



7^{mo}
Congreso de
Medio Ambiente

Actas 7mo Congreso de Medio Ambiente AUGM
22 al 24 de mayo de 2012. UNLP. La Plata Argentina

**DETERMINACIÓN DE ATRAZINA E INTERMEDIARIOS DE
BIODEGRADACIÓN EN UN MEDIO DE CULTIVO LÍQUIDO
PARA EL ENRIQUECIMIENTO DE CONSORCIOS
MICROBIANOS.**

**Determination of atrazine and intermediates of biodegradation in a liquid culture
medium for the enrichment of the microbial consortia.**

Jonathan Da Cunha ^{a*}, Inés M Bellini ^a, Laura Pinelli ^a, Ana Fernández-Scavino ^a,
Danilo Davyt ^b.

*Autor para correspondencia: + 00598 2924.42 09. jdacunha@fq.edu.uy

^{a)} Laboratorio Ecología Microbiana y Microbiología Ambiental, Departamento de
Biociencias, Facultad de Química, Universidad de la República, Gral. Flores 2124,
Montevideo, Uruguay

^{b)} Laboratorio de Química Farmacéutica, Departamento de Química Orgánica,
Facultad de Química, Universidad de la República, Gral. Flores 2124, Montevideo,
Uruguay.

Palabras claves: atrazina, metabolitos, biorremediación, HPLC, agua potable

Keywords: atrazine, metabolites, bioremediation, HPLC, drinking water

Titulo abreviado: Determinación de atrazina y metabolitos intermediarios

ABSTRACT

Atrazine, 1-chloro-3-ethylamino-5-isopropylamino-2,4,6-triazine, is an herbicide used to control annual weeds and perennial grasses. Although this herbicide is banned in the European Union for its toxicity, it is still widely used. Also, it is the second most frequently employed in Uruguay.

The main mechanism for removal of atrazine in neutral pH environments is the bacterial degradation. The microorganisms can mineralize atrazine giving ammonia and carbon dioxide or they can degrade it to intermediates which vary in persistence and toxicity. The separation and detection of atrazine intermediates is important to know the health risk that represents its partial degradation in the environment. Furthermore, the separation method could be useful to characterize bacterial degraders with potential application in biorremediation. Among the atrazine biodegradation intermediates are the hydroxyatrazine, the desethylhydroxyatrazine, the desisopropylhydroxyatrazine and cyanuric acid.

In this paper we developed a method to separate atrazine and metabolites in a synthetic culture medium used to select atrazine degrading bacteria. For this technique we optimized a high performance liquid chromatography (HPLC) ion pair method using an C8 column, mobile phase acetonitrile / water, gradient flow and an UV detector. We evaluated its application to detect intermediates in several bacterial enrichments. It was found that the method is suitable to distinguish different metabolic capabilities of these enrichment.

RESUMEN

La atrazina, 1-cloro-3-etilamino-5-isopropilamino-2,4,6-triazina, es un herbicida que se utiliza para el control de malezas anuales y gramíneas perennes. Aunque este herbicida se encuentra prohibido en la Unión Europea por su toxicidad y la de sus metabolitos, sigue siendo muy usado y en Uruguay ocupa el segundo lugar de importancia.

El principal mecanismo de eliminación de la atrazina en ambientes con pH neutro es la degradación bacteriana. Los microorganismos pueden mineralizar la atrazina dando amonio y anhídrido carbónico o degradarla produciendo intermediarios de variada persistencia y toxicidad. La separación y detección de estos intermediarios es relevante para conocer el riesgo sanitario que representa su degradación parcial en el ambiente y para encontrar y caracterizar bacterias o consorcios degradadores con potencial

aplicación en biorremediación. Entre los intermediarios de la biodegradación de atrazina se encuentran la hidroxiatrazina, la desetilhidroxiatrazina, la desisopropilhidroxiatrazina y el ácido cianúrico.

En el presente trabajo se desarrolló un método para separar atrazina de sus metabolitos en un medio de cultivo sintético empleado para seleccionar bacterias degradadoras de atrazina. Para esto se optimizó una técnica de cromatografía líquida de alta performance (HPLC) de par iónico utilizando una columna C8, fase móvil acetonitrilo/agua, con un gradiente de flujo y detector UV. Se evaluó su aplicación para detectar intermediarios en varios enriquecimientos bacterianos degradadores de atrazina. Se pudo comprobar que el método resulta adecuado para distinguir capacidades metabólicas de enriquecimientos diferentes.

INTRODUCCIÓN

La atrazina, 1-cloro-3-etilamino-5-isopropilamino-2,4,6-triazina, es un herbicida que se utiliza para el control de malezas anuales y gramíneas perennes. Actúa inhibiendo la fotosíntesis y otros procesos enzimáticos. Es uno de los herbicidas más usados a nivel mundial. Sin embargo se encuentra prohibido en la Unión Europea desde el año 2006.

En Uruguay es el segundo herbicida más importado en los últimos años luego del glifosato. Se lo utiliza en cultivos de soja, mezclado con glifosato, para controlar el trébol blanco y otras “malezas” que han desarrollado resistencia a este último, fenómeno incipiente en nuestro país pero bastante más desarrollado en la Argentina. La atrazina ocasiona trastornos del sistema endócrino (Salaberria *et al.* 2009; Freeman *et al.* 2005; Victor-Costa *et al.* 2010; Friedmann 2002; Song *et al.* 2009) y también puede afectar los sistemas nervioso y reproductor (Cooper *et al.* 2000; Narotsky *et al.* 2001;

Rodriguez *et al.* 2005). Se han encontrado efectos definidos para las células humanas con exposiciones a concentraciones tan bajas como 2 µg/L.

