

Evaluación de la calidad microbiológica y físico-química del río Xichú y aislamiento de microorganismos degradadores de triclosán en la reserva de la biósfera sierra gorda de Guanajuato

Claudia González, Gustavo de la Riva, Francisco Alejo y María Márquez

C. González, G. de la Riva, F. Alejo y M. Márquez
Instituto Tecnológico Superior de Irapuato, Carretera Irapuato- Silao Km. 12.5, s/N, C.P: 36821, Guanajuato, Irapuato.
clgonzalez@itesi.edu.mx.

M. Ramos., V.Aguilera., (eds.).Ciencias Naturales y Exactas, Handbook -©ECORFAN- Valle de Santiago, Guanajuato, 2014.

Abstract

Samples of water and sediments from Xichú River in the north of the Guanajuato State were taken in order to evaluate the water quality and the isolation of microorganisms potentially triclosan resistant and removers. Water that is used primarily for human consumption and for agriculture but due to triclosan is actually included as active ingredient in many household products and discharged to wastewater conducted to river; it may increase bacterial resistance to antimicrobials. Recently it has been placed in the status emerging contaminant and it has been shown that this compound acts as an endocrine disruptor, causing damage to different organisms. Current treatments for the removal of xenobiotic as triclosan (TCS) are costly and inefficient, leaving these substances exposed terminals effluent stations Wastewater Treatment Microbial and biodegradation is an option to this problem. For the water quality, we identified total and fecal coliforms, *E. coli*, and the quantification of helminthes eggs. Also physicochemical analysis was performed to determine temperature, pH, CO₂, hardness, dissolved oxygen, nitrate, phosphate and total solids. For the selection of resistant organisms and degradative, bioassays were performed using minimal medium supplemented with triclosan (20 ppm) and minimal medium containing triclosan as sole carbon source.

The results suggest water pre-treatment is needed for human consumption and could be used for other purposes that do not compromise the health and balance of the ecological system.

In other hand, the isolation of three bacteria strains capable degrading triclosan was achieved. Some biochemical test and colonial morphology was analyzed.

16 Introducción

El agua es un elemento vital para la existencia humana, de su uso adecuado depende nuestra salud, alimentación y producción agrícola. El utilizar agua contaminada en la preparación de alimentos u otras actividades nos podría producir un gran número de casos de infección. Por tal motivo, existen guías de vigilancia y control de calidad de del agua para consumo humano, como el acuerdo cooperativo entre la Organización Panamericana de la Salud/Organización Mundial de la Salud (OPS/OMS) y la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos de América (USEPA), en cumplimiento de una actividad relacionada con el Plan de Mejoramiento de la Calidad del Agua en América Latina y el Caribe (Fuentes, 2007).

En México; en febrero del 2012 fue publicado en el Diario Oficial de la Federación, el decreto por el cual se han hecho reformas al artículo 4° de la Constitución política de los estados unidos mexicanos, por la que se asegura el Derecho Humano al agua y la obligación correctiva del estado mexicano en garantizar el acceso y uso equitativo y sustentable de los recursos hídricos del país (Ley General de Aguas, 2012).

La calidad de diferentes tipos de agua se ha valorado a partir de variables físicas, químicas y biológicas, evaluadas individualmente o en forma grupal.

Los parámetros físico-químicos dan una información extensa de la naturaleza de las especies químicas del agua y sus propiedades físicas, sin aportar información de su influencia en la vida acuática; los métodos biológicos aportan esta información pero no señalan nada acerca del contaminante o los contaminantes responsables, por lo que muchos investigadores recomiendan la utilización de ambos en la evaluación del recurso hídrico (Lombardo, 2008).

