

**EFFECTO DE LA CLORACION DEL AGUA DE MAR EN LA
SUPERVIVENCIA Y CRECIMIENTO DE LARVAS DEL
GRUÑÓN (*Leuresthes tenuis* AYRES),
EN CONDICIONES DE LABORATORIO**

**EFFECT OF SEAWATER CHLORINATION ON THE SURVIVAL AND
GROWTH OF GRUNION (*Leuresthes tenuis* AYRES) LARVAE,
IN LABORATORY CONDITIONS**

Jorge A. Rosales-Casián ¹
Irma Alfonso-Hernández ²
M. Gregory Hammann ¹

1 Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada
Apartado Postal 2732, Ensenada, Baja California, México
U.S. Mailing Address: P.O. Box 4844, San Ysidro, Ca. 92073, USA

2 Centro de Investigaciones Pesqueras del Ministerio de la Industria Pesquera
Calle 1a. y 26, Rpto. Miramar, Mpio. Playa, Cd. Habana, Cuba

Rosales-Casián, J.A., Alfonso-Hernández, I. y Hammann, M.G. (1990). Efecto de la cloración del agua de mar en la supervivencia y crecimiento de larvas del gruñón (*Leuresthes tenuis* Ayres), en condiciones de laboratorio. Effect of seawater chlorination on the survival and growth of grunion (*Leuresthes tenuis* Ayres) larvae, in laboratory conditions. Ciencias Marinas, 16(2): 31-46.

RESUMEN

Un número de 21 bioensayos duplicados fueron realizados para determinar el efecto del cloro (hipoclorito de sodio) en la supervivencia y crecimiento de larvas del gruñón de California (*Leuresthes tenuis*) de 1, 4 y 16-días de edad. En el laboratorio, las larvas fueron mantenidas en técnica semiestática a 17.8°C, y alimentadas con nauplios de *Artemia*. Después de la cloración se presentó en general un drástico decremento en la supervivencia con 0.2 mg l⁻¹ Cl₂ y fue nula en menos de dos horas con 1.0 mg l⁻¹. Las concentraciones letales (LC50) después de las primeras dos horas para las larvas de 1, 4 y 16-días fueron 0.255, 0.15 y 0.119 mg l⁻¹ Cl₂ respectivamente; los valores de LC50 a 24 h (0.252, 0.139 y 0.118) y 48 h (0.209, 0.121 y 0.116 mg l⁻¹) fueron muy similares. Los valores de LC50s se consideran muy bajos, considerando los niveles de cloro (0.5 a 3.0 mg l⁻¹) que son dosificados al agua de mar de sistemas de enfriamiento de centrales eléctricas. Datos de crecimiento fueron obtenidos solamente en concentraciones bajas de cloro; para la serie de bioensayos con larvas de 4-días, se observó una tasa de crecimiento significativamente más baja con el incremento de la concentración del cloro. La alta sensibilidad al cloro y la facilidad para su manejo en laboratorio de las larvas de gruñón, demuestran su utilidad en futuros bioensayos con otras sustancias tóxicas.

ABSTRACT

Twenty-one bioassays were done to determine the effect of chlorine (sodium hypochlorite) on the survival and growth of 1, 4 and 16-day-old California grunion (*Leuresthes tenuis*) larvae. In the laboratory, larvae were maintained under semistatic conditions at 17.8°C, and fed with *Artemia* nauplii. After chlorination there was generally a drastic decrease in survival with 0.2 mg l⁻¹ Cl₂ and was null in less than two hours with 1.0 mg l⁻¹. The lethal concentrations (LC50)

after the first two hours for 1, 4 and 16-day larvae were 0.255, 0.15 and 0.119 mg l⁻¹ Cl₂ respectively; the LC50 values at 24 h (0.252, 0.139 and 0.118) and 48 h (0.209, 0.121 and 0.116 mg l⁻¹) were quite similar. These LC50s are low considering the dosing levels (0.5 to 3.0 mg l⁻¹) of chlorine that is added to water of power plant cooling systems. Growth data were obtained for low chlorine concentrations only. For 4-day-old larvae series, a significantly slower growth rate with an increase in chlorine concentration was observed. The high sensitivity to chlorine and ease of handling of California grunion larvae, demonstrate its usefulness in future bioassay studies with other toxic substances.

INTRODUCCION

El cloro es usado como un fuerte oxidante en la esterilización del agua potable, en el tratamiento del agua de drenaje, y para prevenir y controlar las bioincrustaciones en el sistema de enfriamiento de centrales eléctricas. Las centrales eléctricas costeras requieren grandes volúmenes de agua de mar para su sistema de enfriamiento. El uso del cloro como biocida y el abrupto aumento de temperatura son los riesgos más importantes para los organismos que entran con el flujo de agua (Chow *et al.*, 1981).

Las larvas de peces son afectadas por la cloración debido a su sensibilidad a perturbaciones externas, así como su relativa baja abundancia y largos períodos de generación. Sin embargo, el impacto de las centrales eléctricas puede ser significativo cuando se localicen en lugares semicerrados como bahías o lagunas costeras, que funcionan como áreas de desove o protección a los estadios larvales de peces marinos.

En una revisión de los efectos del cloro en peces estuarinos y marinos (Hall *et al.*, 1981b), los estudios con estadios larvales fueron escasos. Peces de agua dulce han sido usados para determinar el efecto del cloro en las proteínas del plasma de la trucha arcoiris *Salmo gairdneri* (Booth *et al.*, 1981), para probar sistemas de toxicidad (Mattice *et al.*, 1981; Brooks y Bartos, 1984) y para determinar la evasión al cloro y temperatura (Cherry *et al.*, 1982).

En peces marinos se ha determinado el efecto del cloro en el comportamiento de adultos (Hose *et al.*, 1983b), en las respuestas fisiológicas (Hose *et al.*, 1983a), y en el efecto del agua caliente y declarada en el comportamiento del pez (Hose *et al.*, 1984). Aunque se ha mostrado la sensibilidad de algunos peces marinos al cloro (Hall *et al.*, 1982), es

INTRODUCTION

Chlorine is used as a strong oxidant in potable water sterilization, in the treatment of sewage water, and to prevent and control fouling in power plant cooling systems. Coastal power plants require large volumes of seawater for their cooling systems. The use of chlorine as a biocide to prevent fouling, and the abrupt temperature increase, have been identified as the most important risks to organisms following their entrainment with uptake water (Chow *et al.*, 1981).

Fish larvae are affected by chlorination due to their sensitivity to external disturbances, and relatively low abundance and long generation times. Nevertheless, the impact of a power plant may be significant when located in semi-enclosed areas such as bays or coastal lagoons, that are important as spawning or nursery areas to early life stages of coastal marine fishes.

In a review of chlorine effects on estuarine and marine fishes (Hall *et al.*, 1981b), studies with early life stages were scarce. Freshwater fishes have been used to determine the effect of chlorine on plasma proteins of rainbow trout, *Salmo gairdneri* (Booth *et al.*, 1981), to test toxicity (Mattice *et al.*, 1981; Brooks and Bartos, 1984) and fish avoidance responses to chlorine and temperature (Cherry *et al.*, 1982).

Studies with marine fishes have determined chlorine effects on adult fish behavior (Hose *et al.*, 1983b), on physiological responses (Hose *et al.*, 1983a), and the effect of heated-dechlorinated water on fish behavior (Hose *et al.*, 1984). Although studies have shown the sensitivity of some marine fish species to chlorine (Hall *et al.*, 1982), it is necessary to study the developmental stages of other species to determine possible differences.

necesario estudiar los estadios de desarrollo de otras especies para determinar posibles diferencias.