El principal mecanismo de eliminación de la atrazina de ambientes con pH neutro es la degradación bacteriana, hasta ahora el mejor descrito (Ostrofsky *et al.*, 2002). La atrazina puede biodegradarse en diversos metabolitos, cada cual de variada persistencia y toxicidad. Alguno de los intermediarios de la degradación microbiana son la hidroxiatrazina, la desetilhidroxiatrazina, la desisopropilhidroxiatrazina y el ácido cianúrico (Smith *et al.*, 2005, Vargha *et al.*, 2005)

La cromatografía líquida de alta performance (HPLC) ha sido la metodología más utilizada para la separación y determinación de la atrazina y sus metabolitos intermedios a la degradación microbiana en medios de cultivo especialmente diseñados para realizar ensayos en microcosmos (Mandelbaum *et al.*, 1993; Radosevich *et al.*, 1995; Lin *et al.*, 2008), así como también en matrices ambientales como ser agua y suelo (Vermulen *et al.*, 1982; Karlaganis *et al.*, 1991; Steinheimer, 1993; Briceño, 2009). En el *Handbook of Environmental Analysis* (Patnaik, 1997) y *The Triazine Herbicide* (LeBaron, McFarland and Burnside, 2008) se describe, además de la metodología HPLC, la cromatografía gaseosa (GC) y GC/MS como alternativas usadas para la separación y determinación de atrazina y sus metabolitos. Aunque estas presentan buena sensibilidad para la separación, presentan la desventaja de que dichos compuestos tienen que ser derivatizados para lograr la determinación, por lo que la cromatografía líquida ha sido la más utilizada (dado que no requiere derivatización). En la metodología de HPLC se han estudiado diferentes condiciones de trabajo, tales como cromatografía en fase ligada con

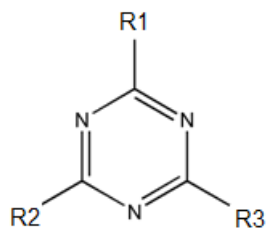
columnas amino (Dufek *et al.*, 1980) o ciano (Smolkova & Pacakova, 1978), así como también en fase reversa con columna C8 (Vermulen *et al.*, 1982; Mandelbaum *et al.*, 1993) o C18, siendo esta última la más utilizada. Aunque la mayoría de los reportes estudian la determinación y separación de atrazina, no todos plantean su trabajo para determinar los metabolitos más críticos de la vía de degradación, como los productos desalquilados y el ácido cianúrico.

Beilstein *et al.* (1981) han estudiado, por HPLC en fase reversa con columna C18, la separación de 17 triazinas entre ellas la atrazina y los metabolitos, incluyendo al ác. Cianúrico. Si bien, estos pudieron determinar la totalidad de los compuestos, la separación no fue buena. Desde este último trabajo hasta la fecha no se han reportado otros estudios en la separación de todos los metabolitos juntos a la atrazina, dado la complejidad que esto conlleva. El ácido cianúrico es un compuesto hidrofílico y con un carácter muy polar, por lo que, en los sistemas adecuados para separar los demás metabolitos en fase reversa, eluye en el frente de la corrida. Otros estudios hacen énfasis en la determinación del ácido cianúrico en aguas de piscina (Downes *et al.*, 1982; Hou & Ding, 2011), en leche en polvo (Hou & Ding, 2011), ambos por HPLC en fase reversa con columna C18 y en medio de cultivo microbiano por HPLC en columna de fase ligada con aminas (Jessee *et al.*, 1981). Según estudió Jessee *et al.*, 1981, a pH alto (próximo al neutro) el ácido cianúrico se encuentra en su forma enol, por lo que en solución con un compuesto iónico de carga positiva, es probable la formación de un par iónico entre ambos. Debido a esto Hou & Ding (2011) plantearon la determinación del ácido cianúrico a través de la realización de una cromatografía de par iónico con el agregado de bromuro de tetrabutilamonio (TBAB) a la fase móvil como reactivo de par iónico, utilizando condiciones de fase reversa con una columna C18. Los autores

lograron así la determinación del ácido cianúrico, con un límite de detección de 0.3 ppm, y una buena separación del frente de la corrida. De aquí, utilizando y extendiendo esta metodología, se plantea el objetivo de nuestro trabajo que es la determinación y separación de atrazina, hidroxiatrazina, desetilhidroxiatrazina, desisopropilhidroxiatrazina y ácido cianúrico, mediante la cromatografía de par iónico en un medio de cultivo microbiano.