En el municipio de Xichú cuya cabecera municipal está situada en las coordenadas geográficas 100° 03' 37'' de longitud oeste y 21° 18' 00'' latitud norte, con una altura sobre el nivel del mar es de 1,334 metros, se encuentra la microcuenca que forma el río Xichú, muy importante debido a que está totalmente dentro de la Reserva de la Biosfera Sierra Gorda de Guanajuato, por lo que si existe algún impacto provocado por algún agente contaminante, éste podría afectar a los diferentes ecosistemas que le rodean y al mismo ser humano, dado que el uso principal del agua de dicho río así como las corrientes que le abastecen es para consumo humano, así como para riego agrícola.

La calidad del agua en los principales cauces de la Reserva no está determinada cuantitativamente y se considera que hay cierto deterioro debido a factores como descargas de aguas residuales de asentamientos humanos, basura y escurrimientos de los excesos de compuestos químicos que se utilizan para la agricultura y otros urbanos y suburbanos que se depositan en tiraderos a cielo abierto. Entre los principales problemas ambientales detectados y priorizados por la población de la reserva están el agua y generación y disposición de residuos, ya que considerando que sólo cuenta con precipitaciones anuales que no superan los 850 mm y, además, la naturaleza cárstica de los suelos propicia que gran parte del agua pluvial que se recibe se infiltre y haya pocas corrientes superficiales permanentes utilizables. (INE, 1999).

La evaluación de aspectos contaminantes define la aceptabilidad en términos de calidad de este líquido vital para el uso y consumo humano. Es por ello que una parte del presente estudio está centrado en hacer una evaluación de la calidad microbiológica y de algunos parámetros físico-químicos del agua. Sin embargo, existen otros compuestos que aun no están normados y de los cuales se desconoce su impacto ecológico. En éste sentido es de particular el triclosán (5-cloro-2-(2,4-diclorofenoxi)-fenol), el cual es un agente antimicrobiano sintético común que ha sido incorporado en más de 700 productos diferentes de cuidado personal e industrial. Estos productos, como desodorantes, jabones, cremas dentales, y diversos productos de plástico, contienen 0.1-0.3% de triclosán. La propagación del triclosán en el medio ambiente ha despertado una gran preocupación, ya que el nivel de seguimiento de triclosán podría promover el desarrollo de microorganismos resistentes y de causar efectos adversos en el ecosistema. Cuando se expone a los rayos UV, el triclosán puede ser transformado en productos químicos más tóxicos como clorodioxinas.

La biodegradación del triclosán en el medio ambiente y las aguas residuales ha convertido recientemente en un tema de investigación interesante. Un estudio informó que aproximadamente el 79% de triclosán se eliminó mediante procesos de tratamiento biológico de aguas residuales, sugiriendo que la biodegradación puede ser un mecanismo importante (Lee, et al., 2012).

Varios estudios determinaron que el triclosán puede actuar como un agonista del receptor de estrógeno y muestra actividad estrogénica. Por lo tanto, podría tener efectos endocrinos y en el desarrollo reproductivo mediante la alteración de la señalización hormonal (Honkisz y Wojtowicz 2012).

Finalmente, en un estudio publicado en la revista "Proceedings", de la Academia Nacional de Ciencias de Estados Unidos (PNAS), se demostró que el triclosán perjudica la función de algunos músculos. Al interrumpir la comunicación entre dos proteínas fundamentales para el funcionamiento de los músculos estriados, el triclosán provocó insuficiencias musculares en células del corazón y en músculos esqueléticos, tanto en animales (ratones y peces) como en seres humanos (Cherednichenkoa, et al 2012).

La biodegradación se ha sugerido como una alternativa importante para la eliminación de triclosán en las aguas residuales. Hasta la fecha, sólo unos pocos microorganismos de aguas residuales, incluyendo *Sphingomonas* sp. Rd1, *Nitrosomonas europaea*, *Sphingomonas* sp. PH-07 y *Sphingophyxis* Strain KCY1, se sabe que degradan triclosán a través de reacciones de vía cometabólica. Aunque dos bacterias de suelo son conocidas por utilizar triclosán como fuente única de carbono. Y aún se desconoce si los microorganismos de aguas residuales pueden utilizar triclosán como fuente de carbono (Lee, 2013).

