

**LA CLORACION DEL AGUA DE MAR Y LA SUPERVIVENCIA
Y CRECIMIENTO DE ESTADIOS INICIALES DE LA
ANCHOVETA NORTEÑA (*Engraulis mordax* GIRARD),
CON REFERENCIA A SISTEMAS DE ENFRIAMIENTO
DE CENTRALES ELECTRICAS**

**SEAWATER CHLORINATION AND THE SURVIVAL AND GROWTH
OF EARLY LIFE STAGES OF NORTHERN ANCHOVY
(*Engraulis mordax* GIRARD), WITH REFERENCE
TO POWER PLANT COOLING SYSTEMS**

Jorge Adrián Rosales Casián

Centro de Investigación Científica y de
Educación Superior de Ensenada
Apartado Postal 2732
Ensenada, Baja California, México

US mailing address: P.O. Box 434844, San Diego, CA. 92143-4844, USA

Ciencias Marinas (1991), Vol. 17, No. 1, pp. 99-117.

RESUMEN

La eclosión viable, la supervivencia, el crecimiento y las concentraciones letales (LC50) para huevos y larvas de la anchoveta noroesteña (*Engraulis mordax*), fueron examinadas después de la cloración del agua de mar. El cloro es usado como un fuerte biocida para la limpieza de sistemas de enfriamiento de centrales eléctricas, en el tratamiento de drenaje, agua potable y albercas. En el laboratorio, huevos de 36 horas, y larvas de 1 día (vitelo), 3 días (absorción vitelo) y 5 días, se expusieron a 0.0, 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 0.8 y 1.0 mg l⁻¹ de cloro por duplicado. Los bioensayos con huevos duraron 24 horas en técnica estática, y hasta 12 días después de la eclosión en condición semiestática para las larvas. La temperatura del agua fue de 18°C. La eclosión viable de los huevos de *E. mordax* fue reducida a 47.5% con 0.1 mg l⁻¹, y sólo una larva viva en cada repetición emergió con 1.0 mg l⁻¹. La supervivencia larval disminuyó drásticamente con 0.5-0.8 (larvas 1 día) y fue nula a las dos horas con 1.0 mg l⁻¹. Se observó una tolerancia al cloro con la edad larval. Debido a la alta y rápida mortalidad en concentraciones mayores a 0.5 mg l⁻¹, el crecimiento de las larvas se determinó sólo hasta 0.2 mg l⁻¹. Una excepción se presentó en la serie con larvas de 5 días: la supervivencia en uno de los tratamientos con 0.8 mg l⁻¹ alcanzó el día 12 y permitió determinar el crecimiento; la longitud estándar promedio (6.04 ± 1.24 mm) fue más pequeña con 0.8 mg l⁻¹ que en la encontrada en los controles (9.03 ± 0.760 y 7.65 ± 1.13 mm); la comparación de promedios de la longitud estándar en esta serie fue significativa (ANCOVA, p = 0.0350); las tasas de crecimiento en los controles fueron 0.44 y 0.39 mm/día y con 0.8 mg l⁻¹ fue de 0.26 mm/día. El 24hLC50 indicó que el huevo fue el estadio más sensible con 0.114 mg l⁻¹. Para las series con larvas de 1 día, los 24hLC50 fueron 0.248 (sin alimento) y 0.18 mg l⁻¹ (*Tetraselmis*). Para las larvas de 3 días el 24hLC50 fue 0.236; las larvas de 5 días mostraron un mayor valor (0.799 mg l⁻¹), pero a las 96 horas disminuyó a 0.29 mg l⁻¹.

ABSTRACT

The viable hatch, survival, growth and lethal concentrations (LC50) for early life stages of northern anchovy (*Engraulis mordax*) were examined after seawater chlorination. Chlorine is used as a strong biocide for cleaning power plant cooling systems, and for sewage, tap water and pool treatment. In the laboratory, 36-hour eggs, and 1-day (yolk-sac), 3-day (yolk-sac absorption) and 5-day-old larvae were exposed to replicated concentrations of 0.0 (controls), 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 0.8 and 1.0 mg l⁻¹. Egg bioassays were of 24 hours duration only in static technique, and up to 12 days after hatching for larval series in semistatic technique. Water temperature was 18°C in all bioassays. The viable hatch of *E. mordax* eggs was reduced to 47.5% with 0.1 mg l⁻¹, and only one live larva per replicate hatched in 1.0 mg l⁻¹. Larval survival showed a drastic decrease in the first two hours with 0.5, 0.8 (1-day larvae) and was null with 1.0 mg l⁻¹. A slight tolerance to chlorination with increased larval age was observed. Because of the high and fast mortality in greater concentrations than 0.5 mg l⁻¹, only growth data in less of 0.2 mg l⁻¹ were obtained. An exception was shown with 5-day larval series: survival in only one replicated treatment of 0.8 mg l⁻¹ reached the twelfth day and permitted growth measuring; the mean standard length (6.04 ± 1.24 mm) was smaller than that found in controls (9.03 ± 0.760 and 7.65 ± 1.13 mm); the comparison of mean standard lengths in this series was significant (ANCOVA, p = 0.0350); growth rates in controls were 0.44 and 0.39 mm/day, and with 0.8 mg l⁻¹ growth rate was 0.26 mm/day. The 24hLC50 indicated that the egg was the most sensitive stage with 0.114 mg l⁻¹. For 1-day larval series, the 24hLC50s were 0.248 (no food) and 0.18 mg l⁻¹ (*Tetraselmis*). For 3-day larvae, 24hLC50 was 0.236; 5-day larvae showed a greater value (0.799 mg l⁻¹), but at 96 hours it decreased to 0.29 mg l⁻¹.

INTRODUCCION

El cloro ha sido usado como un fuerte tratamiento desinfectante en drenaje y agua potable, y como biocida para las incrustaciones en sistemas de enfriamiento de centrales eléctricas en concentraciones hasta de 3.0 mg l⁻¹ (Goodman, 1987); una sola planta puede usar hasta más de 63 m³ s⁻¹ de agua de mar (PNLV, 1979), un volumen mayor que el drenaje municipal descargado a la zona costera del sur de California, EUA (Espinosa, 1985).

El cloro y el incremento de temperatura han sido identificados como los riesgos más importantes para los organismos que entran a los sistemas de enfriamiento (Chow *et al.*, 1981). En el flujo, una variedad de organismos son encontrados, muchos de ellos son importantes recursos alimenticios que desovan intermitentemente en aguas costeras (Goldman, 1979).

El efecto del cloro ha sido estudiado en fitoplancton y zooplancton (Thatcher *et al.*, 1976), en invertebrados estuarinos (McLean, 1973; Larson *et al.*, 1980), en crustáceos (Capuzzo, 1977; Capuzzo *et al.*, 1977) y en peces juveniles (Thatcher *et al.*, 1976; Hoss *et al.*, 1977) y adultos (Dickson *et al.*, 1974), pero estudios en huevos y larvas de

INTRODUCTION

Chlorine has been widely used as a strong disinfectant treatment in sewage and potable water, and as biocide for power plant cooling systems in concentrations of up to 3.0 mg l⁻¹ (Goodman, 1987); only a power plant can use more than 60 m³ s⁻¹ of water (PNLV, 1979), a greater volume than the municipal sewage discharged into the nearshore zone of the Southern California Bight (Espinosa, 1985).

Chlorine and temperature increase have been identified as the most important risks to organism entrainment in cooling systems (Chow *et al.*, 1981). In the uptake flow, many organisms can be found; many of them are important marine food resources that spawn intermittently in coastal waters (Goldman, 1979).

The effect of chlorine has been studied on phytoplankton and zooplankton (Thatcher *et al.*, 1976), estuarine invertebrates (McLean, 1973; Larson *et al.*, 1980), crustaceans (Capuzzo, 1977; Capuzzo *et al.*, 1977) and juvenile (Thatcher *et al.*, 1976; Hoss *et al.*, 1977) and adult fishes (Dickson *et al.*, 1974), but studies of chlorine effects on eggs and larval stages of marine fishes are scarce (Hall *et al.*, 1981).

peces marinos son escasos (Hall *et al.*, 1981).

Las larvas de peces muestran gran vulnerabilidad a estímulos externos, y la mortalidad es más alta que en otros estadios (Hunter, 1981); cambios pequeños en las tasas de mortalidad tienen un efecto significativo en la magnitud del reclutamiento en las pesquerías deportivas y comerciales (Lawrence, 1975). Debido al amplio uso del cloro, es importante extender los estudios en una variedad de especies de peces para obtener mayor número de datos de referencia, principalmente con especies de una amplia distribución.

Serie de bioensayos se realizaron con estadios iniciales de la anchoveta norteña (*Engraulis mordax* Girard) para determinar las concentraciones letales de cloro, así como el efecto sobre la eclosión viable de los huevos y sobre la supervivencia y crecimiento de larvas de 1, 3 y 5 días. Este organismo fue escogido porque es un importante componente ecológico y comercial, por su amplia literatura sobre su cultivo en laboratorio, por su abundancia y amplia distribución, y porque no hay reportes acerca del efecto del cloro en los estadios iniciales de esta especie.

MATERIALES Y METODOS

Seis series de siete bioensayos duplicados fueron realizados con huevos y larvas de la anchoveta norteña (*Engraulis mordax*). La primera se tomó como serie de prospección (Rosales-Casián, 1986) y definió la concentración límite superior del cloro a utilizar; después de eso se seleccionaron las concentraciones 0.0, 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 0.8 y 1.0 mg l⁻¹.