MATERIALES Y METODOS

Los estándares sólidos, calidad HPLC, de atrazina, hidroxiatrazina, desetilhidroxiatrazina, desisopropilhidroxiatrazina y ácido cianúrico (en la Figura 1 se puede ver las abreviaturas y las estructuras de estos compuestos) fueron adquiridos de Sigma-Aldrich. A partir de éstos se prepararon soluciones estándar de 100 ppm. La solución estándar de ácido cianúrico fue preparada con agua, la de atrazina con metanol y el resto con acetonitrilo. Tanto el metanol como el acetonitrilo utilizados para la preparación de las soluciones estándar y para la preparación de la fase móvil, fueron de calidad HPLC, con alto grado de pureza y se adquirieron de J.T. Baker. El agua utilizada, tanto para la metodología HPLC como para la preparación de las soluciones estándar, fue destilada y posteriormente tratada para obtener agua de calidad milli-Q. El hidróxido de tetrabutilamonio (TBAOH) utilizado como reactivo de par iónico, marca Sigma Aldrich, se presentaba en solución 12,5% en metanol. Las matrices estudiadas, fueron agua calidad milli-Q y medio de cultivo bacteriano MDA, cuya composición es: K_2HPO_4 18 mM, KH_2PO_4 6 mM (pH 7.2), trazas minerales 5 mg.L^{-1} , acetato de sodio 0.7 mM, ácido succínico 0.7 mM y citrato de sodio 0.7 mM, solución de vitaminas 0.9X (Touzel & Albagnac, 1983), $CaCl_2$ 0.5 mM, $MgSO_4$ 1 mM.



Compuesto	Abreviatura	R1	R2	R3
Atrazina	AT	cloro	etilamino	isopropilamino
Hidroxiatrazina	HA	hidroxilo	etilamino	isopropilamino
Desetilhidroxiatrazina	DEHA	hidroxilo	amino	isopropilamino
Desisopropilhidroxiatrazina	DIHA	hidroxilo	etilamino	amino
Ácido Cianúrico	AC	hidroxilo	hidroxilo	hidroxilo

Figura 1. Nombres, abreviaturas y estructuras de la atrazina, hidroxiatrazina, 2 desalquilhidroxiatrazinas y el ácido cianúrico.

Figure 1. Names, abbreviates and structure of the atrazine, hydroxyatrazine, 2 desalquilhydroxyatrazine and the cyanuric acid.

La solución acuosa analizada contenía atrazina y sus metabolitos en una concentración final de 2 ppm. Para el análisis de control en medio de cultivo este se adicionó de atrazina comercial (concentración final de 11 ppm), metabolitos (concentración final de 2 ppm) y nitrato en forma de KNO_3 (concentración final de 22 ppm).

Para el estudio de la presencia de los metabolitos intermediarios a la degradación microbiana en MDA, se prepararon enriquecimientos y subcultivos con inóculos de bacterias nativas de aguas de ríos de la cuenca lechera del Uruguay. Para ello se llevó a cabo un muestreo de agua de ríos provenientes de las ciudades de Aguas Corrientes (departamento de canelones) y Dolores (departamento de soriano). Al cabo de la

incubación durante cierto tiempo se determinó degradación parcial de atrazina por HPLC (Pinelli *et al.*, 2012), se centrifugo y se analizó el sobrenadante con la metodología presentada en este trabajo.

La determinación y separación de atrazina y sus metabolitos en ambas matrices, se realizó con un HPLC marca Shimadzu, con bomba LC-10AD operada en modo isocrático, volumen de inyección de 20 μL y un detector UV SPD-10 con lámpara de deuterio a la longitud de onda de 220 nm. Las condiciones cromatográficas seleccionadas fueron: una columna C8 Lichrospher select B marca Lichrocart de 250x4.0 mm, tamaño de poro de 60 Å y tamaño de partícula de 5 μm , fase móvil de acetonitrilo/TBAOH 3mM en buffer fosfato 0.01M pH 7 y con el gradiente de flujo (F) programado que sigue: de 0 a 8 minutos, $F = 0.5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$; de 8 a 10 minutos aumento progresivo hasta $F = 1.5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$; de 10 a 18 minutos se mantuvo este flujo; de 18 a 20 minutos aumento progresivo hasta $F = 2.0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$; de 20 a 40 minutos se mantuvo este flujo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Separación de Desetilhidroxiatrazina y Desisoprilhidroxiatrazina

El grado de similitud de las estructuras de los compuestos desalquilados fue el primer problema en abordar en este trabajo. Dado que la separación cromatográfica en fase reversa se basa en las diferencias de hidrofobicidad que presentan los compuestos a separar, y como los compuestos se diferencian en un grupo metilo, los tiempos de

retención son muy similares, dificultando así su separación. Se planteó variar el tipo y la concentración de fase móvil, trabajando con metanol y acetonitrilo (en adelante ACN). Por razones prácticas se buscó optimizar un sistema isocrático. Se probó con dos concentraciones diferentes para cada fase orgánica: 40 % y 60 % para metanol; 17% y 20% para ACN. Aunque las separaciones con cualquiera de las condiciones mencionadas fueron buenas, se seleccionó la concentración de 17 % de ACN ya que separó mejor los compuestos desalquilados. Se ensayaron dos flujos, 1 mL.min⁻¹ y 0.5 mL.min⁻¹, encontrándose que este último mejoraba mucho la separación de estos 2 compuestos tan similares. En la Tabla 1 se muestran los tiempos de retención de la atrazina y sus metabolitos trabajando con la solución acuosa, con una fase móvil de ACN/buffer fosfato 0.01M pH 7 (20:80) y a un a un flujo de 0.5 mL.min⁻¹. En ésta se puede ver que el tiempo al cual salía la atrazina (70 minutos) hacía un tiempo de análisis muy largo y además distaba mucho de los metabolitos. La disminución de la concentración de ACN por debajo de 20%, mejoraría la separación de los compuestos desalquilados, pero aumentaría aún más el tiempo de retención de la AT, debido a la falta de fuerza del solvente para hacerla eluir de la columna.

Con estas condiciones se obtuvieron similares tiempos de retención entre AT y HA, que los obtenidos por Vermulen *et al.*, 1982, quienes utilizaron condiciones cromatograficas diferentes.

