

# LOS NIVELES DE MICROCONTAMINANTES ORGÁNICOS EXPLICAN UNA MUERTE MASIVA DE PECES EN EL RÍO ATOYAC, PUEBLA, MÉXICO

## ORGANIC MICROPOLLUTANTS LEVELS EXPLAIN A MASSIVE DEATH OF FISH IN THE ATOYAC RIVER, PUEBLA, MEXICO

**Amado E. Navarro<sup>1</sup>, Jorge A. Herrera<sup>1</sup>, Lorenzo Morales<sup>1</sup>**

(1) Universidad Tecnológica de Izúcar de Matamoros, Prolongación Reforma 168, Izúcar de Matamoros,  
74420 Puebla - México  
(e-mail: navarro4899@gmail.com)

*Recibido: 26/04/2017 - Evaluado: 17/06/2017 - Aceptado: 03/08/2017*

### RESUMEN

Se reportó una muerte masiva de peces en el río Atoyac, presumiendo como causa el vertido de algún contaminante químico muy tóxico. El análisis de muestras de agua, sedimentos y tejidos, mostró una baja concentración de oxígeno disuelto y elevadas de amonio y de nitritos en el río el día del incidente, probables causas directas de la muerte de los peces. Por cromatografía de gases/espectrometría de masas, no se detectaron contaminantes persistentes pero sí, concentraciones elevadas de microcontaminantes orgánicos antrópicos, lo cual indica un vertido de residuos municipales al cauce de la corriente, causa indirecta de la muerte de los peces. Las concentraciones de coprostanol y epicoprostanol indican la presencia de heces de mamíferos, incluidas las de rumiantes, en el vertido. Los resultados obtenidos muestran la utilidad de determinar las concentraciones de los microcontaminantes orgánicos para esclarecer las causas de estos incidentes.

### ABSTRACT

A massive fish death was reported in the Atoyac river, presuming as its cause the discharge of a very toxic chemical pollutant. The analysis of water, sediment and tissue samples, showed a low concentration of dissolved oxygen and high levels of ammonium and nitrite in the river the day of the incident, likely to be the direct causes of the death of the fish. By gas chromatography/mass spectrometry, persistent contaminants weren't detected, instead high concentrations of anthropic organic micropollutants were detected, which indicates a discharge of municipal waste to the riverbed, the indirect cause of the fish killing. The concentration of coprostanol and epicoprostanol indicates the presence of mammal's feces, including those of ruminants, in the discharge. The obtained results show the usefulness of the organic micropollutants levels determination to clear up the causes of such incidents.

Palabras clave: residuos municipales, agua superficial, ecocidio, ictiofauna

Key words: municipal waste, surface water, ecocide, ichthyofauna

## INTRODUCCIÓN

Las aguas superficiales y sus ecosistemas asociados en las cuencas hidrológicas, han provisto por miles de años los servicios ambientales necesarios para el desarrollo social y económico de las poblaciones humanas. A pesar de los beneficios que se reciben, muchas veces considerados inagotables, la influencia directa o indirecta del hombre conduce a cambios drásticos en la calidad y cantidad del agua de estos ecosistemas. En lo referente a la hidromorfología, la construcción de presas, hidroeléctricas, canales de riego, así como la extracción y trasvase de agua altera el flujo del agua, llegando a niveles inferiores a los del caudal ecológico (Acreman, 2016). En lo que concierne a la calidad, las principales fuentes de contaminación, tanto puntual como difusa son la agricultura, la industria y la urbanización (Chen *et al.*, 2016). Un problema que puede afectar la calidad del agua en una región es la descarga de grandes volúmenes de aguas residuales no tratadas, que pueden superar la capacidad de dilución y autodepuración de las corrientes de agua (Chinyama *et al.*, 2016). Como resultado de las alteraciones hidromorfológicas y la contaminación, no faltan ejemplos hoy en día de ríos muertos, convertidos sus cauces en canales de aguas residuales (Misra, 2010).

Se ha demostrado que las poblaciones de peces son muy sensibles a la degradación de los ecosistemas acuáticos y a los vertidos de contaminantes, por lo que su cantidad y su diversidad de especies han sido utilizadas desde hace tiempo como indicadores de la calidad del agua (Baskar *et al.*, 2013; Poikane *et al.*, 2017). Las comunidades de peces también han sido utilizadas como un vector de comunicación útil para sensibilizar al público y las autoridades sobre la necesidad de preservar la calidad de ríos y lagos (Cowx & Collares, 2002). En este sentido, las muertes masivas de peces reciben gran atención de los medios de comunicación, obligando a las autoridades a dar respuestas a la sociedad sobre las causas de los mismos. Hoy en día se dispone de protocolos de actuación ante incidentes de muerte masiva de peces (Dewis *et al.*, 2005).

