



## BIODEGRADACIÓN DE CARBOFURAN Y CARBARIL POR *Sphingomonas sp.*, S8-M3-13

José CASTELLANOS-ROZO<sup>(1)\*</sup>, Jaqueline GALVIS LOPEZ<sup>(2)</sup> y Alejandra CARREÑO MENDIVELSO<sup>(3)</sup>

<sup>1</sup> Microbiólogo, MSc. Ciencias Microbiología, Jefe de Laboratorio de Microbiología, Departamento de Biología y Microbiología, Universidad de Boyacá, Campus Universitario Tunja-Colombia: Carrera 2ª Este No. 64-169.

<sup>2</sup> Químico, MSc. Ciencias Biológicas, Jefe del Laboratorio de Análisis ambiental, Departamento de Química y Bioquímica, Universidad de Boyacá, Campus Universitario Tunja-Colombia: Carrera 2ª Este No. 64-169.

<sup>3</sup> Licenciada en Química, MSc. Ciencias Biológicas, Laboratorio de Química, Departamento de Química y Bioquímica, Universidad de Boyacá, Campus Universitario Tunja-Colombia: Carrera 2ª Este No. 64-169.

\*Autor responsable: joscastellanos@uniboyaca.edu.com

Recibido: 16-02-2016

Aceptado: 02-06-2016

### RESUMEN

El objetivo de este estudio fue determinar la biodegradación de los plaguicidas N-metilcarbamatos carbofuran y carbaril por *Sphingomonas sp.*, cepa S8-M3-13. La biodegradación de carbofuran y de carbaril, fue evaluada mediante la medición del crecimiento bacteriano por recuento en placa de células viables y la concentración de los plaguicidas mediante cromatografía líquida de alta resolución con detección UV (HPLC-UV). Los resultados demostraron biodegradación de carbofuran y carbaril como única fuente de carbono y nitrógeno a una tasa de 4,5 mg L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> y 1,1 mg L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>, respectivamente. El principal metabolito de la degradación de carbaril fue el 1-naftol, el cual no fue degradado.

**Palabras clave:** plaguicidas, aislamiento, crecimiento, fuente de carbono y nitrógeno.

### SUMMARY

The objective of this study was to determine the biodegradation of N-methylcarbamate pesticides carbofuran and carbaryl, by *Sphingomonas sp.*, strain S8-M3-13. The biodegradation of carbofuran and carbaryl, was evaluated measuring the bacterial growth by plate count of viable cells and the pesticides concentration with high resolution liquid chromatography and UV detection (HPLC-UV). The results showed that biodegradation of carbofuran and carbaryl, was made using the pesticides as carbon and nitrogen source at a rate of 4.5 mg L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> and 1.1 mg L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> respectively. The major metabolite of degradation of carbaryl was 1-naphthol which was not degraded

**Key words:** pesticides, isolate, growth, carbon and nitrogen source.

## INTRODUCCIÓN

El carbofuran y el carbaril son plaguicidas N-metilcarbamatos comúnmente utilizados en la agricultura para controlar plagas como *Premnotrypes vorax*, *Epitrix sp.*, *Elasmopalpus lignosellus*, *Phyllophaga sp.*, *Pratylenchus sp.*, *Meloidogyne sp.*, en cultivos como la papa, arroz, maíz, fresa, tabaco, entre otros (Proagro, 2015). La alta toxicidad de carbofuran y carbaril y de sus metabolitos en animales y seres humanos, sumada a las malas prácticas de manejo asociadas entre otras a la sobredosificación, lo han convertido en un riesgo para la salud pública (Hmimou *et al.*, 2014; Bonner *et al.*, 2005; Goad *et al.*, 2004).

Las bacterias juegan un papel importante en la biodegradación de plaguicidas tóxicos en el ambiente. Se han reportado bacterias que presentan degradación de carbofuran y de carbaril como *Bacillus sp.* (Hamada *et al.*, 2015), *Acinetobacter baumannii* (Abou-Shanab *et al.*, 2012), *Burkholderia sp.* PCL3 (Plangklang y Reungsang, 2012), *Aminobacter ciceronei* (McDonald *et al.*, 2005), *Rhizobium sp.* (Hashimoto *et al.*, 2002), *Micrococcus sp.* (Doddamani y Ninnekar, 2001), *Pseudomonas sp.* (Bano y Musarrat, 2004; Mateen *et al.*, 2002; Slaoui *et al.*, 2001; Chalamadugu y Chaudhry, 1991), *Arthrobacter sp.* (Hayatsu *et al.*, 1999), *Rhodococcus sp.* (Larkin y Day, 1986).

