

IDENTIFICACIÓN PRECOZ DEL EFECTO TÓXICO DE FÁRMACOS SOBRE LA BIOMASA ANAEROBIA EN DIGESTORES

1. INTRODUCCIÓN

La digestión anaerobia es una tecnología adecuada para tratar los residuos sólidos y las aguas residuales, considerándose como una tecnología de tratamiento de residuos para producción de energía, debido a la generación de biogás, producto final de la degradación de la materia orgánica por esta vía.

Hoy en día, el desarrollo tecnológico depende en gran medida de los recursos energéticos que deben ser renovables y ecológicos. El biogás es un recurso ecológico, económico y alternativo a los combustibles fósiles, por lo que su producción a partir de efluentes y residuos orgánicos está cobrando un importante y renovado interés en el sector de las tecnologías ambientales.

En la operación de los reactores anaerobios a escala industrial, se deben controlar numerosos parámetros fisicoquímicos como: temperatura, pH, alcalinidad, carga orgánica alimentada, ácido grasos volátiles (AGV), sólidos en suspensión entre otros. De hecho, el funcionamiento de los digestores anaerobios a nivel industrial suele monitorizarse, con alto grado de automatización, exclusivamente a través de dichos parámetros [1,2].

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN

- 1.1 Enzimas clave en el proceso de degradación anaerobia y detección de estrés

2. PROCEDIMIENTO DE DETECCIÓN DE ESTRÉS EN REACTOR ANAEROBIO

- 2.1 Reactivos
- 2.2 Métodos y equipos
- 2.3 Producción de biomasa anaerobia
- 2.4 Contacto de la biomasa anaerobia con los contaminantes emergentes

3. RESULTADOS

4. CONCLUSIONES

5. REFERENCIAS

AUTORES

Mabel Díaz Cubilla¹

Pedro Letón García^{2,3}

Ana Karina Boltes Espínola^{2,3}

¹Ingeniería Química.

UNIVERSIDAD DE ALCALÁ, ALCALÁ DE HENARES, MADRID (ESPAÑA).

²Grupo Bioe. Ingeniería Química.

UNIVERSIDAD DE ALCALÁ, ALCALÁ DE HENARES, MADRID (ESPAÑA).

³Instituto IMDEA Agua.

ALCALÁ DE HENARES, MADRID (ESPAÑA).

Si bien los microorganismos y sus enzimas juegan un papel crucial en la digestión anaerobia y son esenciales para un proceso eficiente, no es habitual realizar un seguimiento continuo de las poblaciones bacterianas, ni de sus actividades enzimáticas asociadas a ellas, aspecto que debería ser estudiado y analizado para anticiparse a los posibles problemas de operación en el digestor [3].

Las enzimas son catalizadores orgánicos producidos por seres vivos y utilizados por ellos para acelerar la velocidad de infinidad de reacciones bioquímicas, cuyas principales características son: su especificidad y la tasa de la reacción que catalizan. La especificidad nos da a entender que una enzima conduce la transformación de una sustancia química a lo largo de una trayectoria concreta. Por otro lado, la tasa, da cuenta de la velocidad a la que la reacción se produce en presencia de la enzima. En una mezcla dada de compuestos orgánicos e inorgánicos, tal como ocurre en las aguas residuales, muchas reacciones son termodinámicamente espontáneas, pero no ocurren por sí mismas en condiciones normales de presión y temperatura. Sin embargo, cuando los organismos tienen las enzimas adecuadas en proporciones correctas, pueden llevarse a cabo estas transformaciones, además de controlar y dirigir la trayectoria de las reacciones químicas que se producen.

La presencia de situaciones de estrés, como: cambios de temperatura, condiciones oxidantes, sustancias tóxicas, etc., modifican la actividad enzimática de forma inmediata. Algunas de las enzimas actúan como defensa ante el ataque de tóxicos, para transformar y neutralizar las sustancias nocivas, así como para corregir los desequilibrios en el medio de cultivo. Todo esto se traduce en cambios rápidos en la expresión de ciertas enzimas, así como en las velocidades de las reacciones enzimáticas, que pueden detectarse rápidamente y con ello dar una señal de alarma que informe del mal funcionamiento o de un posible peligro en la estabilidad del proceso de digestión anaerobia. Esta señal biológica generada por las enzimas, como respuesta a una situación de estrés, es rápida, mucho más que la monitorización de los parámetros físicoquímicos clásicos. Además, para un diagnóstico eficaz del funcionamiento del reactor, se

necesita un análisis histórico de la evolución de estos parámetros fisicoquímicos en conjunto, hechos que retrasan la toma de decisiones y las actuaciones que se deben realizar para mantener un funcionamiento estable de los reactores anaerobios.