La parte final del estudio aquí presentado consistió en aislar y caracterizar los microorganismos resistentes y degradadores de triclosán como parte de un estudio microbiológico en cuatro sitios muestreados en la microcuenca del río Xichú y su intersección con el río Laja en subcuenca hidrológica del río Santa María de la Reserva de la Biósfera Sierra Gorda de Guanajuato.

16.1 Materiales y métodos

Muestreo y análisis de calidad de agua

Los análisis fisicoquímicos y microbiológicos fueron realizados en el Laboratorio de Bioquímica y Microbiología del Instituto Tecnológico Superior de Irapuato (ITESI) ubicado en la ciudad de Irapuato, Guanajuato. La toma y preservación de muestras se realizó conforme lo establecido dentro de la norma NMX-AA-014-1980. Para la realización de los análisis de calidad del agua se tomaron en cuenta 5 puntos de muestreo, 4 (P1 al P4) a lo largo de una corriente perene de abastecimiento del río Xichú y el quinto se tomó en un punto del nacimiento de ésta corriente (ubicado en la localidad de Casitas), la cual utilizan los pobladores para consumo humano (P5), las coordenadas de ubicación se presentan en la Tabla 1. Con respecto al análisis microbiológico se tomó en cuenta la Norma Mexicana NMX-AA-42-1987 para la cuantificación de coliformes totales, coliformes fecales y *Escherichia coli* por el método de NMP, utilizando como medio de cultivo caldo lactosado; para los medios confirmativos se usaron los caldos bilis verde brillante (BVB) y el medio EC respectivamente.

Para la cuantificación de los huevos de helminto se siguió el procedimiento descrito por la Norma Mexicana NMX-AA-113-SCFI-1999, en las muestras se utiliza la combinación de dos métodos en una sola técnica; el método difásico y el método de flotación que suponen una confiabilidad de hasta el 90 % en muestras artificiales contaminadas con huevos de helminto.

Para la determinación de los parámetros fisicoquímicos se utilizaron equipos de Hanna instruments ®. Los parámetros determinados y su respectivo número del kit utilizado son los siguientes: temperatura (HI 145), pH (pH ep® 4 meter), CO₂ (HI 3818), dureza (HI 3812), oxígeno disuelto (HI 3810), nitrato (HI 3874), fosfato (HI 3833) y sólidos totales; para este último punto se basó en la norma NNMX-AA-034-SCFI-2001. Los resultados obtenidos para OD se cotejaron con lo estipulado por la norma PROY-NMX-AA-012-SCFI-2009, mientras que el resto de los parámetros se compararon con lo estipulado en la norma NOM-127-SSA1-1994.

Tabla 16 Puntos de muestreo para calidad de agua

Punto	Coordenadas de Ubicación
P1	Lat N 21°18'46.7''
	Long O 100°6'40.18''
P2	Lat N 21°18'50.40''
	Long O 100°6'39.01''
P3	Lat N 21°18'51.27''
	Long O 100°6'36.24''
P4	Lat N 21°18'36.89''
	Long O 100°7'39.67''
P5	Lat N 21°18'38.15
	Long O 100°7'41.67''

Muestreo y colecta para aislamiento de microorganismos

Se seleccionaron 4 sitios de muestreo en base a la ubicación de aguas superficiales cercanas a diferentes comunidades circundantes a la microcuenca del río Xichú y su intersección con el río Laja en subcuenca hidrológica del río Santa María de la Reserva de la Biósfera Sierra Gorda de Guanajuato, se colectaron muestras de agua y sedimento y se registraron las principales características de la toma de muestra, los cuales se detallan en la Tabla No. 2