Tabla 1. Tiempos de retención (tr) de metabolitos de atrazina en fase reversa (sin TBAOH).

Table 1. Retention time (tr) of the atrazine`s metabolites in reverse phase (without TBAOH)

Compuesto*	tr ** (min)
AT	70
HA	16.8
DEHA	6.2
DIHA	6.0
AC	3.8

* Solución acuosa con 2 ppm de todos los compuestos en base agua milli-Q

** Flujo de 0.5 mL.min⁻¹, ACN/buffer fosfato 0.01M pH7 (20:80)

Para la disminución del tiempo de análisis se procedió a trabajar con un gradiente de flujo de manera de mantener la separación en los metabolitos y reducir el tiempo de análisis. En la Tabla 2 se muestra el gradiente de flujo, trabajando con la solución acuosa y con la fase móvil ACN/buffer fosfato 0.01M pH 7 (17:83).

Tabla 2. Gradiente de flujo seleccionado para trabajar con la fase móvil: ACN/buffer fosfato 0.01M pH7 (17:83) sobre la solución acuosa.

Table 2. Select gradient flow to work with mobile phase: ACN/buffer phosphate 0.01 M pH7 (17:83) about aqueous solution.

Tiempo (min)	Flujo (mL.min ⁻¹)
0 a 8	0.5
8 a 10	0.5 a 1.5
10 a 18	1.5
18 a 20	1.5 a 2.0
20 a 40	2.0

En la Figura 2 se muestra el cromatograma con las condiciones seleccionadas. Se destaca que el tiempo de análisis obtenido para la atrazina se redujo de 70 minutos ($0.5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$) a 37.6 minutos con el gradiente de flujo.

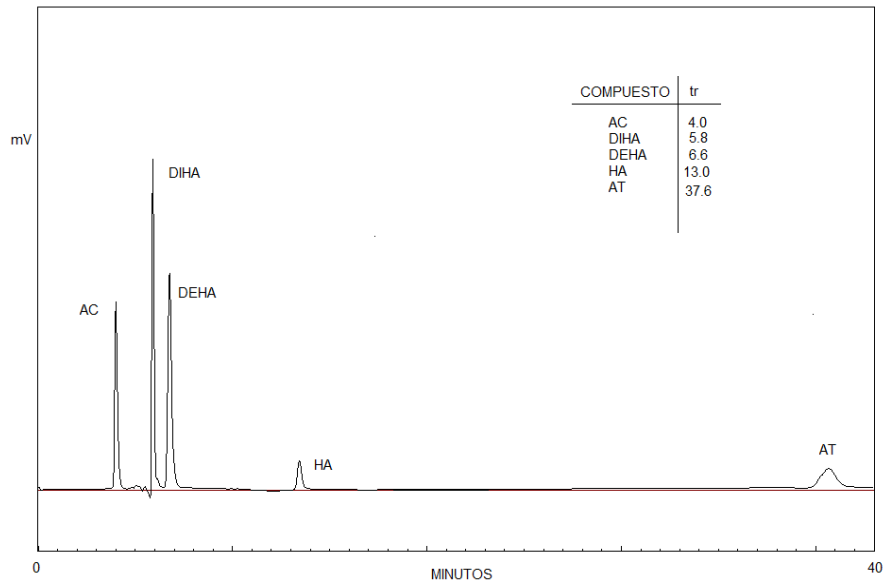


Figura 2. Cromatograma resultado de la aplicación del gradiente de flujo óptimo, trabajando con la condición cromatográfica de fase móvil: ACN/buffer fosfato 0.01M pH7 (17:83) sobre la solución acuosa.

Figure 2. Chromatogram result of applying the flux gradient optimum working condition with the chromatographic mobile phase: ACN / 0.01M phosphate buffer pH7 (17:83) over the aqueous solution.

Optimización de la separación de AC por agente de par iónico

Para evitar la elución del AC con el frente de la corrida, se ensayó una cromatografía de par iónico modificada de Hou & Ding (2011). Se utilizó hidróxido de tetrabutilamonio (TBAOH) como reactivo de par iónico en concentración de 3mM en la fase móvil ACN/buffer fosfato 0.01M pH 7 (17:83).

En la Figura 3 se muestra el cromatograma obtenido del análisis de la solución acuosa con estas condiciones. Se pudo observar que con estas condiciones el AC tiene un tiempo de retención de 4.8 minutos, mientras que sin el TBAOH eluye a los 4.0 minutos. En esta Figura también se puede ver que el TBAOH no tuvo efecto apreciable sobre el resto de los compuestos, por lo que estos no estarían ionizados a este pH. Con estas condiciones se obtuvieron similares tiempos de retención para el AC, que los obtenidos por Hou & Ding (2011), quienes utilizaron condiciones cromatograficas relativamente similares.