Los plaguicidas N-metilcarbamatos son degradados por los microorganismos mediante reacciones de hidrólisis, hidroxilación y oxidación (Castellanos *et al.*, 2015 y 2013b). No obstante, la mayoría de las bacterias degradan los plaguicidas N-metilcarbamatos carbaril y carbofuran parcialmente, generando metabolitos que podrían llegar a ser más tóxicos que el compuesto parental (Desaint *et al.*, 2000; Mateen *et al.*, 2002; Chalamadugu y Chaudhry, 1991).

Las bacterias pertenecientes al grupo de las *Sphingomonas sp.*, han llamado la atención de la comunidad científica, debido a que son microorganismos ubicuos, con una ex-

traordinaria versatilidad metabólica para degradar aceleradamente compuestos xenobióticos generando metabolitos menos tóxicos, característica que las hace atractivas para ser utilizadas en biorremediación (Waigi *et al.*, 2015; Kolvenbach *et al.*, 2012; Zhao *et al.*, 2008; Fang *et al.*, 2007; Wu *et al.*, 2006; Yabuuchi *et al.*, 2000; Ogram *et al.*, 2000; Feng *et al.*, 1997).

A nivel mundial se han aislado *Sphingomonas sp.*, degradadoras de carbofuran como *Sphingobium sp.*, (Shin *et al.*, 2012), *Sphingomonas sp.*, CFDS-1 (Xu *et al.*, 2011), *Novosphingobium sp.*, cepa FND-3 (Yan *et al.*, 2007), *Sphingomonas sp.*, SB5 (Kim *et al.*, 2004), *Sphingomonas sp.*, CF06 (Feng *et al.*, 1997).

Se ha determinado que la ruta de degradación de carbofuran por las bacterias *Sphingomonas sp.*, es la hidrólisis generando carbofuran 7-fenol metabolito menos tóxico que el carbofuran (Kim *et al.*, 2004; Park *et al.*, 2006). Sin embargo, Yan *et al.* (2007), determinaron que *Novosphingobium sp.*, cepa FND-3, aislada de un sistema de aguas residuales de una empresa manufacturera de plaguicidas en China, degradó carbofuran simultáneamente mediante tres rutas metabólicas diferentes a una tasa de 28 mg L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>. La primera ruta fue la hidrólisis del enlace éster de carbofuran, la segunda ruta fue la hidroxilación del anillo bencénico del carbofuran y la tercera ruta es la hidrólisis directa del enlace éter del anillo furanil (Yan *et al.*, 2007).

Por otro lado, son pocas las *Sphingomonas sp.*, que degradan carbaril, según lo reportado en la literatura. Investigaciones realizadas Yan *et al.* (2007), comprobaron que la bacteria *Novosphingobium sp.*, cepa FND-3 además de degradar carbofuran degradó 50 mg L<sup>-1</sup> de carbaril en 12 h, pero no determinaron la ruta de degradación del compuesto. Yan *et al.*, (2010), aislaron una bacteria caracterizada como *Sphingobium qiguonii sp. nov.*, de una planta de tratamiento de aguas residuales, que degrada carbaril, y aunque no se determi-

nó la tasa de biodegradación, no se evidenció degradación cruzada con otros plaguicidas.

Estudios realizados por Castellanos *et al.* (2013a), aislaron diez bacterias degradadoras de carbofuran, de suelos cultivados con papa (*Solanum tuberosum*), con historia de aplicación de plaguicidas de ocho años, ubicados en el municipio de Silos, Departamento Norte de Santander, Colombia. Una de las bacterias caracterizada como *Sphingomonas paucimobilis* cepa S8-M3-13 degradó carbofuran como única fuente de carbono y nitrógeno. Sin embargo, no se determinó que la bacteria degrade plaguicidas químicamente relacionados como carbaril. El objetivo de este trabajo fue determinar las tasas de biodegradación de carbofuran y carbaril por *Sphingomonas paucimobilis* cepa S8-M3-13 y su capacidad para degradar los metabolitos intermediarios originados en la degradación.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Los reactivos utilizados fueron tripticasa de soya (Scharlau 2-200), glucosa (Merck 1.04074), leche descremada en polvo (Proleche), glicerol (Carlo Erba 453752), dimetilsulfóxido (Sigma-Aldrich 276855), agar-agar (Scharlau 07-490),  $K_2HPO_4$  (Carlo Erba 361757),  $KH_2PO_4$  (Merck 1048731000), NaCl (Merck 1.06404.100),  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  (Merck 1.05886),  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  (Scharlau CA0194),  $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$  (Merck 1065210100),  $H_3BO_3$  (Merck 10043-35-3),  $ZnCl_2$  (Panreac 141779.1210),  $CuCl_2$  (Merck 1088160250),  $FeCl_3$  (Merck 8451240500), carbofuran (Aldrich 18396-2, 99% de pureza), carbaril (Aldrich 559814, 97% de pureza), 1-naftol (Alfa Aesar A11862, 99% de pureza), metanol (Honeywell 10071753 grado HPLC), acetonitrilo (Honeywell 10623134 grado HPLC), cloroformo (Merck 1.02445.4000). El agua HPLC fue obtenida del sistema de purificación de agua (Cascada LS-water Pall Corporation).

