



Università  
Ca' Foscari  
Venezia

Corso di Laurea  
Magistrale  
in Scienze Ambientali  
(LM-75)

Tesi di Laurea

**Comportamento dei PFAS nel processo di  
digestione anaerobica e valutazione  
preliminare degli effetti sulle rese di biogas.**

**Relatore**

Prof.ssa Cristina Cavinato

**Correlatore**

Prof. Antonio Marcomini

**Laureanda**

Vanessa Canaletti

Matricola 861584

**Anno Accademico**

2020 / 2021

# Sommario

Lista acronimi.....	6
Abstract .....	8
1. Introduzione.....	9
1.1 Le sostanze per- e polifluoroalchiliche.....	9
1.1.1 Sostanze per- e poli-fluoroalchiliche: definizioni ed utilizzi.....	9
1.1.2 I PFAS come contaminanti.....	12
1.1.3 Legislazione Europea ed Italiana, restrizioni di produzione e di utilizzo.....	16
1.1.1 La rilevanza dei PFAS a catena corta e la “dark matter”.....	19
1.2 Gli impianti di depurazione delle acque reflue: generalità e ruolo nel ricircolo ambientale dei PFAS	21
1.2.1 Gli impianti di depurazione delle acque reflue.....	21
1.2.2 I PFAS negli impianti di depurazione acque reflue.....	23
1.3 La digestione anaerobica .....	29
1.3.1 Condizioni operative e parametri di stabilità nella digestione anaerobica .....	32
1.4 Scopo del lavoro di tesi .....	36
2. Materiali e metodi.....	37
2.1 Test di biometanazione.....	37
2.1.1 Campionamento, quantificazione e analisi della composizione del biogas:.....	41
2.2 Caratterizzazione delle matrici utilizzate .....	43
2.3 Analisi chimico-analitiche per la quantificazione dei PFAS .....	45
2.3.1 Preparazione dei campioni.....	45
2.3.2 Analisi strumentale (LC/MS-MS) .....	45
2.3.3 Quantificazione.....	47
3. Risultati e discussione .....	48
3.1 Caratterizzazione delle matrici utilizzate .....	48
3.2 Test di biometanazione.....	50
3.2.1 Test con PFOA .....	51

3.2.2	Test con aggiunta di PFOS, PFBA e PFBS .....	56
3.2.3	Secondo test con aggiunta di PFOS, PFBA E PFBS .....	59
3.3	Test statistico di Kolmogorov-Smirnov .....	64
<b>3.4</b>	<b>Calcolo delle costanti di ripartizione .....</b>	<b>65</b>
<b>4.</b>	<b>Conclusioni e prospettive .....</b>	<b>67</b>
5.	Bibliografia.....	69
6.	Sitografia .....	79
7.	Materiali supplementari:.....	81
7.1	Appendice I: valori composizione biogas .....	81
7.2	Appendice 2: Grafici BMP .....	82
7.3	Appendice 3: metodi analitici.....	85

Indice figure:

Figura 1-	Formula condensata e di struttura dell'acido perfluoroottansolfonico .....	10
Figura 2-	Alcol 8:2 fluorotelomero .....	10
Figura 3 –	Illustrazione di pattern di degradazione microbica per (A) alcuni derivati di 8:2 FTOH e (B) alcuni esteri della perfluoroottansulfonamide che portano alla formazione di PFOA e PFOS (da Liu and Mejia Avendaño, 2013). .....	11
Figura 4 –	Schema di classificazione dei PFAS .....	12
Figura 5 –	Sorgenti e percorsi di missione di PFAS in ambiente, e conseguente interazione col biota. (Oliaei et al., 2013).....	14
Figura 6-	Impatti sulla salute umana dei PFASs. Fonte : (EEA, 2019).....	16
Figura 7-	Cambiamenti nella conformazione delle catene perfluorurate (...-CF2-...) nei PFAS commercializzati. Fonte: Occurrence and use of highly fluorinated substances and alternatives (KEMI, 2015) .....	19
Figura 8 -	Schema delle fasi per la depurazione delle acque reflue (impianto civile). Fonte: (Mallik et al., 2018) .....	22
Figura 9 -	Sfide, soluzioni e opportunità per gli impianti di trattamento delle acque reflue urbane. (EEA, 2019) .....	23
Figura 10 -	Variazione delle concentrazioni dei diversi PFAS in entrata ed uscita della linea acque di un WWTP civile (Arvaniti et al., 2012) .....	25

Figura 11 - Schema generale del processo di digestione anaerobica (Cecchi et al., 2005) .....	31
Figura 12 - Velocità specifica di crescita nei diversi range termici (Cecchi et al., 2005) .....	35
Figura 13 - Schema di un vessel per test di biometanazione (modificato da Angelidaki et al., 2009).....	37
Figura 14- Raccolta del biogas e sua misurazione volumetrica.....	41
Figura 15 - Analizzatore portatile per la composizione del biogas.....	41
Figura 16- Gas bag .....	41
Figura 17 - Diagramma del gradiente di eluizione .....	46
Figura 18- Valori medi dei VFA del fango (FV1) (mg L <sup>-1</sup> ) .....	49
Figura 19- Valori medi del VFA del fango (FV2) (mg L <sup>-1</sup> ).....	49
Figura 20- Valori medi dei VFA del digestato (DV1) (mg L <sup>-1</sup> ) .....	50
Figura 21- Valori medi VFA del digestato (DV2) (mg L <sup>-1</sup> ).....	50
Figura 22- Attività di inoculo e substrato e con aggiunta del PFOA a concentrazione 1 e 10 mg * L <sup>-1</sup> .....	51
Figura 23- SGP di inoculo e substrato e con aggiunta del PFOA a concentrazione 1 e 10 mg * L <sup>-1</sup> .....	52
Figura 24- Produzione specifica di metano per Kg di substrato.....	52
Figura 25-Variazione nel tempo della composizione del CH <sub>4</sub> .....	55
Figura 26- Variazione nel tempo della composizione del CO <sub>2</sub> .....	55
Figura 27- Attività delle BMP con aggiunta di PFOS, PFBA e PFBS a concentrazione 1 e 10mg L <sup>-1</sup> .....	56
Figura 28- SGP delle BMP con aggiunta di PFOS, PFBA e PFBS a concentrazione 1 e 10mg L <sup>-1</sup> .....	57
Figura 29- SMP delle BMP con aggiunta di PFOS, PFBA e PFBS a concentrazione 1 e 10mg L <sup>-1</sup> .....	57
Figura 30 - Variazione nel tempo della composizione del CH <sub>4</sub> .....	58
Figura 31- Variazione nel tempo della percentuale di CO <sub>2</sub> .....	59
Figura 32- Attività di inoculo e substrato e con aggiunta del PFOA a concentrazione 1 mg * L <sup>-1</sup> .....	60
Figura 33-SGP di inoculo e substrato e con aggiunta del PFOA a concentrazione 1 mg * L <sup>-1</sup> .....	60
Figura 34- SMP di inoculo e substrato e con aggiunta del PFOA a concentrazione 1 mg * L <sup>-1</sup> .....	61
Figura 35 - Variazione nel tempo della composizione del CH <sub>4</sub> (test con aggiunta di 1mg L <sup>-1</sup> PFOS, PFBS E PFOS) .....	62
Figura 36 - Variazione nel tempo della composizione del CO <sub>2</sub> (test con aggiunta di 1mg L <sup>-1</sup> PFOS, PFBS E PFOS) .....	62
Figura 37- Coefficienti di ripartizione di diversi PFAS relativi a diversi metodi di stabilizzazione dei fanghi (Ebrahimi et al., 2021b).....	66
Figura 38 - titolazione colorimetrica .....	86

## Indice tabelle

Tab.1. Concentrazioni di diversi acidi perfluoroalchilici (PFAA) in diversi comparti ambientali.....	15
Tab.2. Standard di qualità ambientale per le acque superficiali in Italia. (Commissione europea, 2013).....	18
Tab. 3. Valori soglia dei differenti PFAS nelle acque sotterranee.....	18
Tab. 4. Concentrazioni di PFAS all'ingresso e all'uscita di impianti di trattamento civili. Sono riportati solo alcuni degli analiti (acidi perfluorocarbossilici e perfluorosolfonici a catena corta e lunga), mentre le sommatorie sono riferite all'intero set di analiti.....	24
Tab.5. Concentrazioni di PFA nei biosolidi in uscita da diversi WWTP.....	27
Tab.6. Alcuni dati sulla degradabilità di alcuni PFAS (precursori di acidi perfluoroalchilici).....	28
Tab. 7. Dati PFOA reali per ciascuna bottiglia.....	40
Tab.8. Dati PFOS + PFBA + PFBS reali per ciascuna bottiglia primo test.....	40
Tab.9. Dati PFOS + PFBA + PFBS reali per ciascuna bottiglia secondo test.....	40
Tab. 10. Gradiente di eluizione.....	46
Tab.11. Misura del pH e dell'alcalinità ( $\text{mg CaCO}_3^* \text{ L}^{-1}$ ) nei diversi tipi di fango e digestato.....	48
Tab.12. Valori di SGP e Kid riportati in letteratura per sewage sludges e waste activated sludges.....	53
Tab.13.Valori finali di SGP ed SMP nelle tre condizioni.....	53
Tab 14. Costante di idrolisi.....	54
Tab. 15 . Valori finali di SGP ed SMP.....	58
Tab. 16. Costante di idrolisi.....	58
Tab. 17. Valori finali SGP ed SMP.....	61
Tab. 18. Costante di idrolisi.....	63
Tab.19.Test statistico di KolmogorovSmirnov.....	64
Tab. 20. Valori del coefficiente di ripartizione ottenuti alla concentrazione di 1 e 10 $\text{mg L}^{-1}$ nei campioni prelevati in corrispondenza dell'apertura delle bottiglie.....	65
Tab. 21. Composizione biogas PFOA.....	81
Tab. 22. Composizione biogas PFOS, PFBS e PFBA (primo test).....	81
Tab. 23. Composizione biogas PFOS, PFBS e PFBA (secondo test).....	81

## Lista acronimi

ACRONIMO	NOME	CAS NUMBER	FORMULA BRUTA
APFO	Pentadecafluoroottanoato di ammonio	3825-26-1	C <sub>8</sub> HF <sub>15</sub> O <sub>2</sub>
BMP	potenziale di biometanazione (Biochemical Methane Potential)	/	/
EtFOSE	N-ethyl perfluorooctane sulfonamido ethanol	/	C <sub>12</sub> H <sub>6</sub> F <sub>21</sub> NO <sub>3</sub> S
F/M	Rapporto food/microrganisms		
FBSA	Perfluorobutan sulfonamide	30334-69-1	C <sub>4</sub> H <sub>2</sub> F <sub>9</sub> NO <sub>2</sub> S
FOSA	Perfluorobutan sulfonamide	754-91-6	C <sub>8</sub> H <sub>2</sub> F <sub>17</sub> NO <sub>2</sub> S
GenX	2,3,3,3-tetrafluoro-2-(eptafluoropropossi)-propanoato di ammonio	62037-80-3	C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> F <sub>11</sub> NO <sub>3</sub>
HRT	tempo di ritenzione idraulica	/	/
LOD	Limite di rilevazione	/	/
LOQ	Limite di quantificazione	/	/
OL	Carico organico (organic loading)	/	/
OLR	Tasso di carico organico (organic loading rate)	/	/
pCOD	Richiesta chimica di ossigeno nel particolato	/	/
PFAA	Acidi perfluoroalchilici	/	/
PFCA	Acidi perfluorocarbossilici	/	/
PFDA	Acido perfluorodecanoico	335-76-2	C <sub>10</sub> HF <sub>19</sub> O <sub>2</sub>
PFOA	Acido perfluoroottanoico	335-67-1	C <sub>8</sub> HF <sub>15</sub> O <sub>2</sub>
PFBA	Acido eptafluorobutirrico	375-22-4	C <sub>3</sub> F <sub>7</sub> COOH
PFBS	Perfluoro butano sulfonato	375-73-5	C <sub>4</sub> HF <sub>9</sub> O <sub>3</sub> S
PFOS	Acido perfluoroottansolfonico	1763-23-1	C <sub>8</sub> HF <sub>17</sub> O <sub>3</sub> S
PFHxA	Acido perfluoroesanoico	/	C <sub>6</sub> HF <sub>11</sub> O <sub>2</sub>

PFHxS	Perfluoro esan sulfonato	/	$C_6HF_{13}O_3S$
PFHpA	Acido perfluoro eptanoico	375-85-9	$C_7HF_{13}O_2$
PTFE	Politetrafluoroetilene	9002-84-0	$(C_2F_4)_n$
PVF	Polivinilfluoruro	24981-14-4	$(C_2H_3F)_n$
sCOD	Richiesta chimica di ossigeno solubile	/	/
SGP	Produzione specifica media di biogas	/	/
SMP	Produzione specifica media di metano	/	/
TS	Solidi totali	/	/
TVS	Solidi volatili totali	/	/
VFA	Acidi grassi volatili (volatile fatty acids)	/	/
8:2 FTOH	Alcoli fluorotelomerici	678-39-7	$C_{10}H_5F_{17}O$
6:2 FTOH	Alcoli fluorotelomerici	647-42-7	$C_8H_5F_{13}O$
8:2 FTS	Fluorotelomero solfonato	27619-96-1	$C_{10}H_4F_{17}SO_3Na$
8:2 FTAC	Fluorotelomer acrylate	7905-45-9	$C_8F_{17}CH_2CH_2OC(O)CH=CH_2$
6:2 FTSA	Acido perfluottano solfonico	27619-97-2	$C_8H_5F_{13}O_3S$

## Abstract

Le sostanze per- e polifluoroalchiliche (PFAS) sono una classe di sostanze xenobiotiche prodotte a partire dalla fine degli anni '40 ed utilizzate largamente in ambito sia industriale che commerciale, principalmente per conferire idro- ed oleorepellenza. La presenza di numerosi legami C-F nella molecola e quindi l'estrema resistenza termica e chimica di queste sostanze anfifiliche è alla base della loro enorme diffusione. Negli ultimi due decenni sono emerse numerose criticità legate ai PFAS, come l'estrema persistenza in ambiente (che le ha rese inquinanti ubiquitari nonché contaminanti emergenti), e il fatto che sono associati a diversi effetti sulla salute umana (bioaccumulabilità, perturbazione endocrina).

Gli impianti di depurazione delle acque reflue, rappresentando importanti sorgenti puntuali secondarie dei PFAS in ambiente, data la loro solubilità e sono spesso rilevati negli effluenti degli impianti a concentrazioni fino a centinaia di  $\text{ng L}^{-1}$ .

La digestione anaerobica è un processo usato per stabilizzare le matrici organiche come i fanghi primari e secondari prodotti in un impianto di depurazione, ed ottenere biogas riutilizzabile come fonte energetica. Se è nota la presenza di PFAS nei biosolidi stabilizzati in uscita dalla linea fanghi dei WWTP, poco studiato è il destino di queste sostanze nel processo di digestione anaerobica. Alla luce delle lacune conoscitive circa il destino dei PFAS in questo processo, in questo lavoro di tesi si è voluto indagare:

- 1) la ripartizione tra la fase solida e quella liquida di alcuni PFAS selezionati
- 2) l'effetto sulla produzione di biogas in test di biometanazione, data dalla presenza di queste sostanze.

Sono state per questo effettuate delle sperimentazioni in batch finalizzate alla misura del potenziale di biometanazione (BMP) ed al calcolo della costante di ripartizione solido liquido dei PFAS selezionati.

# 1. Introduzione

## 1.1 Le sostanze per- e polifluoroalchiliche

### 1.1.1 Sostanze per- e poli-fluoroalchiliche: definizioni ed utilizzi

Le sostanze per- e polifluoroalchiliche (PFAS) sono una classe di sostanze chimiche xenobiotiche prodotte a partire dalla fine degli anni '40 ed utilizzate largamente in ambito sia industriale che commerciale (Wang et al., 2017).

Caratteristica comune dei PFAS è la presenza di almeno una catena alchilica poli- o perfluorurata (idrofobica) e un gruppo funzionale (idrofilico), tipicamente solfonico o carbossilico (Muller & Yingling, 2018). L'elevato tasso di fluorurazione e quindi di legami C-F all'interno della molecola rende queste sostanze altamente resistenti alla degradazione e termicamente stabili, mentre il carattere di anfifilicità e la natura tensioattiva sono stati sfruttati per conferire idro- ed oleorepellenza a numerosi prodotti (padelle antiaderenti, indumenti sportivi tecnici, imballaggi per il cibo), nelle formulazioni di schiume antincendio, o come ritardanti di fiamma nei beni di consumo (Dean et al., 2020). A livello industriale hanno numerose applicazioni nel settore aerospaziale, fotografico, automobilistico, edilizia, elettronico, e nell'industria aeronautica (ITRC, 2017). Un recente studio ha individuato circa 200 categorie di utilizzo dei PFAS (Glüge et al., 2020).

Nonostante siano utilizzati da svariati decenni, solo nello scorso decennio è stata fornita una nomenclatura e una classificazione esaustiva per queste sostanze (Buck et al., 2011), recentemente modificata dall'OECD che ne ha ampliato la definizione per la quale la classe dei PFAS è arrivata a comprendere circa 4500 CAS numbers associati a tali sostanze (OECD, 2018). Secondo la definizione, i PFAS sono sostanze alifatiche altamente fluorurate, dove una parte o tutti gli atomi di H legati agli atomi di C della catena alchilica (presenti negli analoghi non fluorurati dai quali sono teoricamente derivati) sono stati sostituiti da atomi di F, e dove quindi è presente una porzione di molecola che risponde alla formula  $C_nF_{2n+1}$ .

Gli acidi perfluoroalchilici (PFAA) comprendono le sub-classi degli acidi perfluorocarbossilici e solfonici (PFCA e PFSA) a cui fanno capo rispettivamente PFOS e PFOA, che assieme ad una decina di altri acidi perfluoroalchilici costituiscono i PFAS più utilizzati e studiati e su cui si sono concentrate le ricerche rispetto alle proprietà tossicologiche e alla presenza in ambiente. Nella Figura 1 è mostrata la struttura chimica dell'acido perfluoroottansolfonico (PFOS).

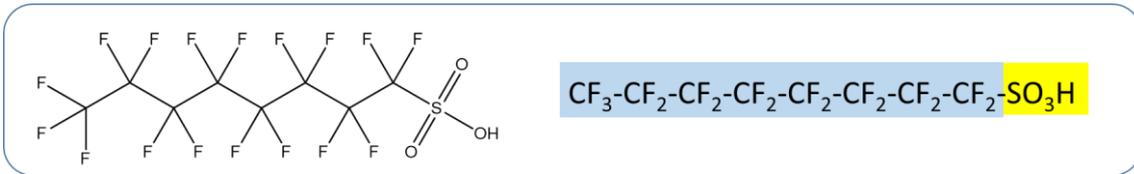


Figura 1- Formula condensata e di struttura dell'acido perfluorooctansolfonico

Anche le sostanze polifluoroalchiliche (dove non tutti gli idrogeni della catena perfluoroalchilica sono completamente sostituiti da atomi di fluoro) rispondono a tale formula, come l'alcol 8:2 fluorotelomero o 8:2 FTOH (Figura 2)

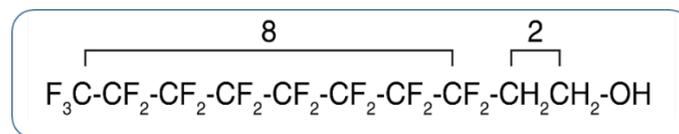


Figura 2- Alcol 8:2 fluorotelomero

Due criteri alla base della nomenclatura sono la lunghezza della catena alifatica e il gruppo funzionale, caratteristiche indicate negli acronimi (PFX<sub>Y</sub>, dove PF= per- o polifluoroalchil, X indica la lunghezza della parte perfluorurata della catena alifatica e Y il gruppo funzionale). Ad esempio, PFOA = acido perfluorooctansolfonico e PFH<sub>x</sub>S= perfluoroesansolfonato.

