Rev. Int. Contam. Ambie. 29 (Número especial sobre plaguicidas) 105-119
Septiembre 2013

MICROORGANISMOS, ENZIMAS, PLÁSMIDOS Y GENES INVOLUCRADOS EN LA DEGRADACIÓN DE PLAGUICIDAS N-METILCARBAMATOS

José CASTELLANOS ROZO[1]* y Leidy Yanira RACHE CARDENAL[2]

[1] Laboratorio de Microbiología, Departamento de Biología y Microbiología, Universidad de Boyacá, Campus Universitario Tunja-Colombia: Carrera 2ª Este No. 64-169
[2] Laboratorio de Biología molecular, Departamento de Biología y Microbiología, Universidad de Boyacá, Campus Universitario Tunja-Colombia: Carrera 2ª Este No. 64-169
*Autor responsable: joscastellanos@uniboyaca.edu.co

(Recibido marzo 2013, aceptado mayo 2013)

Palabras clave: biorremediación, toxicidad, bacterias, rutas catabólicas, mecanismos moleculares

RESUMEN

Los plaguicidas N-metilcarbamatos, son muy utilizados a nivel mundial para controlar insectos, ácaros, nemátodos, hongos y malezas en diferentes cultivos. Son altamente tóxicos para humanos y animales, persisten en el ambiente y tienen movilidad significativa en suelos. Una posible alternativa para mitigar los efectos provocados por estos plaguicidas, es la biorremediación, que puede ser mediada por microorganismos capaces de degradar moléculas tóxicas y altamente complejas a moléculas menos complejas, no tóxicas y que pueden ser utilizadas por otros organismos. En esta revisión, se pretende hacer un análisis detallado acerca de los microorganismos biorremediadores de plaguicidas N-metilcarbamatos, puesto que se ha encontrado una gran diversidad de especies con rutas catabólicas de degradación diferentes; además, se analizarán las enzimas carbamato hidrolasas, que actúan sobre un amplio rango de sustratos, bajo distintas condiciones y los diversos mecanismos moleculares (plásmidos y genes) involucrados en los procesos de biodegradación de plaguicidas. La información recopilada es útil para entender los mecanismos que han desarrollado los microorganismos para degradar los plaguicidas N-metilcarbamatos.

Key words: bioremediation, toxicity, bacteria, catabolic pathway, molecular mechanisms.

ABSTRACT

N-methylcarbamates are widely used worldwide to control insects, mites, nematodes, fungi and weeds in different crops. These are highly toxic to humans and animals, persist in the environment and have significant mobility in soils. Biorremediation is a possible alternative to mitigate the effects caused by these pesticides, which may be mediated by microorganisms capable of degrading toxic and highly complex molecules, in less complex molecules, non-toxic and that can be used by other organisms. In this review, we performed a detailed analysis of N-methylcarbamate pesticides degrading microorganisms, since a great diversity of species with different catabolic pathways of degradation have been found; also, we analyzed carbamate hydrolase enzymes, which act on a wide range of substrates, under different conditions and different molecular

mechanisms (plasmids and genes) involved in pesticide biodegradation processes. The information collected is useful for understanding mechanisms that have developed microorganisms to degrade N-methylcarbamate pesticides.

INTRODUCCIÓN

Los N-metilcarbamatos son compuestos orgánicos derivados del ácido carbámico, utilizados ampliamente como insecticidas, fungicidas, acaricidas y nematicidas (Castillo *et al*. 2003, Chelinho *et al*. 2011). La actividad común de estos plaguicidas es inhibir de forma reversible la acetilcolinesterasa, lo cual causa espasmos y parálisis en insectos y mamíferos (Bretaud *et al.* 2000, Jiandong *et al*. 2007, Dong *et al*. 2012).

Entre los N-metilcarbamatos más utilizados se encuentran: carbofuran (2,2-dimetil-2,3-dihidro-1-benzofuran-7-il metilcarbamato), carbaril (1-naftil metilcarbamato), aldicarb (2-metil-2-(metiltio) propanal O-(N-metilcarbamoil) oxima) (Nogueira *et al*. 2003, Naqvi *et al*. 2009, Dong *et al*. 2012), fenoxicarb (etil N-(2-(4-fenoxifenoxi)etil) carbamato), fenobucarb ((2-Butan-2-ilfenil) N-metilcarbamato) (Dong *et al*. 2012), metomil (S-metil-N-(metilcarbamoil-oxi)-tioacetimidato), pirimicard ((2-dimetilamino-5,6-dimetilpirimidin-4-il) dimetilcarbamato), carbosulfan (2,3-dihidro-2,2-dimetilbenzofuran-7-il (dibutilaminotio) metilcarbamato), oxamil (N,N-dimetil-2-metilcarbamoil oximino-2-(metilito) acetamida) (Nogueira *et al*. 2003), bendiocarb (2,2-dimetil-1,3 -benzodioxol-4-il-metilcarbamato) y propoxur (2-isopropoxifenil N-metilcarbamato) (Topp *et al*. 1993). Su alta toxicidad en animales y seres humanos, significativa movilidad en suelos y las malas prácticas de manejo asociadas entre otras a la sobredosificación, pueden generar posible riesgo para la salud pública, produciendo enfermedades como cáncer de pulmón (Bonner *et al*. 2005) y problemas reproductivos (Goad *et al*. 2004).

Una de las estrategias actuales empleadas para mitigar los efectos que tienen los plaguicidas es la biorremediación, la cual puede ser definida como el uso de organismos vivos, componentes celulares y enzimas libres, con el fin de realizar una transformación parcial o mineralización de compuestos xenóbióticos (Megharaj *et al*. 2011).

El potencial de la biorremediación, a diferencia de los métodos fisicoquímicos, reside en que es una estrategia de bajo costo, bajo mantenimiento, amigable con el ambiente y fácilmente aplicable *in situ* (Megharaj *et al*. 2011).

Estudios a nivel mundial han determinado que los microorganismos son los principales responsables de la degradación de compuestos plaguicidas (Parekh *et al.* 1994). Esto se debe al uso extenso de estos compuestos en suelos agrícolas, lo cual ha inducido mecanismos de adaptación genética en los microorganismos, que ha conllevado a la síntesis de enzimas que oxidan, hidrolizan e hidroxilan los plaguicidas, permitiendo su utilización como única fuente de carbono, nitrógeno, azufre o fósforo, facilitando la eliminación de la toxicidad del compuesto por actividad cometabólica o mineralización completa (Desaint *et al.* 2000, Grenni *et al.* 2012).

El objetivo de este trabajo es realizar una revisión sobre los diversos microorganismos degradadores de plaguicidas N-metilcarbamatos, las rutas de degradación, las enzimas y los genes involucrados en este proceso.

I. DIVERSIDAD DE MICROORGANISMOS DEGRADADORES DE PLAGUICIDAS N-METILCARBAMATOS

Se ha descrito gran diversidad de microorganismos capaces de degradar plaguicidas N-metilcarbamatos. Entre ellos están bacterias Gram negativas como *Rhizobium* sp. (Hashimoto *et al.* 2002), *Sphingomonas* sp. (Feng *et al*. 1997, Park *et al*. 2006; Wu *et al.* 2006, Xu *et al*. 2011), *Novosphingobium* sp. (Yan *et al.* 2007) *Paracoccus* sp. (Xu *et al*. 2009), *Sphingobium* sp. (Sipilä *et al*. 2010) *Bosea* spp. (Dong *et al*. 2012), *Pseudomonas* sp. (Slaoui *et al*. 2001, Bano y Musarrat 2004), *Burkholderia* sp. (Plangklang y Reungsang 2011, 2012) y bacterias que pertenecen al grupo heterogéneo de los metilótrofos facultativos como *Aminobacter ciceronei* nov. ER2 (Topp *et al.* 1993, McDonald *et al.* 2005).

Chauldry y Ali (1988), fueron los primeros en aislar microorganismos de suelos con historia de aplicación de carbofuran, todos correspondieron a bacilos Gram negativos solos o en cadenas cortas, oxidasa y catalasa positivos, pertenecientes a los géneros *Flavobacterium* sp. o *Pseudomonas* sp.

Posteriormente Parekh *et al.* (1994), obtuvieron 68 aislamientos de suelos con diferente historia de aplicación de carbofuran, que también fueron bacilos

aerobios Gram negativos, la mayoría oxidasa y catalasa positivos. Todos los aislamientos de este estudio hidrolizaron carbofuran a carbofuran 7-fenol sin utilizar este último compuesto como fuente de carbono.

De otro lado, se han aislado especies Gram positivas como *Micrococcus* sp. (Hanumanthanaik y Harichandra 2001), *Rhodococcus* sp. y *Microbacterium* sp. (Dong *et al*. 2012) y otros aislamientos ambientales con características fisiológicas y químicas, que a menudo no coinciden con especies previamente descritas y en algunos casos con ningún género, siendo estos microorganismos mal identificados o no identificados (Parekh *et al*. 1995).

Además de ello, se ha comprobado la existencia de microorganismos no cultivables capaces de degradar N-metilcarbamatos en suelos con historia de aplicación de estos compuestos (Desaint *et al.* 2000) y un alto grado de diversidad genética (Karpouzas *et al*. 2000). Desaint y colaboradores (2000), observaron mediante análisis de restricción del gen 16S ADNr amplificado (ARDRA) y por análisis enzimático de restricción de la región espaciadora del 16S-23S ADNr (IGS), la diversidad genética de 128 bacterias degradadoras de carbofuran en suelos franceses e ingleses. Los aislamientos fueron distribuidos en 26 grupos ARDRA y 45 tipos IGS, revelando de igual manera un alto nivel de diversidad microbiana.

