 μm , ajustando el volumen a 12 L con agua limpia filtrada a la temperatura y salinidad respectiva por acuario.

Cada 24 h entre 25 y 30 larvas de cada acuario se examinaron *in vivo* para determinar sus fases de desarrollo, mismas que se regresaron al recipiente correspondiente para minimizar la mortalidad por muestreo. El índice de desarrollo (ID) fue calculado como: $ID = (\sum n_i) / N$, donde i es el valor absoluto atribuido a cada etapa larval (nauplio V=0; zoea I a III: 1 a 3; mysis I a III: 4 a 6; PL1 = 7), n_i es el número de larvas de la etapa i , y N es el número total de larvas en la muestra (9).

Con los datos de ID se determinó la ración de alimento respectiva, que se modificó simultáneamente en todos los acuarios cuando las larvas comenzaron a pasar a la siguiente fase de desarrollo en por lo menos tres réplicas del mismo tratamiento.

Adicionalmente, se evaluó la supervivencia (S), para lo cual, se contaron las larvas de cada unidad experimental mediante conteos diarios de larvas vivas en muestras de volumen de 0.5 L y calculando el número de larvas sobrevivientes en el volumen total del acuario respectivo, usando la ecuación: $S = (NT/N0) \times 100$. En donde S es la supervivencia expresada en porcentaje, NT es el número de larvas restantes en cualquier tiempo de haber iniciado el experimento y $N0$ es el número inicial de larvas.

El experimento terminó cuando el 50% de los organismos alcanzaron la fase de PL1, en al menos una de las interacciones de temperatura y salinidad.

Análisis estadístico. A los datos de supervivencia (transformados a arcoseno) y del índice de desarrollo de larvas, se les aplicaron las pruebas de normalidad (Lilliefors) y de igualdad de varianzas (Bartlett). Posteriormente se analizaron por un ANOVA de dos vías, considerando como factor A la salinidad (ups) y B la temperatura ($^{\circ}\text{C}$), como variables respuesta la supervivencia y el índice de desarrollo. Al resultar significativo el ANOVA de dos vías, se realizaron pruebas de comparaciones múltiples de Tukey; en todos los casos se utilizó un nivel de significancia (α) de 0.05 (18).

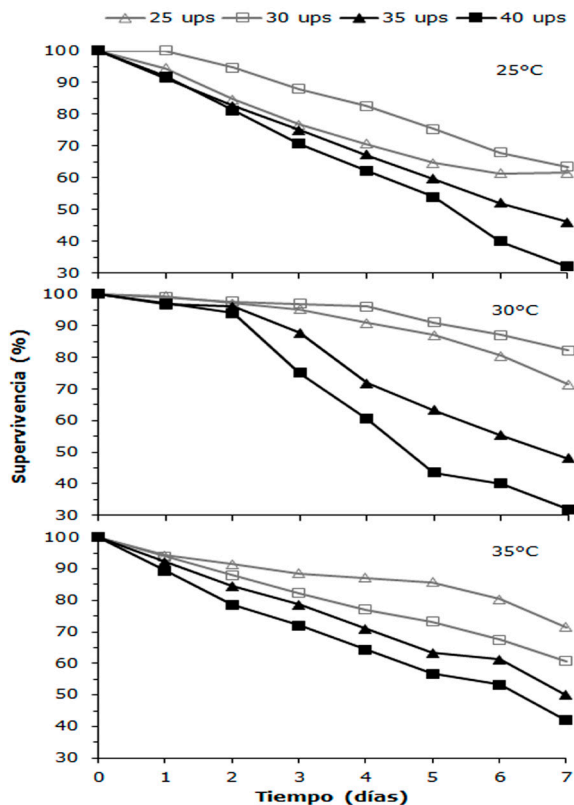


Figure 1. Average (%) *Litopenaeus vannamei* larvae survival at different salinity and temperature levels

lowest DI value was at 25°C and 40 ups, followed by 35, 25 and 30 ups. DI trends during cultivation days at different temperature and salinity levels are shown in Figure 2. At 25 and 35°C, DI increase for days three and four was above 30, followed by 25, 35 and 40 ups salinity levels. At 35°C, the DI was similar throughout all the salinities used during the trial for the first two-day period, with a higher value at 25 ups, followed by DI values at 30, 35 and 40 ups salinities until the end of the trial.