Las muertes de peces se producen por causas naturales, por eventos extremos de contaminación y más frecuentemente constituyen un problema multifactorial en el que un problema se origina por determinada causa, natural o no, ocurren fenómenos de sinergia entre los distintos factores y/o se termina favoreciendo la intervención de otro factor nuevo como puede ser una enfermedad mortal (Eissa *et al.*, 2013; Polidoro & Morra, 2016). La hipoxia, originada por factores naturales o la contaminación, es al final una de las mayores amenazas para la ictiofauna, siendo lo más importante determinar lo que causa la hipoxia (Alabaster & Lloyd, 1982; Small *et al.*, 2014; Schulz & Costa, 2015). Independientemente de que se determinen las probables causas, siempre queda un número de eventos de muerte masiva de peces sin esclarecer (Gómez, 2014; Luckett, 2015; O'Hearn & McAteer, 2016). No es descartable, por el carácter multifactorial del fenómeno, que se confundan las causas y tampoco que por la presión ante el descuido de los cuerpos de agua, se den explicaciones naturales a eventos generados por la contaminación. Es un hecho que hay poca documentación de los incidentes de muerte masiva de peces en la literatura científica sujeta a arbitraje y que se necesitan trabajos que contribuyan a obtener más información sobre las causas de estos incidentes (La & Cooke, 2011).

En la tarde del 6 de junio de 2013 se reporta por lugareños una muerte masiva de peces (varios miles de ejemplares), en el río Atoyac a la altura del puente del Marqués, en el municipio de Tehuiztzingo, Estado de Puebla (Figura 1). Se presumió inicialmente como causa, el vertido de algún contaminante químico muy tóxico, cuestión no descartable, dado que el río Atoyac recibe el impacto de las descargas de la ciudad de Puebla y aportes de contaminación difusa a su paso por zonas agrícolas. Ante una contingencia como la ocurrida, la evaluación oportuna de diversos parámetros de calidad del agua, incluyendo los niveles de microcontaminantes orgánicos, es importante para la identificación de las posibles causas, aspecto que se aborda en el presente trabajo.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Temprano en la mañana del día 7 de junio las autoridades estatales, en coordinación con la Universidad Tecnológica de Izúcar de Matamoros (UTIM), toman 3 muestras de agua, 2 de pozos cercanos al río (P1 y P2), una de la corriente de ese día (P3), así como un espécimen muerto. Al día siguiente se toma otra muestra de

agua (P4) y una de sedimentos (S) en el lugar del incidente. Todas las muestras son transportadas a la UTIM debidamente refrigeradas (las de agua por debajo de 4 °C, el pez y el sedimento a -4°C). A su llegada al laboratorio, las muestras fueron analizadas de inmediato. Del pez se tomaron muestras de los tejidos de las branquias y del hígado.

