



**ESCUELA POLITÉCNICA DE INGENIERÍA DE  
GIJÓN.**

**GRADO EN INGENIERÍA QUÍMICA INDUSTRIAL**

**DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA Y TECNOLOGÍA  
DEL MEDIOAMBIENTE**

**ÁREA DE TECNOLOGÍAS DEL MEDIOAMBIENTE**

**ANÁLISIS DE LA INTERACCIÓN ENTRE SUSTANCIAS  
POLIMÉRICAS EXTRACELULARES (SPE) Y MICROPLÁSTICOS  
EN LODOS DE EDAR**

**Dña. GONZÁLEZ MENÉNDEZ, CARLA**  
**TUTORES: Dña. LACA PÉREZ, AMANDA**  
**D. SOL SÁNCHEZ, DANIEL**

**FECHA: Julio, 2023**

# Índice

<b>RESUMEN</b> .....	<b>4</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>5</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	<b>6</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<b>8</b>
<b>LISTA DE TABLAS</b> .....	<b>12</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS</b> .....	<b>14</b>
2.1 CLASIFICACIÓN Y ORIGEN DE MICROPLÁSTICOS: CONCEPTO, ORIGEN Y CLASIFICACIÓN DE LOS MICROPLÁSTICOS. ....	17
2.2 INCIDENCIA DE MICROPLÁSTICOS EN EDAR.....	18
2.2.1. <i>Pretratamiento</i> .....	19
2.2.2. <i>Tratamiento primario</i> .....	19
2.2.3. <i>Tratamiento secundario</i> .....	20
2.2.4. <i>Tratamiento terciario</i> .....	21
2.2.5. <i>Lodos</i> .....	21
2.3 TRATAMIENTOS BIOLÓGICOS DE AGUAS RESIDUALES URBANAS: MBR .....	22
2.3.1. <i>Características generales de los MBRs</i> .....	23
2.3.2 <i>Eliminación de MPs en MBRs</i> .....	26
2.4 SUSTANCIAS POLIMÉRICAS EXTRACELULARES (SPE) EN SISTEMAS DE DEPURACIÓN BIOLÓGICA DE AGUAS RESIDUALES .....	29
2.4.1. <i>Composición de las SPE</i> .....	29
2.4.2. <i>Comportamiento de las SPE en sistemas de lodos activados</i> .....	30
2.4.3. <i>Efectos de las SPE sobre los MBRs</i> .....	31
2.4.4. <i>Efectos de la presencia de MPs sobre las SPE</i> .....	32
<b>3. METODOLOGÍA</b> .....	<b>36</b>
3.1 DESCRIPCIÓN DE LA PLANTA ESTUDIADA .....	36
3.2 TOMA DE MUESTRA.....	38
3.2 DETERMINACIÓN DE SPE.....	39
3.2.1. <i>Extracción de SPE</i> .....	39
3.2.2. <i>Medida de la concentración de proteínas y ácidos húmicos</i> .....	40
3.2.3. <i>Medida de la concentración de carbohidratos totales</i> .....	43
3.3 DETERMINACIÓN DE SÓLIDOS .....	46
3.4 DETERMINACIÓN DE MICROPLÁSTICOS .....	47
3.4.1 <i>Preparación de reactivos</i> .....	47
3.4.2. <i>Pretratamiento de las muestras</i> .....	47
3.4.2 <i>Cuantificación y clasificación de microplásticos</i> .....	49
3.4.3 <i>Caracterización de microplásticos</i> .....	50
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	<b>52</b>
4.1. CARACTERÍSTICAS Y EVOLUCIÓN DE SPE CON EL TIEMPO .....	53
4.2. CARACTERÍSTICAS Y EVOLUCIÓN DE MPs CON EL TIEMPO.....	60

4.3. RELACIÓN SPE-MPS .....	73
<b>5. CONCLUSIONES .....</b>	<b>80</b>
<b>6. ANEXOS .....</b>	<b>84</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>100</b>

# Resumen

En los últimos años, se ha incrementado notablemente la preocupación medioambiental en relación con los microplásticos (MPs). Numerosos estudios científicos alertan sobre los potenciales riesgos de estas micropartículas, no sólo para el medio ambiente, sino también para la salud humana. Ante esta situación, cada vez más gobiernos intentan afrontar esta problemática con la implantación de nuevas normas y/o directrices.

Una de las formas para prevenir esta contaminación es actuar en los focos de emisión de MPs al medioambiente. En este contexto, las estaciones depuradoras de aguas residuales (EDAR) son una importante fuente de la liberación de MPs a los ecosistemas acuáticos. Por tanto, resulta fundamental evaluar el comportamiento de los MPs en el contexto de las diferentes etapas de tratamiento de las aguas residuales. En el presente TFG, se llevó a cabo un estudio durante 6 meses sobre la interacción entre las sustancias poliméricas extracelulares (SPE) y los MPs en lodos de un MBR de una EDAR de Murcia. En primer lugar, se cuantificaron las SPE (solubles y ligadas) en función de su contenido en proteínas, ácidos húmicos y carbohidratos. En segundo lugar, se cuantificaron los MPs presentes en el licor mezcla del MBR así, como los MPs retenidos en el lodo.

Los resultados obtenidos mostraron que las concentraciones de proteínas, ácidos húmicos y carbohidratos representan el  $40 \pm 12\%$ ,  $40 \pm 11\%$  y  $20 \pm 2\%$  de las SPE, respectivamente, siendo la concentración total de SPE entre 1.955 y 4.297 mg/L. Asimismo, en las muestras analizadas se han encontrado altas concentraciones de MPs, comprendidas entre 2.482 y 4.597 MPs/L (con un valor medio de  $3.414 \pm 764$  MPs/L) en el licor mezcla, y entre 110 y 210 MPs/g sólido seco (con un valor medio de  $159 \pm 33$  MPs/g sólido seco) en el sólido centrifugado. Se observó que las partículas  $>250 \mu\text{m}$  son las que pasan a la fracción sólida en mayor proporción y se detectaron hasta 18 polímeros distintos en ambas fracciones. Por último, se encontró que la concentración de ácidos húmicos enlazados y totales presenta una buena correlación lineal con respecto al porcentaje de MPs retenidos en el sólido centrifugado. Esto implica que cuanto mayor sea la concentración de ácidos húmicos en el licor mezcla, mayor proporción de MPs son retenidos en el sólido. Esta correlación se debe principalmente a interacciones hidrofóbicas, aunque también puede estar originadas en menor medida por otro tipo de interacciones, como los puentes de hidrógeno.

# Abstract

In recent years, environmental concerns about microplastics (MPs) have considerably increased. Numerous scientific studies warn about the potential risks of these microparticles, not only for the environment, but also for human health. Against this background, more and more governments are trying to tackle this problem by implementing new regulations and/or guidelines.

One way to prevent this pollution is to act on the sources of MP emission into the environment. In this context, wastewater treatment plants (WWTPs) are an important hot spot of MPs release into aquatic ecosystems. Therefore, it is essential to evaluate the behaviour of MPs through the different stages of wastewater treatment process. In the present Bachelor's Degree Final Project, a 6-month study on the interaction between extracellular polymeric substances (SPE) and MPs in sludge coming from MBR of a WWTP in Murcia has been carried out. Firstly, SPE (soluble and bound) were quantified according to their protein, humic acid and carbohydrate content. Secondly, MPs present in the mixed liquor of the MBR were quantified, as well as the MPs retained in the sludge.

Results obtained showed that the concentrations of proteins, humic acids and carbohydrates in SPE represent  $40 \pm 12\%$ ,  $40 \pm 11\%$  and  $20 \pm 2\%$ , respectively, with the total SPE concentration ranging from 1.955 to 4.297 mg/L. In addition, high MP concentrations have been found in the analysed samples, ranging from 2.482 to 4.597 MPs/L (with an average value of  $3.414 \pm 764$  MPs/L) in the mixed liquor, and from 110 to 210 MPs/g dry solid (with an average value of  $159 \pm 33$  MPs/g dry solid) in the centrifuged solid. Regarding MPs size, particles  $>250 \mu\text{m}$  were transferred in the highest proportion into the solid fraction and 18 different polymers were detected in both fractions. Finally, a good linear correlation between the concentration of bound and total humic acids and the percentage of MPs retained in the centrifuged solid was found. This implies that the higher the concentration of humic acids in the mixed liquor, the higher the proportion of MPs in the solid are retained. This correlation is mainly due to hydrophobic interactions, although other minor interactions, such as hydrogen bonds, may also be considered.

# Lista de Abreviaturas

AnMBR: Biorreactor de membrana anaerobio  
ARI: Aguas residuales industriales  
ARU: Aguas residuales urbanas  
BSA: Seroalbúmina bovina  
CAS: Sistema convencional de lodos activados  
CE: Celulosa  
DO: Oxígeno disuelto  
EDAR: Estación depuradora de aguas residuales  
EDARU: Estación depuradora de aguas residuales urbanas  
ER: Resina epoxy  
FTIR: Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier  
HDPE: Polietileno de alta densidad  
MBR: Biorreactor de membrana  
MPs: Microplásticos  
NBE: Norborneno  
PA: Poliamida  
PAA: Ácido poliacrílico  
PAHs: Hidrocarburos aromáticos policíclicos  
PB: Polibutadieno  
PBDE: Éteres de difenilo polibromados  
PC: Policarbonato  
PCBs: Policlorobifenilos  
PE/PP: Copolímero polietileno:polipropileno  
PE: Polietileno  
PEI: Polietilenimina  
PES: Poliéster  
PESU: Polietersulfona

PET: Tereftalato de polietileno

PMS: Productos microbianos solubles

POM: Polioximetileno

PP: Polipropileno

PPCPs: Productos farmacéuticos y de cuidado personal

PS: Poliestireno

PS/PAN/PMA: Poliestireno:acrilonitrilo:metilacrilato

PU: Poliuretano

PVC: Policloruro de vinilo

PVDF: Fluoruro de polivinilideno

RA: Rayón

RSF: Filtración rápida en arena

SPE: Sustancias poliméricas extracelulares

SPE<sub>DL</sub>: SPE débilmente ligadas

SPE<sub>FL</sub>: SPE fuertemente ligadas

SPE<sub>L</sub>: Sustancias poliméricas extracelulares ligadas

SPEs: Sustancias poliméricas extracelulares solubles

SSF: Sólidos suspendidos fijos

SSLM: Sólidos suspendidos en el licor mezcla

SST: Sólidos suspendidos totales

SSV: Sólidos suspendidos volátiles

SSVLM: Sólidos suspendidos volátiles en el licor mezcla

TRC: Tiempo de retención celular

TRH: Tiempo de retención hidráulica

TRS: Tiempo de retención de sólidos

UV: Ultravioleta

# Lista de figuras

Figura 1. Diferentes rutas de emisión y exposición de MPs a los seres vivos. Extraído de Du et al. (2022). .....	15
Figura 2. Ejemplos de distintas morfologías en MPs: a) fibras; b) espuma; c) pellet; d) film e) fragmento. ....	18
Figura 3. Diagrama de flujo de una EDARU convencional. Extraído de Sánchez et al. (2020). ....	19
Figura 4. Esquema de las distintas configuraciones en un MBR: a) Membrana sumergida; b) Membrana externa. Extraído de Ruiz (2018). ....	23
Figura 5. Configuraciones comerciales de membrana en MBR. Modificado de Rodríguez (2009) <sup>50</sup> .....	24
Figura 6. Estructura SPE. Modificada de Fard y Wu (2023). ....	29
Figura 7. Esquema de la EDAR estudiada en este TFG. ....	36
Figura 8. Centrífugas utilizadas en este procedimiento; a) Extracción y preparación de la muestra de MPS; b) Extracción y preparación de SPE .....	39
Figura 9. Espectrofotómetros empleados para la caracterización de la composición de las SPE; a) ácidos húmicos y proteínas; b) carbohidratos. ....	41
Figura 10. Rectas de calibrado para las proteínas utilizadas durante los meses de estudio; febrero (línea azul); marzo y abril (línea naranja); mayo, junio y julio (línea gris). .....	42
Figura 11. Rectas de calibrado para los ácidos húmicos utilizadas durante los meses de estudio; febrero (línea azul); marzo y abril (línea naranja); mayo, junio y julio (línea gris). ....	43
Figura 12. Rectas de calibrado para los carbohidratos utilizadas durante los meses de estudio; febrero (línea azul); marzo y abril (línea naranja); mayo, junio y julio (línea gris). ....	44



Figura 13. Esquema del procedimiento experimental seguido para la determinación de SPE (contenido en proteínas, ácidos húmicos y carbohidratos) .....	45
Figura 14. Material utilizado en el pretratamiento de la muestra. a) Tamices de distintos tamaños de poro: 500, 250, 100 y 20 $\mu\text{m}$ , b) Equipo de filtración.....	48
Figura 15. Estereomicroscopio Leica M205FA utilizado en este trabajo. ....	49
Figura 16. Preparación de las muestras. a) Fragmento azul en el filtro, b) Fragmento cogido con las pinzas, c) Fragmento en la placa Petri de vidrio. ....	50
Figura 17. Espectrofotómetro FTIR Spotlight 200i de Perkin Elmer utilizado en este TFG. ....	51
Figura 18. Evolución de la concentración (g/L) de SST, SSF y SSV a lo largo de los meses de estudio. Todos los errores de SD son inferiores al 10%. ....	53
Figura 19. Evolución de la concentración (mg/L) de SPE a lo largo de los meses de estudio; a) ácidos húmicos, b) proteínas, c) carbohidratos, d) SPE totales. Todos los errores de SD son inferiores al 10%. ....	56
Figura 20. Variación de la concentración (mg/g SS) de ácidos húmicos, proteínas y carbohidratos solubles y enlazados a lo largo de los meses de estudio; a) mg/g SST, b) mg/g SSF, c) mg/g SSV.....	57
Figura 21. Porcentaje medio de proteínas, carbohidratos y ácidos húmicos en SPE totales entre los meses de febrero y julio. ....	58
Figura 22. Evolución de la concentración de MPs en el licor mezcla bruto (MPs/L) y en el sólido centrifugado (MPs/L sedimentado) y, el porcentaje de retención de MPs en el sólido con respecto al licor mezcla, a lo largo de los meses en estudio. ....	61
Figura 23. Evolución de la concentración (MPs/g SST, SSV y SSF de licor mezcla) en los meses de estudio. ....	64
Figura 24. Contenido porcentual en función del tamaño de MPs durante los meses de estudio; a) licor mezcla bruto, b) sólido obtenido por centrifugación.....	66

Figura 25. Contenido porcentual en función de la forma de MPs durante los meses de estudio; a) licor mezcla bruto, b) sólido obtenido por centrifugación.....	68
Figura 26. Contenido porcentual en función del color de MPs durante los meses de estudio; a) licor mezcla bruto, b) sólido obtenido por centrifugación.....	69
Figura 27. Contenido porcentual en función de la composición de los MPs durante los meses de estudio; a) licor mezcla bruto, b) sólido obtenido por centrifugación. ....	72
Figura 28. Correlaciones entre el porcentaje de MPs retenidos en el sólido centrifugado y las SPE; a) proteínas, b) carbohidratos, c) ácidos húmicos y d) SPE totales. ....	75
Figura 29. a) Estructura de las SPE; b) Grupos funcionales de los ácidos húmicos e interacciones hidrofóbicas entre húmicos-proteínas; c) Interacciones existentes entre los ácidos húmicos-MPs y las glucoproteínas.....	77
Figura 30. Espectro infrarrojo obtenido a través del FTIR para un microplástico que se corresponde con el polipropileno (PP). ....	91
Figura 31. Espectro infrarrojo obtenido a través del FTIR para un microplástico que se corresponde con el poliéster (PES).....	91
Figura 32. Espectro infrarrojo obtenido a través del FTIR para un microplástico que se corresponde con el tereftalato de polietileno (PET). ....	92
Figura 33. Espectro infrarrojo obtenido a través del FTIR para un microplástico que se corresponde con el rayón (RA).....	92
Figura 34. Espectro infrarrojo obtenido a través del FTIR para un microplástico que se corresponde con el polietileno (PE).....	93
Figura 35. Espectro infrarrojo obtenido a través del FTIR para un microplástico que se corresponde con el copolímero polietileno:polipropileno (PE/PP). ....	93
Figura 36. Espectro infrarrojo obtenido a través del FTIR para un microplástico que se corresponde con el norborneno (NBE). ....	94
Figura 37. Espectro infrarrojo obtenido a través del FTIR para un microplástico que se corresponde con el ácido poliacrílico (PAA). ....	94

Figura 38. Espectro infrarrojo obtenido a través del FTIR para un microplástico que se corresponde con la celulosa (CE). ..... 95

Figura 39. Espectro infrarrojo obtenido a través del FTIR para un microplástico que se corresponde con el algodón. .... 95

Figura 40. Espectro infrarrojo obtenido a través del FTIR para un microplástico que se corresponde con polietilenimina (PEI). ..... 96

Figura 41. Espectro infrarrojo obtenido a través del FTIR para un microplástico que se corresponde con policloruro de vinilo (PVC)..... 96

Figura 42. Espectro infrarrojo obtenido a través del FTIR para un microplástico que se corresponde con poliuretano (PU). ..... 97

Figura 43. Espectro infrarrojo obtenido a través del FTIR para un microplástico que se corresponde con resina epoxi (ER). ..... 97

Figura 44. Espectro infrarrojo obtenido a través del FTIR para un microplástico que se corresponde con polioximetileno (poliacetal, POM)..... 98

Figura 45. Espectro infrarrojo obtenido a través del FTIR para un microplástico que se corresponde con poliestireno (PS). ..... 98

Figura 46. Espectro infrarrojo obtenido a través del FTIR para un microplástico que se corresponde con látex. .... 99

Figura 47. Espectro infrarrojo obtenido a través del FTIR para un microplástico que se corresponde con poliestireno:acrilonitrilo:metilacrilato (PS/PAN/PMA)..... 99

# Lista de tablas

Tabla 1. Estudios de eliminación de MPs en MBR en distintas EDAR.....	28
Tabla 2. Estudios sobre la relación entre MBR y SPE. ARI: Aguas residuales industriales, ARU: Aguas residuales urbanas, SPE <sub>DL</sub> : SPE débilmente ligadas, SPE <sub>FL</sub> : SPE fuertemente ligadas, SSLM: sólidos suspendidos en licor mezcla, SSV: Sólidos suspendidos volátiles, TRH: Tiempo de retención hidráulica, TRC: Tiempo de retención celular. ....	34
Tabla 3. Estudios sobre la relación entre SPE y MPs. HDPE: Polietileno de alta densidad, PE: Polietileno, PS: Poliestireno. ....	35
Tabla 4. Datos de ácidos húmicos y proteínas para la elaboración de las rectas de calibrado durante los meses de estudio. ....	84
Tabla 5. Datos de carbohidratos para la elaboración de las rectas de calibrado durante los meses de estudio. ....	84
Tabla 6. Evolución de la concentración (g/L) de SST, SSF y SSV a lo largo de los meses de estudio.....	85
Tabla 7. Evolución de la concentración (mg/L) de ácidos húmicos, proteínas y carbohidratos a lo largo de los meses de estudio.....	85
Tabla 8. Variación de la concentración (mg/g SST) de ácidos húmicos, proteínas y carbohidratos solubles y enlazados a lo largo de los meses de estudio. ....	85
Tabla 9. Variación de la concentración (mg/g SSF) de ácidos húmicos, proteínas y carbohidratos solubles y enlazados a lo largo de los meses de estudio. ....	86
Tabla 10. Variación de la concentración (mg/g SSV) de ácidos húmicos, proteínas y carbohidratos solubles y enlazados a lo largo de los meses de estudio. ....	86
Tabla 11. Evolución de la concentración de MPs en el licor mezcla bruto y en el sólido centrifugado (MPs/L) y MPs/g sólido seco a lo largo de los meses en estudio. ....	87

Tabla 12. Evolución de la concentración (MPs/g SST, SSV y SSF de licor mezcla) en los meses de estudio. ....	87
Tabla 13. Contenido porcentual en función del tamaño de MPs en el licor mezcla bruto y en el sólido obtenido por centrifugación. Bruto, se considera al licor mezcla bruto; sólido, sólido centrifugado. ....	87
Tabla 14. Contenido porcentual en función de la forma de MPs en el licor mezcla bruto y en el sólido centrifugado durante los meses de estudio. ....	88
Tabla 15. Contenido porcentual en función del color de MPs durante los meses de estudio en el licor mezcla bruto y en el sólido obtenido por centrifugación. ....	89
Tabla 16. Concentración de proteínas, carbohidratos y ácidos húmicos (mg/L), concentración de MPs en el licor mezcla bruto y en el sólido centrifugado (Nº MPs/L) y porcentajes de MPs retenidos en el sólido centrifugado. ....	90

# 1. Introducción y objetivos

Durante varias décadas, el plástico ha sido el material más producido y utilizado a nivel mundial en la vida diaria, y su uso continúa incrementándose año tras año, generando cada vez más residuos que son difíciles de gestionar. Según Plastics Europe (2022)<sup>1</sup>, China es el mayor productor de plásticos, seguida por Europa y América del Norte. La producción global de plásticos se ha incrementado de 2 millones de toneladas en la década de 1950 a 390 millones de toneladas en 2021, creciendo un 4% con respecto al año anterior, lo que supone también un aumento de los impactos ambientales asociados a la producción y gestión de este material<sup>2</sup>.

La fragmentación y/o degradación de los plásticos conduce a la generación de partículas más pequeñas, entre las que destacan los microplásticos (MPs). Una particularidad de estas micropartículas es su ubicuidad, están presente en medios terrestres, aéreos y especialmente, en los acuáticos<sup>3</sup>. Se han encontrado MPs en océanos, estuarios, lagos, ríos, hielo ártico, aguas residuales, aguas superficiales, sedimentos marinos, playas, etc<sup>4</sup>. El agua es el principal medio de transporte de MPs y las estaciones depuradoras de aguas residuales (EDAR) reciben millones de MPs al día a través de la red de saneamiento, siendo uno de los principales focos de emisión de MPs al medio ambiente. El origen de los MPs puede ser agrícola, industrial o urbano, destacando el uso de las lavadoras y lavavajillas, el desgaste de los neumáticos, el uso de mascarillas durante la COVID-19, la deposición atmosférica, etc<sup>5,6</sup>.

La cantidad de plástico vertida al océano depende de la densidad de población, las emisiones de las cuencas hidrográficas y la actividad marítima. Se ha estimado que hay 5,25 billones de partículas de plástico flotando en los océanos del mundo, de los cuales el 11% son microplásticos. Si continúa esta tendencia, se prevé que para 2050, la cantidad de plástico en los océanos será superior en masa a la cantidad de peces<sup>7</sup>.

A pesar de la alta eficacia de eliminación de MPs que una EDAR puede alcanzar (>90%), se siguen emitiendo una gran cantidad de MPs a los medios acuáticos, suponiendo una amenaza para los organismos marinos<sup>3,6</sup> puesto que se acumulan en el sistema gastrointestinal de estos<sup>8</sup>. Se han encontrado MPs en pescados, langostas, mejillones, ostras y vieiras, entre otros muchos, lo que puede conllevar su paso a la cadena trófica y la ingesta de estas micropartículas por parte de los seres humanos. También se ha

observado la presencia de MPs en alimentos de consumo diario, tales como la sal común, el azúcar, la miel, la cerveza, el agua embotellada, el agua del grifo<sup>9</sup> e incluso la leche en polvo para bebés<sup>10</sup>. Estos MPs pueden ser absorbidos por el sistema sanguíneo, alterando el sistema inmunológico intestinal y dificultando la absorción de nutrientes<sup>11,12</sup>. Se estima que un ser humano puede ingerir entre 39.000 y 52.000 de MPs al año, pudiendo aumentar esta cantidad en 56.000 partículas anuales adicionales debido al consumo de agua del grifo<sup>4</sup>.

Aunque la ingesta es la vía más importante de entrada de los MPs en los seres humanos, existen otras formas de exposición como la inhalación, donde las partículas más pequeñas y menos densas penetran en los pulmones (Figura 1), provocando inflamación crónica<sup>13</sup> y enfermedades pulmonares<sup>14</sup>, o el contacto dérmico (la vía menos relevante, aunque se ha encontrado que los plásticos pueden provocar reacciones inflamatorias bajas y respuestas a cuerpos extraños)<sup>15</sup>. Teniendo en cuenta todas las vías de exposición, se estima que un humano puede ingerir una cantidad de MPs en peso que puede oscilar entre 0,1 y 5 g a la semana<sup>16</sup>.

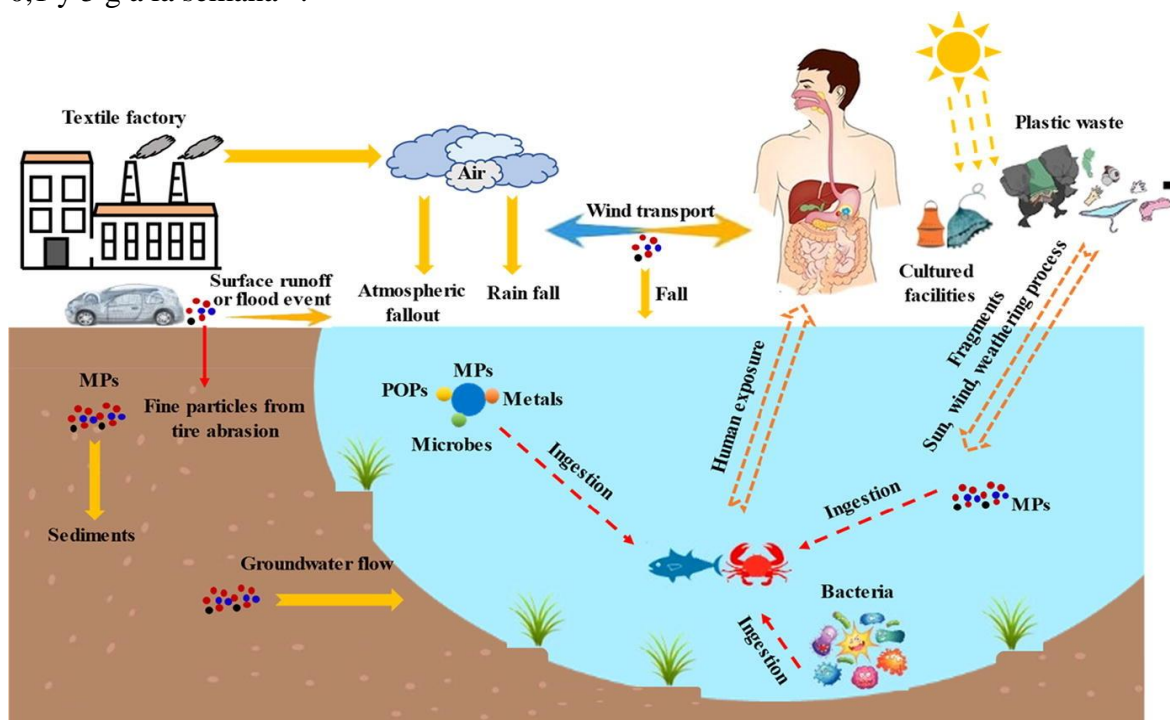


Figura 1. Diferentes rutas de emisión y exposición de MPs a los seres vivos. Extraído de Du et al. (2022)<sup>17</sup>.

La potencial toxicidad de los MPs resulta evidente y su resistencia a la degradación dificulta su eliminación de los órganos, provocando inflamación crónica y aumentando el riesgo de cáncer<sup>8</sup>. Asimismo, se ha encontrado que los MPs pueden estar relacionados

con diversas enfermedades inmunológicas, neurodegenerativas o inflamatorias<sup>18</sup>, como la enfermedad de Crohn<sup>19</sup>.

Por lo tanto, con el objetivo de evaluar los factores implicados en la liberación de MPs a los medios acuáticos en los efluentes de las plantas de tratamiento de aguas residuales, en el presente TFG se ha analizado durante 6 meses la eliminación de estos microcontaminantes en un biorreactor de membrana (MBR) de una EDAR localizada en Murcia en relación a la presencia de sustancias poliméricas extracelulares (SPE). Para ello, se han planteado los siguientes objetivos específicos:

- Evaluar las características y evolución de microplásticos con el tiempo en muestras de licor de mezcla procedentes del MBR.
- Evaluar las características y evolución de las sustancias poliméricas extracelulares (SPE) presentes en el MBR, en concreto la concentración de proteínas, ácidos húmicos y carbohidratos.
- Evaluar posibles interacciones existentes entre las SPE y los MPs, a fin de determinar la existencia de posibles correlaciones que permitan ampliar el conocimiento sobre la capacidad de retención de MPs en sistemas de lodos activados.



## 2. Contexto actual

### 2.1 Clasificación y origen de microplásticos: Concepto, origen y clasificación de los microplásticos.

El concepto de microplástico viene definido por su tamaño, refiriéndose a partículas plásticas con diámetros inferiores a los 5 mm<sup>20,21</sup>. Por lo general, se suele considerar como límite inferior el tamaño de 1 µm, aunque no existe un convenio claro<sup>22</sup>.

Los microplásticos se clasifican según su origen en dos grupos principales: primarios y secundarios. Los MPs primarios se fabrican intencionadamente, en forma microscópica, para ser añadidos a diversos productos, como cosméticos, productos de limpieza e higiene, pinturas, detergentes, etc. También pertenecen a este grupo los subproductos generados durante el lavado de materiales textiles o la producción de materiales plásticos a nivel industrial<sup>23,24</sup>. Por otro lado, los MPs secundarios se originan por la degradación de plásticos de mayor tamaño mediante procesos fotolíticos, biológicos y/o mecánicos. En concreto, los MPs que provienen de esta última vía son los más abundantes en medios marinos y terrestres<sup>24</sup>.

Los microplásticos se pueden clasificar también en función de su forma, color o composición. Según su forma, se pueden dividir en fibras, fragmentos, films, microesferas (pellets) y espumas<sup>3</sup>, tal y como se muestra en la Figura 2. En las aguas residuales urbanas, la forma más común son las fibras, que representan el 48,5% del total, seguidas por los fragmentos (31%), los pellets (6,5%), los films (5,5%) y las espumas (3,5%)<sup>25</sup>.

En cuanto al color de los MPs, se observa una amplia gama, siendo los más comunes beige, blanco, negro, azul y verde<sup>26</sup>. Hay que destacar que la clasificación por color no tiene una importancia fundamental a la hora de caracterizar los microplásticos, aunque sí que es cierto que suele ser mencionada por diversos autores como una característica principal que determina su ingesta por parte de muchos organismos acuáticos, que ingieren una micropartícula u otra en función de su color<sup>27</sup>.

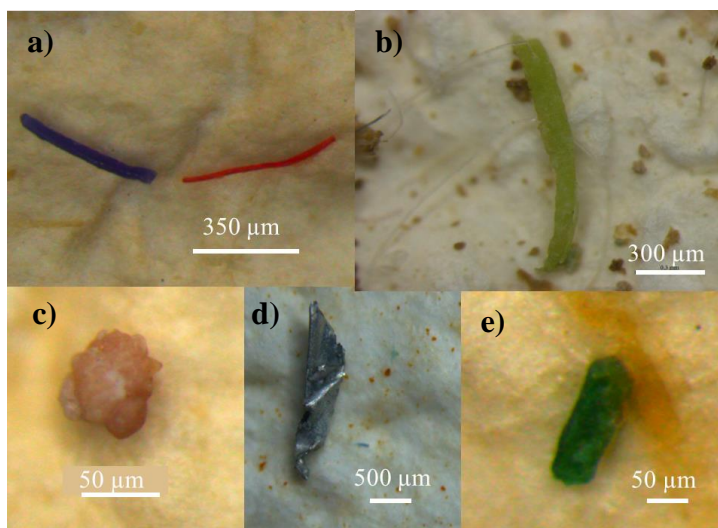


Figura 2. Ejemplos de distintas morfologías en MPs: a) fibras; b) espuma; c) pellet; d) film e) fragmento.

Por último, según su composición química, los polímeros más frecuentes encontrados en aguas residuales urbanas son los siguientes, polipropileno (PP), polietileno (PE), policloruro de vinilo (PVC), poliestireno (PS) y tereftalato de polietileno (PET)<sup>24</sup>.

## 2.2 Incidencia de microplásticos en EDAR

Las Estaciones Depuradoras de Aguas Residuales (EDARs) son instalaciones cuyo objetivo es tratar las aguas residuales urbanas, industriales y domésticas para eliminar los contaminantes y garantizar que no causen impactos negativos en la salud humana y los ecosistemas<sup>28</sup>. A pesar de que no cuentan con tecnologías específicas para la eliminación de estas micropartículas, estas instalaciones son capaces de llegar a eliminar más del 90% de los microplásticos de la línea de aguas<sup>26</sup>. Sin embargo, debido a las grandes cantidades de microplásticos que estas plantas de tratamiento reciben a través de la red de saneamiento (entre 0,28 y  $3,14 \cdot 10^4$  MPs/L<sup>6</sup>), son consideradas una de las principales fuentes emisoras de estas partículas a los ecosistemas acuáticos<sup>29,30</sup>. En la Figura 3 se muestra como ejemplo el diagrama de flujo de una Estación Depuradora de Aguas Residuales Urbanas (EDARU) convencional, que consta de varias etapas: pretratamiento, tratamiento primario, tratamiento secundario y tratamiento terciario.

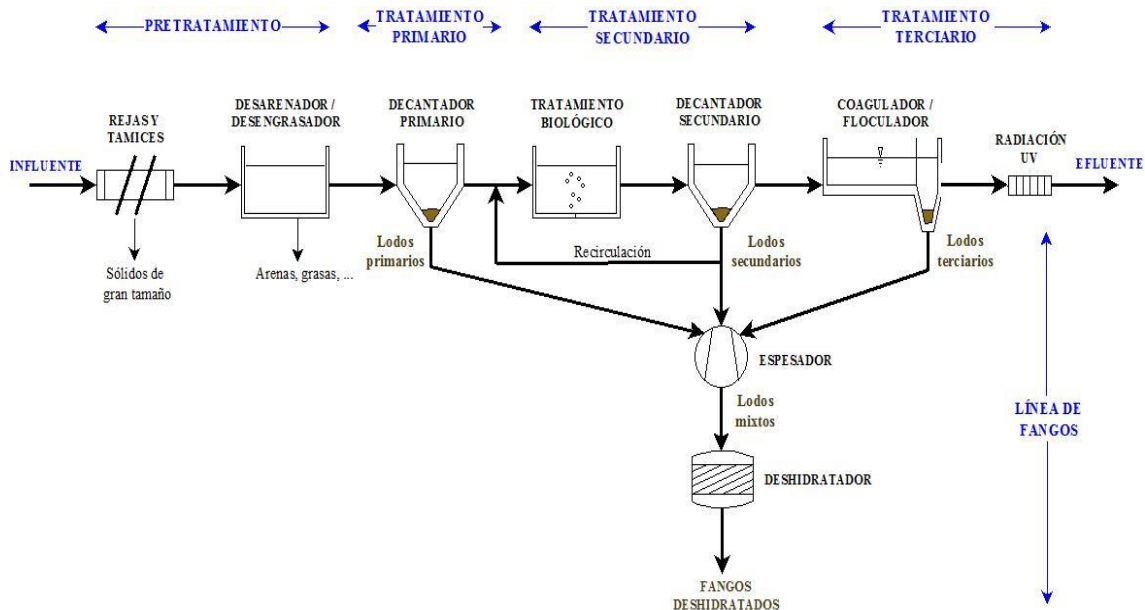


Figura 3. Diagrama de flujo de una EDARU convencional. Extraído de Sánchez et al. (2020)<sup>31</sup>.

### 2.2.1. Pretratamiento

El pretratamiento tiene como objetivo eliminar las materias gruesas que se encuentran en el agua residual. La ausencia de esta etapa podría causar atascos y otros problemas de funcionamiento de la planta. En una EDAR convencional el pretratamiento hace referencia a las operaciones de desbaste, incluye habitualmente rejas y/o tamices, así como una etapa de desarenado/desengrasado.

El agua residual bruta pasa a través de diferentes sistemas de cribado, como rejas y tamices, con un tamaño de malla que suele estar entre 1 y 6 mm, permitiendo eliminar las partículas más grandes. A continuación, el agua residual continúa por la línea de aguas y llega al desarenador/desengrasador, donde se elimina la arena por decantación (desarenado) y la grasa por laminación (desengrasado). En esta etapa, se pueden eliminar microplásticos con la arena y la grasa, logrando eficacias de eliminación de hasta el 45%<sup>32</sup> o de más del 69 - 79% de los MPs si se tiene en cuenta el proceso de cribado (considerando MPs entre 1 y 5 mm)<sup>33</sup>.

### 2.2.2. Tratamiento primario

El tratamiento primario es un proceso físico en el que se emplea un decantador para eliminar los sólidos en suspensión. El agua clarificada se separa por la parte superior, mientras que las partículas con densidad mayor que la del agua sedimentan en el fondo por acción de la gravedad. Por lo tanto, se generan dos corrientes, un efluente menos turbio y una línea de lodos primarios.