Le sostanze polifluoroalchiliche possono essere utilizzate per la produzione di altri PFAS, come 8:2 FTOH (o suoi equivalenti a catena alchilica più corta) che è utilizzato per la produzione di fluoropolimeri, oppure trovano impiego tal quali come i diesteri fosforici dell'acido dell'N-etil perfluorooctansulfonamide (*SAmPAP diesters*), ma possono degradarsi in ambiente per formare PFAA, come PFOA e PFOS (Ross et al., 2018; Benskin et al., 2013). Nell'esempio seguente (Figura 3) sono mostrate delle reazioni microbiologicamente mediate dove a partire da PFAS polifluoroalchilici "precursori", intesi come sostanze prodotte per essere usate tal quali o come reagenti per la produzione di PFAA, si formano PFOA e PFOS (Liu and Mejia Avendaño, 2013).

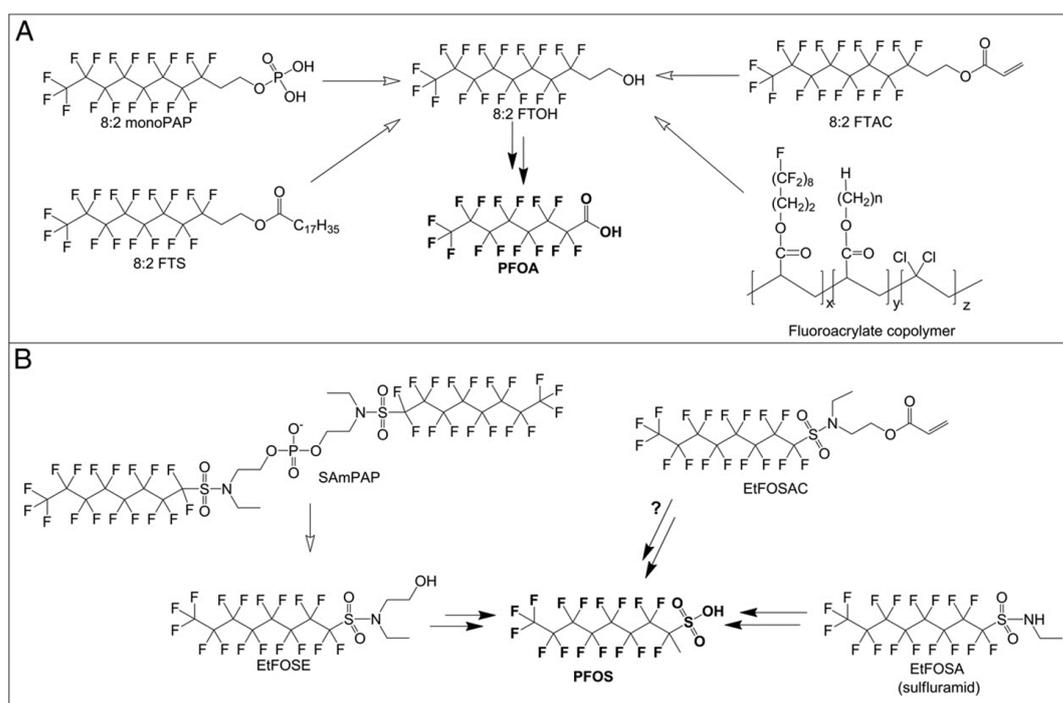


Figura 3 – Illustrazione di pattern di degradazione microbica per (A) alcuni derivati di 8:2 FTOH e (B) alcuni esteri della perfluorootansulfonamide che portano alla formazione di PFOA e PFOS (da Liu and Mejia Avendaño, 2013).

Inoltre, sono compresi nella definizione di PFAS anche i polimeri nel cui processo di sintesi sono utilizzati uno o più PFAS come monomeri o la cui produzione richiede comunque l'uso di PFAS come additivo (*processing aid*); sono così incluse le sottoclassi dei fluoropolimeri, dei perfluoropolietteri e dei *side-chain fluorinated polymers*, come il PTFE (politetrafluoroetilene, Teflon®) o il PVF (polivinilfluoruro).

In Figura 4 sono riportate due versioni di uno schema generale di classificazione dei PFAS con le principali sottoclassi.

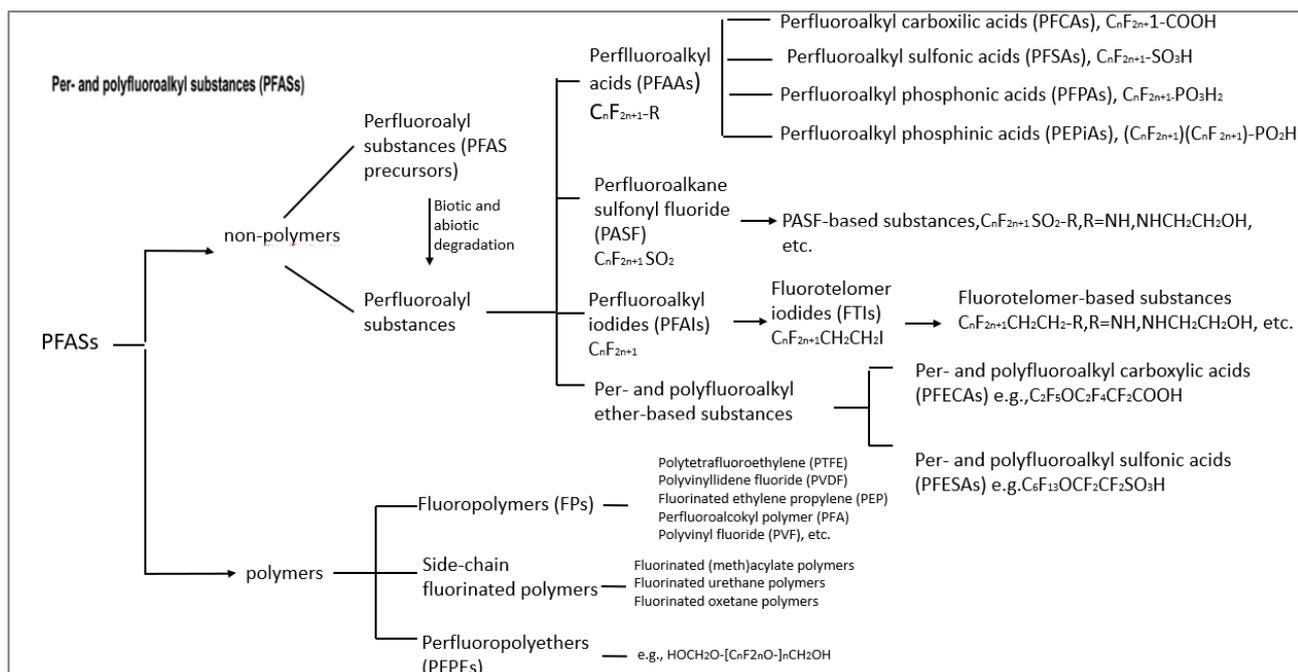


Figura 4 – schema di classificazione dei PFAS

### 1.1.2 I PFAS come contaminanti

La presenza di fluoro organico nel sangue umano è stata rilevata per la prima volta negli anni '60, e i dati relativi a forme specifiche di fluoro organico come PFOS e PA nel siero del sangue umano furono pubblicati nel 1990 (Sunderland et al., 2019). A partire dagli anni '90, la frequenza di rilevamento del PFAS in fluidi e tessuti biologici di esseri umani, pesci, uccelli, mammiferi marini, nonché nelle acque naturali iniziò a crescere rapidamente (Trojanowicz et al., 2018; Lindstrom et al., 2011). Questo sia perché fu possibile iniziare a ricercare estesamente queste sostanze a livello di  $\mu\text{g/L}$  (e, poi,  $\text{ng/L}$ ) solo dopo una sufficiente diffusione delle tecnologie analitiche basate sulla cromatografia liquida accoppiata a spettrometria di massa (LC/MS), sia perché il notevole aumento della produzione di queste sostanze (Paul et al., 2009) si tradusse in un aumento della loro concentrazione in matrici ambientali e biologiche.

Infatti, le proprietà che li rendono così interessanti a livello applicativo sono anche alla base della loro ubiquità, persistenza e resistenza alla degradazione ambientale. Date le peculiari proprietà chimico-fisiche ed il rilascio di queste sostanze dalle sorgenti industriali di produzione e dall' utilizzo dei prodotti commerciali su cui sono stati applicati, i PFAS non sono confinati all'interno dell'antroposfera, e attraverso diversi percorsi entrano nell'ambiente naturale, dove, una volta degradati (eventualmente) a PFAA, non subiscono ulteriori processi di degradazione, con tempi di dimezzamento che possono arrivare alle decine di anni. Sono per questo stati definiti “[...] *an intractable, never-ending chemicals*

*management issue*” (Wang et al., 2017).

I PFAS normalmente monitorati (si veda 1.1.3) sono stati individuati in acque naturali e potabili, suoli, sedimenti, fanghi biologici, acque reflue, aria ((Wen et al., 2019 ; Eschauzier et al., 2013; Hamid and Li, 2016), ma anche nel plankton oceanico e nel siero sanguigno degli orsi polari(Fair and Houde, 2018)(Casal et al., 2017). Infatti, la loro natura di inquinanti organici persistenti (POPs) fa sì che essi possano subire un processo di distillazione globale arrivando ai poli. L’esposizione ai PFAS determina costi elevati per la società, di cui quelli connessi alla salute ammontano da soli a 52-84 miliardi di euro all’anno in Europa (Nordic Council, 2019).

Le emissioni di PFAS nell'ambiente (Figura 5) possono verificarsi in corrispondenza dei siti produttivi, nei siti industriali in cui vengono utilizzati, e in varie fasi di utilizzo e smaltimento di prodotti sia commerciali che industriali (EEA, 2019). L'esposizione umana a PFASs avviene principalmente attraverso l'ingestione di acqua potabile e cibo contaminati, ma anche per inalazione di aria indoor e per il contatto con manufatti trattati con queste sostanze (Sunderland et al., 2019; Jian et al., 2018). I PFAS presenti nei prodotti di consumo, come indumenti, mobili, creme lucidanti e detergenti, possono contaminare polvere e aria, mentre i materiali a contatto con gli alimenti possono contaminare gli alimenti (Nordic Council, 2019; Danish EPA, 2018). Il rilascio accidentale dei PFAS può quindi avvenire direttamente (produzione ed utilizzo di PFAS in ambito industriale) oltre che indirettamente da prodotti di consumo, impianti di trattamento di acque e/o biosolidi, discariche (percolati) (Sinclair, E., Kannan, 2006); la produzione e l’utilizzo di queste sostanze ne costituiscono senza dubbio la fonte principale di contaminazione (Wang et al., 2014; Hu et al., 2016), ed anche le schiume antincendio, nelle cui formulazioni sono presenti PFAS ed utilizzate estesamente nei luoghi dedicati alle esercitazioni antincendio, sono legate alla presenza di numerosi siti contaminati (Bolan et al., 2021). (Cousins et al., 2019) coinvolgendo suolo, acque superficiali e sotterranee nelle immediate circostanze.

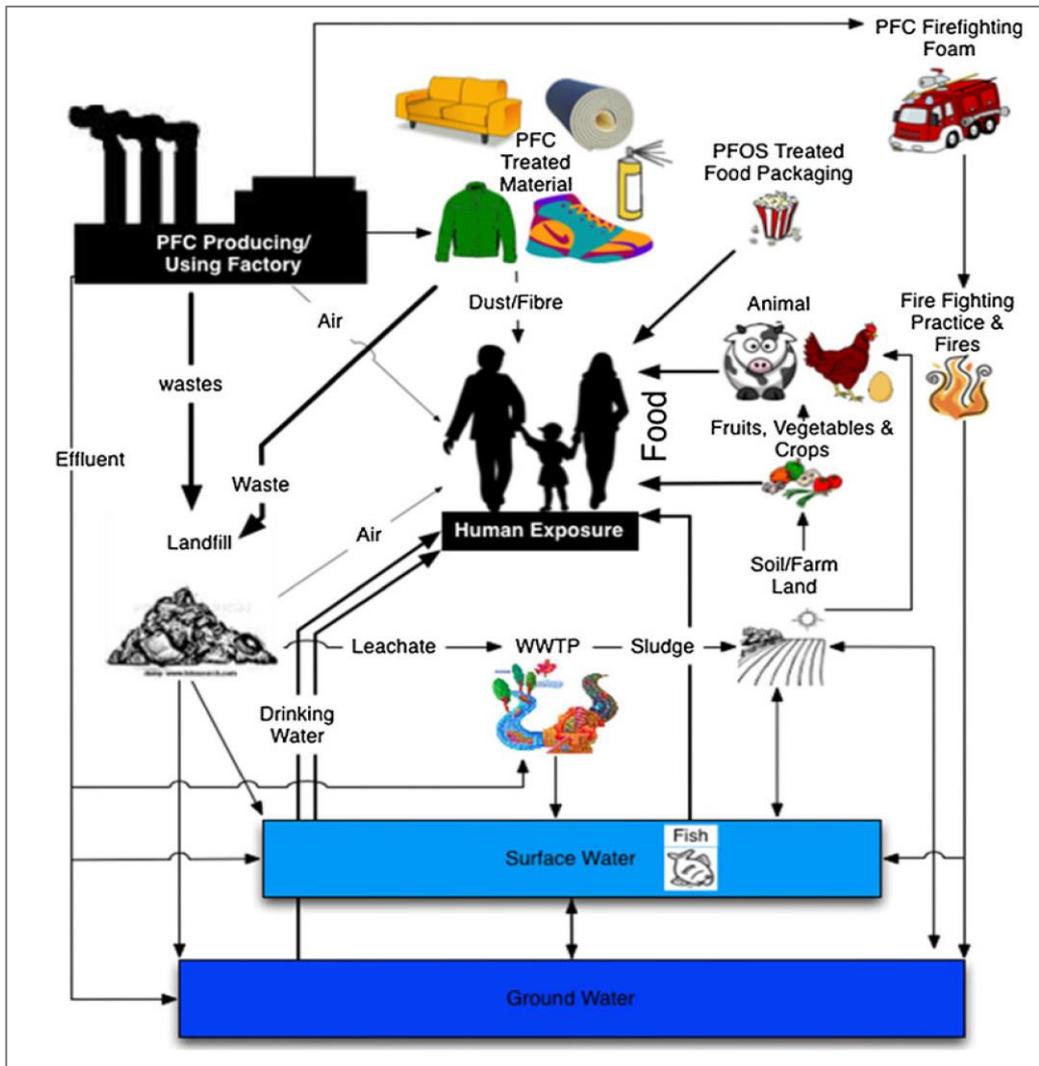


Figura 5 – Sorgenti e percorsi di missione di PFAS in ambiente, e conseguente interazione col biota. (Oliaei et al., 2013)

Per quanto riguarda le concentrazioni nelle altre matrici vengono riportati in Tabella 1 sottostante alcuni valori di concentrazione di acidi perfluoroalchilici frequentemente monitorati. I dati si riferiscono ad aree diversamente urbanizzate ma comunque lontane da hotspots di contaminazione.

Tabella 1- Concentrazioni di diversi acidi perfluoroalchilici (PFAA) in diversi comparti ambientali.

	<b>PFAS</b>	<b>TIPO DI DATO</b>	<b>CONC.</b>	<b>AREA GEOGRAFICA</b>	<b>RIFERIMENTI</b>
<b>U.M.</b>			<b>ng g<sup>-1</sup></b>		
<b>SUOLO</b>	PFBS PFHxA PFHxS PFOA PFOS Σ19PFAS	Mediana	0.04 0.17 0.04 0.21 0.34	Corea del Sud	(Seo et al., 2019)
<b>SEDIMENTO</b>	PFOA PFOS PFPeA PFHxA PFOA PFOS Σ21PFAS	Mediana	0.27 0.54 0.08 0.07 0.06 0.77 2.51	Sedimento di lago, Corea del Sud	(Leea et al., 2020)
<b>ACQUE SUPERFICIALI</b>	PFHxA PFOA PFHxS PFOS Σ4PFAS	Range	8-191 n.d.- 3.21 0.47- 2.23 1.8- 4.57 13 – 200	Fiume Reno (Francia)	(Schmidt et al., 2019)
<b>ACQUE SOTTERRANEE</b>	PFBA PFPeA PFHxA PFOA PFBS Σ23PFAS	Media	2.9 8.2 7.3 1.1 1.3 0.56	Guinea Francese	(Munoz et al., 2017)
<b>ARIA (fase gassosa)</b>	PFPeA PFHxA PFHpA PFOA PFOS Σ21PFAS	Mediana	1.58 3.86 1.01 37 0.34 45.4	Corea del Sud	(Leea et al., 2020)

Dal suolo e dal sedimento tali sostanze possono migrare verso altri comparti ambientali (Brusseau et al., 2020) e fino al biota, e l'affinità verso la fase liquida cresce al diminuire della lunghezza della catena perfluorurata e quindi al diminuire dell'idrofobicità. Per quanto riguarda la matrice aria i PFAS sono stati rilevati sia in fase gassosa che particolata; i PFAA possono essere emessi direttamente oppure formarsi in atmosfera da precursori quali i fluorotelomeri (X:2 FTOH), inoltre (Ellis et al., 2004) riporta che i precursori dei PFAS, come FTOH, possono portare a PFCA in fase gassosa.

I PFAS sono stati rilevati non solo in aree antropizzate, ma anche in zone remote. Ne consegue che il biota, uomo compreso, è ubiquitariamente esposto a concentrazioni ambientali di PFAS che per matrici acquose, ad esempio, possono variare da 1.8 ng L<sup>-1</sup> nelle acque superficiali a 0.56 ng L<sup>-1</sup> nelle acque sotterranee fino a raggiungere negli hotspot di contaminazione 16.6 ng L<sup>-1</sup> nelle acque superficiali e

300 ng L<sup>-1</sup> nelle acque sotterranee (Munoz et al., 2017).

È dimostrato che i PFAS si legano prevalentemente al siero del sangue e non ai grassi corporei, cionondimeno possono distribuirsi in diversi tessuti, organi e apparati (Pérez et al., 2013). Diversi studi tossicologici sui PFAS indicano effetti avversi per la salute umana (Figura 6), tra cui neurotossicità, epatotossicità, genotossicità, immunotossicità, disturbi della tiroide e cancerogenicità (Ojo et al., 2021; Sunderland et al., 2019). PFOS e PFOA, tra i PFAS storicamente più utilizzati e studiati, sono stati classificati come sostanze PBT (Persistenti, Bioaccumulabili e Tossiche).