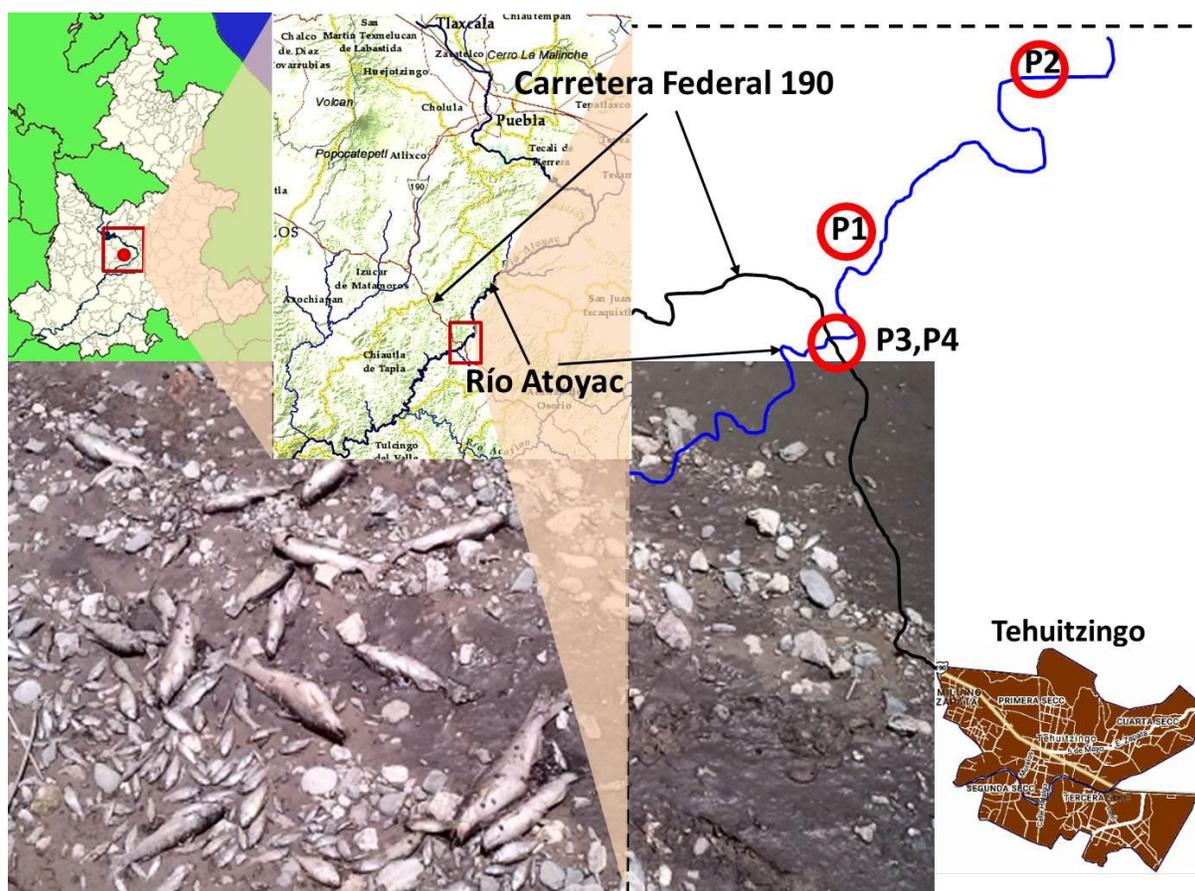


Fig. 1: Localización del incidente de muerte de peces y puntos de toma de muestras.

A las muestras de agua se les determinó: pH, conductividad eléctrica (CE), oxígeno disuelto ( $O_D$ ), nitritos ( $NO_2^-$ ), nitratos ( $NO_3^-$ ) y amonio ( $NH_4^+$ ). En la Tabla 1 se indican los métodos utilizados.

Tabla 1: Métodos de análisis utilizados.

Índice	Método	Unidades y Equivalencia
pH	NMX-AA-008-SCFI-2000	Unidades pH
CE	NMX-AA-093-SCFI-2000	$\mu S\ cm^{-1}$
$O_D$	NMX-AA-012-SCFI-2000	$mg\ L^{-1}$
$NO_2^-$	Colorimétrico	$mg\ L^{-1}$ , EPA 354.1
$NO_3^-$	Electrodo selectivo	$mg\ L^{-1}$ , SM-4500- $NO_3^-$
$NH_4^+$	Colorimétrico	$mg\ L^{-1}$ , SM-4500- $NH_3$

Para el análisis de compuestos orgánicos las muestras fueron filtradas y se utilizó la extracción en fase sólida para la extracción/concentración de los compuestos orgánicos de la fase acuosa (Matamoros *et al.*, 2010), la

asistida por ultrasonido de la fase particulada de las muestras de agua (Zhang *et al.*, 2006) y se realizó una limpieza por cromatografía en columna (Yeasmin *et al.*, 2011). Las muestras fueron previamente salpicadas con una mezcla de subrogados para evaluar recobrados. Los extractos se trasvasaron y llevaron casi a sequedad con un flujo suave de nitrógeno y se reconstituyeron con 80  $\mu\text{L}$  de acetato de etilo/metanol/isooctano (2:2:1 v/v), almacenándose a  $-4^{\circ}\text{C}$  hasta su análisis. Justo antes del análisis se añadieron a las muestras 20  $\mu\text{L}$  de una solución de d-pireno y trifenilamina (estándares internos, para la corrección de inestabilidades del equipo), para su análisis por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG/EM). Antes de la inyección se realizó la derivatización de los extractos con hidróxido de trimetilsulfonio (TMSH, 2:1 v/v).

Para la determinación de contaminantes orgánicos en tejidos y sedimentos, las muestras, previamente salpicadas con subrogados, fueron sometidas a extracción Soxhlet, en base al Método EPA 3540c. Brevemente la extracción se llevó a cabo durante 16 horas utilizando una mezcla hexano acetona (2:1) y (1:1) v/v para tejido y sedimento respectivamente. Los extractos fueron concentrados hasta un volumen final de 1.5 mL y purificados en una columna (empacada con 6 g de alúmina y 6 g de gel de sílice y 1 g de sulfato de sodio anhidro), la cual fue lavada y/o acondicionada con 5 mL de diclorometano (DCM), en seguida se cargó la muestra y se eluyó en dos fracciones (apolar y polar) con: 20 mL de hexano, 40 mL de hexano/DCM (8:2) v/v, y 20 mL de DCM (fase apolar) y finalmente con: 19 mL DCM/acetato de etilo (1:1) v/v y 20 mL de metanol. Cada fase se concentró hasta un volumen final de 0.5 mL en un rotavapor y finalmente se llevó casi a sequedad con un flujo suave de nitrógeno, para posteriormente reconstituirla según el procedimiento ya mencionado.