La eliminación de sólidos y microplásticos en esta etapa depende de factores como la temperatura, el tiempo de retención, la velocidad de flujo y las características del sedimentador y de las partículas. En este proceso se pueden eliminar hasta el 50% de los MPs, incrementándose la eficacia al aumentar el tiempo de retención o la temperatura de operación<sup>34</sup>, y, conjuntamente con el pretratamiento, pueden alcanzar entre un 78 - 98% de eliminación con respecto al agua residual bruta<sup>35</sup>. De acuerdo con Liu et al. (2021)<sup>36</sup>, en esta etapa se eliminan preferentemente las fibras, mientras que, respecto al tamaño, aquellas partículas mayores de 500  $\mu\text{m}$  son las que quedan retenidas principalmente. Por lo general, las microfibras son difíciles de eliminar debido a su elevada relación longitud-anchura<sup>37</sup>, aunque hay determinadas condiciones operativas que reducen la concentración de estas micropartículas en el efluente del clarificado hasta un 58%<sup>38</sup>, ya que estas se quedan atrapadas con mayor facilidad en los sólidos durante la decantación<sup>39</sup>.

### 2.2.3. Tratamiento secundario

Este proceso consiste en un tratamiento biológico aerobio mediante un sistema de lodos activado, de manera que los microorganismos degradan la materia orgánica en presencia de oxígeno. En este sistema se diferencian dos etapas: una etapa de aireación, donde se produce la degradación de la materia orgánica por parte de los microorganismos presentes en el reactor, seguido de una la operación de decantación (sedimentador secundario), donde se separa el agua tratada de los lodos biológicos (lodos secundarios).

En la etapa de aireación, algunos microplásticos pueden ser emitidos a la atmósfera debido a la emisión de aerosoles<sup>34</sup>. En términos generales, algunos autores han estimado que en la decantación secundaria se pueden eliminar entre el 7% y el 20% de los MPs presentes en el agua bruta<sup>29,34</sup>, mientras que Hidayaturrahman y Lee (2019)<sup>38</sup> indicaron eficiencias de eliminación de microfibras del 60% en esta etapa. El tratamiento secundario tiene un impacto destacable en la reducción de fragmentos, aunque también se eliminan fibras (preferentemente menores de 500  $\mu\text{m}$ )<sup>36</sup>.

#### 2.2.4. Tratamiento terciario

Es la última etapa del tratamiento de las aguas residuales y busca mejorar la calidad del efluente con el fin de reutilizarlo o verterlo de manera segura al medio ambiente. Sus objetivos son diversos según el caso, como, por ejemplo, la reducción de la contaminación microbiológica o la eliminación de nutrientes, por lo que se pueden emplean distintos procesos, siendo los más comunes: coagulación–floculación, sedimentación, filtración o desinfección mediante cloración o irradiación UV<sup>30,34</sup>.

La coagulación–floculación y la filtración mejoran la eliminación de sólidos y reducen la turbidez del agua tratada, mientras que el tratamiento UV permite la eliminación de organismos patógenos hasta alcanzar un nivel determinado como seguro para la salud humana. Algunos estudios, indican que la cloración sólo reduce la concentración de microplásticos en un 7%, mientras que la filtración rápida en arena (RSF) puede eliminar entre un 45% y un 97% de los MPs presentes en el efluente procedente del tratamiento secundario<sup>4</sup>. En esta etapa, se elimina menos cantidad de MPs que en los tratamientos primario y secundario, debido a que la cantidad de sólidos suspendidos es muy baja, siendo las micropartículas de tamaños muy pequeños y difíciles de eliminar<sup>36</sup>. Los sistemas de membrana, como las membranas dinámicas (cuando actúan solas), poseen el mejor rendimiento de eliminación de MPs dentro de los tratamientos terciarios existentes ( $\geq 99\%$ )<sup>3,34</sup>. Se estima que, con tratamientos terciarios avanzados, como la degradación catalítica, se puedan obtener rendimientos semejantes a los obtenidos a las membranas dinámicas<sup>29,34</sup>.

#### 2.2.5. Lodos

Como se ha comentado anteriormente, los lodos procedentes del tratamiento primario y del secundario se denominan lodos primarios y secundarios, respectivamente, y la mezcla de ambos se conoce como lodos mixtos. Durante el tratamiento terciario, la cantidad de lodos generados es despreciable en comparación con el volumen de lodos primarios y secundarios<sup>40</sup>. Frecuentemente, la gestión de los lodos se basa en un proceso de espesamiento para reducir su volumen, seguido de una estabilización para evitar problemas de fermentación y de una deshidratación mecánica para reducir la humedad, para que sean más manejables y económico su transporte. Los lodos deshidratados pueden ser aprovechados como fertilizantes orgánicos en suelos agrícolas, sin embargo, también pueden ser depositados en vertederos o incinerados<sup>41</sup>.

Se ha observado que la mayoría de los microplásticos eliminados en las aguas residuales se acumulan en los lodos mixtos, en concreto, el 73% de los MPs queda retenido en los lodos primarios, mientras que el 20% son atrapados en los lodos secundarios<sup>42</sup>. Varios estudios han señalado que los lodos mixtos húmedos pueden contener entre 400 y 7.000 MPs/kg, mientras que en lodos mixtos secos el rango encontrado es mucho mayor (1.500 -170.000 MPs/kg). Los microplásticos más comúnmente identificados en lodos son pellets, seguidos de fragmentos, fibras y films<sup>37,43</sup>. Como se ha comentado anteriormente, el tratamiento primario y secundario actúa preferentemente sobre los MPs de mayor tamaño, por lo tanto, en los lodos se encuentra una mayor abundancia de MPs > 500  $\mu\text{m}$ <sup>35</sup>.

La acumulación de microplásticos en lodos puede conllevar ciertos problemas, ya que su empleo como fertilizantes en agricultura, conduce a la liberación y/o retorno de estos microcontaminantes al medio ambiente. Se estima que se vierten entre 44.000 - 300.000 y 63.000 - 430.000 toneladas de MPs a los suelos agrícolas cada año en Europa y Norteamérica, respectivamente, lo que agrava aún más el problema de contaminación<sup>44,45</sup>.

Hasta ahora, no se han desarrollado tecnologías eficaces que permitan la separación de los microplásticos de los lodos, por lo que es necesaria una investigación más detallada en dicho campo, para así evitar la posible liberación de estos microcontaminantes al medioambiente.

### **2.3 Tratamientos biológicos de aguas residuales urbanas: MBR**

Los biorreactores de membranas (MBR) son una evolución de los sistemas tradicionales de fangos activados, ya que combinan la degradación biológica con la separación de sólidos y agua mediante membranas de filtración. Esta tecnología permite el tratamiento de grandes caudales de aguas con altos contenidos de materia orgánica. Son particularmente útiles para aplicaciones específicas donde los procesos convencionales de fangos activados no producen un efluente de óptima calidad y en áreas con limitaciones de espacio. Debido al reducido tamaño de poro de las membranas (aproximadamente 0,4  $\mu\text{m}$ ), se puede conseguir la retención de bacterias, ciertos virus y componentes orgánicos e inorgánicos del agua residual a tratar.

### 2.3.1. Características generales de los MBRs

Los MBR constan de dos partes principales: la unidad biológica, responsable de la degradación de compuestos orgánicos en el agua residual y la unidad de filtración (o módulo de membranas), encargado de la separación física del agua tratada mediante filtración. Según la ubicación de las membranas, se distinguen dos configuraciones posibles: biorreactores con membranas integradas (o sumergidas) y biorreactores con membranas externas (o con recirculación al biorreactor) (Figura 4).

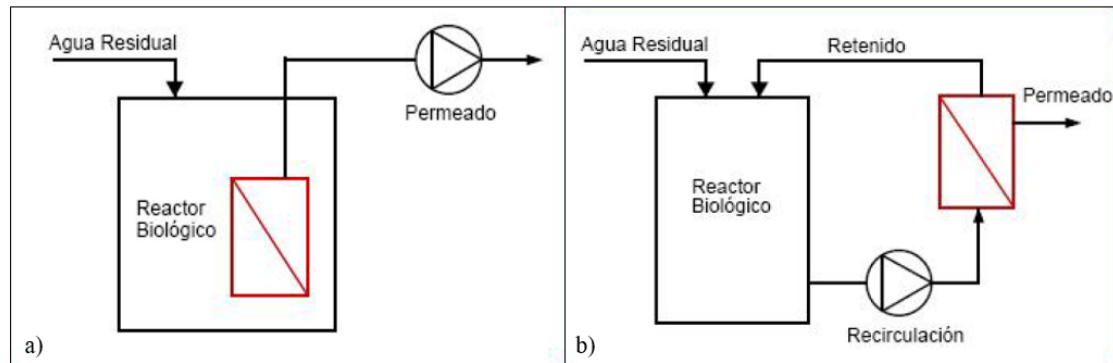


Figura 4. Esquema de las distintas configuraciones en un MBR: a) Membrana sumergida; b) Membrana externa. Extraído de Ruiz (2018)<sup>46</sup>.

La tecnología de membrana sumergida (Figura 4a) se basa en la inmersión de la unidad de membrana en el tanque biológico. La fuerza impulsora se consigue mediante la presurización del biorreactor o con la creación de una presión negativa desde el lado del permeado de la membrana. Se utiliza un difusor de aire para homogeneizar el contenido del tanque, suministrar el aire necesario para el proceso biológico y generar un flujo cruzado que dificulte las deposiciones sobre la membrana. Esta tecnología se aplica en tanques aerobios, donde los difusores de aire se sitúan debajo de la membrana, lo que ayuda a mantener las membranas limpias al crear un flujo de aire tangencial a la membrana que favorece el desprendimiento y arrastre de la película de biomasa que se deposita sobre la superficie de la misma. Además, la limpieza de la membrana se realiza mediante frecuentes retrolavados con agua permeada y aire y ocasionalmente con soluciones químicas, como sosa cáustica o hipoclorito de sodio<sup>47</sup>.

Por otro lado, la configuración de membranas externas (Figura 4b) implica la recirculación del licor mezcla desde el tanque biológico hasta la unidad de membranas que se encuentra en el exterior del biorreactor. La velocidad del agua en la membrana es alta, lo que evita la acumulación de sólidos en la superficie y favorece la eliminación y arrastre de la película de biomasa que se deposita sobre ella. Para crear la fuerza impulsora

necesaria, se produce una sobrepresión en la zona de alimentación mediante una unidad de bombeo. Estos biorreactores tienen como ventaja fundamental la facilidad de operación al poder manipular los tanques independientemente del módulo de membranas, lo que permite, por ejemplo, realizar limpiezas químicas o mantenimiento sin influir en el reactor, así como vaciar el contenido del reactor sin dañar las membranas. Sin embargo, su gasto energético es superior en comparación con los sistemas de membrana sumergida<sup>48,49</sup>.

En términos técnicos, las membranas se instalan en lo que se denomina un “módulo de membrana” que es la unidad principal de operación. Al elegir un tipo de módulo, se deben considerar factores como su tamaño, así como la facilidad de montaje y ensamblaje del sistema. Existen cuatro configuraciones comerciales de membranas: membrana de fibra hueca, plana, tubular y en espiral (Figura 5)<sup>49,50,51</sup>.

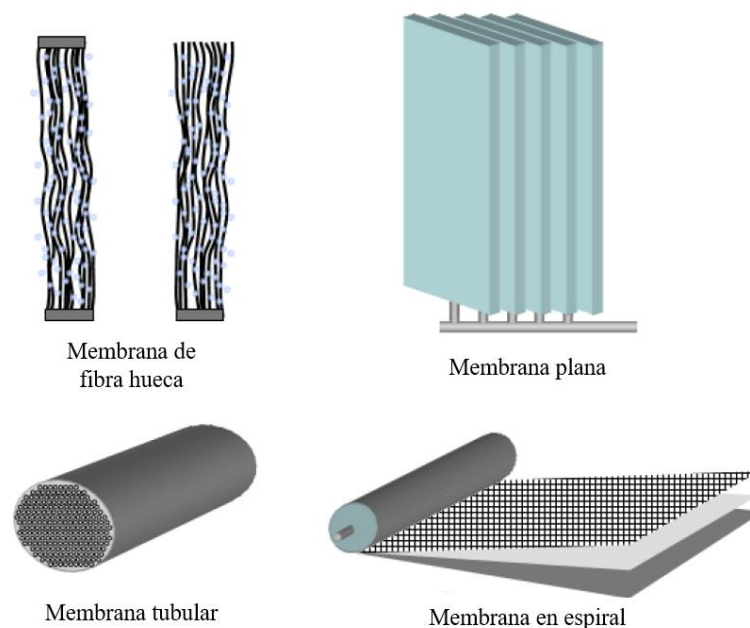


Figura 5. Configuraciones comerciales de membrana en MBR. Modificado de Rodríguez (2009)<sup>50</sup>.

- Membrana de fibra hueca (Figura 5): están formadas por haces de fibras tubulares huecas y de pequeño diámetro, que pueden medir hasta 2 m de longitud. Las fibras están fabricadas de un material polimérico hidrófilo (PE, polietersulfona (PESU), fluoruro de polivinilideno (PVDF), etc.)<sup>52</sup> y tienen tamaños de poro entre 0,04 y 5 mm. Los haces están compuestos por manojos de fibras encapsulados en resina. La alimentación puede fluir a través de las fibras (configuración de dentro hacia fuera) o alrededor de las mismas (configuración de fuera hacia dentro). Los módulos de



membranas se unen para formar un *cassette*, que es la unidad más pequeña de acción del sistema de filtración, y varios *cassettes* unidos forman lo que se conoce como tren de filtración, que es la unidad de proceso que se sumerge en el tanque de membranas<sup>49,50,51</sup>.

- Membrana plana (Figura 5): consisten en placas rectangulares adyacentes separadas 2 mm de ancho y que se apilan mediante paquetes con la siguiente configuración: espaciador - membrana - placa - membrana. Esta estructura ofrece un flujo tangencial mejorado a lo largo de la membrana y una relación superficie/volumen baja. La alimentación se impulsa creando una depresión en el lado del permeado, lo que permite que el flujo circule por los espacios placa - membrana. No suelen presentar problemas importantes de ensuciamiento y son fáciles de desmontar<sup>49,50,51</sup>.
- Membrana tubular (Figura 5): se utilizan en configuraciones de MBR con membranas externas. Son módulos cilíndricos de naturaleza cerámica con un diámetro entre 10 - 20 cm y un largo que puede llegar hasta los 3 m. A pesar de ser muy poco compactos, son muy robustos y pueden soportar flujos a gran velocidad y tolerar aguas con altos niveles de sólidos. Necesitan ser lavadas a contracorriente<sup>49,50,51</sup>.
- Membrana de espiral (Figura 5): son módulos de filtración que consisten en dos capas de membranas enrolladas en espiral alrededor de un colector de permeado en el centro, formando un cilindro. Esta configuración aumenta la densidad de empaquetamiento de las membranas, lo que resulta en módulos muy compactos<sup>49,50,51</sup>.

Entre las ventajas de un MBR respecto al sistema convencional de lodos activados (CAS) se encuentran<sup>49,50,51</sup>:

- Requiere menos espacio para la misma carga másica, y al ser modular tiene capacidad de ampliación, ya que dependiendo del caudal a tratar se puede aumentar o disminuir el número de módulos de membrana.
- Operación con altas concentraciones de biomasa, lo que permite una edad de fango elevada y el desarrollo de bacterias nitrificantes.
- Baja producción de lodos debida su edad elevada, por lo que los costes de tratamiento del fango disminuyen.
- Mejora significativa de la calidad del agua tratada y posibilidad de su reutilización directa.

Por otro lado, algunos de los inconvenientes son<sup>49,50,51</sup>:

- Costes altos. Se necesita una inversión inicial elevada y tiene un consumo energético alto.
- Se necesita un mayor mantenimiento de las membranas para evitar su ensuciamiento. Además, se pueden acumular compuestos inorgánicos no filtrables, como metales pesados, que pueden dañar la población bacteriana.
- Tratamiento de lodos más complejo, ya que la mayoría de los sólidos en suspensión se retienen en el reactor, lo que provoca que los lodos sean más viscosos y difíciles de deshidratar.

### 2.3.2 Eliminación de MPs en MBRs

El análisis y evolución de los MPs en sistemas MBR también ha sido objeto de varios trabajos, se muestra una recopilación de las publicaciones más importantes sobre este tema en la Tabla 1. Como se puede observar, el 86% de los estudios se han llevado a cabo en MBR aerobios, mientras que el 14% restante han sido desarrollados en MBR anaerobios (AnMBR). De los siete estudios mencionados en la Tabla 1, seis utilizan MBR con membrana sumergida, mientras que Park et al. (2020)<sup>53</sup> no especifican que configuración se emplea. El rango de poro de membrana varía entre 0,08 - 0,4  $\mu\text{m}$ , excepto en el caso de Lares et al. (2018)<sup>54</sup> que utilizan un tamaño mayor (0,8  $\mu\text{m}$ ), por lo que en todos los casos se emplea ultrafiltración (< 4  $\mu\text{m}$ ).

Por lo general, el estudio de MPs en MBR se ha llevado a cabo para comprobar la eficacia de eliminación de MPs que estas tecnologías pueden ofrecer. Como se puede observar, la concentración de MPs en el influente del MBR varía entre 0,28 - 133 MPs/L, mientras que en el efluente se encuentra entre 0,05 y 5,9 MPs/L, excepto en el caso de Leslie et al. (2017)<sup>55</sup> donde la concentración de MPs en el efluente es de 51 MPs/L. Las eficacias de eliminación son muy altas, entre 95,6 y 99,9%, aunque también se han indicado porcentajes más bajos del 79%<sup>56</sup> y 25%<sup>55</sup>. Por lo general, se puede considerar que esta tecnología es muy prometedora para la eliminación de microplásticos de la línea de aguas de una EDAR, ya que la concentración emitida de estos microcontaminantes (MPs/L) en el efluente de la planta puede llegar a ser inferior a la unidad.

En relación a la morfología de los MPs, se ha observado que en el influente predominan mayoritariamente las fibras (32 - 80%) y los fragmentos (7 - 68%), seguidos de pellets (1

- 11%) y films (2%). Por otro lado, en el efluente se detecta mayor presencia de fibras (18 - 100%), seguidas de fragmentos (11 - 82%) y pellets (0 - 6%). Por tanto, es importante destacar que los films y los pellets son las partículas más fáciles de eliminar, seguidos de los fragmentos y finalmente las fibras. Por ejemplo, en el caso de Michielssen et al. (2016)<sup>57</sup> los films, pellets y fragmentos se eliminan con mayor facilidad, mientras que la proporción de fibras aumenta de forma destacable en el efluente. Esta misma tendencia es descrita por Lares et al. (2018)<sup>54</sup> y Talvitie et al. (2017)<sup>58</sup>, donde los fragmentos se eliminan en el MBR con mayor facilidad. Sin embargo, Park et al. (2020)<sup>53</sup> observan lo contrario, puesto que, en este caso, son las fibras las que se eliminan con mayor facilidad. En términos generales, y como se ha indicado anteriormente, las fibras son las micropartículas que se eliminan peor debido a su elevada relación longitud - anchura, lo que les permite atravesar la membrana longitudinalmente. Esto es corroborado por Freeman et al. (2020)<sup>59</sup> que indican que las altas tasas de eliminación de MPs del agua residual con un MBR implicaría la retención de toda morfología microplástica, excepto las fibras que serían las únicas partículas detectables en el efluente.

En definitiva, la tecnología MBR es un enfoque cada vez más aceptado y una solución importante para el tratamiento de aguas residuales en la industria, ya que reduce los costes económicos, sociales y medioambientales del proceso y mejora la sostenibilidad medioambiental de las EDARs<sup>56</sup>. Además, es un sistema apropiado para la eliminación de microplásticos, ya que puede llegar a reducir la concentración de estas partículas en el efluente hasta <1 MPs/L, lo que se traduce en un efluente de calidad óptima en cuanto a contaminación microplástica.

Tabla 1. Estudios de eliminación de MPs en MBR en distintas EDAR.

País	Tipo MBR	Influyente MBR (MPs/L)	Efluente MBR (MPs/L)	Eliminación de MPs (%)	Composición morfológica de MPs en influente	Composición morfológica de MPs en efluente	Referencia
China	Membrana sumergida con tamaño poro 0,1 $\mu\text{m}$	0,28	0,05	99,5	Fibras (50%) Fragmentos (50%)		60
Corea del Sur	-	-	-	99,4 – 99,9	Fragmentos (68%) Fibras (32%)	Fragmentos (82%) Fibras (18%)	53
E.E.U.U.	MBR anaerobio con membrana sumergida y tamaño poro 0,2 $\mu\text{m}$	133,0	5,9	95,6	Fibras (55 - 62%) Fragmentos (23 - 26%) Microesferas (11-16%) Otros (4%)	Fibras (61 - 89%) Fragmentos (11-33%) Microesferas (0-6%)	57
España	Membrana sumergida	4,40	-	79	Fibras (61%) Films (31%) Fragmentos (7%) Esferas (1%)		61
Finlandia	Membrana sumergida con tamaño de poro 0,8 $\mu\text{m}$	57,6	1,0	99,4	Fibras (60%) Fragmentos (40%)	Fibras (65%) Fragmentos (35%)	54
Finlandia	Membrana sumergida con tamaño de poro 0,4 $\mu\text{m}$ + ultrafiltración	6,9	0,05	99,9	Fibras (80%) Fragmentos (7%) Films (2%) Otros (10%)	Fibras (100%)	58
Países Bajos	Membrana con tamaño poro 0,08 $\mu\text{m}$	68	51	25	Fibras Films Esferas		55

## 2.4 Sustancias poliméricas extracelulares (SPE) en sistemas de depuración biológica de aguas residuales

### 2.4.1. Composición de las SPE.

Las sustancias poliméricas extracelulares (SPE), son compuestos secretados por los microorganismos, incluyendo bacterias, hongos y algas, que forman una matriz extracelular que los rodea. Estos compuestos de alto peso molecular están formados principalmente por carbohidratos, pero también incluyen proteínas, ácidos nucleicos, lípidos y en menor cantidad ADN y otras macromoléculas<sup>62</sup>. Estas sustancias tienen una función importante en la protección de las células contra agentes tóxicos y la deshidratación, así como en procesos de adhesión y agregación de bacterias para formar biopelículas y flóculos<sup>63</sup>. Las SPE pueden hallarse alrededor de la pared celular o en disolución en el medio, de modo que las que están unidas a los microorganismos se las denomina SPE enlazadas o ligadas (SPE<sub>L</sub>), mientras que a las que están en disolución se las conoce como SPE solubles (SPE<sub>S</sub>) o productos microbianos solubles (PMS) (Figura 6).

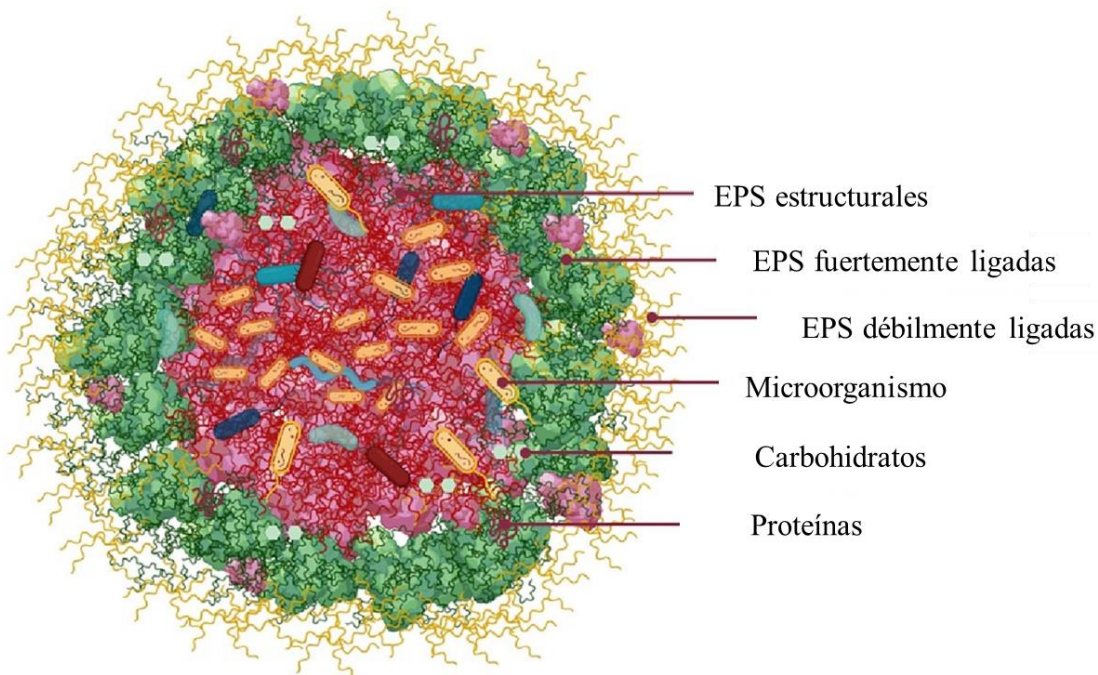


Figura 6. Estructura SPE. Modificada de Fard y Wu (2023)<sup>64</sup>.

Las SPE<sub>S</sub> son compuestos solubles que se liberan al medio durante la metabolización del sustrato o la descomposición de la biomasa, siendo esta liberación más rápida cuando los microorganismos se encuentran en situación de estrés ambiental originados, por ejemplo,

por cambios de temperatura, modificaciones en el pH, falta de alimento o presencia de sustancias tóxicas. Comprenden un amplio rango de pesos moleculares, y su distribución es importante para definir la eficacia del tratamiento biológico, puesto que la cantidad de compuestos con peso molecular alto se incrementa con la edad del lodo.

Por otro lado, las SPE<sub>L</sub> son una mezcla compleja de macromoléculas biológicas que se encuentran en la superficie externa de la pared celular y en el interior de los agregados microbianos. Estas macromoléculas de alto peso molecular se sintetizan mediante diferentes procesos (secreción activa, desprendimiento de material de la superficie celular, etc.). Participan en diversas funciones celulares como la adherencia a superficies, la formación de una barrera protectora, la retención de agua, la estabilización de la estructura de la biopelícula y la acumulación de enzimas. Las SPE<sub>L</sub> están formadas principalmente por proteínas, carbohidratos y ácidos húmicos, y se distribuyen alrededor de la pared celular en una estructura dinámica de doble capa, subdividida en SPE fuertemente ligadas (capa interna, SPE<sub>FL</sub>) y en SPE débilmente ligadas (capa externa, SPE<sub>DL</sub>). En ambas, las proteínas son más abundantes (40 - 56%), seguidas de los ácidos húmicos (28 - 50%) y de los carbohidratos (10 - 16%)<sup>65,66</sup>.

Se ha estimado que la cantidad de metabolitos presentes en SPE<sub>DL</sub> representa la quinta parte de la cantidad total de SPE. Las proteínas se encuentran principalmente en SPE<sub>FL</sub> (97%), mientras que los ácidos húmicos están presentes en ambas fracciones y los carbohidratos se distribuyen uniformemente tanto en SPE<sub>DL</sub> como SPE<sub>FL</sub><sup>67,68</sup>.

#### *2.4.2. Comportamiento de las SPE en sistemas de lodos activados*

Las SPE influyen en las propiedades de los agregados microbianos debido a sus características únicas, tales como la capacidad de adsorción, biodegradabilidad o hidrofobicidad/hidrofilicidad. Estas características dependen de los componentes que forman las SPE, incluyendo carbohidratos, proteínas, ácidos nucleicos y ácidos húmicos<sup>69</sup>.

Debido a la diversidad de grupos funcionales presentes en las SPE, estas especies pueden desempeñar un papel importante en el transporte y la transformación de microcontaminantes mediante el proceso de adsorción. En presencia de tóxicos como compuestos farmacéuticos o pesticidas, se produce un aumento en la producción de SPE por parte de las células, formando una capa protectora contra el agente externo. También es destacable la adsorción tanto de metales como de materia orgánica debido a los grupos

aromáticos, los alifáticos en las proteínas o las regiones hidrofóbicas en los carbohidratos<sup>69,70</sup>.

Por otra parte, las bacterias utilizan las SPE como fuente de carbono y energía debido a que contienen proteínas y carbohidratos que pueden ser degradados por las enzimas durante el tratamiento biológico. Sin embargo, una parte de las SPE producidas por gránulos aeróbicos no puede ser biodegradada por los microorganismos y se encuentra en las capas externas de los gránulos, mientras que la fracción biodegradable está en la capa interna. Las SPE no biodegradables mantienen la estructura granular, y las biodegradables adoptan el papel de reservas para épocas de escasez de alimento<sup>63</sup>.

Las SPE contienen tanto grupos hidrofílicos como hidrofóbicos, lo que las hace anfóteras. Aproximadamente el 7% de estas sustancias son hidrofóbicas y principalmente compuestas por proteínas, mientras que la fracción hidrofílica está constituida fundamentalmente por carbohidratos. Este carácter anfótero influye en la capacidad de adhesión, floculación, asentamiento y deshidratación de las SPE y, por tanto, de los flóculos, y es un factor importante en la formación de biofilms en los sistemas de tratamiento de aguas residuales. En condiciones extremas de pH, temperatura, oxígeno disuelto (DO), salinidad o toxicidad del agua a tratar se puede producir la defloculación del fango, es decir la ausencia de asociación que ocurre cuando predominan las fuerzas repulsivas entre partículas<sup>67,69</sup>.

#### *2.4.3. Efectos de las SPE sobre los MBRs*

Uno de los problemas que plantea el funcionamiento de los MBRs es el ensuciamiento de las membranas. Esto se debe a la presencia de componentes de las aguas residuales como coloides, partículas minerales, componentes iónicos, microorganismos y, principalmente, SPE<sup>71</sup>.

En la Tabla 2 se muestra una recopilación de los principales estudios publicados hasta el momento acerca del efecto de las SPE en MBR. De los cinco estudios mencionados, cuatro se han llevado a cabo a escala de laboratorio, excepto Bin et al. (2008)<sup>72</sup> que desarrollaron su trabajo en una EDAR real.

Chabalina et al. (2008)<sup>73</sup> investigaron la relación entre SPE totales y sólidos suspendidos volátiles (SSV), y observaron un incremento de SSV a medida que aumentaban las concentraciones de SPE. Por otro lado, los estudios restantes se enfocaron en el análisis de las proteínas y carbohidratos retenidos sobre la superficie del MBR, por ser los

compuestos mayoritarios dentro de las SPE. Algunos autores<sup>74,75,76</sup> relacionaron el ensuciamiento de la membrana debido a la presencia de SPE con una mayor resistencia a la filtración, específicamente con las SPE<sub>L</sub>, debido a la formación de una capa coloidal, según lo indicado por Teng et al. (2020)<sup>74</sup>. Por otro lado, estos mismos autores también observaron que las SPE<sub>FL</sub> se adhieren mejor a la membrana que las SPE<sub>DL</sub>, mientras que, por el contrario, Wang et al. (2009)<sup>75</sup> indicaron mayor capacidad de adherencia de las SPE<sub>DL</sub>. Por último, se ha establecido una relación entre la temperatura del licor mezcla y la generación de SPE (a menor temperatura, menor producción)<sup>75</sup>.

Un estudio exhaustivo de la concentración de SPE es esencial para mejorar y promover el funcionamiento del MBR, puesto que el ensuciamiento de la membrana reduciría la calidad del efluente, aumentando el consumo energético y la frecuencia de limpieza, acortando la vida útil de la membrana y aumentando los costes de funcionamiento.

#### 2.4.4. Efectos de la presencia de MPs sobre las SPE

Hasta el momento, no hay muchos estudios que analicen la influencia que la presencia de MPs puedan tener sobre las SPE. Un resumen de los trabajos fundamentales en este campo se muestra en la Tabla 3.

Respecto a los medios acuáticos naturales, algunos autores<sup>77,78</sup> han observado que cuando *Goniopora columna* y un ecosistema de arrecife de coral son expuestos a MPs, en concreto PE, y un alga verde (*Chlamydomonas reinhardtii*) es expuesto a polietileno de alta densidad (HDPE)<sup>79</sup>, en todos los casos la presencia de MPs favorece la formación de SPE.

Respecto a los procesos de tratamiento de aguas residuales, en sistemas de tratamiento con biomasa granular aerobia, Wang et al. (2022)<sup>80</sup> encontraron que el uso de PS de gran tamaño inhibe la formación de SPE, mostrándose el efecto contrario cuando se utilizan PS de menor tamaño. En estos mismos sistemas, Jachimowicz et al. (2022)<sup>81</sup> observaron que la presencia de PE a bajas concentraciones (<50 mg/L) no afectaba a la eficiencia del tratamiento biológico, pero estimulaba la producción de SPE. Por otro lado, el uso de 50 mg/L de PE provocó la generación de gránulos de mayor tamaño empeorando el proceso de sedimentación<sup>81</sup>. Finalmente, en la bibliografía también se encuentran algunos estudios basados en los procesos de interacción y adsorción de SPE con MPs. En este caso, se observó que el PP<sup>82</sup> y PE<sup>83</sup> desgastado conlleva una mayor afinidad e interacción con los



ácidos húmicos debido a modificaciones estructurales que inducen a la formación de nuevos grupos funcionales que generan nuevas interacciones.

Los resultados de los estudios comentados anteriormente ayudan a revelar los efectos ecológicos de los MPs en las comunidades microbianas de diversos ecosistemas naturales. Asimismo, los trabajos llevados a cabo en sistemas de tratamiento biológico de aguas residuales permiten ampliar el conocimiento sobre la interacción de los MPs y la biomasa celular, lo que podría servir para mejorar dichos procesos de tratamiento.

Tabla 2. Estudios sobre la relación entre MBR y SPE. ARI: Aguas residuales industriales, ARU: Aguas residuales urbanas, SPE<sub>DL</sub>: SPE débilmente ligadas, SPE<sub>FL</sub>: SPE fuertemente ligadas, SSLM: sólidos suspendidos en licor mezcla, SSV: Sólidos suspendidos volátiles, TRH: Tiempo de retención hidráulica, TRC: Tiempo de retención celular.

Tipo de MBR	Parámetros analizados en las SPE	Condiciones operativas	Efectos de las SPE sobre MBR	Referencia
Escala de laboratorio	SPE totales	- Agua 90% ARU - 10% ARI - TRH: 2,32 h - TRS: 65 días	- Incremento en la concentración SPE (mg/L) y los SSV (g/L).	73
Escala de laboratorio, tamaño de poro 0,1 µm	Proteínas Carbohidratos	- ARU sintética - TRH: 5 h - TRS: 30 días	- Las SPE <sub>L</sub> presentaron una alta resistencia específica a la filtración por la formación de una capa coloidal. - Las SPE <sub>FL</sub> presentaron una mayor capacidad de adhesión a la membrana con respecto a las SPE <sub>DL</sub> .	74
MBR con membrana sumergida, tamaño de poro 0,22 µm	Proteínas Carbohidratos	- ARU - SSLM: 5.996 mg/L (SSV 34%)	- Ensuciamiento de la membrana principalmente con sustancias orgánicas. - SPE de alto peso molecular adheridos en la membrana. - Proteínas y carbohidratos son componentes clave en ensuciamiento.	72
Escala de laboratorio, MBR con membrana sumergida, tamaño de poro 0,20 µm	Proteínas Carbohidratos	- ARU - TRH: 2,0 - 3,5 h - TRS: 20 - 40 días	- Mayor relación de SPE <sub>DL</sub> en comparación con las SPE <sub>FL</sub> en el ensuciamiento de la membrana. - A menor temperatura del licor mezcla, menor generación de SPE y viceversa.	75
Escala de planta piloto con membrana sumergida	Carbohidratos Proteínas	- TRH: 16 - 24 h - TRS: 35 - 144 días	- Menor concentración de SPE provoca menor resistencia a la filtración. - Mayor concentración de proteínas y carbohidratos, mayor resistencia a la filtración.	76

Tabla 3. Estudios sobre la relación entre SPE y MPs. HDPE: Polietileno de alta densidad, PE: Polietileno, PS: Poliestireno.