Estudios realizados por Dong *et al.* (2012) mediante secuenciación del 16S ADNr y amplificación de elementos palindrómicos extragénicos repetitivos a través de reacción en cadena de la polimerasa (REP-PCR), revelaron que 37 aislamientos bacterianos de diferentes suelos de Corea, capaces de degradar carbofuran al utilizarlo como única fuente de carbono, presentaron patrones idénticos de ADN cromosómico conformando 15 grupos REP-PCR. Concluyeron que los aislamientos bacterianos dentro de cada grupo están estrechamente relacionados con *Sphingomonas* sp. y *Sphingobium* sp. Los aislamientos de este estudio fueron clasificados en cuatro grupos de acuerdo con las características de crecimiento y degradación, comprobando que todos utilizaron carbofuran y carbaril como única fuente de carbono y energía. Entre los aislamientos la cepa SS1 fue capaz de degradar todos los plaguicidas evaluados, carbofuran, carbofuran 7-fenol, aldicarb, fenoxicarb, propoxur, carbaril, 4-nitrofenil acetato, mientras las cepas MW3 y TA5, sólo degradaron carbofuran y carbaril (Dong *et al.* 2012).

Por otro lado, se han reportado diversos hongos degradadores de plaguicidas N-metilcarbamatos como *Mucor ramanianus* (Seo *et al*. 2007), *Aspergillus niger* (Qing y Yang 2003), *Gliocladium sp*. (Slaoui *et al*. 2007), levaduras como *Pichia anomala* cepa HQ-C-01, capaces de degradar carbofuran como única fuente de carbono y/o de nitrógeno (Yang *et al*. 2011).

También se ha evaluado la degradación cruzada por hongos de plaguicidas del grupo N-metilcarbamatos como carbofuran y otro grupo de plaguicidas no relacionados como fenamifos y cadusafos, pertenecientes al grupo de los organofosforados (Slaoui *et al*. 2007).

Se han reportado consorcios de hongos y bacterias capaces de ejercer degradación cruzada de plaguicidas no relacionados químicamente como aldicard, atrazina y alaclor (Hai *et al*. 2011).

II. RUTAS CATABÓLICAS DE DEGRADACIÓN MICROBIANA DE LOS PLAGUICIDAS N-METILCARBAMATOS

La utilización de técnicas como cromatografía líquida de alta eficiencia con fase reversa acoplada a espectrofotometría de masas (RP-HPLC/MS) (Dong *et al*. 2012), cromatografía de gases acoplada a espectrofotometría de masas (GC/MS) (Yang *et al*. 2011) y resonancia magnética nuclear (RMN) (Park *et al*. 2006), han permitido identificar diferentes rutas de degradación que emplean los microorganismos para la degradación de los plaguicidas N-metilcarbamatos.

Se han propuesto dos rutas principales de degradación bacteriana de los N-metilcarbamatos, la vía oxidante y la hidrolítica. Sin embargo, se ha comprobado que la degradación por la vía oxidante de los N-metilcarbamatos, produce metabolitos que son más tóxicos que el mismo compuesto parental (Mateen *et al*. 2002).

De otro lado, se ha reportado ampliamente que la hidrólisis enzimática del enlace N-metilcarbamato es el mecanismo primario de inactivación de estos plaguicidas carbamatos en suelos previamente tratados (**Fig. 1a**, Chaudhry y Ali 1988). La hidrólisis del enlace carbamato podría ocurrir por cualquiera de las dos vías, por rompimiento del enlace éster (el grupo carbonilo del ácido N-metilcarbámico unido al fenol), o por rompimiento del enlace amida. En ambos casos, tanto con la amidasa o con la esterasa, el producto de la hidrólisis es idéntico por la inestabilidad del enlace del ácido N-metilcarbamato, produciendo carbofuran 7-fenol (2,3-dihidro-2,2-dimetil-7-benzofuranol), metabolito menos tóxico que el carbofuran, y metilamina, la cual actúa como fuente de carbono y/o de nitrógeno para un grupo diverso de bacterias que hidrolizan carbofuran en suelos previamente tratados (Topp *et al*. 1993, Feng *et al*. 1997, Kim *et al*. 2004, Yan *et al*. 2007, Dong *et al*. 2012).

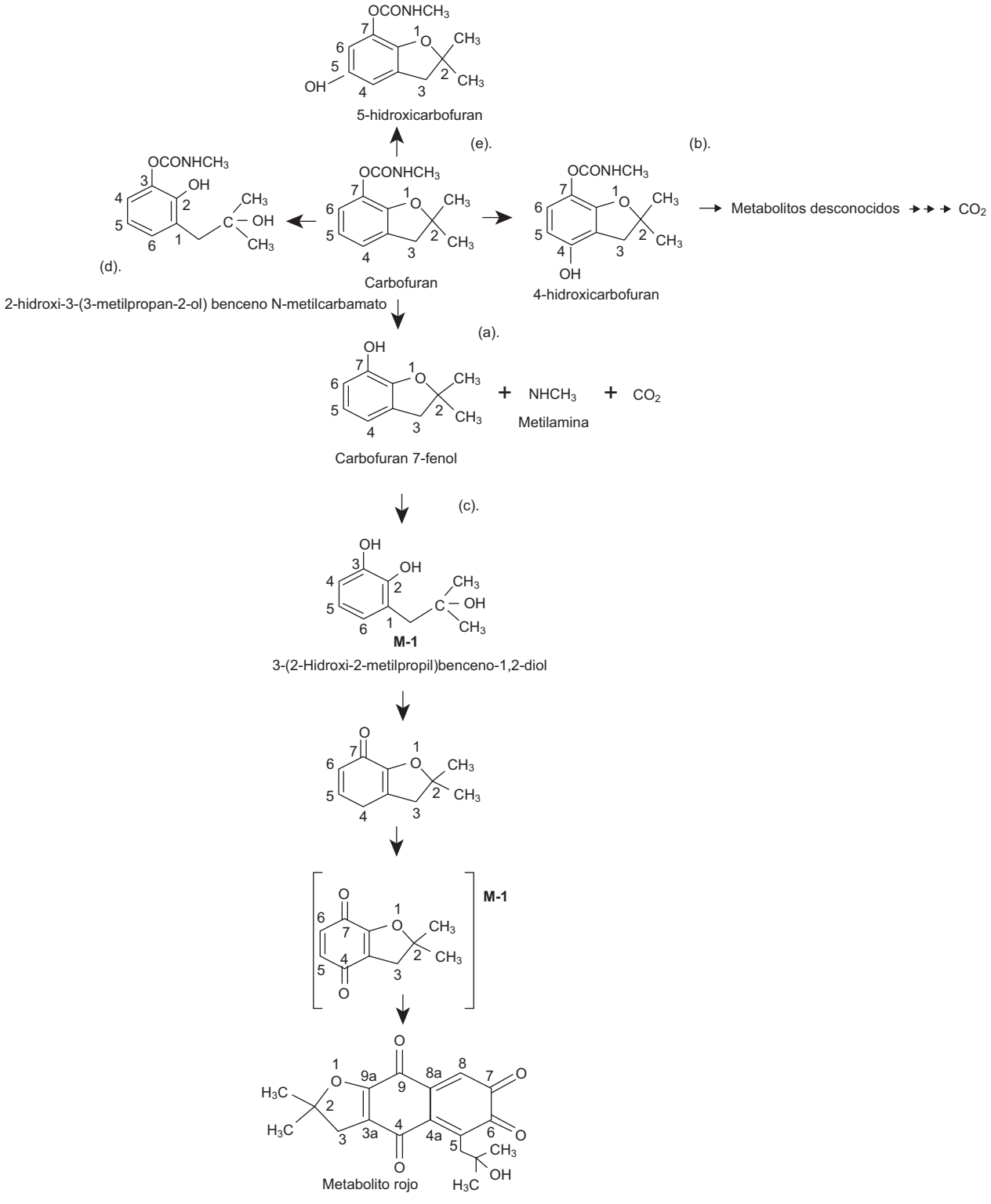

Fig. 1. Rutas metabólicas empleadas por los microorganismos para la degradación de carbofuran **a).** Ruta propuesta por Chaudhry y Ali (1988). **b).** Ruta propuesta por Mateen *et al*. (2002) para *Pseudomonas* sp. 50432. **c).** Ruta propuesta por Park *et al.* (2006) para *Sphingomonas* sp. SB5. **d).** Ruta propuesta por Yan *et al*. (2007) para *Novosphingobium* sp. FND-3 **e).** Ruta propuesta por Behki *et al*. (1994) para *Rhodococcus* sp.TE1. Fuente autores.