El efecto del cloro en *E. mordax* se determinó en embriones de 36 horas, en larvas de 1 día (vitelo), de 3 días (absorción vitelo) y de 5 días. Se realizaron dos series de bioensayos con larvas de 1 día (sin alimento y con 40-50 x 10³ cel/ml de *Tetraselmis suecica*). Al agotar el saco vitelino en las series con larvas de 3 y 5 días, se alimentaron con 3-4 nauplios de copépodos/ml (44-120 μ) colectados en la bahía de Todos Santos, B.C. (México). A los nueve días después de la eclosión se les proporcionaron rotíferos (*Brachionus plicatilis*) en la misma densidad, la cual se determinó a diario en cada uno de los tanques para su ajuste (Houde, 1978). Los rotíferos y *Tetraselmis* fueron cultivados en el laboratorio.

Larval fishes show greater vulnerability to external stimulus, and the mortality is higher than other stages (Hunter, 1981); small changes in mortality rates have a significant effect on the magnitude of recruitment in sport or commercial fisheries (Lawrence, 1975). Due to the wide use of chlorine, it is important to extend the studies to a variety of species to obtain more reference data, mainly with species with a wide range of distribution.

Six bioassay series were carried out with early life stages of northern anchovy (*Engraulis mordax* Girard), to determine the lethal concentrations of chlorine, and the effect on eggs viable hatch, and survival and growth of 1, 3 and 5-day larvae. This organism was chosen because it is an important ecological and commercial component, by the wide literature on its laboratory rearing, by its abundance and wide distribution, and because there are no reports about chlorine effects on early life stages of this species.

MATERIALS AND METHODS

Six series of seven replicated bioassays each were realized with early life stages of northern anchovy (*Engraulis mordax*). The first was taken as a preliminary bioassay series, and it defined the upper limit of chlorine concentration; afterwards 0.0, 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 0.8 and 1.0 mg l⁻¹ were selected.

The effect of chlorine on *E. mordax* was determined using 36-hour embryos, and 1-day (yolk-sac), 3-day (yolk-sac absorption) and 5-day-old larvae. Two bioassay series were realized with 1-day larvae (no food and with 40-50 x 10³ cel/ml of *Tetraselmis suecica*). At yolk absorption, 3-day and 5-day larvae series were fed with 3-4 copepod nauplii/ml (44-120 μ) collected in Todos Santos Bay, B.C. (Mexico). On the ninth day after hatch, larvae were fed with the same density of rotifers (*Brachionus plicatilis*), which was determined daily in each tank for adjustment (Houde, 1978). Rotifers and *Tetraselmis* were cultured in the laboratory.

Fertilized eggs of *E. mordax* were obtained from artificial spawning (Leong, 1971) realized by the National Marine Fisheries Service (La Jolla, California, USA). The eggs were transported to Ensenada, B.C. (Mexico), and sorted in the laboratory into groups of 100 and 200 for egg and larvae stage bioassays, respectively. Hatching percent was

Los huevos fertilizados de *E. mordax* se obtuvieron de desoves artificiales (Leong, 1971) realizados en National Marine Fisheries Service (La Jolla, California, EUA); se transportaron a Ensenada, B.C. (México), y en el laboratorio se separaron en grupos de 100 y 200 para los bioensayos con huevos y larvas, respectivamente. El porcentaje de eclosión se obtuvo al inicio de cada serie, utilizando 20 cajas petri de vidrio con 10 huevos cada una. Los contenedores para los bioensayos en estadio de huevo fueron vasos de precipitado de vidrio (un litro), y para larvas, tanques circulares de 10 litros (35 cm diámetro, 14 cm alto) de cloruro de acrílico polivinilo; los tanques tienen una superficie lisa para no dañar a las larvas y son de color negro para mejor observación de las mismas ya que son transparentes en los primeros días después de la eclosión (Lasker *et al.*, 1970). El material es no-tóxico e inerte como se sugiere para estos estudios (Burton, 1977).

El agua de mar usada fue filtrada (10, 5 y 1 μ) e irradiada con luz UV. La técnica estática se empleó en los bioensayos con huevos, y la semiestática con larvas (Houde y Scheker, 1981). No se proporcionó aereación para evitar la volatilización del cloro y daños a las larvas por el movimiento del agua. Un sistema de aire acondicionado y los tanques sobre una cama de agua (Lasker y Vlymen, 1969) mantuvieron la temperatura del agua a 18°C. Un fotoperíodo de 14 h luz y 10 h oscuridad fue proporcionado por un reloj automático adaptado al cuarto de experimentación y por lámparas (75 W) montadas 40 cm arriba de los contenedores.

Temperatura, pH, oxígeno disuelto y salinidad fueron diariamente medidas. El cloro usado fue en forma de hipoclorito de sodio (12.5%); para reducir la degradación se prepararon nuevas soluciones al inicio de cada experimento, y se guardaron en la oscuridad a baja temperatura dentro de un refrigerador. La detección del cloro fue realizado por el método DPD-espectrofotométrico (EPA, 1979).

Después de la cloración del agua, la mortalidad de las larvas se registró a la primera, segunda y cada octava hora hasta el día 12. Los bioensayos con 0.8 y 1.0 mg l⁻¹ de cloro fueron iniciados dos horas antes para recobrar las larvas muertas y evitar acumulación de trabajo. La supervivencia larval se determinó de acuerdo a O'Connell y Raymond

obtained at the start of every experiment by using 20 petri dishes containing ten eggs each. Containers for egg stage bioassays were 1-liter crystal beakers, and 10-liter circular tanks (35 cm diameter x 14 cm deep) of acrylic polyvinyl chloride for larval experiments; these tanks provided a non-glossy, black surface (Lasker *et al.*, 1970) for no detrimental walls and better observation of clear anchovy larvae. Containers are built with nontoxic and relatively inert material as suggested for these studies (Burton, 1977).

Seawater was filtered (10, 5 and 1 μ) and UV light irradiated. Egg bioassays were conducted in static and semistatic technique for larvae (Houde and Scheker, 1981). No aeration was provided to avoid chlorine volatilization and larval damage by water movement. A constant room-temperature with air conditioning and tanks on a waterbed (Lasker and Vlymen, 1969) were employed, and water temperature was maintained at 18° ± 0.3°C. A 14 h light and 10 h dark photoperiod was provided by an automatic clock adapted to the experimentation room with fluorescent lamps (75 W) mounted 40cm above the containers.

Temperature, pH, dissolved oxygen and salinity were measured daily. Chlorine was in sodium hypochlorite (12.5%) form; to reduce degradation, new stock solutions were prepared and dark-stored at low temperature before the start of each experiment. The chlorine detection in water was realized by the DPD-spectrophotometric method (EPA, 1979).

After seawater chlorination, larval mortality was registered on the first, second, and every eighth hour up to the twelfth day. Bioassays with 0.8 and 1.0 mg l⁻¹ of chlorine were started two hours before in order to recover dead larvae and to avoid work overlapping. Larval survival was determined after O'Connell and Raymond's (1970) method. The mean standard length was determined at hatch with 20 larvae; growth was obtained by measuring five larvae in each container every two days. All larvae that reached the last day were measured for final growth. Mortality and growth data were transformed to arcsen and logarithms respectively, and a covariance analysis to determine differences was employed. Growth rate was obtained by regression analysis for comparative purposes (Lasker *et al.*, 1970).

(1970). Al inicio de cada serie, la longitud estándar promedio se determinó el día de la eclosión con 20 larvas; el crecimiento se obtuvo midiendo cinco larvas por contenedor cada dos días. Las larvas que alcanzaron el último día fueron medidas para el crecimiento final. Mortalidad y crecimiento fueron transformados a arcoseno y logaritmos respectivamente, y se empleó un análisis de covarianza para determinar diferencias. La tasa de crecimiento se obtuvo por regresión lineal con fines comparativos (Lasker *et al.*, 1970).

Las concentraciones letales (LC50) se determinaron con el análisis Probit a las 2, 8, 24, 48 y 96 horas, y debido a la mortalidad natural en los controles sin estímulo tóxico, un ajuste se efectuó por la fórmula de Abbott (Finney, 1971).

RESULTADOS

La temperatura promedio en todos los bioensayos fue de $18^{\circ}\text{C} \pm 0.3$. La salinidad cambió de 32 a $35^{\circ}/\text{oo}$, pero fue mínimo entre bioensayos de cada serie manteniéndose a $34.1\% \pm 0.432$; los valores mínimos de salinidad se registraron al inicio y se incrementaron con los días. El oxígeno disuelto (ml/l) varió de 5.0 a 8.2 con un promedio de 6.8 ± 0.431 . El pH presentó un intervalo de 7.3-8.59 (prom. 8.35 ± 0.109); valores máximos y mínimos fueron registrados indistintamente en contenedores y tiempo. Las concentraciones de cloro libre disminuyeron rápidamente después de añadirlo al agua.

En este estudio, ocho desoves de anchoveta fueron empleados. El tiempo de eclosión fue de 2.5 días a 18°C . Los bioensayos en estado de huevo se realizaron al mismo tiempo que la serie con larvas mantenidas sin alimento. La eclosión para los bioensayos con larvas de 1 día (sin alimento y con *Tetraselmis*), 3 días y 5 días (alimentación óptima) fue de 95, 91, 99 y 95 por ciento respectivamente.

Efecto del cloro en estadio de huevo de *E. mordax*

Los bioensayos con embriones de *E. mordax* sólo duraron 24 horas; la eclosión viable en los controles fue de 95 y 90 por ciento, pero en los tratamientos se observó un notable decremento aun en las bajas concentraciones (0.1 mg l^{-1}) y fue drástico con 0.5 en

Lethal concentrations (LC50) were determined by Probit analysis at 2, 8, 24, 48, and 96 hours, and because larvae can show natural mortalities without toxic stimulus, an adjustment was realized by Abbott's formula (Finney, 1971).