Tabla 16.1 Características de las Zonas Muestreadas

Puntos de muestreo	Coordenadas	Elevacion	T° agua	T° ambiente	Ph	Profundidad
"El charro"	N 21° 18' 38.5"	2354 m	17°c	18°c	6.3	22 cm
Municipio xichú	O 100° 07'41.05					
"El charco azul"	N 21° 18' 50.6	2265 m	19°c	17°c	7.3	60 cm
Municipio xichú	O 100° 06'39.2"					
"El charco azul"	N 21° 18' 44.9"	2278 m	17°c	18°c	7.2	37 cm
Municipio xichú	O 100° 06' 40.4"					
"San agustín", municipio victoria	N 21°c 19' 12.4"	2378 m	18°c	17.5°c	7.3	14 cm
	O 100° 09'27.3"					

Las muestras de sedimentos, fueron introducidas dentro de bolsas plásticas con cierre hermético y almacenadas junto a las muestras líquidas, dentro de una hielera con bolsas de hielo herméticamente selladas, para su posterior análisis en laboratorio.

Aislamiento de Microorganismos

Se sembraron diluciones seriadas (10^{-1} hasta 10^{-5}) de las muestras de agua y sedimento en solución salina peptonada en placas Petri con agar nutritivo y PDA inoculando 70 μ l de cada dilución por duplicado distribuyendo con ayuda de asa de Drigalsky y se incubaron a 37° C durante 24 a 48 hrs. Transcurriendo el tiempo asignado se realizó el conteo y repique de colonias microbianas y fúngicas diferentes para la obtención de aislados puros.

Ensayos de Resistencia y degradación de triclosán in vitro

Los ensayos de degradación y resistencia de los microorganismos aislados se realizaron empleando medio mínimo sólido cuya composición en g/l fue: 13.48 g K_2HPO_4 , 16.68 g KH_2PO_4 , 0.5 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.3 g $(NH_4)_2SO_4$ y 14 g de agar bacteriológico (Aquiahuatl et al, 2004), adicionado con 20 ppm de triclosán y 10 g/l de dextrosa para el ensayo de resistencia, mientras que para los ensayos de degradación se utilizó triclosán como única fuente de carbono. Las cajas fueron incubadas a 37°C cubiertas con papel aluminio durante 72 horas y se evaluó el crecimiento de microorganismos.

Pruebas Bioquímicas

A cada una de las cepas degradadoras y resistentes a triclosán encontradas, se les realizaron diferentes pruebas bioquímicas. Se les realizó las pruebas de TSI (Agar- Hierro triple azúcar), LIA (Agar Hierro Lisina), prueba de Citrato de Simmons, prueba de Catalasa (preparando cajas con agar nutritivo sembradas con las cepas clave y usando peróxido de hidrogeno como indicador) y prueba de Urea con caldo de urea.

Morfología Colonial

Las colonias de cada cepa fueron estudiadas en forma, tamaño, elevación, borde o margen, color, superficie, densidad, consistencia, luz reflejada, luz transmitida y aspecto de cada una de las cepas.

16.2 Resultados y discusión

Análisis microbiológicos y físico-químicos de calidad de agua

Los resultados obtenidos de los parámetros microbiológicos así como de huevos de helminto se presentan en la Tabla 3 junto con los límites permisibles.

De acuerdo al análisis de los resultados; según los parámetros microbiológicos, se puede observar un gradiente del punto inicial (P1) al punto final (P4), en el que la carga microbiológica se ve disminuida en un 57.5%, aproximadamente. Es necesario que el agua del río en los puntos P1 al P5 reciba un tratamiento previo antes de su consumo desde la perspectiva microbiológica, pues los parámetros se encuentran por arriba de lo estipulado en la normatividad y puede representar problemas de salud pública si se consume “cruda”.

Tabla 16.2 Resultados de Análisis Microbiológico

Parámetro	P1	P2	P3	P4	P5	Límite permitido Para agua de de consumo Humano NOM-127- SSA1-1994	Límite permitido Para agua de uso (riego agrícola) CE-CCA- 001/89
Coliformes* totales	≥ 240	160	160	92	5	Ausencia o no detectables	2000
Coliformes* fecales	65	92	7	17	7	Ausencia o no detectables	1000
E.coli*	50	8	4	6	2	Ausencia o no detectables	1-5
Huevos de helminto*	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	≤ 1	Ausencia

En la Tabla se encuentran registrados los parámetros fisicoquímicos y de forma comparativa se incluyen los límites permitidos para cada uno de los aspectos analizados.