De acuerdo con la forma de utilización del carbofuran (carbono y/o nitrógeno) y al mecanismo de degradación que emplean las bacterias (oxidante y/o hidrolítico), se han reportado diferentes grupos bacterianos degradadores. Chauldry y Ali (1988) reportaron tres grupos microbianos que degradaban carbofuran de distinta manera. El grupo I correspondió a seis aislamientos bacterianos que fueron capaces de hidrolizar el carbofuran a carbofuran 7-fenol y metilamina, utilizando esta última como única fuente de nitrógeno. El grupo II correspondió a siete bacterias que hidrolizaron carbofuran a carbofuran 7-fenol y metilamina usando esta última como única fuente de carbono (**Fig. 1a**). El grupo III correspondió a dos aislamientos bacterianos, caracterizados como *Pseudomonas* sp. los cuales mineralizaron rápidamente el anillo aromático del carbofuran como fuente de carbono para su crecimiento. Subsiguientes pruebas determinaron que eran incapaces de crecer a partir de carbofuran 7-fenol y metilamina como única fuente de carbono y nitrógeno respectivamente, lo cual sugirió que podrían degradar carbofuran por vía oxidante (**Fig. 1b**).

Experimentos posteriores determinaron que *Pseudomonas* sp. 50432, posee ambos mecanismos de degradación de carbofuran (oxidante e hidrolítico), concluyendo que el mecanismo oxidante, dado por una enzima hidroxilasa, es de carácter inducible y convierte el carbofuran en un metabolito identificado como 4-hidroxicarbofuran, que a su vez es degradado a otros metabolitos aún no conocidos, hasta alcanzar la mineralización completa (**Fig. 1b**, Mateen *et al*. 2002).

No obstante, son pocos los estudios que describen bacterias involucradas en la degradación completa de la estructura del anillo aromático del carbofuran.

Aislamientos bacterianos obtenidos por Parekh y colaboradores en 1995, de suelos con diferente historial de tratamiento con N-metilcarbamatos, fueron caracterizados por 125 pruebas fenotípicas y por patrones de RFLP (polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción) del ADN total. Estos aislamientos fueron capaces de hidrolizar carbofuran, suplementado como única fuente de carbono y nitrógeno a carbofuran 7-fenol y metilamina. También fueron capaces de hidrolizar carbaril y aldicard, no obstante ninguno pudo metabolizar el anillo aromático de estos compuestos (**Fig. 1a**).

De otro lado, una bacteria Gram negativa aislada de un suelo agrícola en Canadá, que presenta degradación acelerada de plaguicidas, creció en carbofuran como fuente de carbono y nitrógeno, con un tiempo de duplicación de tres horas, en medio mínimo de sales minerales, sin metabolizar el anillo aromático. Esta bacteria denominada ER2, fue capaz de hidrolizar otros N-metilcarbamatos como carbaril, bendiocarb y propoxur, acumulando de igual manera el respectivo fenol. ER2 presentó características fenotípicas y algunas genotípicas similares a *Achromobacter* sp. cepa WM111, descrita por Karns y Tomasek en 1991 (Topp *et al*. 1993). Se determinó que estas dos cepas a pesar de ser aisladas de zonas geográficamente distintas, poseen un perfil plasmídico similar. Ambas bacterias poseen el gen *mcd*, que codifica la enzima carbofuran hidrolasa, en plásmidos de igual tamaño (Topp *et al.* 1993). Sin embargo, el análisis filogenético basado en la secuencia del gen 16S ARNr, indicó que la cepa ER2, está estrechamente relacionada a metilótrofos de la vía serina. El análisis de las características morfológicas, fisiológicas, composición de ácidos grasos y caracterización filogenética, basada en los registros de la secuencia del gen 16S ARNr y la hibrización ADN-ADN, determinaron que la cepa metilotrófica ER2 pertenece a una nueva especie denominada *Aminobacter ciceronei* sp. nov. cepa tipo ER2 (McDonald *et al.* 2005).

Por otro lado se han reportado *Sphingomonas* sp. degradadoras de plaguicidas. El gran interés por estas bacterias se debe a su extraordinaria versatilidad metabólica, principalmente a la capacidad de degradar un amplio rango de compuestos aromáticos, diferentes herbicidas y plaguicidas, compuestos xenobióticos y naturales (Basta *et al*. 2005, Stolz 2009).

Ogram *et al*. (2000) aislaron de suelos de Washington, 55 microorganismos que pudieron utilizar el carbofuran como única fuente de carbono y/o de nitrógeno. Estudios realizados con carbofuran radiomarcado en la cadena lateral y en el anillo aromático, determinaron que todos los aislamientos fueron capaces de mineralizar la cadena lateral del carbofuran, pero solo dos pudieron mineralizar el anillo aromático. Una de esas bacterias fue la cepa CF06, un bacilo Gram negativo perteneciente al género *Sphingomonas* sp., miembro del grupo ά proteobacteria, degrada el anillo aromático del carbofuran, el carbaril, gentisato, ácido procatecuico y metilamina como única fuente de carbono y de energía. Sin embargo, se determinó que no puede utilizar tolueno, benzofuran, dibenzofuran ni 2,4-diclorofenoxiacetato (Feng *et al*. 1997). No obstante, se ha reportado la cepa *S. yanoikuyae* B1, que degrada compuestos BTEX (benceno, tolueno, etilbenceno y xileno) y poliaromáticos, aunque no degrada aromáticos clorinados o herbicidas (Romine *et al*. 1999, Kim y Zylstra 1999, en Stolz 2009). Sin embargo, *S. herbicidovorans* MH, puede degradar varios herbi-

cidas, pero no poliaromáticos o componentes BTEX (Kohler 1999). También se han aislado las cepas *Sphingomonas* sp. KS14, *S. paucimobilis* TNE12 y *S. xenophaga* BN6, que degradan compuestos aromáticos policíclicos como el fenantreno, naftaleno, fluoranteno y naftalensulfonato.

Estudios posteriores hechos en Corea, aislaron de suelos agrícolas expuestos a carbofuran durante cinco años, *Sphingomonas* sp., capaces de crecer en carbofuran como única fuente de carbono y nitrógeno (Kim *et al*. 2004). *Sphingomonas* sp. SB5, fue seleccionada por su capacidad de hidrolizar 0.91 milimolar (mM) de carbofuran a carbofuran 7-fenol y metilamina, en un tiempo de 12 horas e hidrolizar a su vez carbofuran 7-fenol a un producto metabólico denominado 2-hidroxi-3-(3-metilpropan-2-ol) fenol, por adición de una molécula de agua al enlace éter del anillo furanil, en un tiempo de 48 horas. Metabolitos rojos resultantes del 2-hidroxi-3-(3-metilpropan-2-ol) fenol, fueron observados y posteriormente caracterizados por espectrofotometría de masas y análisis RMN (^{1}H, ^{13}C). Los resultados sugirieron que el metabolito rojo es 5-(2-hidroxi-2-metil-propil)-2,2-dimetil-2,3 dihidronafto [2,3-6]furan-4,6,7,9-tetrona, el cual se forma como producto de la condensación de algunos metabolitos provenientes de la degradación del 2-hidroxi-3-(3-metilpropan-2-ol) fenol (**Fig. 1c**, Park *et al*. 2006).

Se han reportado otros aislamientos capaces de hidrolizar carbofuran 7-fenol y producir metabolitos rojos (Dong *et al*. 2012, Yan *et al.* 2007, Xu *et al*. 2011). *Sphingomonas* sp. CDS-1 ha sido descrita por ser oxidasa, catalasa y Voges Proskauer positivo, fermentar la glucosa, la xilosa, la fructosa, la 3-cetolactosa e incapaz de hidrolizar el almidón, la gelatina y reducir nitratos. Las pruebas para L-fenilalanina y rojo de metilo también fueron negativas (Xu *et al*. 2011). Los análisis de homología de secuencia del 16S ADNr demostraron 99 % de similitud con la cepa degradadora de carbofuran *Sphingomonas* sp. CF06 descrita por Feng y colaboradores (1997). Estas bacterias fueron capaces de hidrolizar el carbofuran a carbofuran 7-fenol en 48 horas, en medio mínimo de sales minerales, a una concentración de 100 ppm, pH 7 y 180 rpm. También se observaron metabolitos rojos para estas cepas creciendo en carbofuran y en carbofuran 7-fenol como única fuente de carbono. Se identificó por análisis GC/MS el producto hidrolítico de la degradación del carbofuran 7-fenol denominado 2-hidroxi-3-(3-metilpropan-2-ol) fenol, en tales bacterias, sugiriendo que poseen la misma ruta de degradación de carbofuran descrita para *Sphingomonas* sp. SB5 (**Fig. 1**).

Por otra parte, *Novosphingobium* sp. cepa FND-3 degradadora de carbofuran, descrita como bacilo corto Gram negativo, con dimensiones de 1.5–2.0 x 0.6–1.0 µm sin flagelo, oxidasa positiva, nitrato reductasa positiva, Voges Proskauer positiva, hidrólisis de almidón negativa, producción de L-fenilalanina negativa y rojo de metilo negativa, fue aislada por la técnica de cultivo enriquecido, de lodos de un sistema de tratamiento de aguas residuales en una compañía manufacturera de plaguicidas en China (Yan *et al.* 2007). *Novosphingobium* sp. cepa FND-3, además de hidrolizar el enlace éster para formar carbofuran 7-fenol y metilamina y posteriormente producir 2-hidroxi-3-(3-metilpropan-2-ol) fenol, también posee la capacidad de hidrolizar el enlace éter produciendo 2-hidroxi-3-(3-metilpropan-2-ol) benceno N-metilcarbamato (**Fig. 1d**) e hidroxilar el anillo bencénico del carbofuran, constituyendo el metabolito 5-hidroxicarbofuran como se ha descrito para otras bacterias como *Rhodococcus* sp. TEI (**Fig. 1e**) (Behki *et al*. 1994). Ello indica que los microorganismos no solo adquieren un mecanismo único de degradación sino que tienen la capacidad de degradar un mismo compuesto utilizando varias rutas metabólicas.