RESULTS

Mean temperature in all bioassays was $18^{\circ}\text{C} \pm 0.3$. Salinity ranged from 32 to $35^{\circ}/\text{oo}$ but was minimal between bioassays of series, maintaining around $34.1\% \pm 0.432$; minimal values of salinity were registered at the start of the experiment and increased with days. Dissolved oxygen (ml/l) varied from 5.0 to 8.2 with a mean of 6.8 ± 0.431 . Values of pH showed a range of 7.3-8.59 (8.35 ± 0.109); maximum and minimum values were indistinctly registered in containers and time. Concentrations of free chlorine fastly decreased after addition to seawater.

In this study, eight anchovy spawnings were used. Hatching time was 2.5 days at 18°C . Embryo bioassays were realized at the same time as the larval series maintained with no food. Hatching for bioassay series with 1-day (no food and with *Tetraselmis*), 3-day and 5-day (optimal food) larvae were 95, 91, 99 and 95 percent, respectively.

Effect of chlorine on embryo stage of *E. mordax*

Embryos of *E. mordax* were 36 hours old (late embryo) and bioassays were 24 hours only; hatching was produced in 2.5 days at 18°C . Viable hatch in controls was 95 and 90 percent, but in treatments a notable decrease even in low concentrations (0.1 mg l^{-1}) and drastic in 0.5 and up was observed (Fig. 1). Only one egg per bioassay with 1.0 mg l^{-1} showed viable hatch, and the rest were opaque whitish nonviable eggs. Surviving larvae at high concentrations ($0.5\text{-}1.0 \text{ mg l}^{-1}$) showed a continuous swimming or a slow but erratic movement. No difference was observed between nonviable hatch means of replicates (ANCOVA, $p = 0.8296$).

The 24 hour lethal concentrations (24hLC50) for *E. mordax* embryo stage replicates were 0.111 and 0.116 mg l^{-1} . For all mortality data, 24hLC50 was 0.114 mg l^{-1} (Table 1).

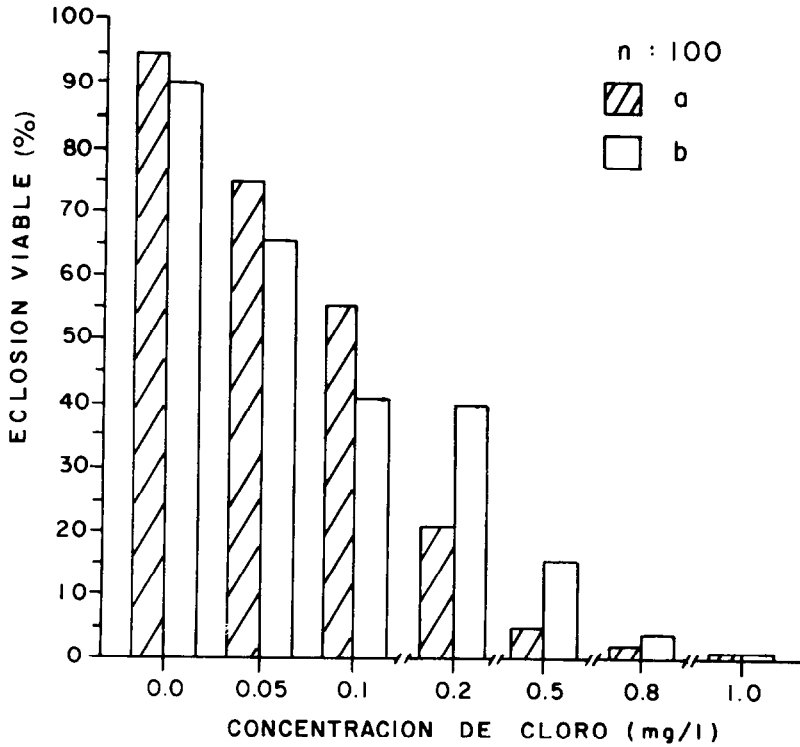


Figura 1. Porcentaje de eclosión viable en huevos de *Engraulis mordax* bajo cloración del agua de mar. El cloro se agregó a las 36 horas de la fertilización.

Figure 1. Viable hatch percent of *Engraulis mordax* eggs under seawater chlorination. Chlorine was added 36 hours after fertilization.

Tabla 1. Concentraciones letales (LC50) de cloro (mg l^{-1}) a diferentes tiempos de exposición, para huevos y larvas de *Engraulis mordax*. Los valores entre paréntesis son los LC50 para cada uno de los bioensayos repetidos.

Table 1. Lethal concentrations (LC50) of chlorine (mg l^{-1}) at different exposition times for eggs and larvae of *Engraulis mordax*. Values in parentheses are the LC50 for each replicated bioassay.

LC50	Huevos (36 horas)	Larva 1 día (sin alimento)	Larva 1 día (<i>Tetraselmis</i>)	Larva 3 días	Larva 5 días
2hLC50		0.251 (0.257, 0.244)	0.234 (0.248, 0.221)	0.312 (0.331, 0.307)	1.02 (1.15, 0.910)
8hLC50		0.241 (0.242, 0.241)	0.214 (0.224, 0.205)	0.276 (0.282, 0.270)	0.829 (0.859, 0.80)
24hLC50	0.116 (0.114, 0.111)	0.248 (0.237, 0.275)	0.179 (0.169, 0.195)	0.236 (0.237, 0.234)	0.79 (0.39, 0.484)
48hLC50		0.233 (0.217, 0.264)	0.183 (0.166, 0.207)	0.219 (0.225, 0.213)	0.71 (0.39, 0.484)
96hLC50					0.29 (0.25, 0.344)

adelante (Fig. 1). Solamente un huevo por bioensayo con 1.0 mg l^{-1} mostró eclosión viable, y el 99% restante fueron huevos no viables de color blanco opaco. Las larvas vivas en las altas concentraciones ($0.5\text{-}1.0 \text{ mg l}^{-1}$) mostraron una natación continua o movimientos lentos y erráticos. No se observó diferencia entre la eclosión viable de los bioensayos y sus repeticiones (ANCOVA, $p = 0.8296$).

Las concentraciones letales a las 24 horas (24hLC50) para los embriones de *E. mordax* fueron 0.111 y 0.116 mg l^{-1} para cada una de las repeticiones. Para todos los datos de mortalidad el 24hLC50 fue de 0.114 mg l^{-1} (Tabla 1).

Supervivencia de larvas de *E. mordax* de 1, 3 y 5 días

La supervivencia en los controles con larvas de 1 día (sin alimento) fue alta y estable durante los primeros seis días; un drástico decremento natural al séptimo día fue observado, y fue nula al noveno día después de la eclosión (Fig. 2). En los tratamientos menores a 0.2 mg l^{-1} , se presentó un ligero decremento en la supervivencia después de la cloración pero posteriormente se estabilizó. Con 0.5 , la supervivencia larval disminuyó drásticamente y el exterminio fue total en tan solo dos horas con 0.8 y 1.0 mg l^{-1} . El tratamiento con 0.2 mg l^{-1} (sin alimento) muestra una sola curva debido a la alta mortalidad (50%) presentada en su repetición antes de la cloración (Fig. 2). La supervivencia de larvas de 1 día mantenidas con *Tetraselmis* presentó un patrón semejante al de las larvas sin alimento, excepto que en los controles una pequeña fracción alcanzó el décimo día después de la eclosión (Fig. 2).

Con las larvas de 3 días alimentadas con nauplios de zooplancton y rotíferos, la supervivencia en los controles fue la más alta y alrededor de 70% alcanzó el día 12 después de la eclosión. En concentraciones de 0.2 mg l^{-1} y menores, se observó un ligero decremento en la supervivencia después de la cloración, pero al segundo día se estabilizó. En concentraciones de 0.5 mg l^{-1} en adelante se observó una declinación abrupta en la supervivencia, aunque con cierta tolerancia al cloro (Fig. 3).

En la serie de bioensayos donde se añadió el cloro al quinto día, la supervivencia en los controles fue alta hasta los seis días de

Survival of 1, 3 and 5-day *E. mordax* larvae

Survival in controls of 1-day larvae (no food) was high and stable during the first six days; a natural drastic decrease on the seventh day was observed, and survival was null on the ninth day after hatch (Fig. 2). In treatments up to 0.2 mg l^{-1} , a slight decreasing after chlorination was observed but was stable posteriorly. With 0.5 , survival decreased drastically to total extermination in two hours with 0.8 and 1.0 mg l^{-1} . Treatment of 0.2 ppm showed one survival curve, because the replicate presented a high mortality (50%) before chlorination, and data were excluded (Fig. 2). Survival of 1-day larvae maintained with *Tetraselmis* showed a resembling pattern with no food series, except that in controls a small fraction reached the tenth day after hatch (Fig. 2).

With 3-day larvae that fed on zooplankton nauplii and rotifers, survival in controls was highest and around 70% of the larvae reached the twelfth day after hatch. In 0.2 mg l^{-1} and less, a slight decrease in survival after chlorination was also observed, but it stabilized on the first or second day. With 0.5 mg l^{-1} and up, an abrupt decline of survival, although with a certain tolerance to chlorine was observed (Fig. 3).

In bioassay series with chlorine addition on the fifth day, survival in controls was high to six days after hatch; afterwards survival failed without toxic stimulus, however a half fraction of the total reached the twelfth day. In low chlorine concentrations ($< 0.2 \text{ mg l}^{-1}$), survival was similar to the controls during these days, but dropped quickly although not totally on the sixth day. In treatments with 1.0 mg l^{-1} , larval survival up to the third day after the chlorination was observed. Only five larvae in replicates with 0.8 mg l^{-1} reached the end of the experiment (twelfth day); these larvae were suitable to determine final growth. Bioassays with 0.5 mg l^{-1} showed greater tolerance after chlorination (Fig. 3) than those larvae of previous series.