El grujón de California (*Leuresthes tenuis*) es un importante componente ecológico de la comunidad costera en el Pacífico de Baja California (México) y California (EUA). Desova en playas arenosas durante las mareas nocturnas más altas de febrero a septiembre, y en este período están disponibles para su estudio. Las larvas permanecen cerca de la costa y en lagunas costeras (Castro-Longoria y Grijalva-Chon, 1988), y son susceptibles al acarreo al interior de sistemas de enfriamiento de centrales eléctricas o ser afectadas por descargas de drenaje con alto contenido de cloro residual.

El objetivo de este estudio fue determinar el efecto del cloro en la supervivencia y crecimiento de larvas del grujón de California (*Leuresthes tenuis*), determinar las concentraciones letales que exterminan al 50% de los organismos en prueba (LC50) a diferentes tiempos de exposición, y observar la utilidad de las larvas del grujón para otros bioensayos con sustancias tóxicas.

MATERIALES Y METODOS

Se realizaron tres series de bioensayos con larvas del grujón de 1, 4 y 16 días. Durante el desove de los adultos en "Playitas", Ensenada, B.C. (México), huevos y esperma se obtuvieron manualmente y se mezclaron en un frasco de vidrio. En el laboratorio se colocaron en botellas de suero clínico (un litro) cubiertas de papel aluminio y con aereación suficiente para mantener los huevos en suspensión hasta la eclosión (12-13 días).

En las series con larvas de 1 y 4 días, 100 larvas fueron colocadas en cada uno de los tanques circulares negros (cloruro de acrílico polivinílico) y con capacidad de 10 litros (35 cm diámetro x 14 cm alto) (Lasker *et al.*, 1970). Debido al mayor tamaño de las larvas de 16 días, sólo se usaron 50 por tanque. No se proporcionó aeración a los tanques para evitar daños a las larvas.

El agua de mar fue filtrada hasta una micra y esterilizada con rayos UV. Se empleó la técnica semiestática (Houde y Schekter,

The California grunion (*Leuresthes tenuis*) is an important ecological component in the nearshore community of the Pacific coast of Baja California (Mexico) and California (USA). This species spawns on sandy beaches during the highest nocturnal tides of February to September, during which time they are accessible to study. Larvae are near-shore and mainly abundant in coastal lagoons (Castro-Longoria and Grijalva-Chon, 1988), and may be highly susceptible to entrainment in coastal power plant cooling systems or affected by sewage discharges with a high residual chlorine content.

The objective of this study was to determine the effect of chlorine on the survival and growth of California grunion (*Leuresthes tenuis*) larvae, to obtain the lethal concentrations that kill 50% of the test organisms (LC50) at different exposure times, and to observe the usefulness of grunion larvae for other toxic substance bioassays.

MATERIALS AND METHODS

Three bioassay series were done with 1, 4 and 16-day grunion larvae. Sperm and eggs were manually obtained and mixed in a beaker during the spawning run of adults on Playitas Beach, Ensenada, B.C. (Mexico). In the laboratory, eggs were placed in covered 1-liter serum bottles with sufficient aeration to maintain them in suspension until hatching (12-13 days).

For 1 and 4-day larvae series, 100 larvae were placed in each black 10-liter (acrylic polyvinyl chloride) circular (35 cm diameter x 14 cm depth) tank (Lasker *et al.*, 1970); due to the larger size of 16-day larvae, five larvae per liter were used. No aeration was provided to the tanks to avoid larval stress.

Filtered (1 micron) and UV sterilized seawater was used. The semistatic technique was employed (Houde and Schekter, 1981) with a daily renovation of 150 ml of water to check dissolved O₂ (D.O.) with a YSI oxygen meter, and pH with an "Orion 901" ion analyzer. Water temperature was maintained at 18°C by air conditioning; salinity was determined daily with a "Goldberg T/C" refractometer, and maintained at 34‰ by distilled water additions. To help maintain

1981) con una renovación diaria de 150 ml de agua para determinar oxígeno disuelto O₂ (O.D.) con un oxígeno metro YSI, y el pH con un analizador de iones "Orion 901"; la salinidad se determinó diario con un refractómetro "Goldberg T/C", y se mantuvo a 34% con diluciones de agua destilada. La temperatura se mantuvo a 18°C por medio de aire acondicionado. Para ayudar a mantener la calidad del agua, se proporcionó 5000 cel/ml de *Tetraselmis* sp. (Houde y Schekter, 1981). Las larvas fueron alimentadas diariamente con nauplios de *Artemia* (1 nauplio ml⁻¹) de quistes recién eclosionados.

En las centrales eléctricas, el agua del sistema de enfriamiento se descarga rápidamente y un volumen de agua no es clorado dos veces. En este estudio sólo una dosis de cloro fue agregada a los tanques, utilizando una pipeta digital (Eppendorf) con exactitud de ± 1.5 a 0.6%; no se intentó mantener un nivel constante de cloro residual, por tanto el cloro libre decrece rápidamente en el agua de los tanques al igual que en los sistemas de enfriamiento. Soluciones estandarizadas de cloro se prepararon antes de cada serie de bioensayos con hipoclorito de sodio (12.5%) y agua destilada y deionizada; las soluciones fueron mantenidas en la oscuridad dentro de un refrigerador.

Aunque se sugiere utilizar el método amperométrico en la determinación del cloro (Quinby-Hunt *et al.*, 1986), se presentan problemas si la determinación se realiza en agua de mar con concentraciones menores de 1.0 mg l⁻¹ y especialmente en menos de 0.1 mg l⁻¹ (Wong, 1980, 1982; Quinby-Hunt *et al.*, 1986). En este estudio el decaimiento del Cl₂ fue vigilado por el método colorimétrico del DPD el cual ofrece resultados confiables (Hall *et al.*, 1981b; Quinby-Hunt *et al.*, 1986), y se basa en la reacción de los compuestos activos de cloro con el N,N-diethyl-p-fenileno-diamina (DPD). Las concentraciones se expresan como mg l⁻¹ de cloro, aunque en agua de mar la mayor proporción de los compuestos resultantes son derivados de bromo (Goodman, 1987). Este método fue empleado en un estudio reciente sobre el riesgo del hipoclorito de sodio en alevines de la trucha arcoiris *Salmo gairdneri* (Soivio *et al.*, 1988).

water quality, 5000 cell/ml of *Tetraselmis* sp. was added to the tanks (Houde and Schekter, 1981). Grunion larvae were fed with newly hatched *Artemia* (1 nauplius ml⁻¹).

In power plants, cooling water is quickly discharged, and one unit volume of water receives only one dosage of chlorine. In this study, therefore, a single dosage of chlorine was added to the tanks, with an adjustable digital pipette "Eppendorf" (accuracy ± 1.5 to 0.6%), and no intent to maintain a constant level of residual chlorine was made; thus, chlorine decreased quickly in the experimental tanks as it does after power plant dosages. Standardized stock solutions of chlorine were prepared from laboratory-grade sodium hypochlorite (12.5%) and distilled-deionized water; solutions were dark stored in a refrigerator.