El estrés generado en un reactor anaerobio podría asociarse a la presencia de los denominados contaminantes emergentes, presentes en numerosos efluentes y residuos orgánicos en general, especialmente en los lodos de depuradora. Estos microcontaminantes consisten en una amplia y creciente gama de sustancias antropogénicas, incluyendo productos farmacéuticos y para el cuidado personal, hormonas esteroides, productos químicos industriales, pesticidas, etc. Las plantas de tratamiento de aguas residuales actuales no están diseñadas específicamente para eliminar estos microcontaminantes [4]. Su biotransformación durante el tratamiento de aguas residuales no es completa [5,6], y muchos son parcialmente absorbidos en lodos de depuradora [7], pudiendo afectar a la biodegradación anaerobia de la materia orgánica [8].

Resultaría de gran interés, por tanto, disponer de técnicas de detección de situaciones de estrés de sistemas anaerobios, que permitan actuar más rápidamente y evitar la pérdida de rendimiento en la degradación global de la materia orgánica.

Por todo ello, en este trabajo se plantea una estrategia para la detección precoz de los efectos negativos causados por la presencia de fármacos microcontaminantes, específicamente algunos de los más abundantes y generalizados como carbamazepina (CBM), sulfametoxazol (SMF) e ibuprofeno (IBU), además del triclosán (TCS), el bactericida más utilizado en la actualidad en pastas dentales, detergentes y ropa deportiva, con concentraciones reportadas que oscilan entre 620 y 17.500 $\mu\text{g} / \text{kg}$ para lodos secundarios y entre 190 y 9850 $\mu\text{g} / \text{kg}$ para biosólidos [9].

La estrategia se apoya en la medida de actividades enzimáticas clave en el proceso anaerobio de tratamiento de la materia orgánica y eliminación de sustancias tóxicas, aplicando técnicas fluorométricas. El grupo de investigación ha desarrollado un procedimiento para el procesamiento de las muestras, que per-

mite detectar cambios en las actividades enzimáticas de forma rápida y sencilla, y que puede adaptarse y aplicarse fácilmente a las condiciones específicas de un laboratorio de control en cualquier planta de tratamiento de aguas y/o fangos a escala industrial.

Las principales ventajas de detectar cambios en las actividades enzimáticas frente a los parámetros convencionales se citan a continuación:

- Son reacciones rápidas y específicas.
- Pueden servir como indicadores tempranos del mal funcionamiento del reactor.
- Permiten tomar decisiones y actuar con mayor celeridad ante cambios en el reactor.
- Se requiere poca cantidad de muestra.
- Las metodologías pueden adaptarse para su implementación en diferentes configuraciones de reactores anaerobios.

Se han elegido varias enzimas de importancia en sistemas anaerobios de depuración, como son las hidrolasas, transferasas, catalasa y especies reactivas de oxígeno [10,11,12]. A continuación, se presenta el estudio realizado para su aplicación como indicadores tempranos de cambios producidos en la biomasa de un reactor anaerobio, en presencia de contaminantes emergentes.

1.1. Enzimas clave en el proceso de degradación anaerobia y detección de estrés

1.1.1 > Enzimas hidrolíticas y actividad esterasa

Las hidrolasas son enzimas que catalizan la primera etapa de la digestión anaerobia (hidrólisis), mediante procesos catabólicos (destructivos). Existen muchos tipos de las enzimas hidrolíticas intra y extracelulares, como son las lipasas, fosfatasas, glucosidasas, proteasas, esterasas, etc., [10]. En general estas familias se de-

nominan en función del sustrato que hidrolizan. En este trabajo, se evalúa la actividad enzimática intracelular, mediante la medida de la actividad esterasa por la reacción de hidrólisis de diacetato de fluoresceína (fluorescein diacetate, FDA, siglas en inglés). Esta reacción, que ocurre en el interior de la células viables (metabólicamente activas), da lugar a la formación de un producto fluorescente (fluoresceína) fácilmente medible mediante un fluorímetro [13]. La reacción de hidrólisis debe ocurrir en el interior de la célula, por lo que de forma indirecta es una indicación de la integridad de ésta o lo mismo de la viabilidad celular.

1.1.2 > Enzimas glutatona S-transferasa

Las enzimas Glutatona S-transferasa (GST) son una familia de enzimas multi genes, que se activan ante la presencia de una amplia variedad de compuestos químicos [14]. Estas enzimas, implicadas en la Fase II de los procesos de detoxificación, dan lugar a reacciones de conjugación con xenobióticos por adición de glutatona. Estas reacciones normalmente hacen que los tóxicos sean más hidrofílicos y por tanto más fáciles de ser eliminados de la célula.

La actividad GST puede evaluarse fácilmente mediante la conversión enzimática de Monoclorobimano (MCB) en su aducto fluorescente monoclorobimano-glutatión-S-transferasa, reacción intracelular catalizada por la enzima GST [15].

