

# Carbofuran hidrolasa como indicador del uso de carbofuran en agroecosistemas

Jessica Pérez-Nava<sup>1</sup>, José Antonio Rivera-Tapia<sup>1\*</sup>, Fernando Hernández-Aldana<sup>2</sup>,  
Omar Romero-Arenas<sup>3</sup> y Lilia Cedillo-Ramírez<sup>1</sup>,  
Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas<sup>1</sup>,  
Centro de Química<sup>2</sup>, Centro de Agroecología<sup>3</sup>  
Instituto de Ciencias de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla  
Puebla, Pue.; México  
jart70@yahoo.com

**Abstract**— Identifying the presence of the enzyme carbofuran hydrolase in agro-ecosystems is important since it indicates the activity of the microorganisms and their relationship in the hydrolysis of carbofuran, a pesticide that has a negative influence on the environment and public health. The objective of this work is to determine the presence of the enzyme carbofuran hydrolase from bacterial isolates of agro-ecosystems. From the soil samples, microbial isolation, determination and sequencing of the protein *profile* were performed. The results obtained showed *Pseudomonas* sp., as the most frequent isolation. In the determination of the protein profile, seven of the eight samples showed a band in the molecular weight range 70-85 kDa; the positive samples to this band are isolates of conventional and agroecological agro-ecosystems. For amino acid sequencing the positive samples showed identical linkage with *Acromobacter* sp. and *Klebsiella pneumoniae*.

**Keywords**- Agro-ecosystem, carbofuran, hydrolase carbofuran, Mexico, soil.

**Resumen**— Identificar la presencia de la enzima carbofuran hidrolasa en agroecosistemas es importante ya que indica la actividad de los microorganismos y su relación en la hidrolisis del carbofuran, plaguicida que influye negativamente en el ambiente y la salud pública. El objetivo de este trabajo fue determinar la presencia de la enzima carbofuran hidrolasa a partir de aislamientos bacterianos de agroecosistemas. A partir de las muestras de suelo se realizó el aislamiento microbiano, determinación y secuenciación del perfil proteico. Los resultados obtenidos mostraron a *Pseudomonas* sp., como el aislamiento más frecuente. En la determinación del perfil proteico, siete de las ocho muestras mostraron una banda en el rango de peso molecular 70-85 kDa; las muestras positivas a esta banda son aislamientos de agroecosistemas convencionales y agroecológicos. Para la secuenciación aminoacídica las muestras positivas presentaron emparentamiento idéntico con *Acromobacter* sp. y *Klebsiella pneumoniae*.

**Palabras clave**- Agroecosistema, carbofuran, carbofuran hidrolasa, México, suelo.

## I. INTRODUCCIÓN

En agroecosistemas tradicionales y agroecológicos el uso de plaguicidas no representa ningún inconveniente por su escasa aplicación, esto se debe a que dichos ecosistemas se desarrollaron dentro del concepto útil en una disciplina de productividad sin tener impactos negativos, gracias a que este tipo de agricultura existía desde antes del desarrollo de paquetes tecnológicos, considerándose como una agricultura biológica, pero a medida que progresa el conocimiento y se modernizan los sistemas de producción agrícola, los principios ecológicos son fácilmente ignorados, lo que provoca que los agroecosistemas principalmente tradicionales se vean vulnerables, aumentando la expansión de los agroecosistemas convencionales, generando inestabilidad que se ve reflejada en el surgimiento de plagas agrícolas y enfermedades en los cultivos, incentivando al productor al aumento en el uso de plaguicidas, ocasionando importantes reducciones en el rendimiento y mermas económicas a nivel mundial [1-4]. Un agroecosistema tradicional es aquel que utiliza los recursos disponibles locales y renovables de modo que acentúa el reciclaje de nutrientes, adaptándose a las condiciones locales tomando las ventajas totales de los microambientes, este maximiza la producción a la vez que sostiene la capacidad productiva por la

diversidad espacial y temporal para resolver primero las necesidades locales, conservando la diversidad genética local y el conocimiento de las culturas indígenas a diferencia de un agroecosistema convencional el cual intensifica la agricultura con el fin de incrementar el rendimiento de los cultivos, de modo que el agroecosistema agroecológico se sitúa en una producción intermedia logrando abastecer las necesidades alimentarias sin dejar de lado la importancia del ecosistema de forma que no se realiza el aumento de producción con la simplificación de los sistemas agrícolas [5,6].