Los valores del potencial de hidrogeno (pH) se mantienen igual en todos los puntos muestreados (7.2) por lo que indican niveles de pH ligeramente alcalinos y se muestran en un nivel optimo, se encuentran dentro de los límites permisibles según la OMS, y la normativa mexicana.

En este estudio el rango de concentración de nitrato se mantuvo en 44.3 por lo que se encuentra dentro de los límites marcados por la OMS; no así en la normativa mexicana, puesto que supera el máximo permisible según la NOM 127-SSA1-1994.

El dióxido de carbono (CO₂) indica la cantidad de carbono orgánico presente en la muestra. En el estudio se encontró en valores de 20.5 y 28.5 con una media de 23.8 mg/l.

La dureza se encuentra entre los 81 y 129 mg/l con una media de 97.8 mg/l, por lo que se encuentra dentro de los límites permisibles marcados tanto por la OMS como por la norma mexicana NOM-127-SSA1-1994.

El oxígeno disuelto, en la presente investigación se encuentra en valores que fluctúan de 3.5 hasta 7 mg/l; por lo que superan por mucho los límites permisibles según la OMS.

En este estudio los valores del fosforo van de 1 hasta 2 con una media de 1.6 mg/L; por lo que se encuentran dentro de los límites permisibles impuestos por la norma NOM-001-ECOL-1996.

Tabla 16.3 Resultados de Análisis físico-químico

Parámetro	P1	P2	P3	P4	P5	Límite permitido OMS	Límite permitido Normas Mexicanas
Temperatura (°C)	23.4	23.3	22.3	22.7	22.9	—	—
pH	7.2	7.2	7.2	7.2	7.2	6.5 - 8.5 ± 3	6.5 - 8.5
CO ₂ (mg/L)	24.5	20.5	23	22.5	28.5	—	—
Dureza (mg/L CaCO ₃)	96	129	81	102	81	100-500	500
OD (mg/L)	5.5	3.5	5	7	6.5	2-5	5.0
Nitrato (mg/L NO ₃)	44.3	44.3	44.3	44.3	44.3	25-45	—
Fosfato (mg/L)	1	2	2	2	1	—	10
Sólidos totales (mg/L)	6	160	20	160	60	—	120-200

Por otro lado los sólidos totales se encuentran en un rango de 6 hasta 160 mg/l con una media de 81.2 mg/l; por lo que también se considera dentro de los límites máximos permitidos por las normas NOM-001-ECOL-1996 y NOM-CCA/032-ECOL/1993. Otro de los parámetros evaluados fue la temperatura, la cual modifica la solubilidad de las sustancias aumentando la cantidad de sólidos disueltos y disminuyendo la de los gases, lo que le confiere una gran importancia para el desarrollo de los diferentes procesos biológicos; pero en realidad al ser un parámetro dependiente del tipo de ecosistemas, la normativa utilizada no aplica.

Aislamiento y caracterización de microorganismos degradadores de triclosan

Se aislaron un total de 36 colonias diferentes de las 4 muestras de agua y sedimento recolectadas.

De las muestras de agua, se aislaron un total de 17 cepas bacterianas y 2 fúngicas tanto en las muestras de agua como de sedimento, de lo cual se especula que no hay diferencia entre los microorganismos presentes en agua y sedimento en las 4 estaciones de muestreo.

Los ensayos de resistencia y degradación de triclosán permitieron seleccionar 3 cepas de 36 de ellas obtenidas de sedimento y una de agua con resistencia a triclosan y con capacidad para degradarlo, que representa aproximadamente el 8% del total de las cepas aisladas, de las cuales el 5.5 % de la resistencia se presentó en muestras de sedimento y solamente el 2.5% en muestras de agua. Las cepas seleccionadas fueron nombradas M1S_A, MIS_p, M4A_A como se detalla en la Tabla 5.