1.1.3 > Especies reactivas de oxígeno (ROS)

Las especies reactivas de oxígeno (ROS), como indica su nombre, presentan mayor reactividad que el oxígeno molecular y una elevada actividad redox [13]. Estas especies incluyen, el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), y el radical hidroxilo (OH^{\cdot}). Entre todas ellas, el H_2O_2 es la más abundante, también porque es el subproducto de la captación de superóxido por las enzimas superóxido dismutasa (SOD). Cuando en la célula se dan situaciones de estrés, por ejemplo ante la presencia de contaminantes emergentes, ocurre una super-

producción de ROS tendiente a eliminar estas sustancias, y que cause una reducción importante de sustancias antioxidantes, hecho que desencadena un desequilibrio con acumulación de ROS. Dicha acumulación, finalmente da lugar a estrés oxidativo, situación muy dañina para las células porque da lugar a la oxidación de biomoléculas, daño celular irreversible y muerte celular [14].

La generación de ROS puede detectarse mediante el seguimiento de la reacción de esterificación de diacetato de 2,7-diclorodihidrofluoresceína (DCFH-DA) a 2,7-diclorodihidrofluoresceína (DCFH) y oxidación adicional a 2,7-diclorofluoresceína (DCF) fluorescente.

1.1.4 > Actividad enzimática catalasa

La catalasa (CAT), está asociada primariamente con los peroxisomas en los que se reduce el contenido intracelular de especies reactivas de oxígeno, por ejemplo el peróxido de hidrógeno, generando H_2O y O_2 . En la medida de actividad catalasa, resulta sencillo determinar el oxígeno molecular producido, hecho que facilita el seguimiento con bajo coste de reactivos.

2. PROCEDIMIENTO DE DETECCIÓN DE ESTRÉS EN REACTOR ANAEROBIO

2.1. Reactivos

Los siguientes fármacos (pureza del 99.9%) se adquirieron de Sigma Aldrich, sulfametoxazol (CAS 723-46-6), carbamazepina (CAS 298-46-4), ibuprofeno (CAS 15687-27-1), triclosán (CAS 3380-34-5). El resto de los productos químicos fueron de grado analítico y se adquirieron de Sigma-Aldrich. Los medios de cultivo se prepararon con agua ultrapura generada mediante un sistema Direct-Q™ 5 de Millipore (Bedford, MA, EE. UU.). Los reactivos empleados en la cuantificación de las actividades enzimáticas fueron adquiridos en ThermoFischer Scientific.

2.2. Métodos y equipos

Se midió el caudal de biogás producido, que se analizó mediante GC-TCD Varian 3350 [17]. La densidad óptica de los cultivos se determinó a 600 nm, mediante espectrofotómetro UV-VIS 1800 Shimadzu, correlacionando el valor de absorbancia con una recta patrón de sólidos volátiles en suspensión. Para el seguimiento de la eliminación de materia orgánica, diariamente se midió el Carbono Orgánico Total (COT) empleando un analizador de TOC-VCSH Shimadzu.

En la determinación de actividad esterasa, GST y ROS, se empleó un fluorímetro de microplacas Ascent FL ThermoScientific™, que permite trabajar con volúmenes muy pequeños (50-200 μ L), tal como se muestra en la **Figura 1a**. En relación a la actividad catalasa, la producción de oxígeno se midió mediante un sistema Oxygraph Hansatech. Los métodos empleados proceden de [18,19].

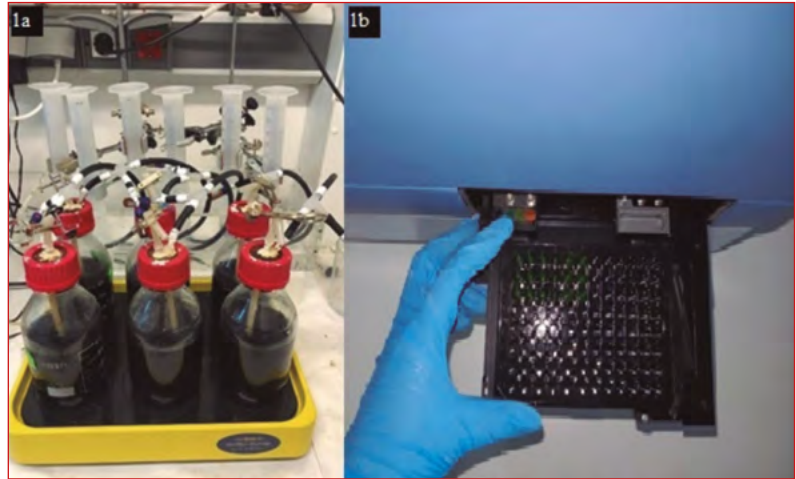
2.3. Producción de biomasa anaerobia

El cultivo anaerobio se generó a partir de fango aerobio procedente de biorreactor aireado descrito en [21]. Dicho fango, fue transferido a un tanque agitado anaerobio de 2.5 L, que ha sido mantenido bajo las siguientes condiciones: temperatura 37 ± 3 °C, pH = 7 ± 0.5 ; DQO= 1700 ± 500 mg/L durante 120 días.