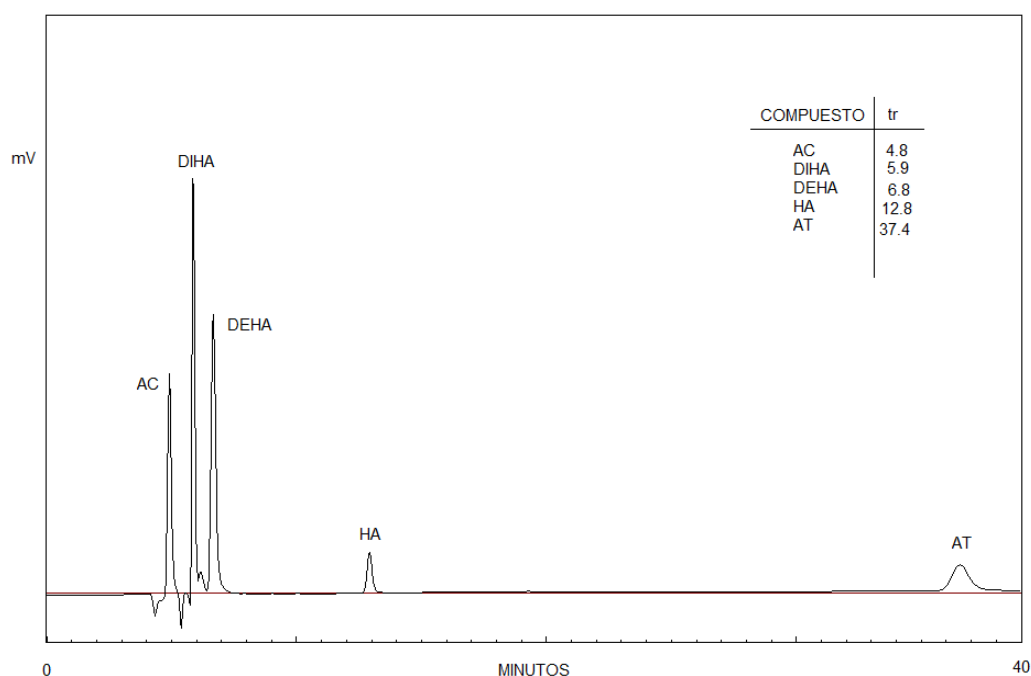


Figura 3. Cromatograma resultado del análisis de la solución acuosa, con fase móvil ACN/buffer fosfato 0.01M pH 7 TBAOH 3mM (17:83).

Figure 3. Chromatogram result of analysis of the aqueous solution with mobile phase ACN/buffer fosfato 0.01M pH 7 TBAOH 3mM (17:83).

En la Figura 4 se comparan los cromatogramas de AC en solución acuosa y en MDA. Con este análisis se buscó ver el efecto matriz que el MDA podría tener sobre el AC. El

MDA contiene ácidos que pueden formar par iónico con el TBAOH y que podrían interferir con el AC. En la figura se puede apreciar que el pico del AC en MDA presenta un ensanchamiento en la base, que se podría deber a la interferencia de alguno de los ácidos presentes en el MDA. El aumento relativo del área en MDA respecto a la fase acuosa es del orden del 10%.