Para el análisis por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG/EM), se utilizó un sistema CG/EM Clarus 680/SQ8 (Perkin Elmer), con una columna capilar AB-5MS de 30 m x 0.25 mm x 0.25  $\mu\text{m}$ . La inyección se realizó en el modo split/splitless (relación de Split 20:1), con el inyector a  $295^{\circ}\text{C}$ . Como gas portador se utilizó helio ( $1.3 \text{ mL min}^{-1}$ ). Programa del horno: temperatura inicial de  $100^{\circ}\text{C}$  1 min; rampa de  $20^{\circ}\text{C min}^{-1}$  hasta  $290^{\circ}\text{C}$ , seguida de una segunda rampa de  $4^{\circ}\text{C min}^{-1}$  hasta  $310^{\circ}\text{C}$  y una tercera rampa de  $8^{\circ}\text{C min}^{-1}$  hasta  $330^{\circ}\text{C}$ , permaneciendo ahí hasta completar 24 min de corrida. El espectrómetro de masas fue operado en modo de impacto electrónico, una temperatura de la interfase con el cromatógrafo de  $280^{\circ}\text{C}$ , una temperatura similar de la fuente y barrido de 35 a 450 m/z. Para la identificación de los compuestos se utilizó el programa NIST MS Search 2.0, y para su cuantificación se utilizaron curvas de calibración de 6 puntos de los compuestos de interés ( $R > 0.99$ ). Los aspectos básicos del análisis de compuestos orgánicos y el aseguramiento de la calidad se describen en (Navarro *et al.*, 2014).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Tabla 2 se muestran los parámetros evaluados en cada una de las muestras de agua analizadas, es claro que, para la muestra que se tomó en los primeros momentos después de la mortalidad de los peces, los valores de conductividad eléctrica (CE) y compuestos nitrogenados [amonio ( $\text{NH}_4^+$ ), nitratos ( $\text{NO}_3$ ) y nitritos ( $\text{NO}_2$ )] presentaron los valores más altos, además de una mínima concentración de oxígeno disuelto ( $\text{O}_D$ ). Asimismo se puede observar la disminución de los valores de los mismos parámetros en la muestra del río tomada con posterioridad. Para comparar se muestran los valores promedio obtenidos en el río Nexapa en el punto en el que impacta un flujo de agua muy contaminada del Atoyac después de su paso por Puebla, durante los años 2012-2013 (Navarro *et al.*, 2013). Es significativa la similitud de los valores obtenidos. Es obvio que el río Nexapa ya no tiene ictiofauna en ese punto.

El amoniaco no ionizado,  $\text{NH}_3$ , es muy tóxico para los animales acuáticos, en especial para los peces, mientras que el ión amonio,  $\text{NH}_4^+$ , es apreciablemente mucho menos tóxico. La acción tóxica del  $\text{NH}_3$  puede ser debida a una o más de las siguientes causas: (1) destrucción del epitelio branquial; (2) estimulación de la glucólisis y supresión del ciclo de Krebs; (3) inhibición de la producción de ATP y reducción de sus niveles; (4) alteración de la actividad osmorreguladora; (5) disrupción del sistema inmunológico (Camargo & Alonso, 2007). No obstante su menor toxicidad, el  $\text{NH}_4^+$  puede contribuir a la toxicidad total (Levit, 2010). Tal como se observa en la ecuación 1, ambas especies se encuentran indisolublemente ligadas por el equilibrio químico:



Este equilibrio depende fuertemente del pH y la temperatura. La fracción de  $NH_3$ ,  $f_{NH_3}$  se puede calcular por las ecuaciones 2 y 3 (SRH, 2004; USEPA, 2009):

$$f_{NH_3} = \frac{1}{(10^{(pKa-pH)+1})}; f_{NH_3}^{ad} = \frac{1}{(10^{(pKa-pH+0.221)+1})} \quad (2)$$

$$pKa = 0.09018 + \frac{2729.92}{T} \quad (3)$$

Siendo  $f^{ad}$ , la fracción de amoníaco para aguas muy duras. De acuerdo a las mismas, un incremento de una unidad de pH ocasiona un incremento en 10 veces de la concentración de  $NH_3$ , duplicándose por cada 10°C de incremento de la temperatura.

Tabla 2: Valores de los parámetros estudiados.