Desde los años setenta, numerosos productores de maíz de diversas partes del mundo han reportado el riesgo que implica el uso de carbofuran para el control de plagas en los cultivos, debido a la resistencia que generan diversas plagas a este compuesto aun cuando la cantidad que se aplica es mínima, sin embargo la constante utilización de carbofuran ha causado con el paso del tiempo la contaminación de suelos y aguas subterráneas y problemas de salud pública [7,8]. Estudios de monitoreo muestran que aun cuando este plaguicida llega a las aguas subterráneas por filtración, los problemas de contaminación también surgen debido al vertido accidental, almacenamiento y control inadecuado del plaguicida; sin embargo los plaguicidas desarrollados durante el siglo XX y hasta la fecha desafían la capacidad de degradación de los microorganismos; debido al aumento de la estimulación de las actividades microbianas nativas que incluyen la supervivencia y su movilidad en el ambiente, así como las fuentes alternativas de carbono y la competencia entre los microorganismos [9-11], careciendo de un conocimiento acerca de los factores moleculares que intervienen en la formación de suelos problemáticos, resaltando la probabilidad de que los plásmidos bacterianos desempeñen un papel importante en la evolución y la difusión de ciertos genes de biodegradación dentro de la micro flora del suelo; por lo tanto la continua aplicación de plaguicidas puede causar el aumento de microorganismos que lleven un plásmido de biodegradación, provocando la reducción de eficacia de los plaguicidas [12], es por esto que el uso de enzimas para desintoxicar los desechos y ambientes contaminados ha mostrado más potencial [13], en comparación con los microorganismos, debido a que las enzimas no pueden ser afectados por los inhibidores del metabolismo microbiano y pueden ser utilizadas en condiciones que serían perjudiciales para la actividad microbiana. Las enzimas hidrolasas poseen una amplia gama de sustrato siendo potencialmente más útiles para la descontaminación de desechos que contienen mezclas de compuestos peligrosos que aquellas enzimas con un rango menor de sustrato [14]. El objetivo del trabajo fue determinar la presencia de la enzima carbofuran hidrolasa a partir de aislamientos bacterianos de agroecosistemas.

## II. MATERIAL Y METODOS

### A. Áreas y muestreo de suelos

Las muestras de suelo fueron colectadas de campos agrícolas localizados en Vicente Guerrero, Españita, Tlaxcala, México (longitud: -98.489722, latitud: 19.422500 y altitud: 2520 msnm), Xochitlán Todos Santos, Puebla, México (longitud: -97.775833, latitud: 18.705278 y altitud: 1860 msnm), San Pedro Cholula, Puebla, México (longitud: -98.31655, latitud: 19.0983 y altitud: 2250 msnm) y Tezonapa, Veracruz, México (longitud: -96.45436, latitud: 18.31027 y altitud: 180 msnm; de acuerdo a la NOM-021-RECNAT-2000 [15], donde se indica que la muestra colectada de suelos agrícolas debe ser 0-15 cm de profundidad. Las muestras de suelo fueron procesadas dentro de los 30 días posteriores al muestreo [16].

### B. Aislamiento e identificación bacteriana

A partir de las muestras de suelo se realizó el aislamiento bacteriano bajo el siguiente esquema: 5 g de cada una de las muestras de suelo se resuspendieron en 50 mL del medio de sales minerales (MM) [17], adicionado con carbofuran [100 ppm] pH 7, dejando en agitación a 180 rpm/48 h. Posteriormente de los cultivos resultantes se sembraron 10  $\mu$ L por estría en agar MM [12], adicionado con carbofuran [100 ppm] pH 7, incubándose a 35 °C/48 h. Este mismo esquema de trabajo se realizó utilizando el medio Luria-Bertani (LB) suplementado. Las colonias aisladas, tanto del medio MM y LB, se identificaron con el medio cromogénico Compact Dry “Nissui” EC.