Los medios de cultivo que se utilizaron fueron caldo Gherna, el cual fue preparado según Gherna, (1986), agar nutritivo (Oxoid CM0003)

el cual fue preparado según las instrucciones del fabricante, medio mínimo de sales minerales con 200 mg L<sup>-1</sup> de carbofuran como única fuente de carbono y nitrógeno (MMS-carbofuran) preparado según Kim *et al.* (2004), medio mínimo de sales minerales con 200 mg L<sup>-1</sup> de carbaril como única fuente de carbono y nitrógeno (MMS-carbaril) y medio mínimo de sales minerales, sin carbofuran y sin carbaril, el cual se utilizó como control negativo.

## Biodegradación de carbofuran

*Sphingomonas sp.*, cepa S8-M3-13 fue donada por el laboratorio de Microbiología Agrícola del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia, y fue aislada de suelos cultivados con *Solanum tuberosum* del municipio de Silos Norte de Santander, Colombia, con un historial de ocho años de aplicación de plaguicidas N-metilcarbamatos (Castellanos *et al.*, 2013a). La bacteria fue cultivada en agar nutritivo a 25°C durante 24 h y criopreservada en medio Gherna a -70°C, luego fue subcultivada en los agares MMS-carbofuran, MMS-carbaril y MMS sin carbaril y sin carbofuran a 25°C durante 8 días.

Para determinar la tasa de biodegradación de carbofuran, la bacteria *Sphingomonas sp* cepa S8-M3-13., fue cultivada de forma masiva en agar nutritivo a 25°C durante 24 h. La biomasa bacteriana fue recolectada y dispersada completamente en caldo MMS-carbofuran con 200 mg L<sup>-1</sup> de carbofuran (caldo MMS-carbofuran), mediante agitación con vórtex. Posteriormente fue recuperada mediante centrifugación a 5000 r.p.m, durante 5 minutos a 25°C y ajustada a una absorbancia de 1,2 a 600 nm en espectrofotómetro. Luego 1 mL de la biomasa fue inoculado en frascos con 100 mL de caldo MMS-carbofuran. El experimento fue realizado por triplicado. El caldo MMS-carbofuran, sin bacteria fue utilizado como control. Los frascos fueron colocados en una incubadora con agitación orbital a 25°C y 150 rpm, bajo oscuridad. El crecimiento celular y la biodegradación de carbofuran fueron

evaluados simultáneamente. Para determinar el crecimiento celular, fueron tomadas muestras de 100  $\mu\text{L}$  periódicamente del medio de cultivo y diluidas de forma seriada en cloruro de sodio al 0,85% hasta  $10^{-4}$ . Las diluciones fueron sembradas por triplicado en placas de Petri con agar MMS-carbofuran, las cuales fueron incubadas a  $25^{\circ}\text{C}$  durante 8 días, posteriormente fueron realizados los recuentos de UFC/mL. Para evaluar la biodegradación de carbofuran, fueron tomadas muestras de 1 mL del medio de cultivo periódicamente, con y sin bacteria, las cuales fueron tratadas con cloroformo volumen/volumen líquido-líquido (1 mL de la muestra: 1 mL de cloroformo) 5 veces, agitando con vórtex durante 90 segundos. Los extractos orgánicos obtenidos, fueron recolectados y evaporados en un desecador a temperatura ambiente y en oscuridad. Los residuos fueron disueltos en metanol, filtrados mediante membranas de nitrocelulosa estériles de  $0,22\ \mu\text{m}$  y analizados por el método de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC-UV) descrito por Park *et al.* (2006), con algunas modificaciones. El límite de detección y de cuantificación para carbaril y carbofuran fue de  $0,01\ \text{mg L}^{-1}$  y  $1\ \text{mg L}^{-1}$  respectivamente.