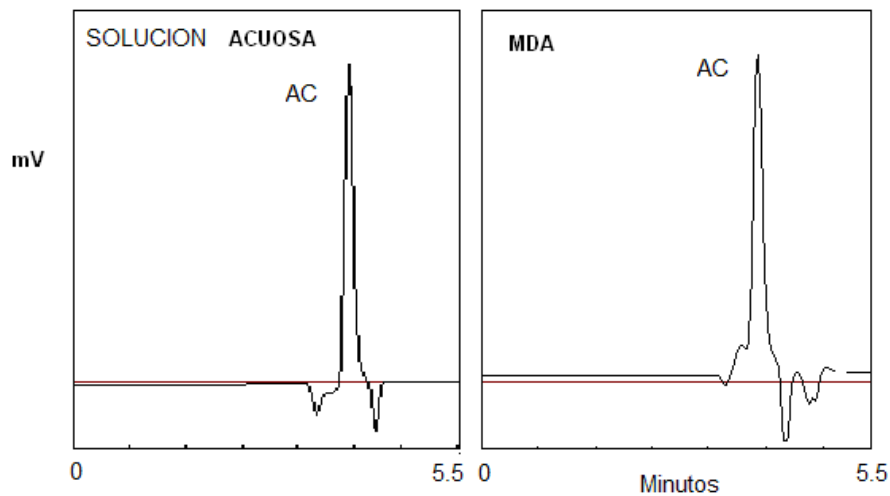


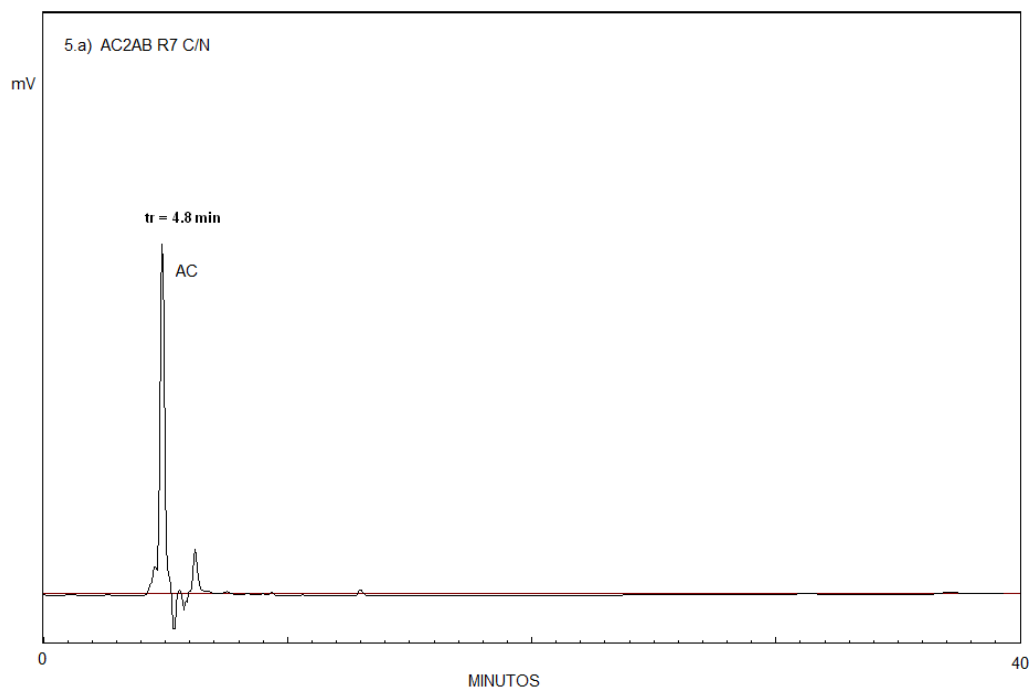
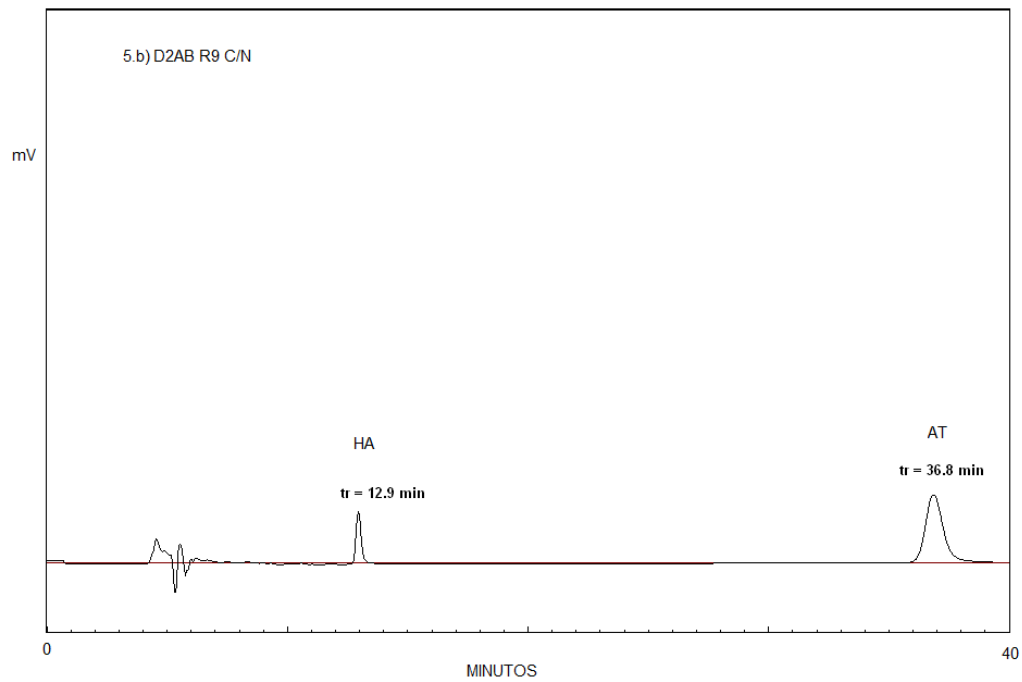
Figura 4. Efecto matriz en la elución del AC con fase móvil ACN/buffer fosfato 0.01M pH 7 TBAOH 3mM (17:83).

Figure 4. Matrix effect on elution of AC with mobile phase ACN/buffer 0.01M pH 7 TBAOH 3mM (17:83).

Aplicación del método en la caracterización de enriquecimientos degradadores de atrazina

Por último, se realizó una caracterización metabólica de enriquecimientos degradadores de AT en MDA. En la Figura 5 se muestran los análisis de los metabolitos acumulados luego de la incubación en 4 enriquecimientos diferentes. La diferencias son el origen

del inóculo (Aguas Corrientes o Dolores), las condiciones de incubación (temperatura y presencia o no de nitrato) y el número de subcultivo. En la figura 5.a) proveniente de Aguas Corrientes se puede ver que se acumula AC en el medio y se degrada la AT completamente. En las restantes Figuras el inóculo original proviene de Dolores y los enriquecimientos de la Figura 5.b) y 5.c) se incubaron en idénticas condiciones. Se observa que con el tiempo se pierde la actividad metabólica que transforma la AT en HA, ya que el enriquecimiento que se observa en la Figura 5. c) muestra menor degradación de AT y menor acumulación de HA. En la figura 5.d) sin nitrato e incubado a 20°C, se puede observar la degradación completa de la AT y la acumulación de AC. Estos resultados indican que el método seleccionado permite distinguir los metabolitos acumulados por diferentes enriquecimientos.