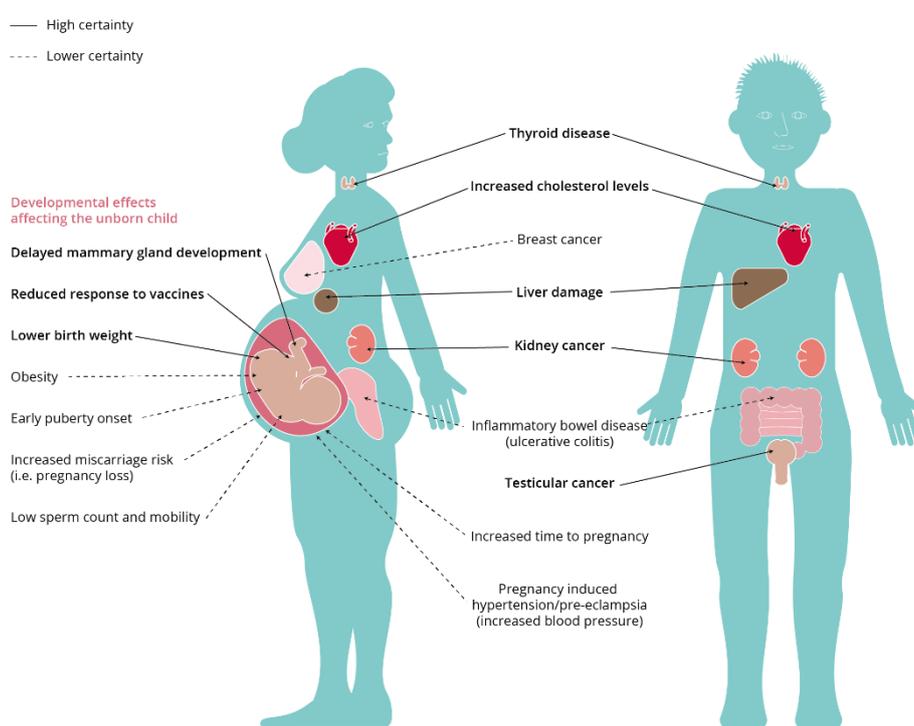


Figura 6- Impatti sulla salute umana dei PFASs. Fonte : (EEA, 2019)

### 1.1.3 Legislazione Europea ed Italiana, restrizioni di produzione e di utilizzo

In conseguenza della maggiore comprensione dei rischi, dell'esposizione ambientale e delle tossicodinamiche legate ai PFAS, a partire dal primo decennio degli anni 2000 si assiste a una progressiva restrizione e regolamentazione di queste sostanze (Scheringer et al., 2014). (Gobelius et al., 2018). PFOS, il cui utilizzo è ora bandito in Europa con alcune eccezioni, è stato inserito nella lista dei POPs nel 2009 (PFOA nel 2019) in seno alla Convenzione di Stoccolma, mentre a partire dal 2013 diversi PFAA sono stati inseriti nella lista di sostanze estremamente preoccupanti (SVHC, *Substances of Very High Concern*) dell'ECHA, inclusi PFOA, PFBS, PFHxS, PFDA, PFNA, APFO, GenX. Negli

Stati Uniti, alcune tra le principali aziende produttrici iniziarono un processo (in parte volontario e in parte guidato dall'EPA) di diminuzione e/o cessazione della produzione di PFOA e PFOS (Gobelius et al., 2018).

A livello legislativo, nei paesi occidentali sono stati normati i principali acidi perfluorocarbossilici e perfluorosulfonici, e così anche in Europa. L'EFSA (*European Food Safety Authority*) ha emanato delle linee guida per il tasso di assimilazione tollerabile (TDI, *tolerable daily intake*) di 150 ng/kg bw e 1.5 µg/kg bw rispettivamente per PFOS e PFOA, aggiornate poi nel 2020 e poste a 4.4 ng/kg bw come dose tollerabile settimanale (TWI) riferita alla somma di PFOA, PFOS, PFNA e PFHxS data la loro rilevanza negli studi epidemiologici sulla presenza di PFAS nel sangue umano (Nordic Council, 2019).

Il Consiglio dell'Unione Europea ha recentemente deciso di adottare un limite di 0.1-0.5 µg/L in acqua potabile come sommatoria di tutti i PFAS eventualmente presenti (intesi come sommatoria di PFCA C4- C13 e PFSA C4-C13) (Council of European Union, 2020).

Sono inoltre stati stabiliti degli standard di qualità ambientale per le acque superficiali per PFOS. In Italia, così come in altri stati membri, in particolare laddove si sono verificati rilevanti episodi di contaminazione ambientale, i limiti sono stati resi più restrittivi e/o estesi ad altri PFAS secondo il D.Lgs. 13 ottobre 2015, n° 172<sup>1</sup> (Gazzetta ufficiale della repubblica italiana, 2016) (Tabella 2), anche per acque sotterranee (Tabella 3, Decreto MATT 06/07/2016<sup>2</sup>) (Gazzetta ufficiale della repubblica italiana, 2016). Non esistono invece al momento limiti allo scarico per questa classe di sostanze.

---

<sup>1</sup> che recepisce la direttiva 2013/39/UE sull'ampliamento dell'elenco delle sostanze prioritarie contenuto nella direttiva 2000/60/CE

<sup>2</sup> "Recepimento Direttiva 2014/80/UE che modifica l'allegato II alla direttiva 2006/18/CE sulla protezione delle acque sotterranee dall'inquinamento e dal deterioramento"

Tabella 2- Standard di qualità ambientale per le acque superficiali in Italia. Fonte: (Commissione europea, 2013).

SOSTANZA	Standard di qualità ambientale (valore medio annuo) (ng/L)		Standard di qualità ambientale (concentrazione massima ammissibile) (ng/L)		Standard di qualità ambientale (µg/L)
	acque superficiali interne (fiumi e laghi)	altre acque di superficie	acque superficiali interne (fiumi e laghi)	altre acque di superficie	Biota (pesci)
PFOS	0.65	0.13	36000	7200	9.1
PFBA	7000	1400	-	-	-
PFPeA	3000	600	-	-	-
PFHxA	1000	200	-	-	-
PFOA	100	20	-	-	-
PFBS	3000	600	-	-	-

Tabella 3- valori soglia dei differenti PFAS nelle acque sotterranee

SOSTANZA	Acque sotterranee	
	Valori soglia (ng L <sup>-1</sup> )	Valori soglia interazione acque superficiali (ng L <sup>-1</sup> )
PFOS	30	0.65
PFBA	-	-
PFPeA	3000	-
PFHxA	1000	-
PFOA	500	100
PFBS	3000	-

L'Unione Europea grazie al regolamento (UE) 2017/1000 del 14 giugno 2017 ha aggiornato il regolamento REACH ponendo dei limiti nella produzione e nell'utilizzo di PFOA, dei suoi sali e delle sostanze correlate: infatti "A partire dal 2020 il PFOA non dovrà più essere prodotto o commercializzato come sostanza in quanto tale e, se utilizzato per la produzione di altre sostanze, miscele o articoli, non dovrà superare la concentrazione di 25 ppb (PFOA e sali) e 1000 ppb (sostanza correlata o combinazione di sostanze correlate al PFOA)" (Gazzetta ufficiale dell'Unione europea, 2017).

### 1.1.1 La rilevanza dei PFAS a catena corta e la “dark matter”

Nonostante il conclamato impatto ambientale e sulla salute umana, è stato ribadito come un abbandono totale di questa classe di sostanze non sia per il momento attuabile: a seconda dell’ambito applicativo, si è evidenziato come non esistano sostanze che riescano a conferire proprietà idro- ed oleorepellenti od un abbassamento della tensione superficiale quanto i PFAS, e come sostanze alternative ai PFAS non siano ancora sufficientemente competitive a livello di mercato (KEMI, 2015).

Perciò, in seguito alle progressive restrizioni e regolamentazioni, si è assistito nel tempo ad un percorso di dismissione di PFAS a catena lunga in favore dell’aumento della produzione di PFAS che contengono catene perfluoroalchiliche più corte (per esempio C6, C4, C2) in quanto meno bioaccumulabili. Inoltre, sono comparsi nel mercato PFAS di nuova generazione (“*novel*” PFAS) in sostituzione dei “legacy” PFAS a catena lunga come PFOA/PFOS, i quali sono caratterizzati da: ciclizzazione o ramificazione molecolare, presenza di ponti ad ossigeno, sostituzione di atomi di fluoro con atomi di idrogeno o alogeni in diversi punti della catena alchilica. In Figura 7 e Figura 8 sono schematicamente illustrati tali cambiamenti strutturali.

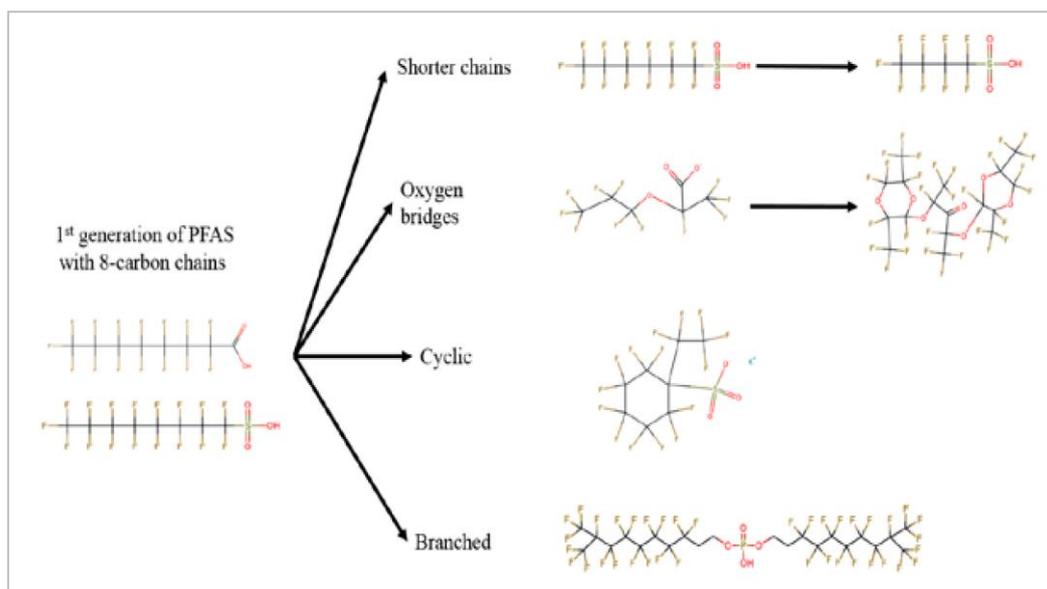


Figura 7- Cambiamenti nella conformazione delle catene perfluorurate (...-CF<sub>2</sub>-...) nei PFAS commercializzati. Fonte: Occurrence and use of highly fluorinated substances and alternatives (KEMI, 2015)

Vi è evidenza di come in conseguenza di questo processo di sostituzione di PFAS di vecchia generazione, a catena lunga, le concentrazioni di questi nel siero del sangue umano stiano diminuendo

(Sunderland et al., 2019; Dassuncao et al., 2018). I PFAS a catena lunga sono infatti, come detto, maggiormente bioaccumulabili. Tuttavia, evidenze epidemiologiche sembrano suggerire un trend opposto ad esempio in Cina (Land et al., 2018), attualmente leader mondiale nella produzione di PFAS. Il quadro legislativo (almeno dei paesi occidentali) e il processo di sostituzione dei PFAS di vecchia generazione hanno generato tuttavia una serie di criticità che inficiano negativamente sulla gestione dei PFAS “*from cradle to grave*”:

- Innanzitutto, i PFAS monitorati a norma di legge comprendono essenzialmente gli acidi perfluoroalchilici (PFAA) e non tengono in considerazione i PFAS di nuova generazione né i precursori dei PFAA. Questo causa una sottostima non indifferente della presenza e concentrazione di tali sostanze nelle matrici ambientali (Jacob et al., 2021), come ad esempio le acque reflue. Spesso, infatti, le concentrazioni dei PFAA in ingresso agli impianti di depurazione risultano minori delle concentrazioni in uscita; ciò è attribuibile, ad esempio, alla conversione di diversi precursori a PFAA, che avviene per mezzo dei processi chimici, fisici e biologici utilizzati per la depurazione delle acque.
- Recenti evidenze scientifiche indicano come i PFAS di nuova generazione siano molto persistenti in ambiente (Pan et al., 2018), e che la rimozione di PFAS a catena corta attraverso adsorbimento e scambio ionico con materiali quali carboni attivi e resine, diffusissime in ambito della depurazione e potabilizzazione delle acque nonché nel risanamento di siti contaminati, sono meno efficaci rispetto a quelli a catena lunga a causa della maggiore idrofilicità dei PFAS “*short-chained*” (Li et al., 2020). Inoltre, sono disponibili poche informazioni sui volumi di produzione, sugli usi, sulle proprietà, sui profili tossicologici ed anche sugli effetti biologici di queste sostanze (European Commission, 2020), almeno rispetto ai PFAS di vecchia generazione.
- In ambito europeo, l’alto numero di PFAS in commercio utilizzati negli stessi campi applicativi fa sì che questi possano essere prodotti individualmente con bassi tonnellaggi, e che quindi non ricadano nell’obbligo di registrazione REACH; inoltre, numerosi PFAS sono polimeri, non ancora soggetti a registrazione al REACH. Questo limita notevolmente le informazioni disponibili sul loro utilizzo (European Commission, 2020). Inoltre, una corretta valutazione dell’esposizione globale a queste sostanze è ulteriormente limitata dal segreto di brevetto (*Confidential Business Information*, CBI) per la quale le aziende non sono obbligate a rivelare informazioni essenziali per l’analisi e l’identificazione dei PFAS, quali la struttura chimica.

## 1.2 Gli impianti di depurazione delle acque reflue: generalità e ruolo nel ricircolo ambientale dei PFAS

### 1.2.1 Gli impianti di depurazione delle acque reflue

Tra le conseguenze dei processi di industrializzazione, urbanizzazione e di crescita esponenziale della popolazione dal secondo dopoguerra, si può certamente annoverare il progressivo peggioramento della qualità dell'acqua, dell'aria e del suolo. In questo contesto, il trattamento delle acque reflue costituisce il mezzo attraverso il quale l'acqua utilizzata per le attività umane viene trattata per migliorarne la qualità fino ad un livello ritenuto accettabile<sup>1</sup>. L'alto carico organico presente generalmente nelle acque reflue risulta ecologicamente incompatibile con le capacità auto depurative dei corpi idrici ricettori (EEA, 2019).

Le acque reflue possono essere di tipo meteorico, domestico (provenienti da attività domestiche e metabolismo umano nonché insediamenti di tipo residenziale) o industriale (ARPALOMBARDIA, 2021) (provenienti da siti con attività commerciali o stabilimenti produttivi, assimilabili talvolta alle acque domestiche se “aventi caratteristiche qualitative equivalenti a quelle domestiche e indicate dalla normativa regionale” e quindi trattabili in un impianto civile<sup>2</sup>).

Un tipico impianto di depurazione delle acque reflue (WWTP, *wastewater treatment plant*) di tipo civile, illustrato in Figura 8, prevede generalmente le seguenti fasi di trattamento:

- Uno o più trattamenti preliminari che hanno lo scopo di allontanare dal liquame i corpi solidi sospesi di maggiori dimensioni (grigliatura), la sabbia ed anche grassi e oli (Oyedun, 2015);
- Un trattamento primario, di tipo chimico-fisico, che ha lo scopo di separare il materiale solido in sospensione riconducibile a sabbie/ghiaie in termini granulometrici e quindi più facilmente sedimentabili al fine di rendere il liquame maggiormente suscettibile all'ossidazione biologica (Bolton and Klein, 1971). Il liquame nelle vasche di sedimentazione primaria viene quindi lasciato decantare permettendo la deposizione della maggior parte dei solidi sul fondo della vasca formando i “fanghi primari”, i quali vengono tipicamente convogliati alla linea fanghi e trattati separatamente; questo processo può essere migliorato con l'aggiunta di sostanze polielettrolitiche per far flocculare il materiale colloidale;
- un trattamento secondario di tipo biologico, in cui l'azione delle comunità di microrganismi in condizioni aerobiche degrada le sostanze organiche contenute nel refluo uscente dai sedimentatori primari. Nei moderni trattamenti biologici è possibile inoltre la rimozione di azoto e fosforo riducendo cioè il carico di nutrienti sulle acque riceventi (Oyedun, 2015). Successivamente il flusso passa alla vasca di sedimentazione finale dove la maggior parte dei

solidi si depositano come “fanghi secondari”, di nuovo tipicamente convogliati alla linea fanghi per ulteriori trattamenti (stabilizzazione);

- un trattamento terziario, di tipo chimico-fisico in cui possono essere presenti diverse combinazioni di trattamenti avanzati (es. ozonazione, clorazione, adsorbimento, osmosi inversa) volti alla rimozione ulteriore di materiale organico e/o alla disinfezione del mezzo acquoso e alla rimozione di inquinanti a concentrazioni molto basse.

In Europa, la legislazione di riferimento che fissa gli obiettivi di qualità ambientale per i corpi ricettori degli effluenti e in generale per le acque naturali sono:

- La direttiva sul trattamento delle acque reflue urbane (91/271/CEE) che mira a proteggere l'ambiente dagli effetti negativi degli scarichi di acque reflue;
- La direttiva quadro sulle acque (2000/60/CE) ha istituito un quadro per la protezione di fiumi, laghi, acque di transizione (estuari), acque costiere e acque freatiche. L'obiettivo è garantire che tutti i corpi idrici superficiali siano in buono stato chimico ed ecologico.

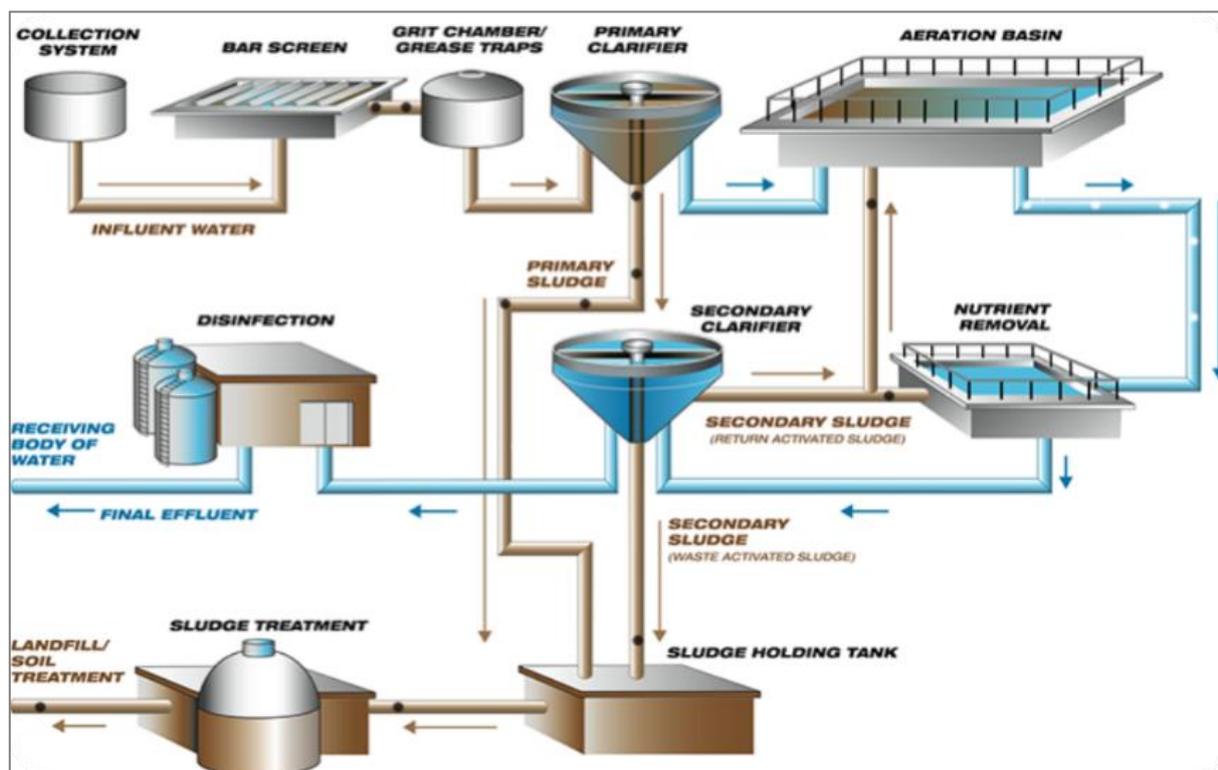


Figura 8 - schema delle fasi per la depurazione delle acque reflue (impianto civile). Fonte: (Mallik et al., 2018)

Con l'affermarsi di limiti allo scarico sempre più stringenti, l'ottimizzazione dei processi di rimozione del carbonio, del fosforo e dell'azoto ha lasciato spazio a più recenti sfide (Figura 9), tra cui la rimozione di inquinanti emergenti come i PFAS. Le risorse idriche nel mondo sono state contaminate nel tempo a causa dell'impatto di scarichi industriali contenenti inquinanti come ad esempio coloranti, metalli pesanti, tensioattivi, pesticidi, farmaci e prodotti per la cura personale (Rashid et al., 2021). Spesso, tali sostanze sono presenti come microinquinanti, la cui compresenza è legata ad altri rilevanti problematiche come l'effetto cocktail e i suoi possibili impatti sulla vita acquatica. Considerando gli elevati volumi delle acque da trattare che giungono ai WWTP non sorprende che questi non sempre siano in grado di smaltire o rimuovere l'alto carico di inquinanti a cui sono sottoposti.