SITIO, Clave	pH	CE	NO <sub>3</sub>	NO <sub>2</sub>	NH <sub>4</sub>	O <sub>D</sub>
Agua de pozo Sn Vicente Ferrer P1	8.15	1089	16.1	0.1	0.25	4.4
Agua de pozo Sn Francisco P2	8.12	1090	11.7	0.08	0.55	4.3
Agua de Rio Tehuiztingo P3	<b>7.89</b>	<b>2009</b>	<b>19.32</b>	<b>1.86</b>	<b>17.27</b>	<b>0.5</b>
Agua de Rio Tehuiztingo P4	8.39	873	13.37	0.29	1.94	4.9
Nexapa	6.96	1111	22.51	2.37	11.23	3.24

Considerando la dureza del agua de la muestra como típica de agua dulce y temperaturas entre 20 y 25°C, el cálculo por las ecuaciones anteriores muestra que la concentración de N-NH<sub>3</sub> correspondiente a la concentración de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> de la muestra P3 se encuentra entre 0.41 y 0.59 mg L<sup>-1</sup>, correspondientes a 13.82 y 14.07 mg L<sup>-1</sup> de Nitrógeno Total Amoniacal (NTA). Aunque el efecto agudo del NTA depende mucho de la especie, los valores encontrados exceden el valor de 11 mg L<sup>-1</sup> que establece la EPA como Concentración Máxima Criterio, en ausencia de mejillones, para pH=7.9 y 20°C (USEPA, 2013). Asimismo se exceden los niveles para amoníaco establecidos para la protección de la biota acuática en Argentina, que a pH=8 y T=20°C no debe exceder 0.31 mg L<sup>-1</sup> (SRH, 2004). La concentración de N-NTA también excede los valores de las regulaciones canadienses para la protección de la vida acuática, 0.41 y 0.29 mg L<sup>-1</sup> a pH=8 y T 20 y 25°C, respectivamente (EC, 2010).

El nivel de nitrógeno de nitritos de la muestra P3, 0.57 mg L<sup>-1</sup>, no excede los valores de la CL<sub>50</sub>, 96 h, reportados para ciprínidos, aunque cercanos a los de salmónidos (Camargo & Alonso, 2007). En general las altas concentraciones elevadas de nitritos pueden ocasionar estrés en los peces (Bautista & Velazco, 2011), que aunado a otros efectos puede contribuir a la mortalidad observada. La regulación canadiense para la protección de la vida acuática (0.06 mg L<sup>-1</sup> como nitrógeno), es ampliamente superada (CCME, 2001).

La concentración de oxígeno disuelto en la muestra P3, 0.4 mg L<sup>-1</sup>, es característica de un ambiente con hipoxia, no aceptable para la vida acuática, pues la concentración mínima para especies de aguas cálidas es de 5.5 mg L<sup>-1</sup> en Canadá (CCME, 2001) y de 5.0 mg L<sup>-1</sup> para la protección de la vida acuática según lo establecido en México (LFD, 2015). Esta baja concentración de oxígeno refleja su alto consumo a través de los procesos metabólicos en el ecosistema acuático, lo cual se debe principalmente a vertimientos antrópicos, mismos que alteran el proceso de autodepuración de un cuerpo de agua. También es importante mencionar que en la misma muestra se observa un valor de la CE superior a las otras muestras analizadas, que indica una alteración de la concentración de sales en el río, pudiendo atribuirse también a un vertido de residuos al río.

De esta manera, la causa directa de la muerte de los peces es la hipoxia con el efecto concurrente de una elevada concentración de nitrógeno amoniacal. Queda entonces determinar si ambas son atribuibles a una causa no natural.

En la Tabla 3 se muestran las concentraciones de algunos microcontaminantes orgánicos (MCO), de origen antropogénico (denominados también contaminantes emergentes, productos de uso cotidiano por la población), determinados por CG/EM: cafeína (CAF), galaxolide (GAL), tonalide (TON), sunscreen UV15 (SCR), parsol CMX (PAR), metildihidrojasmonato (MDJ), naproxeno (NAP), ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4D), así como octil- y nonilfenoles (AF). También se determinaron las concentraciones de coprostanol (CPL) y etilcoprostanol (ETCPL). Como referencia comparativa se muestran las concentraciones de esos contaminantes en el río Nexapa (2012-2013), de nuevo a la altura del impacto del trasvase de aguas del Atoyac.

Tabla 3: Concentración de contaminantes emergentes evaluados en diversas matrices.