### Biodegradación de carbaril

Se empleó la metodología descrita para la biodegradación de carbofuran, con las siguientes modificaciones: el caldo MMS con  $200\ \text{mg L}^{-1}$  carbofuran (MMS-carbofuran) fue reemplazado por el caldo MMS con  $200\ \text{mg L}^{-1}$  carbaril (MMS-carbofuran). El caldo MMS-carbaril sin bacteria fue utilizado como control.

### Análisis estadísticos

Los datos de crecimiento y biodegradación fueron analizados usando un análisis de varianza de medidas repetidas con un  $\alpha\ 0,05$  usando el software SPSS versión 16 para Windows IBM® 2007. Para determinar diferencias entre los tratamientos y el control se aplicó el test de Dunnett.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Biodegradación de carbofuran

Se comprobó cualitativamente la degradación de carbofuran por el crecimiento de colonias amarillas, pequeñas, convexas, definidas, las cuales aparecieron sobre agar MMS-carbofuran después de un tiempo de incubación de 72 h a  $25^{\circ}\text{C}$ . La bacteria no creció en el medio control.

Los ensayos de biodegradación determinaron diferencias significativas entre el control (sin bacteria) y los tratamientos con la bacteria ( $p < 0,05$ ). La bacteria alcanzó su máximo crecimiento a las 48 h, tiempo en el cual no se detectó carbofuran en el medio de cultivo. Los controles, no mostraron crecimiento, así como tampoco una disminución significativa de las concentraciones de carbofuran, lo cual indicó que la degradación de carbofuran se presentó únicamente por la bacteria, al utilizar el carbofuran como única fuente de carbono y nitrógeno para su crecimiento (Fig. 1).

*Sphingomonas sp.*, cepa S8-M3-13 degradó carbofuran como única fuente de carbono y nitrógeno, a una tasa de  $4,5\ \text{mg L}^{-1}\ \text{h}^{-1}$  a  $25^{\circ}\text{C}$ , 150 rpm y pH 7, la cual es inferior a la reportada por Kim *et al.* (2004), quienes determinaron una tasa de biodegradación de carbofuran de  $17\ \text{mg L}^{-1}\ \text{h}^{-1}$  como única fuente de carbono y nitrógeno, en medio mínimo de sales minerales a  $25^{\circ}\text{C}$ , 150 rpm y pH 7,2. Estudios realizados por Yan *et al.* (2007), determinaron que *Novosphingobium sp.*, cepa FND-3, degradó carbofuran a una tasa de  $28,6\ \text{mg L}^{-1}\ \text{h}^{-1}$ , como única fuente de carbono y nitrógeno, en medio mínimo de sales minerales a  $30^{\circ}\text{C}$ , 150 rpm y pH 7. La mayor tasa de degradación de *Novosphingobium sp.*, podría estar fundamentada por la capacidad de esta bacteria para degradar carbofuran mediante tres rutas metabólicas diferentes. La primera ruta fue la hidrólisis del enlace éster de carbofuran, lo cual produjo carbofuran 7-fenol con la subsecuente producción de 2-hidroxi-3-(3-metilpropan-2-ol) fenol mediante la adición de una molécula de agua que rompe el enlace éter del anillo fu-

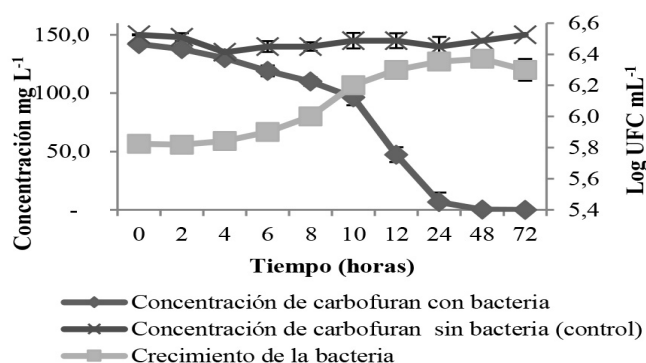


Figura 1: Cinética de biodegradación de carbofuran por *Sphingomonas sp.*, cepa S8-M3-13. Los datos son el resultado del promedio de tres réplicas. Las barras verticales indican la desviación estándar de las tres réplicas.

ranil, la segunda ruta fue la hidroxilación del anillo bencénico del carbofuran resultando 5-hidroxicarbofuran y la tercera ruta es la hidrólisis directa del enlace éter del anillo furanil produciendo el metabolito 2-hidroxi-3-(3-metil-2-ol) (Yan *et al.*, 2007).