Tabla 16.4 Cepas Seleccionadas por su resistencia y degradación de Triclosán

Clave de la cepa	Estacion de muestreo	Naturaleza de la muestra
M1sa	“el chorro” municipio de xichú	Sedimento
M1sp	“el chorro” municipio de xichú”	Sedimento
M4a _a	“san agustín municipio de victoria”	Agua

Tabla 16.5 Características de la Morfología Colonial en Medio Mínimo

Característica	Cepas		
	M1s _a	Misp	M4a _a
Morfologica	M1s _a	Misp	M4a _a
Tamaño	2 mm	4 mm	3.5 mm
Forma	Irregular	Rizoide	Irregular
Elevacion	Plana	Poco elevada	Plana
Borde	Ondulado	Ondulado	Ondulado
Color	Marrón	Beige	Marrón
Densidad	Translucida	Opaca	Translucida
Consistencia	Suave	Suave	Suave

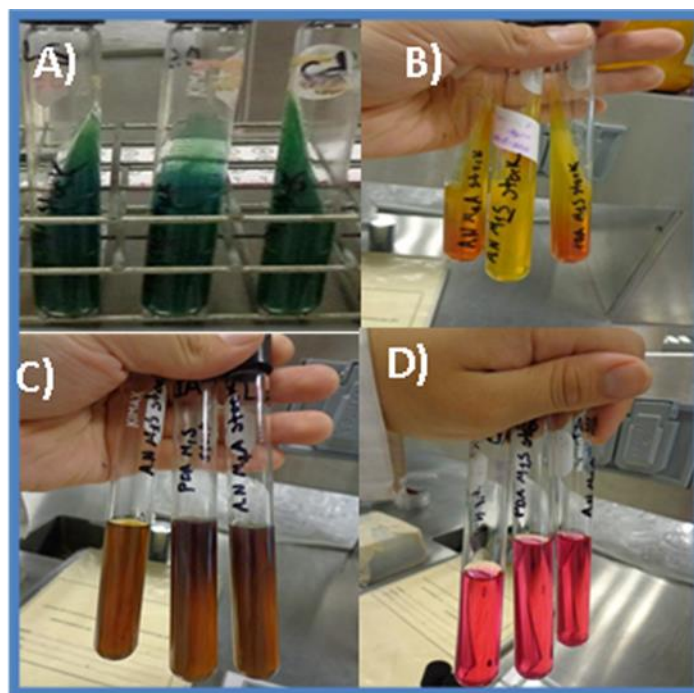
La caracterización bioquímica de las 3 cepas resistentes y degradadoras de triclosán indican actividad fermentadora (glucosa) de la cepa M1SA y productora de gas en el medio TSI y cambio de color como se puede apreciar en la Figura 1B) en el segundo tubo izquierda-derecha, las pruebas de Citrato (segundo tubo izquierda-derecha Figura 1 A), y el ensayo LIA (primer tubo izquierda-derecha Figura 1 C) y ureasa (primer tubo izquierda-derecha Figura 1D), de lo cual se concluye que esta no utiliza citrato como fuente de carbono, no tiene la capacidad de descarboxilar lisina o desaminar la lisina y se descarta la presencia de ureasa y catalasa.

Por su parte, la cepa M1Sp resultó ser fermentadora de azúcares (lactosa o sacarosa), observándose el resultado en el tercer tubo de la Figura 1 B), las pruebas de citrato (tercer tubo Figura 1.A) y ureasa (segundo tubo Figura 1 D)) fueron negativas, por lo que no utiliza el citrato como fuente de carbono ni hay presencia de ureasa. Con respecto a la prueba de LIA, la cepa tiene la capacidad de descarboxilar la lisina (Segundo tubo Figura 1.C).