### C. Determinación del perfil proteico

La determinación del perfil proteico se realizó corriendo las muestras en geles desnaturalizados de poliacrilamida con duodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) [19] a una concentración del 10% y utilizando un marcador de peso molecular All Blue (BioRad). Se obtuvo un concentrado de cada uno de los extractos hidratados con 1 mL de agua especializada agregándoles el colorante azul de bromofenol, enseguida se introdujeron en un baño a 100°C/3 min. La muestra se cargó en un gel de SDS-PAGE al 10% (34,5:1 acrilamida-bisacrilamida) y se corrió a 40 mV durante 30 min para permitir el alineamiento de la muestra y posteriormente 150 min a 80 mV [12]. El gel se tiñó en una solución 50% (v/v) de metanol, 10% (v/v) de ácido acético glacial y 0.25% de azul de Comassie durante 120 min. El colorante no fijado fue desteñido con una solución al 7% (v/v) de ácido acético glacial y 5% (v/v) de metanol en agua destilada (Chaudhry et al. 2002). Los geles obtenidos se visualizaron en un analizador de imágenes BioImaging Systems MiniBisPro secándose y almacenándose.

### D. Secuenciación de los perfiles proteicos

Las bandas que presentaron un peso molecular 70-85 kDa se enviaron al Instituto Nacional de Medicina Genómica (México) para su secuenciación bajo el siguiente esquema: Las bandas fueron cortadas manualmente y reducidas con DTT 10 mM, alquiladas con Iodoacetamida 100 mM y desteñidas con ACN:NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 50 mM (50:50 v/v). La digestión proteica se llevó a cabo durante 18 horas a 37°C con tripsina grado masas (Promega V528A). Se extrajeron los péptidos obtenidos de la digestión con ACN:H<sub>2</sub>O:ácido fórmico (50:45:5 v/v). El volumen de la muestra se disminuyó en un concentrador (Eppendorf 5301) y se desaló la muestra utilizando una columna C18 (ZipTipC18).

Las muestras se colocaron por sextuplicado en placa utilizando como matriz  $\alpha$ -ciano, y se analizaron en un MALDI TOF/TOF 4800. Con los espectros MS/MS obtenidos se realizó una búsqueda utilizando el algoritmo de búsqueda Paragón del software ProteinPilot, con un porcentaje de confianza del 66%.

## III. RESULTADOS

Las áreas de los muestreos de suelos representan a los estados de Tlaxcala, Puebla y Veracruz, zona centro de México, donde prevalece el clima subhúmedo templado, sin embargo cada área de muestreo presenta diferentes características (Tabla I). A partir de cada parcela se obtuvieron 1.2 Kg de suelo, a las cuales se les realizaron diferentes técnicas de laboratorio.

El análisis microbiológico de las muestras de suelo permitió el aislamiento e identificación de los géneros *Pseudomonas* sp., *Coliformes* y *E. coli* (Figura 1).

Para la determinación de la presencia de la enzima carbofuran hidrolasa, se detectó una banda (70-85 kDa) en siete de las ocho muestras (Figura 2), se incluyó la cepa control de *Pseudomonas putida* K2440

con la finalidad de localizar la enzima carbofuran hidrolasa, acertando en la presencia de la banda correspondiente a la enzima.

Tabla I. Características de los campos de cultivo estudiados.

Parcela	Cultivo	Agroecosistema	Ubicación	Coordenadas
1 (M1)	Monocultivo de maíz, en rotación con haba	Convencional	Vicente Guerrero, Españaíta, Tlaxcala	19°24'55.88" LN 98°29'41.31" LO 2,454 msnm
2 (M2)	Policultivo de maíz, calabaza, haba y frijol	Agroecológico	Vicente Guerrero, Españaíta, Tlaxcala	19°25'24.69" LN 98°28'56.75" LO 2,550 msnm
3 (M3)	Policultivo de maíz, frijol, calabaza, haba, tomate y chícharo	Agroecológico	Vicente Guerrero, Españaíta, Tlaxcala	19°25'38.59" LN 98°29'14.10" LO 2,546 msnm
4 (M4)	Monocultivo de tomate	Convencional	Vicente Guerrero, Españaíta, Tlaxcala	19°25'37.15" LN 98°29'46.22" LO 2,514 msnm
5 (M5)	Policultivo de maíz, frijol, avena y calabaza	Agroecológico	Vicente Guerrero, Españaíta, Tlaxcala	19°25'34.92" LN 98°29'40.26" LO 2,519 msnm
6 (M6)	Policultivo de maíz, calabaza y frijol	Tradicional	Xochitlán Todos Santos, Puebla	18°67'96.19" LN 97°78'33.18" LO 1,876 msnm
7 (M7)	Monocultivo de frijol	Convencional	Cholula, Puebla	19° 3' 27.34" LN 98°18'48.48" LO 2,190 msnm
8 (M8)	Monocultivo en invernadero de plántulas de café	Convencional	Tezonapa, Veracruz	18°31' 02.7" LN 96°45'43.6" LO 180 msnm