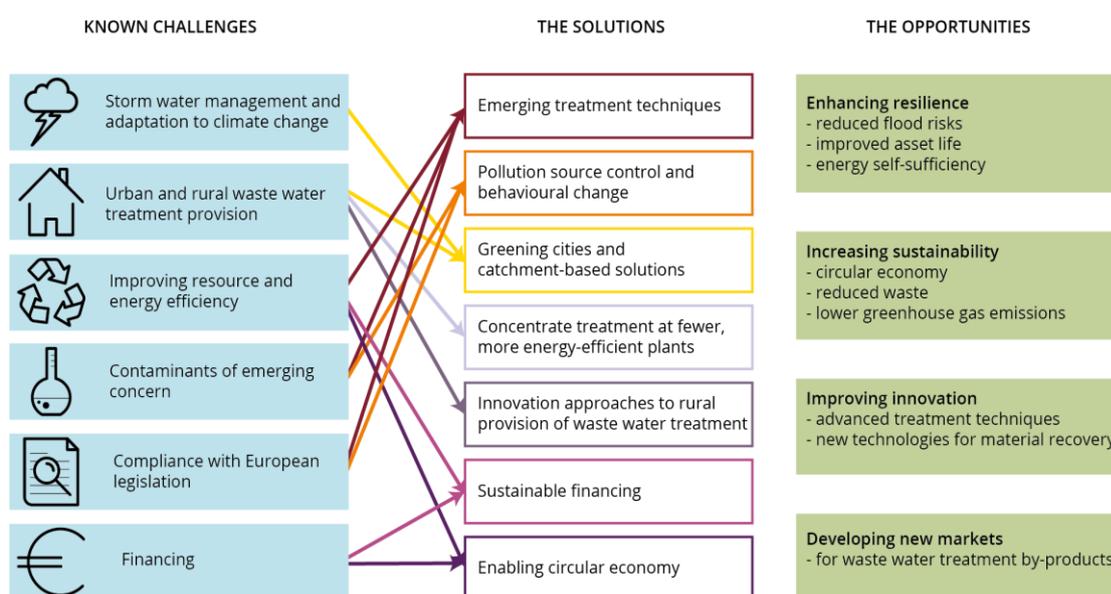


Figura 9 - Sfide, soluzioni e opportunità per gli impianti di trattamento delle acque reflue urbane. (EEA, 2019)

## 1.2.2 I PFAS negli impianti di depurazione acque reflue

### 1.2.2.1 I PFAS nella linea acque

I PFAS vengono spesso rilevati negli influenti e negli effluenti degli impianti di trattamento delle acque reflue (WWTP) a concentrazioni fino a centinaia di ng L<sup>-1</sup> (Arvaniti et al., 2014; Bossi et al., 2008; Stasinakis et al., 2013), impianti che rappresentano di conseguenza importanti sorgenti di immissione in ambiente.

In Tabella 4 sono riportate le concentrazioni di alcuni acidi perfluoroalchilici all'ingresso e all'uscita della linea acque di WWTP civili, ricavati da letteratura. Alcuni analiti singolarmente quantificati sono stati esclusi dall'elenco e sono riportati solo alcuni degli analiti (acidi perfluorocarbossilici e perfluorosolfonici a catena corta e lunga), mentre le sommatorie sono riferite all'intero set di analiti rilevati e quantificati per singolo studio.

Tabella 4- Concentrazioni di PFAS all'ingresso e all'uscita di impianti di trattamento civili. Sono riportati solo alcuni degli analiti (acidi perfluorocarbossilici e perfluorosolfonici a catena corta e lunga), mentre le sommatorie sono riferite all'intero set di analiti

Riferimento	Regione Geografica	PFAS analizzati	LO D	LO Q	IN (range)	OUT (range)	IN (media)	OUT (media)	IN (median)	OUT (median)
(Arvaniti et al., 2012)	Grecia	PFPeA	0.52	1.7	8.4-52.5	3.2-160.3	24.80	55.70		
		PFOA	0.72	2.4	<LOD-6.3	<LOD-12.7	4.20	7.20		
		PFBS	0.11	0.37	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD		
		PFOS	0.18	0.58	1.0-6.3	<LOD-0.45	3.50	0.08		
		∑15PFAA					166.20	70.05		
		∑PFAS					168.50	70.46		
Campo et al., 2014)	Spagna	PFBA			0.04-302	0.04-153	53.70	57.90		
		PFOA			0.04-107	0.04-67.9	22.40	14.90		
		PFBS			0.02-67.0	0.02-305	19.10	57.90		
		PFOS			34.8-109	0.4-283	78.10	91.00		
		∑19PFAA					614.81	566.69		
		∑20PFAS					615.01	566.89		
(Guerra et al., 2014)	Canada	PFBA		0.1-2.62	<LOQ-81.4	<LOQ-89	9.84	9.62	4.84	4.70
		PFOA		0.1-1.04	<LOQ-127	<LOQ-138	11.99	18.50	5.16	11.50
		PFBS		1.9-5.01	<LOQ-42.2	<LOQ-69.2	19.29	24.66	16.50	20.65
		PFOS		1.9-2.51	<LOQ-905	<LOQ-77.21	53.49	77.21	5.08	5.84
		∑12PFAA					175.23	211.77	49.26	68.88
		∑13PFAS					229.73	238.27	103.76	71.48
(Eriksson et al., 2017)	Svezia	PFBA	3.4		n.d.-5.5	8.2-30.1		17.00		
		PFBS	0.06		0.6-3.2	0.9-3.7		1.90		
		PFOA	0.5		2.8-5.1	4.1-5.2				
		PFOS	0.7		0.91-7	1-1.5		1.90		
		∑PFAA			14.8-26.1	24.8-68.9				
		∑PFAS			40.1-87.4	30-77.1				
(Zhou et al., 2019)	Cina	PFBA	0.25	1.25	3.22-56.13	1.47-59.26	23.80	20.24	20.87	16.25
		PFOA	0.03	0.13	1.06-23.68	n.d.-22.56	6.15	6.07	3.68	3.37
		PFBS	0.05	0.13	n.d.-11.97	n.d.-8.04	2.80	2.17	1.91	1.43
		PFOS	0.05	0.13	n.d.-13.61	n.d.14.39	3.43	1.86	2.50	1.11
		∑17PFAA			5.83-142.93	2.06-136.54	46.37	38.53	36.37	28.67

Diversi autori tra cui (Arvaniti et al., 2012), riportano delle concentrazioni maggiori di alcuni acidi perfluoroalchilici all'effluente rispetto alle acque reflue in entrata, indicando quindi la loro possibile

formazione a partire dai precursori polifluoroalchilici durante il trattamento. Inoltre, sovente le concentrazioni a valle dei trattamenti terziari e prima del conferimento non diminuiscono sensibilmente. Ciò è più facilmente osservabile dal grafico della Figura 10, che si riferisce alla distribuzione dei PFAS target in entrata e in uscita da due WWTP situati in Grecia (Arvaniti et al., 2012).

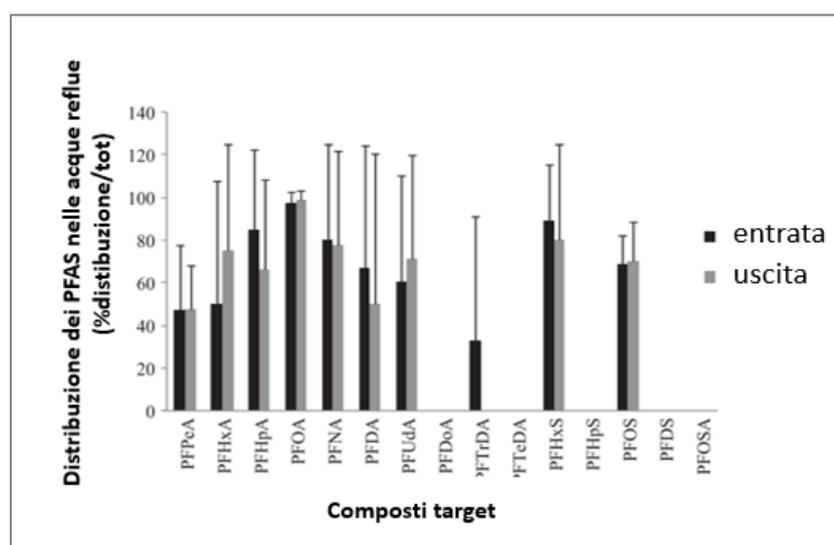


Figura 10 - variazione delle concentrazioni dei diversi PFAS in entrata ed uscita della linea acque di un WWTP civile (Arvaniti et al., 2012)

I PFAS si annoverano così tra le sostanze per le quali le tradizionali metodologie per il trattamento delle acque non risultano sufficientemente adeguate a causa delle loro peculiari proprietà chimico-fisiche e ciò comporta degli ulteriori costi destinati al trattamento di queste sostanze (ENEA, 2020). La tecnologia che viene più frequentemente utilizzata per la rimozione degli inquinanti organici (e quindi anche dei PFAS) è basata sull'uso di materiali adsorbenti, in particolare del carbone attivo granulare (GAC) per il quale però la rimozione degli acidi perfluoroalchilici a catena corta, ma anche di PFAS di nuova generazione come il GenX (M. Ateia, 2019), si è rivelata più difficoltosa richiedendo quindi maggiori tempi di contatto con il GAC per una maggiore efficacia (Rodowa et al., 2020). L'efficacia del filtro GAC è inoltre differente a seconda della lunghezza delle catene carboniose: esso infatti appare una tecnologia adatta per la rimozione dei PFAA a catena lunga ma poco efficace per quelli a catena corta e per alcuni precursori (Ross et al., 2018). Per ottimizzarne l'efficienza sarebbe necessaria una più frequente rigenerazione o sostituzione del materiale, con conseguenti tempi di vita più brevi di questo, e generando un aumento non indifferente dei costi (Belkouteb et al., 2020). È evidente quindi la necessità di sviluppare nuove tecnologie per una rimozione efficiente di PFAS a catena corta e che presentino degli approcci maggiormente sostenibili (Zhang et al., 2019), aspetto che rappresenta un ramo di ricerca molto attivo negli ultimi anni.

### 1.2.2.2 IPFAS nella linea fanghi

Un pressante problema connesso al trattamento delle acque è quello dello smaltimento del fango prodotto dagli impianti (sia provenienti dalla sedimentazione primaria che secondaria), la cui collocazione prevede diverse possibilità sulla base delle caratteristiche qualitative del fango e quindi della loro stabilizzazione: lo spargimento nel terreno, il compostaggio, l'incenerimento, la digestione anaerobica e la messa in discarica. I fanghi contengono infatti elementi nutritivi che ne permettono l'utilizzo come fertilizzanti ed ammendanti ma dall'altra parte possono contenere contaminanti che ne precludono questo impiego.

Negli ultimi 20 anni nell'UE-15, i fanghi di depurazione prodotti dal trattamento delle acque reflue urbane (WWTP) sono passati da 6,5 milioni di t di materia secca a 9,5 milioni di t; nell'UE-28, sono stati prodotti oltre 10 milioni di t di fanghi di depurazione (Collivignarelli et al., 2019). Circa la metà dei fanghi di depurazione prodotti dagli Stati membri dell'UE viene sparsa sul terreno come fertilizzante e un quarto viene incenerito (EEA, 2019; Eureau, 2017). La stabilizzazione dei fanghi è un passaggio importante che permette di rendere questa matrice idonea per l'utilizzo in agricoltura (diminuendo quindi sia la frazione ancora putrescibile che la presenza di patogeni) o per ridurre i volumi ed i successivi costi di smaltimento.

I processi principali attraverso cui il fango viene stabilizzato sono la digestione aerobica o anaerobica, compostaggio, cui si aggiungono sovente fasi di ispessimento e di disidratazione. Le successive vie di smaltimento dipendono principalmente dai quadri normativi nazionali e dalla qualità dei fanghi.

I fanghi possono contenere alte concentrazioni di metalli, patogeni e sostanze inquinanti organiche persistenti, per cui il loro uso sul terreno può essere limitato per proteggere l'ambiente e la salute umana, incidendo di fatto sulla possibilità di riutilizzo dei biosolidi e quindi sulla possibilità di implementare strategie di economia circolare (Venegas et al., 2021).

Tabella 5 - Concentrazioni di PFAS nei biosolidi in uscita da diversi WWTP

PFAS	CONCENTRAZIONE (ng g <sup>-1</sup> )	LOQ e LOD (ng g <sup>-1</sup> )	TIPO DI DATO	NOTE	AREA GEOGRAFICA	AUTORI
PFBS	0.32	LOD (ng g <sup>-1</sup> d,w.): 0.19 LOQ (ng g <sup>-1</sup> d,w.):0.59	MEDIA	Periodo campionamento: 2016	Canada	(Letcher et al., 2020)
PFOS	11.6					
FBSA	0.10					
FOSA	1.90					
<b>Σ22PFAS</b>	43.4					
PFHxA	0.50	/	MEDIA	Valori medi di 14 WWTP Periodo campionamento: Dall'8-8-2014 al 2-12-2014 WRRF Prelievo dopo il processo di calcinazione	Australia	(Gallen et al., 2018)
PFHpA	0.26					
PFNA	1.1					
PFDA	17					
PFOA	6.5					
PFOS	25					
<b>Σ9PFAS</b>	45					
PFPeA	8.27					
PFHxA	7.71					
PFHpA	5.12					
PFOA	23.5					
PFNA	25.1					
PFOS	22.5					
PFDS	5.61					
<b>Σ7PFAS</b>	97.8					
<b>PFBA</b>	0.80	< LOQ -730 (ng/g d.w.) < LOD e 730 (ng g <sup>-1</sup> d.w.)	MEDIA	Valori medi di 19 WWTP Periodo campionamento: 2018	Sud Australia Est Australia	(Moodie et al., 2021)
<b>PFPeA</b>	2.0					
<b>PFHxA</b>	2.8					
<b>PFOA</b>	8.3					
<b>PFOS</b>	23					
<b>6:2 FTSA</b>	0.4					
<b>10:2</b>	0.7					
<b>FTSA</b>	260					
<b>Σ44PFAS</b>						

In questo contesto i PFAS rappresentano sia un possibile rischio per la salute umana che, alla luce di normative sempre più stringenti (Collivignarelli et al., 2019), un problema rilevante per il riutilizzo dei fanghi di depurazione. L'adsorbimento di questa classe di sostanze ai solidi nei fanghi primari e secondari costituisce infatti uno dei principali meccanismi di rimozione dei PFAS nel processo di trattamento delle acque reflue (Arvaniti and Stasinakis, 2015), tanto che sono oggetto di studio dei metodi per estrarre (concentrando) e poi eliminare i PFAS dai fanghi, come ad esempio la liquefazione idrotermica (HTL), (Zhang et al., 2020). Questi autori hanno però evidenziato che l'applicazione di questa tecnologia risulta in una diversa degradabilità di vari PFAS alle condizioni testate (300 °C per 2 ore); gli acidi perfluorosolfonici come PFOS, PFHxS e PFBS sono risultati più recalcitranti rispetto agli acidi perfluorocarbossilici che sono stati completamente degradati al termine delle due ore.

La Tabella 5 mostra le concentrazioni dei PFAS nei biosolidi prodotti dalla stabilizzazione dei fanghi di depurazione nei WWTP. L'interesse nell'indagare i PFAS nei biosolidi deriva dall'utilizzo di questi ultimi come ammendanti, che prevede tipicamente il loro spargimento nel terreno, impiego che potrebbe essere dannoso per l'ecosistema data la presenza di inquinanti organici (Armstrong et al., 2016). La sommatoria dei PFAS considera anche quelli non riportati nella medesima tabella.

L'accumulo dei PFAS nei fanghi può quindi comprometterne il possibile riutilizzo in agricoltura rappresentando una potenziale fonte di contaminazione dei suoli, e quindi indirettamente di altre matrici biotiche e abiotiche, della catena trofica e dell'ambiente in generale (Cordiano et al., 2019) e questo renderebbe utile una legge a livello nazionale che ponga dei limiti in termini di concentrazioni ammissibili prima dello spargimento in agricoltura.

Ad oggi pochi studi hanno focalizzato la loro attenzione sulla degradazione attiva dei PFAS adsorbiti nei fanghi delle acque reflue e la maggior parte delle tecnologie sviluppate per il trattamento in fase acquosa dei PFAS non risultano applicabili a questo contesto (Arvaniti and Stasinakis, 2015).

Per quanto riguarda la conversione in PFAS a partire dai precursori la letteratura riporta informazioni nelle diverse matrici quali suoli aerobici e fanghi attivi (Tabella 6).

*Tabella 6- Alcuni dati sulla degradabilità di alcuni PFAS (precursori di acidi perfluoroalchilici)*

<b>PFAS</b>	<b>MATRICE</b>	<b>PRODOTTI DELLA DEGRADAZIONE E RELATIVA CONVERSIONE %</b>	<b>TEMPO DI DIMEZZAMENTO</b>	<b>RIFERIMENTO BIBLIOGRAFICO</b>
<b>8:2 FTS</b>	Suolo aerobico	PFOA: 1.7 - 4% PFHpA: 0.38 – 0.9% PFHxA: 0.16%	5-28 giorni	(Dasu et al., 2012)
<b>6:2 FTOH</b>	Suolo aerobico	PFHxA: 8.1% PFPeA: 30% PFBA: 1.8%	<2 giorni	(Liu et al., 2010)
<b>8:2 FTAC</b>	Suolo aerobico	PFOA: 0,6-1.7%	3-5 giorni	(Royer et al., 2011)
<b>8:2 FTOH</b>	Fanghi attivi (diluiti)	PFOA: 2%	/	(Liu et al., 2010)
<b>6:2 FTSA</b>	Fanghi attivi (diluiti)	PFBA: 0.14% PFPEA: 1.5% PFHxA; 1.1%	>90 giorni	(Wang et al., 2011)
<b>EtFOSE</b>	Fanghi attivi	PFOS: 7% PFOA: 0.6%	Fino a 3 giorni	(Lange et al., 2000)

Il destino dei contaminanti emergenti all'interno di processi di trattamento di acque reflue e fanghi, dipende dai parametri di processo quali la temperatura, dall'SRT (tempo di ritenzione dei solidi), dalle caratteristiche dei fanghi, dall'adattamento della biomassa e dalla biodisponibilità (Stasinakis, 2012). Il processo di digestione anaerobica è stato molto studiato per definire il destino di alcuni contaminanti emergenti come, ad esempio, i prodotti per la cura personale, i prodotti farmaceutici, gli estrogeni ed i tensioattivi. Durante il trattamento delle acque reflue parte di questi vengono assorbiti nei solidi sospesi e concentrandosi quindi nei fanghi. I diversi parametri operativi hanno delle influenze diverse sulla degradabilità di queste sostanze: ad esempio la temperatura ed il tempo di ritenzione hanno avuto influenza sugli ftalati ma non sui prodotti farmaceutici (Carballa et al., 2006) mentre l'accrescimento della biomassa della popolazione microbica ha favorito la biodegradazione di diclofenac, diazepam ed estrogeni (Carballa et al., 2007). Ciò indica quando la corretta regolazione di questi parametri a seconda delle esigenze degradative dei diversi composti sia un aspetto da non sottovalutare nei digestori anaerobici.

Infatti, alcuni PFAS potrebbero essere concentrati nei rifiuti solidi (come i fanghi di depurazione) durante il processo di trattamento delle acque reflue (ITRC, 2018) e, più nel dettaglio (Ebrahimi et al., 2021a), la ripartizione dei PFAS nei fanghi di depurazione dipende dal tipo di fango e di conseguenza dalla sua composizione.