Although the amperometric method is suggested for chlorine determination (Quinby-Hunt *et al.*, 1986), special problems result if determinations below 1.0 mg l⁻¹ and especially below 0.1 mg l⁻¹ are made in seawater (Wong, 1980, 1982; Quinby-Hunt *et al.*, 1986). In this study Cl₂ decay was monitored by the DPD-colorimetric method which gives reliable results (Hall *et al.*, 1981b; Quinby-Hunt *et al.*, 1986), and is based on a reaction of active chlorine compounds with N,N-diethyl-p-phenylene-diamine (DPD). Concentrations have been expressed as mg l⁻¹ of chlorine, although it is understood that in seawater the greatest proportion of the compounds giving the reactions would be bromine derivatives (Goodman, 1987). This method was also employed in a recent study on the risk of sodium hypochlorite to rainbow trout (*Salmo gairdneri*) fingerlings (Soivio *et al.*, 1988).

A bioassay series with 1-day larvae was done to determine the concentrations in which mortality was 0-100%; afterwards 0.0 (control), 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 0.8, and 1.0 mg l⁻¹ of chlorine as treatment levels were selected. Dosing levels in power plant cooling systems are from 0.5 to 3 mg l⁻¹ to provide a residual chlorine of 0.2-0.5 mg l⁻¹ (Goodman, 1987), nevertheless the proposed discharge limit is 0.011 mg l⁻¹ TRC (USEPA, 1986).

Una serie de bioensayos con larvas de 1-día fue realizada para determinar las concentraciones de cloro con respuestas de mortalidad entre 0-100%; después de esto se seleccionaron las concentraciones 0.0 (control), 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 0.8, y 1.0 mg l⁻¹ de cloro como niveles de tratamiento. Los niveles de cloro utilizados en los sistemas de enfriamiento de centrales eléctricas van desde 0.5 a 3 mg l⁻¹ para proveer 0.2-0.5 mg l⁻¹ de cloro residual (Goodman, 1987), sin embargo el límite de descarga propuesto es 0.011 mg l⁻¹ TRC (USEPA, 1986).

Después de la cloración, la mortalidad fue registrada a la primera, segunda y octava hora; después cada ocho horas hasta las 96 h, y por último cada 24 h hasta el día 12. Los bioensayos con larvas de 16-días sólo tuvieron una duración de siete días. La mortalidad fue transformada a arcoseno y se empleó el análisis de covarianza para detectar diferencias.

La supervivencia se calculó de los datos de mortalidad de acuerdo a lo descrito por O'Connell y Raymond (1970). Las concentraciones letales de cloro que exterminaron al 50% de las larvas (LC50) se determinó por el análisis Probit, con la corrección de Abbott por la mortalidad observada en los controles (Finney, 1971).

Debido a que la alta reactividad del cloro con componentes del agua de mar produce la pérdida de una fracción con respecto al tiempo y que no es recuperable con las técnicas actuales, las concentraciones usadas en el cálculo del LC50 se basaron en la cantidad de cloro inicial y utilizando los datos de mortalidad registrados en los tanques duplicados.

En el día de la eclosión, la longitud estándar de 20 larvas fue medida para determinar su tamaño inicial, y entre cinco y diez larvas por tanque fueron medidas al final de cada experimento. La tasa de crecimiento promedio fue determinada restando la longitud inicial de la final y dividida entre el número de días de experimentación. Un análisis de varianza fue empleado para determinar diferencias entre las tasas de crecimiento. En los tratamientos con larvas de 16-días no se

After chlorination, mortality was recorded at hours one, two and eight; thereafter, for every eight hours up to 96 h, and then every 24 h until the 12th day. Bioassays beginning with 16-day larvae were only seven days in duration. Mortality data were transformed to arcsin and the analysis of covariance was employed to detect differences.

Survival was calculated from mortality data as described in O'Connell and Raymond (1970). The lethal concentration of chlorine that killed 50% of larvae (LC50) was determined by Probit analysis, with the Abbott correction for larval mortality observed in controls (Finney, 1971).

High reactivity of chlorine with seawater components produces a lost fraction with time that is not recoverable by current measuring techniques. Therefore, concentrations used in the LC50 calculations were based on the added amount of chlorine, and combining the mortality data of replicates.

After hatching, a number of 20 live larvae were measured for their standard length and at the end of the experiment a minimum of five were collected from each tank. Three larvae every two days and their standard lengths were measured in each tank. Their mean growth rate was determined by subtracting the initial from the final standard mean length and dividing by the number of days of the experiment. Analysis of variance was used to detect differences between growth means. No growth data were obtained in treatments with 16-day larvae due to the small number of larvae used, but growth in controls is reported.

RESULTS

Dissolved oxygen (D.O.) averaged 6.46 ± 0.54 ml l⁻¹, pH ranged from 7.2 to 8.5 with a mean of 7.9 ± 0.24 and water temperature was 17.8 ± 0.4°C.

In controls with 1 and 4-day larvae, survival was high up to days 10 and 11, and then decreased slowly (Figs. 1, 2). Treatments with 0.05 and 0.1 mg l⁻¹ chlorine showed a slight decrease in survival after chlorination (Figs. 1, 2). Survival of 16-day larvae in controls and 0.05 mg l⁻¹ treatments was near

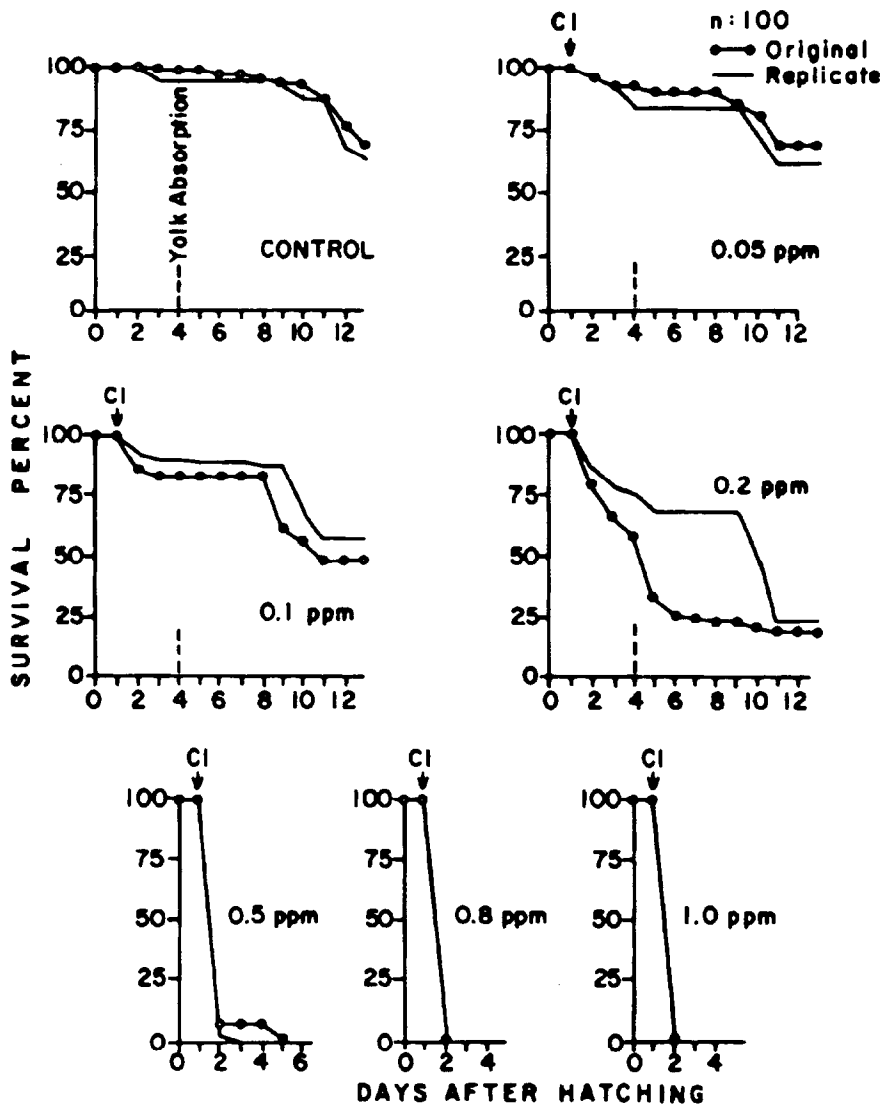


Figura 1. Porcentaje de supervivencia de larvas de *Leuresthes tenuis* de 1-día bajo cloración del agua de mar. Las flechas verticales indican el tiempo de la cloración.
 Figure 1. Percent survival of 1-day *Leuresthes tenuis* larvae under seawater chlorination. Vertical arrows indicate the time of chlorine addition.