The effect of salinity and temperature, in addition to its impact on *L. vannamei* larvae DI values at the end of the trial, had a significant effect ($p < 0.05$; Table 1).

In particular, average larvae DI values showed significance between 40 ups and 35°C with compared to the remaining salinities used. At 30 and 35°C with salinity between 20 and 40ups, statistical differences were found between DI values, but no statistical differences between DI values were found at 25, 30 and 35ups (the latter at 35°C only) (Table 1).

RESULTADOS

En general, independientemente de la salinidad, los porcentajes de supervivencia fueron mejores a 30°C que en 35 y 25°C. Tasas de supervivencia superiores al 50% se obtuvieron en los tratamientos de 25 y 30ups en todas las temperaturas ensayadas. El mayor porcentaje de supervivencia se obtuvo en 30°C y 30ups (82.2%), seguido de 25 ups con 30 y 35°C (71.5 y 71.6%). Los organismos mantenidos a 25°C y 40ups tuvieron la supervivencia más baja durante todo el período experimental (Figura 1).

La metamorfosis de nauplio V hasta la etapa de PL1 fue exitosa en algunas combinaciones de salinidades y temperaturas ensayadas (25-35 ups con 30 y 35°C). En el séptimo día, el experimento llevado a cabo en una temperatura de 30°C terminó con el más alto valor del ID (6.76) a una salinidad de 30 ups, seguido de un ID de 6.74 a una salinidad y temperatura de 25 ups y 35°C. Aunque, el valor más bajo del ID se presentó a 25°C y 40 ups, seguido de 35, 25 y 30ups. La tendencia del ID durante los días de cultivo a diferentes temperaturas y salinidades se muestran en la figura 2. A los 25 y 30°C,

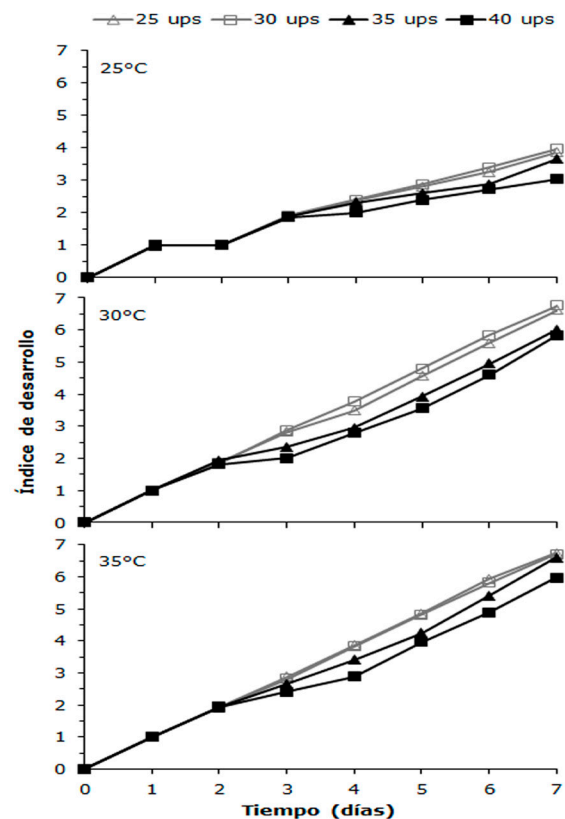


Figure 2. Average (%) *Litopenaeus vannamei* larvae development index at different salinity and temperature levels

Table 1. Survival and development index (DI) averages (standard deviation in brackets) of *Litopenaeus vannamei* larvae at different salinity and temperature combinations at the end of the experiment (day 7). Different letters indicate significant differences (two-way ANOVA).