In all bioassays of series, survival between replicates was similar (ANCOVA, $p > 0.287$). All treatments with 0.5 mg l^{-1} of chlorine and up showed differences with controls (ANCOVA, $p = 0.000$). A two-way ANOVA analysis revealed a greater interaction of chlorine concentrations on larval

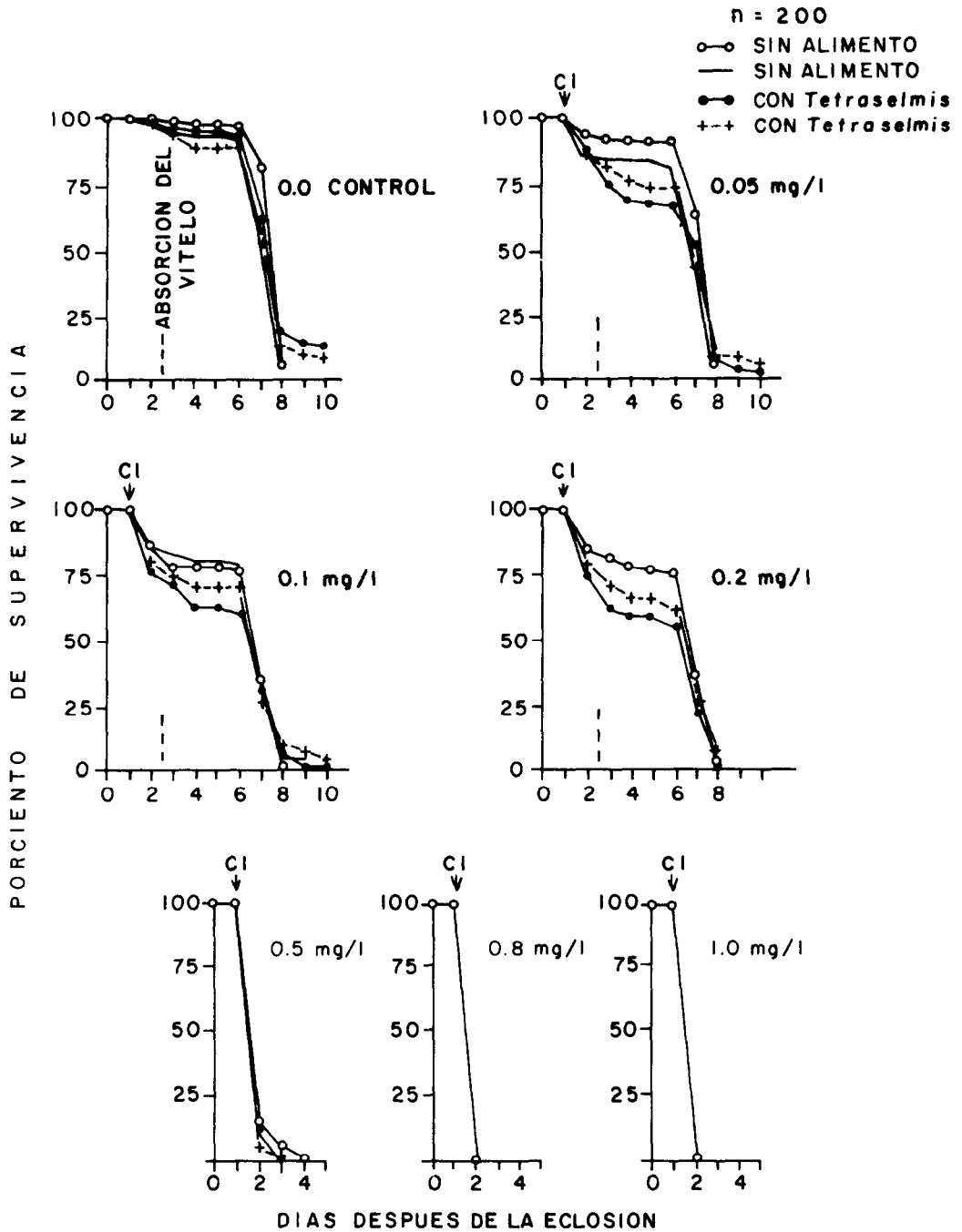


Figura 2. Porciento de supervivencia en larvas de *Engraulis mordax* de 1 día (sin alimento y con *Tetraselmis*) bajo cloración del agua de mar. La flecha vertical indica el día de la cloración.

Figure 2. Percent survival of *Engraulis mordax* 1-day larvae (no food and with *Tetraselmis*) under seawater chlorination. The vertical arrow indicates the chlorination day.

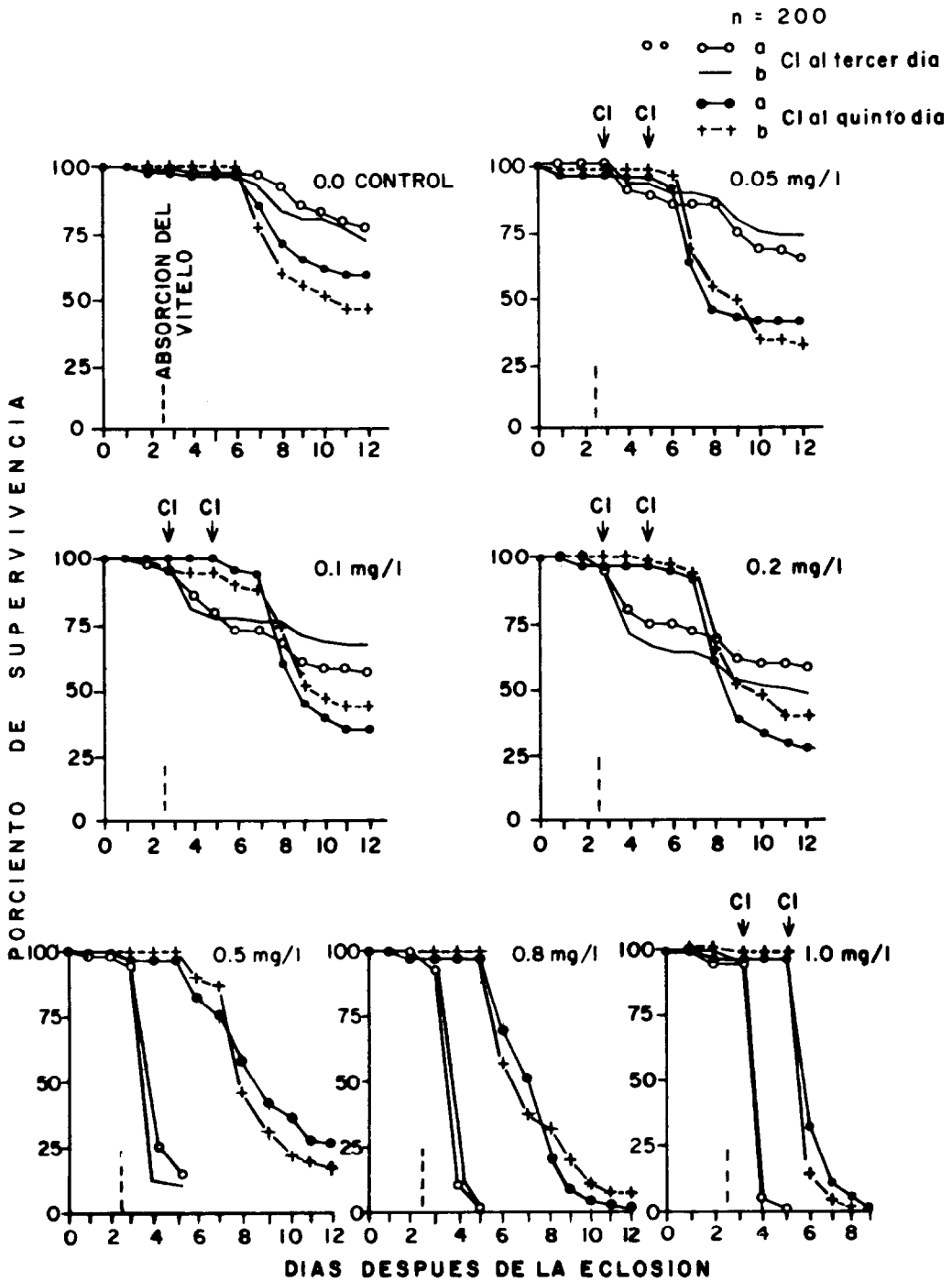


Figura 3. Porciento de supervivencia en larvas de *Engraulis mordax* (3 y 5 días) bajo cloración del agua de mar. La flecha vertical indica el día de la cloración.

Figure 3. Percent survival of *Engraulis mordax* (3 and 5-day) larvae under seawater chlorination. The vertical arrow indicates the chlorination day.

la eclosión; después disminuyó sin el estímulo del tóxico. Sin embargo, la mitad del total alcanzó el día 12. En bajas concentraciones de cloro ($< 0.2 \text{ mg l}^{-1}$), la supervivencia fue semejante a los controles durante los primeros días, cayendo rápidamente entre el séptimo y el octavo día aunque no totalmente. En los tratamientos con 1.0 mg l^{-1} , se observó una supervivencia larval hasta el tercer día de la cloración. Sólo cinco larvas en una de las dos repeticiones con 0.8 mg l^{-1} alcanzaron el final del experimento (día 12), y con ellas se determinó el crecimiento final. Las larvas en los bioensayos con 0.5 mg l^{-1} mostraron una mayor tolerancia después de la cloración (Fig. 3) que las larvas de las series anteriores.

En todos los bioensayos de las series, la supervivencia de las repeticiones fue similar (ANCOVA, $p > 0.287$). Todos los tratamientos de 0.5 mg l^{-1} en adelante mostraron diferencias con los controles (ANCOVA, $p = 0.000$). Un análisis de varianza de dos vías reveló una mayor interacción del cloro sobre la mortalidad larval que la producida por el tiempo ($p = 0.000$).