Yan *et al*. (2007) secuenciaron el gen 16S ARNr de *Novosphingobium* sp. cepa FND-3. La secuencia del gen fue comparada con secuencias disponibles en el GenBank demostrando 99.4 % de similitud con *Novosphingobium subarcticum* KF1 (X94102) degradadora de clorofenol, 97 % con *Sphingomonas* sp. SB5 (Kim *et al.* 2004) y 93 % de semejanza con *Sphingomonas* sp. CF06 (Feng *et al*. 1997).

III. ENZIMAS MICROBIANAS INVOLUCRADAS EN LA DEGRADACIÓN DE CARBOFURAN

Los enzimas carbamato hidrolasas han sido detectadas en *Blastobacter* sp. (Hayatsu y Nagata 1993) *Arthrobacter* sp. (Pohlenz *et al*. 1992), *Pseudomonas* sp. (Mulbry y Eaton 1991), *Achromobacter* sp. (Karns y Tomasek 1991), *Micrococcus* sp. (Doddamani y Ninnekar 2001), *Rhizobium* sp. (Hashimoto *et al*. 2002) y *Aspergillus* sp. (Qing y Yang 2003).

En general las hidrolasas involucradas en la degradación de carbofuran parecen tener diferencias en sus características bioquímicas y en su actividad sobre un amplio rango de sustratos relacionados, bajo el mismo grupo de plaguicidas carbamatos (**Cuadro I**). Estudios realizados por Mulbry y Eaton (1991), determinaron que la enzima carbamato

hidrolasa producida por *Pseudomonas* sp. CRL-OK, fue sintetizada de forma inducible y está conformada por un dímero con subunidades idénticas de aproximadamente 85 kiloDaltones (kDa). Su temperatura óptima es de 60 ºC y pH entre 8 y 9. Características relativamente parecidas han sido determinadas para las enzimas de *Achromobacter* sp. y *Rhizobium* sp. No obstante, a diferencia de la enzima carbamato hidrolasa de *Pseudomonas* sp. cepa CRL-OK, la enzima de *Pseudomonas aeruginosa* está formada por un monómero sintetizado constitutivamente por la bacteria, con temperatura óptima de reacción de 45 ºC y pH óptimo 8.5 (**Cuadro I**, Chapalmadugu y Chaudhry 1993).

Otra de las características en las que difieren estas enzimas es el rango de sustratos N-metilcarbamatos sobre los cuales actúan. Las carbamato hidrolasas parecen ser capaces de hidrolizar un gran número de compuestos con enlaces químicos similares. Estudios realizados para evaluar la afinidad de sustrato de las carbamato hidrolasas, determinaron que la enzima de *Pseudomonas* sp. cepa CRL-OK, presentó afinidad semejante para los plaguicidas carbaril y carbofuran, con menor afinidad para aldicard. No se detectó actividad enzimática para EPTC (dipropiltiocarbamato de etilo), CIPC (isopropil m-cloro carbanilato) y o–NPDC (orto-nitrofenil-dimetilcarbamato). De otro lado, estudios realizados con la hidrolasa de *Rhizobium* sp., determinaron mayor especificidad en la actividad hidrolítica para carbaril, seguida por propoxur, fenobucard e isoprocard. No se detectó actividad hidrolítica con carbofuran y clorprofam (**Cuadro I**, Hashimoto *et al*. 2002).

La enzima de *Pseudomonas* sp. cepa CRL-OK., actúa sobre un rango relativamente amplio de sustratos N-metilcarbamatos, mientras la hidrolasa de *Achromobacter* sp. y la de *Pseudomonas aeruginosa* posee mayor especificidad hacia los plaguicidas carbamatos. La enzima de *Pseudomonas aeruginosa* sólo hidroliza carbaril, mientras la hidrolasa de *Achromobacter* sp., hidroliza carbaril y carbofuran principalmente, como también o-NPDC. No obstante, ambas enzimas citosólicas tienen aproximadamente la misma afinidad por el carbofuran y el carbaril. La enzima carbamato hidrolasa de *Achromobacter* sp., no demostró actividad frente a fenilcarbamatos y tiocarbamatos (**Cuadro I**, Karns y Tomasek 1991, Mulbry y Eaton 1991).

Por otra parte, estudios de caracterización de la enzima carbamato hidrolasa de *Blastobacter* sp., determinaron una alta actividad de esta enzima para hidrolizar carbaril. También se determinó hidrólisis de propoxur, xililcarb y 4–nitrofenilacetato en menor grado. La hidrólisis de carbamatos por la carbaril hidrolasa de *Blastobacter* sp. parece estar muy afectada por los sustituyentes alquilo que se encuentran en el anillo aromático, ya que la actividad relativa hacia fenobucarb e isoprocarb fue la más baja de todos los carbamatos evaluados. Así, las hidrolasas de *Pseudomonas* sp., cepa CRL-OK y *Achromobacter* sp., cepa WM111, son más efectivas en hidrolizar N-metilcarbamatos que tienen grupos aromáticos. Esto se debe a que la carbaril hidrolasa de *Blastobacter* sp. cepa M501, parece tener cierta especificidad por el enlace éster de los N-metilcarbamatos (Hayatsu y Nagata 1993).

Con excepción de algunos carbamatos, las enzimas hidrolasas de *Blastobacter* sp., *Rhizobium* sp. y *Aspergillus niger*, tienen la capacidad de hidrolizar otros ésteres de carboxilo como 4-nitrofenil acetato, 1-naftil acetato (Hayatsu y Nagata 1993) y p-nitrofenil butirato (Pohlenz *et al*. 1992), lo cual determina que las enzimas son esterasas (CbEs).

Otro aspecto bioquímico, en el cual se presentan grandes diferencias entre las enzimas, es la inhibición o estimulación de su actividad hidrolítica bajo un amplio rango de condiciones de reacción, como es la presencia de detergentes, cationes divalentes como Hg^{2+} y Al^{2+} y sales como el dodecil sulfato de sodio (SDS), entre otras sustancias químicas. Las enzimas carbamato hidrolasas producidas por *Pseudomonas* sp. CRL-OK y *Pseudomonas aeruginosa*, retienen su actividad en presencia de detergentes, agentes reductores sulfhidrilo y presencia de sales como SDS, mientras que la actividad de las enzimas de *Rhizobium* sp., *Blastobacter* sp. y *Aspergillus niger*, son inhibidas por iones Hg^{2+}, lo cual indica la presencia de grupos sulfhidrilo en el sitio activo de estas enzimas. No obstante, retienen su actividad enzimática con yodo acetamida, dihidroisopropilfluorofosfato, paraoxon y ácido etilendiaminotetraacético, determinando que los iones divalentes no son necesarios para su actividad enzimática (Mulbry y Eaton 1991, Hayatsu y Nagata 1993, Qing y Yang 2003).

Otros estudios de caracterización de la enzima carbamato hidrolasa producida por *Aspergillus niger*, determinaron que esta enzima es inhibida por la unión de fenilmetilsulfonil fluoruro (PMSF), cloromercurio benzoato (PCMB), ácido iodoacético (IAA) y diisofluorofosfato (DIPF), estos compuestos son inhibidores de los residuos de serina en su centro activo, los cuales son indispensables para la catálisis enzimática (Qing y Yang 2003).

Estudios detallados del sitio activo de las enzimas carboxilesterasas (CbEs), han determinado que la hidrólisis enzimática de ésteres de carboxilo se basa

CUADRO I. PRINCIPALES CARACTERÍSTICAS DE LAS ENZIMAS CARBAMATO HIDROLASAS PRESENTES EN MICROORGANISMOS

Enzima	Subunidades	Temperatura óptima ºC	pH óptimo	Actividad enzimática	Agente inhibidor	Km (μM)[a] carbofuran	Km (μM)[a] carbaril	Actividad no detectada	Referencia
Pseudomonas sp. cepa 50432	Monómero de 88 kDa	37	8.5	Detergentes, iones metálicos, EDTA	2-mercaptoetanol	16	12	o-NPDC.	Chaudhry *et al.* (2002)
Pseudomonas sp. cepa CRL-OK	Dímero con subunidades idénticas de 85 KDa	60	8.0	Detergentes, EDTA, iones metálicos, 2-mercaptoetanol.	ND	140	213	o-NPDC. EPTC. CIPC	Mulbry y Eaton (1991)
Pseudomonas aeruginosa cepa 50581	Monómero de 65 kDa	45	8.5	Iones metálicos ditioeritritol, ditiotreitol, 2-mercaptoetanol.	ND	ND	9	Carbofuran	Chapalmadugu. y Chaudhry (1993).
Achromobacter sp. cepa WM111	Dímero con subunidades 70 kDa	50	9	ND	EDTA	56	15	Propoxur Isoprocarb Fenobucarb	Karns y Tomasek (1991).
Rhizobium sp. cepa AC100	Dímero con subunidades idénticas de 70 kDa	45	9	IAA, DIPF, paraoxon, EDTA	Iones Hg^{2+}	ND	62	Carbofuran Clorprofam	Chapalmadugu y Chaudhry (1993).
Blastobacter sp. cepa M501	Dímero con subunidades idénticas de 84 kDa	45-50	9	Iones metálicos, DIPF, paraoxon, EDTA.	Iones Hg^{2+}	---	55	Fenitrotion Metilparation Paraoxon Clorprofam	Hayatsu y Nagata (1993).
Aspergillus niger cepa PY168	Monómero de 50 kDa	45	7.5	Fenaltrolina, EDTA	Iones Hg^{2+}y Al^{2+}, IAA, DIPF, PMSF, PCMB	67	12	---	Qing y Yang (2003).