Temperature °C	Salinity ups	Survival	DI
25	25	61.50 (10.97) ^{bc}	3.86 (0.26) ^c
	30	63.50 (1.91) ^{bc}	3.97 (0.06) ^c
	35	46.00 (8.16) ^{cd}	3.65 (0.12) ^c
	40	32.00 (4.90) ^d	3.04 (0.04) ^d
30	25	71.50 (11.24) ^{ab}	6.62 (0.25) ^a
	30	82.17 (9.21) ^a	6.76 (0.17) ^a
	35	48.00 (11.43) ^{cd}	6.01 (0.07) ^b
	40	32.00 (5.42) ^d	5.84 (0.15) ^b
35	25	71.58 (8,22) ^{ab}	6.74 (0.18) ^a
	30	60.67 (8.84) ^{bc}	6.71 (0,22) ^a
	35	50.00 (6,53) ^{cd}	6.60 (0.26) ^a
	40	42.00 (7.12) ^{cd}	5.98 (0.16) ^b

DISCUSSION

The development and survival index shows the success or failure of the conditions in which organisms are cultivated (5, 8). Higher survival rates and greater progress in the larval development of shrimp are directly related to appropriate maintenance conditions (7,13); nevertheless, some researchers who studied the combined effect of salinity and temperature in *L. vannamei* concluded that biomass respiration, excretion and growth were the best survival indicators (19-21). As in this study, other authors have reported that salinity and temperature have an influence on the larval development index of *Penaeus merguensis* and on the survival of *Litopenaeus stylirostris* (5,22).

The highest survival and larval development index values were found at 30 and 35°C and at 25 and 30 ups. Other salinities analyzed in this trial delayed growth and decreased survival in the larvae of this shrimp type, although the effect was different to the three temperatures of the trial. Results differ from those reported by other authors (9,10), where a salinity of 34 to 35 ups is said to be optimal for the development and

el aumento en el ID a partir de los días tres y cuatro fue mayor a 30ups, consecutivo de las salinidades 25, 35 y 40ups. En 35°C el ID fue muy parecido en todas las salinidades ensayadas durante el periodo de los dos primeros días, con un valor más alto en 25 ups, anterior a los ID de las salinidades de 30, 35 y 40 ups hasta la terminación del experimento.

El efecto de la salinidad y la temperatura, además de su interacción sobre el ID de las larvas de *L. vannamei* al final del experimento tuvieron un efecto significativo ($p < 0.05$; Tabla 1).

En particular, los promedios del ID de las larvas presentaron una significancia entre los tratamientos de 40ups y 25°C con el resto de las salinidades utilizadas. A 30 y 35°C entre salinidades de 25 y 40ups, se encontraron diferencias estadísticas entre los valores del ID, pero a 25, 30 y 35ups (ésta última solo con 35°C), no se encontraron diferencias estadísticas entre los valores del ID (Tabla 1).

DISCUSIÓN

El índice de desarrollo y la supervivencia reflejan las condiciones de éxito o fracaso en que los organismos son cultivados (5,8). Las supervivencias altas y mayores adelantos en el desarrollo larvario del camarón están relacionadas directamente con las condiciones apropiadas de mantenimiento (7,13); sin embargo, algunos investigadores quienes estudiaron el efecto combinado de salinidad y temperatura en *L. vannamei* concluyeron que la respiración, excreción y crecimiento en biomasa representaron mejores indicadores que la supervivencia (19-21). Al igual que en éste estudio, otros autores han reportado que la salinidad y temperatura influyen en el índice de desarrollo larval de *Penaeus merguensis* y en la supervivencia de larvas de *Litopenaeus stylirostris* (5,22).

La mayor supervivencia e índice de desarrollo larval se encontraron a 30 y 35°C con 25 y 30 ups. Otras salinidades analizadas en este estudio retardaron el desarrollo y disminuyeron la supervivencia de las larvas de esta especie de camarón, aunque el efecto fue diferente a las tres temperaturas ensayadas. Los resultados difieren de acuerdo con lo reportado por algunos autores (9,10), donde una salinidad de 34 a 35 ups se menciona como óptima para el éxito del desarrollo y la supervivencia de larvas del camarón blanco *L. vannamei*. Los estudios realizados sobre *Penaeus semisulcatus* y *Penaeus merguensis* (4,5), así como con *Penaeus penicillatus*, *Metapenaeus affinis* y *Parapenaeopsis stylifera* (23), mostraron que el mejor intervalo

survival success of *L. vannamei* white shrimp larvae. The studies conducted on *Penaeus semisulcatus* and *Penaeus merguensis* (4,5), as well as *Penaeus penicillatus*, *Metapenaeus affinis* and *Parapenaeopsis styliifera* (23), showed that the best temperature and salinity interval for survival and development since nauplius eclosion is between 29-33°C and 30-35 ups.