Cada tres días, se añadía al reactor fango y nutrientes, de acuerdo al procedimiento establecido en Test Guía 209 [22].

2.4. Contacto de la biomasa anaerobia con los contaminantes emergentes

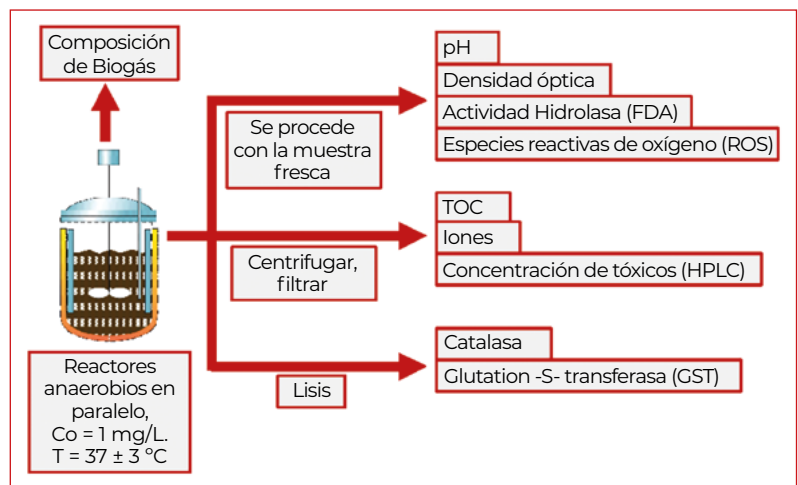
Para los ensayos de exposición a los fármacos, se acondicionaron seis reactores anaerobios de 400 mL de volumen de reacción, que funcionaron en paralelo (**Figura 1a**). Un reactor actúa de control, cuatro reactores operan con tóxicos individuales y el sexto reactor con la mezcla de los cuatro fármacos.



■ **Figura 1a.** Reactores anaerobios en paralelo. **Figura 1b.** Reacción biomasa anaerobia con FDA

En todos los casos, la concentración inicial de los fármacos fue de 1 mg/L. De cada reactor se tomaron muestras a lo largo del tiempo de exposición, hasta 48 horas. En la **Figura 2**, se representa el diagrama de procesamiento de las muestras recogidas en cada reactor.

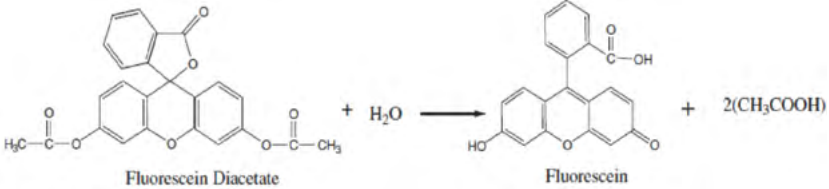
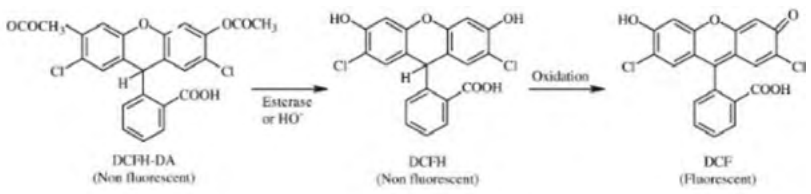
El procedimiento esquematizado en la **Figura 2**, detalla el tratamiento de las muestras del reactor. Brevemente, se toma un



■ **Figura 2.** Esquema de ensayos realizados

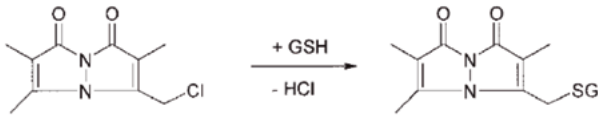
muestra de cada reactor, y se fracciona en tres porciones. La primera (muestra fresca), se emplea para medir: pH, densidad óptica, actividad esterasa y ROS. La segunda fracción, se centrifuga a 10.000 rpm, se filtra con membranas de 0,2 µm, se mide: COT, iones en solución y concentración de fármacos. En la tercera fracción se realiza lisis, sonicando a 0 °C, 10 minutos. Esta última fracción se emplea para medir: actividad catalasa y GST.