CLAVE	CAF	GAL	TON	PAR	MDJ	NAP	AF	CPL	ETCPL
<b>BRANQUIAS</b>	<LD	0.22	0.24	0.50	5.91	1.13	6.30	100.4	10.7
<b>HIGADO</b>	nd	0.95	1.07	<LD	26.17	<LD	21.56	491.3	37.4
<b>SEDIMENTO</b>	<LD	0.16	0.03	0.11	0.42	<LD	<LD	56.0	22.8
<b>P1</b>	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	1.8	0.6
<b>P2</b>	<LD	<LD	<LD	0.03	<LD	<LD	<LD	4.7	1.1
<b>P3</b>	<b>13.62</b>	<b>3.99</b>	<b>0.22</b>	0.13	<b>0.22</b>	<b>0.34</b>	<b>6.92</b>	<b>591.3</b>	<b>317.4</b>
<b>P4</b>	0.66	<LD	0.1	0.08	<LD	0.13	nd	15.6	3.8
<b>Nexapa</b>	4.41	1.73	0.22	1.95	7.32	2.53	30.62	252.7	-

Nota: Todas las concentraciones en ppb,  $\mu\text{g kg}^{-1}$  masa húmeda o  $\mu\text{g L}^{-1}$ .

Se puede observar que todos presentan una elevada concentración en la muestra de agua del río 3, en comparación con las demás. Los AF, únicos regulados en Estados Unidos y Canadá, se encuentran por debajo de los límites para la protección de la vida acuática ( $28 \text{ g L}^{-1}$ ), aunque es evidente que hay bioacumulación en los peces. No se detectaron ni 2,4D ni SCR.

Es de resaltar la presencia de concentraciones muy elevadas de CPL, compuesto que se ha usado desde hace tiempo como indicador de contaminación fecal (Srijew *et al.*, 2016). Este compuesto fue identificado en altas concentraciones en las branquias y el hígado lo cual constituye a una acumulación en órganos importantes para los organismos acuáticos, dichas concentraciones son superiores a las que se identificaron en sedimento. Dado que las aves no excretan cantidades considerables de coprostanol (Noblet *et al.*, 2004), esto indica aportes de excretas de mamíferos. La relación ETCPL/CPL, alcanza un valor de 0.54 para la muestra P3, considerablemente superior a la muestra P4 (0.23). De igual manera la relación CPL/(CPL+ETCPL) disminuye de 0.81 en la muestra P4 a 0.65 en la muestra P3. Esto indica que durante el incidente hubo un incremento de la descarga de excretas de rumiantes (Shah *et al.*, 2007; Suprihatin & Cromar, 2008).

La comparación con las concentraciones obtenidas en el punto ya mencionado del río Nexapa, resulta muy interesante. La mayoría de los MCO están por debajo de las observadas en ese río. Es de señalar que las aguas que se trasvasan al Nexapa se derivan justo después del paso por la ciudad de Puebla, una urbe que impacta fuertemente al Atoyac con estos contaminantes emergentes. Después el río Atoyac llega a la Presa Valsequillo, donde los procesos naturales degradan una parte considerable de la contaminación y después de la presa continúa su curso y recibe otras corrientes de agua. Entonces, considerando esta diferencia entre el Nexapa y los valores en el río Atoyac a la altura del lugar del incidente y la elevada diferencia entre los valores de coprostanol para ambas corrientes, se puede concluir que este vertido ocurrió después del paso por la Presa Valsequillo, proveniente de una zona con ganado, dado lo observado con respecto a la relación entre los esteroides analizados.

La disminución brusca de las concentraciones de las especies químicas estudiadas, indica el carácter súbito del vertido que avanzó por la corriente del río. Sobre su extensión en el tiempo, considerando que la muestra P3 fue tomada unas 12 horas después del avistamiento de los peces muertos y que la muestra P4 ya mucho más limpia se colectó 24 horas después, se puede considerar que fue un evento de más de 12 horas de duración

## CONCLUSIONES

El análisis de los resultados, permite extraer las siguientes conclusiones:

1. Se detectó una baja concentración de oxígeno disuelto, inaceptable para la vida acuática y una concentración elevada de  $\text{NH}_4^+$  de nitritos en la muestra del agua del río, tomada el día del incidente. Esta es la causa directa más probable de la mortandad de peces observada.
2. La muestra de agua del río presentó además concentraciones elevadas de microcontaminantes orgánicos antropogénicos, lo cual señala a un vertimiento de residuos al cauce de la corriente como la causa indirecta de la muerte de los peces.
3. Las elevadas concentraciones de coprostanol y la relación etilcoprostanol/coprostanol indican el vertido de heces de humanos y rumiantes al río.

Considerando que en este caso la actuación rápida permitió identificar las causas más probables de la muerte de los peces, se recomendó a las autoridades correspondientes, que se establezca un protocolo concerniente a la actuación una vez que se detecten casos similares, así como disponer de los materiales para realizar la toma de muestra lo antes posible y garantizar su traslado a los laboratorios que se designen para realizar los análisis. Esto permitiría estar en mejores condiciones para enfrentar estos eventos.