La cepa M4AA resultó ser fermentadora de azúcares (lactosa o sacarosa) observándose resultado en el primer tubo de la Figura 1.2, tiene la capacidad de descarboxilar la lisina (tercer tubo Figura 1.4) y utiliza como fuente de carbono al Citrato (primer tubo Figura 1.3), aunque resultaron negativas sus pruebas de ureasa (tercer tubo Figura 1.5) y catalasa.

Las principales características de la Morfología colonial se resumen en la Tabla 6 en donde se observa que el tamaño colonial de las cepas varía de 2 a 4 mm, el resto de las características observadas son muy similares entre las cepas M1SA_A y M4AA, mientras que la cepa MIS_p difiere en la mayoría de las características observadas

Figura 16 Pruebas Bioquímicas de Cepas degradadoras de Triclosán. Se muestran resultados de: A) Prueba de Catalasa (Citratos de Simmons), B) Ensayo TSI (Agar. Hierro Triple azúcar, C) Prueba LIA (Agar Hierro Lisina) y D) Prueba de Urea



16.3 Conclusiones

Una de las principales fuentes de contaminación por nitratos y fosfatos del cauce del río, pudiese ser la deposición fecal de los animales (vacuno, caprino y ovino) de la zona. A excepción de los nitratos, se considera que la calidad del agua del río en los puntos P1 al P5, es óptima para el uso humano.

Los resultados obtenidos permiten establecer que no se debe utilizar el agua sin un pre-tratamiento para el consumo humano y otros usos siempre que no comprometan la salud y equilibrio del sistema ecológico.

Los sitios ubicados en las cuatro estaciones de muestreo en la micro cuenca del río Xichú y su intersección con el río Laja en subcuenca hidrológica del río Santa María, a partir de los cuales se tomaron muestras de agua y sedimentos, son los ambientes con presencia de microorganismos potencialmente degradadores de TCS.

Se logró el aislamiento de tres cepas de microorganismos resistentes y con capacidad degradadora de triclosán. Las cepas corresponden a un 8% del total de cepas aisladas en las 4 estaciones de muestreo. Con las pruebas bioquímicas, se determinó que las tres cepas muestran capacidad para fermentar azúcares, mientras que las cepas M4A_A y MIS_p también tienen la capacidad de descarboxilar la lisina, los resultados de los ensayos bioquímicos son insuficientes para sugerir la identificación de las cepas aisladas. Las observaciones de las características morfológicas son diferentes para cada una de las cepas aislada, aunque M4A_A y MIS_A presentaron similitudes en la mayoría de las características.

Los ensayos bioquímicos y morfológicos contribuyeron a caracterizar la fisiología de las cepas aisladas y a determinar las condiciones bajo las cuales se pueden utilizar estas cepas para la degradación de triclosán, se recomienda realizar análisis bioquímico y molecular para la identificación de las cepas así como su análisis filogenético.

16.4 Agradecimientos

Al Programa de Mejoramiento al profesorado (PROMEP) por el apoyo a través del proyecto IDCA 11112

16.5 Referencias

Aquihuatl Ramos, M. d., & Pérez Chabela, M. d. (2004). *Manual de prácticas del laboratorio de Microbiología General*. Iztapalapa, D.F., México: Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa.

Cottell, A., et al., (2009) "Triclosan-tolerant bacteria: changes in susceptibility to antibiotics". *Journal of Hospital Infection*, **72**(1): p. 71-76.

Cuellar. 2003. Xichú. Extraído el 19 de agosto de 2013 desde: Enciclopedia de Los Municipios y Delegaciones de México Estado de Guanajuato

Fuentes. 2007. Calidad Microbiológica del Agua de Consumo Humano de tres comunidades rurales del sur de Sonora, Mexico. *Respyn, salus cum propositum vitae* , 1-2.