Concentraciones letales (LC50)

Las concentraciones letales de cloro para larvas de 1 día (sin alimento) decrecieron con el tiempo de exposición; después de la cloración, el LC50 a las dos primeras horas fue 0.252 mg l^{-1} , a las 24 horas fue 0.248 mg l^{-1} , y disminuyó aún más a las 48 horas 0.233 mg l^{-1} . Los LC50 para las larvas de 1 día mantenidas con *Tetraselmis* fueron ligeramente menores, 0.234 mg l^{-1} a las dos horas, y a las 24 horas y 48 horas fueron 0.179 y 0.183 mg l^{-1} de cloro (Tabla 1). Para las larvas de 3 días, los valores de las concentraciones letales fueron mayores a las dos horas (0.312 mg l^{-1}) que a las 24 horas (0.236) y a las 48 horas (0.219). Los LC50 para larvas de 5 días fueron altos en relación a los obtenidos en las series anteriores, aunque en todos los casos los LC50 disminuyeron con el tiempo; los 2h, 24h y 48hLC50 fueron 1.02 , 0.79 y 0.71 mg l^{-1} de cloro respectivamente, pero el 96hLC50 disminuyó a 0.29 mg l^{-1} (Tabla 1).

Crecimiento de larvas de *E. mordax*

En el día 0 (eclosión), las larvas de las diferentes series presentaron una longitud

mortality than that produced by time ($p = 0.000$).

Lethal concentrations (LC50)

Lethal concentrations of chlorine for 1-day larvae (no food) showed decreasing values with exposition time. After chlorination, the two hour LC50 was 0.252 mg l^{-1} , at 24 hours it was 0.248 mg l^{-1} , and it decreased at 48 hours to 0.233 mg l^{-1} . The LC50s for larvae maintained with *Tetraselmis* were 0.234 mg l^{-1} at two hours, and 0.179 and 0.183 mg l^{-1} of chlorine for 24 hours and 48 hours, respectively (Table 1). For 3-day-old larvae, values of lethal concentrations were slightly higher at two hours (0.312 mg l^{-1}) than at 24 hours (0.236) and 48 hours (0.219). The LC50s for 5-day larvae were much greater than those obtained in previous series; values of 2h, 24h and 48hLC50 were 1.02 , 0.79 and 0.71 mg l^{-1} of chlorine respectively, but 96hLC50 decreased to 0.29 mg l^{-1} (Table 1).

Growth of *E. mordax* larvae

On day 0 (hatching), larvae of different series showed mean standard lengths from 2.9 ± 0.121 to $3.16 \pm 0.264 \text{ mm}$ (Table 2). In 1-day larval series, growth data up to the sixth day after hatch in controls and treatments under 0.2 mg l^{-1} of chlorine were only obtained. Growth rate in controls (0.169 and 0.173 mm/day) in no-food series were slightly lower than in series maintained with *Tetraselmis* (0.169 and 0.173 mm/day). On the sixth day, smaller and greater mean standard lengths (3.88 and 4.26 mm) were recorded in no-food and maintained with *Tetraselmis* series, respectively (Table 2). No difference was found between the means of larval growth of controls and treatments, or between replicates in no-food and with *Tetraselmis* series (ANCOVA, $p = 0.9438$, $p = 0.9164$) (Table 2).

In the series of chlorine addition on the third day after hatch, growth data were obtained up to the tenth day in replicate treatment with 0.5 mg l^{-1} (Table 2); in this case, the final mean standard length was 6.78 mm and growth rate was 0.33 mm/day . In controls, mean standard lengths were 6.39 and 6.83 mm , but greater growth rate (0.34 mm/day) was found in the bioassay with 0.1

Tabla 2. Longitud estándar (mm) promedio de larvas de *Engraulis mordax* bajo cloración del agua de mar. La desviación estándar se presenta entre paréntesis.**Table 2.** Mean standard length (mm) of *Engraulis mordax* under seawater chlorination. The standard deviation is shown in parentheses.

Larvas sin alimento, día 0, 3.16 (0.264)

Cloro (mg l ⁻¹)	Día 2	Día 4	Día 6	a	b	r
0.0	3.57 (0.234)	4.18 (0.152)	4.03 (0.360)	3.26	0.169	0.812
0.0	3.52 (0.270)	4.13 (0.349)	4.08 (0.357)	3.20	0.173	0.803
0.05	3.47 (0.312)	4.09 (0.176)	4.09 (0.179)	3.18	0.173	0.854
0.05	3.38 (0.191)	4.33 (0.182)	4.08 (0.245)	3.18	0.184	0.809
0.1	3.40 (0.272)	4.12 (0.239)	4.12 (0.239)	3.15	0.170	0.859
0.1	3.32 (0.282)	3.95 (0.148)	3.88 (0.245)	3.17	0.149	0.769
0.2	3.42 (0.257)	4.40 (0.176)	3.93 (0.269)	3.17	0.171	0.752

Larvas con *Tetraselmis* sp., día 0, 2.9 (0.121)

Cloro (mg l ⁻¹)	Día 2	Día 4	Día 6	a	b	r
0.0	3.42 (0.189)	3.61 (0.152)	4.22 (0.307)	2.91	0.209	0.934
0.0	3.19 (0.164)	3.27 (0.099)	4.02 (0.344)	2.84	0.196	0.828
0.05	3.11 (0.121)	3.27 (0.099)	4.21 (0.318)	2.83	0.189	0.922
0.05	3.22 (0.121)	3.28 (0.210)	4.21 (0.318)	2.84	0.190	0.848
0.1	3.16 (0.139)	3.41 (0.182)	4.26 (0.198)	2.84	0.205	0.906
0.1	3.28 (0.136)	3.42 (0.330)	3.99 (0.215)	2.89	0.170	0.876
0.2	3.30 (0.180)	3.44 (0.206)	3.92 (0.204)	2.90	0.175	0.910
0.2	3.14 (0.234)	3.18 (0.249)	4.03 (0.230)	2.83	0.165	0.791

Larvas con alimentación óptima, día 0, 3.11 (0.107)

Cloro (mg l ⁻¹)	Día 6	Día 8	Día 10	a	b	r
0.0	3.91 (0.586)	5.34 (0.496)	6.39 (0.659)	2.87	0.299	0.794
0.0	4.05 (0.522)	5.71 (0.985)	6.83 (0.285)	2.89	0.324	0.798
0.05	3.61 (0.253)	5.49 (0.552)	5.80 (0.948)	2.88	0.271	0.749
0.05	3.83 (0.252)	5.65 (0.145)	5.73 (0.943)	2.92	0.272	0.686
0.1	3.78 (0.751)	5.41 (0.592)	6.85 (0.714)	2.74	0.335	0.695
0.1	3.76 (0.252)	5.75 (0.908)	6.35 (1.160)	2.82	0.315	0.783
0.2	3.65 (0.534)	5.18 (0.544)	6.04 (0.666)	2.90	0.268	0.747
0.2	3.22 (0.665)	5.19 (0.461)	6.43 (1.140)	2.69	0.296	0.577
0.5	3.47 (0.289)	5.35 (0.328)	—	3.05	0.180	0.674
0.5	3.61 (0.107)	5.63 (0.958)	6.78 (0.328)	2.70	0.330	0.671

estándar promedio de 2.9 ± 0.121 a 3.16 ± 0.264 mm (Tabla 2). En ambas series con larvas de 1 día, sólo se obtuvieron datos de crecimiento hasta el sexto día en los controles y tratamientos menores de 0.2 mg l^{-1} de cloro. Las tasas de crecimiento en los controles (0.169 y 0.173 mm/día) de la serie sin alimento fueron ligeramente menores a los de la serie mantenida con *Tetraselmis* (0.209 y 0.196 mm/día). Al sexto día, el menor y mayor promedio de longitud estándar (3.88 y 4.26 mm) se registraron en la serie mantenida sin alimento y con *Tetraselmis*, respectivamente (Tabla 2). No se encontró diferencia entre los promedios del crecimiento larval de controles y tratamientos o entre repeticiones de las series sin alimento y con *Tetraselmis* (ANCOVA, $p = 0.9438$, $p = 0.9164$).

En la serie donde se añadió el cloro al tercer día después de la eclosión, el crecimiento se obtuvo hasta el décimo día en uno de las repeticiones del tratamiento con 0.5 mg l^{-1} (Tabla 2); en este caso la longitud estándar promedio final fue de 6.78 mm y la tasa de crecimiento fue 0.33 mm/día. Las longitudes estándar promedio en los controles fueron 6.39 y 6.83 mm, pero la mayor tasa de crecimiento (0.34 mm/día) se encontró en uno de los bioensayos con 0.1 mg l^{-1} . No se encontró diferencia en la longitud estándar promedio de controles, tratamientos y repeticiones (ANCOVA, $p = 0.6662$).

En la última serie larval con la cloración al quinto día después de la eclosión, las tasas de crecimiento decrecieron con el aumento del cloro (Fig. 4). En los controles, las tasas fueron 0.44 y 0.39 mm/día, mientras que en el único tratamiento con 0.8 mg l^{-1} que alcanzó el día 12 fue de 0.26 mm/día (Fig. 4). El promedio final de longitud estándar para ambos controles fue 8.34 mm, y para el tratamiento con 0.8 mg l^{-1} fue de solo 6.04 mm; en este caso, se encontró una diferencia (ANCOVA, $p = 0.0350$) en las longitudes promedio. No se encontró diferencia en las densidades de alimento registradas diariamente en los tanques de cultivo (ANCOVA, $p = 0.2558$).

DISCUSION

Este estudio demuestra la toxicidad aguda del cloro a huevos y larvas de la anchoveta noroesteña (*Engraulis mordax*). Las larvas de anchoveta son pequeñas a la eclosión

mg l^{-1} of chlorine. No differences were found in growth means between controls, treatments and replicates (ANCOVA, $p = 0.6662$).