### 1.3 La digestione anaerobica

Uno dei metodi impiegati nel trattamento/stabilizzazione dei fanghi provenienti dalla depurazione delle acque reflue è quello della digestione anaerobica, ovvero un processo che si basa su un biologico attraverso cui la sostanza organica viene degradata in assenza di ossigeno molecolare ( $O_2$ ) o legato ad altri elementi, come i nitrati ( $NO_2^-$ ,  $NO_3^-$ ), ad opera di numerosi ceppi batterici che vivono in sintrofia. I prodotti principali sono il biogas, composto in media dal 65% di metano ( $CH_4$ ) e dal 35% di anidride carbonica ( $CO_2$ ), e il digestato (Kelleher et al., 2002).

Qui di seguito è illustrata la reazione esotermica (eq. 1) che a partire dalla materia organica in condizioni anaerobiche porta alla formazione della biomassa ed altri prodotti:



Il processo attraverso cui i batteri anaerobici decompongono la materia organica producendo biometano, anidride carbonica e fanghi ricchi di sostanze nutritive è reso possibile grazie ad una sequenza ben precisa di reazioni con un'azione cooperativa degli organismi che vi partecipano (Tabatabaei et al., 2010) le quali possono essere distinte in quattro fasi: idrolitica, acidogenica, acetogenica metanogenica. Nella prima fase grazie all'azione dei batteri idrolitici avviene la degradazione di substrati organici complessi particolati o solubili (proteine, grassi e carboidrati) con formazione di composti organici semplici (aminoacidi, acidi grassi a catena lunga e monosaccaridi in forma solubile) (Cecchi et al., 2005). Successivamente nella fase acidogenica vengono convertite le molecole organiche semplici in acidi grassi volatili (acido formico, acetico, propionico, butirrico etc),alcoli e chetoni da parte dei batteri acidogenici (Cheah and Dosta, 2018), con produzione di sottoprodotti quali ammoniaca, biossido di carbonio e acido solfidrico; successivamente, nella terza fase, ovvero quella acetogenica, le molecole organiche del precedente stadio (ovvero gli acidi grassi) vengono ulteriormente digerite a biossido di carbonio, idrogeno, acido acetico e acido formico. L'ultima fase, quella metanigena, viene definita limitante in termini di velocità del processo (Tabatabaei et al., 2010) ed avviene attraverso due differenti vie metaboliche: la via idrogenotrofa, in cui i metanogeni idrogenotrofi generano metano e acqua a partire da idrogeno molecolare e biossido di carbonio (Eq. 2), e la via acetoclastica, in cui metanogeni acetoclastici producono metano e biossido di carbonio tramite la dismutazione dell'acido acetico (eq. 3), e che costituisce il meccanismo preponderante per la produzione di metano (Cecchi et al., 2005). Le diverse fasi del processo di digestione anaerobica sono illustrate in Figura 12.



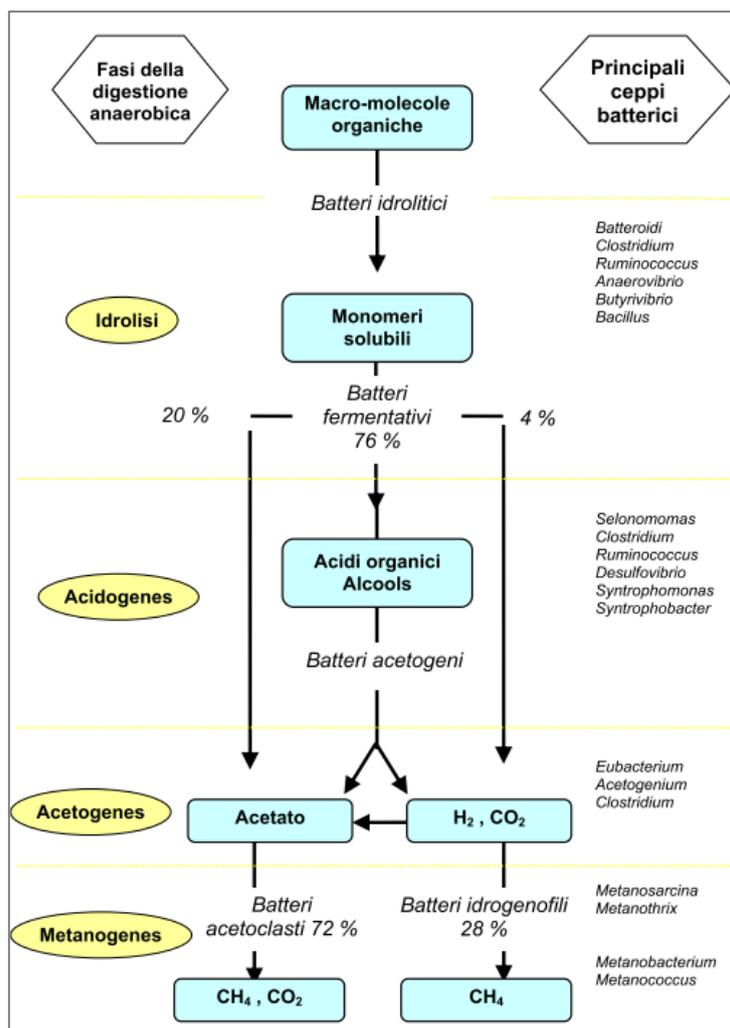


Figura 11 - schema generale del processo di digestione anaerobica (Cecchi et al., 2005)

Il processo della digestione anaerobica viene utilizzato in tutto il mondo per il trattamento dei rifiuti industriali, agricoli e urbani grazie ai vantaggi che ne derivano come una bassa produzione di fanghi, un basso fabbisogno energetico e soprattutto un possibile recupero energetico (De Baere, 2008). Il metano prodotto da questo processo infatti, oltre a coprire parzialmente o totalmente il fabbisogno energetico di un impianto di depurazione, può essere utilizzato come combustibile per caldaie, come sostituto del gas naturale o dell'olio combustibile e per produrre elettricità ad uso aziendale o per la vendita alle società elettriche (Kelleher et al., 2002) permettendo quindi alle aziende di migliorare i processi produttivi in un'ottica di economia circolare.

Poco ancora è stato approfondito in merito ai meccanismi di interazione tra i PFAS ed i fanghi nel processo di digestione anaerobica e, nello specifico, in merito alle costanti di ripartizione solido-liquido. Questo permetterebbe di comprendere, in modo preliminare, il destino dei PFAS ed il loro bilancio di massa nei WWTP. Infatti, i valori delle  $K_d$  (costante di ripartizione) dei PFAS suggeriscono la tendenza di alcuni di questi composti a ripartirsi nella fase solida dei fanghi; sono però necessari

ulteriori studi per meglio definirne le caratteristiche e ed il destino nel processo di stabilizzazione anaerobica (Li et al., 2021).

Altra tematica largamente sconosciuta nell'ambito della digestione anaerobica riguarda, come accennato in precedenza, la generazione dei PFAA a partire dai precursori a causa di specifiche attività enzimatiche in anaerobiosi, problematica che però non sembra riguardare i PFAA a catena lunga (>8C) (Li et al., 2021).

### 1.3.1 Condizioni operative e parametri di stabilità nella digestione anaerobica

Per un corretto funzionamento del digestore anaerobico e quindi per la migliore efficienza ottenibile da questo processo vi sono alcuni parametri che necessitano di essere monitorati e che definiscono i tempi di permanenza della massa nel digestore, la concentrazione dei microrganismi ed anche la produzione del biogas in base al volume del digestore ed alle caratteristiche del substrato in uso (Cecchi et al., 2005).

#### 1) **Parametri di gestione del reattore**

Il substrato viene tipicamente caratterizzato attraverso i seguenti parametri che costituiscono una misura della quantità di composti biodegradabili presenti nel campione, ossia 1) i solidi totali (TS) ed i solidi volatili totali (TVS), 2) la domanda chimica di ossigeno (COD) o 3) la domanda biologica di ossigeno a cinque giorni (BOD<sub>5</sub>).

- TS: rappresentano il contenuto in sostanza secca di un campione dopo un essicamento in stufa per 24 ore a 105 °C. Questo dato rappresenta l'insieme della frazione organica e quella inerte del substrato.
- TVS: ovvero la frazione che corrisponde alla frazione di sostanza secca che risulta volatilizzata per combustione a 550 °C fino a peso costante e rappresenta, ancora una volta in via approssimativa, la frazione organica della sostanza secca. Se precedentemente filtrati attraverso un filtro a 0.45 µm, TS e TVS sono riferibili alla frazione non strutturata della materia organica (la classe dimensionale delle cellule viene esclusa).
- COD: ossia la quantità di ossigeno consumato per l'ossidazione della sostanza organica.
- BOD<sub>5</sub>: quantità di ossigeno consumata in 5 giorni per l'ossidazione biologica della sostanza organica contenuta nel campione.

In base all'unità di misura/metodologia scelta per definire le concentrazioni di composti biodegradabili, si potranno poi definire i parametri di gestione del processo; vengono in seguito

riportati quelli utilizzati nelle sperimentazioni di questa tesi.

- Tempo di residenza idraulico (HRT):

viene definito come il rapporto tra il volume ( $V$ ,  $m^3$ ) del reattore considerato e la portata di alimentazione al reattore ( $Q$ ,  $m^3/d$ ) (eq.4) (Cecchi et al., 2005). Fornisce informazioni sulla quantità di tempo in cui il substrato permane nel reattore. L'HRT del digestore in esame è di 20 giorni: ciò significa che sono necessari 20 giorni affinché l'alimentazione con il fango sostituisca tutto il volume del digestore. Il sistema viene considerato a stabilità se questa viene mantenuta per almeno tre HRT, ma è comunque necessaria una valutazione della stabilità dei dati nel tempo.

$$HRT = \frac{V}{Q} \quad [\text{giorni}] \quad \text{eq.4}$$

Dove:

$Q$  = portata in ingresso al digestore ( $m^3$  /giorno);

$V$  = volume del reattore ( $m^3$ );

- Carico organico volumetrico (OLR): permette di definire la quantità di substrato inserita quotidianamente nel digestore con la sua alimentazione (eq. 5). Viene solitamente calcolato sul volume utile del reattore e può essere riferito a parametri come TS, TVS, COD e BOD i quali esprimono la concentrazione di substrato organico (Cecchi et al., 2005). Per queste analisi è stato deciso di utilizzare TVS.

$$OLR = \frac{Q * S}{V} \quad [\text{kgTVS}/m^3 \text{ reatt} * \text{giorni}] \quad \text{eq.5}$$

Dove:

OLR = fattore di carico volumetrico in termini di substrato riferito al volume del reattore ( $kgSV/m^3 \text{ reatt} * d$ )

$Q$  = portata influente ( $m^3/d$ )

$S$  = concentrazione di substrato nella portata influente ( $kg/m^3$ )

$V$  = volume del reattore ( $m^3$ )

- Produzione specifica di gas (SGP)

È un parametro utilizzato per stimare le rese dei processi di digestione anaerobica ed è strettamente correlato alla degradabilità del substrato (Cecchi et al., 2005). Definisce la quantità di biogas prodotta per quantità di sostanza volatile alimentata al reattore (eq. 6).

$$SGP = \frac{Q_{\text{biogas}}}{Q \cdot S} \quad [\text{m}^3 \text{ biogas/kg substrato alimentato}] \quad \text{eq.6}$$

$Q_{\text{biogas}}$  = portata di biogas prodotto, [ $\text{m}^3/\text{giorno}$ ]

$Q$  = portata influente [ $\text{m}^3/\text{giorno}$ ]

$S$  = concentrazione di substrato nella portata influente, [ $\text{kg substrato}/\text{m}^3$ ].

- Produzione specifica di metano (SMP)

È un calcolo molto simile a quello dell'SGP se non per il fatto che per la misura dell'SMP viene considerato il solo volume di metano.

Il mantenimento delle condizioni di stabilità nel processo di digestione anaerobica gioca un ruolo di fondamentale importanza dato dal fatto che i microorganismi metanigeni, protagonisti della fase che controlla l'intero processo, risultano particolarmente sensibili alle variazioni ambientali che subisce il mezzo di reazione (Cecchi et al., 2005).

I parametri di stabilità che vengono riportati in seguito permettono di diagnosticare eventuali discostamenti del sistema da una condizione di equilibrio. Tuttavia, questo è possibile solo monitorando e valutando i parametri in maniera integrata: la variazione di un singolo parametro non fornisce informazioni affidabili sull'andamento del processo.

- pH: il cui valore è influenzato dalla presenza di  $\text{CO}_2$ , ammoniaca ed AGV nel liquido ed associato ad una condizione di stabilità quando compreso, generalmente, tra 6.5 e 7.5. La sua variazione è correlata all'equilibrio tra i microrganismi sintrofici che partecipano al processo e alla capacità tampone del sistema. Il discostamento del pH dai valori di equilibrio avviene con un ritardo temporale rispetto alla variazione della concentrazione di  $\text{CO}_2$ , ammoniaca ed AGV nel liquido, ovvero solo quando il bicarbonato ha esaurito le sue capacità tamponanti e per questo come detto in precedenza richiede la valutazione degli altri parametri.
- Alcalinità: viene definita come la capacità di un sistema di neutralizzare gli ioni  $\text{H}^+$  e si esprime solitamente come concentrazione di carbonato di calcio; la capacità tampone è data in prima approssimazione dallo ione bicarbonato fino a  $\text{pH} \sim 6$  e dagli acidi grassi volatili (AGV) prodotti dalla degradazione della materia organica fino a  $\text{pH} \sim 4$ . Il delta di alcalinità tra  $\text{pH} 4$  e  $6$  è quindi indicativo della variazione nella concentrazione di AGV nel mezzo: maggiore è il volume necessario, maggiore è la quantità di acidi grassi volatili presenti nel digestato (che in condizioni di equilibrio dovrebbe rimanere costante).

- acidi grassi volatili (AGV): È un parametro importante perché la quantità di AGV dipende dalla quantità e dalla qualità del materiale introdotto nel digestore anaerobico ed anche dal rapporto tra batteri acidogeni e metanigeni. Il rapporto tra gli acidi grassi volatili e l'alcalinità permette di determinare l'allontanamento del sistema dalla stabilità in tempi più brevi rispetto al pH: in questi casi si verifica un aumento degli AGV e una diminuzione dell'alcalinità parziale.
- Ammoniaca: ne viene misurata la concentrazione in quanto, se elevata, può inibire la crescita batterica di acidogeni e metanigeni a causa della sua azione tossica (Van Velsen, 1979). Un aumento della concentrazione può essere riconducibile alla degradazione da parte dei batteri. D'altro canto, la sua azione tamponante che permette di compensare un aumento di AGV diventando ione ammonio gioca un ruolo importante nella stabilità del pH.
- Composizione del biogas: la misura della composizione riporta le percentuali con cui sono presenti i diversi gas quali CH<sub>4</sub>, CO<sub>2</sub>, O<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>S. Ad esempio, un aumento della percentuale di CO<sub>2</sub> accompagnata dalla diminuzione della percentuale di CH<sub>4</sub> può essere indicatore dell'inibizione dei metanigeni dovuto ad un accumulo di VFA nel mezzo.
- Produzione di biogas: come la composizione deve risultare costante in condizioni di stabilità
- Temperatura: avendo un'influenza diretta sull'attività e speciazione delle popolazioni microbiche questo parametro è di fondamentale importanza. Una sua variazione in un certo intervallo determina infatti una variazione nelle velocità di reazione (CECCHI et al., 1991).  
Nei digestori anaerobici solitamente si hanno tre intervalli di temperatura di riferimento rispetto alla quale è possibile mantenere il processo stabile: mesofilo (25°C < T < 40°C), termofilo (45 < T < 60 °C) e psicrofilo (T < 25°C). Essendo la digestione anaerobica un processo endotermico è necessario che al digestore sia fornito calore affinché la temperatura venga mantenuta stabile.

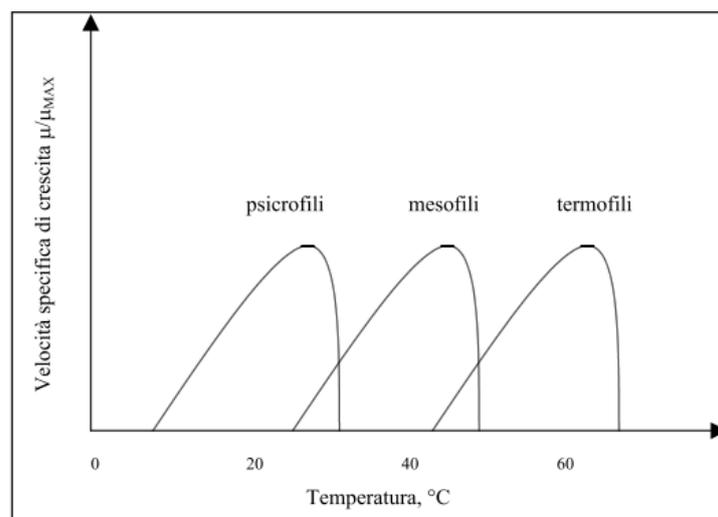


Figura 12 - velocità specifica di crescita nei diversi range termici (Cecchi et al., 2005)

## **1.4 Scopo del lavoro di tesi**

Considerate le numerose lacune circa gli effetti ed il destino dei PFAS nei processi di digestione anaerobica la presente tesi si prefigge i seguenti obiettivi:

- 1) determinare, attraverso i test di biometanazione, l'effetto di alcuni PFAS preventivamente identificati sulla produzione di biogas nel trattamento di digestione anaerobica di fanghi secondari, al variare della concentrazione;
- 2) determinare la costante di ripartizione dei PFAS selezionati tra la fase solida e quella liquida.

I risultati delle sperimentazioni permetteranno di definire i parametri di processo applicabili in un sistema di digestione anaerobica in semicontinuo.

## 2. Materiali e metodi

### 2.1 Test di biometanazione

Per il raggiungimento degli obiettivi è stata predisposta una sperimentazione in batch utilizzando il setup tipico degli esperimenti per la stima del potenziale di biometanazione (BMP, *Biochemical Methane Potential*) di un substrato.

Il test BMP prevede l'incubazione in bottiglie di vetro di un inoculo contenente una cultura mista di microorganismi anaerobici, posta a temperatura controllata (tipicamente mesofilia o termofilia), a cui viene aggiunto un substrato che i microorganismi utilizzano come fonte di energia (Raposo et al., 2011) (Figura 12 e Figura 14). La degradabilità del substrato viene determinata a partire dalla produzione di biogas, misurata nel tempo (Raposo et al., 2011; Angelidaki et al., 2009). I test BMP possono essere utilizzati anche per definire la stabilità biologica di un fango per un eventuale uso a fini agricoli o per il conferimento in discarica (Fricke et al., 2005).

In questo lavoro di tesi sono stati utilizzati come inoculo e substrato rispettivamente digestato anaerobico e fango secondario entrambi provenienti da un impianto di depurazione delle acque reflue della provincia di Venezia. La caratterizzazione completa dei substrati e inoculi utilizzati è riportata in Tabella 11. In vista di un futuro scale-up dei test in batch è stato inoltre avviato un reattore anaerobico lab-scale alimentato con le stesse matrici utilizzate per i test in batch (si veda paragrafo 2.4).



Figura 13 - Schema di un vessel per test di biometanazione (modificato da Angelidaki et al., 2009)

Vista l'ubiquità dei PFAS e la loro capacità di assorbimento in diversi materiali, tra cui vetro, plastiche fluorurate, ecc., i materiali per la preparazione dell'esperimento, conservazione dei campioni e soprattutto per l'analisi, sono stati attentamente scelti prediligendo, ove possibile, materiali a base di polipropilene ad alta densità (HD-PP) che sono stati successivamente decontaminati con metanolo.