Ácido iodoacético: IAA; diisopropilfluorofosfato: DIPF; fenilmetilsulfonil fluoruro: PMSF; cloromercurio benzoato: PCMB; orto-nitrofenil-dimetilcarbamato: o-NPDC; dipropiltiocarbamato de etilo: EPTC; isopropil m-cloro carbanilato: CIPC; ND (no detectado); ácido etilendiaminotetraacético: EDTA

en la acilación reversible de un residuo de serina en el centro activo de la proteína. Esta acilación provoca la liberación de la molécula y de la correspondiente enzima covalentemente acilada. Este intermediario acilado es hidrolizado por ataque nucleofílico del agua que libera la fracción del ácido carboxílico correspondiente, además de las enzimas activas, las cuales quedan dispuestas para iniciar un nuevo ciclo catalítico. Las secuencias de aminoácidos de algunas de estas CbEs, presentan importantes homologías con esterasas eucariotas como las presentes en el hígado y en la albúmina de suero (Sogorb y Vilanova 2002).

IV. PLÁSMIDOS Y GENES IMPLICADOS EN LA DEGRADACIÓN DE PLAGUICIDAS N-METILCARBAMATOS

Estudios realizados a nivel mundial indican que la capacidad de degradación de la mayoría de los microorganismos se debe a la presencia de varios plásmidos que codifican enzimas que les permiten degradar xenobióticos, plaguicidas N-metilcarbamatos, entre otros (Desaint *et al*. 2000, Ogram *et al*. 2000, Basta *et al*. 2004) y que están implicados en las vías degradantes de diversos componentes heterocíclicos. Se demostró que casi todas las cepas analizadas contenían de 2 a 5 plásmidos circulares con tamaños entre <50 - >400 kilobases (Kb) (Basta *et al*. 2004, Stolz 2009).

También se han encontrado plásmidos grandes >500, 240 y 180 kb conteniendo genes que codifican enzimas para la degradación de compuestos aromáticos (Shuttleworth *et al*. 2000, Cho y Kim 2001, Basta *et al*. 2004, en Stolz 2009) y/o compuestos xenobióticos poliméricos tales como polietilenglicoles (PEGs) y/o polivinil alcoholes (Tani *et al*. 2007, Stolz 2009).

La primera prueba de la importancia de esos plásmidos en la degradación de compuestos orgánicos fue obtenida por Romine *et al*. (1999), al reportar la secuencia de un plásmido de 184 kb (pNL1) de *Sphingomonas aromaticivorans* F199, que contiene todos los genes necesarios para la degradación de naftaleno, bifenil y tolueno. Posteriormente, Ogram y colaboradores (2000) y Lim y colaboradores, encontraron evidencia fuerte sobre la participación de plásmidos en la degradación de varios biocidas (carbofuran y mecoprop), por diferentes especies de *Sphingomonas* (Stolz 2009). En el año 2004, con la secuenciación del genoma de *S. wittichii* RW1, se demostró la presencia de dos plásmidos en esta cepa (pSWIT01 y pSWIT02 con tamaños de 310 y 223 kb, respectivamente, Basta *et al*. 2004). Shintani *et al*. (2007), detectaron en *Sphingomonas* sp. KA1 un plásmido (pCAR3-225 kb) con genes para la degradación, que le permiten a la cepa mineralizar carbazol en intermediarios del ciclo del ácido tricarboxílico. Recientemente se ha registrado que los plásmidos de *S. francense* y *S. japonicum* UT26, están involucrados en la degradación de lindano y que *S. japonicum* UT26, contiene un replicón de 185 kb (pCHQ1) que le permite convertir 2,5 diclorohidroquinona a maleilacetato (Cérémonie *et al*. 2006, Nagata *et al*. 2006, Stolz 2009).

Algunos autores sugieren que estos plásmidos son transmitidos por conjugación entre *Sphingomonas* sp. y que su transferencia es limitada hacia otros géneros de bacterias (Romine *et al*. 1999, Tiirola *et al*. 2002, Nagata *et al*. 2006), lo cual contribuye a reducir el flujo de genes desde *Sphingomonas* a otras bacterias. Probablemente esta es una de las razones de la acumulación de cepas de *Sphingomonas* degradadoras de xenobióticos y el bajo grado de homología de las secuencias de sus genes con los de otros géneros de bacterias (Stolz 2009).

La transferencia por conjugación de plásmidos de gran tamaño entre *Sphingomonas* sp., fue previamente evidenciada *in vitro* para el plásmido (pNL1) de *Sphingomonas aromaticivorans* (Romine *et al*. 1999). Tiirola *et al*. (2002), propusieron una diseminación por conjugación específica para genes pcpB (codifican para la pentaclorofenol-4-monooxigenasa) por medio de análisis de secuencias, donde demostraron un alto grado de identidad, mayor al 98.9 % de la secuencia de genes pcpB, aislados entre *Sphingomonas* sp., y una ausencia del gen en bacterias distintas a *Sphingomonas* sp., aisladas de la misma fuente y degradadoras de policlorofenol.

Adicionalmente, se ha estudiado en diferentes cepas de *Sphingomonas* sp., plásmidos involucrados en la degradación de naftalensulfonatos, naftaleno, bifenil y tolueno marcados con resistencia a kanamicina, que únicamente pudieron ser transmitidos dentro de la familia Sphingomonadaceae (Basta *et al*. 2004), lo cual hace evidente la limitación de la transferencia de material genético extra-cromosómico involucrado en el metabolismo de distintos compuestos xenobióticos hacia otros grupos de bacterias.

Por otra parte, los plásmidos de este grupo de bacterias presentan rearreglos genéticos masivos, como ha sido descrito para bacterias degradadoras de carbofuran (Ogram *et al*. 2000). Los principales rearreglos fueron observados en la transferencia por conjugación del plásmido pNL1 a *Sphingomonas* sp. HH69 y pBN6 a *Sphingomonas* sp., SS3, donde el plásmido recibido experimentó alteraciones significativas en el tamaño (Basta *et al*. 2004, Stolz 2009).

Algunos autores atribuyen estos cambios a numerosos elementos de inserción y transposones presentes en los plásmidos de las *Sphingomonas* sp., lo cual les permitiría tener mayor adaptabilidad a diferentes condiciones ambientales (Shintani *et al*. 2007, Sipilä *et al*. 2010). Sin embargo, aún falta profundizar en los análisis de secuencias y los genes codificados por los diferentes plásmidos presentes en *Sphingomonas* sp., dada su relevancia aplicativa en diferentes procesos agroindustriales y de biorremediación.

Topp *et al*. (1993), Parekh *et al*. (1995) y Desaint *et al*. (2000), caracterizaron 55 bacterias aisladas de suelos ingleses y franceses con diferentes historiales de tratamiento con N-metilcarbamatos. En estos aislamientos se encontraron 10 perfiles plasmídicos diferentes, con un tamaño entre 84 y aproximadamente 438 kb, de los cuales el 60 % de los plásmidos tuvieron perfiles plasmídicos similares (tipo VII ó IV), es decir, plásmidos con tamaños mayores a 330 kb y el 40 % restante de los aislamientos tuvieron perfiles de plásmidos I-IV que corresponden a plásmidos con tamaños de 100, 105, 115 y 124 kb.

Hayatsu *et al*. (1999) demostraron que *Arthrobacter* sp. cepa RC100, posee tres plásmidos distintos de los cuales dos, denominados pRC1 y pRC2, están implicados en la degradación del carbaril. El tamaño total de los plásmidos fue estimado con base en la movilidad electroforética de los fragmentos (obtenidos previamente por digestión con las enzimas *BamHI* y *PstI*), comparados con los patrones de digestión del fago lambda de tamaños conocidos. Se observó que la cepa RC100 contiene plásmidos de 110 kb (pRC1), 120 kb (pRC2) y 130 kb (pRC3), muy similares a los obtenidos por Parekh y colaboradores (1995).

Los resultados de estos experimentos por técnicas de curación con mitomicina C y ensayos de transconjugación, demostraron que el plásmido pRC1, codifica la proteína necesaria para hidrolizar carbaril, mientras que el plásmido pRC2, codifica la proteína que actúa en la vía metabólica del 1-naftol a ácido gentísico y el ADN cromosómico codifica las proteínas necesarias para la degradación restante del ácido gentísico. Los plásmidos involucrados en la degradación de carbaril actúan sincronizadamente para la degradación completa del compuesto, de tal manera que si faltara la función de un plásmido no se podría completar la degradación del plaguicida (Hayatsu *et al*. 1999).

Los plásmidos bacterianos, por tanto, son importantes en la naturaleza y en el laboratorio por su diversidad genética. Entre las funciones de los plásmidos están la degradación de agentes químicos recalcitrantes, producción de antibióticos, resistencia y factores de virulencia, que evidentemente tienen un impacto sobre la salud humana (Yeon y Chang 2011). Además, los plásmidos han sido evaluados como aproximaciones moleculares promisorias para ser usadas en biología sintética, medicina, ecología y evolución, como también en investigación básica en biología molecular y estructural (Azuma *et al*. 2009).