## REFERENCIAS

1. Acreman, M. (2016). Environmental flows—basics for novices. *WIREs Water*, 3, 622–628. doi: 10.1002/wat2.1160.
2. Alabaster, J.S. & Lloyd, R. (1982). *Water Quality Criteria for Freshwater Fish*. Butterworth, London.
3. Baskar, S., Narasimhan, N., Swamidass, G., Ravichelvan R., Sukumaran, M. & Anandaraj, T. (2013). Seasonal Variations in physico-chemical parameters of river Cauveri, Thanjavur, Tamil Nadu, India. *Intl. J. Res. Biol. Sci.* 3(1), 8-11.
4. Bautista, J.C. & Velazco, J.M. (2011). Calidad de agua para el cultivo de Tilapia en tanques de geomembrana. *Revista Fuente*, 3(8), 8-13.
5. Camargo, J.A. & Alonso, A. (2007). Contaminación por nitrógeno inorgánico en los ecosistemas acuáticos: problemas medioambientales, criterios de calidad del agua, e implicaciones del cambio climático. *Ecosistemas*, 16(2), 1-13.
6. CCME, Canadian Council of Ministers of Environment (2001). *Canadian Environmental Quality Guidelines and Summary Table online*. <http://ceqg-rcqe.ccme.ca/>. (consultada, 07/2016)
7. Chen, J., Li, F., Fan, Z. & Wang, Y. (2016). Integrated Application of Multivariate Statistical Methods to Source Apportionment of Watercourses in the Liao River Basin, Northeast China. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 13(10), 1035. <http://doi.org/10.3390/ijerph13101035>
8. Chinyama, A., Ncube, R. & Ela, W. (2016). Critical pollution levels in Umguza River, Zimbabwe. *Physics and Chemistry of the Earth, Parts A/B/C*, 93, 76-83, <http://doi.org/10.1016/j.pce.2016.03.008>.

9. Cowx, I. & Collares Pereira, M. (2002). *Freshwater fish conservation: options for the future*. In: Collares-Pereira M., Cowx I., y Coelho M., (Eds) Conservation of freshwater fishes: options for the future. Fishing News Books, Blackwell Science, Oxford, pp. 443-452.
10. Dewis, S., Long G. & Keenan R., (2005). *Response procedures for natural and pollution-related fish kill incidents in the Atlantic Region*. 117 pp., Environment Canada.
11. EC, Environment Canada (2010). *Canadian Water Quality Guidelines for the Protection of Aquatic Life: Ammonia*.
12. Eissa, A.E., Tharwat, N.A. & Zaki, M.M. (2013). Field assessment of the mid-winter mass kills of trophic fishes at Mariotteya stream, Egypt: Chemical and biological pollution synergistic model. *Chemosphere*, 90 (3), 1061-1068, <http://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.09.010>.
13. Gómez, S.E., (2014). Análisis de las mortandades masivas de peces en el siglo 20, Argentina, Sud América. *Bioikos*, 28 (2), 95-102.
14. La, Van T. & Cooke, S.J. (2011). Advancing the Science and Practice of Fish Kill Investigations. *Reviews in Fisheries Science*, 19(1), 21-33. DOI: 10.1080/10641262.2010.531793.
15. Levit, S.M. (2010). *A Literature Review of Effects of Ammonia on Fish*. Center for Science in Public Participation Bozeman, Montana (2010). <https://www.conservationgateway.org/ConservationByGeography/North America/UnitedStates/alaska/sw/cpa /Documents/ L2010ALR122010.pdf>
16. LFD, Ley Federal de Derechos (2015). Texto vigente. Última Reforma DOF 18-1-2015. Cámara de Diputados del H. Congreso de la Unión.
17. Lockett, C.N. (2015). *2014 Fish Kill Summary*. Maryland Department of the Environment. Science Services Administration. Fish Kill Investigation Section.
18. Matamoros, V., Jover, E. & Bayona, J. (2010). Part-Per-Trillion Determination of Pharmaceuticals, Pesticides, and Related Organic Contaminants in River Water by Solid-Phase Extraction Followed by Comprehensive Two-Dimensional Gas Chromatography Time-Of-Flight Mass Spectrometry. *Anal. Chem.*, 82, 699-706.
19. Misra, A. (2010). A River about to Die: Yamuna. *Journal of Water Resource and Protection*, 2 (5), 489-500. doi: 10.4236/jwarp.2010.25056.
20. Navarro, A., Herrera, J., Caso, L. & Marrugo, J. (2013). *Calidad del agua del río Nexapa: Tendencias espacio-temporales y sus implicaciones*. En M. Ramos., V. Aguilera., (eds.) .Ciencias Naturales y Exactas, Handbook T-I. -©ECORFAN- Valle de Santiago, Guanajuato, pp. 83-97.
21. Navarro A., Herrera J., Marrugo J., Bayona J., Morales L. (2014). Microcontaminantes orgánicos en los ríos de México: El caso del río Nexapa. En M. Ramos., V. Aguilera., (eds.). Ciencias de la Ingeniería y Tecnología, Handbook T-IV. -©ECORFAN- Valle de Santiago, Guanajuato, pp. 49-63.
22. Noblet, J.A., Young, D.L., Zeng, E.Y. & Ensari, S. (2004). Use of Fecal Steroids To Infer the Sources of Fecal Indicator Bacteria in the Lower Santa Ana River Watershed, California: Sewage Is Unlikely a Significant Source. *Env. Sci. Tech.*, 38, 6002-6008.
23. O'Hearn, R. & McAteer, S. (2016). *Missouri pollution and fish kill investigations 2015*. Missouri Department of Conservation.