LN= latitud norte, LO= longitud oeste, msnm= metros sobre el nivel del mar

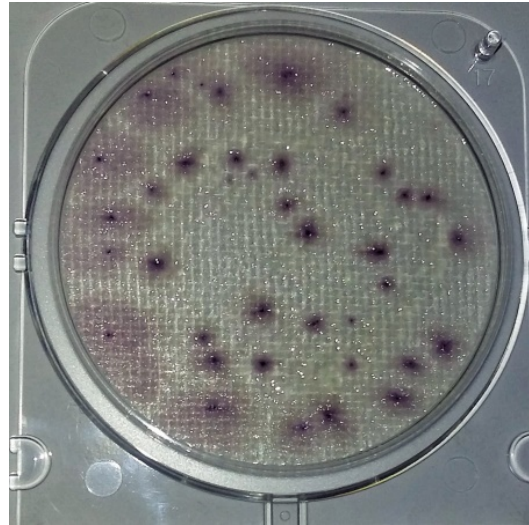


Figura 1. Medio cromogénico que identifica a *Pseudomonas* spp. (Beige), Coliformes (rojo) y *E. coli* (azul).

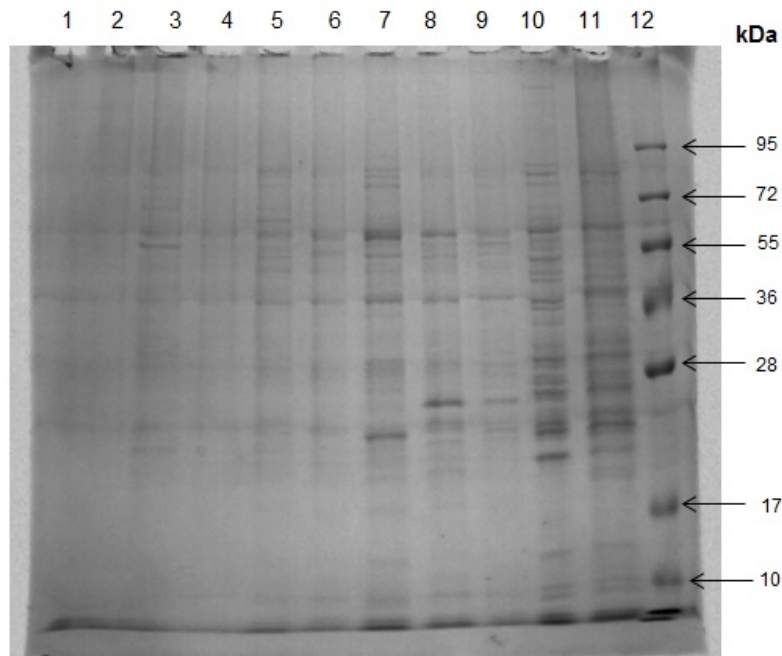


Figura 2. Electroforesis de poliacrilamida. Carril 12 marcador de peso molecular, carril 10 y 11 (cepa control concentrada), carril 9 (cepa control sin concentrar) carriles 1, 2, 4, 5, 6, 7 y 8 (M8, M7, M5, M4, M3, M2 y M1 respectivamente) muestran la banda de un rango 70-85 kDa. Carril 3 (M6), negativa a la banda.

A las bandas de las muestras que coincidieron con el peso molecular (77 kDa), reportado para *Pseudomonas putida* y la proteína purificada carbofuran hidrolasa de *Achromobacter* cepa WM111 (85 kDa), se les realizó la secuenciación aminoacídica en el Instituto Mexicano de Medicina Genómica-unidad de Proteómica, en la Ciudad de México. De color verde se muestra el péptido encontrado en la muestra digerida, que tiene una coincidencia exacta con la secuencia de la base de datos utilizada, la parte de la secuencia que se encuentra de color amarillo indica que para que la secuencia del péptido

determinado en la muestra analizada por masas coincida con la secuencia de la base de datos, es necesario considerar un cambio en la secuencia, tal como: sustitución de un aminoácido (Tabla II).