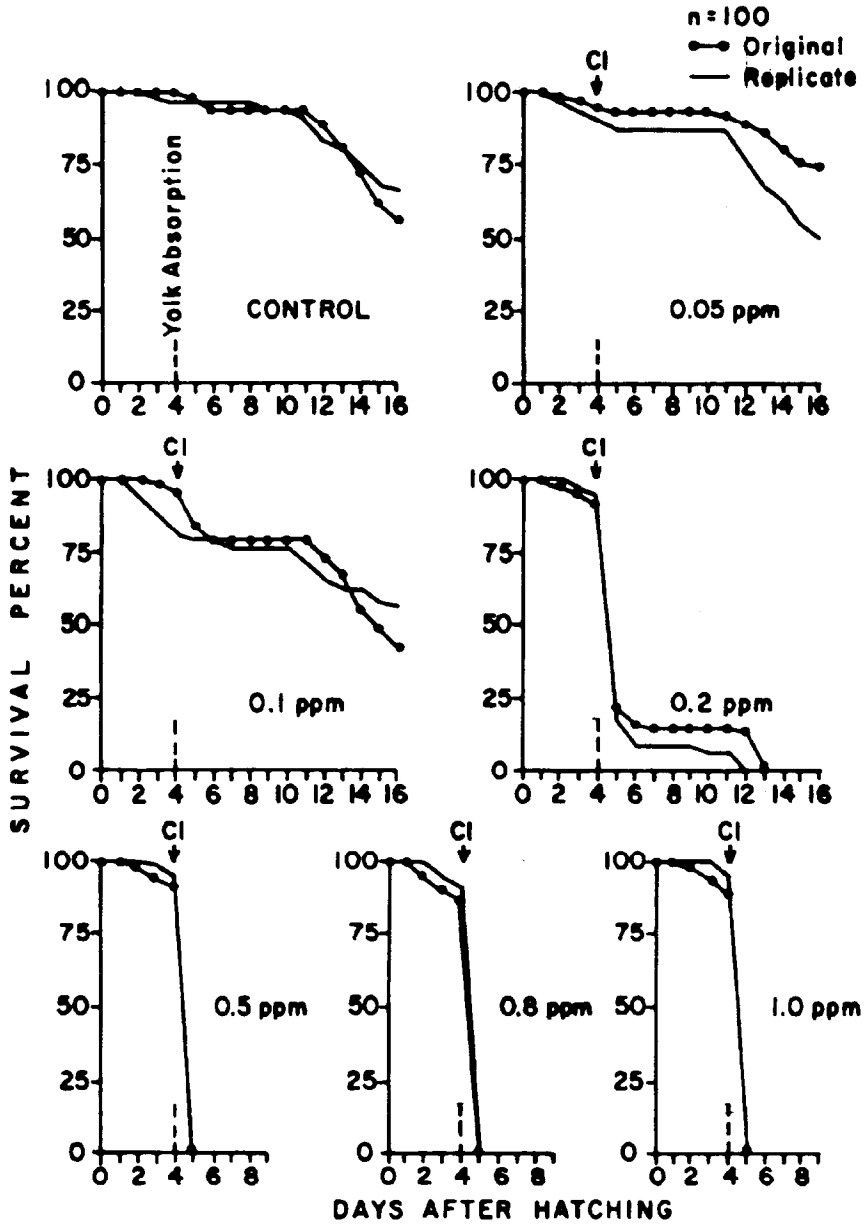


Figura 2. Porcentaje de supervivencia de larvas de *Leuresthes tenuis* de 4-días bajo cloración del agua de mar.
Figure 2. Percent survival of 4-day (yolk-sac absorption) *Leuresthes tenuis* larvae under seawater chlorination.

obtuvieron datos de crecimiento por el menor número de larvas utilizadas, sólo la tasa de crecimiento en los controles es reportada.

RESULTADOS

La temperatura en el agua de los tanques se mantuvo a $17.8 \pm 0.40^\circ\text{C}$; los valores de pH se presentaron en un intervalo de 7.2 a 8.5 con un promedio de 7.9 ± 0.24 ; el oxígeno disuelto presentó un promedio de $6.46 \pm 0.54 \text{ ml l}^{-1}$.

En los controles con larvas de 1 y 4-días, la supervivencia fue alta hasta los 10 y 11 días; después decrece lentamente (Figs. 1 y 2). Los tratamientos con 0.05 y 0.1 mg l^{-1} , mostraron un ligero decremento en la supervivencia después de la cloración (Figs. 1 y 2). La supervivencia en los controles con larvas de 16 días y en los tratamientos con 0.05 mg l^{-1} fue casi el 100% al día 23 (séptimo día de la cloración), pero con 0.1 mg l^{-1} , una reducción del 30-50% en la supervivencia después de que la cloración fue observada (Fig. 3). Sólo los tanques duplicados con 0.2 mg l^{-1} en la serie con larvas de 1-día, mostraron diferencias significativas (ANCOVA, $P=0.000$).

En las tres series, los tratamientos con 0.2 mg l^{-1} presentaron una notable declinación en la supervivencia durante los siguientes dos días; después, sólo una pequeña fracción alcanzó el final de los experimentos (Figs. 1, 2 y 3). Un exterminio drástico de las larvas fue observado en concentraciones de 0.5 mg l^{-1} en adelante; la supervivencia con 1.0 mg l^{-1} fue nula en menos de dos horas. En las tres series, la mortalidad promedio entre controles y tratamientos mayores de 0.2 mg l^{-1} , fue significativamente diferente (ANCOVA, $P=0.000$).

En general, los LC50 fueron bajos y disminuyeron ligeramente con el tiempo y la edad de las larvas (Tabla I). Las concentraciones letales de cloro después de dos horas (2hLC50) para series con larvas de 1, 4 y 16-días de *L. tenuis* fueron 0.255, 0.150 y 0.191 mg l^{-1} , respectivamente. A las 24 h de exposición, los resultados no fueron muy diferentes (0.241, 0.139 y 0.118 mg l^{-1}). En el mismo orden, los 48hLC50 fueron 0.209, 0.139 y 0.116 mg l^{-1} (Tabla I).

100% at day 23, the seventh day of the experiment, but at 0.1 mg l^{-1} a 30-50% reduction in survival after chlorination was observed (Fig. 3). Only the replicates with 0.2 mg l^{-1} of 1-day larvae series, were significantly different (ANCOVA, $P=0.000$).

For all three series, treatments with 0.2 mg l^{-1} showed a notable decline in survival during the next two days; after which, a small fraction survived to the experiment's end (Figs. 1, 2, 3). A drastic larval extermination with 0.5 mg l^{-1} and greater was observed; survival with 1.0 mg l^{-1} was null in less than two hours. In all three series, the mean mortality between controls and treatments greater than 0.2 mg l^{-1} were significantly different (ANCOVA, $P=0.000$).