In the last series with chlorination on the fifth day after hatch, larval growth rate showed decreasing values with chlorine concentration increase (Fig. 4). In controls, growth rates were 0.44 and 0.39 mm/day, while in the single treatment with 0.8 mg l^{-1} that reached twelfth day after hatch it was 0.26 mm/day (Fig. 4). The mean value of final standard length for controls was 8.34 mm, and for 0.8 mg l^{-1} it was 6.04 mm. In this case, a statistical difference in growth means (standard length) was found (ANCOVA, $p = 0.0350$). No differences were observed in food densities that were registered daily in the culture tanks (ANCOVA, $p = 0.2558$).

DISCUSSION

This study demonstrates the acute toxicity of chlorine to eggs and larvae of northern anchovy (*Engraulis mordax*). Anchovy larvae are small at hatch with a relatively slow swimming movement, and can be entrained to power plant cooling systems that use chlorine as biocide.

Viable hatch of anchovy eggs was drastically reduced even in low concentrations of chlorine ($< 0.2 \text{ mg l}^{-1}$). The 24hLC_{50} for eggs (0.114 mg l^{-1}) is considerably lower than that for larvae, and concentrations added (up to 3.0 mg l^{-1}) to cooling systems (Goodman, 1987). No hatching eggs showed whitish coloration typical of dead eggs; some of them exhibited twisting notochord as a sign of chlorine stress. Some newly hatching larvae that survived in high concentrations (0.5 - 1.0 mg l^{-1}), showed a fast and continuous swimming or a slow and erratic swimming movement. This movement was abnormal and agonizing because 1-day larvae of anchovy display a relatively quiet swimming, with sporadic lashings and the anterior part of body inclined to the bottom.

Anchovy eggs have a thin chorion that is permeable to water and some salts, but no protection to external stress is exhibiting; this is similar to Pacific sardine eggs, *Sardinopsis caerulea* (Lasker and Theilacker, 1962). In this study, however, part of the effect of chlorine on eggs can be explained by their floating tendency, that maintains them on the water

Rosales Casián: Cloración del agua de mar y supervivencia y crecimiento de *E. mordax*

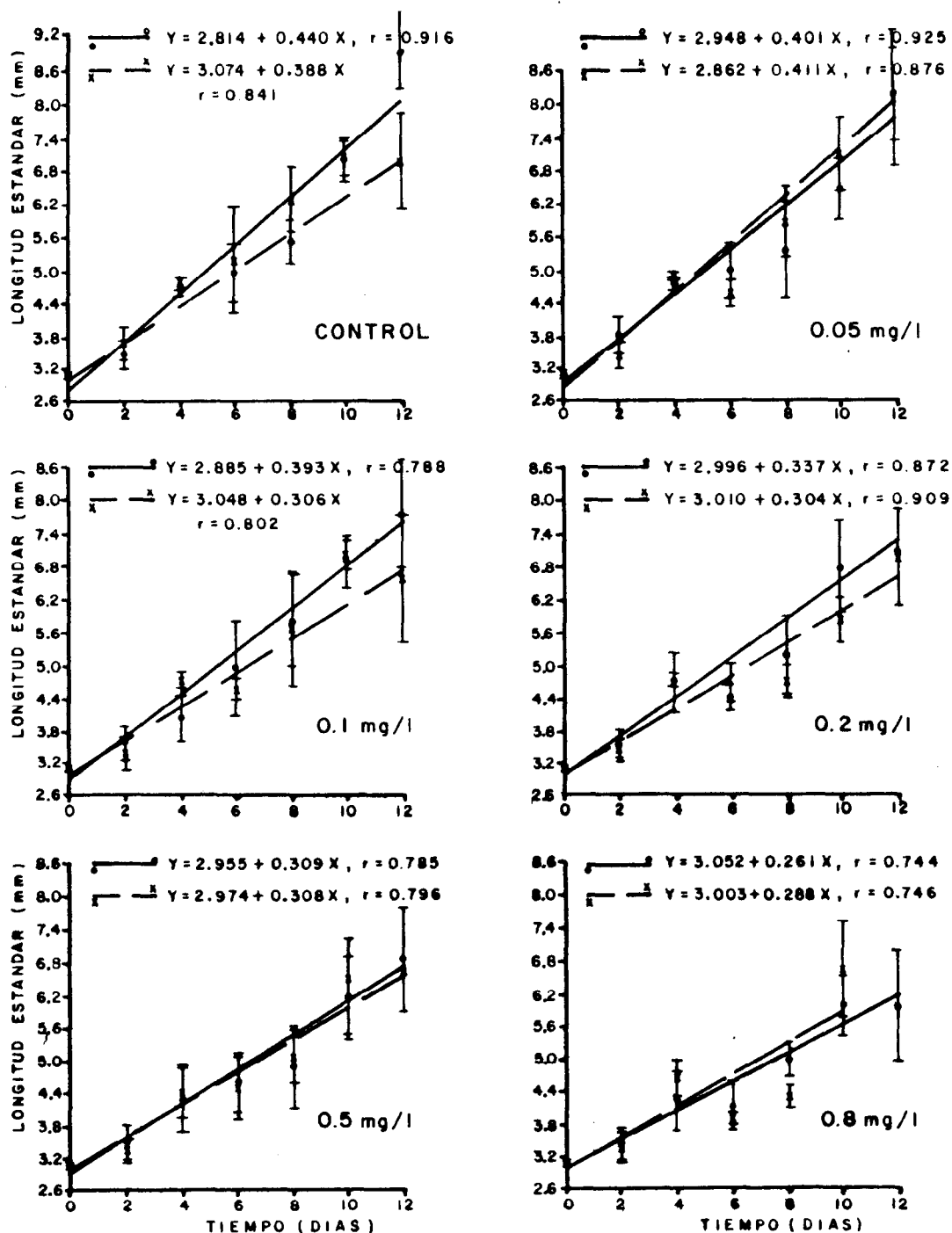


Figura 4. Crecimiento (mm) promedio en larvas de *Engraulis mordax* de 5 días bajo cloración del agua de mar y alimentadas con nauplios de copépodos. Las barras son la desviación estándar.
 Figure 4. Mean growth (mm) of *Engraulis mordax* 5-day larvae under seawater chlorination and feeding with copepod nauplii. Vertical bars are the standard deviation.

con una natación relativamente lenta, por lo que pueden ser acarreadas al interior de sistemas de enfriamiento de centrales eléctricas que usan el cloro como biocida.

La eclosión viable de los huevos de anchoveta fue drásticamente reducida aun en bajas concentraciones de cloro ($< 0.2 \text{ mg l}^{-1}$). El 24hLC50 para el estadio de huevo (0.114 mg l^{-1}) fue menor que los obtenidos para las larvas, pero todos los valores son considerablemente bajos tomando en cuenta las concentraciones (hasta 3.0 mg l^{-1}) que son agregadas a los sistemas de enfriamiento (Goodman, 1987). Huevos sin eclosionar mostraron coloración blanco opaco típico de huevos muertos; algunos de ellos exhibieron el notocordio torcido como signo del efecto del cloro. Después de la eclosión, algunas larvas que sobrevivieron a las altas concentraciones ($0.5\text{-}1.0 \text{ mg l}^{-1}$), mostraron una natación rápida y continua o lenta y errática; este movimiento fue considerado anormal y agónico debido a que las larvas de anchoveta de 1 día presentan una natación relativamente quieta, con coletazos esporádicos y la parte anterior del cuerpo inclinada al fondo.

Los huevos de anchoveta poseen un corión delgado que es permeable al agua y a algunas sales, pero protege a las larvas de perturbaciones externas; esto es similar para los huevos de la sardina del Pacífico *Sardinopsis caerulea* (Lasker y Theilacker, 1962). En este estudio, parte del efecto del cloro a los huevos puede ser explicado por su tendencia a flotar, que los mantuvo en la superficie del agua y durante la cloración fueron directamente afectados. Al igual que para huevos de anchoveta, otras especies han mostrado ser sensitivas al cloro; la eclosión viable de embriones de *Morone saxatilis* fue nula con 0.21 ppm , y sólo 23% de eclosión viable se presentó con 0.01 ppm (Middaugh *et al.*, 1977). Algunas especies han presentado resultados opuestos, embriones de *Fundulus heteroclitus* fueron más tolerantes a la cloración que sus larvas, por la presencia de un corión grueso que protege efectivamente de condiciones adversas (Middaugh *et al.*, 1978). Con 0.36 ppm , huevos de *Pleuronectes platessa* mostraron un 64% de eclosión viable los cuales se desarrollaron normalmente, mientras que el 50% de los estadios larvales fueron exterminados en 96 horas (Alderson, 1972). En el presente estudio, con una concentración de

surface and during chlorination were directly affected. Like anchovy eggs, other species have shown to be sensitive to chlorine; no viable hatch of *Morone saxatilis* embryos was displayed with 0.21 ppm , and only 23% of viable hatch with 0.01 ppm (Middaugh *et al.*, 1977). Some species show opposite results to the northern anchovy; *Fundulus heteroclitus* embryo stages were more tolerant to chlorination than its larval stages, by the presence of a thick chorion that effectively protects against adverse conditions (Middaugh *et al.*, 1978). With 0.36 ppm , *Pleuronectes platessa* eggs showed a 64% viable hatch which developed normally, while 50% of larval stages were exterminated in 96 hours (Alderson, 1972). In this study, with a chlorine concentration of 0.36 mg l^{-1} , a 29% of viable hatch for eggs of *Engraulis mordax* was calculated.