Tabla 1. Resumen de métodos empleados en la detección de alteraciones de actividades enzimáticas del biorreactor anaerobio

Técnicas basadas en la detección de un producto fluorescente				
Actividad enzimática	Método	Tiempo de reacción (min)	λ exc/em (nm)	Lisis
	Hidrólisis de diacetato de fluoresceína	30	480/530	No
Reacción				
Esterasa	 <p style="text-align: center;">Fluorescein Diacetate + H₂O → Fluorescein + 2(CH₃COOH)</p>			
Actividad enzimática	Método	Tiempo de reacción (min)	λ exc/em (nm)	Lisis
	Esterificación de diacetato de 2,7-diclorodihidrofluoresceína (DCFH-DA) a 2,7-diclorodihidrofluoresceína (DCFH) y oxidación adicional a 2,7-diclorofluoresceína (DCF) fluorescente por ROS.	30	480/530	No
Reacción				
Generación de Especies reactivas de oxígeno intra y extracelulares	 <p style="text-align: center;">DCFH-DA (Non fluorescent) $\xrightarrow{\text{Esterase or HO}^\bullet}$ DCFH (Non fluorescent) $\xrightarrow{\text{Oxidation}}$ DCF (Fluorescent)</p> <p style="text-align: right;">λ_{excitación} = 498 nm λ_{emisión} = 522 nm</p>			

Un resumen de los métodos empleados en la determinación de las actividades enzimáticas, se muestra en la **Tabla 1**. En esta tabla, se puede observar que las técnicas basadas en la medida de un producto fluorescente requieren más tiempo de medición frente a la técnica basada en la medida del oxígeno producido.

Tabla 1. Resumen de métodos empleados en la detección de alteraciones de actividades enzimáticas del biorreactor anaerobio (CONT.)

Actividad enzimática	Método	Tiempo de reacción (min)	λ exc/em (nm)	Lisis
Glutatión -S transferasa	Conversión enzimática de Monoclorobimano (MCB) no fluorescente a un aducto fluorescente GSH-MCB fluorescente. Reacción catalizada por enzima GST	20	390/465	Sí
	Reacción			
				
Técnica sin generación de productos fluorescentes				
Actividad enzimática	Método	Tiempo de reacción (min)	λ exc/em (nm)	Lisis
Catalasa	Generación de oxígeno por reducción de peróxido de hidrógeno	5	Medida directa de oxígeno producido	Sí
	Reacción			
$H_2O_2 \rightarrow O_2 + H_2O$				