Por ejemplo, *Sphingobium chungbukense* DJ77, fue aislada a partir de sedimentos de agua fresca contaminada químicamente, con base en su habilidad para degradar hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) (Pinyakong *et al*. 2003) y su resistencia a la estreptomicina (Pal *et al*. 2005). Luego, esa cepa fue estudiada por su habilidad para degradar tolueno, benzoato, bifenil, antraceno y fenantreno (Basta *et al*. 2004, Yeon y Chang 2011). Actualmente, mediante ingeniería genética, se transformó una cepa de *Sphingomonas* sp. CDS-1, que degradaba carbofuran con el gen paration metil hidrolasa (*mpd*) que le confería a este microorganismo además, la capacidad de degradar simultáneamente paration metílico (PM). Se obtuvo un microorganismo útil para la biorremediación de plaguicidas (Jiandong *et al*. 2007).

Acerca de los genes que se han encontrado en los plásmidos y que están involucrados en el catabolismo de aromáticos, a partir de cepas cultivadas se han identificado y clonado alrededor de 300 genes, número que sigue incrementándose constantemente (Widada *et al*. 2002a, 2002b).

Derk *et al*. (2003) en *Achromobacter* sp. cepa WM111, identificaron y clonaron el gen (*mcd*), que codifica la enzima metilcarbamato hidrolasa encargada de degradar el plaguicida carbofuran. El gen *mcd* fue localizado en un plásmido (pPDL11) de 100 kb y se encontró que algunas bacterias que degradan carbofuran tienen secuencia homóloga con el gen *mcd* (Parekh *et al*. 1996, Dong *et al*. 2012).

Hashimoto *et al*. (2006) realizaron una comparación entre la proteína recombinante de 77 kDa de *Pseudomonas putida* y la proteína purificada carbofuran hidrolasa de *Achromobacter* cepa WM111 y observaron bandas idénticas, determinando que los genes clonados codificaban la enzima carbofuran hidrolasa responsable de la hidrólisis primaria del carbofuran.

Secuencias homólogas para el gen *mcd* fueron detectadas inicialmente en un plásmido llamado pER2a, de la cepa metilotrópica ER2, aislada de suelos canadienses, con grandes similitudes plasmídicas (Topp *et al*. 1993, McDonald *et al*. 2005). Sin embargo, se ha demostrado la existencia de secuencias homólogas para el gen *mcd* en otras bacterias degradadoras de

N-metilcarbamatos con profundas diferencias fenotípicas, genómicas y geográficas (Parekh *et al*. 1996).

Los estudios de Parekh *et al*. (1995) reportaron un método para la detección específica del gen *mcd,* en aislamientos bacterianos por la técnica de PCR (reacción en cadena de la polimerasa). El diseño y uso de oligonucleótidos específicos para la amplificación de un fragmento de 590 pb, en 24 aislamientos bacterianos, permitió la detección específica del gen *mcd* en bacterias, comprobando que esas secuencias iniciadoras son altamente específicas y que podrían ser apropiadas para la identificación del gen por PCR en aislamientos bacterianos y directamente del suelo (Parekh *et al.* 1996).

La detección de este gen usando oligonucleótidos específicos fue fuertemente correlacionada para su determinación por hibridación con el gen *mcd* utilizándolo como sonda (Parekh *et al*. 1995). El alto grado de homología de las secuencias entre los productos de la PCR, como se determinó por hibridación y por PCR-RFLP, demostró que el fragmento interno de 590 pb del gen *mcd,* está muy conservado entre bacterias del suelo que poseen profundas diferencias fenotípicas, genéticas y geográficas (Parekh *et al*. 1996).

Parekh *et al*. (1995) utilizaron el plásmido pPDL11 entero como sonda universal. Se obtuvo hibridación de perfiles de plásmidos de 57 bacterias degradadoras de N-metilcarbamatos con la sonda para el plásmido pPDL11, demostrando que existe una extensa homología entre éste y otros plásmidos de aproximadamente 100 kb de 24 aislamientos bacterianos de suelos geográficamente separados, fenotípica y genéticamente diferentes, todos con secuencias homólogas al gen *mcd* (Parekh *et al*. 1996). Los patrones de RFLP obtenidos usando como sonda el plásmido, demostraron que hay al menos cinco tipos polimórficos de este plásmido degradador y que plásmidos muy similares están presentes en bacterias con profundas diferencias cromosómicas y plasmídicas.

En el estudio de Desaint *et al*. (2003), los perfiles plasmídicos y los patrones de ADN total digeridos con *EcoRI*, fueron hibridados con un fragmento interno del gen *mcd*, resultando 22 aislamientos bacterianos de suelos distintos (40 %) con secuencias homólogas para la sonda de este gen. En 28 aislamientos el ADN cromosómico y plasmídico fue digerido y en cinco aislamientos no se detectó plásmido (60 %). Estos resultados indican que las secuencias homólogas para el gen *mcd*, están localizadas en un fragmento conservado de 12 y 14 kb, obtenido por la digestión con *EcoRI* de plásmidos con tamaños similares entre 100, 105, 115 y 124 kb, encontrados en bacterias con profundas diferencias fenotípicas, genéticas (plasmídicas y cromosómicas) y aisladas de zonas geográficamente distantes (Desaint *et al*. 2000).

Chapalamadugu y Chaudhry (1991) observaron que 13 aislamientos bacterianos capaces de hidrolizar N-metilcarbamatos (incluyendo al carbofuran) aislados de áreas geográficas diferentes, no presentaron secuencias homólogas para el gen *mcd,* y Hashimoto *et al*. (2006) purificaron y caracterizaron una enzima N-metilcarbamato hidrolasa de *Pseudomonas* sp. cepa CRL-OK, diferente a la aislada de *Achromobacter* sp. cepa WM111 y demostraron que el ADN de la *Pseudomonas sp*., no hibridó con el gen *mcd*.

En otro estudio se determinó que 58 de los 128 aislamientos con actividad degradadora de N-metilcarbamatos no tenían el gen *mcd,* no siendo clara la relación entre la presencia del gen y la posición filogenética de la cepa. Lo anterior sugiere que un número significativo de poblaciones del suelo que hidrolizan carbofuran, no pueden ser detectadas por el gen sonda *mcd*, indicando que existen otras secuencias genéticas que codifican para la función N-metilcarbamato hidrolasa. Esto puede deberse a que cada cepa aislada contiene plásmidos distintos que les permiten tomar vías diferentes de degradación (Desaint *et al*. 2000).

En el estudio de Dong *et al*. (2012), se aislaron 37 bacterias degradadoras de carbofuran de varios suelos agrícolas. Su diversidad y propiedades para la degradación de carbofuran fueron analizadas usando métodos filogenéticos, fenotípicos y genotípicos. Las secuencias obtenidas se investigaron utilizando oligonucleótidos para amplificar la región 16S ADNr y encontraron que los aislamientos se relacionaban con miembros de los géneros *Sphingomonas*, *Sphingobium*, *Rhodococcus*, *Bosea* y *Microbacterium*.

Los aislamientos que degradaban carbofuran fueron clasificados en cuatro grupos teniendo en cuenta sus características de degradación y crecimiento. Los aislamientos ES2, IJ1, NS2, SS1, TA5 y YJ1, clasificados en el grupo A, pertenecientes a los géneros *Sphingomonas* y *Sphingobium,* degradaron carbofuran rápidamente después de un periodo de adaptación inicial al estar expuestos al plaguicida. Los aislamientos JE1, SS3 y YJ2 clasificados en el grupo B, pertenecen al género *Sphingobium* y se caracterizan por degradar rápidamente carbofuran sin presentar periodo de adaptación inicial al estar expuestos al plaguicida.

Los grupos A y B de los aislamientos contienen diversos plásmidos que tienen muchos de los genes que codifican las proteínas necesarias para

degradar plaguicidas carbamatos. Mientras que los aislamientos del grupo C, que pertenecen al género *Rhodococcus*, degradan y crecen sobre carbofuran a una proporción moderada, pero ningún aislamiento tiene ADN plasmídico. Se evidenció que la eliminación de los plásmidos resultó en la pérdida total de las capacidades de degradación de los aislamientos para los plaguicidas carbamatos. Lo anterior proporciona evidencia de que los plásmidos contienen genes esenciales involucrados en la degradación de los carbamatos y que el mismo gen o genes similares, están comprometidos en las reacciones catabólicas. Por tanto, la hidrólisis del enlace éster o de las uniones éter de los plaguicidas carbamatos son cruciales para eliminar la toxicidad de estos compuestos, por lo que el gen carbamato hidrolasa recibe atención potencial por su uso en biodegradación (Dong *et al*. 2012).

CONCLUSIONES

Se ha comprobado que existe una gran diversidad de microorganismos degradadores de plaguicidas N-metilcarbamatos y sus vías de degradación oxidante y/o hidrolítica. Sin embargo, se considera necesario identificar algunos productos de degradación no conocidos y su impacto en el ambiente. Los análisis se han centrado en las enzimas carbamato hidrolasas, las cuales actúan en la hidrólisis primaria de carbofuran; sin embargo, existe un vacío sobre el aislamiento y caracterización del resto de las enzimas que intervienen en el proceso de degradación. Las diferencias encontradas entre las enzimas carbamato hidrolasas, aisladas de distintos microorganismos, han permitido identificar genes ubicados en diversos plásmidos, los cuales pueden ser transferidos entre especies diferentes o sólo entre la misma especie.