Survival of *E. mordax* larvae, in controls and treatments with 0.05 , 0.1 and 0.2 mg l^{-1} of chlorine, displayed similar results to other studies (O'Connell and Raymond, 1970; Lasker *et al.*, 1970): a high survival during the first six or seven days, a drastic decline afterwards and null at ninth day after hatch with no food, and around 40-50% survival at twelfth day with optimal food conditions. In this study, *E. mordax* larvae showed high sensitivity to chlorine, with 0.5 mg l^{-1} and up. The value of 24hLC50 was 0.248 mg l^{-1} for 1-day larvae in no food condition, and was similar to LC50 (0.241 mg l^{-1}) at same exposition time obtained for 1-day larvae of *Leuresthes tenuis* under optimal food (Rosales-Casián, 1986; Rosales-Casián *et al.*, 1990). Since chlorine reacts quickly with organic compounds and oxidizes the organic matter to produce less toxic compounds, the high density of *Tetraselmis* was expected to decrease the toxic effect. However, the lethal concentration of chlorine at 24 hours for 1-day larvae maintained with *Tetraselmis* sp. was slightly lower (0.18 mg l^{-1}) than those maintained with no food (0.248 mg l^{-1}).

Larvae of 3 days (*E. mordax*) resisted up to 24 hours in 1.0 mg l^{-1} of chlorine, compared with total extermination in only two hours of 1-day larvae; but when computing the 24hLC50 for 3-day larvae (0.236 mg l^{-1}) it was not different to 1-day larvae. This indicates high sensibility to chlorine in both stages. A drastic change in chlorine tolerance was observed with 5-day larvae, which with

cloro de 0.36 mg l^{-1} , se calculó un 29% de eclosión viable en los huevos de *Engraulis mordax*.

La supervivencia de larvas de *E. mordax* en los controles y tratamientos con 0.05, 0.1 y 0.2 mg l^{-1} de cloro, mostró resultados similares a otros estudios (O'Connell y Raymond, 1970; Lasker *et al.*, 1970): una alta supervivencia durante los primeros seis o siete días, después una drástica disminución hasta ser nula al noveno día (sin alimento), y alrededor del 40-50% al día 12 en óptimas condiciones de alimento. En este estudio, las larvas de *E. mordax* mostraron una alta sensibilidad al cloro con 0.5 mg l^{-1} en adelante. El valor del 24hLC50 fue de 0.248 mg l^{-1} para larvas de 1 día (sin alimento), y fue similar al 24hLC50 (0.241 mg l^{-1}) encontrado para larvas de *Leuresthes tenuis* de 1 día (Rosales-Casián, 1986; Rosales-Casián *et al.*, 1990). Debido a que el cloro reacciona rápidamente con compuestos orgánicos y oxida la materia orgánica formando compuestos menos tóxicos, se esperaba que la alta densidad de *Tetraselmis* disminuyera el efecto del cloro; sin embargo, el 24hLC50 para larvas de 1 día mantenidas con *Tetraselmis* fue ligeramente más bajo (0.18 mg l^{-1}) que las mantenidas sin alimento (0.248 mg l^{-1}).

Las larvas de *E. mordax* de 3 días resistieron hasta 24 horas en 1.0 mg l^{-1} de cloro comparado con la exterminación total en sólo dos horas de larvas de 1 día; al calcularse el 24hLC50 para larvas de 3 días no fue distinto (0.236 mg l^{-1}) a las larvas de 1 día, lo que indica la sensibilidad en ambas edades al cloro. Un cambio drástico en la tolerancia se presentó en las larvas de 5 días, las cuales con un tamaño mayor y con alimento óptimo, un 24hLC50 de 0.799 mg l^{-1} fue obtenido, un valor tres veces más que lo encontrado para larvas de 1 día y 3 días, aunque disminuyó a 0.29 mg l^{-1} a las 96 horas. El ajuste (fórmula de Abbott) depende de qué tan bien puede estimarse la mortalidad en los controles (Ashton, 1972); sin embargo, la alta mortalidad natural en los controles después del sexto o séptimo día, tiene una gran influencia en la estimación de las concentraciones letales.

En este estudio y observando los 24hLC50 para huevos y larvas en todas las series, una tolerancia al cloro con el aumento de la edad fue observada; resultados similares fueron encontrados para larvas de *Solea solea*

greater size and several days of exogenous optimal food, a 24hLC50 of 0.799 mg l^{-1} was obtained, a value three times higher than that found for 1-day and 3-day larvae, although it decreased to 0.29 mg l^{-1} at 96 hours. The adjustment (Abbott's formula) depends on whether a good estimate of mortality can be made in the control batch or not (Ashton, 1972); however, the high natural mortalities after the sixth and seventh day after hatch in controls, have a great influence on the estimation of the lethal concentrations.

In this study and taking values of 24hLC50 for all bioassay series of eggs and larvae, a chlorine tolerance with age increase was observed; similar results were found for larvae of *Solea solea* (Alderson, 1972). On the contrary, embryos of plaice *Pleuronectes platessa* showed less sensitivity than their larvae (Alderson, 1972), and 7-day larvae of *Fundulus heteroclitus* were more sensitive to chlorine than newly hatched larvae (Middaugh *et al.*, 1978).

At hatching, the means of standard length for *E. mordax* larvae were according to the literature for this species (Lasker *et al.*, 1970). In bioassays with 1-day and 3-day larvae, growth data were obtained with 0.2 mg l^{-1} and down of chlorine only, and no differences were found between controls and treatments. On the contrary, in bioassay series with 5-day larvae, growth data up to the twelfth day were obtained with 0.8 mg l^{-1} (replica bioassay) that showed a mean standard length of 6.04 mm; this length was smaller than that reported by Kramer and Zweifel (1970) and compared with the controls a statistical difference was found ($p = 0.0315$). With this, the effect of chlorine is not only restrictive to larval death but growth too.

Another effect of chlorine on fishes is the interruption of triosa phosphate dehydrogenase, an important enzymatic system for the utilization of glucose (Green and Stumpf, 1946), which makes them unable to provide sufficient energy to maintain homeostasis (Zeitoun *et al.*, 1977). The chlorine effect extends to total or partial extermination of food organisms, and larvae were maintained under suboptimal feeding and physiological stress really. Although in this study the effect of chlorine was not determined on food organisms, mean densities of *Tetraselmis* sp. added to 1-day larvae series were substan-

(Alderson, 1972). Por el contrario, embriones de la platija *Pleuronectes platessa* mostraron menor sensibilidad que sus larvas (Alderson, 1972), y las larvas de *Fundulus heteroclitus* de 7 días fueron más sensibles al cloro que las larvas de 0 días (Middaugh *et al.*, 1978).

Los promedios de longitud estándar al día 0 para larvas de *E. mordax* fueron acordes a la literatura para esta especie (Lasker *et al.*, 1970). En los bioensayos con larvas de 1 día y 3 días, los datos de crecimiento no presentaron diferencias porque sólo se obtuvieron en las concentraciones bajas. Por el contrario, en la serie con larvas de 5 días se obtuvo la longitud estándar hasta el día 12 después de la eclosión sólo en la repetición con 0.8 mg l^{-1} , resultando un promedio de 6.04 mm; esta longitud es menor a lo reportado por Kramer y Zweifel (1970), y a su vez fue diferente (ANCOVA, $p = 0.0315$) al promedio encontrado en los controles. Con esto, el efecto del cloro no se restringe a la muerte de las larvas sino también al crecimiento.

Otro efecto del cloro a los peces es la interrupción del sistema enzimático (triosa fosfato deshidrogenasa) esencial para la utilización de la glucosa (Green y Stumpf, 1946), y que los incapacita para proveerse suficiente energía para mantener la homeóstasis (Zeitoun *et al.*, 1977). Su efecto se extiende a los organismos que son proporcionados como alimento, por tanto las larvas se mantienen bajo alimentación subóptima y perturbaciones fisiológicas. Aunque en este estudio el efecto del cloro no fue determinado en los organismos-alimento, las densidades promedio de *Tetraselmis* sp. proporcionadas a las larvas de 1 día fueron substancialmente diferentes (ANCOVA, $p < 0.001$) entre controles y tratamientos, debido principalmente a la acción del cloro. En la literatura, el rotífero *Brachionus plicatilis*, el cual fue parte del alimento para las larvas de anchoveta, presentó un bajo LC50 de 0.18 ppm de cloro en 48 horas (Capuzzo, 1979). Estudios de laboratorio indican que niveles bajos de cloro (< 0.25 ppm) pueden producir daño moderado al fitoplancton, y es relativamente seguro para el ictioplancton y los copépodos si la exposición no excede por un tiempo de una hora (Gentile *et al.*, 1976).

Para el caso de larvas de anchoveta sin branquias presentes, la respiración se lleva a cabo de forma cutánea ayudada por movimientos natatorios (Wheis, 1981), y de

tialmente diferente ($p < 0.001$) between control and treatment tests. In the literature, a low LC50 of 0.18 ppm of chlorine in 48 hours was reported for the rotifer *Brachionus plicatilis* (Capuzzo, 1979), which was part of the food for the anchovy larvae. Laboratory studies indicate that lower levels of chlorine (< 0.25 ppm) may show only moderate damage to phytoplankton, and be relatively safe for ichthyoplankton and copepods if exposures do not exceed one hour (Gentile *et al.*, 1976).

For the case of larval anchovies with no gills present, breathing is cutaneous helped by swimming movements (Wheis, 1981), and so chlorine affects the whole body, disrupts cell functions and vital physiological functions by a pH decrease of internal fluids (Miller *et al.*, 1979). In this study, the chlorine has demonstrated specific toxicity to embryos and larvae of *Engraulis mordax*.

The effect on eggs and larval fishes by the operation of power plant cooling systems, can be greater if they are located on coastal lagoons, estuaries or bays. Chlorine as only one disturbing factor, with difficulty will be one which causes a fish population to decrease, but interaction with other biotic and abiotic variables or synergistic effects can increase impact on intake and discharge zones. The results of this study provide a basis for the evaluation of the environmental impact produced by chlorine and the operation of cooling systems.