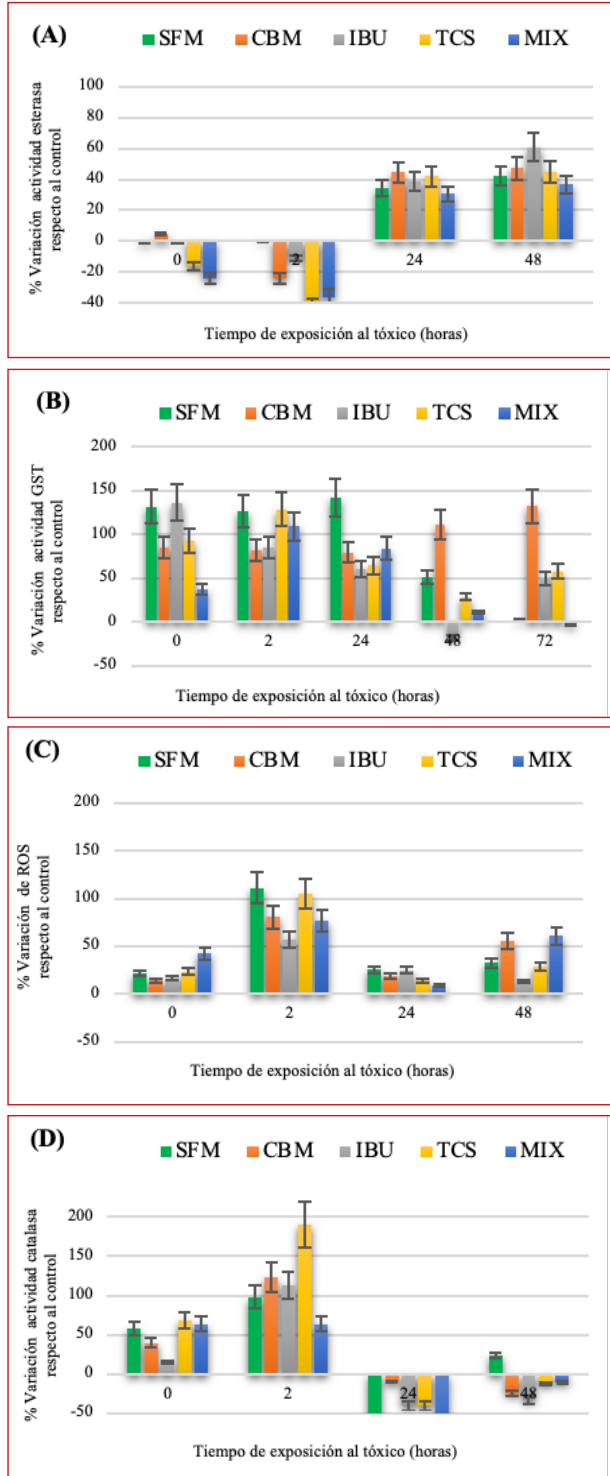
3. RESULTADOS

A continuación se presentan los perfiles de variación de las actividades medidas en los diferentes reactores y a distintos tiempos de contacto con los tóxicos individuales y mezclados. La **Figura 3**, muestra las evoluciones temporales de todas las actividades medidas en presencia de los fármacos, respecto a las mismas actividades medidas en el reactor anaerobio control (no expuesto a los tóxicos).

Se observan variaciones de la actividad hidrolítica de la biomasa, evaluada como actividad esterasa, en respuesta a la presencia de los fármacos ensayados. En la **Figura 3a**, a tiempo inicial de contacto (0 horas), ya se observan pequeñas alteraciones en los valores de actividad enzimática para CBM, TCS y la mezcla de los cuatro contaminantes emergentes. Variaciones significativas pueden observarse a tiempos de 2 horas de contacto para todos los tóxicos, excepto el SMF. A las 24 horas es cuando claramente se miden estos cambios que muestran una pérdida de la capacidad hidrolítica de la biomasa entre el 30 y 50% respecto a la actividad normal del reactor control.

Esta tendencia se confirma y mantiene a lo largo del tiempo de exposición, incluso llega a aumentar ligeramente. Si bien, se observan alteraciones en la actividad hidrolítica del fango anaerobio desde el inicio del contacto con los fármacos, éstas no aparecen de forma significativa hasta las 24 horas de exposición. Valores más elevados de pérdida de capacidad hidrolítica de la biomasa se ha observado en presencia de CBM o TCS. La mezcla de los cuatro fármacos se comporta de forma peculiar, ya que produce alteraciones en la actividad esterasa desde el momento inicial de exposición al cóctel de tóxicos. Sin embargo, la mezcla no provoca una pérdida tan importante de capacidad hidrolítica como la observada para CBM y TCS de forma individual. Atendiendo a la variación temporal, se observa que no existe una reparación del daño en la capacidad hidrolítica, hecho que se podría asociar a la pérdida de viabilidad de la biomasa por lisis celular.

En relación a la medida de la actividad GST, que indica la capacidad de la biomasa anaerobia para neutralizar la acción tóxica



■ **Figura 3.** Perfiles temporales de variación de actividades enzimáticas de la biomasa anaerobia expuesta a fármacos A) Actividad esterasa; B) Actividad GST; C) Evolución de ROS; D) Actividad catalasa. Emergentes: SFM: sulfametoxazol; CBM: carbamacepina; IBU: ibuprofeno; TCS: triclosán; MIX: mezcla de los 4 emergentes. Las barras de error corresponden a Intervalos de Confianza del 95%.

de los fármacos por reacciones de conjugación con estos, en la **Figura 3b**, se observa una hiperexpresión de la actividad GST respecto al ensayo control sin tóxicos. Las variaciones son significativas desde el momento inicial del contacto, siendo el antibiótico SFM el que produce las mayores alteraciones a todos los tiempos de exposición. Sin embargo, a las 48h de contacto, este perfil cambia, observándose mayor incremento de actividad GST como respuesta a la presencia de CBM.

La generación de estrés oxidativo como consecuencia de la presencia de los fármacos, que se ha medido como ROS, presenta las variaciones que se muestran en la **Figura 3c**. El perfil de generación de ROS muestra una diferencia importante a las 2 h de exposición en todos los reactores con un aumento de prácticamente el doble respecto al control, excepto para el sistema con IBU, en el que la hiperproducción de ROS es sólo un 50% superior al control. Atendiendo al tiempo, se observa que la biomasa es capaz de neutralizar estas especies reactivas por lo que a tiempos más largos las variaciones se van atenuando.