The results of this study show that salinity had a greater influence on survival and temperature had a greater influence during larval development. The facts show that this shrimp species is more tolerant to low salinity levels, given that survival was considerably low at 40ups, followed by 35ups in all the trial temperatures. Nevertheless, it is known that *L. vannamei* larval stages (nauplius, zoea, mysis) and PL1 can tolerate salinities between 20 and 45ups (6), due to the fact that it is a euryhaline species under natural conditions (24). Nevertheless, there is evidence to show that penaeidae larvae are less resistant to abrupt salinity and temperature variations (22), mainly due to the fact that its gills and other structures specialized in osmoregulation have not developed completely.

In a trial with *P. merguensis* larvae (5), it was found that survival decreases more at low salinities (25 and 30ups) than at 35 and 40 ups with 29 and 33°C temperatures. However, another study (22) reports that *L. stylirostris* larvae and post-larvae (PL1) survival is lower at 20, 25, 35 and 39ups than at intermediate salinity levels of 27 and 31ups, at a temperature of 29°C. Nevertheless, *P. semisulcatus* survival starting at the zoea stage I is lower at 34°C than at 26 and 30°C temperatures, with 25, 30 and 35 ups salinity levels (4). The foregoing is explained by the fact that each shrimp species operates in optimum temperatures and salinity levels, out of which, organisms show a lower metabolic efficiency and more energy spending associated to the requirements of metabolic maintenance, which affects development and survival.

Although temperature does not appear to have a drastic impact on survival in this study, its impact on penaeidae growth and on the time to advance through larval stages is known. Another study (4) showed that high temperatures (30 and 34°C) can significantly increase growth rate and metamorphosis during the zoea and mysis stages when compared to a temperature of 26°C.

Similarly, the development index that represents metamorphosis at each larval stage was extended, survival was reduced to 40ups and the metamorphosis process during larval development was faster at 30 and 35°C. These

de temperatura y salinidad para la supervivencia y el desarrollo desde la eclosión naupliar es entre 29-33°C y 30-35 ups.

Los resultados del presente estudio muestran que la salinidad tuvo una mayor influencia en la supervivencia y la temperatura durante el desarrollo larvario. Los hechos indican que esta especie de camarón es más tolerante a bajas salinidades, puesto que la supervivencia fue considerablemente baja a 40ups, seguido de 35ups en todas las temperaturas ensayadas. Aunque, se sabe que las etapas larvales (nauplios, zoea, mysis) y PL1 de *L. vannamei* pueden tolerar salinidades entre 20 y 45ups (6), debido a que es una especie eurihalina en condiciones naturales (24). Sin embargo, existen evidencias de que las larvas de peneidos son menos resistentes a las variaciones bruscas de salinidad y temperatura (22), debido principalmente a que sus branquias y otras estructuras especializadas en la osmorregulación no se han desarrollado completamente (8).

En un estudio realizado con larvas de *P. merguensis* (5), se encontró que la supervivencia disminuye a bajas salinidades (25 y 30ups) más que a 35 y 40ups con temperaturas de 29 y 33°C. Sin embargo, en otra investigación (22), reportan que la supervivencia de larvas y postlarvas (PL1) de *L. stylirostris* es menor a 20, 25, 35 y 39ups más que a salinidades intermedias de 27 y 31ups, a una temperatura de 29°C. No obstante, la supervivencia de *P. semisulcatus* a partir de la etapa de zoea I es menor a 34°C que a temperaturas de 26 y 30°C, con salinidades referidas de 25, 30 y 35 ups (4). Lo anterior se debe, a que cada especie de camarón opera en un óptimo de temperatura y salinidad, fuera del cual, los organismos presentan una menor eficiencia metabólica y mayores gastos de energía asociados a los requerimientos del mantenimiento metabólico afectando el desarrollo y la supervivencia.