In general, the LC50s were low and declined slightly with time and age of larvae (Table I). The lethal concentrations of chlorine after two hours (2hLC50) for 1, 4 and 16-day larvae of *L. tenuis* were 0.255, 0.150 and 0.191 mg l^{-1} , respectively. With 24 h exposition, the results were not very different (0.241, 0.139 and 0.118 mg l^{-1}). In the same order, 48hLC50 were 0.209, 0.139 and 0.116 mg l^{-1} (Table I). The 48hLC50 for 1-day larvae was only determined from the results of one tank due to an unusually high mortality.

Due to high mortality in 0.5-1.0 mg l^{-1} treatments, growth rates were only determined for 1 and 4-day larvae exposed with up to 0.2 mg l^{-1} chlorine (Table II). In the series with 1-day larvae, eggs had hatched at a mean standard length (SL) of $6.7 \pm 0.13 \text{ mm}$, and larvae grew $0.21 \pm 0.03 \text{ mm/day}$; no difference in the growth rates was found between replicates (ANOVA, $P=0.323$) or treatments (ANOVA, $P=0.145$).

In 4-day larvae, eggs had hatched at $6.7 \pm 0.21 \text{ mm SL}$, and no significant difference was found in the growth rates between the replicates (ANOVA, $P=0.591$); however, the growth rates of controls and the treatments with 0.2 mg l^{-1} chlorine were significantly different (ANOVA, $P=0.041$).

For experiments initiating with 16-day larvae, eggs had hatched at $6.7 \pm 0.21 \text{ mm SL}$; by day 16 in controls, larvae averaged $10.94 \pm 0.87 \text{ mm SL}$, and seven days later they were

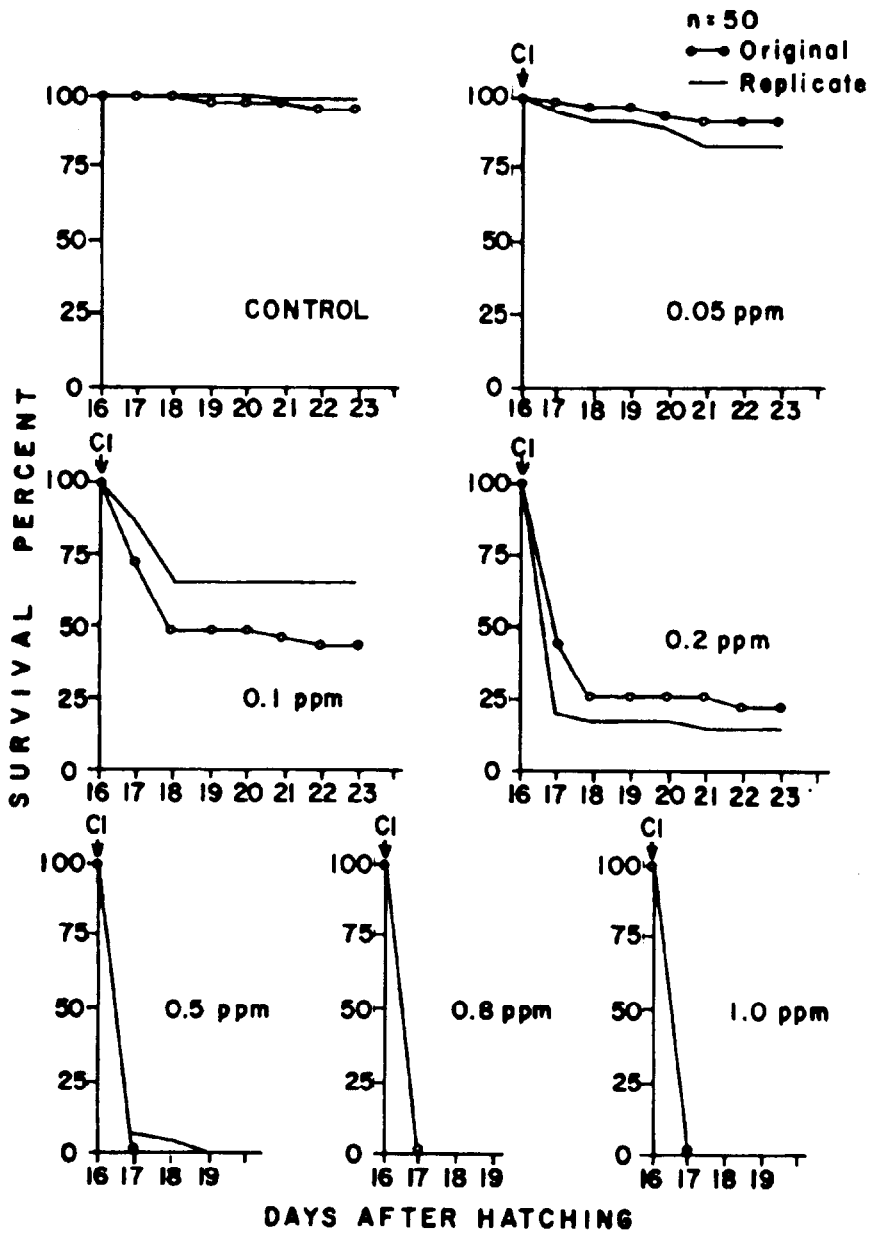


Figura 3. Porcentaje de supervivencia de larvas de *Leuresthes tenuis* de 16-días bajo cloración del agua de mar.

Figure 3. Percent survival of 16-day *Leuresthes tenuis* larvae under seawater chlorination.

Tabla I. Concentraciones letales de cloro (mg l^{-1}) a diferentes tiempos de exposición, para larvas de *Leuresthes tenuis* de 1, 4 y 16 días.

Table I. Lethal concentrations (mg l^{-1}) of chlorine at different exposition times for *Leuresthes tenuis* larvae of 1, 4 and 16-days.

Edad larva	2hLC50	8hLC50	24hLC50	48hLC50
1-día	0.255	0.230	0.241	0.209
4-días	0.150	0.142	0.139	0.139
16-días	0.191	0.157	0.118	0.116

Tabla II. Longitud estándar (mm) promedio inicial y final, y tasa de crecimiento de larvas de *Leuresthes tenuis*, en bajas concentraciones de cloro. La desviación estándar se muestra en paréntesis.

Table II. Initial and final mean standard length (mm), and growth rate (mm/day) of *Leuresthes tenuis* larvae under low concentrations of chlorine. Standard deviations are shown in parentheses.

Conc. mg l^{-1}	Serie larvas de 1-día			Serie larvas de 4-días		
	Día 0 (mm)	Día 12 (mm)	Tasa de crecimiento (mm/día)	Día 0 (mm)	Día 12 (mm)	Tasa de crecimiento (mm/día)
0.00	6.7 (0.13)	9.41 (1.08)	0.209	6.9 (0.21)	9.09 (0.17)	0.199
0.00		9.46 (1.10)	0.209		8.74 (0.34)	0.170
0.05		8.91 (1.22)	0.168		9.02 (0.21)	0.193
0.05		9.61 (0.80)	0.226		9.19 (0.68)	0.206
0.10		9.75 (0.79)	0.238		9.56 (0.32)	0.238
0.10		10.03 (1.01)	0.261		9.20 (0.40)	0.208
0.20		9.01 (0.82)	0.176		8.55 (0.32)	0.154
0.20		9.18 (0.88)	0.190		8.47 (0.24)	0.148

Debido a la alta mortalidad en los tratamientos con 0.5-1.0 mg l⁻¹, la tasa de crecimiento fue determinada únicamente para larvas de 1 y 4-días expuestas hasta 0.2 mg l⁻¹ de cloro (Tabla II). En la serie con larvas de 1-día, los huevecillos eclosionaron larvas con una longitud estándar promedio de 6.7 ± 0.13 mm, y crecieron 0.21 ± 0.03 mm/día; no se presentaron diferencias en las tasas de crecimiento larval en los tanques por duplicado (ANOVA, P=0.323) o entre controles y tratamientos (ANOVA, P=0.145).