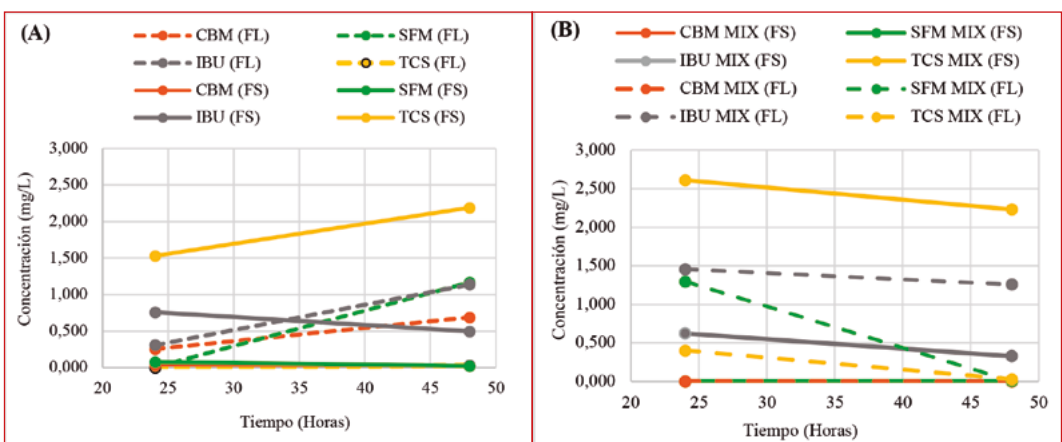
Las variaciones medidas en la actividad catalasa, enzima implicada en el proceso de detoxificación, se muestran en la **Figura 3d**. Se detecta una hiperexpresión de la actividad catalasa en respuesta a la presencia de todos los fármacos desde el momento inicial del contacto, pero especialmente para TCS. Asimismo, la variación se va amortiguando con el tiempo de incubación. Este perfil, que coincide con el de variación de ROS corresponde con la neutralización del estrés oxidativo generado por las células como mecanismo de defensa ante la presencia de xenobióticos, para lo cual las células generan ROS en exceso con la finalidad de oxidar los fármacos. Sin embargo, este desequilibrio provocado no puede restablecerse, tal como puede observarse en las variaciones de CAT a 24 y 48h de exposición. A tiempos largos, se pierde actividad enzimática en prácticamente todos los reactores, hecho que conlleva al colapso del digestor anaerobio.

La evolución de las actividades enzimáticas ha de analizarse a la luz de las medidas de concentración de los fármacos tanto en la fase acuosa del reactor como en los sólidos biológicos del

mismo. La **Figura 4** muestra las concentraciones de los cuatro fármacos estudiados en exposición individual y mezclados. Los resultados muestran que el TCS se encuentra asociado a la fracción sólida (FS), en tanto que los demás fármacos se reparten entre la fase líquida (FL) y sólida del digestor. Esta distribución de los microcontaminantes ha sido descrita previamente por [9]. Estos autores explicaron el reparto de microcontaminantes orgánicos en función del coeficiente de partición octanol-agua. Atendiendo a LogKow, el orden de hidrofobicidad sería TCS (4.78) > IBU (3.97) > CBZ (2.45) > SFM (0.89).

Asimismo, se puede observar que existe una eliminación más eficiente de SFM y CBM en la fracción líquida de los reactores, sin embargo pueden existir metabolitos residuales no detectados, que siguen provocando alteraciones a nivel enzimático y cuyos efectos se evidencian mediante el procedimiento de detección enzimática de estrés de los digestores, aquí presentado.

Finalmente, cabe resaltar que durante las 48h de duración de estos ensayos no se observaron cambios significativos en la generación de biogás o eliminación de materia orgánica, respecto al control.



■ **Figura 4.** Concentración de fármacos: A) en reactores individuales; B) en reactor mezcla

4. CONCLUSIONES

Los resultados muestran un rápido efecto de los contaminantes ensayados, con perfiles de variación temporal y niveles de efecto diferentes sobre cada una de las actividades enzimáticas estudiadas.

Los fármacos SMF y TCS son los que producen las alteraciones más importantes en la actividad biológica del fango.

GST y catalasa son las enzimas que muestran una respuesta inmediata a la presencia de los tóxicos, observándose un aumento importante de su actividad que permiten la detección temprana de estrés del reactor.