	Tipo de SPE	Tipo MPs	Condiciones operativas	Efectos de MPs sobre SPE	Referencia
Ecosistemas naturales	SPE totales	PE 40 - 48 $\mu\text{m}$ (5 - 300 mg/L)	- pH: 8,0 - Temperatura: 26°C - Duración: 7 días - Exposición de <i>Goniopora columna</i>	- Altas concentraciones de PE (100-300 mg/L) estimularon la formación de SPE, aumentaron el tamaño de partícula y disminuyeron la diversidad bacteriana presente en los corales.	77
	SPE totales	HDPE (0 - 0,4 mg/L)	- Temperatura: 2,5 - 32,5°C - Exposición de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	- La presencia de PE favoreció la producción de SPE.	79
	SPE totales	PE (40 - 48 $\mu\text{m}$ )	- pH: 8,0 - Temperatura: 26°C - Duración: 14 días - Exposición de arrecife de coral	- La presencia de PE potenció la formación de SPE.	78
Aguas residuales	Ácidos húmicos (comerciales)	PP 500 $\mu\text{m}$	- Cámara de ensayo de envejecimiento con lámpara de Xenón - Temperatura: 60°C - Irradiación: 1.000 W/m <sup>2</sup>	- Los ácidos húmicos aumentaron la rugosidad superficial del PP. - Mayor afinidad con PP después del tratamiento tras la formación de nuevos grupos funcionales.	82
	SPE totales	PE (1 - 50 mg/L)	- Biomasa granular aerobia	- PE a bajas concentraciones no empeoró la eficiencia del tratamiento biológico y estimuló la producción de SPE. - La presencia de 50 mg/L de PE dificultó la sedimentación de los lodos por la generación de gránulos de mayor tamaño.	81
	SPE totales	PS (0,5 - 150 $\mu\text{m}$ , 75 mg/L)	- Lodos granulares anaerobios - Temperatura: 4°C - pH: 6,9	- PS de mayor tamaño (150 $\mu\text{m}$ ) inhibieron la formación de SPE. - PS de menor tamaño (0,5 $\mu\text{m}$ ) favorecieron la formación de SPE	80
	Ácidos húmicos	PE	- Irradiación ultravioleta (Intensidad 4.350 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ y 15 días) - Adsorción (pH: 7 y Temperatura: 4°C)	- Tras envejecimiento de PE, se produjeron cambios estructurales en la adsorción de los ácidos húmicos sobre los MPs.	83

## 3. Metodología

### 3.1 Descripción de la planta estudiada

La estación depuradora de aguas residuales urbanas estudiada en este TFG se encuentra localizada en Murcia (España) (EDAR Mar Menor). Está diseñada para tratar un caudal de 1.880 m<sup>3</sup>/día y dar servicio a una población de 7.800 habitantes equivalentes. Como es habitual en EDARU, consta de dos líneas de funcionamiento: línea de aguas y línea de fangos. En la Figura 7 se muestra el esquema de la EDAR y, a continuación, se hace una descripción de las características principales de cada etapa del proceso de tratamiento llevado a cabo en la planta.

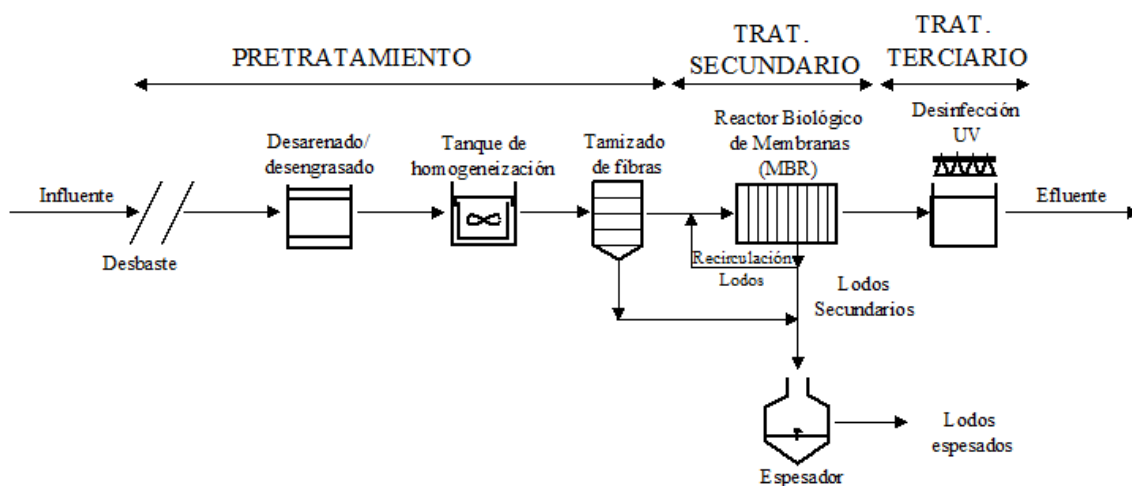


Figura 7. Esquema de la EDAR estudiada en este TFG.

#### 3.1.1 Línea de aguas

##### Pretratamiento:

El agua residual procedente de la urbanización llega a la planta mediante una conducción PEAD PN10 de 160 mm de diámetro y se recoge en una arqueta de rotura. A continuación, el desbaste se realiza en dos canales, cada uno de 0,40 m de anchura y 0,90 m de profundidad, con rejillas de limpieza automática de 10 mm de paso y tamices automáticos tipo Aquaguard de 1 mm de luz. Los sólidos retirados son transportados por un tornillo sin fin compactador a un contenedor de residuos.

Se dispone de dos líneas de desarenado - desengrasado de canal aireado, capaces de tratar hasta 78 m<sup>3</sup>/h cada una. La mezcla de agua y arena es impulsada por una bomba centrífuga vertical a un canal central longitudinal que conduce la arena hasta el clasificador-lavador

de arenas. Por otra parte, las grasas, una vez se encuentren en la zona lateral de tranquilización del desarenador - desengrasador, es decir, en el canal desengrasador, son arrastradas por la rasqueta superficial del puente hacia un canal transversal y desde éste hasta un concentrador de grasas.

Con el fin de garantizar el funcionamiento en continuo de la planta, se incluye en la línea de tratamiento un tanque regulador, ubicado tras el sistema de desarenado-desengrasado, que sirve para homogeneizar caudales y evitar puntas de contaminación. Tras el tanque regulador, con objeto de mejorar el funcionamiento de las membranas del biorreactor y minimizar su ensuciamiento, se dispone de un tamiz Huber de 0,5 mm de luz de paso, colocado antes del MBR y especialmente diseñado para eliminación de pelos y fibras.

#### Tratamiento biológico:

La planta consta de dos reactores biológicos de 825 m<sup>3</sup> de volumen total, incluyendo la zona de membranas. Cada reactor biológico presenta una zona anóxica, una zona óxica y una zona de membranas. La aireación de la zona óxica se realiza mediante parrillas de difusores de membrana con 282 ud/línea. Las membranas instaladas son de la marca KUBOTA, modelo EK400, con un tamaño de poro de 0,45 µm y con una superficie filtrante total de 3.200 m<sup>2</sup> (1.600 m<sup>2</sup>/reactor). La carcasa que contiene los módulos de microfiltración está fabricada en acero inoxidable. Cada módulo de membranas alberga 400 cartuchos de microfiltración, distribuidos a su vez en dos pisos de 200 cartuchos cada uno. El número total de módulos del sistema es de 10 unidades, que se distribuyen en dos líneas, como ya se apuntó con anterioridad. Cada módulo de membranas tiene una capacidad de filtración máxima de 15 m<sup>3</sup>/h, por lo que la capacidad de tratamiento del sistema de microfiltración supera las necesidades de tratamiento del sistema, al estar por encima del caudal punta de diseño de la EDAR, y superando ligeramente el caudal medio.

#### Tratamiento terciario:

En el tratamiento terciario se dispone de un sistema de desinfección UV en tubería marca Berson, con lámparas de media presión. Está situado en el colector de agua de permeado. Asimismo, se incluye en la instalación un sistema para desinfección con hipoclorito que consta de un depósito de almacenamiento de hipoclorito de 500 L y una bomba dosificadora. El hipoclorito no se emplea para tratar el agua, sino que únicamente se utiliza para la limpieza química de las membranas.

### 3.1.2 Línea de fangos.

Se dispone de una capacidad de recirculación de hasta el 310% del caudal medio de entrada. La recirculación se realiza desde la cámara de bombeo situada después del tanque de membranas, hasta la arqueta de entrada a la cámara anóxica. Esta línea está dotada de un medidor electromagnético de caudal, vinculado a un variador eléctrico en una de las bombas de recirculación, que permite regular el caudal de recirculación en función de las necesidades. Desde la misma tubería y mediante una electroválvula se purgan los fangos en exceso.

Los fangos biológicos en exceso se extraen mediante bombeo y se envían al espesador de fangos que es de polipropileno con un diámetro de 2,5 m y una altura de 3,0 m, con un resguardo de 0,5 m, es decir, un volumen total de 15,0 m<sup>3</sup>. El depósito está dotado de dos módulos de membranas con un sistema independiente de limpieza con un soplante. El agua de permeado se extrae por gravedad y se envía al tanque de agua tratada.

Asimismo, en la planta se dispone de una serie de elementos auxiliares, entre los que se pueden citar: la instalación de agua industrial, la red de drenajes y vaciados, el grupo electrógeno de emergencia y un sistema de desodorización, compuesto por un ventilador - extractor, una torre de humectación y un lecho biológico filtrante.

## 3.2 Toma de muestra

La toma de muestra se lleva a cabo de forma directa en el MBR introduciendo una pértiga con un recipiente que recoge la muestra (siempre con los soplantes en funcionamiento) y se almacena en una botella de plástico (PE) para su posterior envío a la Universidad de Oviedo. Una vez que la muestra (3 - 4 L de licor de mezcla) llega al laboratorio, se mantiene en refrigeración durante un tiempo máximo de un día hasta su procesado.

Este TFG se desarrolló en el contexto de un proyecto de investigación del grupo TBR de la Universidad de Oviedo con la empresa Cadagua que gestionaba la EDAR Mar Menor. La toma de muestra se llevaba a cabo de forma mensual incluyéndose en este TFG un total de seis muestras correspondientes a las siguientes fechas: 07/02/2022, 22/03/2022, 04/04/2022, 25/05/2022, 04/07/2022 y 18/07/2022.

## 3.2 Determinación de SPE

### 3.2.1. Extracción de SPE

La extracción de SPE se lleva a cabo de acuerdo al método descrito por Liu y Fang (2002)<sup>84</sup>, tal y como se detalla a continuación:

1. Dilución de la muestra 1:2 con agua destilada (10 mL de agua + 10 mL de muestra).
2. Centrifugación para obtener las SPE solubles. Se centrifuga la muestra diluida a 6.000 g durante 30 min en una centrífuga Multifuge X1 (Thermo Fisher Scientific) (Figura 8b). Se recupera el sobrenadante que contiene las SPE solubles o “libres”.
3. El pellet obtenido se resuspende en 20 mL de agua destilada y se le añaden 120 µL de formaldehído al 37% (Merck), se agita bien y se deja reaccionar durante 1 h a 4°C.
5. Transcurrido ese tiempo, se añaden 8 mL de NaOH (Merck) 1M y se deja reaccionar a 4°C durante 3 h.
6. Centrifugación para obtener las SPE ligadas. Tras las 3 h, se centrifuga (Figura 8a) la muestra a 10.000 g durante 30 min y se recupera el sobrenadante que contiene las SPE ligadas o “enlazadas”.



Figura 8. Centrífugas utilizadas en este procedimiento; a) Extracción y preparación de la muestra de MPS; b) Extracción y preparación de SPE

Una vez extraídos las SPE solubles y las ligadas se analizó su composición siguiendo los procedimientos indicados en los siguientes apartados.

### 3.2.2. Medida de la concentración de proteínas y ácidos húmicos

Las proteínas y los ácidos húmicos se determinan mediante el método de Lowry<sup>85</sup>, siguiendo el procedimiento descrito por Frolund et al. (1995)<sup>86</sup> para evitar las interferencias en el método de análisis.

El método consiste en la reducción del reactivo de Folin-Ciocalteu que en presencia de compuestos fenólicos cambia de color amarillo a azulado. Estos compuestos están presentes en los residuos de tirosina de las proteínas, que se despliegan cuando el  $\text{Cu}^{2+}$  se une al enlace peptídico, actuando el  $\text{Cu}^{2+}$  en exceso como catalizador. Los ácidos húmicos también cuentan con grupos fenólicos en su estructura, por lo que se realiza el mismo ensayo, evitando añadir  $\text{Cu}^{2+}$  para que las proteínas no se desplieguen y no participen en la reacción.

En las muestras de proteínas se mide la absorbancia total y en las de ácidos húmicos la absorbancia ciega, ambas a 580 nm, aplicando las ecuaciones (1) y (2) para obtener los valores de absorbancia de cada molécula y evitar los errores debido a las interferencias.

$$\text{Abs (proteína)} = 1,25 \times (\text{Abs total} - \text{Abs ciega}) \quad (\text{Ecuación 1})$$

$$\text{Abs (ác. húmico)} = \text{Abs (ciega)} - 0,2 \times \text{Abs (proteína)} \quad (\text{Ecuación 2})$$

El espectrofotómetro empleado para cuantificar las proteínas y los ácidos húmicos es un Genesys 1XX (Thermo Fisher Scientific) (Figura 9a).





Figura 9. Espectrofotómetros empleados para la caracterización de la composición de las SPE; a) ácidos húmicos y proteínas; b) carbohidratos.

### 3.2.2.1. Preparación de reactivos

De acuerdo con el método de Lowry<sup>85</sup>, hay una serie de reactivos que hay que preparar para realizar los análisis. A continuación, se detalla la preparación de dichos reactivos:

Reactivo A. NaOH 0,1 M y Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al 2% (m/v). Se pesan 8 g y 40 g de NaOH y Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, respectivamente y se enrasa con agua destilada en un matraz aforado de 2 L.

Reactivo B1. CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O al 1% (m/v). Se pesa 1 g de CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O y se enrasa con agua destilada en un matraz aforado de 100 mL.

Reactivo B2. Tartrato sódico potásico al 2% (m/v). Se pesan 2,68 g de C<sub>4</sub>H<sub>4</sub>KNaO<sub>6</sub>·4H<sub>2</sub>O y se enrasa en un matraz aforado de 100 mL con agua destilada.

Reactivo C1 (Proteínas). Se prepara en el momento de hacer el análisis mezclando A, B1 y B2 en proporción volumétrica de 50:0,5:0,5.

Reactivo C2 (Ácidos húmicos). Se prepara en el momento de hacer el análisis mezclando A, agua destilada y B2 en proporción volumétrica de 50:0,5:0,5.

Reactivo Folin-Ciocalteu: Es un reactivo comercial que se prepara en el momento y debe utilizarse en el día (se diluye 1:2 con agua destilada).

Todos los compuestos necesarios para la preparación de los reactivos fueron suministrados por Merck.

### 3.2.2.2. Rectas de calibrado

La preparación de la recta de calibrado para la determinación de proteínas se realizó empleando como patrón seroalbúmina bovina (BSA) ( $\geq 98\%$ , Sigma-Aldrich). Para ello se prepara una disolución madre de 0,5 g/L y, a partir de dicha disolución, se preparan patrones de 100, 200, 300, 400 y 500 ppm.

En tubos Falcon, se añade 1 mL de cada disolución patrón y se les añade 5 mL del reactivo C1. La mezcla se deja reaccionando en la oscuridad durante 15 min. Una vez pasado este tiempo, se añaden 0,3 mL del reactivo de Folin y se deja nuevamente en oscuridad durante 30 min. De igual modo, es necesario preparar un blanco (1 mL de agua destilada, 5 mL de C1 y 0,3 mL de Folin). Transcurrido ese tiempo, las muestras se miden en el espectrofotómetro a una absorbancia de 580 nm empleando una cubeta de cuarzo. Las medidas se hacen por triplicado para minimizar los errores experimentales y el valor empleado en los calibrados se toma como la media de las tres medidas. Las rectas de calibrado y los datos para la determinación de proteínas que se han obtenido durante la elaboración de este TFG se muestran en la Figura 10 y en la Tabla 4 (Anexos).

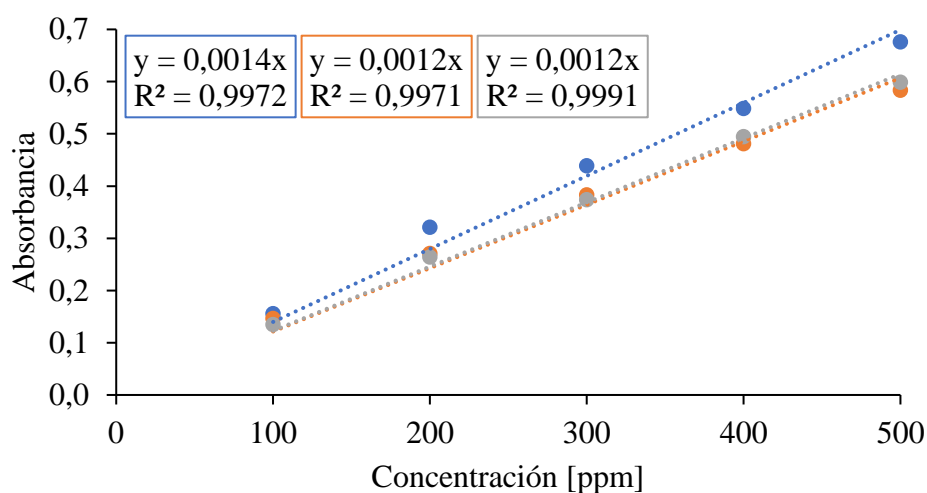


Figura 10. Rectas de calibrado para las proteínas utilizadas durante los meses de estudio; febrero (línea azul); marzo y abril (línea naranja); mayo, junio y julio (línea gris).

La preparación de la recta de calibrado para la determinación de ácidos húmicos sigue un procedimiento similar al descrito para la determinación de las proteínas. Con un patrón

comercial (Sigma-Aldrich), se prepara una disolución madre de 0,5 g/L añadiendo algunas lentejas de NaOH (Merck) para favorecer la solubilización de los ácidos húmicos y, a partir de ella, los patrones de 100, 200, 300, 400 y 500 ppm. En este caso, se cambia el reactivo C1 por el C2. En la Tabla 4 (Anexos) y la Figura 11 se muestran los datos y las correspondientes rectas de calibrado para la determinación de ácidos húmicos obtenidas durante la elaboración de este TFG.

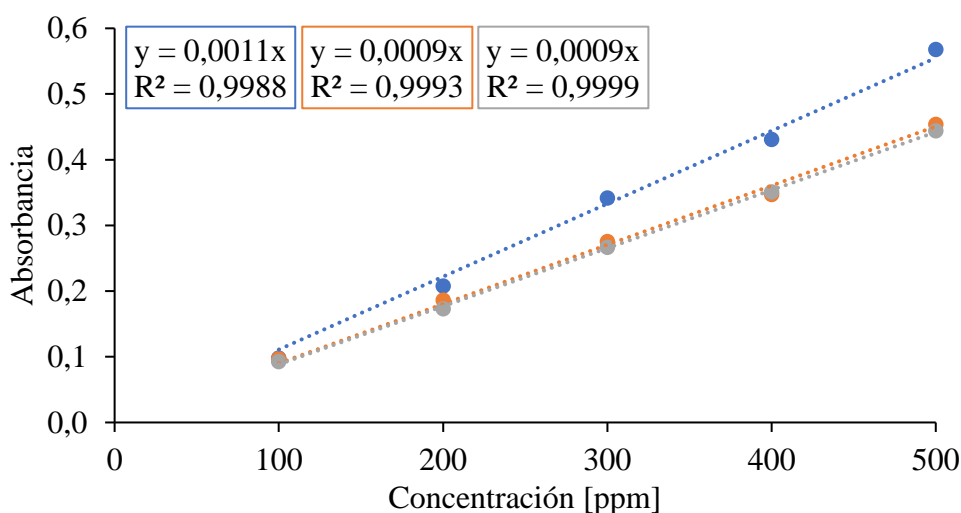


Figura 11. Rectas de calibrado para los ácidos húmicos utilizadas durante los meses de estudio; febrero (línea azul); marzo y abril (línea naranja); mayo, junio y julio (línea gris).

### 3.2.3. Medida de la concentración de carbohidratos totales

Los carbohidratos se miden siguiendo el método del fenol – ácido sulfúrico de Dubois<sup>87</sup>, utilizando D-glucosa monohidratada ( $\geq 99\%$ , Sigma-Aldrich) como patrón. En este método, los azúcares reductores reaccionan con ácido sulfúrico concentrado formando furfural, los cuales, cuando están en medio ácido, se protonan dando lugar a un carbocatión que reacciona con el fenol. A su vez, se genera un compuesto resonante que absorbe a 492 nm.

#### 3.2.3.1. Preparación de reactivos

Como reactivos en este procedimiento solo es necesario preparar una disolución de 200 mL de fenol al 5%. Para ello, se añaden 10 mL de fenol (Sigma-Aldrich) a un matraz aforado de 200 mL y se enrasa con agua destilada.

#### 3.2.3.2. Rectas de calibrado

Se prepara una disolución madre de 0,1 g/L de glucosa y, a partir de esta disolución, se preparan patrones de valores entre 0 y 100 ppm en intervalos de 10 en 10 ppm.

En un tubo de vidrio, se añade 1 mL de muestra, se añaden 0,5 mL de fenol e inmediatamente después 2,5 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (96%) (Merck) y se agita. Se deja reposar 10 - 15 min y se mide la absorbancia en el espectrofotómetro Hach DR/2500 (Figura 9b), a 492 nm. Al igual que en la determinación de proteínas y ácidos húmicos, también es necesario preparar un blanco (1 mL de agua, 0,5 mL de fenol y 2,5 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (96%)). Las medidas se hacen por triplicado para minimizar los errores experimentales y el valor obtenido a partir de las tres medidas se toma como media para realizar la curva de calibrado. Es importante utilizar tubos de vidrio, ya que la reacción es exotérmica.

En la Tabla 5 (Anexos) y Figura 12 se muestran los datos y las correspondientes rectas de calibrado obtenidas para la determinación de carbohidratos totales durante la elaboración de este TFG.

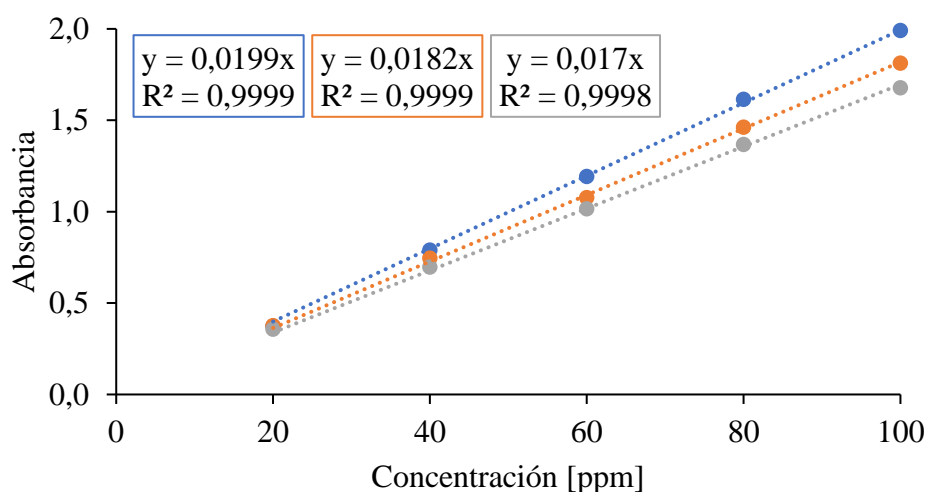


Figura 12. Rectas de calibrado para los carbohidratos utilizadas durante los meses de estudio; febrero (línea azul); marzo y abril (línea naranja); mayo, junio y julio (línea gris).

### 3.2.4. Procedimiento para la determinación de SPE

El procedimiento llevado a cabo para la determinación de SPE (proteínas, ácidos húmicos y carbohidratos) es el mismo que se describe anteriormente para la preparación de las rectas de calibrado de proteínas, ácidos húmicos y carbohidratos, tal y como se resume en la Figura 13.

En este caso, como hay dos muestras que analizar (SPE solubles y SPE enlazadas) (ver apartado 3.2.1.) se añade 1 mL de SPE solubles, mientras que las SPE enlazadas hay que diluirlos 1:3 para que los valores de absorbancia obtenidos estén dentro de la recta de calibrado.

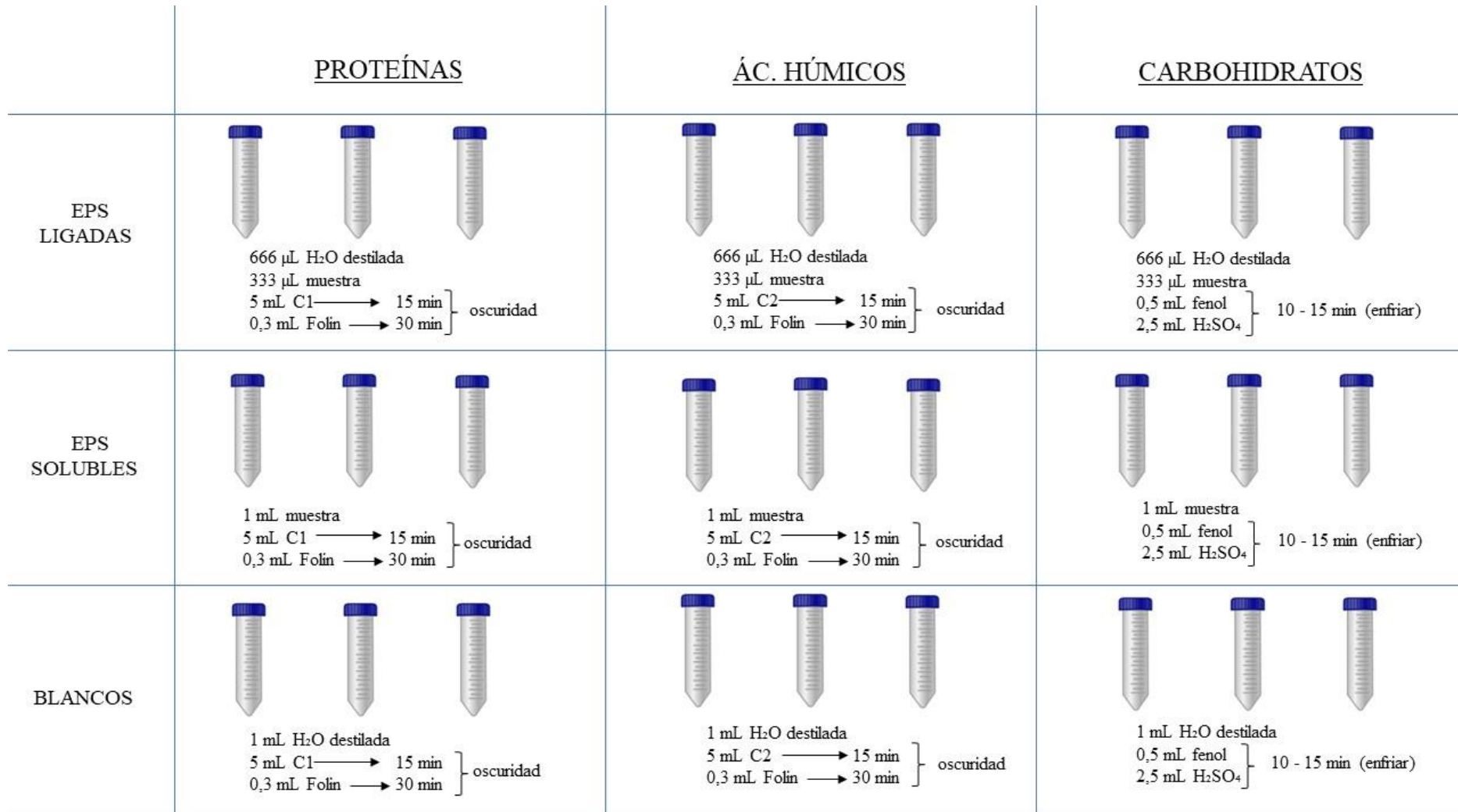


Figura 13. Esquema del procedimiento experimental seguido para la determinación de SPE (contenido en proteínas, ácidos húmicos y carbohidratos)

### 3.3 Determinación de sólidos

Habitualmente, cuando se indica el contenido de sólidos de un lodo, se está haciendo referencia a los sólidos suspendidos totales (SST). Los SST se dividen en sólidos fijos (SSF) y sólidos volátiles (SSV) en función de su volatilidad a 550°C. A esta temperatura, la fracción orgánica se oxida y desaparece en forma de gas, quedando la fracción inorgánica en forma de cenizas. Los Sólidos Suspendidos Volátiles en el Licor Mezcla (SSVLM) del reactor, así como su relación con los SST, son parámetros de gran importancia en los procesos de lodos activos, ya que dan una idea aproximada de la biomasa activa en el sistema<sup>88,89</sup>.

En este TFG, se midieron por triplicado los SST, los SSF y los SSV en todas las muestras de lodos procedentes del MBR. Para ello se siguió el procedimiento estándar 2540 D<sup>90</sup> que se detalla a continuación:

- I. Se llevan a la estufa 3 crisoles con 3 filtros para análisis gravimétrico (Albet, nº 238) durante 60 min a 105°C para eliminar la humedad existente. Se sacan de la estufa, se colocan en un desecador para, una vez que estén a temperatura ambiente, ser pesados.
- II. Se toman 10 mL de muestra y se filtran a vacío a través de los filtros previamente pesados (Figura 14b). Los filtros se llevan a la estufa a 105°C durante 24 h. Una vez pasado este tiempo, los crisoles se colocan en el desecador y posteriormente, se pesan para obtener el valor de SST por gravimetría.
- III. Finalmente, los filtros se calcinan en mufla (HERAEUS M-110) a 550°C durante 4 h y los crisoles se pesan de nuevo, obteniendo así los SSF, que se relacionan con los compuestos inorgánicos. Por diferencia, a partir de los SST y los SSF, se pueden obtener los SSV, que son los compuestos orgánicos que pasan rápidamente a estado gas y representan la fracción volátil de los sólidos suspendidos presentes en el lodo.

### 3.4 Determinación de microplásticos

#### 3.4.1 Preparación de reactivos

##### Preparación del agua destilada filtrada:

Se filtra agua destilada a través de un filtro de poliamida de tamaño de poro de 0,45  $\mu\text{m}$  (Ahlstrom-Munksjö) para evitar la posible contaminación de las muestras con microplásticos presentes en el agua destilada.

##### Preparación de la disolución de Fe (II) 0,05 M:

Se vierten 7,5 g de  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (Sigma-Aldrich) en un vaso de precipitados y se añaden 500 mL de agua destilada y 3 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado (95 - 97%) (Merck). Se agita la disolución y se filtra con un filtro de microfibras de vidrio de tamaño de 0,7  $\mu\text{m}$  (Whatman).

##### Preparación de la disolución de cloruro de zinc:

Se dispone 1 L de agua destilada en un vaso de precipitados y se van añadiendo lentamente 962 g de  $\text{ZnCl}_2$  (Sigma-Aldrich), ya que la reacción es exotérmica. Se agita hasta disolución completa del  $\text{ZnCl}_2$  y se filtra con un filtro de microfibras de vidrio de 0,7  $\mu\text{m}$  (Whatman). De este modo, la disolución obtenida tiene una densidad 1,5 g/mL<sup>91</sup>.

#### 3.4.2. Pretratamiento de las muestras

Con el objetivo de analizar la posible interacción existente entre las SPE y los microplásticos, esta sección se divide en dos partes bien diferenciadas de manera que se analizan los microplásticos presentes, tanto en la muestra de licor de mezcla bruta como en el sólido obtenido tras centrifugar la muestra, siguiendo los procedimientos descritos a continuación:

##### Licor mezcla bruto

- I. Se vierten 300 mL de la muestra del licor mezcla y se secan en la estufa a 100°C durante 24 h.
- II. Se lleva a cabo la oxidación de la materia orgánica presente en el licor mezcla usando  $\text{H}_2\text{O}_2$  al 50% (Sigma-Aldrich) (100 mL) a temperatura ambiente. Pasadas 24 h, se completa la oxidación de la materia orgánica empleando el reactivo de Fenton (30 mL), el cual es una combinación de una disolución de sulfato de hierro (II) (Sigma-Aldrich) 0,05 M a pH 3 (se ajusta con  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado) y de peróxido de hidrógeno al 50%, durante 24 h. La reacción requiere ser controlada puesto que es exotérmica.

III. Para clasificar los MPs por tamaño, se filtra la disolución anterior (muestra) en tamices superpuestos de 500, 250, 100 y 20  $\mu\text{m}$  (Figura 14a). El sólido retenido en los tamices se arrastra con agua destilada filtrada a 4 vasos de precipitados (uno por cada filtro).

IV. Los vasos de precipitados se llevan hasta casi sequedad en una estufa a 100°C durante 8 h.

V. Una vez separados por tamaños, se procede a eliminar la materia inorgánica arrastrando el residuo de cada vaso con 100 mL de  $\text{ZnCl}_2$  ( $d=1.5 \text{ g/mL}$ ). Se agita durante 5 min y se deja reposar durante 24 h para que decante el sólido que hay en la muestra. La muestra de 20  $\mu\text{m}$  requiere 48 h de reposo. Se separa el sobrenadante del sólido (los microplásticos flotan) y se repite el procedimiento realizando una segunda extracción, desechando el sólido.

VI. Las suspensiones de MPs obtenidas en el paso anterior se filtran a vacío (Figura 14b) con un filtro de microfibras de vidrio de tamaño de poro de 0,7  $\mu\text{m}$  (Whatman). El  $\text{ZnCl}_2$  se recupera para reutilizarlo (hasta 5 veces)<sup>92</sup> y se lava el filtro con agua destilada filtrada.

VII. Se dejan secar los filtros (donde han quedado retenidos los MPs) durante 24 h a temperatura ambiente para proceder a su posterior análisis en el estereomicroscopio.



Figura 14. Material utilizado en el pretratamiento de la muestra. a) Tamices de distintos tamaños de poro: 500, 250, 100 y 20  $\mu\text{m}$ , b) Equipo de filtración.

### Sólido

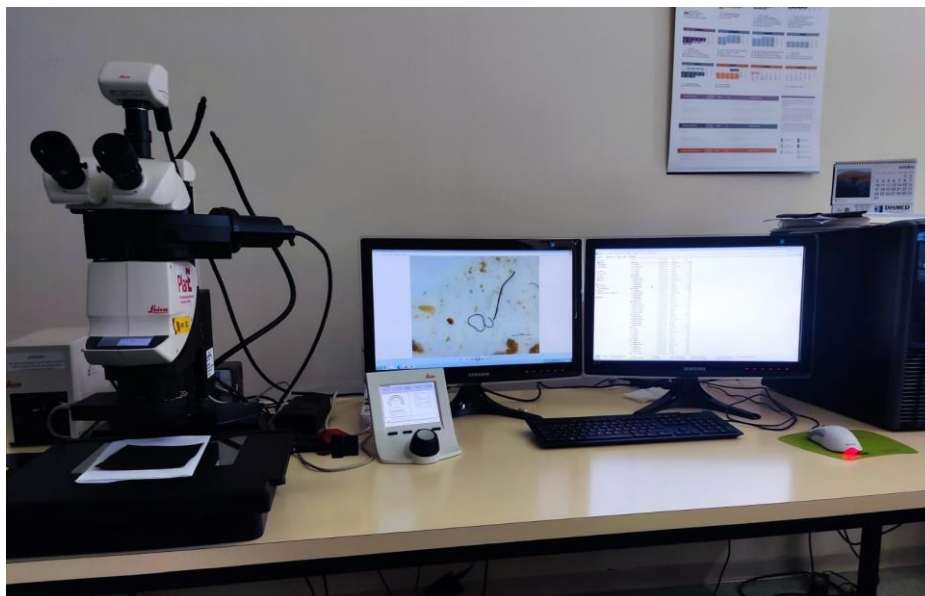
Se toman 120 mL de la muestra del licor mezcla y se vierten en 3 tubos Falcon (50 mL) para centrifugar a 6.000 g durante 30 min en una centrífuga KUBOTA 6500 (Figura 8b).



- I. Se retira el sobrenadante y se mide aproximadamente el volumen de sólidos obtenido en cada uno de los tubos (oscila entre 7,5 - 10 mL). Dicho contenido, se vierte en un vaso de precipitados vacío (previamente pesado) y se emplea agua destilada filtrada para arrastrar toda la muestra (aproximadamente 50 mL).
- II. Las muestras se secan en estufa a 100°C durante 24 h y se pesa el residuo seco.
- III. Se sigue el mismo procedimiento experimental descrito para la extracción de MPs en la muestra de licor mezcla bruto continuando en el paso (II), con la única diferencia de que, en este caso, se utilizan 50 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y 20 mL del reactivo de Fenton.

### *3.4.2 Cuantificación y clasificación de microplásticos*

En este trabajo se ha utilizado el estereomicroscopio de fluorescencia Leica M205FA (Figura 15) para clasificar los MPs en función de su tamaño, forma y color. Se trata de un equipo semiautomático para estudios de transmisión (contraste y relieve), reflexión y fluorescencia con óptica 1x (distancia de trabajo 61,5 mm), 2x (distancia de trabajo 20 mm) y 5x (distancia de trabajo 19 mm). Zoom de 0,7 a 20,5x. Luz de reflexión por anillo LED con iluminación variable 1/4, 1/2 o anillo completo. La captura y el procesado de imágenes se realiza con la cámara digital de color de alta resolución que lleva incorporada (LEICA DFC310FX), permitiendo una resolución máxima de 1392x1040 píxeles (1,4 Mpíxeles CCD).



*Figura 15. Estereomicroscopio Leica M205FA utilizado en este trabajo.*

### 3.4.3 Caracterización de microplásticos

Para la caracterización de los microplásticos en función de su composición química, se empleó la microespectroscopía infrarroja (FTIR) y los análisis fueron llevados a cabo por la Unidad de Espectroscopía Molecular de la Universidad Autónoma de Madrid (UAM).