Tabla II. Secuenciación aminoacídica de las muestras positivas a la banda proteica (70-85 kDa).

Muestra	Nombre	No. de acceso	Secuencia proteica
M5	Phosphatase yihX OS= <i>Achromobacter</i> sp.	tr A0A0M7N...	LYIFDLVNVIVDIDFNR
M5	Glutathione S-transferasa OS= <i>Klebsiella pneumoniae</i>	tr A0A0J3VI...	INRSLDVLEGYLVDGTLK
M5	Rrna methyltransferasa OS= <i>Pseudomonas</i> sp. BAY1663	tr W9T1V2 ...	DNGVACPANHRFDRAR
M5	Glutathione S-transferasa OS= <i>Escherichia coli</i> BWH 40	tr X7P0D3 ...	INRSLDVLEGYLVDGTLK
M7	UvrABC system protein B OS= <i>Achromobacter</i> sp.	tr A0A0M7K...	KADGYIDLLAEISKCVKR
M7	UvrABC system protein B OS= <i>Klebsiella michiganensis</i>	tr A0A0D5...	KADGYIDLLAEISKCVKR
M7	Pertactin OS= <i>Escherichia coli</i> 1.2741	tr I2RHP5 I...	AAVRQEYADSNQVNVNDDGK

#### IV. DISCUSION

La determinación de enzimas para identificar el uso de plaguicidas es importante debido a que de esta forma se pueden caracterizar las enzimas útiles para la destoxicación y eliminación de residuos de una forma fácil y económicamente viable; por otro lado a la utilización de estas enzimas como marcadores puede conducir al desarrollo de métodos para inhibir su acción durante diversos periodos de tiempo, ayudando a prevenir dificultades económicas causadas por la pérdida de cultivos debido a la inadecuada acción de los plaguicidas en los sitios de interés, además de reducir las cantidades adicionadas al suelo y de este modo contribuir en la regeneración del suelo conservando la diversidad de los agroecosistemas y su equilibrio ecológico [18-20]. Los carbofuranos y otros insecticidas de N-metilcarbamato son inhibidores de la acetilcolinesterasa, por lo tanto su toxicidad representa un peligro inminente en bajas dosis [21], determinar la presencia de la enzima carbofuran hidrolasa tiene como objetivo su utilización para tratar los residuos del plaguicida que no se integraron de manera correcta en el suelo de los agroecosistemas reduciendo en gran medida la toxicidad aguda del compuesto produciendo la división del enlace carbamato y generando la disminución de la actividad del plaguicida original. Esta inactivación del carbofuran juega un papel importante en los suelos problemáticos, debido a que por estas razones la actividad del plaguicida no persiste de modo que las cantidades de carbofuran añadidas no son tan elevadas para poder controlar los gusanos de la raíz del maíz provocando la



resistencia al plaguicida [7]. La comprensión de los mecanismos por los cuales la carbofuran hidrolasa hidroliza el enlace carbofuran puede proponer el diseño de inhibidores específicos que eviten la degradación del plaguicida durante el tiempo necesario para el control de las plagas [19]. Aun cuando se ha reportado que la enzima carbofuran hidrolasa es codificada por el gen *mcd* localizado en *Acromobacter* sp. WMIII, la cantidad del gen obtenida en otras bacterias asciende a cantidades mayores a las reportadas en *Acromobacter* sp., esto por las condiciones de adaptabilidad de las bacterias en los suelos tratados con carbofuran [22]. La evidencia genética ha demostrado que la cantidad de ADN que codifica a una carbofuran hidrolasa activa es demasiado, expresando una proteína en el intervalo de 70-77 kDa, y demostrando además que estas bandas de polipéptidos están presentes en extractos de *Pseudomonas putida* que contiene este gen clonado [12]. Diferentes trabajos han reportado a *Pseudomonas putida*, observando que esta especie presenta una mayor capacidad de biodegradación de los plaguicidas permetrina y cipermetrina con eficiencia del 65% a 5 días de su aplicación en los suelos de los agroecosistemas problemáticos. La enzima carbofuran hidrolasa se ha purificado y biocaracterizado a partir de aislamientos de *Pseudomonas* con pesos moleculares entre 72-77 kDa [23,24], en el presente estudio se reporta similitud en el 87% de los aislamientos bacterianos, los cuales corresponde a *Pseudomonas* seguidos por *E. coli*, esta última presenta en la secuenciación aminoacídica un porcentaje elevado de similitud con el péptido emparentado en la base de datos, a la cual se debe realizar un cambio en la secuencia del péptido. Naqvi et al. (2009) cuantificaron mg del gen *mcd* contenido en diversos aislamientos bacterianos de agroecosistemas, encontrado cantidades mayores a las reportadas en *Acromobacter* sp. WMIII en los aislamientos identificados de *E. coli*. Por otro lado Öztürk et al. (2016), realizaron el cambio de aminoácido en la cadena peptídica de una enzima correspondiente a *E. coli* generándose con este cambio que el péptido de dicha cepa correspondiera idénticamente a la enzima carbofuran hidrolasa. En la muestra M5 (Tabla 2) una de las secuenciaciones que presentó una similitud idéntica con la enzima de la base de datos fue con *Klebsiella pneumoniae* la cual codifica una glutathion transferasa, sin embargo estudios realizados anteriormente indican que en cepas de *Klebsiella* específicamente especie *pneumoniae* como en este estudio; se determinó que el aislamiento bacteriano era eficaz en el uso como biodegradador de carbofuran en agroecosistemas [25].