Durante el experimento, se observó la aparición de un color rojo en los matraces inoculados con las bacterias, los cuales fueron correlacionados con la disminución de las concentraciones de carbofuran. Este experimento confirma lo descrito por varios autores, en que el pigmento rojo es un producto del metabolismo bacteriano del carbofuran 7-fenol (Castellanos *et al.*, 2013a; Shin *et al.*, 2012; Yan *et al.*, 2007; Wu *et al.*, 2006) (Fig. 2).

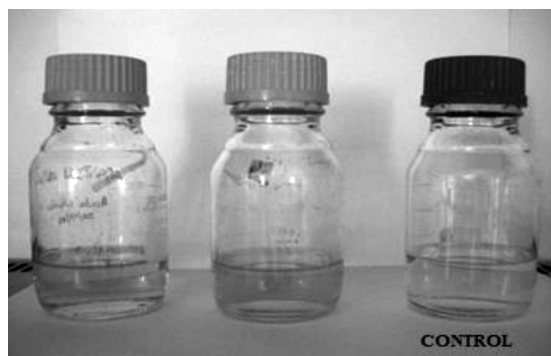


Figura 2: Pigmento producido por el crecimiento de *Sphingomonas sp.*, S8-M3-13 en medio mínimo de sales minerales con carbofuran como única fuente de carbono y nitrógeno.

Experimentos realizados por Park *et al.* (2006), determinaron que el metabolito rojo

es 5-(2-hidroxi-2-metil-propil)-2,2-dimetil-2,3-dihidrofnato [2,3-6-furan-4, 6, 7, 9-tetrona. Sin embargo aún no se ha investigado la toxicidad de este metabolito, ni tampoco sus posibles aplicaciones biotecnológicas.

### Biodegradación de carbaril

Por otra parte, la biodegradación de carbaril fue lenta. Los resultados indicaron que carbaril fue degradado a una tasa de  $1,1 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ . La bacteria alcanzó su máximo crecimiento a los 5 días de incubación, se mantuvo y disminuyó lentamente. A diferencia de la biodegradación de carbofuran, en la biodegradación de carbaril, no se observó ningún pigmento en el medio de cultivo. El carbaril fue degradado completamente después de 15 días a 1-naftol. Sin embargo, se determinó que el metabolito 1-naftol no es degradado por la bacteria (Fig. 3).

La degradación lenta de carbaril también fue descrita por Hamada *et al.* (2015) para las bacterias *Bacillus sp.*, *Morganella sp.*, y *Corynebacterium sp.*, las cuales presentaron degradación de carbaril del 94,6%, 87,3% y 48,8% respectivamente como única fuente de carbono y nitrógeno en medio mínimo de sales minerales a  $37^\circ\text{C}$  y 220 rpm a los 10 días. Sin embargo, no se conoce si estas bacterias realizaron una degradación parcial o una mineralización completa de la molécula.

Por otro lado, se ha determinado una tasa de biodegradación de carbaril de  $4,16 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  para *Novosphingobium sp.*, cepa FND-3, superior a la de *Sphingomonas sp.*, cepa S8-

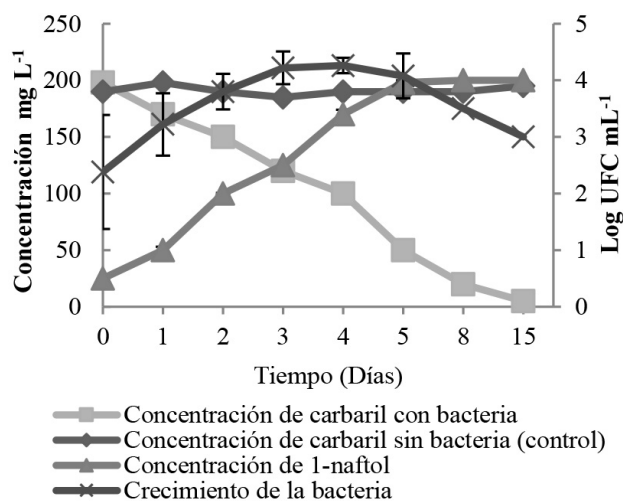


Figura 3: Cinética de biodegradación de carbaril y 1-naftol por *Sphingomonas sp.*, cepa S8-M3-13. Los datos son el resultado del promedio de tres réplicas. Las barras verticales indican la desviación estándar de tres réplicas.

M3-13, sin embargo no se conoce la posible ruta de biodegradación (Yan *et al.*, 2007).