En la serie con larvas de 4-días, se presentó una longitud estándar promedio inicial de 6.7 ± 0.21 mm, y no se observó diferencia significativa entre las tasas de crecimiento larval por duplicado (ANOVA, P=0.591); sin embargo, las tasas de crecimiento entre controles y tratamientos con 0.2 mg l⁻¹ de cloro mostraron diferencias significativas (ANOVA, P=0.041).

Para los experimentos que iniciaron con larvas de 16-días, la longitud estándar inicial fue 6.7 ± 0.21 mm; para el día 16, las larvas en los controles promediaron 10.94 ± 0.87 mm, y siete días después 12.68 ± 0.68 mm, representando un crecimiento de 0.27 mm/día y 0.25 mm/día, respectivamente. Esta tasa de crecimiento fue mayor que la de los controles de las series con larvas de 1 y 4-días. No se obtuvieron datos de crecimiento para los tratamientos con larvas de 16-días.

DISCUSION

La disminución de la concentración del cloro en el agua de mar, rápida en las primeras horas y muy lenta después, está bien documentada (Wong y Davidson, 1977; Wong, 1982; Wong y Oatts, 1984).

Cuando el cloro es añadido al agua de mar, rápidamente reacciona con el agua para establecer un equilibrio; a un pH de 7.8 (promedio encontrado en el agua de los tanques), inicialmente el cloro libre se encuentra presente como una mezcla de ácido hipocloroso (HOCl) y del ión hipoclorito (OCl⁻). HOCl reacciona rápidamente con el bromo del agua de mar y el tiempo necesario para completar el 99% de la reacción a pH 8.0 es de sólo diez segundos (Goodman, 1987); uno de los mayores productos es el ácido

12.68 ± 0.68 mm SL, representing a growth of 0.27 mm/day and 0.25 mm/day, respectively. This growth rate was larger than those of controls for the experiments with 1 and 4-day larvae. No growth data for the 16-day larval treatments were obtained.

DISCUSSION

The rapid drop of chlorine concentration in seawater during small hours and a much slower but continuous decrease afterwards, is well documented (Wong and Davidson, 1977; Wong, 1982; Wong and Oatts, 1984).

When chlorine is added to seawater, it rapidly reacts with the water to establish an equilibrium; at a pH of 7.8 (mean found in this study), free chlorine is initially present in a mixture of hypochlorous acid (HOCl) and hypochlorite ion (OCl⁻). HOCl reacts rapidly with the bromine in seawater and the time needed to complete 99% of the reaction at pH 8.0 is only ten seconds (Goodman, 1987); one of the major products is hypobromous acid (HOBr), an active but unstable disinfectant species (Oldfield and Todd, 1981).

With the higher bromine concentration present in seawater, bromate (BrO₃) is quickly formed at room temperature (20°C), and other prevailing products are Br₃, Br₂Cl, BrCl, Br₂, HOBr, ClO₂, HOCl (Goodman, 1987). Bromine chloride has been identified as the most reactive halogenating agent, nine times more reactive than Cl₂, and 2.2 x 10³ more reactive than Br₂ (Voudrias and Reinhard, 1988). Reaction time of chlorine with bromide is much faster than with ammonia, so that bromine species are first produced than chloramines (Goodman, 1987).

The three bioassay series reported in this study demonstrate the acute, short-term, and lethal toxicity of chlorine to California grunion (*Leuresthes tenuis*) larvae of different ages. The 2hLC₅₀ and 48hLC₅₀ of chlorine for each age, was substantially lower than the dosage concentrations (0.5-3 mg l⁻¹) used in power plant cooling systems (Goodman, 1987).

All three larval stages showed great sensitivity to chlorine as demonstrated by the sharp drop in survival concentrations of 0.2 mg l⁻¹ and greater. Furthermore, an increased

hipobromoso (HOBr), una activa pero inestable especie desinfectante (Oldfield y Todd, 1981).

Con la concentración de bromo presente en el agua de mar, el bromato (BrO_3) es rápidamente formado a temperatura de 20°C , así como otros productos como Br_3 , Br_2Cl , BrCl , Br_2 , HOBr, ClO_2 , HOCl (Goodman, 1987). El cloruro de bromo ha sido identificado como el agente halogenado más reactivo, nueve veces más reactivo que el Cl_2 , y 2.2×10^3 más reactivo que el Br_2 (Voudrias y Reinhard, 1988). El tiempo de reacción del cloro con el bromo es mucho más rápido que con amonio, así que las especies de bromo son primero producidas que las cloraminas (Goodman, 1987).

Las tres series de bioensayos reportadas en este estudio, demuestran la toxicidad aguda, letal y a corto plazo del cloro a las larvas de diferente edad del grunión de California (*Leuresthes tenuis*). Los valores de 2hLC50 y 48hLC50 de cloro para cada edad, fueron substancialmente más bajos que las concentraciones ($0.5\text{-}3.0 \text{ mg l}^{-1}$) utilizadas en los sistemas de enfriamiento de centrales eléctricas (Goodman, 1987).

Los tres estadios larvales mostraron gran sensibilidad al cloro por la caída rápida de la supervivencia en concentraciones de 0.2 mg l^{-1} y mayores. Sin embargo un incremento en la sensibilidad con la edad larval es sugerido por el decremento, aunque ligero, de los LC50.

La menor tasa de crecimiento con 0.2 mg l^{-1} de cloro en la serie con larvas de 4-días, también demuestra su incremento en la sensibilidad con la edad. Una menor tasa de crecimiento puede resultar en una prolongación del periodo larval y por tanto en su vulnerabilidad a la depredación (Bailey y Yen, 1983). Para larvas de *Engraulis mordax* de 5-días, un menor crecimiento al día 12 con 0.8 mg l^{-1} de cloro inicial, también fue observado (Rosales-Casián, 1986).

En el laboratorio, las larvas de la anchoveta norteña (*Engraulis mordax*) fueron menos sensitivas con la edad a la cloración (Rosales-Casián, 1986) que las larvas del grunión de California. Esta diferencia puede

ser sugerida por la sensibilidad con la edad que es sugerida por la disminución, aunque ligera, en el LC50. Aunque más trabajo debe ser hecho, la menor tasa de crecimiento con 0.2 mg l^{-1} de cloro en 4-días grunión larvas, también demuestra su mayor sensibilidad con la edad. La menor tasa de crecimiento daría lugar a una prolongación del periodo larval y así un aumento en su vulnerabilidad a la depredación (Bailey y Yen, 1983). Una menor tasa de crecimiento para *Engraulis mordax* 5-días larvas al día 12, con un 0.8 mg l^{-1} de cloro inicial fue observado (Rosales-Casián, 1986).