Aun cuando no se tienen registros del uso de plaguicidas en agroecosistemas tradicionales o agroecológicos se puede identificar la presencia de su aplicación (carbofuran en particular) como es descrito por Derbyshire et al. (1987) donde informaron de la detección, purificación parcial y caracterización de una enzima a partir de una bacteria capaz de hidrolizar el enlace N-metilcarbamato de carbofuran para producir productos que ya no tienen actividad insecticida, lo cual demostraba que cierta enzima indicaba el uso del plaguicida en el suelo donde se obtuvo la bacteria [26].

En conclusión, las ocho muestras analizadas fueron tomadas de áreas que reúnen las características de un agroecosistema. En el total de las muestras *Pseudomonas* sp., mostró ser el género predominante en los aislamientos bacterianos. Y en relación a la determinación del perfil proteico, siete de las ocho muestras mostraron una banda en el rango de peso molecular 70-85 kDa, destacando que las muestras positivas a esta banda son aislamientos tomados de agroecosistemas convencionales y agroecológicos, sin embargo el aislamiento del agroecosistema tradicional no mostro esta banda. En la secuenciación aminoacídica de las muestras positivas se presenta el emparentamiento idéntico de la muestra M5 con *Acromobacter* sp. y *Klebsiella pneumoniae*.

### Agradecimientos

A la Vicerrectoría de Investigación y Estudios de Posgrado de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla por el apoyo otorgado al presente proyecto VIEP 2017 (ID Proyecto: 00055).