La importancia de identificar los genes que codifican para enzimas degradadoras de plaguicidas radica en la posibilidad de utilizarlos en procesos de ingeniería genética, específicamente en la transformación genética, que tendría como fin transferirle esta característica a otros microorganismos con características de interés agrícola y ambiental, como microorganismos degradadores de compuestos xenobióticos, solubilizadores de fosfato, fijadores de nitrógeno y controladores biológicos, entre otros.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Universidad de Boyacá por el apoyo otorgado y por el financiamiento del proyecto: Degradación de los plaguicidas N-metilcarbamatos carbofuran y carbaril por la cepa bacteriana 8-M3-13, en condiciones *in vitro*.

REFERENCIAS

Azuma Y., Hosoyama A., Matsutani M., Furuya N., Horikawa H., Harada T., Hirakawa H., Kuhara S., Matsushita K., Fujita N. y Shirai M. (2009). Whole-genome analyses reveal genetic instability of *Acetobacter pasteurianus*. Nucleic Acids Res. 37, 5768-5783.

Bano N. y Musarrat J. (2004). Characterization of a novel carbofuran degrading *Pseudomonas* sp. with collateral biocontrol and plant growth promoting potential. FEMS Microbiol. Lett. 231, 13-17.

Basta T., Keck A., Klein J. y Stolz A. (2004). Detection and characterization of conjugative degradative plasmids in xenobiotics degrading *Sphingomonas* strains. J. Bacteriol. 186, 3862– 3872.

Basta T., Bürger S. y Stolz A. (2005). Structural and replicative diversity of large plasmids from polycyclic aromatic compounds and xenobiotics degrading *Sphingomonas* strains. Microbiology 151, 2025-2037.

Behki R.M., Topp E.E. y Blackwell B.A. (1994). Ring hydroxylation of N-methylcarbamate insecticides by *Rhodococcus* TE1. J. Agric. Food Chem. 42, 1375-1378.

Bonner M.R., Lee W.J., Sandler D.P., Hoppin J.A., Dosemeci M. y Alavanja M.C.R. (2005). Occupational exposure to carbofuran and the Incidence of cancer in the agricultural health study. Environ. Health Perspect. 113, 285-289.

Bretaud S., Toutant J.P. y Saglio P. (2000). Effects of carbofuran, diuron and nicosulfuron on acetylcholinesterase activity in goldfish (*Carassius auratus*). Ecotoxicol. Environ. Saf. 47, 117-124.

Castillo A.E., Rojas J.M., Monteros S.R., Nardelli J.I. y Guasch G. (2003). Métodos para determinar carbofuran (2,3-Dihidro-2,2-dimetilbenzofuran-7-il metilcarbamato). Agrotecnia 10, 15-20.

Cérémonie H., Boubakri H., Mavingui P., Simonet P. y Vogel T.M. (2006). Plasmid- encoded y-hexachlorocyclohexane degradation genes and insertion sequences in *Sphingobium francense* (ex –*Sphingomonas paucimobilis* sp.). FEMS Microbiol. Lett. 257, 243-252.

Chapalamadugu S. y Chaudhry G.R. (1991). Hydrolysis of carbaryl by a *Pseudomonas* sp. and construction of a microbial consortium that completely metabolizes carbaryl. Appl. Environ. Microbiol. 57, 744-750.

Chapalmadugu S. y Chaudhry G.R. (1993). Isolation of a constitutively expressed enzyme for hydrolysis of carbaryl in *Pseudomonas aeruginosa.* J. Bacteriol. 175, 6711-6716.

Chaudhry G.R. y Ali A.N. (1988). Bacterial metabolism of carbofuran. Appl. Environ. Microbiol. 54, 1414-1419.

Chaudhry G.R., Mateen A., Kaskar B., Bloda M. y Riazuddin S. 2002. Purification and biochemical characterization of the carbamate hydrolase from *Pseudomonas* sp. 50432. Biotechnol. Appl. Biochem. 36, 63-70.

Chelinho S., Sautter K.D., Cachada A., Abrantes I., Brown G., Costa D.A. y Sousa J. P. (2011). Carbofuran effects in soil nematode communities: Using trait and taxonomic based approaches. Ecotoxicol. Environ. 74, 2002-2012.

Cho J.C. y Kim S.J. (2001). Detection of mega plasmid from polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading *Sphingomonas* sp. strain KS14. J. Mol. Microbiol. Biotechnol. 3, 503-506.

Derk R., Karns J. y Sexstone A. (2003). Detection of a methylcarbamate degradation gene in agricultural soils using PCR amplification of bacterial community DNA. Comm. Soil Sci. Plant Anal. 34, 393-406.

Desaint S., Hartmann A., Parekh N.R. y Fournier J.C. (2000). Genetic diversity of carbofuran-degrading soil bacteria. FEMS Microbiol. Ecol. 34, 173-180.

Desaint S., Arrault S., Siblot S. y Fournier J.C. (2003). Genetic transfer of the *mcd* gene in soil. J. Appl. Microbiol. 95, 102-108.

Doddamani H.P. y Ninnekar H. (2001). Biodegradation of carbaryl by a *Micrococcus* species. Curr. Microbiol. 43, 69-73.

Dong H.S., Kim D.U., Seong C.N., Seong C.N., Song H.G. y Ka J.O. (2012). Genetic and phenotypic diversity of carbofuran-degrading bacteria isolated from agricultural soils. J. Microbiol. Biotechnol. 22, 448-456.

Feng X., Ou L.T. y Ogram A. (1997). Plasmid-mediated mineralization of carbofuran by *Sphingomonas* sp. strain CF06. Appl. Environ. Microbiol. 63, 1332–1337.

Goad R.T., Goad J.T., Atieh B.H. y Gupta R.C. (2004). Carbofuran-induced endocrine disruption in adult male rats. Toxicol. Mech. Methods. 14, 233-239.

Grenni P., Barra C. y Bottoni P. (2012). Microcosm studies to evaluate microbial potential to degrade pollutants in soil and water ecosystems. Microchemical Journal. Water Research Institute, National Research Council, Monterotondo St., Rome, Italy. En prensa.

Hai F., Modin O., Yamamoto K., Fukushi K., Nakajima F. y Nghiem L.D. (2011). Pesticide removal by a mixed culture of bacteria and white-rot fungi. J. Taiwan Inst. Chem. E. 43, 459-462.

Hanumanthanaik P.D. y Harichandra Z.N. (2001). Biodegradation of carbaryl by a *Micrococcus* species. Curr. Microbiol. 43, 69-73.

Hashimoto M., Fukui M., Hayano K. y Hayatsu M. (2002). Nucleotide sequence and genetic structure of a novel carbaryl hydrolase gene (*cehA*) from *Rhizobium* sp. Strain AC100. Appl. Environ. Microbiol. 68, 1220-1227.

Hashimoto M., Mizutani A., Tago K., Kameyama M.O., Shimojo T. y Hayatsu M. (2006). Cloning and nucleotide sequence of carbaryl hydrolase gene (*cahA*) from *Arthrobacter* sp. RC100. J. Biosci. Bioeng. 101, 410-414.

Hayatsu M., Hirano M. y Nagata T. (1999). Involvement of two plasmids in the degradation of carbaryl by *Arthrobacter* sp. Strain RC100. Appl. Environ. Microbiol. 65, 1015-1019.

Hayatsu M. y Nagata T. (1993). Purification and characterization of carbaryl hydrolase from *Blastobacter* sp. Strain M501. Appl. Environ. Microbiol. 59, 2121-2125.

Jiandong J., Ruifu Z., Rong L., Dong G. y Shunpeng L. (2007). Simultaneous biodegradation of methyl parathion and carbofuran by a genetically engineered microorganism constructed by mini-Tn5 transposon. Biodegradation 18, 403-412.

Karns J.S. y Tomasek P.H. (1991). Carbofuran hydrolase-purification and properties. J. Agric. Food Chem. 39, 1004-1008.

Karpouzas D.G., Morgan J.A.W. y Walker A. (2000). Isolation and characterization of 23 carbofuran-degrading bacteria from soils from distant geographical areas. Lett. Appl. Microbiol. 31, 353-358.

Kim I.S., Ryu J.Y., Hur H.G., Gu M.B., Kim S. D. y Shim J.H. (2004). *Sphingomonas* sp. strain SB5 degrades carbofuran to a new metabolite by hydrolysis at the furanyl ring. J. Agric. Food Chem. 52, 2309-2314.

Kohler H.P.E. (1999). *Sphingomonas herbicidovorans* MH: a versatile phenoxyalkanoic acid herbicide degrader. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 23, 336-340.

Mateen A., Chaudhry G.R., Kaskar B., Sardessai M., Bloda M., Bhatti A.R. y Walia, S.K. (2002). Induction of carbofuran oxidation to 4-hydroxycarbofuran by *Pseudomonas* sp. 50432. FEMS Microbiol. Lett. 214, 171-6.

McDonald I., Kämpfer P., Topp E., Warner K.L., Cox M.J., Connell T.L., Miller L.G., Larkin M.J., Ducrocq V., Coulter C., Harper D.B., Colin M.J. y Oremland R.S. (2005). *Aminobacter ciceronei* sp. nov. and *Aminobacter lissarensis* sp. nov., isolated from various terrestrial environments. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 55, 1827-1832.