En el laboratorio, noroeste de la anchoveta (*Engraulis mordax*) larvas fueron menos sensitivas con la edad a la cloración (Rosales-Casián, 1986), que las larvas de California grunión. Esta diferencia puede ser debida a su comportamiento de natación; noroeste de la anchoveta larvas tienen un modo de natación intermitente de saltos y deslizamiento (Weihs, 1981), mientras que las larvas de California grunión tienen un comportamiento activo, continuo de natación que constituye una mayor carga metabólica y que resulta en su contacto con un gran volumen de agua contaminada, aumentando así el efecto tóxico.

Larvas de 38-días (*Dicentrarchus labrax*) mostraron 100% de mortalidad con niveles de 0.5 ppm ; las etapas más jóvenes (1, 6, 9 y 26-días) parecieron ser más sensitivas (Caporiccio y Paris, 1981). En un test de toxicidad de 28-días, no larvas de *Menidia peninsulae* sobrevivieron después de la hatching con una exposición de 0.21 mg l^{-1} de oxidantes producidos por el cloro (Goodman *et al.*, 1983).

Toxicidad del cloro y ozono fue encontrada ser similar con las larvas de la lubina (*Morone saxatilis*) en aguas estuarinas; el 6hLC50 para las alevinas fue 0.20 mg l^{-1} de oxidantes producidos por ozono (Hall *et al.*, 1981a). La lubina (*Pleuronectes platessa*) y la solea (*Solea solea*) larvas mostraron mayor tolerancia al cloro durante la etapa vitelina que las de 7-días y las más antiguas (Alderson, 1974). Mayor tolerancia a perturbaciones externas es una ventaja ecológica si coincide con la etapa de mayor duración. Por ejemplo, *Fundulus heteroclitus* huevos fueron más tolerantes a la cloración que sus larvas, posiblemente debido a la presencia de un grueso corion que efectivamente

deberse al comportamiento natatorio; las larvas de la anchoveta tienen una natación intermitente (Weihs, 1981), mientras que las larvas del grunión tienen una natación activa y continua; esto constituye un mayor gasto energético y también un contacto con mayor volumen de agua contaminada que incrementa el efecto tóxico.

Larvas de lobina (*Dicentrarchus labrax*) de 38 días, mostraron el 100% de mortalidad con niveles de 0.5 ppm de cloro; los estadios larvales más juvenes (1, 6, 9 y 26 días) fueron más sensitivos (Caporiccio y Paris, 1981). En una prueba de toxicidad de 28 días, ninguna larva de *Menidia peninsulae* sobrevivió después de la eclosión con una exposición de 0.21 mg l⁻¹ de oxidantes producidos por el cloro (Goodman *et al.*, 1983).

La toxicidad del cloro y del ozono fue similar para huevos y larvas de lobina rayada (*Morone saxatilis*) de aguas estuarinas; el 6hLC50 para alevines fue 0.20 mg l⁻¹ de oxidantes producidos por ozono (Hall *et al.*, 1981a). Larvas de platija (*Pleuronectes platessa*) y del sol (*Solea solea*), mostraron mayor tolerancia al cloro durante el estadio de vitelo que para larvas mayores de 7-días (Alderson, 1974).

Una mayor tolerancia a perturbaciones externas es una ventaja ecológica si coincide con el estadio de mayor duración. Por ejemplo, los huevos de *Fundulus heteroclitus* fueron más tolerantes a la cloración que las larvas, posiblemente debido a la presencia de un corión grueso que aísla y protege efectivamente al embrión durante más de diez días que permanece en el estadio de huevo (Middaugh *et al.*, 1978). Para la anchoveta norteña, el tiempo de eclosión de los huevos a 16°C es 2.5 días (Hunter y Coyne, 1982), y fue el estadio más sensitivo a la cloración a 17°C (Rosales-Casián, 1986). El tiempo de eclosión para los huevos del grunión a 17°C fue 12 días (Rosales-Casián, 1986), pero debido a sus requerimientos especiales, ningún bioensayo con cloro fue realizado en este estudio.

Juveniles de la lobina rayada (*Morone saxatilis*) mostraron daños a las branquias y pseudobranquias después de la cloración del agua, que se reflejó en un mal funcionamiento

isolates and protects the embryo during the more than ten day duration in the egg stage (Middaugh *et al.*, 1978).

For northern anchovy, hatching time at 16°C is 2.5 days (Hunter and Coyne, 1982), and this stage was the most sensitive to chlorination at 17°C (Rosales-Casián, 1986). The hatching time for grunion eggs at 17°C was 12 days (Rosales-Casián, 1986), but due to the special requirements of grunion eggs, no bioassays with chlorine were done in this work. Nevertheless, the decreased tolerance with age reported for grunion larvae in this study suggests that the egg stage of this species may be the most tolerant.

Juvenile striped bass (*Morone saxatilis*) showed gill and pseudobranch damage after water chlorination which was reflected in respiratory, osmoregulatory and metabolic malfunction (Middaugh *et al.*, 1977). Chlorine was observed to induce oxidation of haemoglobin in red blood cells as they pass through the gills to meta-haemoglobin, that is incapable of transporting oxygen, thus decreasing the oxygen supply to the tissues and causing death by anoxia (Grothe and Eaton, 1975). Although larval fish respiration is cutaneous until the gills develop (about 35 days for northern anchovy) (Hunter and Coyne, 1982), a similar mechanism can be expected. Chlorine also decreases the internal pH of fluids and thus affects the chemical stimuli that regulate many physiological functions (Miller *et al.*, 1979).

Although in the laboratory the California grunion was sensitive to chlorine, due to its wide geographic distribution its population would probably not be severely affected by the chlorine used in power plants. Nevertheless, due to their high sensitivity, larvae of the California grunion may be a good standard test organism for research on the effects of other toxic substances. Chlorine as a biocide, is effective, inexpensive and easy to use, nevertheless, it is important to predict the lethal and sublethal effects of the persistent residual chlorine on a variety of marine organisms, especially non-fouling species or early life stages of fishes, which would be susceptible to power plant entrainment, or be in contact with power plant or sewage effluents in many coastal areas.

respiratorio, osmoregulatorio y metabólico (Middaugh *et al.*, 1977). También el cloro induce la oxidación de la hemoglobina en las células rojas de la sangre conforme pasan por las branquias; el compuesto que se forma es meta-hemoglobina que no tiene la capacidad de transportar oxígeno, entonces decrece el suministro a los tejidos y causa la muerte por anoxia (Grothe y Eaton, 1975). Aunque la respiración larval es cutánea hasta que las branquias se desarrollan (cerca de 35 días para la anchoveta noroesteña) (Hunter y Coyne, 1982), un mecanismo similar puede ser esperado. El cloro también disminuye el pH de los fluidos internos y afecta los estímulos químicos que regulan muchas funciones fisiológicas (Miller *et al.*, 1979).

Aunque en el laboratorio el grunón de California fue sensible al cloro, debido a su amplia distribución geográfica la población no es severamente afectada por el cloro usado en los sistemas de enfriamiento de centrales eléctricas. Sin embargo, por su alta sensibilidad, puede ser un buen organismo estándar para estudios de efectos por otras sustancias tóxicas. El cloro como biocida, es efectivo, barato y fácil de usar, pero es importante predecir los efectos letales y subletales del persistente cloro residual en una variedad de organismos marinos, especialmente las especies no-incrustantes o los estadíos iniciales de peces que pueden ser susceptibles del acarreo al interior de sistemas de enfriamiento de centrales eléctricas, o estar en contacto con efluentes de drenaje en muchas áreas costeras.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) de México, por el apoyo a Jorge A. Rosales Casián durante sus estudios de postgrado, y por su apoyo a Irma Alfonso Hernández a través de su Programa de Intercambio CUBA-MEXICO, para entrenamiento técnico en el Grupo de Ecología Pesquera de CICESE.