Sono state sperimentate e comparate tre condizioni al netto della produzione endogena di biogas indicata da bianchi sperimentali riempiti con il solo inoculo. Il valore di biogas prodotto dai bianchi sperimentali è stato sottratto a quello delle tre condizioni analizzate nell'esperimento, ossia:

- La condizione contenente inoculo e substrato (nominata "I+S") con tre repliche;
- La condizione "PFAS1", in cui nelle 4 bottiglie (4 repliche) sono stati aggiunti PFAS alla concentrazione di  $1 \text{ mg L}^{-1}$  per singola sostanza;
- La condizione "PFAS10", che similmente ha previsto 4 repliche ma dove i singoli PFAS sono stati aggiunti alla concentrazione di  $10 \text{ mg L}^{-1}$ .

Le 4 bottiglie relative alle due condizioni inoculate con PFAS a concentrazione nota sono state aperte dopo 5, 10, 15 e 20 giorni dall'inizio della sperimentazione e sono stati prelevati campioni per determinare la ripartizione dei PFAS tra la componente solida e quella liquida, separate mediante centrifugazione e analizzate con tecniche cromatografiche. È stata effettuata inoltre una misurazione volumetrica del biogas prodotto con una frequenza quotidiana nei primi giorni di analisi che è stata poi ridotta al diminuire del volume di biogas prodotto dalle bottiglie. Infine, è stata misurata la variazione della composizione del biogas per le diverse condizioni mediante un analizzatore portatile di biogas. Considerando l'assenza di un confronto in letteratura, la durata dei test è stata impostata a 20 giorni, tempo sufficiente per completare la degradazione di un fango secondario. I tempi di campionamento sono stati definiti ogni 5 giorni, a copertura dell'intero periodo.

Nello specifico sono stati condotti tre serie di test BMP, in cui sono stati testati i seguenti PFAS:

1. PFOA per il primo test BMP, dove sono state utilizzate le condizioni "I+S", "PFAS1" e "PFAS10"
2. PFOS + PFBS + PFBA anch'esso nelle condizioni "I+S", "PFAS1" (totale  $3 \text{ mg L}^{-1}$ ) e "PFAS10" (totale  $30 \text{ mg L}^{-1}$ )
3. PFOS + PFBS + PFBA nelle sole condizioni "I+S" e PFAS1" (totale  $3 \text{ mg L}^{-1}$ )

Nel secondo test è stato fatto un errore nell'aggiunta PFOS alla concentrazione di  $1 \text{ mg L}^{-1}$  e ciò ha

reso necessario un terzo test sulla sola concentrazione errata.

La scelta di questi PFAS avviene alla luce della regolamentazione dei PFAA e della dismissione di PFAS a catena lunga in favore dell'aumento della produzione di PFAS con catene alchiliche più corte e alla rilevanza di tali molecole in termini di abbondanza relativa e frequenza di rilevamento in campioni ambientali. Le concentrazioni di 1 e 10 mg L<sup>-1</sup> sono invece state scelte per evidenziare eventuali effetti inibitori sugli organismi; il metodo analitico, infatti, doveva ancora essere sviluppato al momento della scelta.

Per i test BMP sono state utilizzate bottiglie da siero (V<sub>totale</sub>=1 L, V utilizzato= 0,3 L nella prima sperimentazione con PFOA e 0,4 L nelle due successive sperimentazioni) chiuse ermeticamente con tappi di butile e ghiera di alluminio. Ogni bottiglia è stata nominata come "PFAS<sub>x</sub>:y" dove "x" si riferisce alla concentrazione dei PFAS mentre "y" al giorno di apertura della bottiglia.

Per ogni test è stata misurata la produzione di biogas di un bianco costituito dal solo inoculo (condizione "B"), condotto in duplice copia, per poter rilevare la produzione endogena di metano.

La condizione "A" ha previsto tre repliche contenenti sia inoculo che substrato che hanno quindi lo scopo di simulare le condizioni di un digestore in WWTP civile, ovvero con il fango secondario proveniente dai chiarificatori secondari. L'ultima condizione ha previsto l'aggiunta di inoculo e substrato e solo successivamente sotto cappa vi è stata l'aggiunta dei PFAS nelle repliche effettuate.

Ciascuna bottiglia è stata flussata con azoto gassoso (N<sub>2</sub>) per 2,5 minuti con lo scopo di rimuovere quanto più ossigeno possibile prima di iniziare la sperimentazione.

Un parametro di fondamentale importanza nella fase di preparazione dei BMP per qualunque tipo di substrato è il rapporto *food/microorganisms* (F/M) (eq. 7), definito come il rapporto tra il substrato fornito e i microrganismi contenuti nell'inoculo, il cui valore ha una diretta influenza sulla possibilità di inibizione dovuta ad un eccesso di substrato qualora il rapporto non risulti ≤0.5 (García et al., 2019): la sua importanza è data quindi una diretta influenza nella produzione volumetrica del biogas (Neves et al., 2004).

$$F/M = \frac{\text{g substrato} \cdot \text{g VS/g substrato}}{\text{L inoculo} \cdot \text{g VS/L inoculo}} \quad \text{eq.7}$$

I test sono stati condotti nelle condizioni illustrate nella Tabella 7 e Tabella 8, con un rapporto F/M pari a 0.3 e la concentrazione effettiva di PFOA e PFAS (inteso come sommatoria dei 3 PFAS utilizzati) indicati per ciascuna bottiglia.

Tabella 7 – dati PFOA reali per ciascuna bottiglia

CONDIZIONE	Nome e n° bottiglia	Volume inoculo	Massa substrato	Rapporto F/M	OL	Concentrazione effettiva PFOA	Giorni di apertura bottiglie
		mL	g		kgTVS/m <sup>3</sup>	mg L <sup>-1</sup>	
<b>B</b>	B1	300	0	0	0	-	20
	B2	300	0	0	0	-	20
<b>I+S (inoculo + substrato)</b>	A1	300	89.15	0.33	6.55	-	20
	A2	300	91.67	0.34	6.55	-	20
	A3	300	90.91	0.34	6.55	-	20
<b>Inoculo + substrato + PFOA (1 mg L<sup>-1</sup>)</b>	PFOA 1:5	300	91.09	0.34	6.60	0.99	5
	PFOA 1:10	300	92.17	0.34	6.60	0.99	10
	PFOA 1:15	300	92.18	0.34	6.60	0.99	15
	PFOA 1:20	300	89.72	0.33	6.60	1.0	20
<b>Inoculo + substrato + PFOA (10 mg L<sup>-1</sup>)</b>	PFOA 10:5	300	91.12	0.34	6.55	9.92	5
	PFOA 10:10	300	90.57	0.34	6.55	9.93	10
	PFOA 10:15	300	90.95	0.34	6.55	9.93	15
	PFOA 10:20	300	89.76	0.34	6.55	10.00	20

Tabella 8 - dati PFOS + PFBA + PFBS reali per ciascuna bottiglia primo test

CONDIZIONE	Nome e n° bottiglia	Volume inoculo	Massa substrato	Rapporto F/M	OL	Conc. effettiva PFOS	Conc. effettiva PFBA	Conc. Effettiva PFBS	Giorni di apertura bottiglie
		mL	g		kgTVS/m <sup>3</sup>	mg L <sup>-1</sup>	mg L <sup>-1</sup>	mg L <sup>-1</sup>	
<b>B</b>	B1	400	0	0.30	0	-	-	-	20
	B2	400	0	0.30	0	-	-	-	20
<b>I+S (inoculo + substrato)</b>	A1	400	118.12	0.30	6.35	-	-	-	20
	A2	400	116.00	0.30	6.35	-	-	-	20
	A3	400	117.52	0.30	6.35	-	-	-	20
<b>Inoculo + substrato + PFAS (1 mg L<sup>-1</sup>)</b>	PFAS 1:5	400	118.15	0.30	6.35	0.99	0.99	1.00	5
	PFAS 1:10	400	117.87	0.30	6.35	0.99	0.99	1.00	10
	PFAS 1:15	400	115.96	0.30	6.35	1.00	1.08	0.99	15
	PFAS 1:20	400	116.54	0.30	6.35	1.00	1.00	1.00	20
<b>Inoculo + substrato + PFAS (10 mg L<sup>-1</sup>)</b>	PFAS 10:5	400	117.20	0.30	6.41	9.96	9.98	9.98	5
	PFAS 10:10	400	118.54	0.30	6.41	9.93	9.95	9.95	10
	PFAS 10:15	400	119.21	0.31	6.41	9.92	9.94	9.94	15
	PFAS 10:20	400	118.21	0.30	6.41	9.94	9.96	9.96	20

Tabella 9 - dati PFOS + PFBA + PFBS reali per ciascuna bottiglia secondo test

CONDIZIONE	Nome e n° bottiglia	Volume inoculo	Massa substrato	Rapporto F/M	OL	Concentrazione effettiva PFOS	Concentrazione effettiva PFBA	Concentrazione effettiva PFBS	Giorni di apertura bottiglie
		mL	g		kgTVS/m <sup>3</sup>	mg L <sup>-1</sup>	mg L <sup>-1</sup>	mg L <sup>-1</sup>	
<b>B</b>	B1	400	0	0.30	0	-	-	-	20
	B2	400	0	0.30	0	-	-	-	20
<b>I+S (inoculo + substrato)</b>	A1	400	83.67	0.30	4.54	-	-	-	20
	A2	400	83.75	0.30	4.54	-	-	-	20
	A3	400	83.75	0.30	4.54	-	-	-	20
<b>Inoculo + substrato + PFAS (1 mg L<sup>-1</sup>)</b>	PFAS 1:5	400	83.75	0.30	4.54	0.99	0.99	1.00	5
	PFAS 1:10	400	83.66	0.30	4.54	0.99	1.00	1.00	10
	PFAS 1:15	400	83.66	0.30	4.54	1.00	1.00	1.00	15
	PFAS 1:20	400	83.65	0.30	4.54	1.00	1.00	1.00	20

### 2.1.1 Campionamento, quantificazione e analisi della composizione del biogas:

La Figura 14 riporta la strumentazione necessaria per la misurazione volumetrica del biogas accumulato all'interno delle bottiglie BMP (metodo dei vasi comunicanti).

L'acqua contenuta nel cilindro è acidificata con HCl 0.1 N per evitare la solubilizzazione della CO<sub>2</sub>. Il gas dal cilindro viene poi trasferito nelle gas bags (Figura 14 e Figura 16) per misurarne la composizione con l'analizzatore di biogas (Figura 15). La misurazione volumetrica è stata eseguita quotidianamente nella prima settimana, poi ad intervalli maggiori al diminuire della produzione di biogas, così da ottenere un volume sufficiente che permettesse la misurazione della composizione del biogas.



Figura 14- raccolta del biogas e sua misurazione volumetrica

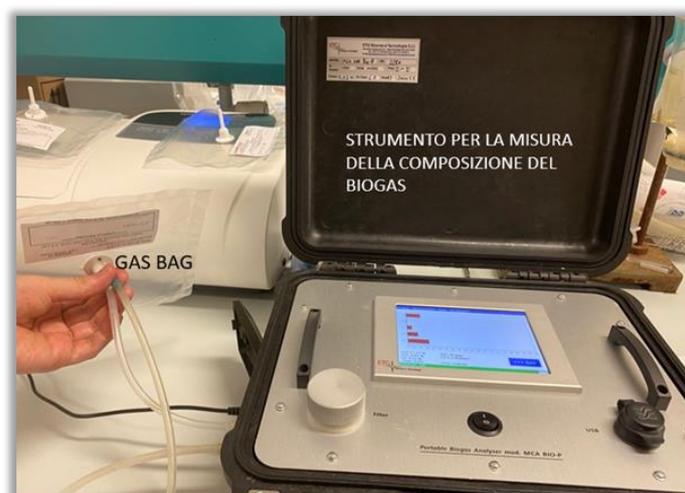


Figura 15 - analizzatore portatile per la composizione del biogas



Figura 16- gas bag

Ogni gas bag raccoglie l'insieme del biogas prodotto dalle bottiglie della medesima condizione.

Metodi di calcolo dei seguenti parametri:

Dai dati di caratterizzazione dei BMP sono state calcolate:

- la produzione media specifica di biogas (average specific biogas production, SGP) espressa come  $\text{m}^3\text{biogas kgTVS}^{-1}$  (eq. 8)

$$SGP = \frac{V_{\text{biogas(m3)}}}{\text{kgTVS}_{\text{substrato}}} \quad \text{eq. 8}$$

Questo è stato calcolato a partire dal volume cumulativo netto di biogas prodotto, calcolato a sua volta sommando il volume medio di ogni misurazione. A partire da quest'ultimo volume è stato poi calcolato il volume cumulativo netto di biogas a cui è stato sottratto il volume medio cumulativo di biogas prodotto dal bianco.

- la produzione media specifica di metano (average specific methane production, SMP) espressa come  $\text{m}^3 \text{ kgTVS}^{-1}$  (eq. 9)

$$SMP = \frac{V_{\text{metano (m3)}}}{\text{kgTVS}_{\text{substrato}}} \quad \text{eq. 9}$$

In questo caso l'equazione applicata è la medesima dell'SGP con la sola differenza di aver considerato il volume del metano anziché quello del biogas prodotto.

- l'attività, la quale è stata misurata come  $\text{m}^3\text{biogas kgTVS} \cdot \text{d}^{-1}$ .
- la costante di idrolisi del substrato  $K_{id}$ :

questo parametro può essere ricavato dai test BMP e fornisce importanti informazioni considerando che l'idrolisi è la fase limitante dell'intero processo di digestione anaerobica (Angelidaki et al., 2009).

Per un modello di idrolisi con una cinetica di primo ordine è possibile applicare la seguente equazione (eq. 10) a partire dalla parte iniziale della curva inerente la produzione di biogas:

$$\frac{dS}{dt} = -K_{id} S \quad [\text{d}^{-1}] \quad \text{eq. 10}$$

Dove:

S: substrato biodegradabile

T: tempo

$K_{id}$ : costante di idrolisi di primo ordine

Dalla separazione ed integrazione della variabile e considerando la relazione tra il substrato biodegradabile e il metano prodotto è possibile ottenere la seguente equazione (eq. 11):

$$\ln \frac{B_{\infty} - B}{B_{\infty}} = -k_{id} t \quad \text{eq. 11}$$

$B_{\infty}$  : valore massimo della produzione cumulativa di metano

B: metano prodotto d un tempo  $t$

Il valore di  $K_{id}$  corrisponde al coefficiente angolare della retta ottenuta ed è caratteristico a seconda del tipo di substrato utilizzato (Angelidaki et al., 2009). Indica inoltre qual è il tempo richiesto per poter ottenere la percentuale della quantità massima di biometano che può essere ottenuta da un dato substrato (Mace et al., 2003).

## 2.2 Caratterizzazione delle matrici utilizzate

**TS/TVS:** i solidi totali (TS) rappresentano il residuo presente nel crogiolo dopo aver sottoposto il campione in stufa a 105 °C per 24 ore al fine di ottenere l'evaporazione dell'acqua contenuta in esso; i solidi volatili (TVS) invece, rappresentano i solidi volatilizzati successivamente al loro incenerimento in muffola a 550°C e permette di valutare le sostanze organiche presenti nel campione.

**Alcalinità:** fornisce informazioni sulla capacità tamponante del sistema e sulla sua stabilità ed è definita come la capacità dell'acqua di neutralizzare gli ioni  $H^+$ .

Conoscendo il volume di campione, il volume della soluzione utilizzato nella titolazione ed infine la normalità dell'acido è possibile calcolare l'alcalinità in termini di  $mg\ L\ CaCO_3^{-1}$ .

**Composizione del biogas:** questa procedura ha lo scopo di determinare le percentuali di CH<sub>4</sub>, CO<sub>2</sub>, O<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>S prodotte, potendo quindi rilevare eventuali effetti inibitori causati dai PFAS alle diverse concentrazioni.

È però importante tenere in considerazione che nei test in batch la rappresentatività del biogas che viene generato nel processo di digestione anaerobica risulta bassa e di conseguenza le rese dei substrati utilizzati sono state calcolate considerando la composizione media del biogas, costituito per il 60% da CH<sub>4</sub> e per il 40% da CO<sub>2</sub>.

**sCOD :** rappresenta la quantità di ossigeno necessaria ad ossidare chimicamente la sostanza organica presente nella frazione liquida della matrice considerata. Questo parametro è stato determinato con metodo colorimetrico (spettrofotometria) successivamente alla digestione del campione in ambiente acido alla temperatura di 150°C. La lettura dell'assorbanza a 600 nm permette di risalire alla concentrazione di mgCOD L<sup>-1</sup> della frazione solubile.

**TKN (azoto totale di Kjeldhal):** Questo metodo può essere utilizzato per analisi chimiche del suolo, dell'acqua o delle acque reflue e si basa sulla decomposizione dell'azoto organico totale presente nei campioni, in azoto ammoniacale tramite digestione acida del campione a 37 °C e conseguente formazione di (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, successivamente distillato e determinato colorimetricamente (spettrofotometro).

#### **Ammoniaca:**

Per l'analisi della concentrazione di azoto ammoniacale in forma di ione ammonio sono stati utilizzati 2 metodi: un'analisi cromatografica e una spettrofotometrica. Nel primo metodo lo strumento riporta direttamente la concentrazione in massa\*volume<sup>-1</sup> di NH<sub>4</sub> mentre nella via spettrofotometrica viene mantenuto un ambiente basico per evitare la volatilizzazione dell'ammoniaca in forma gassosa. La soluzione utilizzata è il reagente di Nessler al quale l'ammoniaca si lega per poi essere rilevata allo spettrofotometro.

#### **Concentrazione di acidi grassi volatili:**

Lo strumento che è stato utilizzato è un HPLC (High Performance Liquid Chromatography) il quale ha permesso di determinare la concentrazione ed il profilo degli acidi grassi volatili presenti nel digestato.

Gli acidi grassi volatili che vengono indagati sono: formico, acetico, propionico, iso-butyrico, n-butyrico, isovalerico, n-valerico, iso-caproico, acidi n-caproico.

### **Ortofosfato (P-PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>) con metodo colorimetrico:**

Gli ioni ortofosfato vengono fatti reagire con il molibdato di ammonio ed il potassio antimonil tartarato con formazione di un eteropoliacido che successivamente viene ridotto mediante acido ascorbico a blu di molibdeno. Viene poi effettuata una lettura allo spettrofotometro alla lunghezza d'onda di 710 nm determinando così l'assorbanza del campione.

### **COD sulla frazione secca mediante mineralizzatore a microonde:**

La preparazione dei campioni prevede la loro essiccazione in stufa a 150°C per 24/48 h e una successiva frantumazione con il mortaio con lo scopo di ottenere il campione che potrà così essere pesato, inserito nelle vessel e successivamente analizzato. La lettura del campione avviene con una titolazione colorimetrica.

## **2.3 Analisi chimico-analitiche per la quantificazione dei PFAS**

### 2.3.1 Preparazione dei campioni

Per la determinazione del coefficiente di ripartizione solido-liquido è stata prelevata un'aliquota di 50 mL da ogni bottiglia BMP. il campione è stato prelevato e centrifugato a 9000 RMP (10161 RCF) per 10 minuti utilizzando la centrifuga Jouan CR3i e successivamente conservato in congelatore fino alla conclusione dei test.

Alla conclusione dell'analisi BMP, i campioni precedentemente congelati sono stati scongelati a temperatura ambiente e filtrati all'interno di vials da 0.75 mL in PP tramite il sistema di filtrazione claristep (Sartorius) utilizzando filtri da 0.2 µm in cellulosa rigenerata e successivamente diluiti 1:100 per l'analisi diretta in LC-MS.