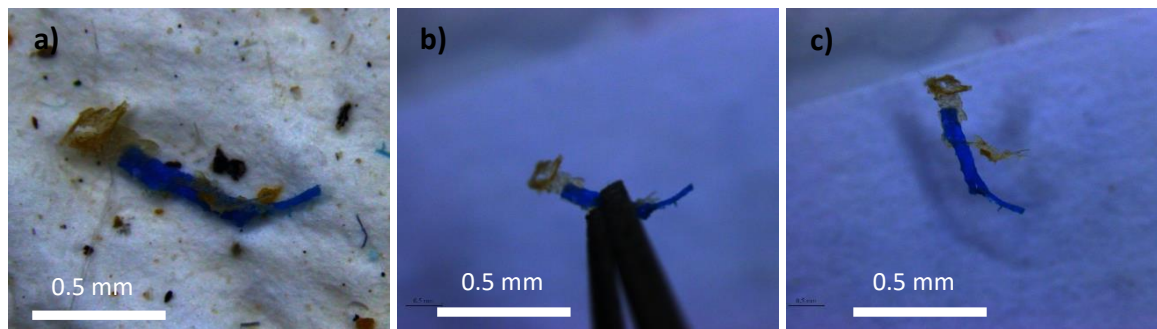
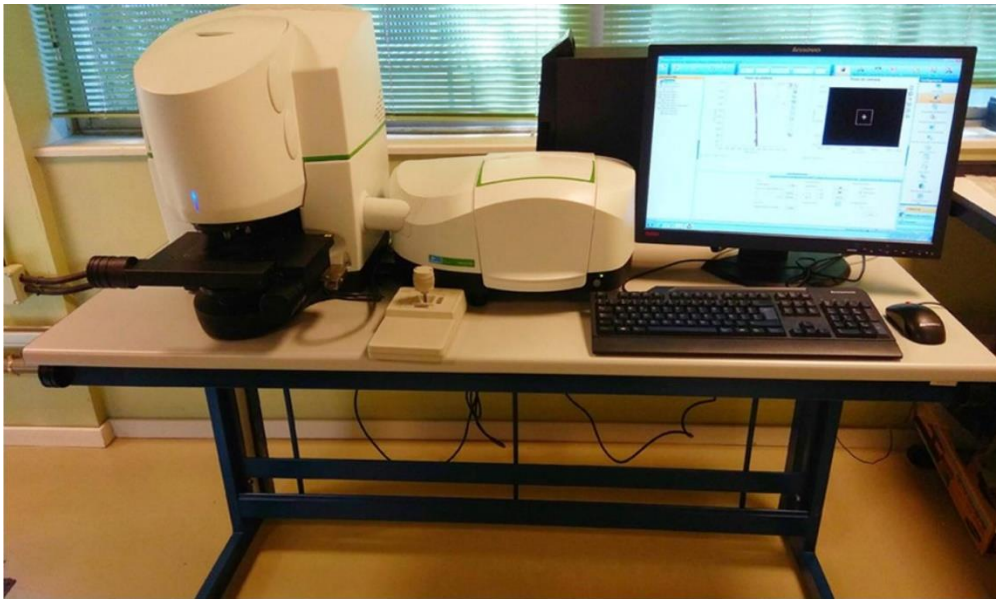


Figura 16. Preparación de las muestras. a) Fragmento azul en el filtro, b) Fragmento cogido con las pinzas, c) Fragmento en la placa Petri de vidrio.

El equipo utilizado para el análisis ha sido un espectrofotómetro FTIR Spotlight 200i de Perkin Elmer (Figura 17) que trabaja en condiciones ambientales en los modos de Transmisión, Reflexión y Reflectancia Total Atenuada en el rango del infrarrojo medio entre  $4.000 - 550 \text{ cm}^{-1}$ . El método de análisis consiste en preparar soportes transparentes a la radiación infrarroja (pastillas de KBr), depositar las muestras sobre ellos mediante el uso de una lupa y proceder a su análisis por transmisión en el sistema de microscopía infrarroja. El espectro de infrarrojo generado es analizado, de forma automática, comparando los resultados obtenidos con una base de datos almacenada en dicho equipo que contiene aproximadamente 36.000 espectros de compuestos diferentes repartidos en diferentes bibliotecas: compuestos orgánicos e inorgánicos, polímeros, fibras, cosméticos y derivados, disolventes, fármacos, drogas, minerales, productos alimentarios, adhesivos, lubricantes, etc. Los resultados de los espectros obtenidos, así como su coincidencia (en porcentaje) con respecto a los espectros incluidos en la base de datos, son enviados por correo electrónico para el posterior tratamiento de los datos (ver Anexo 6.3).



*Figura 17. Espectrofotómetro FTIR Spotlight 200i de Perkin Elmer utilizado en este TFG.*

## 4. Resultados y discusión

La determinación de sustancias poliméricas extracelulares (SPE) y MPs en los sistemas de tratamiento de aguas residuales son temas ampliamente estudiados, especialmente en el primer caso<sup>3,66</sup>. Sin embargo, la relación entre ambos ha sido poco analizada hasta la fecha.

La formación y composición de las SPE varía en función de las características de los lodos (sustrato, disponibilidad de carbono y nitrógeno, contenido en nutrientes, tipo de microorganismos, etc.) y de las condiciones de operación (pH, temperatura, aireación, tiempo de retención celular, etc.)<sup>63</sup>. Las SPE afectan a la morfología de los lodos, por eso tienen un papel determinante en los procesos de tratamiento de aguas residuales, estando relacionados con aspectos como la estabilidad de los fangos, la degradabilidad del sustrato, la cantidad de oxígeno disuelto y otras condiciones hidrodinámicas<sup>67</sup>. Asimismo, las SPE son un parámetro fundamental en los sistemas MBR, ya que estas sustancias son las principales responsables del ensuciamiento de las membranas<sup>93</sup>.

Por otra parte, diversos autores han analizado la incidencia de MPs en EDARs, especialmente su evolución a lo largo de las diferentes etapas del proceso de tratamiento de las aguas residuales<sup>4,6,34</sup>. El estudio del comportamiento de estos microcontaminantes en MBRs indica que este tipo de tecnología puede llegar a alcanzar eficacias de eliminación de MPs superiores al 99% durante el tratamiento biológico de aguas residuales urbanas, debido principalmente al uso de membranas de tamaño de poro muy pequeño ( $0,4 \mu\text{m}$ )<sup>93,94</sup>. En este contexto, resulta de gran interés estudiar la relación entre las SPE y los MPs presentes en el reactor, dado que podrían existir ciertas interacciones entre ambos que afectasen al comportamiento de los MPs en este tipo de sistemas.

En el presente apartado se seguirá la siguiente estructura a la hora de discutir los resultados obtenidos en este TFG: en primer lugar, se analizarán las características y evolución de las SPE en el MBR durante los meses de estudio; en segundo lugar, se comentarán los aspectos más relevantes relacionados con la concentración, características y evolución de los microplásticos en el biorreactor de membrana durante los meses de estudio y; finalmente, se estudiará la posible relación existente entre ambos parámetros.

#### 4.1. Características y evolución de SPE con el tiempo

La determinación de sólidos y SPE (proteínas, ácidos húmicos y carbohidratos), se llevó a cabo empleando las metodologías descritas en los apartados 3.3. *Determinación de sólidos* y 3.2. *Determinación de SPE*. Los resultados obtenidos aparecen recogidos en las Figura 18 y 19 y en las Tablas 6 y 7 de los Anexos, respectivamente.

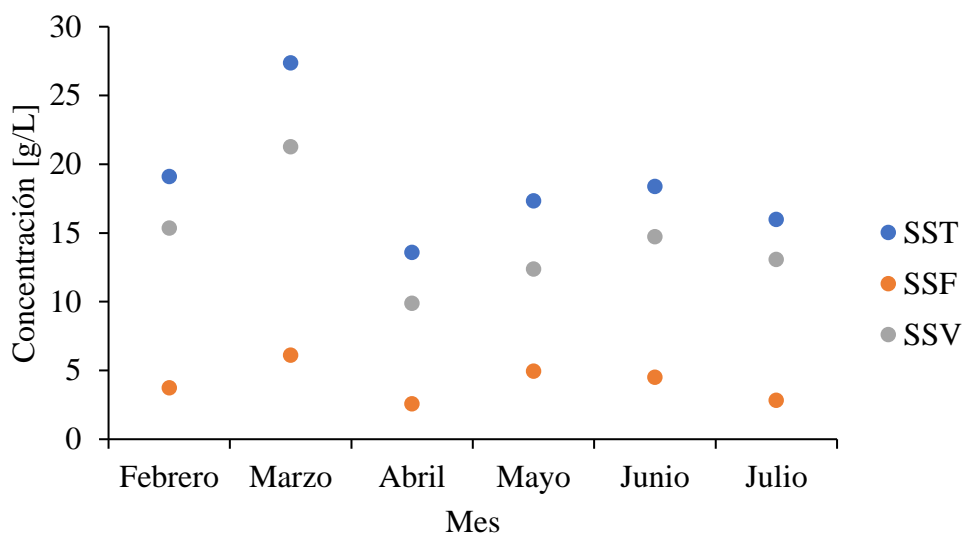


Figura 18. Evolución de la concentración (g/L) de SST, SSF y SSV a lo largo de los meses de estudio. Todos los errores de SD son inferiores al 10%.

La concentración de SST de la mezcla se encuentra en rangos comprendidos entre 14 y 27 g/L (Figura 18). Los primeros MBR que se implantaron en sistemas de depuración de aguas funcionaron con tiempos de retención de sólidos (TRS) de 100 días y con sólidos suspendidos en el licor mezcla (SSLM) de 30 g/L, mientras que los siguientes biorreactores de membrana funcionaron con TRS de 10 a 20 días y SSLM de 12 a 20 g/L para optimizar el volumen del reactor y minimizar la producción de lodos. Un alto contenido en SSLM puede disminuir la eficacia de aireación y el flujo útil de agua tratada por la membrana. Un valor próximo a 30 g/L, como el registrado en el mes de marzo ( $27 \pm 1$  g/L), implica mucha carga orgánica y una alta tasa de ensuciamiento de la membrana y, por lo tanto, la necesidad de limpieza de esta para operar en condiciones óptimas. Por el contrario, valores comprendidos entre 10 a 20 g/L, como los encontrados en el resto de los meses, implican un menor ensuciamiento de la membrana y un funcionamiento eficaz del MBR<sup>95,96,97</sup>. La relación entre SSV/SST estuvo entre los valores 0,71 - 0,82, lo que indica un grado bajo de mineralización de los lodos. Estos valores son similares a los

descritos por Sharrer et al. (2010)<sup>98</sup> y Mueller et al. (1995)<sup>99</sup>, quienes obtuvieron relaciones de 0,73 y 0,77 respectivamente, en un MBR.

Como se puede observar en la Figura 19, las concentraciones de proteínas, carbohidratos y ácidos húmicos aparecen indicadas en función de la parte soluble y enlazada de las SPE. En todos los casos, la concentración de cada sustancia por separado es mayor en la fracción enlazada que en la soluble, esto se debe a que las SPE son el componente mayoritario de los flóculos, interviniendo activamente en la unión de los mismos<sup>100</sup>. Debe señalarse que, aunque los valores de los diferentes parámetros analizados corresponden al mismo orden de magnitud, existe una cierta variación en las concentraciones detectadas a lo largo de los meses de estudio, lo que puede ser debido a distintos factores, como el momento de la toma de muestra o la edad del lodo<sup>63</sup>.

La forma de expresar la concentración de SPE totales, proteínas, carbohidratos y ácidos húmicos es en mg/L, si bien también se puede presentar en función de los SSV, SST y SSF (Figura 20 y Tablas 8 - 10 de Anexos, respectivamente). La concentración de ácidos húmicos en la fracción enlazada es entre 2 y 5 veces superior a la fracción soluble, variando entre 336 y 1.316 mg/L y 114 y 316 mg/L, respectivamente. En base a los SST, las concentraciones de ácidos húmicos varían entre 7 y 15 mg/g SST en SPE solubles y entre 25 y 48 mg/g SST en enlazados. A pesar de que los ácidos húmicos no se han estudiado en gran profundidad en la literatura, se encuentran datos generales en sistemas de depuración biológica de aguas residuales que oscilan entre 0 y 30 mg/g SST en la fracción soluble y entre 12 y 13 mg/g SST en la enlazada<sup>63</sup>. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en el presente trabajo para la fracción soluble, mientras que en la enlazada los valores son más altos.

La concentración de proteínas es entre 20 y 45 veces superior en la fracción enlazada con respecto a la soluble. Esta misma tendencia se observa para los carbohidratos enlazados, cuyos valores son entre 13 y 30 veces superiores con respecto a los carbohidratos solubles detectados, excepto en marzo donde esta diferencia es de 71 veces. Por lo tanto, la concentración de proteínas y carbohidratos oscila entre 10 - 45 mg/L y 9 - 33 mg/L (solubles) y 872 - 1.059 mg/L y 221 - 642 mg/L (enlazados), respectivamente (Figura 19). En ambos casos, la concentración más baja corresponde a las muestras del mes de julio, mientras que la más alta a las de marzo. Gkotsis y Zouboulis (2019)<sup>101</sup> indicaron que, por lo general, la concentración de proteínas es mayor que la de carbohidratos, coincidiendo

con los datos obtenidos en el presente trabajo durante todos los meses de estudio (Figura 19). Bin et al. (2008)<sup>72</sup> analizaron la concentración de carbohidratos y proteínas totales en un MBR a escala de laboratorio con un volumen de trabajo de 30 L con lodos procedentes de una EDAR de una zona residencial de China. Las muestras fueron recogidas directamente de la membrana del MBR y se encontró que estos valores eran de aproximadamente 117 mg/L y 293 mg/L para carbohidratos y proteínas totales, respectivamente, valores que están por debajo de los obtenidos en este trabajo, donde se encontraron rangos entre 232 - 651 mg/L en los carbohidratos y entre 417 - 1.101 mg/L en las proteínas. Esta variación puede deberse a las distintas condiciones de operación de ambos estudios: tiempos de retención, cantidad de materia orgánica, tecnologías utilizadas, etc.

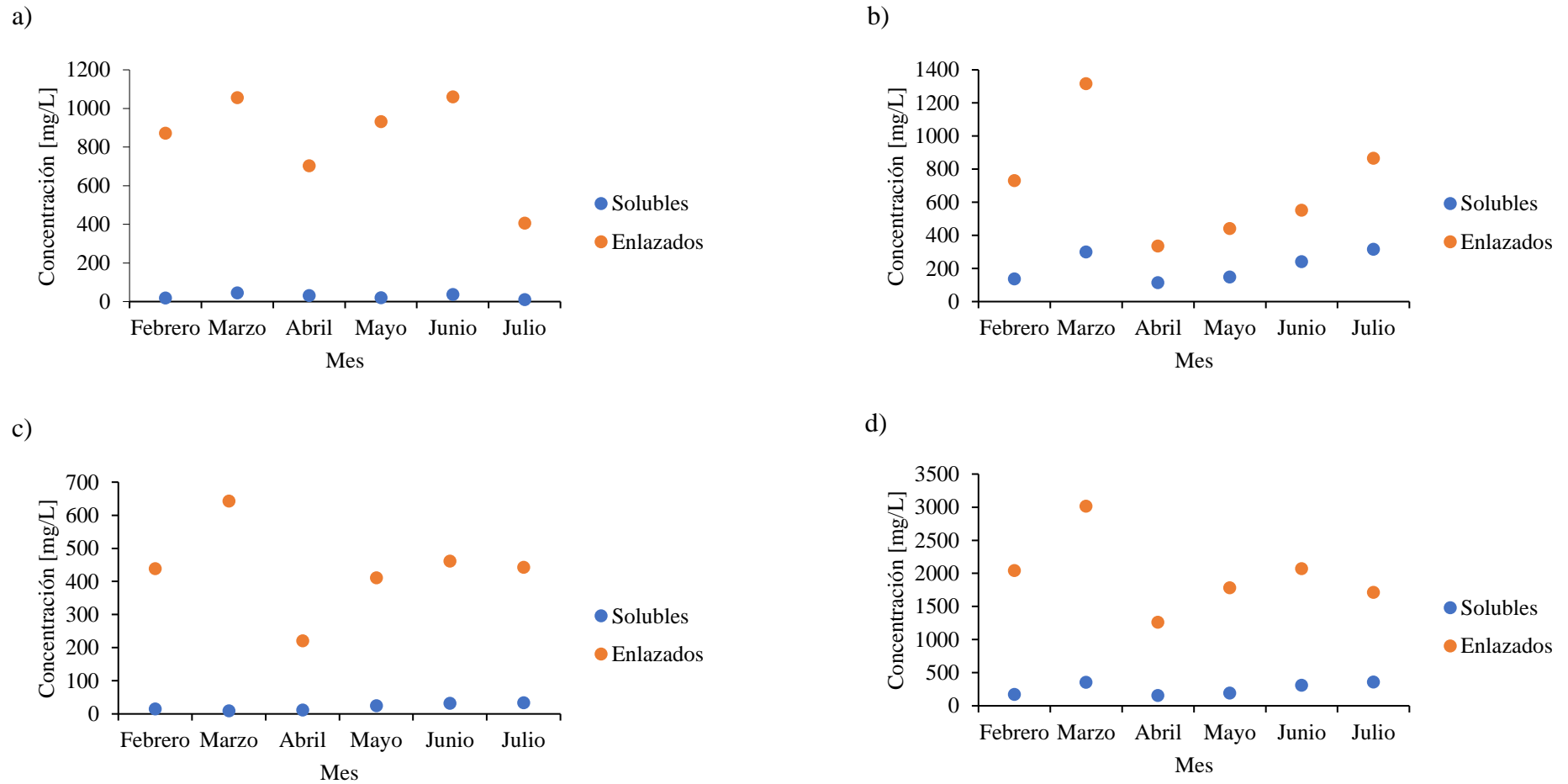


Figura 19. Evolución de la concentración (mg/L) de SPE a lo largo de los meses de estudio; a) ácidos húmicos, b) proteínas, c) carbohidratos, d) SPE totales. Todos los errores de SD son inferiores al 10%.



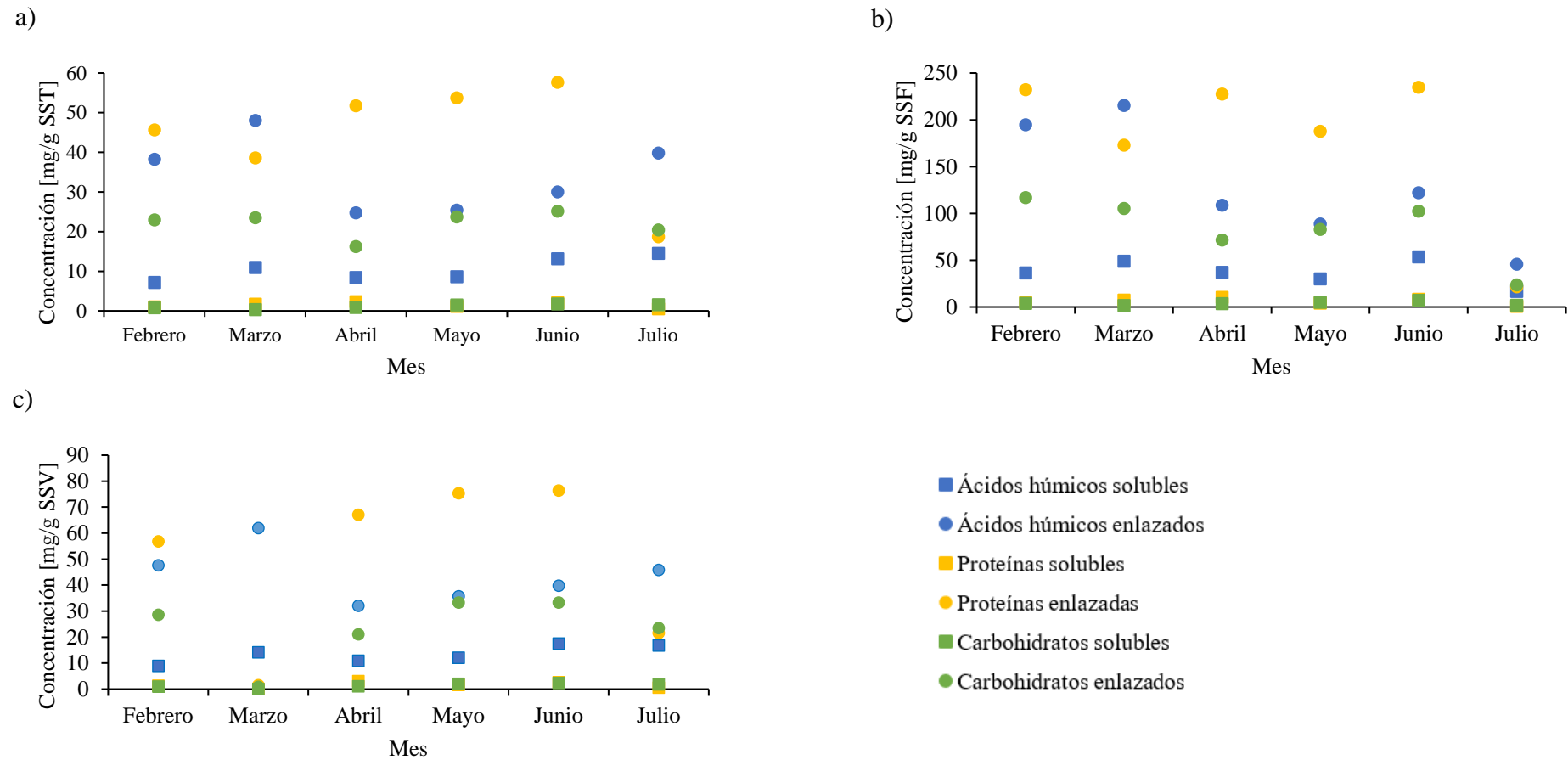
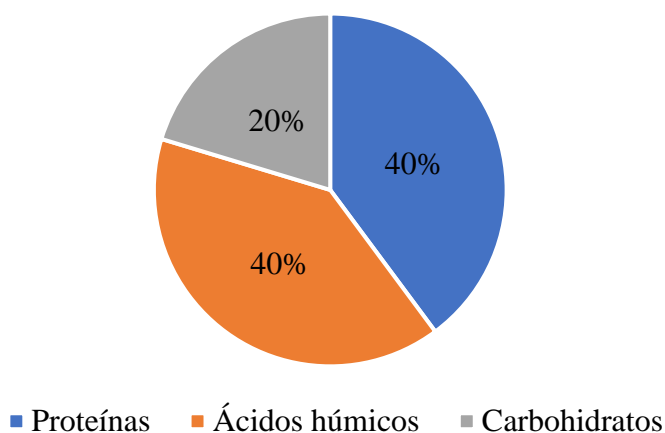


Figura 20. Variación de la concentración (mg/g SS) de ácidos húmicos, proteínas y carbohidratos solubles y enlazados a lo largo de los meses de estudio; a) mg/g SST, b) mg/g SSF, c) mg/g SSV.

En la Figura 21 se muestra el porcentaje medio obtenido de proteínas, ácidos húmicos y carbohidratos en SPE totales durante los meses de estudio,  $40 \pm 12\%$  (20 - 52%),  $40 \pm 11\%$  (30 - 57%) y  $20 \pm 2\%$  (16 - 23%), respectivamente. Estos valores se ajustan a los encontrados en la bibliografía<sup>65,66</sup> en el caso de sistemas de lodos activos donde las proteínas varían entre 40 - 56%, los ácidos húmicos 28 - 50% y los carbohidratos entre 10 - 16%.



*Figura 21. Porcentaje medio de proteínas, carbohidratos y ácidos húmicos en SPE totales entre los meses de febrero y julio.*

Dado que, en tratamientos biológicos de aguas residuales, las SPE están compuestas principalmente por carbohidratos, proteínas y sustancias húmicas (además de pequeñas cantidades de ácido urónico y ADN)<sup>84</sup>, la suma de proteínas, carbohidratos y ácidos húmicos en cada una de las dos fracciones (solubles y enlazadas) da una idea aproximada de las SPE totales. En el caso de las SPE solubles este valor oscila entre 163 y 360 mg/L, mientras que las SPE enlazadas entre 1.792 y 3.964 mg/L durante los meses de estudio (Figura 19). La concentración de SPE enlazadas es entre 9 y 15 veces superior a la detectada en SPE solubles, excepto en junio donde esta diferencia es menor (6 veces), esto es coherente con lo comentado anteriormente, donde la concentración de proteínas, carbohidratos y ácidos húmicos por separado es mayor en la fracción enlazada que en la soluble. La suma de ambas fracciones da lugar a las SPE totales, cuyos valores varían entre 1.955 y 4.297 mg/L a lo largo de los meses.

Con respecto a SST, para SPE solubles se indican en la bibliografía rangos de 0 - 30 mg/g SST de ácidos húmicos, 0 - 33 mg/g SST de carbohidratos y 0,5 - 34 mg/g SST de

proteínas, siendo para SPE ligadas 12 - 13 mg/g SST, 7 - 50 mg/g SST y 20 - 120 mg/g SST, respectivamente (Figura 20)<sup>63</sup>. Como se observa en la Figura 20a, los datos obtenidos en este trabajo se ajustan a los rangos indicados, los cuales son muy amplios, ya que son datos generalizados de sistemas de depuración biológica de aguas residuales.

Comte et al. (2006)<sup>102</sup>, estudiaron diferentes métodos de extracción de SPE en lodos procedentes del tanque de aireación de dos plantas de tratamiento de Francia (90% ARU/10% ARI y 95% ARU/5% ARI) y encontraron que la concentración de SPE totales era en torno a 284 - 318 mg SPE/g SSV, mientras que Chabalina et al. (2008)<sup>73</sup>, indica un rango entre 133 - 234 mg SPE totales/g SSV, siendo las condiciones de este estudio similares a los del caso anterior, con lodos procedentes de tratamiento de aguas de origen 90% municipal y 10% industrial en un MBR a escala de laboratorio. Los resultados obtenidos en el presente TFG oscilan entre 110 - 202 mg SPE/g SSV (suma de carbohidratos, proteínas y ácidos húmicos enlazados y solubles representados en la Figura 20c), valores dentro del rango indicado por Chabalina et al. (2008)<sup>73</sup>, excepto en el mes de julio, y de un orden de magnitud similar al descrito por Comte et al. (2006)<sup>102</sup>.

Estudios más específicos<sup>74,75</sup> en aguas residuales municipales con MBR sumergido, presentan rangos más reducidos: en SPE ligadas, las proteínas se encuentran entre 108 - 243 mg/L y los carbohidratos entre 157 - 306 mg/L, siendo los datos obtenidos más bajos en ambos casos con respecto a los obtenidos en el presente TFG, que son de 406 - 1.059 mg/L y 221 - 642 mg/L, respectivamente (Figura 19). Esta variación puede ser debida a la toma de muestra, ya que los autores indican que esta se lleva a cabo de forma directa en la membrana del MBR, donde la proporción de SPE ligadas es menor debido a que son las SPE solubles las que juegan un papel crítico en el ensuciamiento de la membrana de MBR, mientras que en el presente estudio se toma dentro del reactor<sup>103</sup>.

En la Figura 20, se muestra la relación entre el contenido en proteínas, carbohidratos y ácidos húmicos totales con respecto a los SST, los SSF y los SSV a lo largo de los meses de estudio. Para el cálculo de las concentraciones se ha utilizado el valor medio obtenido y representado en las Figuras 18 y 19. Con respecto a los SST, las proteínas totales varían en rangos de 19 - 60 mg/g SST, los carbohidratos de 17 - 27 mg/g SST y los ácidos húmicos de 33 - 59 mg/g SST (Figura 20a). En función de los SSF, las proteínas totales varían entre 180 - 243 mg/g SSF, los carbohidratos entre 75 - 121 mg/g SSF y los ácidos húmicos entre 119 - 264 mg/g SSF, presentando en julio valores muy bajos con respecto al resto, siendo 22, 25 y 62 mg/g SSF (Figura 20b). Por último, las proteínas en función

de los SSV varían entre 22 y 79 mg/g SSV, los carbohidratos entre 22 y 36 mg/g SSV y los ácidos húmicos entre 43 y 76 mg/g SSV (Figura 20c). En este caso, las proteínas y los carbohidratos presentan en el mes de marzo valores muy por debajo de los rangos indicados, siendo ambos 1 mg/g SSV.

Se ha descrito que la concentración de proteínas y carbohidratos en función de los SSV es un parámetro muy importante en los sistemas de depuración de aguas, puesto que afectan significativamente a la generación de flóculos de los lodos. En este sentido, Huang et al. (2022)<sup>66</sup> indican que una floculación óptima se obtiene cuando los valores de proteínas y carbohidratos están en torno a 22 y 12 mg/g SSV, respectivamente. Una concentración muy alta o baja de estas especies podría llevar a una reducción de la actividad de floculación. Por lo tanto, los valores de proteínas (22 - 79 mg/g SSV) y carbohidratos (22 - 36 mg/g SSV) obtenidos en este TFG indicarían una floculación aceptable (Figura 20c), excepto en el mes de marzo, donde, como se comentó anteriormente, las concentraciones son muy bajas.

A la vista de los datos encontrados de SPE dentro de una misma EDAR y su comparación con otros datos publicados por otros autores, es evidente que, existe una gran variabilidad de datos en cuanto a los rangos de los valores de las SPE, así como su composición, en sistemas de tratamiento de aguas residuales basados en procesos de lodos activos. Esto se debe a innumerables factores que pueden alterar la composición y concentración de SPE, como son: la localización de la planta, el tipo de agua, el punto de muestreo, el origen del lodo, la fase de crecimiento, los parámetros del proceso, el tipo de biorreactor, el método de extracción, los métodos analíticos empleados, etc.<sup>104</sup>

## **4.2. Características y evolución de MPs con el tiempo**

La gran mayoría de los trabajos existentes sobre la presencia de microplásticos en estaciones depuradoras de aguas residuales urbanas (EDARUs) han estudiado los diferentes tratamientos en busca de las mejores condiciones para incrementar la eficacia de eliminación de estos microcontaminantes del agua residual. En este sentido, los bioreactores de membrana (MBR) presentan grandes ventajas con respecto a la mayoría de las tecnologías existentes, pues diversos estudios indican que son capaces de eliminar prácticamente la totalidad de los microplásticos que llegan al mismo ( $\geq 99\%$ ), aunque ciertos autores observaron eficacias de eliminación más bajas (25 - 79%) para estos

sistemas de tratamiento<sup>6</sup>. A este respecto, debe señalarse que la mayoría de los MPs eliminados en los diferentes sistemas biológicos empleados para tratar aguas residuales quedan retenidos en los lodos de depuradora<sup>3</sup>.

Recientes trabajos sobre lodos de aguas residuales en MBR, demuestran que la presencia de MPs en el bioreactor puede reducir el tamaño de los flóculos, su hidrofobicidad y el tamaño molecular de SPE, así como incrementar la concentración de SPE<sup>105</sup>. Por otro lado, diferentes estudios llevados a cabo en sistemas de lodos activos convencionales observaron que la presencia de poliestireno (PS) provocaba el aumento de la cantidad de SPE, la disminución de la respiración endógena, producción de flóculos finos y obstrucción de los poros de la membrana bacteriana, lo que impide el transporte de nutrientes al interior de los microorganismos<sup>106,107</sup>.

En el presente TFG se ha estudiado durante 6 meses la presencia de MPs, y sus características principales, en un MBR de una planta de tratamiento de aguas residuales urbanas de Murcia. Los resultados obtenidos se muestran de manera resumida en la Figura 22 y en la Tabla 11 de Anexos.

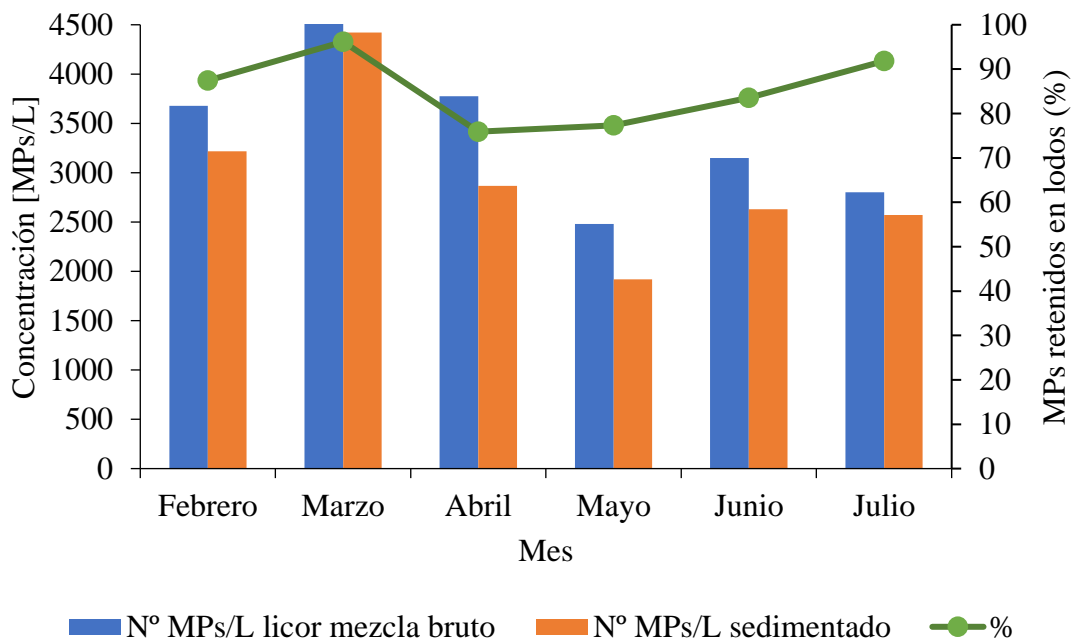


Figura 22. Evolución de la concentración de MPs en el licor mezcla bruto (MPs/L) y en el sólido centrifugado (MPs/L sedimentado) y, el porcentaje de retención de MPs en el sólido con respecto al licor mezcla, a lo largo de los meses en estudio.

Se puede observar como dentro del MBR (licor mezcla bruto), las concentraciones a lo largo de los meses varían entre 2.482 y 4.597 MPs/L, con un valor medio de  $3.414 \pm 764$  MPs/L, mientras que en el sólido centrifugado este valor oscila entre 1.919 y 4.421 MPs/L ( $2.937 \pm 843$  MPs/L). En ambos casos, la concentración más baja se encuentra en el mes de mayo y la más alta en marzo. La presencia de una concentración tan alta de MPs dentro del MBR resulta razonable, puesto que, a pesar de no existir estudios que permitan comparar estos resultados, en la bibliografía se ha descrito que la concentración de MPs en el influente de una EDAR está comprendido entre 0,28 y  $3,14 \cdot 10^4$  MPs/L<sup>36</sup>. Esta gran variabilidad de los datos se debe a muchos factores, específicamente en el caso del agua de origen urbano, a la población servida, la estación del año, el tráfico existente, las actividades domésticas, etc.<sup>5,6</sup>

Como se ha comentado anteriormente, se ha analizado la eficacia de eliminación de MPs en el MBR. Teniendo en cuenta que las muestras de licor mezcla bruto fueron centrifugadas y, aunque, el proceso de separación de los sólidos no es el mismo que ocurre en la EDAR estudiada donde se emplea el MBR, se puede estimar el porcentaje de eliminación de MPs. Para ello, y considerando la concentración de MPs presente en el sólido centrifugado con respecto al licor mezcla bruto, se ha calculado el porcentaje de retención de MPs en los mismos (Figura 22). De este modo, se obtiene un valor de  $85 \pm 8\%$ . Este valor es algo inferior al encontrado en la bibliografía<sup>108</sup> (generalmente mayor del 99%) cuando se compara la concentración de MPs a la entrada y salida de un sistema MBR. Esto se debe a que en el proceso de centrifugación no se separan las partículas de baja densidad que quedarían retenidas en la membrana del biorreactor, ya que la recogida de la muestra se realiza en el licor mezcla, dentro del MBR. El tamaño de poro que presenta la membrana es de  $0,45 \mu\text{m}$ , impidiendo el paso de impurezas (incluidos los MPs), independientemente de su densidad, únicamente en función de su tamaño. En este caso, el ensayo basado en la centrifugación posiblemente subestima el porcentaje de retención final de MPs en los lodos debido a la presencia de la membrana, que muy probablemente sea cercano al descrito en la bibliografía.