Megharaj M., Ramakrishnan B., Venkateswarlu K., Sethunathan N. y Naidu R. (2011). Bioremediation approaches for organic pollutants: A critical perspective. Environ. Int. 37, 1362-1375.

Mulbry W.W. y Eaton R.W. (1991). Purification and characterization of the N-methylcarbamate hydrolase from *Pseudomonas* strain CRL-OK. Appl. Environ. Microbiol. 57, 3679-3682.

Nagata Y., Kamakura M., Endo R., Miyazaki R., Ohtsubo Y. y Tsuda M. (2006). Distribution of γ-hexachlorocyclohexane-degrading genes on three replicons in *Sphingobium japonicum* UT26. FEMS Microbiol. Lett. 256, 112-118.

Naqvi T., Cheesman M.J., Williams M.R., Campbell P.M., Ahmed S., Russell R.J., Scott C. y Oakeshott J.G. (2009). Heterologous expression of the methyl carbamate degrading hydrolase *mcd*. J. Biotechnol. 144, 89-95.

Nogueira J.M.F., Sandra T. y Sandra P. (2003). Considerations on ultra trace analysis of carbamates in water samples. J. Chromatogr. 996, 133-140.

Ogram A.V., Duan Y.P., Trabue S.L., Feng X., Castro H. y Ou L.T. (2000). Carbofuran degradation mediated by three related plasmid systems. FEMS Microbiol. Ecol. 32, 197-203.

Pal R., Bala S., Dadhwal M., Kumar M., Dhingra G., Prakash O., Prabagaran S.R., Shivaji S., Cullum J., Holliger Ch. y Lal R. (2005). Hexachlorocyclohexane-degrading bacterial strains *Sphingomonas paucimobilis* B90A, UT26 and Sp+, having similar *lin* genes, represent three distinct species, *Sphingobium indicum* sp. nov., *Sphingobium japonicum* sp. nov. and *Sphingobium francense* sp. nov. and reclassification of (*Sphingomonas) chungbukensis* as *Sphingobium chungbukense* comb. nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 55, 1965-1972.

Parekh N.R., Suett D.L., Roberts S.J., McKeon T., Shaw E.D. y Jukes A.A. (1994). Carbofuran degrading bacteria from previously treated field soils. J. Appl. Bacteriol. 76, 559-567.

Parekh N.R., Hartmann A., Charnay M.P. y Fournier J.C. (1995). Diversity of carbofuran-degrading soil bacteria and detection of plasmid-encoded sequences homologous to the *mcd* gene. FEMS Microbiol. Ecol. 17, 149-160.

Parekh N.R., Hartmann A. y Fournier J.C. (1996). PCR detection of the *mcd* gene and evidence of sequence homology between the degradative genes and plasmids from diverse carbofuran-degrading bacteria. Soil Biol. Biochem. 28, 1797-1804.

Park M.R., Sunwoo L., Tae-ho H., Byung O., Jae H.S. y In S.K. (2006). A new intermediate in the degradation of carbofuran by *Sphingomonas* sp. strain SB5. J. Microbiol. Biotech. 16, 1306-1310.

Pinyakong O., Habe H. y Omori T. (2003). The unique aromatic catabolic genes in *Sphingomonads* degrading polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). J. Gen. Appl. Microbiol. 49, 1-19.

Plangklang P. y Reungsang A. (2011). Bioaugmentation of carbofuran residues in soil by *Burkholderia cepacia* PCL3: A small-scale field study. Int. Biodeter. Biodegr. 65, 902-905.

Plangklang P. y Reungsang A. (2012). Isolation and characterisation of a carbofuran degrading *Burkholderia* sp. PCL3 from carbofuran-phytoremediated rhizosphere soil. Chem. Ecol. 28, 253-266.

Pohlenz H.D., Boidol W., Schuttke I. y Streber W.R. (1992). Purification and properties of an *Arthrobacter oxydans* P52 carbamate hydrolase specific for the herbicide phenmedipham and nucleotide sequence of the corresponding gene. J. Bacteriol. 174, 6600-6607.

Qing Z. y Yang L. (2003). Purification and characterization of a novel carbaryl hydrolase from *Aspergillus niger* PY168, FEMS Microbiol. Ecol. 228, 39-44.

Romine M.F., Stillwell L.C., Wong K.K., Thurston S.J., Sisk E.C., Sensen C., Gaasterland T., Fredrickson J.K. y Saffer J.D. (1999). Complete sequence of a 184-kilobase catabolic plasmid from *Sphingomonas aromaticivorans* F199. J. Bacteriol. 181, 1585-1602

Seo J., Jeon J., Kim S.D., Kang S., Han J. y Hur H.G. (2007). Fungal biodegradation of carbofuran and carbofuran phenol by the fungus *Mucor ramannianus*: identification of metabolites. Water Sci. Technol. 55, 163-167.

Shintani M., Urata M., Inoue K., Eto K., Habe H., Omori T., Yamane H. y Nojiri H. (2007). The *Sphingomonas* plasmid pCAR3 is involved in complete mineralization of Carbazole. J. Bacteriol. 189, 2007-2020.

Shuttleworth K.L., Sung J., Kim E. y Cerniglia C.E. (2000). Physiological and genetic comparison of two aromatic hydrocarbon-degrading *Sphingomonas* strains. Mol. Cell. 10, 199-205.

Sipilä T.P., Väisänen P., Paulin L. y Yrjälä K. (2010). *Sphingobium* sp. HV3 degrades both herbicides and polyaromatic hydrocarbons using *ortho* – and *meta*-pathways with differential expression shown by RT-PCR. Biodegradation 21, 771-784.

Slaoui M., Ouhssine M., M'rabet M.E.L., Massoui M.E.T. y Elyachioui M.E. (2001). Degradation du carbofuran par une bacterie du genre *Pseudomonas* sp. isolee a partir du sol. Sci. Lett. 3, 3-6.

Slaoui M., Ouhssine M., Berny E. y Elyachioui M. (2007). Biodegradation of the carbofuran by a fungus isolated from treated soil. Afr. J. Biotech. 6, 419-423.

Sogorb M y Vilanova E. (2002). Enzymes involved in the detoxification of organophosphorus, carbamate and pyrethroid insecticides through hydrolysis. Toxicol. Lett. 128, 215-228.

Stolz A. (2009). Molecular characteristics of xenobiotic degrading sphingomonads. Appl. Microbiol. Biotechnol. 81, 793-811.

Tani A., Charoenpanich J., Mori T., Takeichi M., Kimbara K. y Kawai F. (2007). Structure and conservation of a polyethylene glycol- degradative operon in Sphingomonads. Microbiology 153, 338-346.

Tiirola M.A., Wang H., Paulin L. y Kulomaa M.S. (2002). Evidence for natural horizontal transfer of the *pcpB* gene in the evolution of pentachlorophenol - degrading sphingomonads. Appl. Environ. Microbiol. 68, 4495-4501.

Topp E., Hanson R.S., Ringelberg D.B. White D.C. y Wheatcroft R. (1993). Isolation and characterization of an N-methylcarbamate insecticide-degrading methylotrophic bacterium. Appl. Environ. Microbiol. 59, 3339-3349.

Trabue S.L., Ogram, A. y Ou L.-T. (2001). Dynamics of carbofuran degrading microbial communities in soil during three successive annual applications of carbofuran. Soil Biol. Biochem. 33, 75-81.

Widada J., Nojiri H., Kasuga K., Yoshida T., Habe H. y Omori t. (2002a). Molecular detection and diversity of polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria isolated from geographically diverse sites. Appl. Microbiol. Biotechnol. 58, 202-209.

Widada J., Nojiri H. y Omori T. (2002b). Recent developments in molecular techniques for identification and monitoring of xenobiotic-degrading bacteria and their catabolic genes in bioremediation. Appl. Microbiol. Biotechnol. 60, 45-59.

Wu J., Hong Q., Chen Y.N. y Li S.P. (2006). Analysis of the degrading products of carbofuran by *Sphingomonas* sp. with GC/MS and GC/FTIR. Spectrosc Spect. Anal. 26, 1716-1719.

Xu J.L., Wu J., Wang Z.C., Wang K., Li M.Y., Jiang J.D., He J. y Li S.P. (2009). Isolation and characterization of a methomyl-degrading *Paracoccus* sp. mdw-1. Pedosphere 19, 238–243.

Xu J., Hong Q., Hong Y. y Li S. (2011). Isolation, identification and degradation of carbofuran-degrading Strain CFDS-1. Chinese J. Appl. Environ. Biol. 17, 237-242.

Yan Q., Hong Q., Han P., Dong X., Shen Y. y Li S. (2007). Isolation and characterization of a carbofuran degrading strain *Novosphingobium* sp. FEMS Microbiol. Lett. 271, 207-213.

Yang L., Chen S.H., Hu M.Y., Hao W.N., Geng P. y Zhang Y.B. (2011). Biodegradation of carbofuran by *Pichia anomala* strain HQ-C-01 and its application for bioremediation of contaminated soils. Biol. Fert. Soils. 47, 917-923.

Yeon S.M. y Chang Y.K. (2011). Complete sequence and organization of the *Sphingobium chungbukense* DJ77 pSY2 Plasmid. J. Microbiol. 49, 684-688.