Existen reportes en la literatura de cepas bacterianas como *Aminobacter ciceronei* cepa ER2 (Topp *et al.*, 1993) y *Pseudomonas sp.*, cepa 50581, (Chapalamadugu y Chaudhry, 1991), que degradan carbaril a 1-naftol, sin la subsecuente degradación del 1-naftol. Sin embargo, se han reportado bacterias que tienen la capacidad de degradar carbaril y 1-naftol hasta dióxido de carbono y agua. Estudios realizados por Larkin y Day (1986), demostraron que las bacterias *Pseudomonas sp.*, cepa 12043 y *Rhodococcus sp.* cepa 12038, crecieron a partir de carbaril en medio mínimo de sales minerales, a 25°C y 150 rpm, ambos aislamientos utilizaron 1-naftol como única fuente de carbono produciendo salicilaldehído, ácido salicílico y ácido gentísico, como metabolitos intermediarios de la degradación. Por otra parte, Sato *et al.* (1999), reportaron dos cepas caracterizadas como *Arthrobacter sp.*, cepa 19B, que degradaron carbaril a una tasa de 2,1 mg L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>, en medio mínimo de sales minerales a 25°C, 150 rpm y pH 5,8. Análisis de cromatografía de gases y espectrofotometría de masas (GC/MS), evidenciaron que el principal metabolito de la degradación de carbaril es el 1-naftol, el cual fue degradado posteriormente a 1,4-naftalenodiona y 1,4-naftalenodiol. Doddamani y

Ninnekar (2001), evaluaron una cepa de *Micrococcus sp.*, la cual fue capaz de biodegradar 44,44 mg L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> de carbaril como única fuente de carbono y nitrógeno en medio mínimo de sales minerales, pH 6,8 y temperatura ambiente. Se comprobó que el microorganismo hidrolizó carbaril como única fuente de carbono generando los intermediarios metabólicos 1-naftol y metilamina, con la subsecuente degradación de 1-naftol a través de la ruta del salicilato, vía gentisato. Esta ruta de degradación también fue descrita para *Pseudomonas sp.*, cepas C4, C5 Y C6 (Swetha y Phale, 2005).

Los estudios de biodegradación realizados con *Sphingomonas sp.*, demuestran que son bacterias que presentan una extraordinaria versatilidad metabólica. Además de degradar los plaguicidas N-metilcarbamatos, carbaril y carbofuran, también poseen la capacidad para degradar otros compuestos como propoxur, aldicarb, gentisato y ácido procatecoico, fenol, nitrobenzeno, anilina e hidrocarburos aromáticos policíclicos como fenantreno (Waigi *et al.*, 2015; Kolvenbach *et al.*, 2012; Zhao *et al.*, 2008; Fang *et al.*, 2007; Sakai *et al.*, 2007; Wu *et al.*, 2006; Yabuuchi *et al.*, 2000; Feng *et al.*, 1997). Sin embargo, se recomienda evaluar los metabolitos generados durante la degradación y su toxicidad para mitigar el efecto sobre la salud de las personas y el medio ambiente.

## CONCLUSIÓN

Los resultados demostraron crecimiento y biodegradación de la bacteria a partir de carbofuran y carbaril, como única fuente de carbono y nitrógeno. Carbofuran fue degradado a una tasa de 4,5 mg L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>, mientras que carbaril fue degradado a 1,1 mg L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>. Los resultados indicaron que la bacteria no degrada el 1-naftol, principal metabolito de la degradación de carbaril, el cual sigue siendo tóxico.

## AGRADECIMIENTOS

Al instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia, especialmente al Doctor Daniel Uribe Vélez y a la Doctora Jimena Sánchez por facilitar la utilización de la cepa para la continuación de este estudio. A los estudiantes Fredy Cárdenas, Jeraldine Jiménez y al profesor Wilfred Espinosa por su colaboración en los análisis cromatográficos.