La concentración media de MPs en el licor mezcla es de  $188 \pm 47$  MPs/g sólido seco (entre 143 y 278 MPs/g sólido seco, obtenido a partir de SST). Estos valores concuerdan con los descritos en la bibliografía, donde la concentración de microplásticos en lodos está comprendida entre 0,008 MPs/g lodo seco<sup>109</sup> y 240 MPs/g lodo seco<sup>110</sup>. En concreto,

Lares et al. (2018)<sup>59</sup> estudiaron varios parámetros (concentración de MPs, tamaño, forma, composición...) en distintos puntos del proceso de una EDARU en Finlandia, que trataba 10.000 m<sup>3</sup>/día, y en la que se había instalado un MBR a escala piloto después de la decantación primaria. Los autores encontraron una concentración de 27,3 MPs/g sólido seco en los lodos del MBR. Este valor es bastante más bajo que el obtenido en este trabajo, puesto que en la planta de Finlandia se eliminaba parte de los MPs en los lodos obtenidos en la decantación primaria, mientras que la EDARU evaluada en este TFG carece de tratamiento primario. Por su parte, Di Bella et al. (2022)<sup>71</sup> estudiaron una EDARU situada en Sicilia (Italia), con capacidad de 6.000 m<sup>3</sup>/día y que presenta un diagrama de flujo similar (sin tratamiento primario) y el mismo punto de muestreo que la planta de Murcia analizada en este TFG, e indicaron en lodos de MBR una concentración de 81,1 MPs/g sólido seco, siendo inferior al encontrado en el presente trabajo. La concentración de MPs presente en el sólido centrifugado es de  $159 \pm 33$  MPs/g de sólido seco (entre 110 y 210 MPs/g sólido seco). Como se puede observar, este valor es ligeramente inferior al obtenido en el licor mezcla ( $188 \pm 47$  MPs/g sólido seco). Esto es debido a que como se produce una centrifugación, parte de los microplásticos se pierden en el sobrenadante.

Por otro lado, en la bibliografía también se han estudiado numerosos casos de lodos secundarios obtenidos a partir de sistemas convencionales de lodos activados. Por ejemplo, Tadsuwan y Babel (2022)<sup>111</sup> estudiaron la eficacia de eliminación de MPs de una EDAR en Tailandia, con una capacidad de tratamiento de 300.000 m<sup>3</sup>/día, y encontraron una concentración en lodos de 26,3 MPs/g sólido seco, para una planta de tratamiento que cuenta con un diagrama de flujo similar al descrito en la planta estudiada en este TFG, sin tratamiento primario y variando el MBR por el sistema de lodos activados. Di Bella et al. (2022)<sup>40</sup> también estudiaron un sistema de lodos activados sin tratamiento primario, obteniendo una concentración de 36 MPs/g sólido seco. Se puede ver que las concentraciones de MPs son más bajas en sistemas de lodos activados convencionales que en sistemas con MBR, esto se debe a la mayor retención de partículas proporcionado por la membrana, por lo que sistemas de MBR tendrán mayor eficacia de eliminación.

Teniendo en cuenta que en la EDAR estudiada en este TFG, la concentración media de microplásticos en el licor mezcla es de  $188 \pm 47$  MPs/g sólido seco y, que la EDAR genera en torno a  $3 \cdot 10^8$  g de lodos secos/año, se puede estimar que  $5,64 \cdot 10^{10}$  MPs quedan retenidos en los lodos a lo largo del año. De acuerdo a Isobe et al. (2021)<sup>112</sup>, una cantidad

de  $2,44 \cdot 10^{13}$  MPs representa un peso de aproximadamente  $8,2 \cdot 10^4$  toneladas. Extrapolando estos datos a los obtenidos en la EDARU en estudio, se puede ver que los MPs retenidos en los lodos anualmente, tendrían un peso de casi 190 toneladas. Esta cantidad representa aproximadamente el 63% del total de lodos secos generados al año. Una cantidad apreciable si se tiene en cuenta que los lodos se reutilizan mayoritariamente como enmienda orgánica en suelos, lo que implica la liberación de los MPs retenidos en los lodos al medio ambiente<sup>3</sup>.

Otra forma de expresar la concentración de MPs presentes en lodos es en función de los SS. En la Figura 23 y Tabla 12 (Anexos), se puede ver que en el licor mezcla bruto, se obtienen unos valores medios de  $12,55 \pm 1,51$  MPs/g SST,  $58,50 \pm 6,21$  MPs/g SSF y  $16,03 \pm 2,29$  MPs/g SSV.

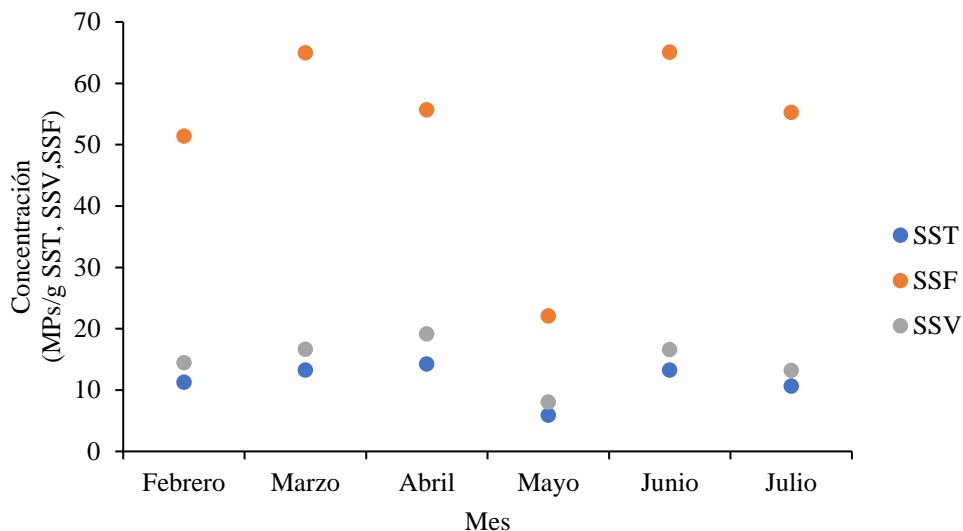


Figura 23. Evolución de la concentración (MPs/g SST, SSV y SSF de licor mezcla) en los meses de estudio.

Los microplásticos detectados se han clasificado en función de su tamaño, forma, color y composición química. En vista a la Figura 24a y en la Tabla 13 (Anexos), se puede observar que la concentración media de tamaños encontrados en el licor mezcla bruto es la siguiente:  $26 \pm 4\%$  ( $> 500 \mu\text{m}$ ),  $25 \pm 3\%$  ( $250 - 500 \mu\text{m}$ ),  $37 \pm 8\%$  ( $100 - 250 \mu\text{m}$ ) y  $11 \pm 5\%$  ( $20 - 100 \mu\text{m}$ ). Por analogía, se podría considerar y comparar la cantidad de MPs en el licor mezcla bruto con las características principales de estos en la línea de aguas. Etapas anteriores al tratamiento secundario (MBR, en este caso), son capaces de eliminar MPs de la corriente acuosa, por ejemplo, según Liu et al. (2021)<sup>36</sup> indica que el tratamiento primario (que incluye el desarenado-desengrasado y la decantación primaria)

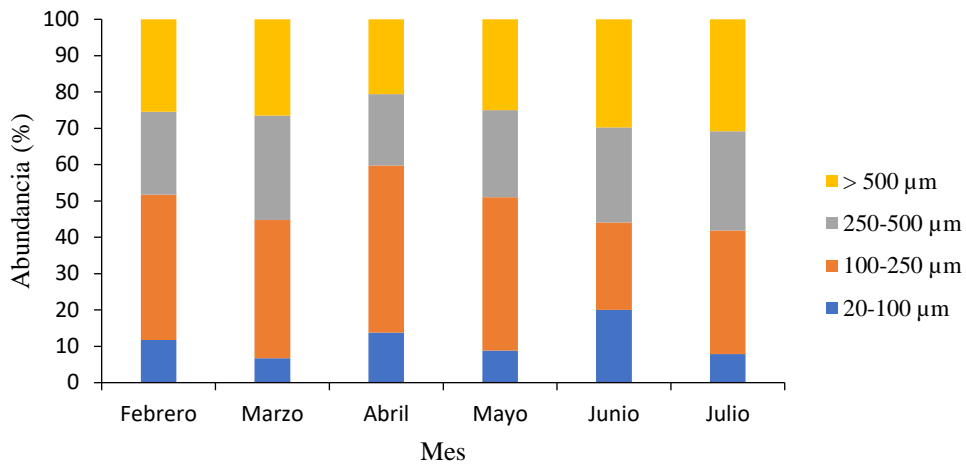


es capaz de eliminar preferentemente las partículas  $> 500 \mu\text{m}$  y una vez eliminadas, el tratamiento secundario actúa sobre las partículas  $< 500 \mu\text{m}$ . Algunos autores han indicado que el desarenado-desengrasado es capaz de eliminar un 45% de los MPs presentes en el agua residual<sup>32</sup> aunque este valor puede llegar a ser hasta del 69 - 79% (incluyendo el desbaste)<sup>33</sup>. En la bibliografía<sup>6,66</sup>, se describe que en el influente de las EDAR las partículas  $> 500 \mu\text{m}$  representan un 70% de los MPs totales, si se compara este valor con el obtenido en el presente TFG en el licor mezcla bruto, donde los MPs  $> 500 \mu\text{m}$  representan únicamente el 26%, se puede decir que el valor experimental obtenido es razonable puesto que en la EDARU en estudio, la etapa anterior al MBR es un desarenado-desengrasado. Este pretratamiento, como se comentó anteriormente, es capaz de eliminar más del 45% de los MPs mayores de  $500 \mu\text{m}$ . Por lo tanto, es normal que la abundancia de este rango de micropartículas sea inferior al del agua que entra en la EDARU.

Por otro lado, en la fracción sólida obtenida por centrifugación los resultados obtenidos fueron los siguientes:  $30 \pm 9\%$  ( $> 500 \mu\text{m}$ ),  $32 \pm 7\%$  ( $250 - 500 \mu\text{m}$ ),  $27 \pm 5\%$  ( $100 - 250 \mu\text{m}$ ) y  $11 \pm 3\%$  ( $20 - 100 \mu\text{m}$ ) (Figura 24b y Tabla 13 de Anexos). Estos porcentajes indican que en los lodos quedaron retenidas mayoritariamente las partículas  $> 250 \mu\text{m}$ . Lares et al. (2018)<sup>59</sup> obtuvieron la siguiente distribución de tamaños en lodos procedentes de MBR: 40 % ( $> 500 \mu\text{m}$ ), 42% ( $250 - 500 \mu\text{m}$ ) y 18% ( $< 250 \mu\text{m}$ ), porcentajes que difieren bastante de los obtenidos en este trabajo, muy probablemente debido a la presencia de una decantación primaria en la EDAR estudiada en el citado trabajo, ya que la fracción de MPs  $< 250 \mu\text{m}$  en este TFG es la más abundante, llegando al 38%. Por otro lado, Di Bella et al. (2022)<sup>71</sup> analizaron lodos procedentes de dos EDARUs, una con un sistema de lodos activados convencional y otra con un MBR, en ambos casos los MPs  $< 1 \text{ mm}$  representan el 98%, mientras que el 2% restante se corresponde a MPs entre 1 y 5 mm.

Comparando el contenido porcentual en función del tamaño, se puede observar como la abundancia de MPs  $> 250 \mu\text{m}$  se incrementa en la fracción sólida con respecto al licor mezcla bruto, lo que indica la mayor facilidad de sedimentar de las micropartículas de mayor tamaño<sup>3,113</sup>. Por otra parte, los MPs comprendidos en el rango  $100 - 250 \mu\text{m}$  son más abundantes en el licor mezcla, mientras que los MPs comprendidos entre  $20 - 100 \mu\text{m}$  tienen la misma abundancia en ambas fracciones.

a)



b)

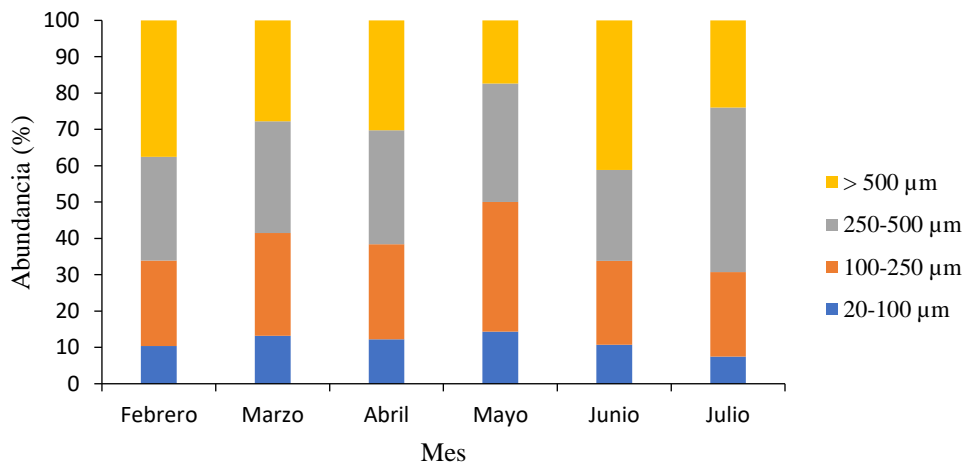


Figura 24. Contenido porcentual en función del tamaño de MPs durante los meses de estudio; a) licor mezcla bruto, b) sólido obtenido por centrifugación.

Otra forma de clasificar los microplásticos es en función de su morfología. En la bibliografía, se indica que las microfibras son los microplásticos más abundantes tanto en las aguas residuales como en los lodos, seguidas de los fragmentos, los cuales también se observan en alta concentración. Otras formas detectadas, como son los pellets, films y espumas se encuentran habitualmente en proporciones minoritarias<sup>4,6,36</sup>. En la Figura 25a y en la Tabla 14 de los Anexos se puede ver como en el licor mezcla las fibras y los fragmentos representan, respectivamente, el  $71,42 \pm 6,05\%$  y  $28,49 \pm 5,99\%$  de los MPs encontrados, constituyendo en conjunto la práctica totalidad de las partículas detectadas (99,91%). Resultado que coincide con los valores descritos en la bibliografía, donde de media, se observa que las fibras representan el 57% y los fragmentos el 34%, siendo el

91% de los MPs detectados<sup>3</sup>. También existen otras morfologías estudiadas en aguas residuales: films, pellets y espumas. En este caso, las espumas ( $0,09 \pm 0,07\%$ ) se han detectado en unas abundancias prácticamente despreciables, y a pesar de que en la bibliografía se indica que en aguas residuales hay films y pellets, no se han detectado ninguna de esas partículas en las muestras analizadas en este TFG.

Por otro lado, en la Figura 25b (Tabla 14 de Anexos) se muestra la relación morfológica de los MPs para la fracción sólida obtenida por centrifugación. Al igual que en el caso anterior, las fibras son mayoritarias, con una abundancia del  $78,49 \pm 2,62\%$  mientras que el contenido en fragmentos es del  $21,38 \pm 2,53\%$ . De nuevo, las espumas representan un porcentaje despreciable ( $0,13 \pm 0,32\%$ ) y no se observa ningún film ni pellet. Sol et al. (2021)<sup>4</sup> analizaron 67 estudios a nivel mundial que evaluaban la incidencia de los microplásticos en EDARs, estos autores concluyeron que hasta el 79% de las microfibras pueden llegar a ser eliminadas de las aguas residuales y, por lo tanto, acabar retenidas en los lodos. Un valor similar al encontrado en el presente TFG, donde se detecta un contenido del 78% de fibras en el sólido centrifugado. Estudios mencionados anteriormente donde analizan los microplásticos encontrados en lodos de MBR, presentan diversos resultados. Por una parte, Di Bella et al. (2022)<sup>71</sup>, encontraron un contenido de 47% en fibras, 29% en films y 24% en fragmentos, mientras que Lares et al. (2018)<sup>59</sup>, obtuvieron unos resultados muy similares a los encontrados en el presente TFG, con un 87% en fibras y un 13% en fragmentos. Ambos estudios coinciden en la ausencia de pellets en las muestras analizadas.

Si se analiza en mayor profundidad los contenidos porcentuales de ambas fracciones, se puede observar como en el sólido obtenido por centrifugación se concentra un mayor porcentaje de fibras con respecto a fragmentos, en concordancia con lo encontrado en la bibliografía, donde se indica que las fibras son las partículas más abundantes y que mejor sedimentan y/o son arrastradas por los flóculos a los lodos<sup>4,36</sup>.

Es destacable el hecho de la presencia de MPs mayores de  $500 \mu\text{m}$  en el licor mezcla ( $26 \pm 4\%$ ), a pesar de que la EDARU en estudio presenta un tamiz Huber de  $0,5 \text{ mm}$  de luz de paso, colocado antes del MBR y especialmente diseñado para eliminación de pelos y fibras. La gran mayoría se corresponden con microfibras, esto es debido a que dichas micropartículas presentan una elevada relación longitud/anchura, lo que les permite atravesar las membranas o filtros longitudinalmente. Por lo tanto, las fibras son las

partículas microplásticas más difíciles de eliminar en las aguas residuales debido a sus características morfológicas<sup>3,6</sup>.

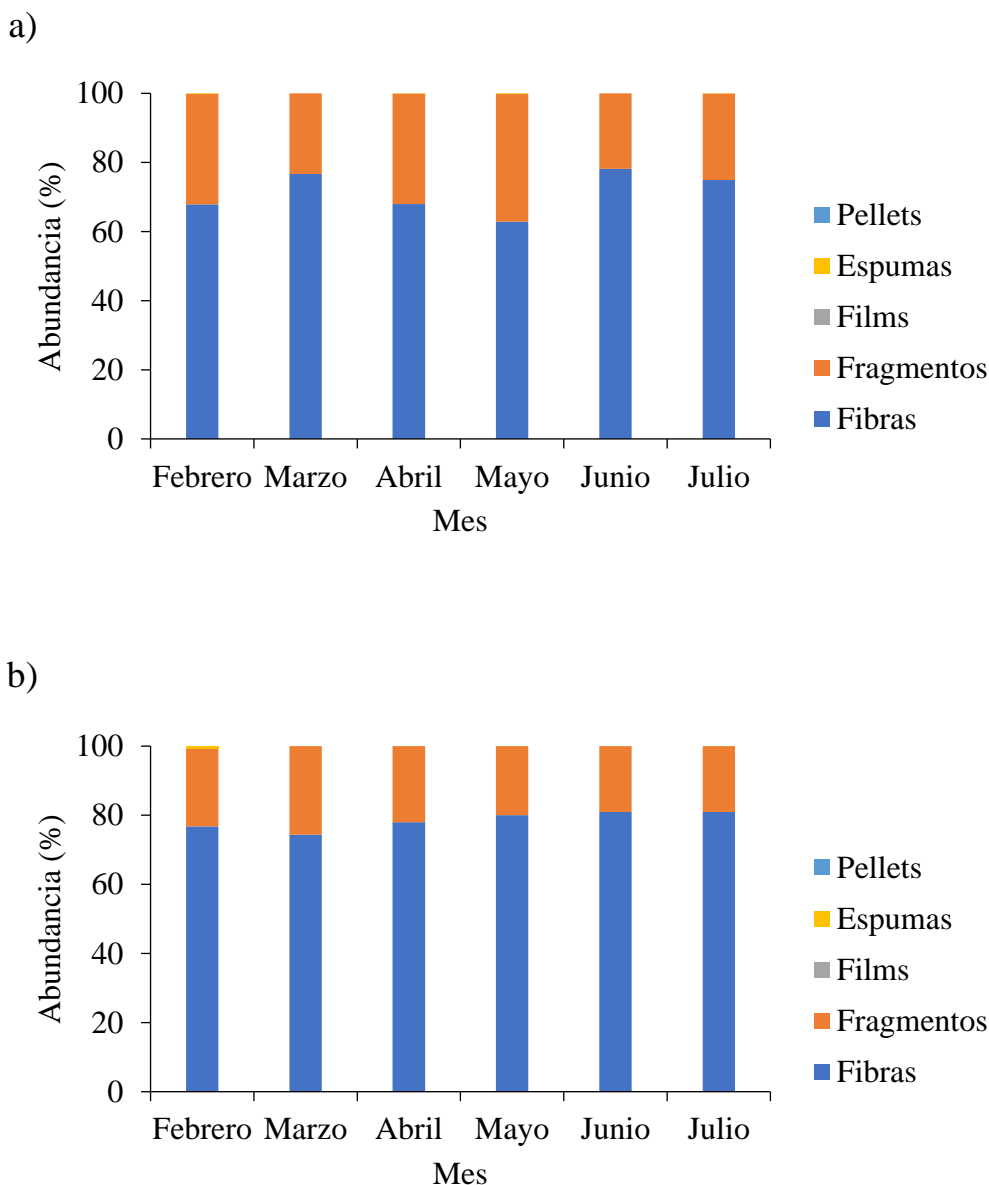
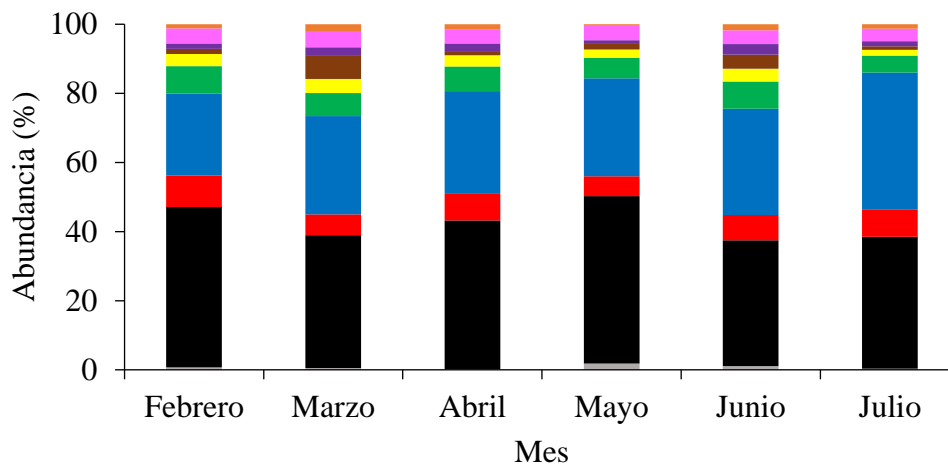


Figura 25. Contenido porcentual en función de la forma de MPs durante los meses de estudio; a) licor mezcla bruto, b) sólido obtenido por centrifugación.

A pesar de no ser un aspecto fundamental en la caracterización de MPs, la clasificación por color es muy común en todos los estudios que implican el análisis de microplásticos. Hay que indicar que esta clasificación puede resultar útil para determinar el origen de estas micropartículas y, sobre todo, es importante ya que algunos estudios han determinado que algunos organismos acuáticos son capaces de ingerir de forma selectiva partículas de un determinado color con respecto a otro<sup>114</sup>.

a)



b)

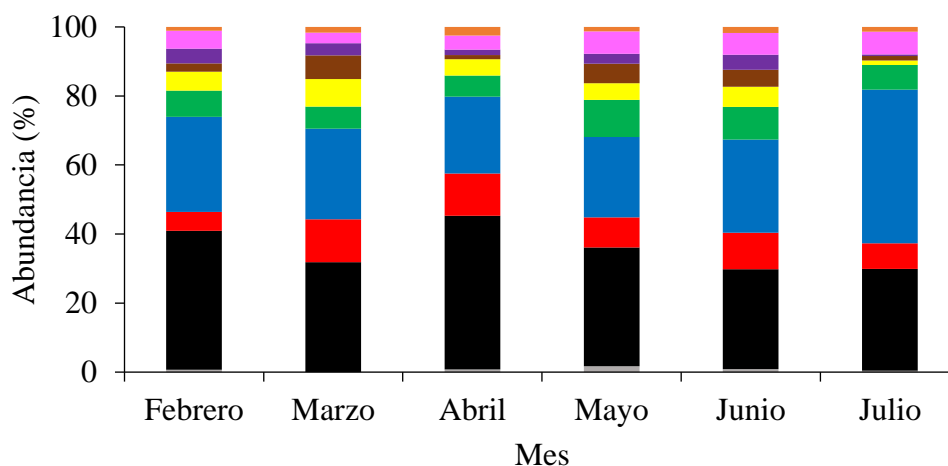


Figura 26. Contenido porcentual en función del color de MPs durante los meses de estudio; a) licor mezcla bruto, b) sólido obtenido por centrifugación.

El contenido porcentual de colores en el licor mezcla es el siguiente:  $34,9 \pm 6,2\%$  (negro),  $30,1 \pm 5,2\%$  (azul),  $7,3 \pm 1,2\%$  (rojo),  $6,7 \pm 1,2\%$  (verde),  $5,3 \pm 1,5\%$  (rosa),  $5,0 \pm 2,2\%$  (amarillo),  $3,7 \pm 2,4\%$  (marrón),  $2,8 \pm 1,6\%$  (morado),  $1,4 \pm 0,6\%$  (naranja) y  $0,8 \pm 0,6\%$  (blanco) (Figura 26a y Tabla 15 de Anexos) y en el sólido obtenido por centrifugación:  $41,8 \pm 4,9\%$  (negro),  $28,5 \pm 8,1\%$  (azul),  $9,5 \pm 2,8\%$  (rojo),  $7,9 \pm 1,8\%$  (verde),  $4,1 \pm 0,3\%$  (rosa),  $3,1 \pm 0,9\%$  (amarillo),  $2,7 \pm 2,2\%$  (marrón),  $1,9 \pm 0,9\%$  (morado),  $1,6 \pm 0,5\%$  (naranja) y  $0,8 \pm 0,6\%$  (blanco) (Figura 26b y Tabla 15 de Anexos). Estos resultados concuerdan con los datos encontrados en la bibliografía, donde se indica que los colores

más detectados en las aguas residuales y en lodos son el negro, azul, rojo y verde, y que la suma de esos colores representa el 86,7% y 81,5% en la fracción licor mezcla y sólida, respectivamente. Sin embargo, el blanco también se identifica como uno de los colores más presentes, mientras que en este TFG es el color menos detectado<sup>6,115</sup>. Debe señalarse que en la bibliografía no aparece ningún estudio de lodos procedentes específicamente de MBR en el que se indique una clasificación de los MPs por color.

Por último, se han clasificado los MPs en función de su composición química. En el presente TFG, se han llegado a detectar hasta 18 polímeros distintos (Figura 27) en el licor mezcla bruto y el sólido obtenido por centrifugación. Las abundancias encontradas para cada una de las fracciones son las siguientes, en el licor mezcla: 31,5% (poliéster, PES), 12,4% (tereftalato de polietileno, PET), 12,4% (rayón, RA), 8,6% (polipropileno, PP), 8,2% (polietileno, PE), 7,3% (polietilenimina, PEI), 3,6% (celulosa, CE), 3,5% (policloruro de vinilo, PVC), 2,7% (poliuretano, PU), 2,1% (ácido poliacrílico, PAA), 2,1% (resina epoxy, ER), 1,4% (polioximetileno, POM), 1,4% (poliestireno:acrilonitrilo:metilacrilato, PS/PAN/PMA), 0,7% (poliestireno, PS), 0,7% (norborneno, NBE), 0,7% (copolímero polietileno:polipropileno, PE/PP) y 0,7% algodón y, en el sólido: 33,7% PES, 13,3% PET, 13,3% RA, 8,2% PP, 8,0% PEI, 6,4% PE, 3,7% CE, 2,9% PVC, 2,1% PU, 1,9% PAA, 1,9% ER, 1,1% POM, 1,1% PS/PAN/PMA, 0,8% algodón, 0,5% PS, 0,5% NBE, 0,5% PE/PP y 0,1% látex. Los espectros característicos de cada polímero detectado se encuentran recogidos en el Anexo 6.3.

No todas las partículas analizadas en FTIR se corresponden con MPs, en concreto, el 93% y 62% de fibras y fragmentos totales son partículas plásticas, mientras que el resto se corresponde con impurezas, como son quitina, sacarosa, eritrosa, ácido ricinoleico, baya de espino, ácido galacturónico, viniltriacetoxisilano, aceite de hachís, colorante cosmético, etc. En la bibliografía se han llegado a detectar hasta 30 polímeros diferentes en EDARs, donde la abundancia de uno u otro compuesto depende fundamentalmente del origen del agua residual (industrial, agrícola, exclusivamente urbana...). De acuerdo a los diferentes trabajos publicados, los microplásticos más detectados, tanto en el agua residual como en los lodos, son PE, PP, PA, PET, PS, PVC, PES, PU y policarbonato (PC)<sup>3,36</sup>. En este TFG, la suma de todos estos polímeros suponen el 67,6% y 67,3% de la fracción licor mezcla bruta y sólida, aunque debe señalarse que en el presente trabajo no se ha detectado PA ni PC. Estudios previos que analizaron MPs en lodos de MBR no

detectaron tanta variedad de polímeros plásticos, siendo los principales compuestos: PET (29%), PES (27%), polibutadieno (PB, 16%), PP (13%), CE (9%) y PE (6%)<sup>71</sup>. Lares et al. (2018)<sup>59</sup> encontraron que PES, PA y PE representaban un 90% de los MPs estudiados, siendo el más abundante PES (80%), de acuerdo con lo encontrado en este TFG.

Los microplásticos encontrados pueden ser agrupados en función de su densidad, entre 0,8 - 1 g/mL (PE, PP, ER, NBE y látex), entre 1 - 1,2 g/mL (PES y NBE) y 1,2 - 1,5 g/mL (PET, PVC, PU, PS, POM, CE, RA, PAA, algodón y PEI). De algunos copolímeros como PS/PAN/PMA y PE/PP, no ha sido posible encontrar valores sobre su densidad en la bibliografía. Los microplásticos más densos sedimentan más fácilmente, mientras que los más ligeros tienden a permanecer en el agua residual por flotación<sup>3,36</sup>. Sin embargo, teniendo en cuenta los valores encontrados tanto en el licor mezcla bruto como en el sólido obtenido por centrifugación no se observan apenas diferencias, ya que todos los polímeros sedimentan en la misma proporción. Esto coincide con los resultados descritos por algunos autores que indican la presencia mayoritaria de MPs de baja densidad como el PE y PP en lodos<sup>116,117</sup>. Mientras que otros autores han encontrados MPs de alta densidad, como PET y PVC, en el efluente de una EDAR<sup>118,119,120</sup>. Esto demuestra la gran complejidad que implica el análisis del comportamiento de los MPs en los procesos de tratamiento de aguas residuales.

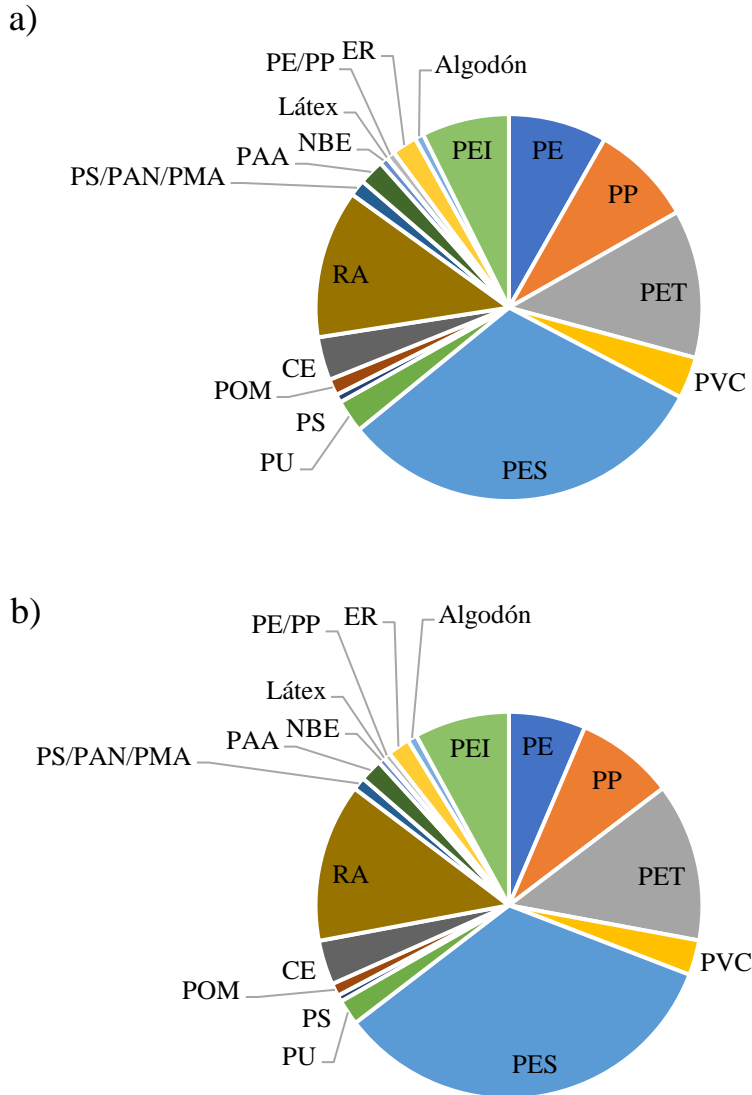


Figura 27. Contenido porcentual en función de la composición de los MPs durante los meses de estudio; a) licor mezcla bruto, b) sólido obtenido por centrifugación.

Como conclusión se puede destacar que la tecnología MBR presenta una alta eficacia en la eliminación de MPs desde la fase acuosa a la sólida. Según los resultados obtenidos en este trabajo, al menos el  $85 \pm 8\%$  de los microplásticos pueden ser eliminados, si bien, es muy probable que este porcentaje se encuentre cerca del 99% si tenemos en cuenta que dentro del MBR hay una membrana de tamaño de poro de  $0,45 \mu\text{m}$ . Los únicos MPs que podrían atravesar la membrana serían las fibras debido a sus características morfológicas. Si bien esta tecnología presenta ciertos inconvenientes como son el alto coste de la membrana y mantenimiento, alto consumo energético y bajo flujo de trabajo<sup>4,6</sup>.



### 4.3. Relación SPE-MPs

Como se ha comentado anteriormente, la presencia de SPE y MPs afecta a los procesos de tratamiento de lodos activos, en general, y a los sistemas MBR, en particular. Las sustancias poliméricas extracelulares determinan la morfología y estructura de los lodos, lo que influye en el ensuciamiento de las membranas y, por otra parte, ha sido descrito que los MPs son capaces de incrementar la cantidad de SPE secretadas por los microorganismos, lo que afecta a los flóculos, reduciendo su tamaño y su carácter hidrofóbico<sup>105,106</sup>.

Por estos motivos, resulta interesante el estudio de las posibles relaciones que puedan existir entre ambos parámetros (MPs y SPE). La gran abundancia de MPs en aguas superficiales y sus efectos sobre el medio ambiente ha llevado a varios autores a realizar estudios donde ponen en contacto determinados MPs con distintos organismos acuáticos comunes. Por ejemplo, Hung et al. (2022) analizaron la exposición de *Goniopora columna*<sup>77</sup> y de un arrecife de coral<sup>78</sup> a PE y observaron que altas concentraciones de MPs (100 - 300 mg/L) aumentaban la diversidad microbiana de los ecosistemas y con ello la producción de SPE (en concreto de ácidos húmicos), mientras que a bajas concentraciones de PE (5 mg/L) ambos parámetros disminuyeron. Esta misma tendencia ha sido observada por Gopalakrishnan y Kashian (2022)<sup>79</sup>, que expusieron *Chlamydomonas* a HDPE, encontrando resultados similares a los descritos por Hung et al (2022). Con otros MPs como el PS, se estudiaron las distintas respuestas microbianas en lodos granulares anaerobios<sup>80</sup> y de *Microcystis aeruginosa*<sup>121</sup> (cianobacteria presente habitualmente en sistemas de lodos activos) y en ambos casos se observó nuevamente el aumento en la producción de SPE, aunque en lodos granulares solo se cumple en el caso de partículas plásticas pequeñas (0,5 µm), mientras que con MPs de tamaños más grandes (150 µm), la producción de SPE disminuye. Asimismo, es reseñable el hecho de que, en el caso de la *Microcystis aeruginosa*, una concentración de 500 mg/L de MPs es capaz de inhibir hasta en un 31% el crecimiento de la cianobacteria.

Por otra parte, Luo et al. (2022)<sup>82</sup> estudiaron las interacciones derivadas de la presencia de PP y ácidos húmicos. Para ello, usaron tanto PP puro como envejecido (mediante un tratamiento de fotoenvejecimiento acelerado en una cámara con luz xenón durante tres meses). Los resultados indicaron que la presencia de ácidos húmicos incrementó la rugosidad superficial del PP y aceleró su oxidación superficial. Los ácidos húmicos

mostraron mayor afinidad de unirse a los PP envejecidos con respecto al PP puro. También se vio un aumento de la proporción de oxígeno por la introducción de nuevos grupos funcionales en la superficie de las partículas de plástico derivados de los ácidos húmicos.