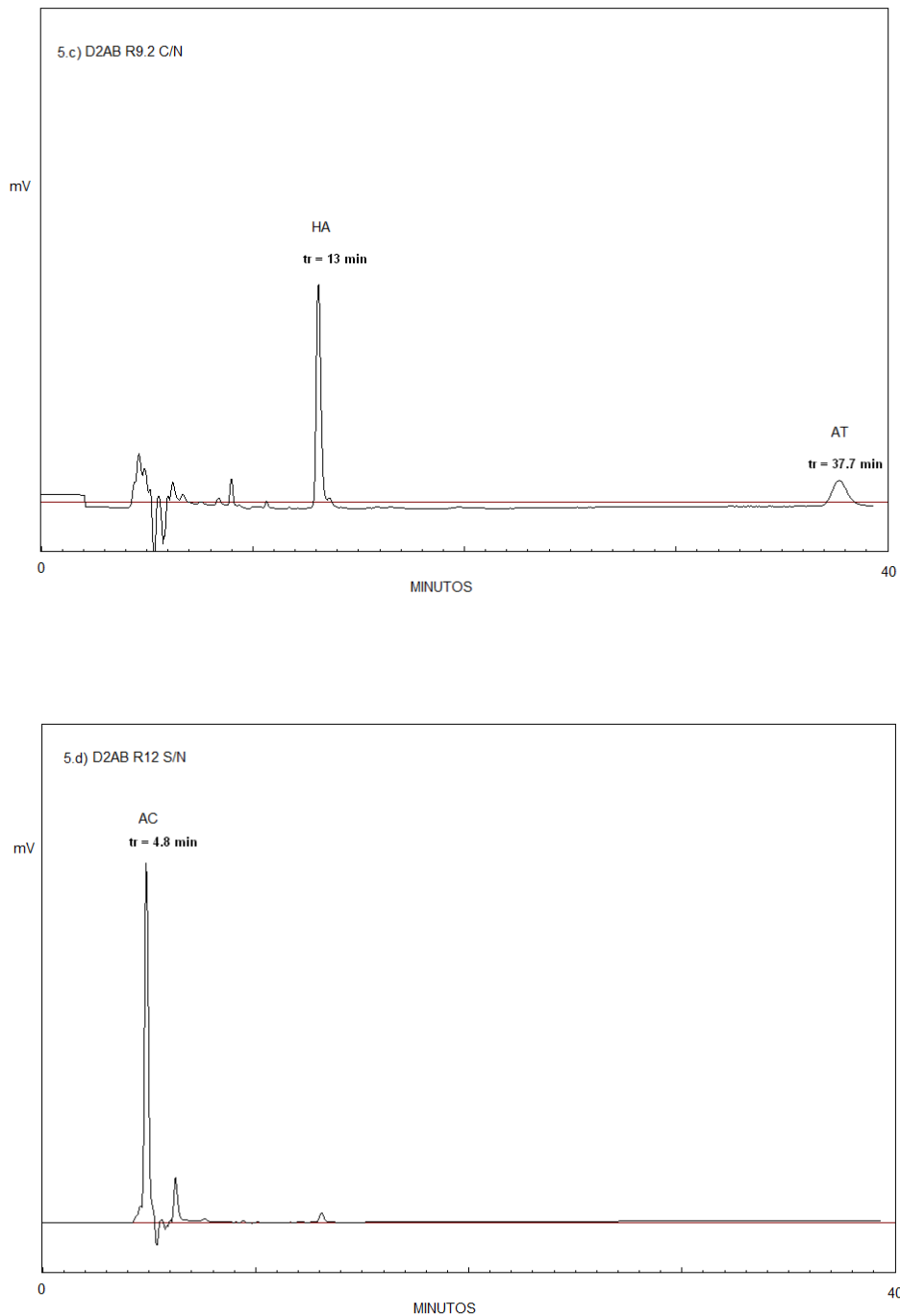


Figura 5. Cromatogramas de estudio de caracterización metabólica en medios de cultivo bacteriano provenientes de los ensayos en microcosmos. a) cromatograma del subcultivo 7 con nitrato a 30 °C, de Aguas Corrientes. b) cromatograma del subcultivo 9 con nitrato a 30 °C, de Dolores. c) cromatograma del subcultivo 9.2 con nitrato a 30 °C, de Dolores. d) cromatograma del subcultivo 12 sin nitrato a 20°C, de Dolores.

Figure 5. Chromatograms of metabolic characterization study of bacterial culture media from the trials in microcosm. a) chromatogram of subculture 7 with nitrate at 30 ° C, Aguas Corrientes. b) chromatogram of subculture 9 with nitrate at 30 ° C, Dolores. c) chromatogram of 9.2 with nitrate subculture at 30 ° C, Dolores. d) chromatogram of subculture 12 without nitrate at 20 ° C, Dolores.

CONCLUSIÓN

La modificación de la composición de la fase móvil y del gradiente de flujo permitieron optimizar un método isocrático para separar atrazina de algunos de sus productos de degradación microbiana en solución acuosa y en medio de cultivo.

Se pudo comprobar que el método resulta adecuado para distinguir diferentes capacidades metabólicas en enriquecimientos microbianos incubados en diferentes condiciones y de distinto origen.

AGRADECIMIENTOS

CSIC: Comisión Sectorial de Investigación Científica. Uruguay. UdelaR: Universidad de la República, Uruguay. OSE: Obras Sanitarias del Estado. Uruguay. ANII: Agencia Nacional de Innovación e Investigación. Uruguay.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Beilstein P, Cook AM. & Hutter R. 1981. Determination of Seventeen s-Triazine Herbicides and Derivatives by High-pressure Liquid Chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 29: 1132-1 135

- Briceño GE. 2009. *Influencia de la aplicación de purines de origen bovino sobre la persistencia de atrazina en el suelo de uso agrícola: estudios de adsorción y degradación*. Tesis Doctoral de la Facultad de Ciencias Agropecuarias y Forestales de la Universidad de la Frontera. Temuco, Chile: 33-34

- Cooper RL, Stoker TE, Tyrey L, Goldman JM & McElroy WK. 2000. Atrazine disrupts the hypothalamic control of pituitary–ovarian function. *Toxicological Sciences*, 53:297–307.