## BIBLIOGRAFÍA

- Abou-Shanab, R. A. I., M. a, Khalafallah, N. F., Emam, M. a, Aly, S. a, Abou-Sdera, and I. Matter, 2012. Characterization and identification of carbofuran-utilising bacteria isolated from agricultural soil. *Chem. Ecol.* 28(2), 193-203.
- Bano, N. and J. Musarrat 2004. Characterization of a novel carbofuran degrading *Pseudomonas* sp. with collateral bio-control and plant growth promoting potential. *FEMS Microbiol. Lett.* 231, 13-17.
- Bonner, M. R.; W. J. Lee; D. P. Sandler; J. A. Hoppin; M. Dosemeci. and M. C. R. Alavanja 2005. Occupational exposure to carbofuran and the Incidence of cancer in the agricultural health study. *Environ. Health Perspect.* 113, 285-289.
- Castellanos-Rozo J., J. Sánchez, D. Uribe; L. Moreno and L. Melgarejo 2013a. Characterization of carbofuran degrading bacteria obtained from potato cultivated soils with different pesticide application records. *Revista Facultad Nacional de Agronomía. Rev. Fac. Nal. Agr. Medellín.* 66(1): 6899-6908.
- Castellanos-Rozo, J., and L. Y. Rache Cardenal 2013b. Microorganismos, enzimas, plásmidos y genes involucrados en la degradación de plaguicidas N-metilcarbamatos. *Rev. Int. Contam. Ambie.*, 29 (SPEC.ISSUE), 105-119.
- Castellanos-Rozo J., and J. Galvis, 2015. Rutas de degradación del plaguicida N-metilcarbamato carbaril. *Revista I3+*, 2(2), 134 - 147p.
- Chapalamadugu, S. and G. R. Chaudhry 1991. Hydrolysis of carbaryl by a *Pseudomonas* sp. and construction of a microbial consortium that completely metabolizes carbaryl. *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 744-750.
- Desaint, S., A., Hartmann, N. R. Parekh, and J. Fournier, C. 2000. Genetic diversity of carbofuran-degrading soil bacteria. *FEMS. Microbiol. Ecol.* 34(2), 173-180.
- Doddamani, H. P. and H. Z. Ninnekar 2001. Biodegradation of carbaryl by a *Micrococcus* species. *Curr. Microbiol.* 43, 69-73.
- Fang, H. H. P., D., Liang, and T. Zhang 2007. Aerobic degradation of diethyl phthalate by *Sphingomonas* sp. *Bioresource. Technol.* 98(3), 717-720.
- Feng, X.; L. T. Ou. and A. Ogram 1997. Plasmid-mediated mineralization of carbofuran by *Sphingomonas* sp. strain CF06. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 1332-1337.
- Gherna, J. 1986. Storage and survival of bacteria by ultra-free. *Let. Appl. Microbiol.* 3:127-129.
- Goad, R. T.; J. T. Goad; B. H. Atieh. and R. C. Gupta 2004. Carbofuran-induced endocrine disruption in adult male rats. *Toxicol. Mech. Methods.* 14, 233-239.
- Hamada, M., Matar, and A. Bashir, 2015. Carbaryl degradation by bacterial isolates from a soil ecosystem of the Gaza Strip. *Braz. J. Microbiol.* 46 (4), 1087-1091.
- Hashimoto, M.; M Fukui; K. Hayano and M. Hayatsu 2002. Nucleotide sequence and genetic structure of a novel carbaryl hydrolase gene (cehA) from *Rhizobium* sp. Strain AC100. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 1220-1227.
- Hayatsu, M.; M. Hirano and T. Nagata 1999. Involvement of two plasmids in the degradation of carbaryl by *Arthrobacter* sp. Strain RC100. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 1015-1019.