A la vista a lo comentado anteriormente, ampliar el conocimiento en dicho campo resulta fundamental a fin de conocer los procesos que tienen lugar en los tratamientos biológicos de aguas residuales y, en concreto, en los sistemas MBR. Por ello, en el presente TFG se ha estudiado la relación existente entre la concentración de SPE (proteínas (Figura 28a), carbohidratos (Figura 28b), ácidos húmicos (Figura 28c) y SPE totales (Figura 28d), cuyos datos se encuentran recogidos en la Tabla 16 de los Anexos) y el porcentaje de MPs retenidos en el sólido centrifugado (Figura 22). Como se puede observar en la Figura 28a, el coeficiente de correlación en las proteínas es muy bajo, tanto en la fracción soluble ( $R^2 = 0,0183$ ) como en la enlazada ( $R^2 = 0,0006$ ). También hay que indicar que el total de proteínas, derivado de la suma de las concentraciones de SPE solubles y enlazadas, presenta una mala correlación ( $R^2 = 0,0003$ ). En carbohidratos (Figura 28b) y SPE totales (Figura 28d) se obtienen mejores correlaciones, aunque los coeficientes de correlación ( $R^2$ ) siguen teniendo valores bajos, respectivamente, 0,0029 y 0,5890 en la fracción soluble y, 0,6916 y 0,5800, en la fracción enlazada. Esta misma tendencia es observada para los totales de ambas fracciones, siendo 0,0003 y 0,6821 para proteínas y carbohidratos, respectivamente. Por último, en ácidos húmicos (Figura 28c), si se encuentra una buena correlación en la fracción enlazada ( $R^2 = 0,9162$ ) y en húmicos totales ( $R^2 = 0,9362$ ), mientras que la fracción soluble tiene un coeficiente de correlación más bajo, similar al de carbohidratos y SPE totales ( $R^2 = 0,6550$ ). Estos resultados muestran que los MPs presentan una mayor afinidad a enlazarse y/o interactuar con los ácidos húmicos, sobre todo con los presentes en la fracción enlazada, con respecto al resto de parámetros estudiados. Considerando los datos obtenidos en las SPE totales, los valores de los coeficientes de correlación son aceptables, con  $R^2$  comprendidos entre 0,5800 y 0,6478. Esto se debe probablemente al efecto de los ácidos húmicos presentes en las SPE totales, ya que estos representan el  $40 \pm 11\%$  de las SPE estudiadas en el presente TFG.

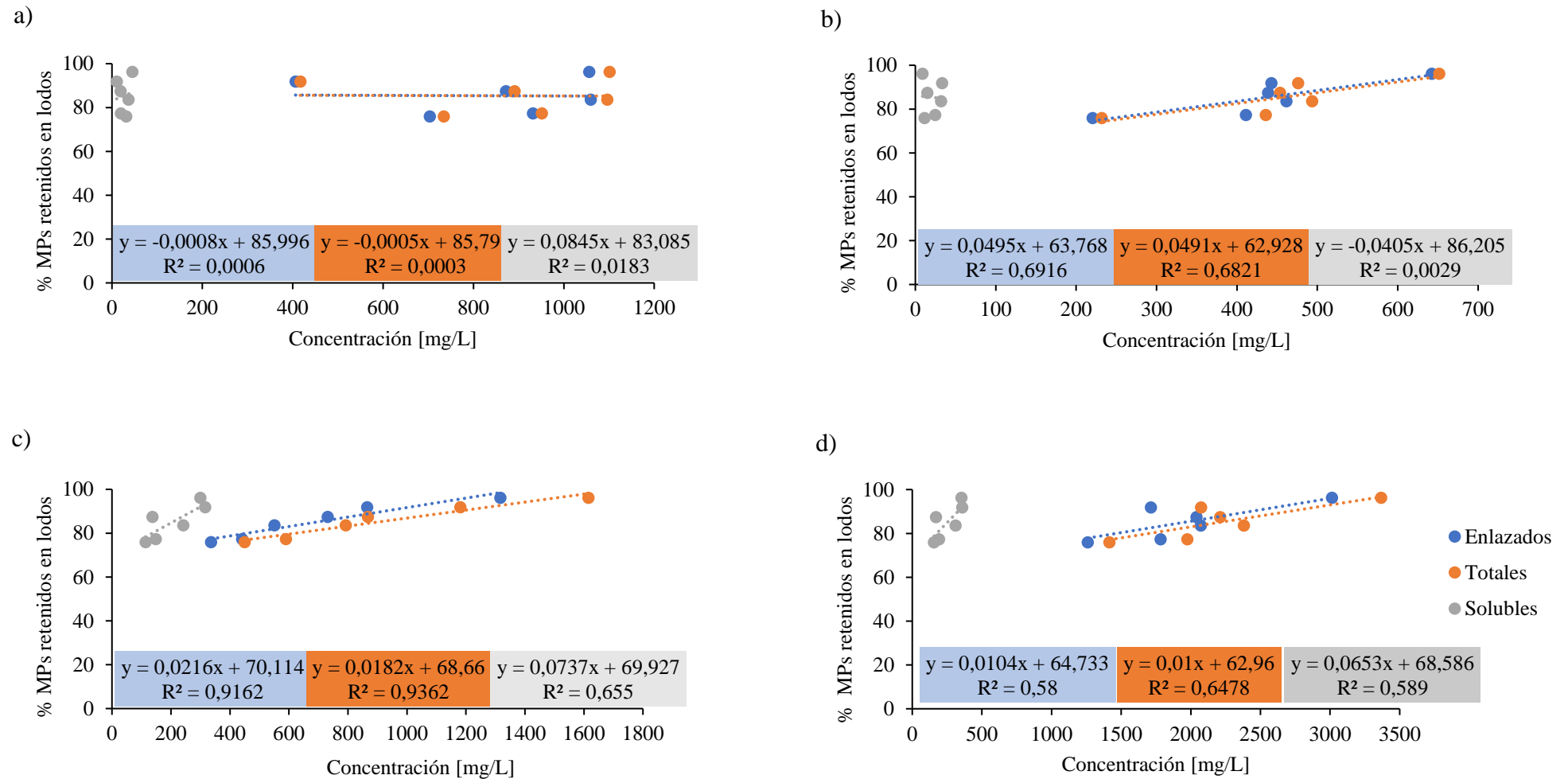


Figura 28. Correlaciones entre el porcentaje de MPs retenidos en el sólido centrifugado y las SPE; a) proteínas, b) carbohidratos, c) ácidos húmicos y d) SPE totales.

Las SPE son compuestos de alto peso molecular que son secretados por diversos tipos de microorganismos, y constan de una matriz hidratada donde sus componentes están ensamblados y mayormente inmovilizados. Se diferencia entre SPE ligadas ( $SPE_L$ ), que se encuentran en la superficie de la célula, y SPE solubles ( $SPE_S$ ), que están disueltas en el medio. Las ligadas se dividen a su vez en SPE fuertemente ligadas ( $SPE_{FL}$ ), las cuales se encuentran en la capa interna rodeando a la célula, y las débilmente ligadas ( $SPE_{DL}$ ), que se difunden en la capa externa, tal y como se puede observar en la Figura 29a. Se estima que el contenido de metabolitos en  $SPE_{DL}$  es aproximadamente 1/5 del contenido en  $SPE_{FL}$ <sup>67</sup>.

Como ya ha sido comentado, las SPE se componen fundamentalmente de proteínas, ácidos húmicos y carbohidratos. Las proteínas se encuentran mayoritariamente en  $SPE_{FL}$  (97%) mientras que los ácidos húmicos se encuentran en ambas fracciones,  $SPE_{FL}$  y  $SPE_{DL}$ . Esta misma tendencia se observa para los carbohidratos, los cuales se distribuyen de forma uniforme en  $SPE_{FL}$  y  $SPE_{DL}$ <sup>68,122,123</sup>. Otro aspecto estructural a tener en cuenta es que, de acuerdo a Tomaszewski et al. (2011)<sup>124</sup>, los ácidos húmicos son capaces de encapsular a las proteínas mediante interacciones hidrofóbicas en un amplio rango de pH, entre 5 y 8 (Figura 29a).

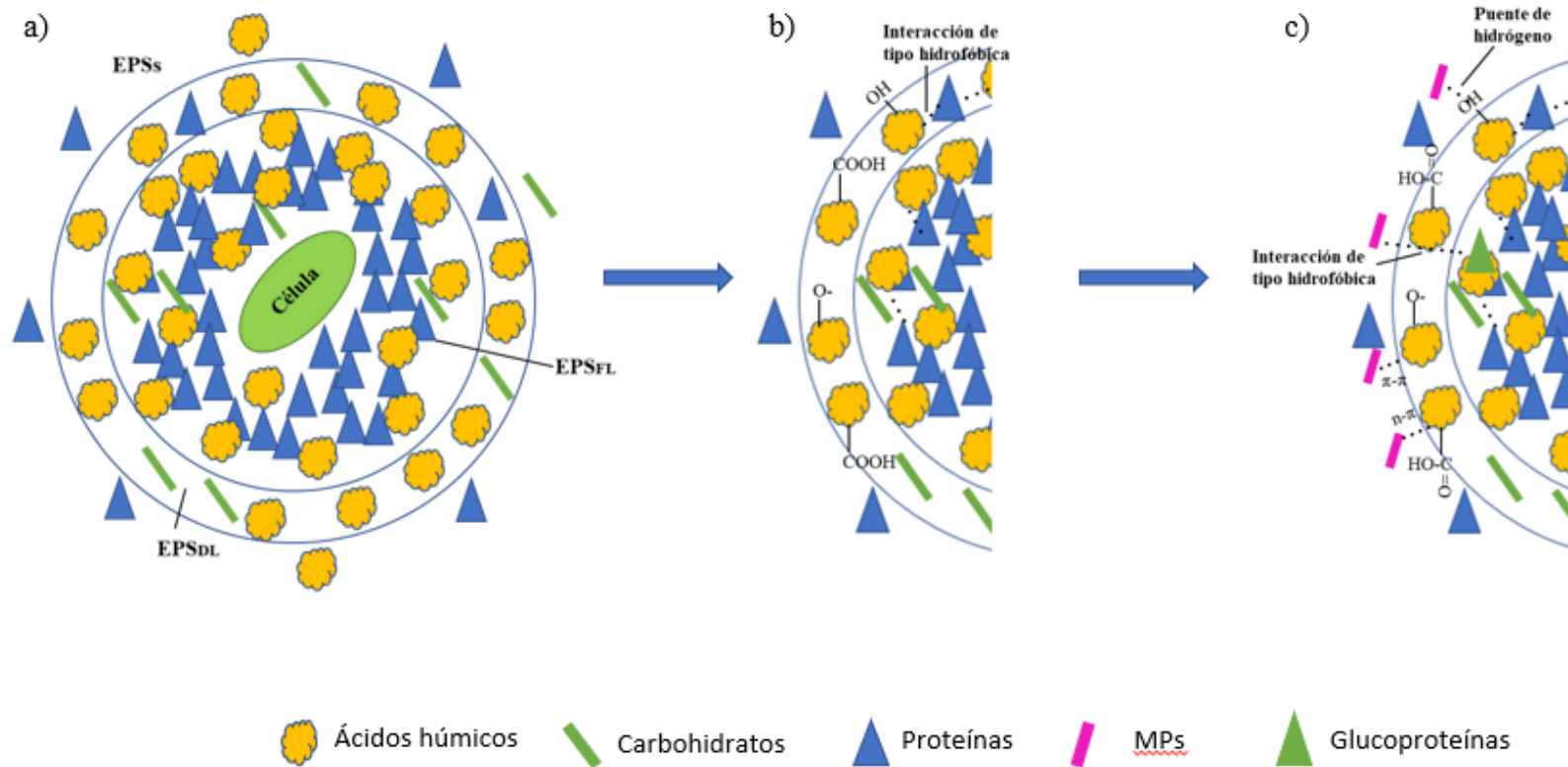


Figura 29. a) Estructura de las SPE; b) Grupos funcionales de los ácidos húmicos e interacciones hidrofóbicas entre húmicos-proteínas; c) Interacciones existentes entre los ácidos húmicos-MPs y las glucoproteínas.

Teniendo en cuenta los aspectos estructurales de cada compuesto, se puede decir que los ácidos húmicos contienen varios grupos funcionales, aunque los más abundantes son los fenólicos (que contiene grupos -OH) y los carboxílicos (-COOH) (Figura 29b). Por otra parte, los carbohidratos están formados por grupos carboxílicos (-COOH), hidroxilos (-OH) y fosfatos ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) y las proteínas por largas cadenas de aminoácidos<sup>123</sup>, concretamente, el 75% de las proteínas en aguas residuales son aminoácidos<sup>125</sup>. Además, el esqueleto principal del que están formados tanto las proteínas como los ácidos húmicos son compuestos de tipo aromáticos y alifáticos, mientras que los carbohidratos tienen una estructura basada en cadenas simples o ramificadas que consisten en la repetición de varios monosacáridos (D-glucosa, D-galactosa, L-fructosa, L-ramnosa, etc.)<sup>65,126,127</sup>. Por su naturaleza, los ácidos húmicos son mayormente hidrofóbicos, los carbohidratos hidrofílicos y las proteínas presentan ambas características<sup>128</sup>. Esta naturaleza hidrofóbica es la causante de la interacción existente entre los ácidos húmicos y las proteínas (Figura 29b), causando el encapsulamiento mencionado anteriormente. Además, por analogía, en estudios previos se han indicado que algunos contaminantes tóxicos, como por ejemplo éteres de difenilo polibromados (PBDE), policlorobifenilos (PCBs), hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs), disruptores endocrinos, productos farmacéuticos y de cuidado personal (PPCPs), etc.<sup>129</sup> pueden adsorberse en los MPs debido a que su superficie es hidrófoba. Por otro lado, también se ha descrito que se puede formar el sistema MP-burbuja de aire en el seno de una disolución por este mismo motivo<sup>130</sup>.

Hasta el momento, no se ha descrito ninguna interacción existente entre los carbohidratos y los MPs, muy probablemente debido a la naturaleza hidrofílica que tienen estos. Sí se ha descrito que en glucoproteínas (proteínas que contienen cadenas de oligosacáridos) se observa interacción entre MPs y estos grupos, puesto que presentan una zona hidrófoba (la cadena de aminoácidos)<sup>131</sup>. Esto podría explicar que la correlación aceptable obtenida para los carbohidratos en este trabajo ( $R^2$  entre 0,6821 y 0,6916), sugiere la posible presencia de compuestos glucoproteicos entre las SPE (Figura 29c).

Se ha descrito que las proteínas son capaces de enlazarse con los MPs formando un complejo MP-proteína, que actúa como una especie transportadora de MPs. Esta afinidad se debe principalmente a la hidrofobicidad de ambas especies, que permite la interacción a través de fuerzas de van der Waals<sup>132</sup>. Esta relación se ha estudiado con PS donde se forma una cubierta proteínica sobre los MPs, llamada corona, que permite a los PS eludir el sistema inmunitario y persistir en la circulación sanguínea<sup>133</sup>. A pesar de que hay una

gran concentración de proteínas en las SPE analizadas, representando el  $40 \pm 12\%$ , la correlación obtenida en la Figura 28a es muy baja ( $R^2$  entre 0,0003 y 0,0183). Esto es debido a que como se ha comentado anteriormente y se puede observar en la Figura 29a, las proteínas además de localizarse en la capa más interna de las SPE ligadas (SPE<sub>FL</sub>), resulta muy probable que se encuentren encapsuladas por los ácidos húmicos impidiendo que estén activas y accesibles a los MPs presentes en el licor mezcla.

En cuanto a los ácidos húmicos, recientemente se ha publicado que estos son capaces de interaccionar con los MPs fundamentalmente mediante los grupos aromáticos y, en menor medida a través de los grupos alifáticos y -OH de los grupos fenólicos y carboxílicos<sup>82</sup>. En los primeros casos esta interacción hidrofóbica es de tipo  $\pi$ - $\pi$  y  $n$ - $\pi$ , mientras que cuando actúa a través de los grupos -OH esta interacción es por puentes de hidrógeno (Figura 29c). Luo et al. (2022)<sup>82</sup> indicó que la interacción mediante puentes de hidrógeno es posible a pH 7. Estudios previos han indicado que a un pH < 3.5 los grupos fenólicos y carboxílicos de los ácidos húmicos se encuentran cargados positivamente, mientras que a un pH comprendido entre 4 y 6,5 la carga superficial de los ácidos húmicos es cero, lo que indica que se comportan como sustancias anfóteras. A partir de un pH 7-8 se empieza a llevar a cabo la disociación de los grupos -OH y -COOH, que se completa totalmente a pH 9. Además, en función del pH la solubilidad de los ácidos húmicos es distinta, en medio ácido son insolubles y a medida que aumenta el pH aumenta su solubilidad<sup>134,135,136</sup>. Hay que tener en cuenta que el agua residual analizada en el presente TFG tiene un pH entre 6 y 8,5, por lo tanto, los ácidos húmicos tendrán algún grupo fenólico y carboxílico no disociado, permitiendo su interacción con los MPs a través de puentes de hidrógeno (Figura 29c). Además, considerando los datos de la Figura 19a, la concentración de ácidos húmicos es mayor en la fracción enlazada, donde los ácidos húmicos son parcialmente insolubles, por lo que la interacción va a ser más patente entre dos especies hidrófobas e insolubles.

Por lo tanto, la hidrofobicidad de los ácidos húmicos, su mayor accesibilidad a interactuar con los MPs y la posibilidad de formar puentes de hidrógeno mediante los grupos fenólicos y carboxílicos (Figura 29c) hacen que la correlación obtenida en el presente estudio sea razonablemente buena en este caso ( $R^2$  entre 0,9162 y 0,9362).

## 5. Conclusiones

En el presente Trabajo Fin de Grado se ha evaluado la concentración de SPE y microplásticos, así como posibles interacciones entre ambas especies, durante 6 meses en muestras procedentes de un MBR de una EDAR localizada en Murcia. Las principales conclusiones derivadas de este estudio se resumen a continuación:

- Respecto a la composición de las SPE, durante el periodo analizado las concentraciones variaron entre 417 - 1.101, 232 - 651 y 450 - 1.615 mg/L para proteínas, carbohidratos y ácidos húmicos, respectivamente. La concentración de SPE ligadas fue siempre superior a las SPE solubles, mientras que la concentración total de SPE varió entre 1.416 y 3.368 mg/L a lo largo de los meses de estudio. En general, estos valores fueron más altos que los encontrados en la bibliografía, debido fundamentalmente a las distintas condiciones de operación de los diferentes estudios.
- Considerando valores medios, la concentración de proteínas, carbohidratos y ácidos húmicos representaron el 40%, 40% y 20% de las SPE, respectivamente. Lo que indica que las proteínas y carbohidratos son los compuestos mayoritarios de las SPE, tal y como describen otros autores en estudios realizados en sistemas de tratamiento biológico de aguas.
- La concentración media de MPs detectada en el licor mezcla fue de  $3.414 \pm 764$  MPs/L, mientras que en el sólido centrifugado esta concentración fue de  $2.937 \pm 843$  MPs/L sedimentado. En función de g sólido seco, estos valores son de  $188 \pm 47$  y  $159 \pm 33$  MPs/g sólido seco para el licor mezcla y el sólido centrifugado, respectivamente.
- Teniendo en cuenta la concentración de MPs presentes en el licor mezcla ( $188 \pm 47$  MPs/g sólido seco), se ha estimado que a lo largo de un año pueden quedar retenidos aproximadamente  $5,64 \cdot 10^{10}$  MPs en los lodos generados en esta planta, lo que equivaldría a 190 toneladas de microplásticos. Esto supone que los MPs constituyen casi el 60% del peso total de los lodos generados.
- El tamaño de partícula más frecuente en el licor mezcla fue 100 - 250  $\mu\text{m}$  ( $37 \pm 8\%$ ), seguido de  $> 500 \mu\text{m}$  ( $26 \pm 4\%$ ), 250 - 500  $\mu\text{m}$  ( $25 \pm 3\%$ ) y 20 - 100  $\mu\text{m}$  ( $11 \pm 5\%$ ). Por otro lado, en el sólido centrifugado destaca la abundancia de los MPs  $> 250 \mu\text{m}$ , lo que supone el 62% de los MPs retenidos en esta fracción. Esta



distribución es similar a los datos proporcionados por algunos autores en trabajos llevados a cabo sobre el comportamiento de los microplásticos en tratamientos biológicos de aguas residuales.

- Las morfologías más comunes tanto en el licor mezcla como en el sólido centrifugado fueron las fibras y los fragmentos, entre el 71 - 78% y el 21 - 28%, respectivamente. Es decir, la suma de ambas representa prácticamente la totalidad de los MPs detectados, lo que concuerda con otros trabajos previos descritos en la bibliografía.
- Tanto en la fracción del licor mezcla como en el sólido centrifugado se llegaron a detectar hasta 18 polímeros distintos, siendo los más abundantes 31,5 % (poliéster, PES), 12,4% (tereftalato de polietileno, PET), 12,4 % (rayón, RA), 8,6% (polipropileno, PP) y 8,2% (polietileno, PE), coincidiendo con lo descrito en la bibliografía en lo que respecta a la presencia de microplásticos en aguas residuales urbanas.
- A pesar de que las proteínas son capaces de enlazarse con los MPs debido al carácter hidrofóbico de ambas, la correlación entre estas especies es muy baja ( $R^2$  entre 0,0003 y 0,0183). Esto se debe probablemente a que las proteínas son encapsuladas por los ácidos húmicos, bloqueando su accesibilidad a los MPs.
- La aceptable correlación obtenida entre carbohidratos y MPs ( $R^2$  entre 0,6821 y 0,6916) indica la posible presencia de glucoproteínas entre las SPE y su interacción con estos microcontaminantes.
- Los ácidos húmicos presentan la mejor correlación con respecto al porcentaje de MPs retenidos en el sólido centrifugado ( $R^2$  de 0,9162 para húmicos ligados y 0,9362 para húmicos totales). Esto es debido a tres razones principales: son capaces de encapsular a las proteínas y, por lo tanto, resultan más accesibles a la interacción con los MPs; son hidrófobos, al igual que los microplásticos, lo que implica que predominen las interacciones a través de sus grupos alifáticos (aunque se ha visto que se pueden formar también puentes de hidrógeno a través de sus grupos fenólicos y carboxílicos) y, su concentración es mayor en la fracción enlazada, donde son parcialmente insolubles, por lo que se facilita la interacción entre especie hidrófoba e insoluble.

## 6. Trabajos Futuros

La contaminación por MPs se ha convertido en un tema de actualidad y de gran repercusión social, lo que se hace patente por los numerosos estudios que están surgiendo en los últimos años. La presencia ubicua de estas micropartículas es capaz de ocasionar problemas a la fauna y la flora, así como a los seres humanos. Por ello, es fundamental actuar en la búsqueda de soluciones que puedan paliar esta situación.

Una manera de afrontar esta situación es la gestión de residuos plásticos, que se puede llevar a cabo de diferentes maneras, como el reciclaje, la incineración o el depósito en vertederos. El reciclaje y la reutilización de plásticos son esenciales para prevenir la dispersión de estos residuos en el medio ambiente, pero también es importante lograr una economía circular de estos materiales. Una de las mejores soluciones para combatir el problema de la contaminación por plásticos es limitando su consumo. En 2015, la Unión Europea (UE) restringía y regulaba el uso de bolsas de plástico con el objetivo de reducir el consumo de estas a un máximo de 40 bolsas por persona y año en 2025. Asimismo, en 2021 entró en vigor una medida adoptada por la Comisión Europea que prohibía los plásticos de un solo uso (pajitas, bastoncillos de algodón, menaje de cocina desechable, etc.)<sup>3</sup>.

Los MPs presentes en las aguas residuales pueden ser liberados a los ecosistemas acuáticos después del proceso de tratamiento. La implementación de tecnologías de tratamiento más efectivas y la gestión adecuada de los residuos generados son otra forma de actuar contra la contaminación de estas micropartículas.

El presente TFG pone de manifiesto resultados relevantes que pueden ser aplicados en EDARs. En concreto, la eliminación de MPs de la línea de aguas es más efectiva con el uso de una tecnología de tipo MBR que con otros sistemas de tratamiento. Por lo tanto, su implementación puede ser fundamental para limitar la emisión de dichos microcontaminantes al medio ambiente ante futuras legislaciones que se puedan imponer desde la Comisión Europea. Por otro lado, dado que los ácidos húmicos presentan una gran afinidad a interactuar con los MPs, los resultados obtenidos permiten sugerir posibles cambios en el sistema de lodos activados modulando las características de las SPE presentes de modo que se pueda conseguir una alta eficacia de eliminación de MPs de la corriente acuosa. Asimismo, dado que la mayor parte de los microplásticos

eliminados quedan retenidos en los lodos, es necesario también unir esfuerzos e investigar en posibles tecnologías que sean capaces de eliminar y/o separar MPs de los lodos para evitar el retorno de estas micropartículas al medioambiente.

## 6. Anexos

### 6.1. Datos rectas de calibrado

Tabla 4. Datos de ácidos húmicos y proteínas para la elaboración de las rectas de calibrado durante los meses de estudio.

ppm	Absorbancia media					
	Ácidos húmicos			Proteínas		
	Febrero	Marzo/Abril	Mayo/Junio/ Julio	Febrero	Marzo/Abril	Mayo/Junio/ Julio
100	0,098	0,097	0,093	0,156	0,146	0,135
200	0,208	0,186	0,173	0,321	0,271	0,264
300	0,342	0,276	0,267	0,439	0,383	0,374
400	0,431	0,347	0,351	0,549	0,481	0,495
500	0,568	0,454	0,444	0,676	0,584	0,599

Tabla 5. Datos de carbohidratos para la elaboración de las rectas de calibrado durante los meses de estudio.

ppm	Absorbancia media		
	Carbohidratos		
	Febrero	Marzo/Abril	Mayo/Junio/ Julio
20	0,373	0,376	0,356
40	0,789	0,745	0,697
60	1,192	1,076	1,015
80	1,614	1,462	1,367
100	1,991	1,812	1,678

## 6.2. Datos SPE

Tabla 6. Evolución de la concentración (g/L) de SST, SSF y SSV a lo largo de los meses de estudio.

	SST (g/L)	SSF (g/L)	SSV (g/L)
<b>Febrero</b>	19	4	15
<b>Marzo</b>	27	6	21
<b>Abril</b>	14	3	10
<b>Mayo</b>	17	5	12
<b>Junio</b>	18	5	15
<b>Julio</b>	16	3	13

Tabla 7. Evolución de la concentración (mg/L) de ácidos húmicos, proteínas y carbohidratos a lo largo de los meses de estudio.

	Concentración (mg/L)					
	Ácidos húmicos		Proteínas		Carbohidratos	
	Solubles	Enlazados	Solubles	Enlazados	Solubles	Enlazados
<b>Febrero</b>	137	731	19	872	15	439
<b>Marzo</b>	299	1316	45	1056	9	642
<b>Abril</b>	114	336	31	703	11	221
<b>Mayo</b>	149	441	20	931	25	411
<b>Junio</b>	242	551	36	1059	32	462
<b>Julio</b>	316	865	10	406	33	443

Tabla 8. Variación de la concentración (mg/g SST) de ácidos húmicos, proteínas y carbohidratos solubles y enlazados a lo largo de los meses de estudio.

		mg SPE/g SST		
		Ácidos húmicos	Proteínas	Carbohidratos
<b>Febrero</b>	Solubles	7	1	1
	Enlazados	38	46	23
<b>Marzo</b>	Solubles	11	2	0
	Enlazados	48	39	23
<b>Abril</b>	Solubles	8	2	1
	Enlazados	25	52	16
<b>Mayo</b>	Solubles	9	1	1
	Enlazados	25	54	24
<b>Junio</b>	Solubles	13	2	2
	Enlazados	30	58	25
<b>Julio</b>	Solubles	15	0	2
	Enlazados	40	19	20

Tabla 9. Variación de la concentración (mg/g SSF) de ácidos húmicos, proteínas y carbohidratos solubles y enlazados a lo largo de los meses de estudio.

		mg SPE/g SSF		
		Ácidos húmicos	Proteínas	Carbohidratos
<b>Febrero</b>	Solubles	36	5	4
	Enlazados	195	232	117
<b>Marzo</b>	Solubles	49	7	1
	Enlazados	215	173	105
<b>Abril</b>	Solubles	37	10	4
	Enlazados	109	227	71
<b>Mayo</b>	Solubles	30	4	5
	Enlazados	89	188	83
<b>Junio</b>	Solubles	54	8	7
	Enlazados	122	235	102
<b>Julio</b>	Solubles	17	1	2
	Enlazados	46	21	23

Tabla 10. Variación de la concentración (mg/g SSV) de ácidos húmicos, proteínas y carbohidratos solubles y enlazados a lo largo de los meses de estudio.

		mg SPE/g SSV		
		Ácidos húmicos	Proteínas	Carbohidratos
<b>Febrero</b>	Solubles	9	1	1
	Enlazados	48	57	29
<b>Marzo</b>	Solubles	14	0	0
	Enlazados	62	1	1
<b>Abril</b>	Solubles	11	3	1
	Enlazados	32	67	21
<b>Mayo</b>	Solubles	12	2	2
	Enlazados	36	75	33
<b>Junio</b>	Solubles	17	3	2
	Enlazados	40	76	33
<b>Julio</b>	Solubles	17	1	2
	Enlazados	46	21	23

### 6.3. Datos MPS

Tabla 11. Evolución de la concentración de MPs en el licor mezcla bruto y en el sólido centrifugado (MPs/L) y MPs/g sólido seco a lo largo de los meses en estudio.

	Licor mezcla bruto		Sólido centrifugado	
	Nº MPs/L	Nº MPs/ g sólido seco	Nº MPs/L	Nº MPs/ g sólido seco
<b>Febrero</b>	3679	192	3216	168
<b>Marzo</b>	4597	167	4421	161
<b>Abril</b>	3776	277	2867	210
<b>Mayo</b>	2482	143	1919	110
<b>Junio</b>	3148	171	2630	143
<b>Julio</b>	2802	175	2572	160

Tabla 12. Evolución de la concentración (MPs/g SST, SSV y SSF de licor mezcla) en los meses de estudio.

	Licor mezcla bruto		
	MPs/g SST	MPs/g SSF	MPs/g SSV
<b>Febrero</b>	11,28	51,41	14,45
<b>Marzo</b>	13,26	65,01	16,65
<b>Abril</b>	14,27	55,72	19,18
<b>Mayo</b>	5,89	22,11	8,04
<b>Junio</b>	13,25	65,10	16,64
<b>Julio</b>	10,67	55,28	13,23

Tabla 13. Contenido porcentual en función del tamaño de MPs en el licor mezcla bruto y en el sólido obtenido por centrifugación. Bruto, se considera al licor mezcla bruto; sólido, sólido centrifugado.

	20-100 $\mu\text{m}$		100-250 $\mu\text{m}$		250-500 $\mu\text{m}$		> 500 $\mu\text{m}$	
	Bruto	Sólido	Bruto	Sólido	Bruto	Sólido	Bruto	Sólido
<b>Febrero</b>	12	10	40	24	23	28	25	38
<b>Marzo</b>	7	13	38	28	29	31	27	28
<b>Abril</b>	14	12	46	26	20	31	21	30
<b>Mayo</b>	9	14	42	36	24	33	25	17
<b>Junio</b>	20	11	24	23	26	25	30	41
<b>Julio</b>	8	7	34	23	27	45	31	24

*Tabla 14. Contenido porcentual en función de la forma de MPs en el licor mezcla bruto y en el sólido centrifugado durante los meses de estudio.*

	<b>Fibras</b>		<b>Fragmentos</b>		<b>Films</b>		<b>Espumas</b>		<b>Pellets</b>	
	<b>Bruto</b>	<b>Sólido</b>	<b>Bruto</b>	<b>Sólido</b>	<b>Bruto</b>	<b>Sólido</b>	<b>Bruto</b>	<b>Sólido</b>	<b>Bruto</b>	<b>Sólido</b>
<b>Febrero</b>	67,91	76,74	31,91	22,48	0	0	0,18	0,78	0	0
<b>Marzo</b>	76,67	74,39	23,33	25,61	0	0	0	0	0	0
<b>Abril</b>	67,93	77,97	31,98	22,03	0	0	0,09	0	0	0
<b>Mayo</b>	62,90	80,00	36,96	20,00	0	0	0,13	0	0	0
<b>Junio</b>	78,20	80,95	21,80	19,05	0	0	0	0	0	0
<b>Julio</b>	74,91	80,91	24,97	19,09	0	0	0,12	0	0	0



Tabla 15. Contenido porcentual en función del color de MPs durante los meses de estudio en el licor mezcla bruto y en el sólido obtenido por centrifugación.

	Blanco		Negro		Rojo		Azul		Verde		Amarillo		Marrón		Morado		Rosa		Naranja	
	Bruto	Sólido	Bruto	Sólido	Bruto	Sólido	Bruto	Sólido	Bruto	Sólido	Bruto	Sólido	Bruto	Sólido	Bruto	Sólido	Bruto	Sólido	Bruto	Sólido
<b>Febrero</b>	0,7	0,7	46,4	40,2	9,0	5,5	23,7	27,5	8,0	7,6	3,5	5,5	1,4	2,3	1,5	4,3	4,4	5,2	1,2	1,1
<b>Marzo</b>	0,5	0,1	38,5	31,7	6,1	12,5	28,4	26,2	6,7	6,4	4,0	7,9	6,7	6,9	2,6	3,5	4,4	3,0	2,2	1,7
<b>Abril</b>	0,2	0,8	43,0	44,4	7,7	12,2	29,7	22,3	7,1	6,1	3,2	4,8	1,2	1,2	2,3	1,6	4,0	4,1	1,6	2,4
<b>Mayo</b>	1,8	1,7	48,4	34,4	5,8	8,7	28,4	23,3	5,9	10,8	2,4	4,9	1,8	5,6	0,8	2,8	4,2	6,5	0,5	1,3
<b>Junio</b>	1,0	0,9	36,4	28,9	7,3	10,6	30,8	26,9	7,8	9,5	3,7	5,8	4,1	4,9	3,1	4,4	3,9	6,4	1,8	1,7
<b>Julio</b>	0,3	0,4	38,2	29,5	8,0	7,4	39,6	44,5	4,9	7,1	1,6	1,3	1,1	1,3	1,4	0,4	3,7	6,6	1,3	1,4

## 6.4. Datos MPs - SPE

Tabla 16. Concentración de proteínas, carbohidratos y ácidos húmicos (mg/L), concentración de MPs en el licor mezcla bruto y en el sólido centrifugado (Nº MPs/L) y porcentajes de MPs retenidos en el sólido centrifugado.

		Concentraciones (mg/L)			Microplásticos		
		Ácidos húmicos	Proteínas	Carbohidratos	Nº MPs bruto/L	Nº MPs sólido/L	%
Febrero	Solubles	137	19	15	3.679	3.216	87,40
	Enlazados	731	872	439			
Marzo	Solubles	299	45	9	4.597	4.421	96,17
	Enlazados	1316	1056	642			
Abril	Solubles	114	31	11	3.776	2.867	75,92
	Enlazados	336	703	221			
Mayo	Solubles	149	20	25	2.482	1.919	77,31
	Enlazados	441	931	411			
Junio	Solubles	242	36	32	3.148	2.630	83,55
	Enlazados	551	1059	462			
Julio	Solubles	316	10	33	2.802	2.572	91,81
	Enlazados	865	406	443			

## 6.5. Espectros

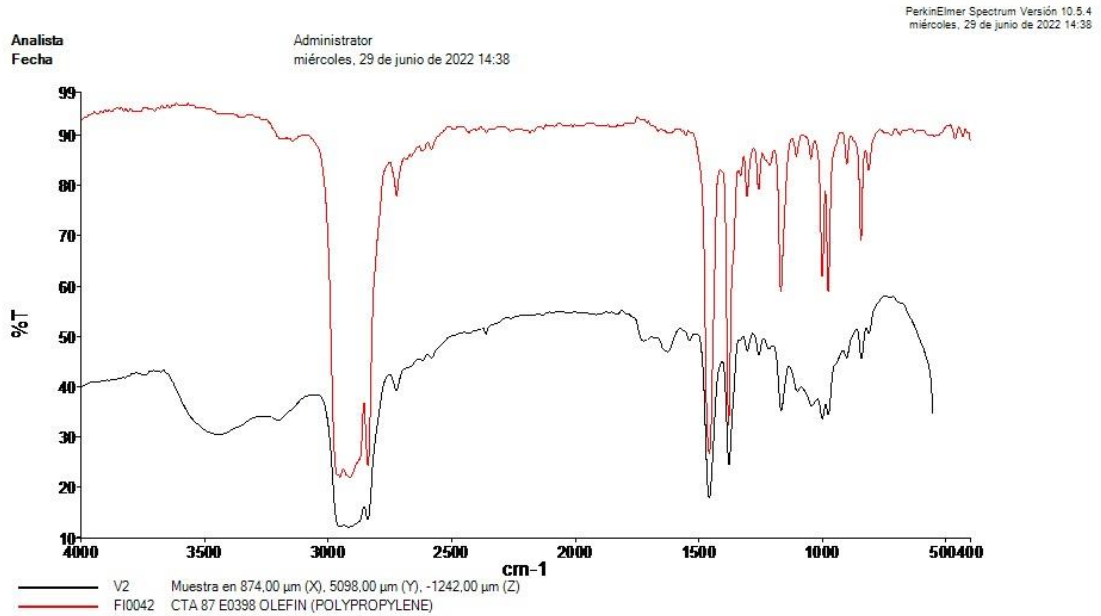


Figura 30. Espectro infrarrojo obtenido a través del FTIR para un microplástico que se corresponde con el polipropileno (PP).