- Downes CJ, Mitchell JW, Viotto ES & Eggers. 1982. Determination of cyanuric acid levels in swimming pool waters by UV absorbance HPLC and melamine cyanurate precipitation. *Water research*, 18: 277-280

- Dufek P & Pacáková V. 1980. Comparison of the high-performance liquid chromatographic behaviour of s-triazine derivatives on various stationary phases. *Journal of Chromatography*, 187: 241-349

- Dufek P, Pacáková V & Tesarová E. 1980. Separation and behavior of s-Triazine derivatives on a NH₂-chemically bonded stationary phase by high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography*, 191: 115-120

- Freeman JL, Beccue N & Rayburn AL. 2005. Differential metamorphosis alters the endocrine response in anuran larvae exposed to T3 and atrazine. *Aquatic Toxicology*, 75:267-273
- Friedmann AS.2002. Atrazine inhibition of testosterone production in rat males following peripubertal exposure. *Reproductive Toxicology*, 16: 275-279
- Hou S & Ding M. 2011. Determination of cyanuric acid in milk powder & swimming pool water by ion pair reversed phase liquid chromatography. *Chinese Journal of Chemistry*, 29: 783-786
- Jesee JA, Valeria C, Benoit RE, Hendricks AC & McNair HM. 1981. Determination of cyanuric acid by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography*, 207: 454-456
- Karlaganis G, Von Arx R, Ammon HU & Camenzind R. 1991. High-performance liquid chromatographic determination of atrazine, deisopropylatrazine and deethylatrazine in soils from corn fields. *Journal of Chromatography*, 549: 229-236
- Lin T, Wen Y, Jiang L, Li J, Yang S & Zhou Q. 2008. Study of atrazine degradation in subsurface flow constructed wetland under different salinity. *Chemosphere*, 72: 122-128
- Mandelbaum RT, Wackett LP & Allan DL. 1993. Mineralization of the s-Triazine Ring of Atrazine by Stable Bacterial Mixed Cultures. *Applied and Environmental Microbiology*, 59: 1695-1701

- McLaughlin RA, Barringer VM, Brady JF & Yokley RA. 2008. P 243-251 En: LeBaron, McFarland & Burnside (ed). *The Triazine Herbicide*. North Carolina State University, Raleigh, North Carolina

- Narotsky M, Best DS, Guidici DL & Cooper RL. 2001. Strain comparisons of atrazine-induced pregnancy loss in the rat. *Reproductive Toxicology*, 15:61–69

- Ostrofsky EB, Robinson JB, Traina SJ & Tuovinen OH. 2002. Analysis of atrazine-degrading microbial communities in soils using most-probable-number enumeration, DNA hybridization, and inhibitors. *Soil Biology and Biochemistry*, 34:1449-1459.

- Patnaik P. 1997. *Handbook of Environmental Analysis. Chemical pollutants in air, water, soil and solid wastes*. P 83-86, 199-330. Editorial CRC Press. Florida, USA.

- Pinelli L, Da Cunha J, Bellini MI & Fernandez-Scavino A. 2012. Selección y caracterización de consorcios de bacterias como herramientas de biorremediación de la contaminación por atrazina en plantas potabilizadoras de agua. *AUGMDOMUS* en prensa

- Radosevich M, Traina SJ, Hao Y & Tuovinen OH. 1995. Degradation and mineralization of atrazine by soil bacterial isolate. *Applied and Environmental Microbiology*. 61: 297-302

- Rodriguez MV, Thiruchelvam M & Cory-Slechta DA. 2005. Sustained exposure to the widely used herbicide atrazine: altered function and loss of neurons in brain monoamine Systems. *Environmental Health Perspectives*, 113: 708-715.

- Salaberria I, Hansenc BH, Asensioa V, Olsvikd PA, Andersenb RA & Jenssen BM. 2009. Effects of atrazine on hepatic metabolism and endocrine homeostasis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Toxicology and Applied Pharmacology*, 234: 98-106

- Smith D, Alvey S & Crowley DE. 2005. Cooperative catabolic pathways within an atrazina- degrading enrichment culture isolated from soil. *FEMS Microbiology Ecology*, 53: 265-273

- Smolkova E & Pacakova V. 1978. Liquid chromatographic separation and behaviour of some substituted s-triazines on a CN-bonded stationary phase. *Chromatographia*,12: 698-702

- Song Y, Zhu LS, Wang J, Wang JH, Liu W & Xie H. 2009. DNA damage and effects on antioxidative enzymes in earthworm (*Eisenia foetida*) induced by atrazine. *Soil Biology and Biochemistry*, 41: 905-909

- Steinheimer TR. 1993. HPLC Determination of Atrazine and Principal Degradates in Agricultural Soils and Associated Surface and Ground Water. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 41: 588-595

- Touzel JP & Albagnac G. 1983. Isolation and characterization of *Methanococcus mazei* strain MC3. *FEMS Microbiology Letters*. 16:241–245

- Vargha M, Takáts Z & Márialigeti K. 2005. Degradation of atrazine in a laboratory scale model system with Danube river sediment. *Water Research*, 39: 1560–1568
- Vermulen NMJ, Apostolides Z, Potgieter DJJ, Nel PC & Smit NSH. 1982. Separation of atrazine and some of its degradation products by high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography*, 240: 247-253
- Victor-Costa AB, Carozzi SM, Oliveira AG, Bohórquez GA & Oliveira CA. 2010. Changes in testicular morphology and steroidogenesis in adult rats exposed to Atrazine. *Reproductive Toxicology*, 29: 323-331