- Hmimou, A.; A. Maslouhi; K. Tamoh and L. Candela 2014. Experimental monitoring and numerical study of pesticide (Carbofuran) transfer in an agricultural soil at a field site. *Comptes Rendus Geoscience*. 346, 255–261.
- Kim, I. S.; J. Y Ryu; H. G Hur; M. B. Gu; S. D. Kim and J. H. Shim 2004. *Sphingomonas* sp. strain SB5 degrades carbofuran to a new metabolite by hydrolysis at the furanyl ring. *J. Agric. Food Chem.* 52, 2309-2314.
- Kolvenbach, B. A., P. F. and Corvini X. 2012. The degradation of alkylphenols by *Sphingomonas* sp. strain TTNP3 - a review on seven years of research. *New Biotechnology*. 30, 88-95.
- Larkin, M. J. and M. J. Day 1986. The metabolism of carbaryl by three bacterial isolates, *Pseudomonas* sp. (NCIB 12042 and 12043) and *Rhodococcus* sp. (NCIB 12038) from Garden Soil. *J. Appl. Bacteriology*. 60(1): 233-242.
- Mateen, A.; G. R. Chaudhry; B Kaskar; M. Sardessai; M. Bloda; A. R. Bhatti. and S. K. Walia 2002. Induction of carbofuran oxidation to 4-hydroxycarbofuran by *Pseudomonas* sp. 50432. *FEMS Microbiol. Lett.* 214, 171-6.
- McDonald, I.; P. Kämpfer; E Topp; K. L. Warner; M. J. Cox; T. L. Connell; L. G. Miller; M. J. Larkin; V. Ducrocq; C Coulter; D. B. Harper; M. J. Colin and R. S. Oremland 2005. *Aminobacter ciceronei* sp. nov. and *Aminobacter lissarensis* sp. nov., isolated from various terrestrial environments. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 55, 1827-1832.
- Ogram, A. V.; Y. P Duan; S. L. Trabue; X Feng; H. Castro and L. T. Ou 2000. Carbofuran degradation mediated by three related plasmid systems. *FEMS Microbiol. Ecol.* 32, 197-203.
- Park, M. R.; L. Sunwoo; H. Tae-ho; O. Byung; H. S. Jae and S. K. In 2006. A new intermediate in the degradation of carbofuran by *Sphingomonas* sp. strain SB5. *J. Microbiol. Biotech.* 16, 1306-1310.
- Plangklang, P. and A. Reungsang 2012. Isolation and characterization of a carbofuran degrading *Burkholderia* sp. PCL3 from carbofuran-phytoremediated rhizosphere soil. *Chem. Ecol.* 28, 253-266.
- Proagro. 2015. Disponible en: <http://www.pro-agro.com.mx/prods/fmc/fmc16.htm>. Consultado el 27 de agosto del 2015.
- Sakai, K., H., Yamanaka, K., Moriyoshi, T., Ohmoto, and T. Ohe, 2007. Biodegradation of bisphenol A and related compounds by *Sphingomonas* sp. strain BP-7 isolated from seawater. *Biosci., Biotechnol., Biochem.* 71(1), 51-7.
- Sato, Y.; T. Tsukamoto and M. Sato 1999. Rapid degradation of carbaryl by two novel strains of *Arthrobacter* spp. isolated from forest soil. *J. For. Res.* 4 (4): 275-280.
- Shin, D.-H., D. Kim, -U., C. Seong, -N., H. Song, -G., and J. Ka, -O. 2012. Genetic and phenotypic diversity of carbofuran-degrading bacteria isolated from agricultural soils. *J. Microbiol. Biotechnol.* 22(4), 448-56.
- Slaoui M.; M. Ouhssine; M. E. L. M'rabet; M. E. T. Massoui and M. E. Elyachioui 2001. Degradation du carbofuran par une bacterie du genre *Pseudomonas* sp. isolee a partir du sol. *Sci. Lett.* 3, 3-6.
- Swetha, V. P. and P. S. Phale 2005. Metabolism of carbaryl via 1,2-dihydroxynaphthalene by soil isolates *Pseudomonas* sp. strains C4, C5, and C6. *Appl Environ Microbiol.* 71:5951–5956.
- Topp, E.; R. S. Hanson; D. B. Ringelberg; D. C. White and R. Wheatcroft 1993. Isolation and characterization of an N-methylcarbamate insecticide-degrading methylotrophic bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 3339-3349.
- Waigi, M. G., F. Kang, C. Goikavi, W. Ling, and Y. Gao, 2015. Phenanthrene biodegradation by sphingomonads and its application in the contaminated soils and sediments: A review. *Int. Biodeterior. Biodegrad.*, 104, 333-349.
- Wu, J.; Q. Hong; Y. N. Chen and S. P. Li 2006. Analysis of the degrading products of Carbofuran by *Sphingomonas* sp. with GC/MS and GC/FTIR. *Spectros. Spect. Anal.* 26, 1716-1719.
- Xu, J.; Q. Hong; Y. Hong and S. Li, 2011. Isolation, identification and degradation of Carbofuran-degrading Strain CFDS-1. *Chinese J. Appl. Environ. Biol.* 17, 237-242.
- Yabuuchi, E., H. Yamamoto, S. Terakubo, N. Okamura, T. Naka, N. Fujiwara, K. Kobayashi, Y. Kosako and Hiraishi A. 2000. Proposal of *Sphingomonas wittichii* sp. nov. for strain RW1T, known as a dibenzo-p-dioxin metabolizer. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51(2), 281-292.
- Yan Q.; Q. Hong; P. Han; X. Dong; Y. Shen and S. Li. 2007. Isolation and characterization of a Carbofuran degrading strain *Novosphingobium* sp. *FEMS Microbiol. Lett.* 271, 207-213.
- Yan, Q. X., Y. Wang, X., S. P. Li, W. J. Li, and Q. Hong, 2010. *Sphingobium qiguonii* sp. nov., a carbaryl-degrading bacterium isolated from a wastewater treatment system. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 60(12), 2724-2728.
- Zhao, H. P., L. Wang, J. R. Ren, Z. Li, M. Li, and H. W. Gao, 2008. Isolation and characterization of phenanthrene-degrading strains *Sphingomonas* sp. ZP1 and *Tistrella* sp. ZP5. *J. Hazard. Mater. Journal*, 152(3), 1293-1300.