24. Poikane, S., Ritterbusch, D., Argillier, C., Białokoz, W., Blabolil, P., Breine, J., *et al.* (2017). Response of fish communities to multiple pressures: Development of a total anthropogenic pressure intensity index. *Sci. of the Total Environ.*, *586*, 502-511 (<http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.01.211>).
25. Polidoro, B.A. & Morra, M.J., (2016). An ecological risk assessment of pesticides and fish kills in the Sixaola watershed, Costa Rica. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.*, *23* (6), 5983-91. doi: 10.1007/s11356-016-6144-0.
26. Schulz, U.H. & Costa, P.F. (2015). The effects of press and pulse disturbance by long and short-term pollution on the fish community in the Sinos River, RS, Brazil. *Brazilian Journal of Biology*, *75* (2, Suppl.), 36-44. <https://dx.doi.org/10.1590/1519-6984.0813>.
27. Shah, V.G., Dunstan, R.H., Geary, P.M., Coombes, P., Roberts, T.K. & Von Nagy-Felsobuki, E. (2007). Evaluating potential applications of faecal sterols in distinguishing sources of faecal contamination from mixed faecal samples. *Wat. Res.*, *41*, 3691-3700. DOI: 10.1016/j.watres.2007.04.006
28. Small, K., Kopf, R.K., Watts, R.J. & Howitt, J. (2014). Hypoxia, Blackwater and Fish Kills: Experimental Lethal Oxygen Thresholds in Juvenile Predatory Lowland River Fishes. *PLoS ONE*, *9* (4), e94524. doi:10.1371/journal.pone.0094524.
29. SRH, Secretaría de Recursos Hídricos de la Nación (2004). *Desarrollos de niveles guía nacionales de calidad de agua ambiente correspondientes a amoniaco*. República Argentina. <http://studylib.es/doc/5975996/desarrollos-de-niveles-guia-nacionales-de-calidad>.
30. Srijew, S., Chiemchaisri, W., Chiemchaisri, C. & Satoh, H. (2016). Source identification of fecal contamination in the canals in Bangkok using fecal sterol compounds. *J. Water Sanit. Hyg. Dev.*, *6* (1) 13-22. DOI: 10.2166/washdev.2016.033.
31. Suprihatin, I.E. & Cromar, N. (2008). *Steroid profiles determine sources of faecal pollution*. Proceedings of The International Seminar on Chemistry, pp. 713-716. Jatinangor, 30-31 October. <http://www.chemistry.unpad.ac.id/isc-proceeding/2008/Pdf/PP/0713-0716%20PP107%20Iryanti.pdf>.
32. USEPA, United States Environmental Protection Agency (2009). Draft 2009 update aquatic life ambient water quality criteria for Ammonia – freshwater. EPA-822-D-09-001.
33. USEPA, United States Environmental Protection Agency (2013). *Aquatic life ambient water quality criteria for Ammonia – freshwater*. EPA 822-R-13-001.
34. Yeasmin, F., Rahman, S., Rana, S., Fatema, K. & Hossain, M. (2011). Determination Of Carcinogenic Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (Pahs), Anthracene In Different Variety Of Fish Samples In The Bangsai River Of Bangladesh. *African Journal of Food, Agriculture, Nutrition and Development*, *11* (2), 4664-4672. DOI: 10.4314/ajfand.v11i2.65920
35. Zhang, S., Zhang, Q., Darisaw, S., Ehie, O. & Wang, G. (2006). Simultaneous quantification of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), polychlorinated biphenyls (PCBs), and pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in Mississippi river water, in New Orleans, Louisiana, USA. *Chemosphere*, *66*, 1057-1069. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2006.06.067