5. REFERENCIAS

1. Bernard, O. *et al.* An integrated system to remote monitor and control anaerobic wastewater treatment plants through the internet. *Water Science & Technology*, (2005). vol 52(1-2), 457-464.
2. Cugueró, M.A., Aguiló, P., Sáenz, B. & Sánchez, M. Aplicación de herramientas avanzadas de soporte a la toma de decisiones en la digestión anaerobia de lodos. *XXXIV Jornadas Técnicas AEAS. Tarragona*.
3. Carballa, M., Regueiro, L. & Lema, J.M. Microbial management of anaerobic digestion: exploiting the microbiome-functionality nexus. *Current Opinion in Biotechnology*, (2015), vol. 15(33), pp. 103-111. <http://dx.doi.org/10.1016/j.copbio.2015.01.008>
4. Luo, Y., Guo, W., Ngo, H. H., Nghiem, L. D., Hai, F. I., Zhang, J., Liang, S., & Wang, X. C. A review on the occurrence of micropollutants in the aquatic environment and their fate and removal during wastewater treatment. *Science of the Total Environment*, (2014), vol. 473-474, pp. 619-641. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.12.065>
5. Falås, P., Wick, A., Castronovo, S., Habermacher, J., Ternes, T. A., & Joss, A. Tracing the limits of organic micropollutant removal in biological wastewater treatment. *Water Research*, (2016), vol. 95, 240-249. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.03.009>
6. Gonzalez-Gil, L., Mauricio-Iglesias, M., Carballa, M., & Lema, J. M. Why are organic micropollutants not fully biotransformed? A mechanistic modelling approach to anaerobic systems. *Water Research*, (2018). vol. 142, pp. 115-128. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.05.032>
7. Symaris, E.C., Fotidis, I.A., Stasinakis, A.S. & Angelidaki, I. Effects of triclosan, diclofenac, and nonylphenol on mesophilic and thermophilic methanogenic activity and on the methanogenic communities. *Journal of Hazardous Materials*, (2015), vol. 291, pp. 45-51. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2015.03.002>
8. Cetecioglu, Z. & Orhon, D. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, (2018), vol. 6, 1305-1313. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2018.01.056>

9. Venegas, M. Leiva, A.M., Reyes-Contreras, C., Neumann, P., Piña, B. & Vidal, G. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, (2021), vol. 9, pp. 104931. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2020.104931>
10. Burgess, J. E., & Pletschke, B. I. Hydrolytic enzymes in sewage sludge treatment: A mini-review. *Water S.A.*, (2008), vol 34(3), 343-350. http://www.scielo.org.za/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1816-79502008000300007&lng=en&tlng=en
11. Martín-Díaz, M. L., Gagné, F., & Blaise, C. The use of biochemical responses to assess ecotoxicological effects of Pharmaceutical and Personal Care Products (PPCPs) after injection in the mussel *Elliptio complanata*. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, (2009), vol. 28(2), pp. 237-242. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2009.04.009>
12. Zhang, P., Shen, Y., Guo, J., Li, C., Wang, H., Chen, Y., Yan, P., Yang, J., & Fang, F. Extracellular protein analysis of activated sludge and their functions in wastewater treatment plant by shotgun proteomics. *Scientific Reports*, (2015), vol. 5(1), pp. 12041. <https://doi.org/10.1038/srep12041>
13. Green, V. S., Stott, D. E., & Diack, M. Assay for fluorescein diacetate hydrolytic activity: Optimization for soil samples. *Soil Biology and Biochemistry*, (2006), vol. 38(4), pp. 693-701. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2005.06.020>
14. Gomes, A., Fernandes, E., & Lima, J. Fluorescence probes used for detection of reactive oxygen species. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, (2005), vol. 65(2), pp. 45-80. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jbbm.2005.10.003>
15. Franklin, M. R., & Yost, G. S. Biotransformation: a balance between bioactivation and detoxification. *Principles of Toxicology: Environmental and Industrial Applications*, (2000), pp. 57-86.
16. Green, V. S., Stott, D. E., & Diack, M. Assay for fluorescein diacetate hydrolytic activity: Optimization for soil samples. *Soil Biology and Biochemistry*, (2006), vol. 38(4), pp. 693-701. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2005.06.020>
17. Boltes, K., Leton, P., & Garcia-Calvo, E. Volatile Fatty Acid Anaerobic Degradation: Kinetic Modeling with an Inoculum under Controlled Conditions. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, (2008), vol 47(15), 5337-5345. <https://doi.org/10.1021/ie071583p>
18. Amariei, G., Boltes, K., Rosal, R., & Leton, P. Enzyme response of activated sludge to a mixture of emerging contaminants in continuous exposure. *Plos One*, (2020), vol. 15(1), pp. e0227267. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0227267>
19. Strange, R. C., Spiteri, M. A., Ramachandran, S., & Fryer, A. A. Glutathione-S-transferase family of enzymes. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, (2001), vol. 482(1), pp. 21-26. [https://doi.org/10.1016/S0027-5107\(01\)00206-8](https://doi.org/10.1016/S0027-5107(01)00206-8)
20. Amariei, G., Boltes, K., Rosal, R., & Leton, P. Enzyme response of activated sludge to a mixture of emerging contaminants in continuous exposure. *Plos One*, (2020), vol. 15(1), pp. e0227267. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0227267>
21. Amariei, G., Boltes, K., Rosal, R., & Letón, P. Toxicological interactions of ibuprofen and triclosan on biological activity of activated sludge. *Journal of Hazardous Materials*, (2017), vol. 334, pp. 193-200. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2017.04.018>
22. OECD Activated sludge, respiration inhibition test (carbon and ammonium oxidation). *Guidelines for the Testing of Chemicals, Section*, (2010), vol. 2. No, 209.