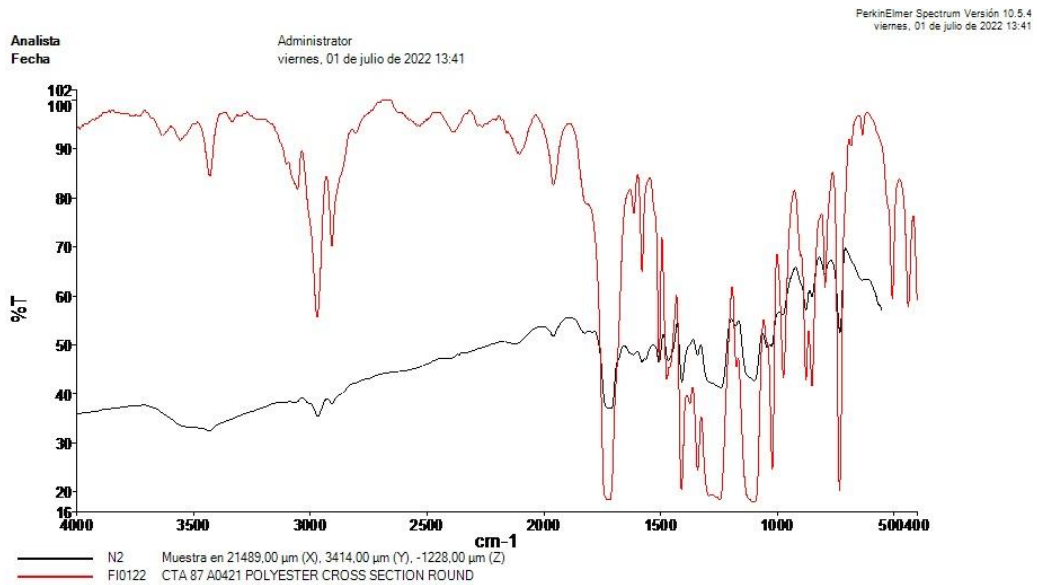


Figura 31. Espectro infrarrojo obtenido a través del FTIR para un microplástico que se corresponde con el poliéster (PES).

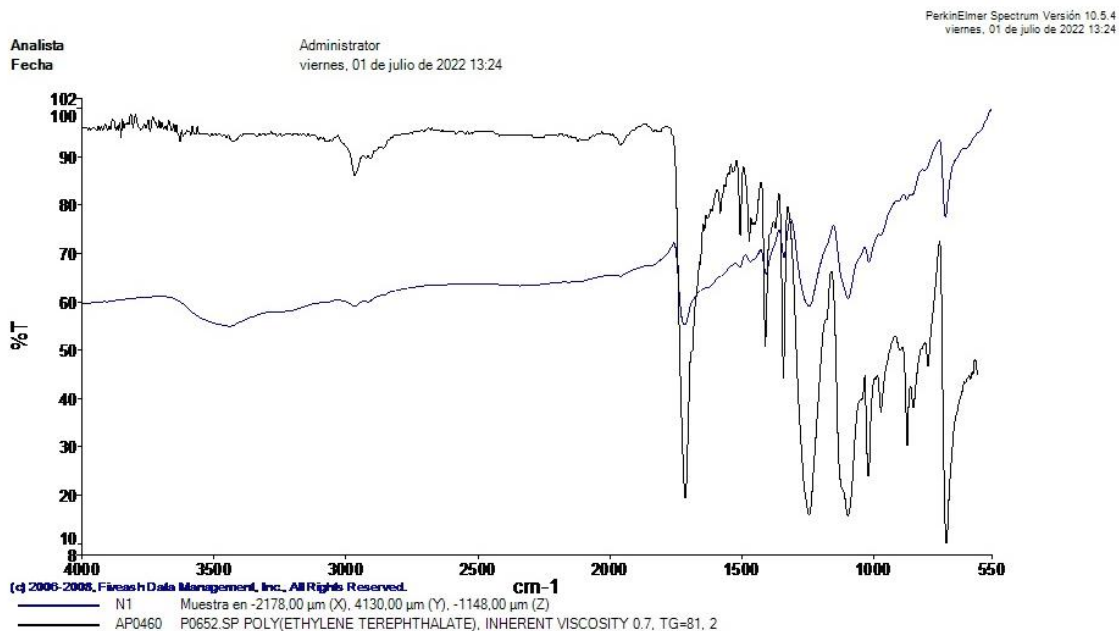


Figura 32. Espectro infrarrojo obtenido a través del FTIR para un microplástico que se corresponde con el tereftalato de polietileno (PET).

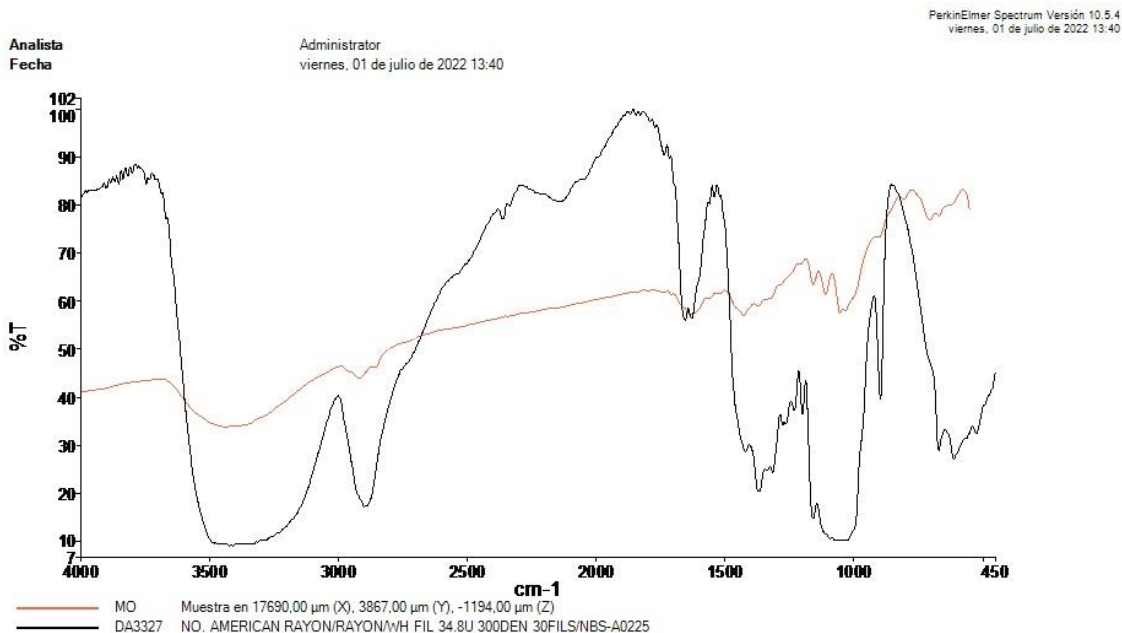


Figura 33. Espectro infrarrojo obtenido a través del FTIR para un microplástico que se corresponde con el rayón (RA).

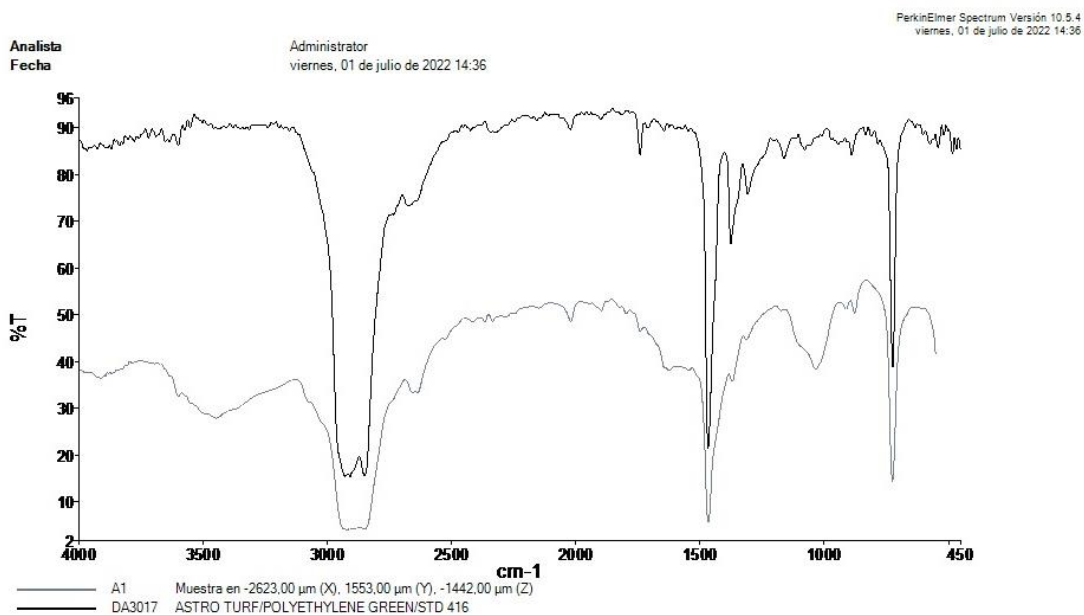


Figura 34. Espectro infrarrojo obtenido a través del FTIR para un microplástico que se corresponde con el polietileno (PE).

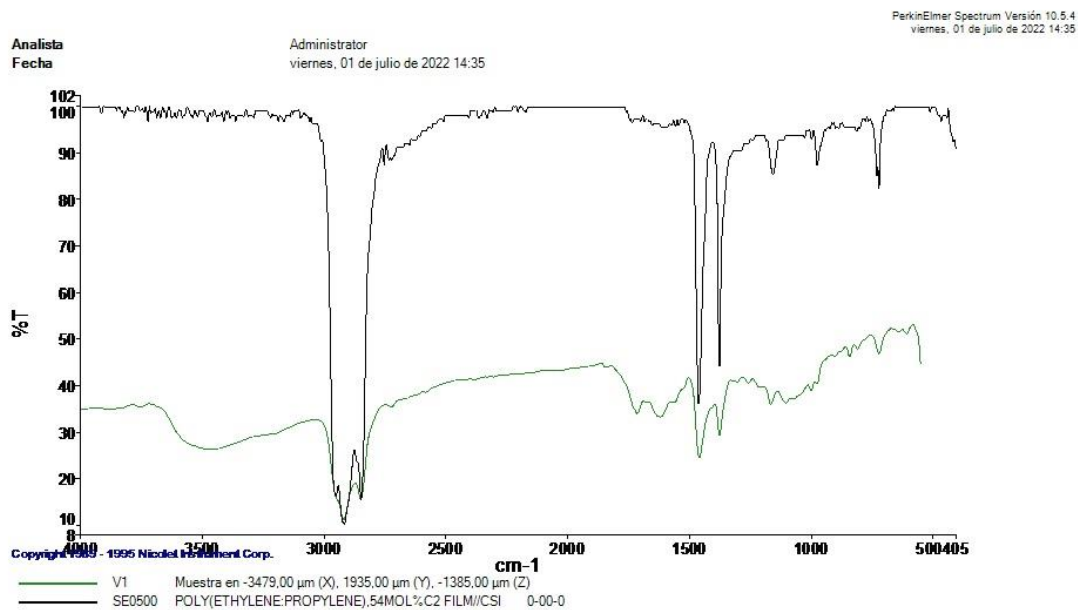


Figura 35. Espectro infrarrojo obtenido a través del FTIR para un microplástico que se corresponde con el copolímero polietileno:polipropileno (PE/PP).

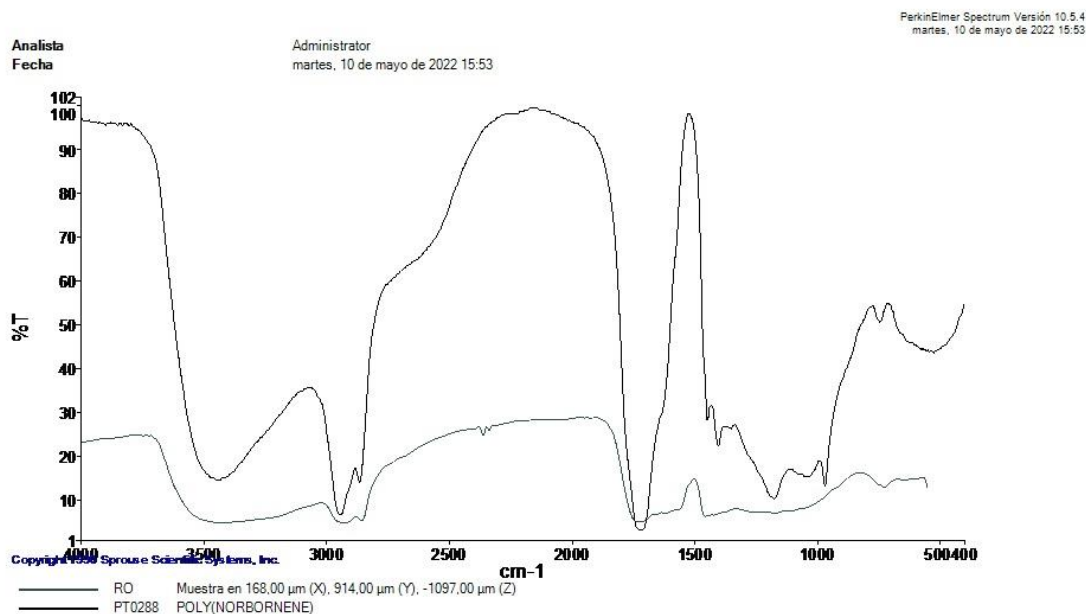


Figura 36. Espectro infrarrojo obtenido a través del FTIR para un microplástico que se corresponde con el norborneno (NBE).

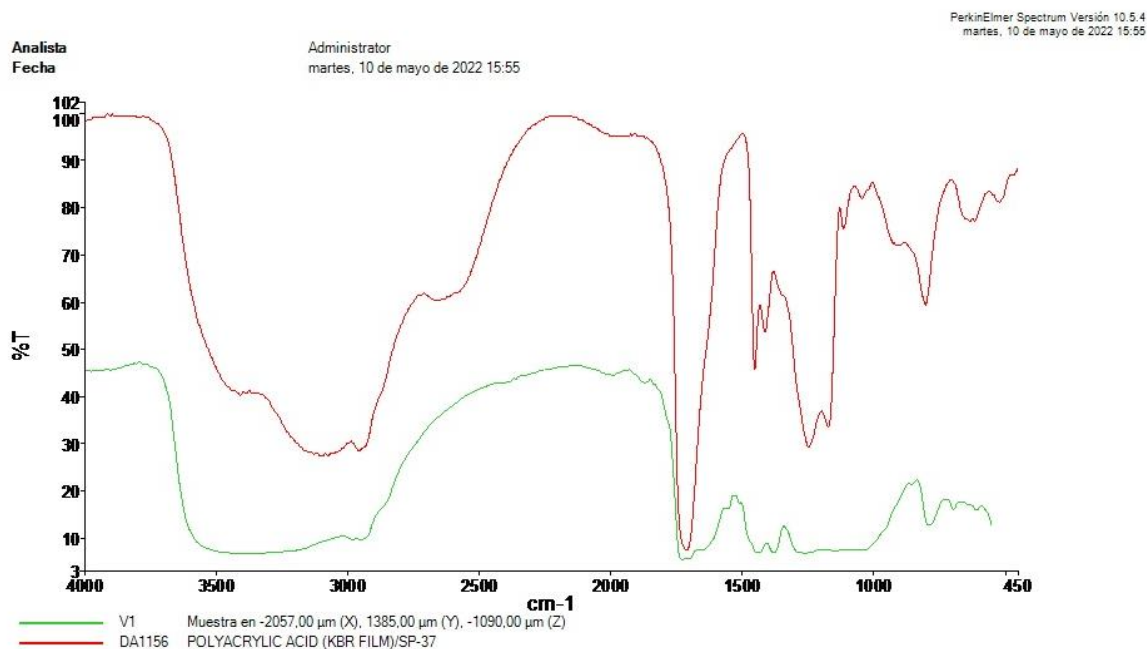


Figura 37. Espectro infrarrojo obtenido a través del FTIR para un microplástico que se corresponde con el ácido poliacrílico (PAA).

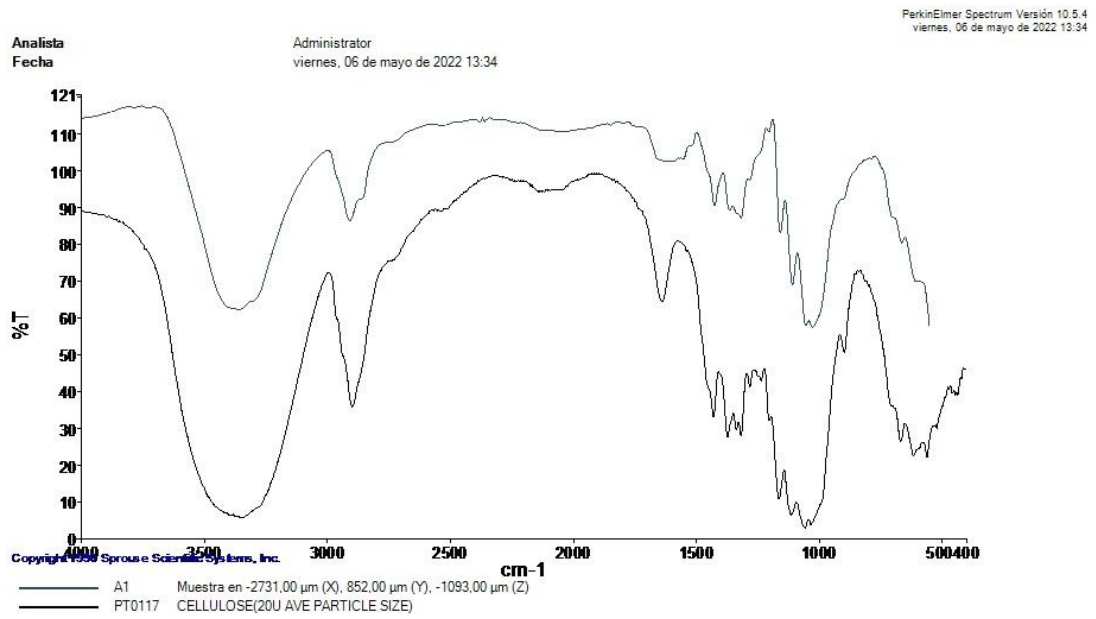


Figura 38. Espectro infrarrojo obtenido a través del FTIR para un microplástico que se corresponde con la celulosa (CE).

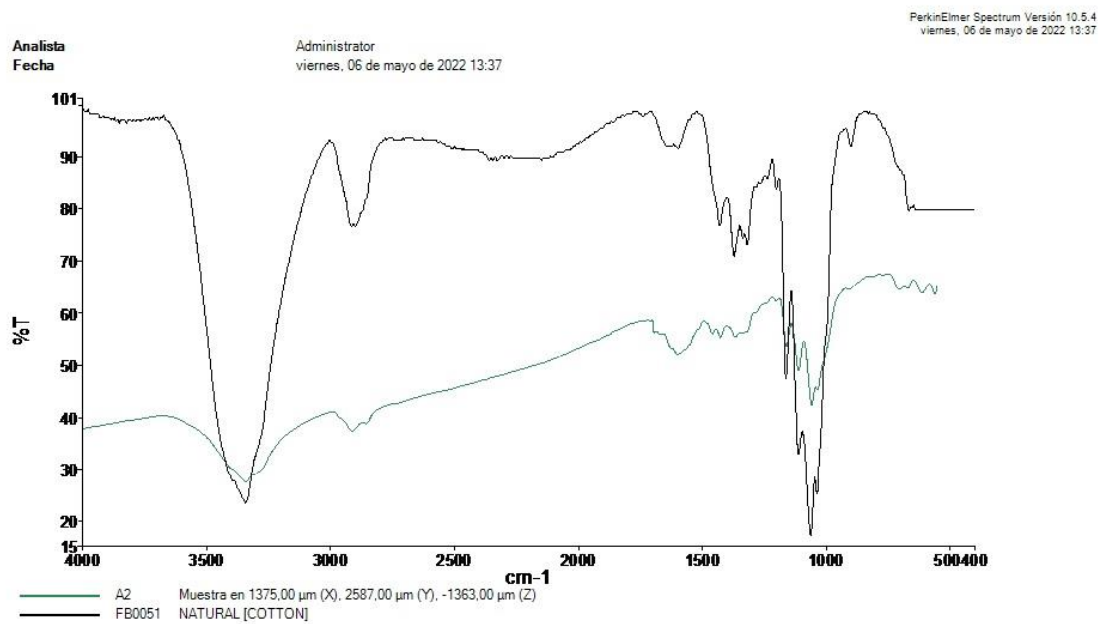


Figura 39. Espectro infrarrojo obtenido a través del FTIR para un microplástico que se corresponde con el algodón.

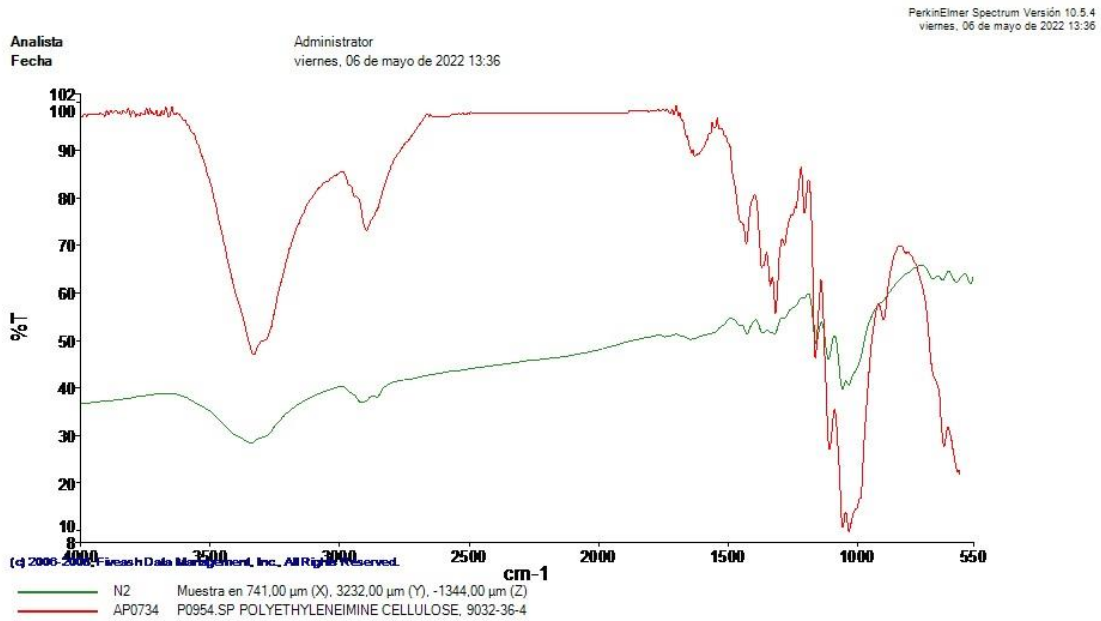


Figura 40. Espectro infrarrojo obtenido a través del FTIR para un microplástico que se corresponde con polietilenimina (PEI).

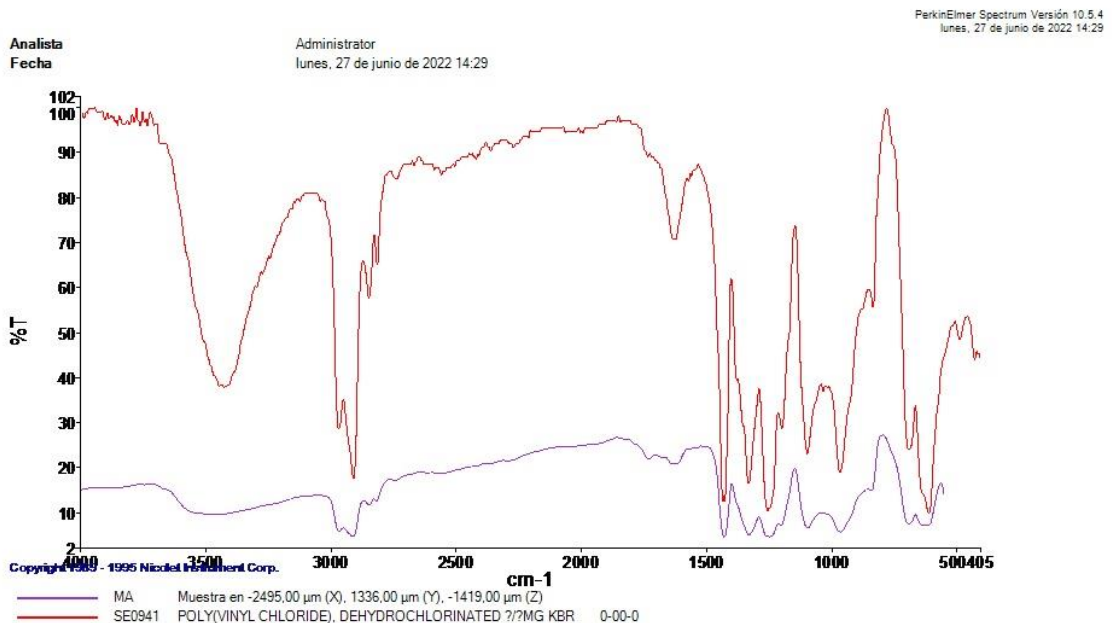


Figura 41. Espectro infrarrojo obtenido a través del FTIR para un microplástico que se corresponde con policloruro de vinilo (PVC).



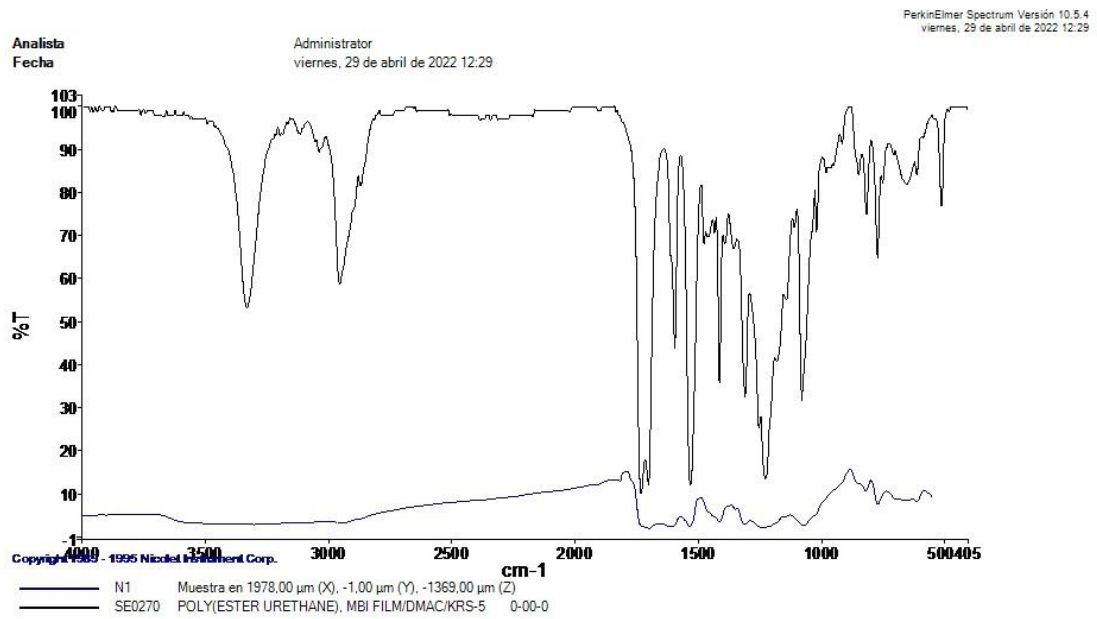


Figura 42. Espectro infrarrojo obtenido a través del FTIR para un microplástico que se corresponde con poliuretano (PU).

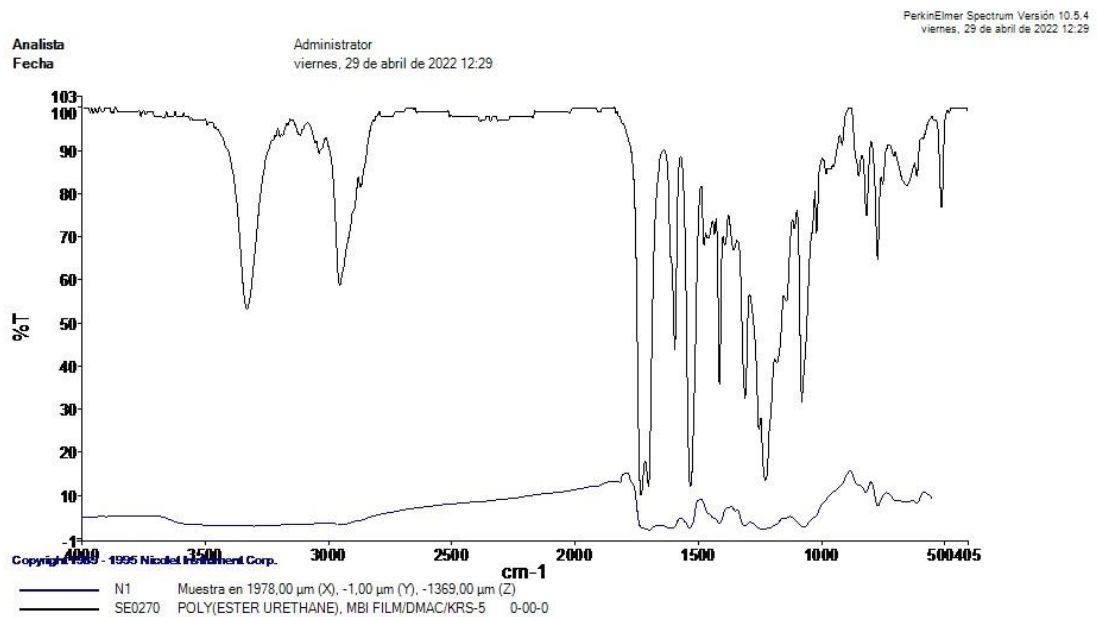


Figura 43. Espectro infrarrojo obtenido a través del FTIR para un microplástico que se corresponde con resina epoxi (ER).

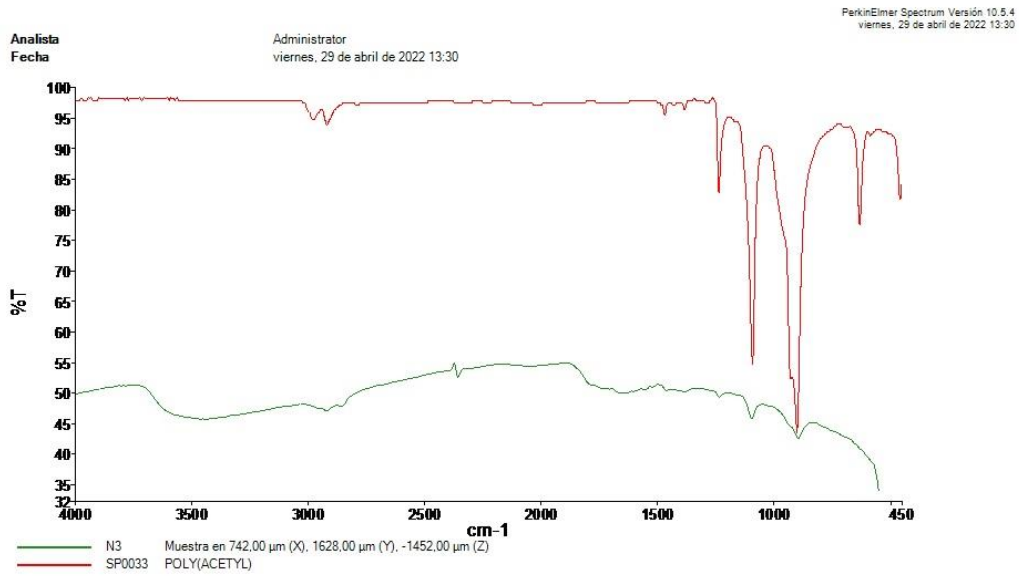


Figura 44. Espectro infrarrojo obtenido a través del FTIR para un microplástico que se corresponde con polioximetileno (poliacetal, POM).

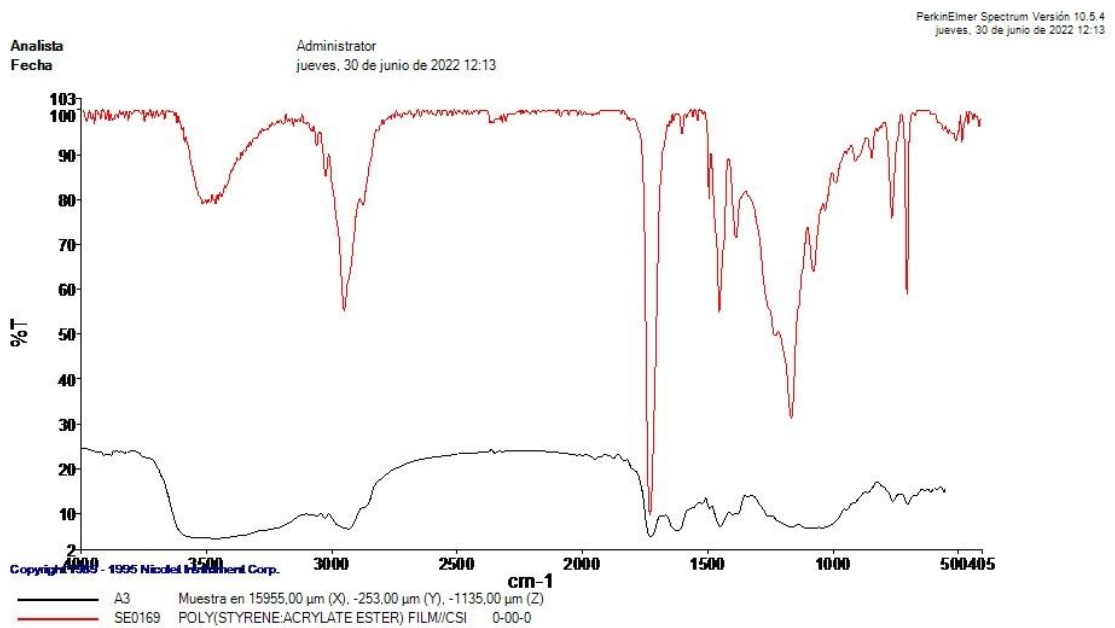


Figura 45. Espectro infrarrojo obtenido a través del FTIR para un microplástico que se corresponde con poliestireno (PS).

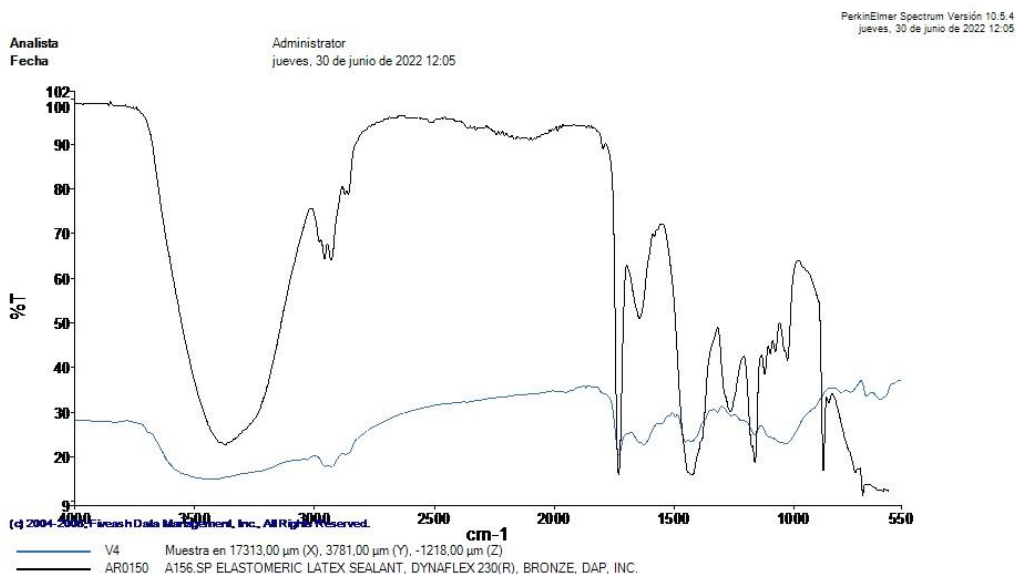


Figura 46. Espectro infrarrojo obtenido a través del FTIR para un microplástico que se corresponde con látex.