### 2.3.2 Analisi strumentale (LC/MS-MS)

L'analisi dei campioni è stata condotta utilizzando lo spettrometro di massa ad alta risoluzione Compact qTOF (Bruker) accoppiato al sistema di cromatografia liquida Elute (Bruker) costituito da degaser, pompa binaria a 700 bar, autocampionatore e forno a colonna. Il metodo utilizzato è stato adattato partendo dall'application note di Waters per l'analisi PFAS in campioni d'acqua (Organtini et al., 2020). In particolare, è stata utilizzata una colonna C18 XBridge BEH da 2.5 µm, 2.1x75 mm

(Waters) con relativa pre-colonna. Per ridurre le interferenze derivanti dal potenziale rilascio di sostanze perfluoroalchilate da materiali fluorurati (e.g. PTFE) presenti nelle tubazioni che gestiscono le fasi mobili, è stata inserita una colonna C18 XBridge BEH da 2.5  $\mu\text{m}$ , 4.6x50 mm (Waters) tra il comparto pompe e la colonna analitica con lo scopo di trattenere e successivamente eluire gli interferenti ad un tempo di ritenzione diverso rispetto a quello del campione iniettato. Le fasi mobili utilizzate sono state realizzate partendo da reagenti, solventi ed acqua di grado LC-MS per analisi di pesticidi: A) acqua:metanolo (95:5 v/v) + 2 mM di ammonio acetato, B) metanolo + 2 mM di ammonio acetato.

Sono state inoltre utilizzate due soluzioni, costituite da acetonitrile:acqua (15:85 v/v) per il trasporto del campione, mentre una soluzione di isopropanolo:acqua (20:80 v/v) per la pulizia dell'autocampionatore tra un'iniezione e l'altra. La colonna è stata termostata a 35 °C per tutta l'analisi, e sono stati iniettati 25  $\mu\text{L}$  di campione per ogni analisi. Con questo tipo di configurazione strumentale il tempo di ritenzione per il PFOA è risultato essere di 13.22 minuti.

Tabella 10 - gradiente di eluizione

tempo (min)	flusso (mL/min)	%A	%B
0	0.3	100	0
1	0.3	80	20
6	0.3	55	45
13	0.3	20	80
14	0.4	5	95
17	0.4	5	95
18	0.3	100	0
22	0.3	100	0

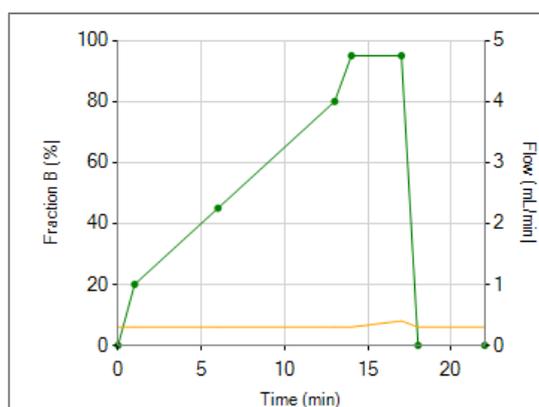


Figura 17 - Diagramma del gradiente di eluizione

Lo spettrometro di massa è stato calibrato iniettando direttamente in sorgente (Electron spray) tramite syringe-pump con flusso di 180  $\mu\text{L}/\text{ora}$  una soluzione di “cluster di sodio formiato”, utile per la calibrazione delle masse nel range 50-1300 m/z. Questo tipo di calibrazione è stata condotta automaticamente all'inizio di ogni corsa cromatografica settando opportunamente la valvola di commutazione interna allo strumento.

L'acquisizione degli spettri di massa è stata condotta utilizzando la modalità bbCID, ovvero una particolare modalità di acquisizione che prevede ad ogni ciclo di acquisire uno spettro di massa in alta risoluzione, uno utilizzando un'energia di collisione di 24 eV, ed un altro utilizzando un'energia di collisione di 60 eV. Questo tipo di modalità unisce informazioni qualitative sulla composizione del campione che possono essere utili per un'analisi retrospettiva dei dati con l'analisi specifica del composto target tramite frammentazione dello ione precursore.

### 2.3.3 Quantificazione

Per la quantificazione del PFOA nei campioni è stata costruita una retta di calibrazione a cinque punti da 0.1 a 10  $\mu\text{g L}^{-1}$  ponendole l'intercetta uguale a zero avente come  $R^2$  0.998.

I dati sono stati elaborati tramite il software TASQ (Bruker) il quale per ogni analisi ha estratto il cromatogramma dello ione PFOA e dello ione frammento come conferma, con una precisione sulla massa estratta di 0.003 m/z.

In particolare, per PFOA è stata utilizzata la massa 412.9664 m/z relativa al frammento  $\text{C}_8\text{F}_{15}\text{O}_2^{-1}$  mentre per lo ione conferma è stato utilizzato il frammento  $\text{C}_3\text{F}_7^{-1}$  di massa 168.9894 m/z. Ai cromatogrammi estratti è stato applicando uno smoothing di tipo gaussiano con ampiezza di 2 secondi.

### 3. Risultati e discussione

#### 3.1 Caratterizzazione delle matrici utilizzate

Nella Tabella 11 vengono riportati i dati di caratterizzazione ottenuti per il fango (FV) ed il digestato (DV) utilizzati nei test di biometanazione. Ogni aliquota di fango o digestato prelevato dall'impianto di depurazione è stato nominato con numeri progressivi che indicano l'ordine di prelievo (esempio: DV1 indica il primo campione di digestato fornito).

Tabella 11 - misura del pH e dell'alcalinità ( $\text{mg CaCO}_3 \cdot \text{L}^{-1}$ ) nei diversi tipi di fango e digestato

	<b>DV1</b>	<b>DV2</b>	<b>DV3</b>	<b>FV1</b>	<b>FV2</b>
<b>pH</b>	7.94	7.79	8.19	7.52	7.79
<b>Alcalinità a pH 6</b> ( $\text{gCaCO}_3 \text{ L}^{-1}$ )	3.14	2.16	2.05	0.23	0.36
<b>Alcalinità a pH 4</b> ( $\text{gCaCO}_3 \text{ L}^{-1}$ )	3.60	2.83	2.59	0.43	0.71
<b>Media TS</b> ( $\text{gTS kgAS}^{-1}$ )	30.32	35.45	30.39	32.67	38.75
<b>Media TVS</b> ( $\text{gVS kgAS}^{-1}$ )	19.51	21.59	18.12	22.90	25.21
<b>%TVS media</b> ( $\text{VS TS}^{-1}$ )	64.36	60.90	59.61	66.97	64.96
<b>sCOD</b> ( $\text{mg L}^{-1}$ )	337.50	362.50	291.88	1502.51	797.92
<b>pCOD</b> ( $\text{gO}_2 \text{ kgTS}^{-1}$ )	685.02	-	628.80	649.02	603.93
<b>TKN</b> ( $\text{g azoto KgTS}^{-1}$ )	-	8.52	-	6.57	-
<b>NH<sub>4</sub><sup>+</sup> concentrazione effettiva</b> ( $\text{mg L}^{-1}$ )	940	687.55	720.80	78.95	116.10

I valori ottenuti e riportati Tabella 11 sono in linea con i valori tipici in queste tipologie di fanghi (Metcalf, Eddy & Tchobanoglous, 1991). Inoltre, i valori di concentrazione di  $\text{NH}_4^+$ , seppure più elevati per DV1, non sembrano indicare un potenziale effetto inibitorio sulla biomassa microbica (Cecchi et al., 2005).

#### VFA (Volatile fatty acids)

Risulta interessante valutare la variazione della composizione degli acidi grassi volatili dei diversi tipi di fango e digestato.

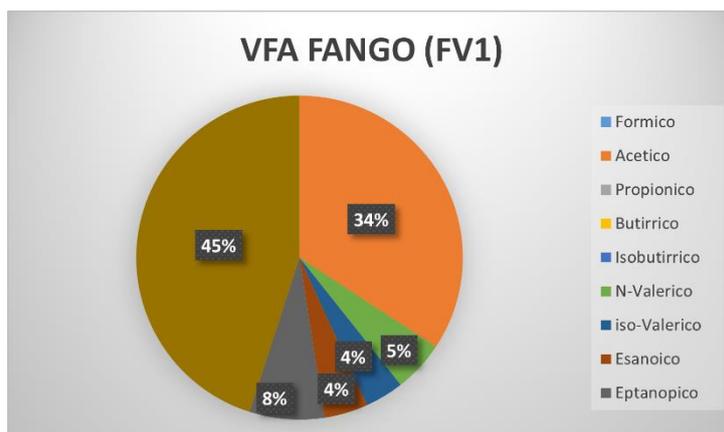


Figura 18- Valori medi dei VFA del fango (FV1) ( $mg L^{-1}$ )

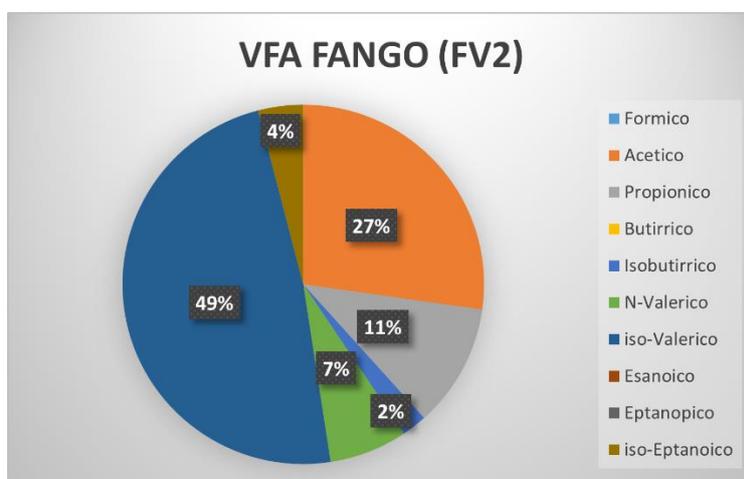


Figura 19- - Valori medi del VFA del fango (FV2) ( $mg L^{-1}$ )

Confrontando i grafici a torta dei VFA ottenuti per i diversi tipi di fango e digestato (Figura 18, Figura 19, Figura 20 e Figura 21) la prima differenza visibile sin da subito grazie ai diversi colori che dividono i grafici è che nei digestati (DV1 e DV3) prevalga l'acido iso-eptanoico, ovvero molecole con il maggior numero di atomi di carbonio. Nei fanghi invece prevalgono acidi grassi a minor contenuto di carbonio.

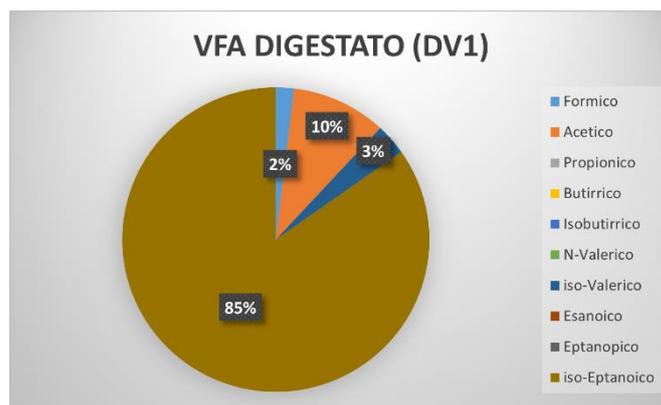


Figura 20- Valori medi dei VFA del digestato (DV1) ( $\text{mg L}^{-1}$ )

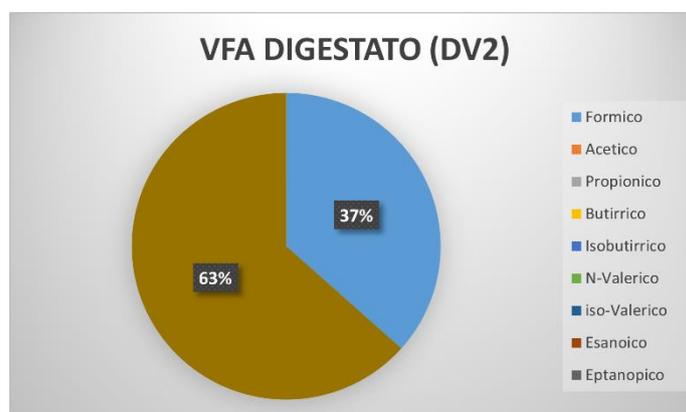


Figura 21- Valori medi VFA del digestato (DV2) ( $\text{mg L}^{-1}$ )

## 3.2 Test di biometanazione

In seguito, vengono riportati i grafici ottenuti dalle letture delle bottiglie BMP nelle differenti condizioni. Di nuovo, le tre condizioni testate si riferiscono alle repliche senza aggiunta di PFAS (“I+S”), con aggiunta di PFAS a concentrazione di  $1 \text{ mg L}^{-1}$  (“PFOA1”/ “PFAS1”) e  $10 \text{ mg L}^{-1}$  (“PFOA10”/ “PFAS10”). Per ciascun esperimento, sono riportati i grafici di attività, SGP, SMP e l’andamento della composizione % di  $\text{CH}_4$  e  $\text{CO}_2$ , nonché i valori di costante di idrolisi. Nel paragrafo 3.3 sono illustrati i risultati di un test statistico effettuato sui dati volumetrici di biometano prodotto e sui dati di SGP al fine di verificare la similarità dei risultati.

Di seguito, la tabella 12 riporta dei valori di riferimento di SGP e Kid.

### 3.2.1 Test con PFOA

La Figura 22 si riferisce al volume di biogas prodotto per ogni kg di TVS al giorno (attività).

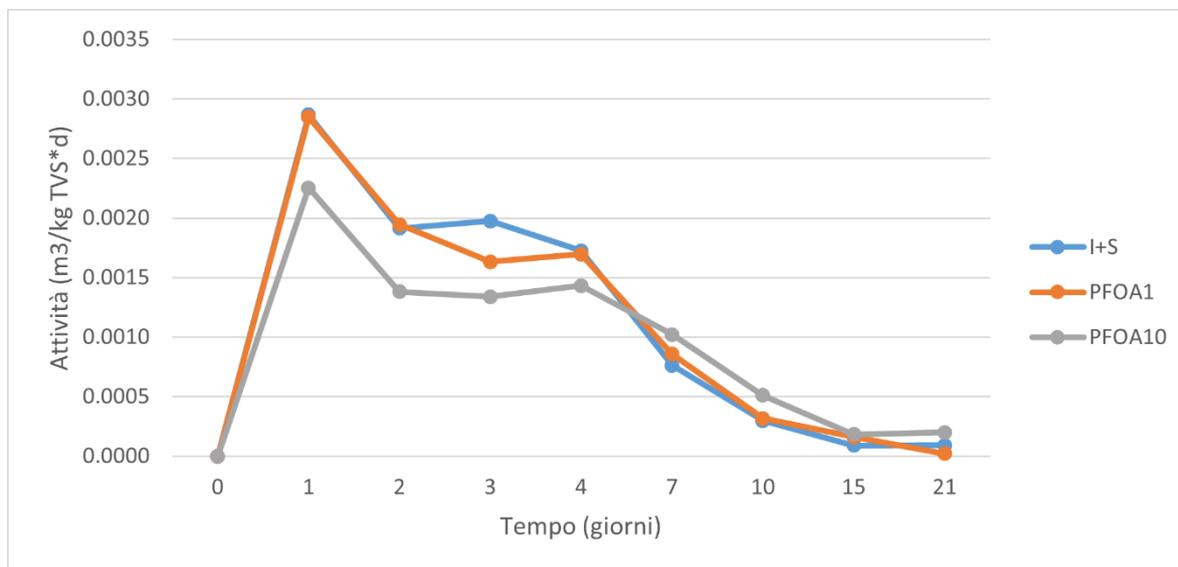


Figura 22- Attività di inoculo e substrato e con aggiunta del PFOA a concentrazione 1 e 10 mg \* L<sup>-1</sup>

I grafici seguenti (Figura 23-24) si riferiscono rispettivamente alla produzione specifica di gas (SGP, espressa come m<sup>3</sup> di biogas prodotti per ogni kg di TVS) e alla produzione volumetrica di metano per Kg di substrato (SMP, m<sup>3</sup>CH<sub>4</sub>/kgTVS). I valori finali ottenuti di tali parametri, riportati in Tabella 12, consentono un confronto con la letteratura. L'ultimo valore ottenuto di SMP è stato scartato (e non è quindi presente nel grafico) a causa di una perdita di biogas dalla *gas bag* confermata anche dall'alta percentuale di O<sub>2</sub> rilevata durante l'analisi del biogas.

I valori di SGP di tutte e tre le condizioni testate risultano coerenti nel range di 0.15 e 0.35 m<sup>3</sup>biogas/kgTVS previsto per i fanghi secondari o misti (Leite et al., 2016; Metcalf, Eddy & Tchobanoglous, 1991). Altri autori hanno riportato valori leggermente differenti, (Bolzonella et al., 2005) ad esempio, descrivono un intervallo di 0.07 - 0.18 per i fanghi attivi mentre (Da Silva et al., 2018) un valore di 0.35 dei fanghi di depurazione misti.

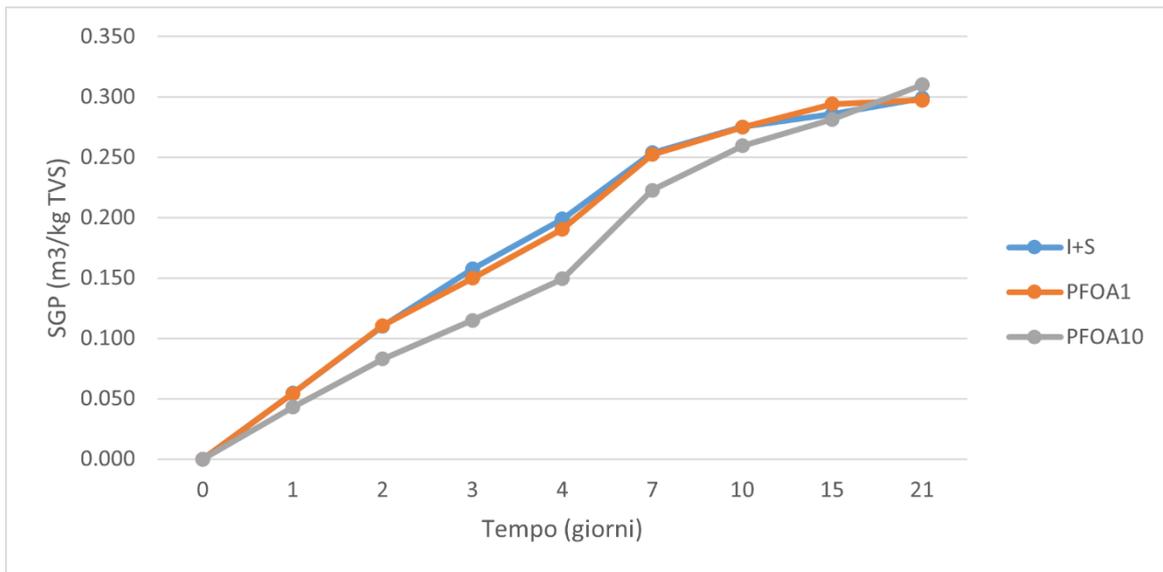


Figura 23- SGP di inoculo e substrato e con aggiunta del PFOA a concentrazione 1 e 10 mg \* L<sup>-1</sup>

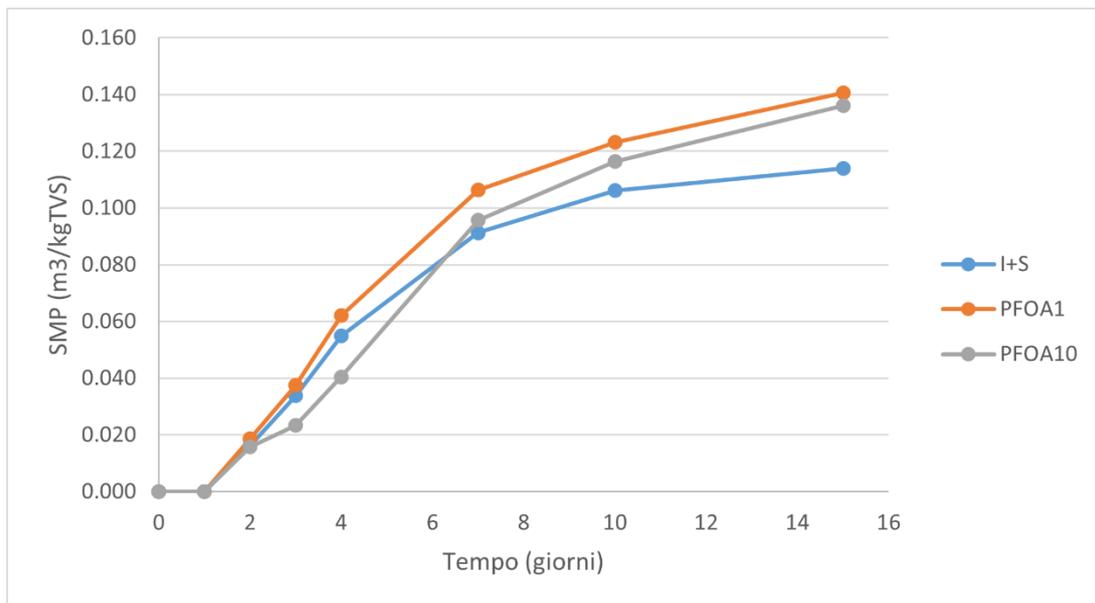


Figura 24- produzione specifica di metano per Kg di substrato

Rispetto ad attività, SGP ed SMP, la concentrazione a 10 mg L<sup>-1</sup> di PFOA è quella che sembra discostarsi maggiormente dalle altre condizioni almeno durante la prima parte della sperimentazione. Analizzando con maggiore dettaglio i valori finali di SGP ed SMP riportati in Tabella 13 risultano comunque simili nelle tre condizioni.