ACKNOWLEDGEMENTS

I am thankful to the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) for their support during my M.Sc. degree studies. Thanks to Enrique Carrillo for his advise on fish larvae culture. Rebeca Vázquez took part in the laboratory work. Thanks to Gregory Hammann for the facilities to finish this paper and his comments.

English translation by the author.

esa manera el cloro afecta a todo el cuerpo, interrumpe funciones celulares y funciones fisiológicas por el decremento del pH de los fluidos internos (Miller *et al.*, 1979). En este estudio, el cloro ha presentado una toxicidad aguda y a corto plazo para huevos y larvas de *Engraulis mordax*.

El efecto del cloro en huevos y larvas de peces por la operación de sistemas de enfriamiento de centrales eléctricas puede ser mayor si se localizan en lagunas costeras o bahías. El cloro como un solo factor de perturbación, es difícil que cause el decremento de una población de peces, pero la interacción con otros factores bióticos o abióticos puede producir efectos sinérgicos e incrementar el impacto por la operación de esos sistemas. Los resultados de este estudio proveen una base para la evaluación del impacto producido por el cloro y la operación de sistemas de enfriamiento.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) el apoyo brindado al autor durante sus estudios de maestría. A Enrique Carrillo por su asesoría en el cultivo de larvas de peces. Rebeca Vázquez participó en el trabajo de laboratorio. Se agradece a Gregory Hammann por las facilidades para la terminación de este artículo, así como sus críticas en la revisión del manuscrito.

LITERATURA CITADA

- Alderson, R. (1972). Effects of low concentrations of free chlorine on eggs and larvae of plaice *Pleuronectes platessa* L. In: M. Riuvo (ed.), Marine Pollution and Sea Life. London: Fishing News (Books), pp. 312-315.
- Ashton, W.D. (1972). The Logit Transformation, with special referenceto its uses in bioassay. Charlie Griffin & Co. Ltd., London, 88 pp.
- Burton, D.T. (1977). General test conditions and procedures for chlorine toxicity with estuarine and marine macroinvertebrates and fishes. Chesapeake Sci., 18: 130-136.
- Capuzzo, J.M. (1977). The effects of free chlorine and chloramine on growth and respiration rates of larval lobsters (*Homarus americanus*). Water Res., 11: 1021-1024.
- Capuzzo, J.M. (1979). The effect of temperature on the toxicity of chlorinated cooling waters to marine animals - a preliminary review. Mar. Pollut. Bull., 10: 45-47.
- Capuzzo, J.M., Goldman, J.C., Davidson, J.A. and Lawrence, S.A. (1977). Chlorinated cooling waters in the marine environment: development of effluent guidelines. Mar. Pollut. Bull., 8: 161-163.
- Chow, W., Murarka, I.P. and Brocksen, R.W. (1981). Entrainment and impingement in power plant cooling systems. J. Water Pollut. Control Fed., 53: 965-973.
- Dickson, K.L., Hendricks, A.C., Crossman, J.S. and Cairns, J. (1974). Effects of intermittently chlorinated cooling tower blowdown on fish and invertebrates. Environ. Sci. Technol., 8(9): 845-849.
- Environmental Protection Agency (EPA) (1979). Methods for chemical analysis of water and wastes. EPA-600/4-79-020, March 1979.
- Espinosa, L.R. (1985). Why work inshore? The need for marine fisheries data in environmental decision-making. CalCOFI Abstracts, CalCOFI Annual Conference 1985.
- Finney, D.J. (1971). Probit Analysis (third edition). Cambridge Univ. Press, New York, 333 pp.
- Gentile, J.H., Cardin, J., Johnson, M. and Sosnowski, S. (1976). Power plants, chlorine, and estuaries. EPA-600/3-76-005, June 1976.
- Goldman, J.C. (1979). Chlorine in the marine environment. Oceanus, 22(3): 36-43.
- Goodman, P.D. (1987). Effect of chlorination on materials for sea water cooling systems: a review of chemical reactions. Br. Corros. J., 22: 56-62.
- Green, D.E. and Stumpf, P.K. (1946). A note on enzymatic method of estimating chlorine. J. Amer. Water Works Assoc., 38: 1306-1303.
- Hall, L.W., Helz, G.R. and Burton, D.T. (1981). Power plant chlorination, a biological and chemical assessment. Ann Arbor, MI. Ann Arbor Science Pub., 237 pp.
- Hoss, D.E., Clemens, L.C. and Colby, D.R. (1977). Synergistic effects of exposure to temperature and chlorine on survival of young-of-the-year estuarine fishes, pp. 345-354. In: F.J. Vernberg, A. Calabrese, F.P. Thurberg and W.B. Vernberg (eds.), Physiological Responses of Marine Biota to Pollutants. Academic Press Inc., N.Y., 462 pp.

- Houde, E.D. (1978). Critical food concentrations for larvae of three species of subtropical marine fishes. *Bull. Mar. Sci.*, 28: 395-411.
- Houde, E.D. and Scheker, R.C. (1981). Growth rates and cohort consumption of marine fish larvae in relation to prey concentrations. *Rapp P. V. Reun. Cons. Perm. Int. Explor. Mer.*, 178: 441-453.
- Hunter, J.R. (1981). Feeding ecology and predation of marine fish larvae, pp. 33-37. In: R. Lasker (ed.), *Marine Fish Larvae*. Wash. Sea Grant Program, Univ. Washington Press, Seattle, 131 pp.
- Kramer, D. and Zweifel, J.R. (1970). Growth of anchovy larvae, *Engraulis mordax*, in the laboratory as influenced by temperature. *Rep. Calif. Coop. Oceanic Fish.*, 14: 84-87.
- Larson G.L., Warren, C.E., Hutchins, F.E., Hutchins, L.P., Lamperti, L.P., Sclensing, D.A. and Seim, W.K. (1980). Toxicity of residual chlorine compounds to aquatic organisms. EPA-600/3-78-023.
- Lasker, R. and Theilacker, G.H. (1962). Oxygen consumption and osmoregulation by single Pacific sardine eggs and larvae (*Sardinopsis caerulea* Girard). *J. Cons. Int. Explor. Mer.*, 27: 25-33.
- Lasker, R. and Vlymen, L.L. (1969). Experimental Sea-Water Aquarium Bureau of Commercial Fisheries. Fishery-Oceanography Center, La Jolla, California. *Circ. Fish Wildl. Serv.*, Wash. U.S. No. 334, 14 pp.
- Lasker, R., Feder, H.M., Theilacker, G.H. and May, R.C. (1970). Feeding, growth and survival of *Engraulis mordax* larvae reared in the laboratory. *Mar. Biol.*, 5: 345-353.
- Lawrence, G.C. (1975). Laboratory growth and metabolism of the winter flounder *Pseudopleuronectes americanus* from hatching through metamorphosis at three temperatures. *Mar. Biol.*, 32: 223-229.
- Leong, R. (1971). Induced spawning of northern anchovy (*Engraulis mordax* Girard). *Fish. Bull. U.S.*, 69: 357-360.
- McLean, R.I. (1973). Chlorine and temperature stress on estuarine invertebrates. *J. Water Pollut. Control Fed.*, 45: 837-841.
- Middaugh, D.P., Couch, J.A. and Crane, A.M. (1977). Responses of early life history stages of the striped bass, *Morone saxatilis*, to chlorination. *Chesapeake Sci.*, 18: 141-153.
- Middaugh, D.P., Dean, J.M., Domey, R.J. and Floyd, G. (1978). Effect of thermal stress and total residual chlorination on early life stages of the mummichog *Fundulus heteroclitus*. *Mar. Biol.*, 46: 1-8.
- Miller, W.R. III, Gruber, D., Cairns, J. Jr. and Hendricks, A.C. (1979). Biological monitoring of chlorine-induced ventilatory damages in bluegill sunfish *Lepomis macrochirus*, pp. 588-597. In: R.L. Jolley, W.A. Brungs, R.B. Cumming and V.A. Jacobs (eds.), *Water Chlorination, Environmental Impact and Health Effects*. Vol. 3. Ann Arbor Science, 641 pp.
- O'Connell, C.P. and Raymond, L.P. (1970). The effect of food density on survival and growth of early post yolk-sac larvae of the northern anchovy in the laboratory. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 5: 187-197.
- PNLV (1979). Proyecto Nucleoeléctrico de Laguna Verde, U1 y 2. Informe Ambiental. Sistema de Disipación de Calor. Cap. 2.0, Secc. 2.4, 2.4-2.
- Rosales Casián, J.A. (1986). Efecto de la cloración del agua de mar en la supervivencia y el crecimiento de larvas de la anchoveta norteña (*Engraulis mordax* Girard) y el grujón (*Leuresthes tenuis* Ayres) cultivadas en laboratorio, con referencia a sistemas de enfriamiento de centrales eléctricas. Tesis de Maestría, CICESE, México, 115 pp.
- Rosales-Casián, J.A., Alfonso-Hernández, M. y Hammann, M.G. (1990). Efecto de la cloración del agua de mar en la supervivencia y crecimiento de larvas del grujón *Leuresthes tenuis* Ayres, en condiciones de laboratorio. *Ciencias Marinas*, 16(2): 31-46.
- Thatcher, T.D., Schneider, M.J. and Wolf, E.W. (1976). Bioassay on the combined effects of chlorine, heavy metals and temperature on juvenile brook trout

- (*Salvelius fontinalis*). Bull. Environ. Contam. Toxicol., 15: 40-48.
- Wheis, D. (1981). Swimming of yolk-sac larval anchovy (*Engraulis mordax*) as a respiratory mechanism. Rapp. P-V Reun. Cons. Int. Explor. Mer., 178: 327.
- Zeitoun, I.H., Hughes, L.D. and Ullrey, D.E. (1977). Effect of shock exposures of chlorine on the plasma electrolyte concentrations of adult rainbow trout (*Salmo gairdneri*). J. Fish. Res. Board Can., 34: 1034-1039.