Aunque la temperatura no parece afectar drásticamente a la supervivencia para el presente estudio, se sabe que influye en el crecimiento de los peneidos y el tiempo que el camarón tarda en pasar a cada etapa larval. Otro trabajo (4) mostró que temperaturas altas (30 y 34°C) pueden aumentar significativamente la tasa de crecimiento y la metamorfosis durante las etapas de zoea y mysis en comparación con 26°C.

De la misma manera, en *L. vannamei* el índice de desarrollo que representa la metamorfosis en cada etapa larval fue prolongado, la supervivencia se redujo a 40ups y el proceso de metamorfosis durante el desarrollo larval fue más rápido a 30 y 35°C. Estos hechos indican que *L. vannamei* es menos tolerante a bajas temperaturas durante el

events indicate that *L. vannamei* is less tolerant to low temperatures during larval development (5,25). Therefore, it is necessary to study the following in future studies: respiration, excretion, longitudinal growth and biomass, as indicators that could lead to a greater understanding of the effects of different temperature and salinity conditions in *L. vannamei* larvae.

In conclusion, it was found that larvae development and survival were best at temperatures of 30 and 35°C combined with 25 and 30ups salinity levels, which coincided with the implementation of new cultivation methods in most commercial laboratories producing *L. vannamei* in northeastern Mexico (14).

Acknowledgements

Projects UAS-CA-162, PROFAPI-159-2014 for the resources provided, CONACYT for the grant awarded to the first author (CVU 206165), the staff at the FITMAR Post-larvae Production Lab and Juan Manuel Flores Alarcón for data collection.

desarrollo larval (5,25). Por lo cual es necesario estudiar en otros trabajos a futuro: la respiración, excreción y crecimiento en longitud y biomasa, como indicadores que pudieran involucrar un entendimiento mayor del efecto a diferentes condiciones de temperatura y salinidad en las larvas de *L. vannamei*.

En conclusión se determinó que a temperaturas de 30 y 35°C en combinación con las salinidades de 25 y 30ups, el desarrollo y supervivencia de larvas fueron mejores, lo cual coincidió con la implementación de nuevos métodos de cultivo para la mayoría de los laboratorios de producción de larvas comerciales de *L. vannamei* del noroeste de México (14).

Agradecimientos

A los proyectos UAS-CA-162, PROFAPI-159-2014 por los recursos otorgados, al CONACYT por la beca asignada al primer autor (CVU 206165), al personal del Laboratorio de Producción de Postlarvas FITMAR y Juan Manuel Flores Alarcón por la recolección de datos.

REFERENCES

- Ye L, Jiang S, Zhu X, Yang Q, Wen W, Wu K. Effects of salinity on growth and energy budget of juvenile *Penaeus monodon*. *Aquacult* 2009; 290(1-2):140-144.
- Kumlu M, Türkmen S, Kumlu M. Thermal tolerance of *Litopenaeus vannamei* (Crustacea: Penaeidae) acclimated to four temperatures. *J Therm Biol* 2010; 35(6):305-308.
- Criales MM, Zink IC, Browder JA, Jackson TL. The effect of acclimation salinity and age on the salinity tolerance of pink shrimp postlarvae. *J Exp Mar Bio Ecol* 2011; 409(1-2):283-289.
- Kumlu M, Eroldogan OT, Aktas M. Effects of temperature and salinity on larval growth, survival and development of *Penaeus semisulcatus*. *Aquacult* 2000; 188(1-2):167-173.
- Zacharia S, Kakati VS. Optimal salinity and temperature for early developmental stages of *Penaeus merguensis* De man. *Aquacult* 2004; 232(1-4):373-382.
- Chong J, Charmantier G, Boulo V, Lizarraga J, Enriquez LM, Giffard I. Osmoregulation pattern and salinity tolerance of the white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) during post-embryonic development. *Aquacult* 2014; 422:261-267.
- Martínez CL. *Camaronicultura, avances y tendencias*. México: AGT Editor: 2002.
- Arzola GJ, Piña VP, Nieves SM, Medina JM. Supervivencia de postlarvas de camarón blanco *Litopenaeus vannamei* a diferentes salinidades y temperaturas. *Rev MVZ Córdoba* 2013; 18(3):3618-3625.
- Piña P, Nieves M, Ramos L, Chavira CO, Voltolina D. Survival, growth and feeding efficiency of *Litopenaeus vannamei* protozoa larvae fed different rations of the diatom *Chaetoceros muelleri*. *Aquacult* 2005; 249(1-4):431-437.
- Piña P, Voltolina D, Nieves M, Robles M. Survival, development and growth of the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* protozoa larvae, fed with monoalgal and mixed diets. *Aquacult* 2006; 253(1-4):523-530.