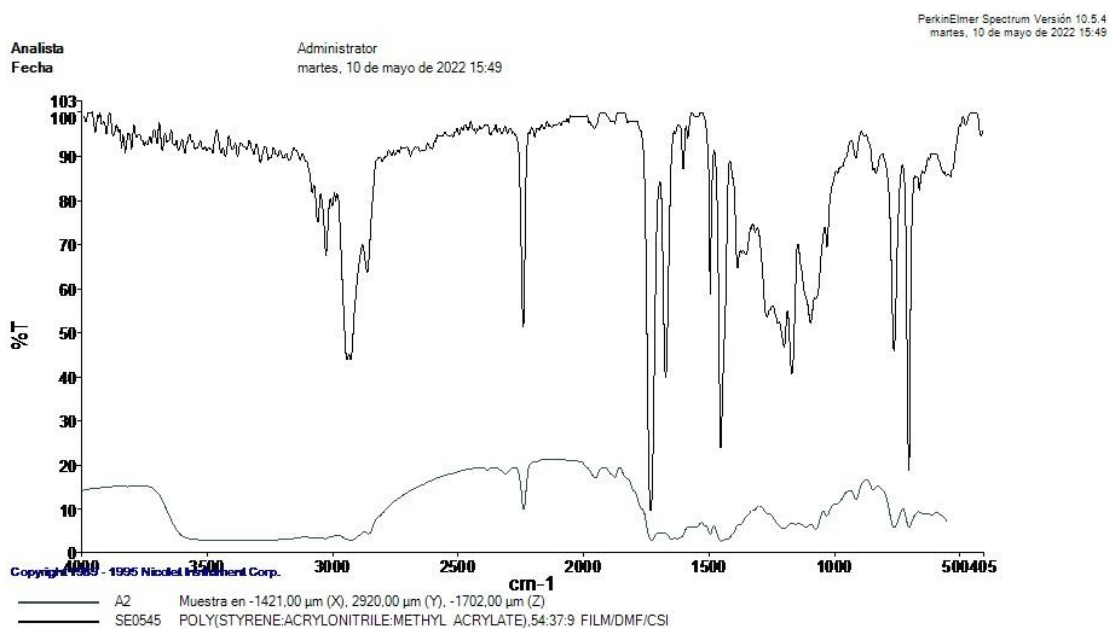


Figura 47. Espectro infrarrojo obtenido a través del FTIR para un microplástico que se corresponde con poliestireno:acrilonitrilo:metilacrilato (PS/PAN/PMA).

# Bibliografía

- 
- <sup>1</sup> PlasticsEurope (2022), *Plastics – The Facts*. Disponible en: <https://plasticseurope.org/es/plastics-europe-presenta-plastics-the-facts-2022-en-la-k2022/>
- <sup>2</sup> Blasing, M., Amelung, W. (2018). Plastics in soil: Analytical methods and possible sources. *Science of the Total Environment*, 612, 422-423.
- <sup>3</sup> Sol, D., Laca, A., Laca, A., Díaz, M. (2020). Approaching the environmental problem of microplastics: Importance of WWTP treatments. *Science of the Total Environment*, 740, 140016.
- <sup>4</sup> Sol, D., Laca, A., Laca, A., Díaz, M. (2021). Microplastics in Wastewater and Drinking Water Treatment Plants: Occurrence and Removal of Microfibres. *Applied Science*, 11(21), 10109.
- <sup>5</sup> Sol, D., Menéndez-Manjón, A., Carrasco, S., Crisóstomo-Miranda, J., Laca A., Laca A., Díaz, M. (2023). Contribution of household dishwashing to microplastic pollution. *Environmental Science and Pollution Research*, 30, 45140-45150. .
- <sup>6</sup> Sol, D., Laca, A., Laca, A., Díaz, M. (2022). Wastewater Treatment Approaches to Remove Microplastics. Microfibre incidence and fate. *Polluting Textiles*, 32.
- <sup>7</sup> Ghaffar, I., Rashid, M., Akmal, M., Hussain, A. (2022). Plastics in the environment as potential threat to life: an overview. *Environmental Science and Pollution Research International*, 29(38), 56928-56947.
- <sup>8</sup> Sangkham, S., Faikhaw, O., Munkong, N., Sakunkoo, P., Arunlertaree, C., Chavali, M., Mousazadeh, M., Tiwari, A. (2022). A review on microplastics and nanoplastics in the environment: Their occurrence, exposure routes, toxic studies, and potential effects on human health. *Marine Pollution Bulletin*, 181, 113832.
- <sup>9</sup> Chang, X., Xue, Y., Li, J., Zou, L., Tang, M. (2019). Potential health impact of environmental micro - and nanoplastics pollution. *Journal of Applied Toxicology*, 40(1), 1-12.
- <sup>10</sup> Zhang, Q., Liu, L., Jiang, Y., Zhang, Y., Fan, Y., Rao, W., Qian, X. (2023). Microplastics in infant milk powder. *Environmental Pollution*, 323, 121225.
- <sup>11</sup> Leslie, H.A., van Velzen, M.J.M., Brandsma, S.H., Vethaak, A.D., Garcia-Vallejo, J. J., Lamoree, M.H. (2022). Discovery and quantification of plastic particle pollution in human blood. *Environment International*, 163, 107199.
- <sup>12</sup> Bouwmeester, H., Hollman, P.C.H., Peters, R.J.B. (2015). Potential health impact of environmentally released micro- and nanoplastics in the human food production chain:

---

Experiences from nanotoxicology. *Environmental Science & Technology*, 49(15), 8932-8947.

<sup>13</sup> Prata, J.C., da Costa, J.P., Lopes, I., Duarte, A.C., Rocha-Santos, T. (2020). Environmental exposure to microplastics: An overview on possible human health effects. *Science of the Total Environment*, 702, 134455.

<sup>14</sup> Atis, S., Tutluoglu, B., Levent, E., Ozturk, C., Tunaci, A., Sahin, K., Saral, A., Oktay, I., Kanik, A., Nemery, B. (2005). The respiratory effects of occupational polypropylene flock exposure. *The European Respiratory Journal: Official Journal of the European Society for Clinical Respiratory Physiology*, 25(1), 110-117.

<sup>15</sup> Van Tienhoven, E.A.E., Korbee, D., Schipper, L., Verharen, H.W., De Jong, W.H. (2006). In vitro and in vivo (cyto)toxicity assays using PVC and LDPE as model materials. *Journal of Biomedical Materials Research. Part A*, 78(1), 175-182.

<sup>16</sup> Senathirajah, K., Attwood, S., Bhagwat, G., Carbery, M., Wilson, S., Palanisami, T. (2021). Estimation of the mass of microplastics ingested - A pivotal first step towards human health risk assessment. *Journal of Hazardous Materials*, 404(Pt B), 124004.

<sup>17</sup> Du, H., Xie, Y., Wang, J. (2022). Environmental impacts of microplastics on fishery products: An overview. *Gondwana Research: International Geoscience Journal*, 108, 213-220.

<sup>18</sup> Crawford, C.B., Quinn, B. (2017). The interactions of microplastics and chemical pollutants, Microplastic pollutants. *Microplastic pollutants*, 131-157.

<sup>19</sup> Yan, Z., Liu, Y., Zhang, T., Zhang, F., Ren, H., Zhang, Y. (2022). Analysis of microplastics in human feces reveals a correlation between fecal microplastics and inflammatory bowel disease status. *Environmental Science & Technology*, 56(1), 414-421.

<sup>20</sup> Jiang, J.-Q. (2018). Occurrence of microplastics and its pollution in the environment: A review. *Sustainable Production and Consumption*, 13, 16-23.

<sup>21</sup> Andrady, A.L. (2017). The plastic in microplastics: A review. *Marine Pollution Bulletin*, 119(1), 12-22.

<sup>22</sup> Hartmann, N.B., Hüffer, T., Thompson, R.C., Hassellöv, M., Verschoor, A., Dagaard, A.E., Rist, S., Karlsson, T., Brennholt, N., Cole, M., Herrling, M.P., Hess, M.C., Ivleva, N.P., Lusher, A.L., Wagner, M. (2019). Are we speaking the same language? Recommendations for a definition and categorization framework for plastic debris. *Environmental Science & Technology*, 53(3), 1039-1047.

<sup>23</sup> Xanthos, D., Walker, T.R. (2017). International policies to reduce plastic marine pollution from single-use plastics (plastic bags and microbeads): A review. *Marine Pollution Bulletin*, 118(1-2), 17-26.

- 
- <sup>24</sup> Xu, S., Ma, J., Ji, R., Pan, K., Miao, A.-J. (2020). Microplastics in aquatic environments: Occurrence, accumulation, and biological effects. *Science of the Total Environment*, 703, 134699.
- <sup>25</sup> Kooi, M., Koelmans, A.A. (2019). Simplifying microplastic via continuous probability distributions for size, shape, and density. *Environmental Science & Technology Letters*, 6(9), 551–557.
- <sup>26</sup> Edo, C., González-Pleiter, M., Leganés, F., Fernández-Piñas, F., Rosal, R. (2020). Fate of microplastics in wastewater treatment plants and their environmental dispersion with effluent and sludge. *Environmental Pollution*, 259, 113837.
- <sup>27</sup> Manuel Ríos, J., Instituto de Medicina y Biología Experimental de Cuyo (IMBECU, CCT-CONICET). (2022). El papel del color en la ingesta de fragmentos de microplástico por el pez cebra (*Danio rerio*). *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 38, 371–380.
- <sup>28</sup> Bellasi, A., Binda, G., Pozzi, A., Galafassi, S., Volta, P., Bettinetti, R. (2020). Microplastic contamination in freshwater environments: A review, focusing on interactions with sediments and benthic organisms. *Environments*, 7(4), 30.
- <sup>29</sup> Sun, J., Dai, X., Wang, Q., van Loosdrecht, M.C.M., Ni, B.-J. (2019). Microplastics in wastewater treatment plants: Detection, occurrence and removal. *Water Research*, 152, 21–37.
- <sup>30</sup> Mason, S.A., Garneau, D., Sutton, R., Chu, Y., Ehmann, K., Barnes, J., Fink, P., Papazissimos, D., Rogers, D.L. (2016). Microplastic pollution is widely detected in US municipal wastewater treatment plant effluent. *Environmental Pollution*, 218, 1045–1054.
- <sup>31</sup> Sánchez, D. S., Pérez, A. L., Fernández, M. D., Andreu, P. S., Abellán, M., Pérez Sánchez, P., Pérez, A. R. (2020). Microplásticos en estaciones depuradoras de aguas residuales urbanas. *Industria química*, 76, 50-56.
- <sup>32</sup> Murphy, F., Ewins, C., Carbonnier, F., Quinn, B. (2016). Wastewater Treatment Works (WwTW) as a Source of Microplastics in the Aquatic Environment. *Environmental Science & Technology*, 50(11), 5800-5808.
- <sup>33</sup> Ziajahromi, S., Neale, P.A., Silveira, I.T., Chua, A., Leusch, F.D.L. (2021). An audit of microplastic abundance throughout three Australian wastewater treatment plants. *Chemosphere*, 263, 128294.
- <sup>34</sup> Masiá, P., Sol, D., Ardura, A., Laca, A., Borrell, Y.J., Dopico, E., Laca, A., Machado-Schiaffino, G., Díaz, M., García-Vázquez, E. (2020). Bioremediation as a promising strategy for microplastics removal in wastewater treatment plants. *Marine Pollution Bulletin*, 156, 111252.
-

- 
- <sup>35</sup> Prata, J. C. (2018). Microplastics in wastewater: State of the knowledge on sources, fate and solutions. *Marine Pollution Bulletin*, 129(1), 262–265.
- <sup>36</sup> Liu, W., Zhang, J., Liu, H., Guo, X., Zhang, X., Yao, X., Cao, Z., Zhang, T. (2021). A review of the removal of microplastics in global wastewater treatment plants: Characteristics and mechanisms. *Environmental International*, 146, 106277.
- <sup>37</sup> Hamidian, A.H., Ozumchelouei, E.J., Feizi, F., Wu, C., Zhang, Y., Yang, M. (2021). A review on the characteristics of microplastics in wastewater treatment plants: A source for toxic chemicals. *Journal of Cleaner Production*, 295, 126480.
- <sup>38</sup> Hidayaturrahman, H., Lee, T.-G. (2019). A study on characteristics of microplastic in wastewater of South Korea: Identification, quantification, and fate of microplastics during treatment process. *Marine Pollution Bulletin*, 146, 696-702.
- <sup>39</sup> Galvão, A., Aleixo, M., De Pablo, H., Lopes, C., Raimundo, J. (2020). Microplastics in wastewater: microfiber emissions from common household laundry. *Environmental Science and Pollution Research International*, 27(21), 26643-26649.
- <sup>40</sup> Okoffo, E.D., O'Brien, S., O'Brien, J.W., Tscharke, B.J., Thomas, K.V. (2019). Wastewater treatment plants as a source of plastics in the environment: a review of occurrence, methods for identification, quantification and fate. *Environmental Science: Water Research & Technology*, 5(11), 1908-1931.
- <sup>41</sup> Gherghel, A., Teodosiu, C., De Gisi, S. (2019). A review on wastewater sludge valorisation and its challenges in the context of circular economy. *Journal of Cleaner Production*, 228, 244-263.
- <sup>42</sup> Gies, E.A., LeNoble, J.L., Noël, M., Etemadifar, A., Bishay, F., Hall, E.R., Ross, P.S. (2018). Retention of microplastics in a major secondary wastewater treatment plant in Vancouver, Canada. *Marine Pollution Bulletin*, 133, 553-561.
- <sup>43</sup> Habib, R.Z., Thiemann, T., Al Kendi, R. (2020). Microplastics and Wastewater Treatment Plants—A Review. *Journal of Water Resource and Protection*, 12(01), 1-35.
- <sup>44</sup> He, D., Luo, Y., Lu, S., Liu, M., Song, Y., Lei, L. (2018). Microplastics in soils: Analytical methods, pollution characteristics and ecological risks. *Trends in Analytical Chemistry: TRAC*, 109, 163-172.
- <sup>45</sup> Nizzetto, L., Futter, M., Langaas, S. (2016). Are agricultural soils dumps for microplastics of urban origin? *Environmental Science & Technology*, 50(20), 10777-10779.
- <sup>46</sup> Ruiz, F. A (2018). Biorreactores de membranas. Tratamientos biológicos con membranas. Dim Water Solutions – Dimasa Grupo. Disponible en: <http://www.dimasagrupo.com/wp-content/uploads/2018/05/Presentaci%C3%B3n-MBR-OK.pdf>
-

- 
- <sup>47</sup> Judd, S. (1982). *The MBR book: Principles and applications of membrane bioreactors for water and wastewater treatment* (2a Ed.). Butterworth-Heinemann.
- <sup>48</sup> Caro Estrada, R. *Estudio de aplicación de Biorreactores de Membrana (MBR) en la depuración de las aguas residuales*. Trabajo Fin de Master (2014). Departamento de Tecnologías del Medio Ambiente, Universidad de Cádiz.
- <sup>49</sup> Zuriaga Agustí, E. *Influencia de las características físicas y químicas del licor de mezcla en Biorreactores de Membrana y su correlación con los parámetros de operación en aguas residuales urbanas e industriales*. Tesis doctoral (2017). Departamento de Ingeniería Mecánica y de Materiales, Universitat Politècnica de Valencia.
- <sup>50</sup> Rodríguez Herrera, A. *Monitorización en línea de un reactor biológico de fangos*. Trabajo Fin de Grado (2009). Departamento de Ciencia e Ingeniería de Materiales e Ingeniería Química, Universidad Carlos III de Madrid.
- <sup>51</sup> González Gálvez, L. *Estudio comparativo de un proceso biológico convencional y un proceso mediante biomembranas para el tratamiento de aguas residuales urbanas*. Proyecto Fin de Carrera (2007). Departamento de Ingeniería Química, Tecnología de Alimentos y Tecnologías del Medio Ambiente, Universidad de Cádiz.
- <sup>52</sup> Viero, A., Santannajr, G., Nobrega, R. (2007). The use of polyetherimide hollow fibres in a submerged membrane bioreactor operating with air backwashing. *Journal of Membrane Science*, 302(1-2), 127-135.
- <sup>53</sup> Park, H.-J., Oh, M.-J., Kim, P.-G., Kim, G., Jeong, D.-H., Ju, B.-K., Lee, W.-S., Chung, H.-M., Kang, H.-J., Kwon, J.-H. (2020). National reconnaissance survey of microplastics in municipal wastewater treatment plants in Korea. *Environmental Science & Technology*, 54(3), 1503-1512.
- <sup>54</sup> Lares, M., Ncibi, M. C., Sillanpää, M., Sillanpää, M. (2018). Occurrence, identification and removal of microplastic particles and fibers in conventional activated sludge process and advanced MBR technology. *Water Research*, 133, 236-246.
- <sup>55</sup> Leslie, H.A., Brandsma, S.H., van Velzen, M.J.M., Vethaak, A.D. (2017). Microplastics en route: Field measurements in the Dutch river delta and Amsterdam canals, wastewater treatment plants, North Sea sediments and biota. *Environment International*, 101, 133-142.
- <sup>56</sup> Stephenson, T., Judd, S., Jefferson B., Brindle K. 2000. *Membrane bioreactors for wastewater treatment*. IWA Publishing, London.
- <sup>57</sup> Michielssen, M. R., Michielssen, E. R., Ni, J., Duhaime, M. B. (2016). Fate of microplastics and other small anthropogenic litter (SAL) in wastewater treatment plants depends on unit processes employed. *Environmental Science: Water Research & Technology*, 2(6), 1064-1073.
-



- 
- <sup>58</sup> Talvitie, J., Mikola, A., Koistinen, A., Setälä, O. (2017). Solutions to microplastic pollution – Removal of microplastics from wastewater effluent with advanced wastewater treatment technologies. *Water Research*, 123, 401-407.
- <sup>59</sup> Freeman, S., Booth, A. M., Sabbah, I., Tiller, R., Dierking, J., Klun, K., Rotter, A., Ben-David, E., Javidpour, J., Angel, D. L. (2020). Between source and sea: The role of wastewater treatment in reducing marine microplastics. *Journal of Environmental Management*, 266, 110642.
- <sup>60</sup> Lv, X., Dong, Q., Zuo, Z., Liu, Y., Huang, X., Wu, W.-M. (2019). Microplastics in a municipal wastewater treatment plant: Fate, dynamic distribution, removal efficiencies, and control strategies. *Journal of Cleaner Production*, 225, 579-586.
- <sup>61</sup> Bayo, J., López-Castellanos, J., Olmos, S. (2020). Membrane bioreactor and rapid sand filtration for the removal of microplastics in an urban wastewater treatment plant. *Marine Pollution Bulletin*, 156, 111211.
- <sup>62</sup> Maldonado Ochoa, M.E. *Producción y caracterización de sustancias poliméricas extracelulares SPE a diferentes tiempos de crecimiento utilizando microorganismos acidófilos*. Trabajo Fin de grado (2010). Universidad Católica de Loja. Área biológica y biomédica.
- <sup>63</sup> Collado, S., Laca, A., Díaz, M., Simón, P., Abellán, M., Polo, M., Rancaño, A. (2011). Sustancias poliméricas extracelulares (SPE) en sistemas de depuración biológica de aguas residuales. Parte I: tipos y formación. *Tecnología del Agua*, 31(333), 40-48.
- <sup>64</sup> Fard, M. B., Wu, D. (2023). Potential interactive effect on biomass and bio-polymeric substances of microalgal-bacterial aerobic granular sludge as a valuable resource for sustainable development. *Bioresource Technology*, 376, 128929.
- <sup>65</sup> Li, X., Yang, S. (2007). Influence of loosely bound extracellular polymeric substances (SPE) on the flocculation, sedimentation and dewaterability of activated sludge. *Water Research*, 41, 1022-1030.
- <sup>66</sup> Huang, L., Jin, Y., Zhou, D., Liu, L., Huang, S., Zhao, Y., Chen, Y. (2022). A Review of the Role of Extracellular Polymeric Substances (SPE) in Wastewater Treatment Systems. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 19(19), 12191.
- <sup>67</sup> Lin, H., Zhang, M., Wang, F., Meng, F., Liao, B.-Q., Hong, H., Chen, J., Gao, W. (2014). A critical review of extracellular polymeric substances (SPEs) in membrane bioreactors: Characteristics, roles in membrane fouling and control strategies. *Journal of Membrane Science*, 460, 110-125.
- <sup>68</sup> Wang, W., Zang, Y., Wang, C., Wang, K., Li, R. (2020). Effects of four kinds of oxide nanoparticles on proteins in extracellular polymeric substances of sludge. *BioMed Research International*, 2020, 1754134.
-

- 
- <sup>69</sup> More, T. T., Yadav, J. S. S., Yan, S., Tyagi, R. D., Surampalli, R. Y. (2014). Extracellular polymeric substances of bacteria and their potential environmental applications. *Journal of Environmental Management*, 144, 1-25.
- <sup>70</sup> Melo, A., Quintelas, C., Ferreira, E. C., Mesquita, D. P. (2022). The role of extracellular polymeric substances in micropollutant removal. *Frontiers in chemical engineering*, 4.
- <sup>71</sup> Di Bella, G., Corsino, S.F., De Marines, F., Lopresti, F., La Carrubba, V., Torregrossa, M., Viviani, G. (2022). Occurrence of Microplastics in Waste Sludge of Wastewater Treatment Plants: Comparison between Membrane Bioreactor (MBR) and Conventional Activated Sludge (CAS) Technologies. *Membranes*, 12, 371.
- <sup>72</sup> Bin, Z., Baosheng, S., Min, J., Taishi, G., Zhenghong, G. (2008). Extraction and analysis of extracellular polymeric substances in membrane fouling in submerged MBR. *Desalination*, 227(1-3), 286-294.
- <sup>73</sup> Chabalina, L.D., Rodríguez, M., Prats, D. (2008). Study of the extracellular polymeric substances (SPE) in different types of membrane bioreactor (MBR) effluents. *Water Pollution IX*, 491-500.
- <sup>74</sup> Teng, J., Wu, M., Chen, J., Lin, H., He, Y. (2020). Different fouling propensities of loosely and tightly bound extracellular polymeric substances (SPEs) and the related fouling mechanisms in a membrane bioreactor. *Chemosphere*, 255, 126953.
- <sup>75</sup> Wang, Z., Wu, Z., Tang, S. (2009). Extracellular polymeric substances (SPE) properties and their effects on membrane fouling in a submerged membrane bioreactor. *Water Research*, 43(9), 2504-2512.
- <sup>76</sup> Pontoni, L., Papirio, S., D'Alessandro, G., Caniani, D., Gori, R., Mannina, G., Capodici, M., Nicosia, S., Fabbicino, M., Pirozzi, F., Esposito, G. (2018). Dewaterability of CAS and MBR sludge: Effect of biological stability and SPE composition. *Journal of Environmental Engineering*, 144.
- <sup>77</sup> Hung, C.-M., Huang, C.-P., Hsieh, S.-L., Chen, Y.-T., Ding, D.-S., Hsieh, S., Chen, C.-W., Dong, C.-D. (2022). Exposure of *Goniopora columna* to polyethylene microplastics (PE-MPs): Effects of PE-MP concentration on extracellular polymeric substances and microbial community. *Chemosphere*, 297, 134113.
- <sup>78</sup> Hung, C.-M., Chen, C.-W., Huang, C.-P., Hsieh, S.-L., Dong, C.-D. (2022). Ecological responses of coral reef to polyethylene microplastics in community structure and extracellular polymeric substances. *Environmental Pollution*, 307, 119522.
- <sup>79</sup> Gopalakrishnan, K., Kashian, D. R. (2022). Extracellular polymeric substances in green alga facilitate microplastic deposition. *Chemosphere*, 286, 131814.
-

- 
- <sup>80</sup> Wang, C., Wei, W., Zhang, Y.-T., Dai, X., Ni, B.-J. (2022). Different sizes of polystyrene microplastics induced distinct microbial responses of anaerobic granular sludge. *Water Research*, 220, 118607.
- <sup>81</sup> Jachimowicz, P., Jo, Y.-J., Cydzik-Kwiatkowska, A. (2022). Polyethylene microplastics increase extracellular polymeric substances production in aerobic granular sludge. *Science of the Total Environment*, 851, 158208.
- <sup>82</sup> Luo, H., Liu, C., He, D., Sun, J., Zhang, A., Li, J., Pan, X. (2022). Interactions between polypropylene microplastics (PP-MPs) and humic acid influenced by aging of MPs. *Water Research*, 222, 118921.
- <sup>83</sup> Zafar, R., Bang, T. H., Lee, Y. K., Begum, M. S., Rabani, I., Hong, S., Hur, J. (2022). Change in adsorption behavior of aquatic humic substances on microplastic through biotic and abiotic aging processes. *Science of the Total Environment*, 843, 157010.
- <sup>84</sup> Liu, H., Fang, H.H.P. (2002). Extraction of extracellular polymeric substances (SPE) of sludges. *Journal of Biotechnology*, 95, 249-256.
- <sup>85</sup> Lowry, O. H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193(1), 265-275.
- <sup>86</sup> Frolund, B., Griebe, T., Nielsen, P.H. (1995). Enzymatic activity in the activated-sludge floc matrix. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 43(4), 755-761.
- <sup>87</sup> Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P., Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical chemistry*, 28(3), 350-356.
- <sup>88</sup> Laca, A., Laca, A., Díaz, M. (2018). Producción y características de lodos, en Paraninfo (Ed.), *Ecuaciones y cálculos para el tratamiento de aguas*, pp. 251-262. Ediciones Paraninfo, S.A.
- <sup>89</sup> Mañunga, T. (2014). Evaluación del desempeño de un sistema de lodos activados en la modalidad de estabilización por contacto sin clarificación primaria tratando agua residual doméstica [Tesis de doctorado publicada]. *Universidad del Valle, Santiago de Cali (Colombia)*.
- <sup>90</sup> Método 2540 SOLIDS (2018). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. Disponible en: <https://www.standardmethods.org/doi/10.2105/SMWW.2882.030>
- <sup>91</sup> Rachel, L., Coppock, M.C. (2017). A small-scale, portable method for extracting microplastics from marine sediments. *Environmental Pollution*, 230, 829-837.
- <sup>92</sup> Rodrigues, M.O., Gonçalves, A.M.M., Gonçalves, F.J.M., Abrantes, N. (2020). Improving cost-efficiency for MPs density separation by zinc chloride reuse. *Methods X*, 100785.
-

- 
- <sup>93</sup> Rosenberger, S., Evenblij, H., te Poele, S., Wintgens, T., Laabs, C. (2005). The importance of liquid phase analyses to understand fouling in membrane assisted activated sludge processes—six case studies of different European research groups. *Journal of Membrane Science*, 263(1-2), 113-126.
- <sup>94</sup> Tang, K.H.D., Hadibarata, T. (2021). Microplastics removal through water treatment plants: Its feasibility, efficiency, future prospects and enhancement by proper waste management. *Environmental Challenges*, 5, 100264.
- <sup>95</sup> Jefferson, B., Laine, A.L., Judd, S.J., Stephenson, T. (2000). Membrane bioreactors and their role in wastewater reuse. *Water Science and Technology*, 41(1), 197-204.
- <sup>96</sup> Lesjean, B., Rosenberger, S., Laabs, C., Jekel, M., Gnirss, R., Amy, G. (2005). Correlation between membrane fouling and soluble/colloidal organic substances in membrane bioreactors for municipal wastewater treatment. *Water Science and Technology*, 51(6-7), 1-8.
- <sup>97</sup> Hong, S.P., Bae, T.H., Tak, T.M., Hong, S., Randall, A. (2002). Fouling control in activated sludge submerged hollow fiber membrane bioreactors. *Desalination*, 143(3), 219-228.
- <sup>98</sup> Sharrer, M.J., Rishel, K., Summerfelt, S.T. (2010). Evaluation of a membrane biological reactor for reclaiming water, alkalinity, salts, phosphorus, and protein contained in a high-strength aquacultural wastewater. *Bioresource Technology*, 101(12), 4322-4330.
- <sup>99</sup> Müller, E.B., Stouthamber, A.H., Verseveld, H.W., Eikelboom, D.H. (1995). Aerobic domestic wastewater treatment in a pilot plant with complete sludge retention by cross-flow filtration. *Water Research*, 29, 1179-1189.
- <sup>100</sup> Raszka, A., Chorvatova, M., Wanner, J. (2006). The role and significance of extracellular polymers in activated sludge. Part I: Literature review. *Acta hydrochimica et hydrobiologica*, 34, 411-424.
- <sup>101</sup> Gkotsis, P.K., Zouboulis, A.I. (2019). Biomass Characteristics and Their Effect on Membrane Bioreactor Fouling. *Molecules*, 24(16), 2867.
- <sup>102</sup> Comte, S., Guibaud, G., Baudu, M. (2006). Relation between extraction protocols for activated sludge extracellular polymeric substances (SPE) and SPE complexation properties. Part I: Comparison of the efficiency of eight SPE extractions methods. *Enzyme and Microbial Technology*, 38, 237-245.
- <sup>103</sup> Geng, Z., Hall, E.R. (2007). A comparative study of fouling-related properties of sludge from conventional and membrane enhanced biological phosphorus removal processes. *Water Research*, 41(19), 4329-4338.

- 
- <sup>104</sup> Liu, Y., Lv, W.Z., Zhang, Z.Q., Xia, S.Q. (2018). Influencing characteristics of short-time aerobic digestion on spatial distribution and adsorption capacity of extracellular polymeric substances in waste activated sludge. *RSC Advances*, 8, 32172-32177.
- <sup>105</sup> Maliwan, T., Pungrasmi, W., Lohwacharin, J. (2021). Effects of microplastic accumulation on floc characteristics and fouling behavior in a membrane bioreactor, *Journal of Hazardous Materials*, 411, 124991.
- <sup>106</sup> Eng, L.J., Wang, J.J., Liu, S.C., Sun, X.D., Yuan, X.Z., Was, G. (2018). Role of extracellular polymeric substances in the acute inhibition of activated sludge by polystyrene nanoparticles. *Environmental Pollution*, 238, 859-865.
- <sup>107</sup> Li, H., Xu, S., Wang, S., Yang J., Yan, P., Chen, Y., Guo J., Fang F. (2020). New insight into the effect of short-term exposure to polystyrene nanoparticles on activated sludge performance. *Journal of Water Process Engineering*, 38, 101559.
- <sup>108</sup> Menéndez-Manjón, A., Sánchez, D.S., Pérez, A.L., Pérez, A.R., Sánchez, P.P., Fernández, M.D. (2021). Tratamientos para la eliminación de microplásticos en Estaciones Depuradoras de Aguas Residuales Urbanas: microfibras. *Industria Química*, 92, 44-49.
- <sup>109</sup> Raju, S., Carbery, M., Kuttykattil, A., Senthirajah, K., Lundmark, A., Rogers, Z., SCB, S., Evans, G., Palanisami, T. (2020). Improved methodology to determine the fate and transport of microplastics in a secondary wastewater treatment plant. *Water Research*, 173, 115549.
- <sup>110</sup> Liu, X., Yuan, W., Di, M., Li, Z., Wang, J. (2019). Transfer and fate of microplastics during the conventional activated sludge process in one wastewater treatment plant of China. *Chemical Engineering Journal*, 362, 176-182.
- <sup>111</sup> Tadsuwan, K., Babel, S. (2022). Microplastic abundance and removal via an ultrafiltration system coupled to a conventional municipal wastewater treatment plant in Thailand. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 10, 2.
- <sup>112</sup> Isobe, A., Azuma, T., Cordova, M.R., Cózar, A., Galgani, F., Hagita, R. et al. (2021). Multilevel dataset of microplastic abundance in the world's upper ocean and the Laurentian Great Lakes. *Microplastics and Nanoplastics*, 1, 16.
- <sup>113</sup> Díaz, M. (2012). Ingeniería de bioprocesos, *Paraninfo*, 102.
- <sup>114</sup> Xiong, X., Tu, Y., Chen, X., Jiang, X., Shi, H., Wu, C., Elser, J. J. (2019). Ingestion and egestion of polyethylene microplastics by goldfish (*Carassius auratus*): influence of color and morphological features, *Heliyon*, 5(12), e03063.
- <sup>115</sup> Shi, Y., Chai, J., Xu, T., Ding, L., Huang, M., Gan, F., Pi, K., Gerson, A.R., Yang, J. (2023). Microplastics contamination associated with low-value domestic source organic solid waste: A review. *Science of The Total Environment*, 857, 159679.
-

- 
- <sup>116</sup> Vollertsen, J., Hansen, A. A. (2017). Microplastic in Danish wastewater: Sources, occurrences and fate. *The Danish Environmental Protection Agency. Environmental Project*, 1906.
- <sup>117</sup> Lusher, A.L., Hurley, R., Vogelsang, C., Nizzetto, L., Olsen., M. (2018). Mapping Microplastics in Sludge. DOI: 10.13140/RG.2.2.25277.56804.
- <sup>118</sup> Gündoğdu, S., Çevik, C., Güzel, Kilercioğlu, S. (2018). Microplastics in municipal wastewater treatment plants in Turkey: a comparison of the influent and secondary effluent concentrations. *Environmental Monitoring Assessment*, 190, 626.
- <sup>119</sup> Kazour, M., Terki, S., Rabhi, K., Jemaa, S., Khalaf, G., Amara, R. (2019). Sources of microplastics pollution in the marine environment: Importance of wastewater treatment plant and coastal landfill. *Marine Pollution Bulletin*, 146, 608-618.
- <sup>120</sup> Magni, S., Binelli, A., Pittura, L., Avio, C. G., Della Torre, C., Parenti, C. C., Gorbi, S., Regoli, F. (2019). The fate of microplastics in an Italian Wastewater Treatment Plant. *Science of The Total Environment*, 652, 602-610.
- <sup>121</sup> Ye, T., Yang, A., Wang, Y., Song, N., Wang, P., Xu, H. (2022). Changes of the physicochemical properties of extracellular polymeric substances (SPE) from *Microcystis aeruginosa* in response to microplastics. *Environmental Pollution*, 315, 120354.
- <sup>122</sup> Mahto, K. U., Vandana, Priyadarshane, M., Samantaray, D. P., Das, S. (2022). Bacterial biofilm and extracellular polymeric substances in the treatment of environmental pollutants: Beyond the protective role in survivability. *Journal of Cleaner Production*, 379, 134759.
- <sup>123</sup> Huang, X., Wang, S., Fu, L., Fang, F., Guo, J. (2022). Characterization of extracellular polymeric substances by microscopic imaging techniques in wastewater biotreatment: A review. *Environmental Engineering Science*, 39(6), 493–511.
- <sup>124</sup> Tomaszewski, J. E., Schwarzenbach, R. P., Sander, M. (2011). Protein encapsulation by humic substances. *Environmental Science & Technology*, 45(14), 6003-6010.
- <sup>125</sup> Wang, B.-B., Liu, X.-T., Chen, J.-M., Peng, D.-C., He, F. (2018). Composition and functional group characterization of extracellular polymeric substances (SPE) in activated sludge: the impacts of polymerization degree of proteinaceous substrates. *Water Research*, 129, 133-142.
- <sup>126</sup> Nouha, K., Kumar, R.S., Balasubramanian, S., Tyagi, R.D. (2018). Critical review of SPE production, synthesis and composition for sludge flocculation. *Journal of Environmental Sciences*, 66, 225-245.
- <sup>127</sup> de Melo, B.A.G., Motta, F.L., Santana, M.H.A. (2016). Humic acids: Structural properties and multiple functionalities for novel technological developments. *Materials Science & Engineering. C, Materials for Biological Applications*, 62, 967-974.
-

- 
- <sup>128</sup> Wei, L., Li, Y., Noguera, D.R., Zhao, N., Song, Y., Ding, J., Zhao, Q., Cui, F. (2017). Adsorption of  $\text{Cu}^{2+}$  and  $\text{Zn}^{2+}$  by extracellular polymeric substances (SPE) in different sludges: Effect of SPE fractional polarity on binding mechanism. *Journal of Hazardous Materials*, 321, 473-483.
- <sup>129</sup> Joo, S.H., Liang, Y., Kim, M., Byun, J., Choi, H. (2021). Microplastics with adsorbed contaminants: Mechanisms and Treatment. *Environmental Challenges*, 3, 100042.
- <sup>130</sup> Solís-Balbín, C., Sol, D., Laca, A., Laca, A., Díaz, M. (2023). Destruction and entrainment of microplastics in ozonation and wet oxidation processes. *Journal of Water Process Engineering*, 51, 103456.
- <sup>131</sup> Summers, S., Henry, T., Gutierrez, T. (2018). Agglomeration of nano- and microplastic particles in seawater by autochthonous and de novo-produced sources of exopolymeric substances. *Marine Pollution Bulletin*, 130, 258–267.
- <sup>132</sup> Lett, Z., Hall, A., Skidmore, S., Alves, N.J. (2021). Environmental microplastic and nanoplastic: Exposure routes and effects on coagulation and the cardiovascular system. *Environmental Pollution*, 291, 118190.
- <sup>133</sup> Park, S.J. (2020). Protein-nanoparticle interaction: Corona formation and conformational changes in proteins on nanoparticles. *International Journal of Nanomedicine*, 15, 5783-5802.
- <sup>134</sup> Prado, A.G.S., Pertusatti, J., Nunes, A.R. (2011). Aspects of protonation and deprotonation of humic acid surface on molecular conformation. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 22(8), 1478-1483.
- <sup>135</sup> Motta, F.L., Melo, B.A.G., Santana, M.H.A. (2016). Deprotonation and protonation of humic acids as a strategy for the technological development of pH-responsive nanoparticles with fungicidal potential. *New Biotechnology*, 33(6), 773-780.
- <sup>136</sup> Sudiono, S., Yuniarti, M., Siswanta, D., Kunarti, E. S., Triyono, T., Santosa, S.J. (2017). The role of carboxyl and hydroxyl groups of humic acid in removing  $\text{AuCl}_4^-$  from aqueous solution. *Indonesian Journal of Chemistry*, 17(1), 95.