LITERATURA CITADA

Alderson, R. (1974). Seawater chlorination and the survival and growth of early development stages of plaice, *Pleuronectes platessa* L., and Dover sole, *Solea solea* (L.). *Aquaculture*, 4: 41-53.

ACKNOWLEDGEMENTS

The Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) of Mexico, is thanked for their support of Jorge A. Rosales-Casián while a graduate student, and for their support of I. Alfonso-Hernández through their CUBA-MEXICO Exchange Program for Technical Training.

English translation by the author.

Bailey, K.M. and Yen, J. (1983). Predation by a carnivorous marine copepod, *Euchaeta elongata* Esterly, on eggs and larvae of the Pacific hake, *Merluccius productus*. *J. Plankton Res.*, 5: 71-82.

Booth, P.M., Sellers, C.M. and Garrison, N.G. (1981). Effects of intermittent chlorination on plasma proteins of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Bull. Environm. Contam. Toxicol.*, 26: 163-170.

Brooks, A.S. and Bartos, J.M. (1984). Effects of free and combined chlorine and exposure duration on rainbow trout, channel catfish, and emerald shiners. *Trans. Amer. Fish. Soc.*, 113: 786-783.

Caporiccio, B. and Paris, J. (1981). Study of chlorale levels in marine and estuarine organisms. In: *Influence of Thermal Discharges on Marine and Estuarine Organisms. Electricity of France. Paris (France). Direction de l'Equipement.*

Castro Longoria, R. y Grijalva Chon, J.M. (1988). Ictioplancton del Estero de Punta Banda, B.C., México, durante primavera-verano de 1985. *Ciencias Marinas*, 14(1): 57-79.

Cherry, D.S., Larrick, S.R., Giattina, J.D., Cairns, J. and Van Hassel, J. (1982). Influence of temperature selection upon the chlorine avoidance of cold-water and warm-water fishes. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 39: 162-173.

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.

- Finney, D.J. (1971). Probit Analysis. New York, Cambridge University Press.
- Goodman, L.R., Middaugh, D.P., Hansen, D.J., Higdon, P.K. and Cripe, G.M. (1983). Early life-stage toxicity test with tidewater silversides (*Menidia peninsulæ*) and chlorine produced oxidants. *Environ. Toxicol. Chem.*, 2: 337-342.
- 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.
- Grothe, D.R. and Eaton, J.W. (1975). Chlorine-induced mortality in fish. *Trans. Amer. Fish. Soc.*, 104: 800-802.
- Hall, L.W., Burton, D.T. and Richardson, L.B. (1981a). Comparison of ozone and chlorine toxicity to the developmental stages of striped bass, *Morone saxatilis*. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 38: 752-757.
- Hall, L.W., Helz, G.R. and Burton, D.T. (1981b). Power plant chlorination, a biological and chemical assessment. Ann Arbor, MI. Ann Arbor Science Pub., pp. 237.
- Hall, L.W., Graves, W.C., Burton, D.T., Margrey, S.L., Hetrick, F.M. and Robertson, B.S. (1982). A comparison of chlorine toxicity to three life stages of striped bass (*Morone saxatilis*). *Bull. Environm. Contam. Toxicol.*, 29: 631-636.
- Hose, J.E., Hunt, W. and Stoffel, R.J. (1983a). Physiological responses of a marine fish exposed to chlorinated seawater at concentrations near its avoidance threshold. *Mar. Environ. Res.*, 8: 241-254.
- Hose, J.E., Stoffel, R.J. and Zerba, K.E. (1983b). Behavioural responses of selected marine fishes to chlorinated seawater. *Mar. Environ. Res.*, 9: 37-57.
- Hose, J.E., King, T.D. and Stephens, J.S. (1984). Effects of dechlorinated seawater on fish behavior. *Mar. Environ. Res.*, 11: 67-76.
- Houde, E.D. and Schekter, 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. and Coyne, K.M. (1982). The onset of schooling in northern anchovy larvae, *Engraulis mordax*. *Calif. Coop. Oceanic Fish. Invest. Rep.*, 23: 246-251.
- Lasker, R., Feder, 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.
- Mattice, J.S., Burch, M.B., Tsai, S.C. and Roy, W.K. (1981). A toxicity system for exposing small invertebrates and fish to short square-wave concentrations of chlorine. *Water Res.*, 15: 923-927.
- Middaugh, D.P., Couch, J.A. and Crane, A.M. (1977). Responses of early life history stages of 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 mummichog *Fundulus heteroclitus*. *Mar. Biol.*, 46: 1-8.
- Miller, W.R., Gruber, D., Cairns, J. and Hendricks, A.C. (1979). Biological monitoring of chlorine-induced ventilatory damages in bluegill sunfish *Lepomis macrochirus*. In: R.L. Jolley, W.A. Brungs, R.B. Cumming and V.A. Jacobs (eds.), *Water Chlorination, Environmental Impact and Health Effects*, Vol. 3, pp. 588-597. Ann Arbor, Ann Arbor Science Publishers, Inc.
- 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.
- Oldfield, J.W. and Todd, B. (1981). Corrosion problems caused by bromine formation in MSF desalination plants. *Desalination*, 38: 233-245.
- Quinby-Hunt, M.S., McLaughlin, R.D. and Quintanilha, A.T. (1986). *Instrumentation for Environmental Monitoring*. 2nd edn. Vol. 2,

Chap. 6 Desinfectants. Lawrence Berkeley Laboratory. John Wiley and Sons, pp. 268-290.

Rosales Casián, J.A. (1986). Efecto de la cloración del agua de mar en la supervivencia y crecimiento de larvas de la anchoveta noroesteña (*Engraulis mordax* GIRARD) y el grujón (*Leuresthes tenuis* AYRES) cultivadas en laboratorio, con referencia a sistemas de enfriamiento de centrales eléctricas. Tesis de Maestría, Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, B.C., México, 115 pp.

Soivio, A., Nikunen, E. and Tuurala, H. (1988). Acute response to sodium hypochlorite in rainbow trout acclimatized to pulp and paper mill effluents. *Aquatic Toxicology*, 13: 77-88.

U.S. Environmental Protection Agency (1986). Quality criteria for water. EPA 440/5-86-001. Office of Water Regulations and Standards, Washington, DC.

Voudrias, E.A. and Reinhard, M. (1988). Reactivities of hypochlorous acid, chlorine monoxide, hypobromous acidium ion, chlorine, bromine and bromine chloride in electrophilic

aromatic substitution reactions with p-xylene in water. *Environ. Sci. Technol.*, 22: 1049-1056.

Weihls, D. (1981). Swimming of yolk-sac larval anchovy (*Engraulis mordax*) as a respiratory mechanism. *Rapp. P. v. Reun. Cons. Perm. Int. Explor. Mer.*, 178: 441-453.

Wong, G.T.F. (1980). Some problems in the determination of total residual "Chlorine" in chlorinated sea-water. *Water Res.*, 14: 51-60.

Wong, G.T.F. (1982). Factors affecting the amperometric determination of trace quantities of total residual chlorine in seawater. *Environ. Sci. Technol.*, 16: 785-790.

Wong, G.T.F. and Davidson, J.A. (1977). The fate of chlorine in sea-water. *Water Res.*, 11: 971-978.

Wong, G.T.F. and Oatts, T.J. (1984). Dissolved organic matter and the dissipation of chlorine in estuarine water and seawater. *Water Res.*, 18: 501-504.