11. Magallón BF, Servín VR, Portillo CG, López MB. *Litopenaeus vannamei* (Boone) post-larval survival related to age, temperature, pH and ammonium concentration. *Aquacult Res* 2006; 37(5):492-499.
12. Miranda I, Valles JL, Sánchez R, Álvarez Z. Cultivo del camarón marino *Litopenaeus Vannamei* (Boone, 1931) en agua dulce. *Rev Cientif FCV-LUZ* 2010; 20(4):339-346.
13. Godínez DE, Chávez MC, Gómez S. Acuicultura epicontinental del camarón blanco del pacífico, *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931). *Trop Subtrop Agroecosyst* 2011; 14(1):55-62.
14. Martínez CL, Martínez PM, Cortés JE. Camaronicultura mexicana y mundial: ¿actividad sustentable o industria contaminante?. *Rev Int Contam Ambient* 2009; 25(3):181-196.
15. Laramore SE, Scarpa J, Laramore S, Lin J. Virulence variation of White Spot Syndrome Virus in Pacific Shrimp *Litopenaeus vannamei*. *J Aquat Anim Health* 2009; 21(2):82-90.
16. Moser JR, Galván AD, Mendoza CF, Encinas GT, Coronado MD, Portillo CG, et al. Water temperature influences viral load and detection of White Spot Syndrome Virus (WSSV) in *Litopenaeus vannamei* and wild crustaceans. *Aquacult* 2012; 326-329:9-14.
17. Rodríguez LG, Maldonado TD, Carrillo NL. Calidad biológica y bioquímica de la población de *Artemia* (Anostraca: Artemiidae) localizada en las salinas de Real de Salinas, Calkini, Campeche, México. *Rev Biol Trop* 2006; 54(4):1283-1293.
18. Zar JH. *Biostatistical analysis*. Upper Saddle River, USA: Prentice-Hall Inc; 2010.
19. Palacios E, Racotta IS. Salinity stress test and its relation to future performance and different physiological responses in shrimp postlarvae. *Aquacult* 2007; 268(1-4):123-135.
20. Gelabert R, Brito R, Gaxiola M, Castro T, Rosas C. Efecto de nauplios de *Artemia franciscana* enriquecidos sobre el crecimiento, supervivencia y resistencia al estrés de postlarvas (PL₅-PL₄₀) de *Litopenaeus vannamei* (Boone 1931). *Univ Cien* 2008; 24(1):29-40.
21. Valenzuela W, Rodríguez G, Ponce JT, Esparza HM. Efecto de diferentes combinaciones de temperatura y salinidad sobre el consumo específico de oxígeno en el camarón blanco *Litopenaeus vannamei*. *Rev Biol Mar y Oceanogr* 2011; 46(3):303-311.
22. Pham D, Charmantier G, Wabete N, Boulo V, Broutoi F, Mailliez J, et al. Salinity tolerance, ontogeny of osmoregulation and zootechnical improvement in the larval rearing of the Caledonian Blue Shrimp, *Litopenaeus stylirostris* (Decapoda, Penaeidae). *Aquacult* 2012; 362-363:10-7.
23. Nisa Z, Ahmed M. Hatching and larval survival of important penaeid shrimps of Pakistan in different salinities. *Pak J Zool* 2000; 32(2):139-143.
24. Pan L, Zhang L, Liu H. Effects of salinity and pH on ion-transport enzyme activities, survival and growth of *Litopenaeus vannamei* postlarvae. *Aquacult* 2007; 273(4):711-720.
25. Azocar C, Claramunt G, Yañez F, Futagawa M. Efecto de la temperatura sobre el desarrollo embrionario y larval de *Graus nigra* (Kyphosidae) del norte de Chile. *Rev Biol Mar Oceanogr* 2014; 49(1):111-122.