## Referencias

- [1] Turrent, F.A. (1980) El agrosistema, un concepto útil dentro de la disciplina de productividad. Colegio de Posgraduados, Chapingo. Pp. 86-92.
- [2] Sans, F.X. (2007) La diversidad de los Agroecosistemas. *Ecosistemas* 16: 44-49.
- [3] Altieri, M.A. (1994) Bases agroecológicas para una producción agrícola sustentable. *Agricultura Técnica (Chile)* 54: 371-386.
- [4] Sarmiento, M.J. (1974) Pérdidas directas ocasionadas por los insectos a la agricultura nacional. *Anales. Segundo Congreso Nacional de Investigadores Agrarios* 1: 143-152.
- [5] Gliessman, S.R. (2002) *Agroecología: procesos ecológicos en la agricultura sostenible*. CATIE: Turrialba, Costa Rica. Pp. 33: 359.
- [6] Altieri, M.A., Toledo, V.M. (2011) The agroecological revolution of latin America: rescuing nature, securing food sovereignty and empowering peasants. *The Journal of Peasant Studies* 38: 587-612.
- [7] Felsot, A., Maddox, J.V., Bruce, W. (1981) Enhanced microbial degradation of carbofuran in soils with histories of Furadan use. *Bulletine Environmental Contamination Toxicology* 26: 781-788.
- [8] Tsuda, T., Kojima, M., Harada, H., Nakajima, A., Aokis, S. (1997) Acute toxicity, accumulation, and excretion of benthocarb and its degradation products in killifish. *Bulletine Environmental Contamination Toxicology* 58: 603-610.
- [9] Cohen, S.Z., Creeper, S.M., Carpel, R.F., Enfilade, C.G. (1984) Treatment and Disposal of Pesticide Waste. En: Craggier, R.F., Seiner, J.N. (eds), American Chemical Society, Washington, DC. Pp. 297-325.
- [10] Schooner, J.L., Mossman, E.J., Borzilov, M.A, Novitsky, O.I., Gerasimenko, A.A.K. (1992) Fate of Pesticides and Chemical sin the Environment. En: Schooner, J.L. (ed.), Wiley, New York. Pp. 29-31.
- [11] Goldstein, R.M., Mallory, L.M., Alexander, M. (1985) Reasons for possible failure of inoculation to enhance biodegradation. *Applied and Environmental Microbiology* 50: 977-983.
- [12] Tomasek, P.H., Karns, J.S. (1989) Cloning of a carbofuran hidrolase gene from *Achromobacter* sp. strain WM111 and its expression in gram-negative bacteria. *Journal of Bacteriology* 171: 4038-4044.
- [13] Johnson, L.M., Talbot, Jr.H.W. (1983) Detoxification of pesticides by microbial enzymes. *Experientia* 39: 1236-1246.
- [14] Chaudhry, G.R., Mateen, A., Kaskar, B., Bloda, M., Riazuddin, S. (2002) Purification and biochemical characterization of the carbamate hydrolase from *Pseudomonas* sp. 50432. *Biotechnology Applied Biochemistry* 36: 63-70.
- [15] Diario Oficial de la Federación (DOF). NOM-021-RECNAT-2000. Que establece las especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos, estudios, muestreo y análisis.
- [16] Ogram, A.V., Duan, Y-P., Trabue, S.L., Feng, X., Castro, H., Ou, L-T. (2000) Carbofuran degradation mediated by three related plasmid systems. *FEMS Microbiology Ecology* 32: 197-203.
- [17] Yan, Q.X., Hong, Q., Han, P., Dong, X.J., Shen, Y.J., Li, S.P. (2007) Isolation and characterization of a carbofuran-degrading strain *Novosphingobium* sp. FND-3. *FEMS Microbiology Letters* 271: 207-213.
- [18] Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- [19] Karns, J.S., Tomasek, P.H. (1991) Carbofuran Hydrolase-Purification and Properties. *Journal Agriculture Food Chemistry* 39: 1004-1008.
- [20] Ramón, V.A., Rodas, F. (2007) El control orgánico de plagas y enfermedades de los cultivos y la fertilización natural del suelo. *Naturaleza y Cultura Internacional*. Perú y Ecuador. Pp. 35.
- [21] Ortiz, I., Avila-Chavez, M.A., Torres, L.G. (2013) Plaguicidas en México: usos, riesgos y marco regulatorio. *Revista Latinoamericana de Biotecnología Ambiental y Algal* 4: 26-46.



- [22] Naqvi, T., Cheesman, M.J., Williams, M.R., Campbell, P.M., Ahmed, S., Russell, R.J., Scott, C., Oakeshott, J.G. (2009) Heterologous expression of the methyl carbamate-degrading hydrolase MCD. *Journal of Biotechnology* 144: 89-95.
- [23] Öztürk, B., Ghequire, M., Nguyen, T.P.O., Mont, De R., Wattiez, R., Springael, D. (2016) Expanding insecticide catabolic activity gained by a single nucleotide substitution in a bacterial carbamate hydrolase gene. *Environmental Microbiology* 18: 4878-4887.
- [24] Mulbry, W.W., Eaton, R.W. (1991) Purification and characterization of the N-methylcarbamate hydrolase from *Pseudomonas* strain CRL-OK. *Applied and Environmental Microbiology* 57: 3679-3682.
- [25] Kadakol, J.C., Kamanavalli, C.M., Shouche, Y. (2011) Biodegradation of Carbofuran phenol by free and immobilized cells of *Klebsiella pneumoniae* ATCC13883T. *World Journal Microbiology Biotechnology* 27: 25-29.
- [26] Derbyshire, M.K., Karns, J.S., Kearney, P.C., Nelson, J.O. (1987) Purification and characterization of an N-Methylcarbamate pesticide hydrolyzing enzyme. *Journal Agriculture Food Chemical* 35: 871-877.