Gennady Cherednichenko, Rui Zhanga,, Roger A. Bannisterb, Valeriy Timofeyevc, Ning Lic, Erika B. Fritscha, Wei Fenga, Genaro C. Barrientosa, Nils H. Schebbd, Bruce D. Hammockd, Kurt G. Beame, Nipavan Chiamvimonvatc,f, and Isaac N. Pessaha. (2012). "Triclosan impairs excitation–contraction coupling and Ca²⁺ dynamics in striated muscle en *PANAS (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America)*, Num. 40, Vol 109, Consultada en <http://www.pnas.org/lookup/suppl/doi:10.1073/pnas.1211314109/-/DCSupplemental>. Fecha de consulta (21-08-2013).

Honkisz, E., Zieba, P. D. y Wojtowicz, A. K. (2012), " The effect of triclosan on hormone secretion and viability of human choriocarcinoma JEG-3 cells", *Journal Elsevier*, 385 pp.

Lee, D. G., Zhao, F, Rezenom, Y. H., Rusell, D. H. y Chu, K. (2012), "Biodegradation of triclosan by a wastewater microorganism", *Journal of the International Water Association*, 4226 pp.

Lee, D. G., Zhao, F, Rezenom, Y. H., Rusell, D. H. y Chu, K. (2013), "Identification of triclosan-degrading bacteria in a triclosan enrichment culture using stable isotope probing", *Journal Springer Science*, 2 pp.

Ley General de Aguas. 2012. Tomado el 19 de agosto de 2013 desde: Diario Oficial de la Federación.

Lombardo. 2008. Evaluacion de la calidad fisicoquimica y microbiologica de la Cuenca del Rio La Villa, Peninsula de Azuero, Panama. Facultad de Ciencias Naturales, Exactas y Tecnologia. Universidad de Panama.

Luege Tamargo, José Luis. 2005. Estudio Previo Justificativo para el Establecimiento de Área Natural Protegida: “Reserva de la Biosfera Sierra Gorda de Guanajuato”. Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas. Guanajuato, México.

Norma Mexicana para Análisis de Agua - Determinación de Oxígeno Disuelto en Aguas Naturales, Residuales Y Residuales Tratadas. (2009). PROY-NMX-AA-012-SCFI-2009. Diario Oficial de la Federación.

Norma Mexicana para el análisis de agua - determinación de huevos de helminto - método de prueba. (1999). NMX-AA-113-SCFI-1999. Diario Oficial de la Federación.

Norma Mexicana para el análisis del agua- determinación de sólidos y sales disueltas en aguas naturales, residuales y residuales tratadas - método de prueba. (2001). NMX-AA-034-SCFI-2001. Diario Oficial de la Federación.

Norma Mexicana para el muestreo de cuerpos receptores. (1980). NMX-AA-014-1980. Diario Oficial de la federación.

Norma Mexicana para la determinación de calidad del Agua determinación del número más probable (NMP) de coliformes totales, coliformes fecales (termotolerantes) Y *Escherichia coli* Presuntiva.(1987). NMX-AA-42-1987. Diario Oficial de la federación.

Norma Oficial Mexicana para los Límites Máximos Permisibles de Contaminantes en las Descargas de Aguas Residuales en Aguas y Bienes Nacionales. (1996). NOM-001-ECOL-1996. Diario Oficial de la Federación.

Norma Oficial Mexicana para los Límites máximos permisibles de contaminantes en las aguas naturales de origen urbano o municipal para su disposición mediante riego agrícola. NOM-CCA/032-ECOL/1993. Diario Oficial de la Federación.

Norma Oficial Mexicana para los Límites Permisibles Para Microorganismos Coliformes y E. Coli. (1994). NOM 127-SSA1-1994. Diario Oficial de la Federación.

Siamak P. Yazdankhah, Anne A. Scheie, E. Arne Høiby, Bjørn-Tore Lunestad, Even Heir, Tor Øystein Fotland, Kristine Naterstad, and Hilde Kruse. (2006). “Triclosan and Antimicrobial Resistance in Bacteria: An Overview”. *Microbial Drug Resistance*. 12(2): 83-90.