Tabella 12- valori di SGP e  $K_{id}$  riportati in letteratura per sewage sludges e waste activated sludges

Riferimento	SGP (m <sup>3</sup> metano/kgTVSd)	$K_{id}$ d <sup>-1</sup>	Note
(Abubakar et al., 2018)		0.1098- 0.2094	BMP, Secondary sludge
(Da Silva et al., 2018)	~0.35*	0.18-0.23	BMP, *sewage sludge
(Wang et al., 2013)	~ 0.2	0.16 ±0.01	BMP, Waste activated sludge
(Ruiz-Hernando et al., 2014)		0.37±0.3	BMP, Waste activated sludge
(Bolzonella et al., 2005)	0.07-0.18		Waste activated sludge, full-scale WWTP
(Wei et al., 2017)	0.16	0.22	Waste activated sludge, full scale WWTP

Tabella 13 - valori finali di SGP ed SMP nelle tre condizioni

	Unità di misura	I+S	PFOA1	PFOA10
<b>SGP</b>	m <sup>3</sup> biogas kgTVS <sup>-1</sup>	0.30	0.30	0.31
<b>SMP</b>	m <sup>3</sup> CH <sub>4</sub> kgTVS <sup>-1</sup>	0.12	0.14	0.14

Come detto in precedenza, dai risultati dei test BMP è possibile ottenere ulteriori informazioni, come ad esempio il tasso o velocità di idrolisi del substrato studiato. In accordo con il metodo descritto in (Angelidaki et al., 2009) è stata quindi determinata la costante di idrolisi caratteristica del substrato utilizzato alle tre condizioni operative scelte.

Nell'analisi dei grafici della costante di idrolisi l'interesse viene focalizzato nella prima parte della curva sperimentale per verificarne la linearità (Angelidaki et al., 2009) e sono per questo stati presi in considerazione i primi quattro valori della retta che presentavano cioè una condizione di linearità (si veda Figura 41, Figura 42 e Figura 43 nei materiali supplementari – Appendice 2). La mancanza di linearità lungo tutto il tempo della sperimentazione è dovuta al fatto che la fase di idrolisi in termini temporali costituisce la prima fase del processo di digestione anaerobica. Come detto in precedenza, il valore assoluto del coefficiente angolare della retta rappresenta la “costante di idrolisi” ( $k_i$ ); generalmente, meno il substrato risulta recalcitrante alla degradazione più tale valore è alto.

Il substrato utilizzato nella sperimentazione è costituito da fango che risulta quindi difficile da degradare, associato tipicamente ad una bassa  $K_{id}$ .

Tabella 14 - costante di idrolisi

condizione	Costante di idrolisi (d <sup>-1</sup> )	R <sup>2</sup>
<b>I+S</b>	0.231	0.9993
<b>PFOA1</b>	0.244	0.9964
<b>PFOA10</b>	0.151	0.9963

Volendo confrontare con la letteratura i dati ottenuti nella costante di idrolisi (Tabella 14), è possibile affermare che questi sono in linea con i valori ottenuti da (Da Silva et al., 2018), dove la *K<sub>d</sub>* dei fanghi primari misti a secondari è risultata 0.18-0.23 d<sup>-1</sup>. Citando un altro autore concentratosi solo sui fanghi di tipo secondario i valori risultanti nel range tra 0.11 e 0.21 d<sup>-1</sup> (Abubakar et al., 2018). Comparando i dati ottenuti in tutte e tre i test a questi ultimi valori alcune costanti di idrolisi risultano leggermente maggiori da quelle descritte, anche se non eccessivamente oltre questo intervallo (Tabella 14, Tabella 16 e Tabella 18). Nel caso dei fanghi attivi il valore della costante di idrolisi risulta invece più basso e pari a 0.16 d<sup>-1</sup> (Abubakar et al., 2018).

È stato poi verificato se le diverse condizioni determinassero una diversa composizione nel tempo del biogas accumulato nelle bottiglie. È necessario considerare però la poca rappresentatività dei test in batch: generalmente la produzione in semicontinuo si aggira intorno al 60% di CH<sub>4</sub> e 40% di CO<sub>2</sub>, ma nella Figura 25 e Figura 26 i valori ottenuti che risultano circa di un 10% inferiori concordano con l'impossibilità di giungere nei test in batch a tali valori che verrebbero quindi ottenuti in condizioni di stabilità. Va inoltre considerato che a differenza del protocollo avanzato da Angelidaki (2009), i test sono stati interrotti dopo un tempo leggermente inferiore a quello previsto per il raggiungimento del plateau nella curva cumulativa di produzione di biogas per le matrici testate in queste condizioni, ossia circa 30 giorni.

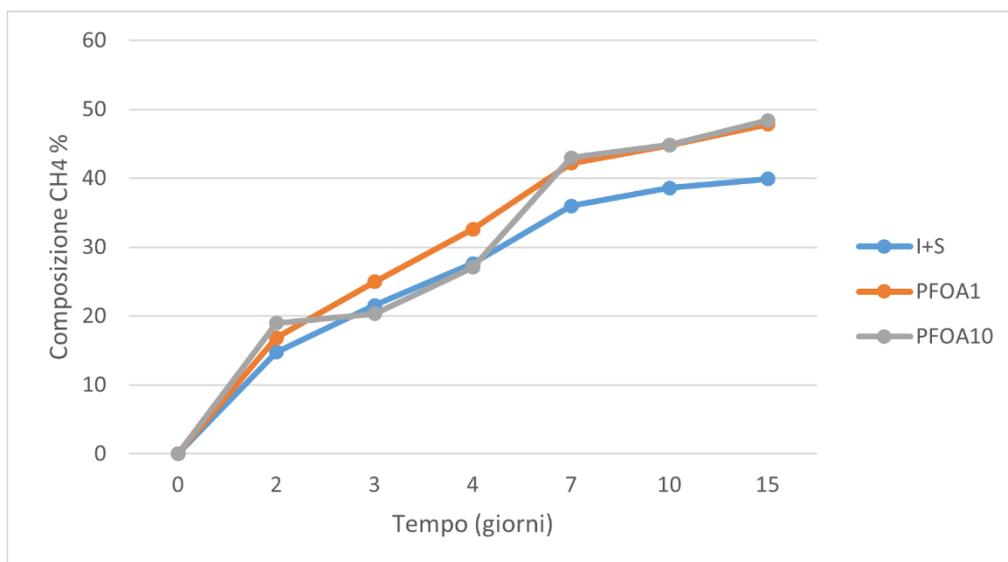


Figura 25-variazione nel tempo della composizione del CH<sub>4</sub>

Considerando le curve del metano nel grafico sopra riportato Figura 25, è possibile notare che la composizione % risulta maggiore di circa il 10% nelle condizioni contenenti il PFOA rispetto alla condizione I+S. Infatti, è proprio la condizione PFOA10 a presentare il contenuto più alto ottenuto pari a 48.39%.

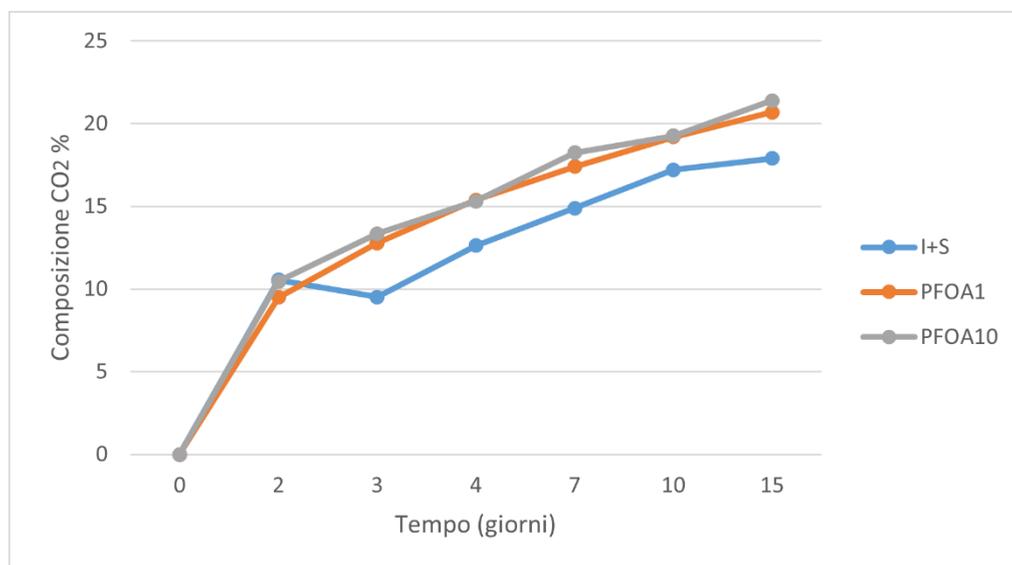


Figura 26- variazione nel tempo della composizione del CO<sub>2</sub>

La composizione del biogas in termini di CO<sub>2</sub> (Figura 26) non subisce invece particolari variazioni tra le tre condizioni: anche in questo caso i valori più bassi si mantengono nella condizione I+S la quale mantiene un andamento più lineare. Le condizioni che hanno previsto l'aggiunta di 1 e 10 mg L<sup>-1</sup> non

segnalano particolari differenze se non ancora una volta nell'ultima lettura che però anche in questo caso appare poco affidabile per la medesima motivazione.

### 3.2.2 Test con aggiunta di PFOS, PFBA e PFBS

I grafici riportati in questo paragrafo si riferiscono al secondo test di biometanazione effettuato su digestato e fango attivo secondario ("I+S") e con l'aggiunta di PFOS, PFBS e PFBA alle concentrazioni di 1 e 10 mg L<sup>-1</sup> ("PFAS1" e "PFAS10") oltre al solo inoculo e substrato.

Nelle bottiglie relative alla condizione "PFAS1", PFOS è stati aggiunto ad una concentrazione errata (10 mg L<sup>-1</sup>), per cui tale condizione non è considerata nella discussione sottostante; è stato comunque deciso di riportare i risultati di PFAS1 nei grafici di attività, SGP, SMP, andamento di CH<sub>4</sub> e CO<sub>2</sub>.

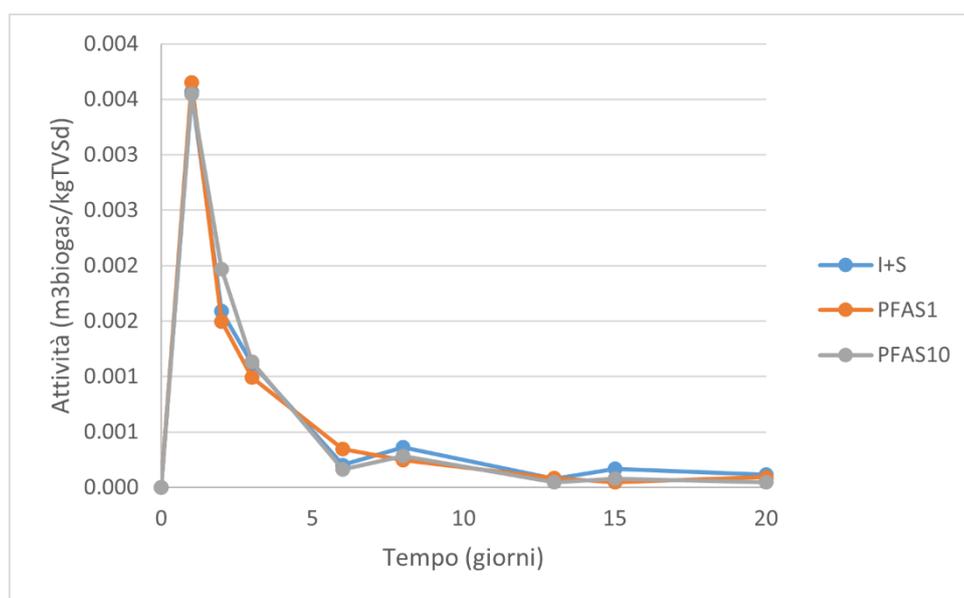


Figura 27- Attività delle BMP con aggiunta di PFOS, PFBA e PFBS a concentrazione 1 e 10mg L<sup>-1</sup>

Nella Figura 27 si osservano ancora una volta andamenti molto simili tra le curve.

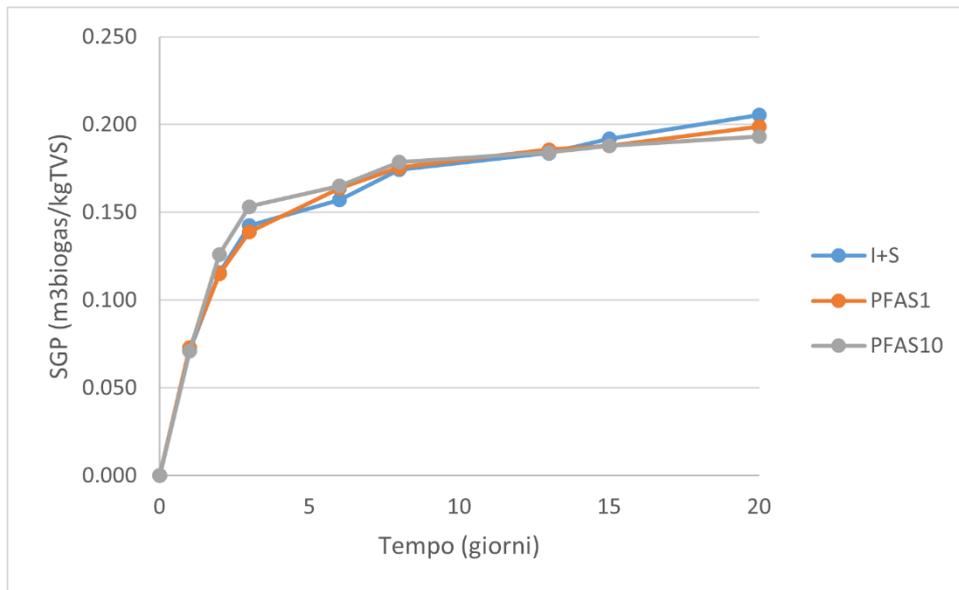


Figura 28- SGP delle BMP con aggiunta di PFOS, PFBA e PFBS a concentrazione 1 e 10mg L<sup>-1</sup>

L'SGP raggiunge al ventesimo giorno di sperimentazione valori di 0.205 m<sup>3</sup>/kg TVS, 0.199 m<sup>3</sup>/kg TVS e 0.193 m<sup>3</sup>/kg TVS rispettivamente per I+S, PFAS1 e PFAS10.

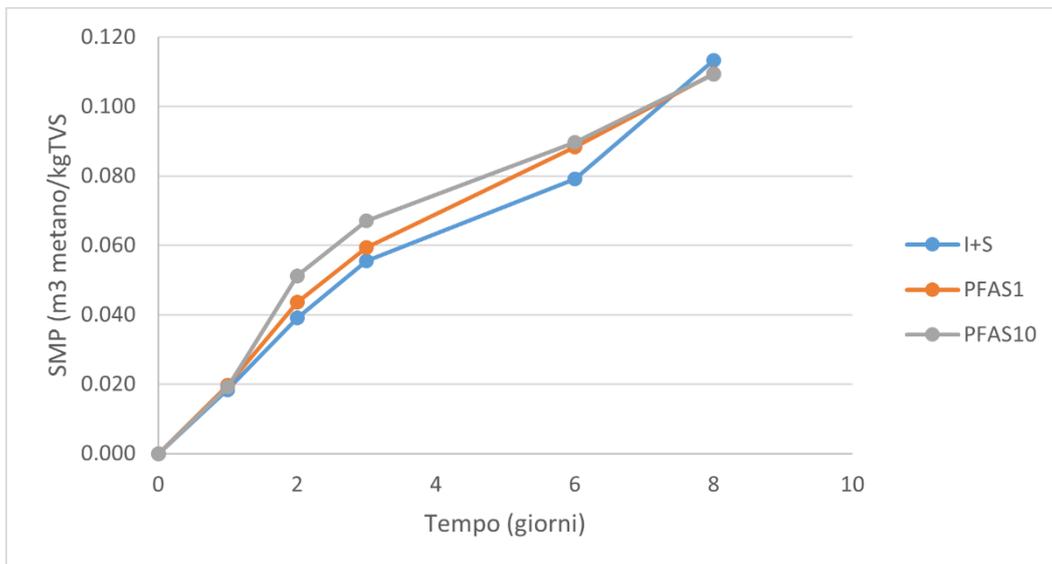


Figura 29- SMP delle BMP con aggiunta di PFOS, PFBA e PFBS a concentrazione 1 e 10mg L<sup>-1</sup>

Per l'SMP (Figura 29) sono stati scartati i valori legati alla percentuale di metano registrata al giorno 8, 15 e 20 a causa del volume insufficiente di biogas raccolto e alla conseguente non affidabilità del dato riportato dall'analizzatore portatile di biogas. Le curve dimostrano un andamento simile in particolare nella parte iniziale e finale dell'esperimento.

Tabella 15 - valori finali di SGP ed SMP

	Unità di misura	I+S	PFOA1	PFOA10
<b>SGP</b>	m <sup>3</sup> biogas kgTVS <sup>-1</sup>	0.21	0.20	0.19
<b>SMP</b>	m <sup>3</sup> CH <sub>4</sub> kgTVS <sup>-1</sup>	0.12	0.11	0.11

In questo test (Tabella 15) ancora una volta i valori di SGP sono in linea con quelli riportati in letteratura per fanghi secondari o misti (primari + secondari) di 0.15 e 0.35 m<sup>3</sup>biogas/kgTVS (Leite et al., 2016; Metcalf, Eddy & Tchobanoglous, 1991).

Tabella 16 - costante di idrolisi

condizione	Costante di idrolisi (d <sup>-1</sup> )	R <sup>2</sup>
<b>I+S</b>	0.395	0.9983
<b>PFAS1</b>	0.533	0.9976

I valori della costante di idrolisi (Tabella 16) risultano leggermente superiori rispetto a quelli ottenuti dal PFOA (Tabella 14) ed anche di quelli ottenuti da (Da Silva et al., 2018).

Per ciò che riguarda la variazione della composizione di metano nel tempo (Figura 30), l'andamento della composizione riflette quello della SMP; la percentuale di metano si assesta a valori finali di 56±0.83% per tutte le condizioni.

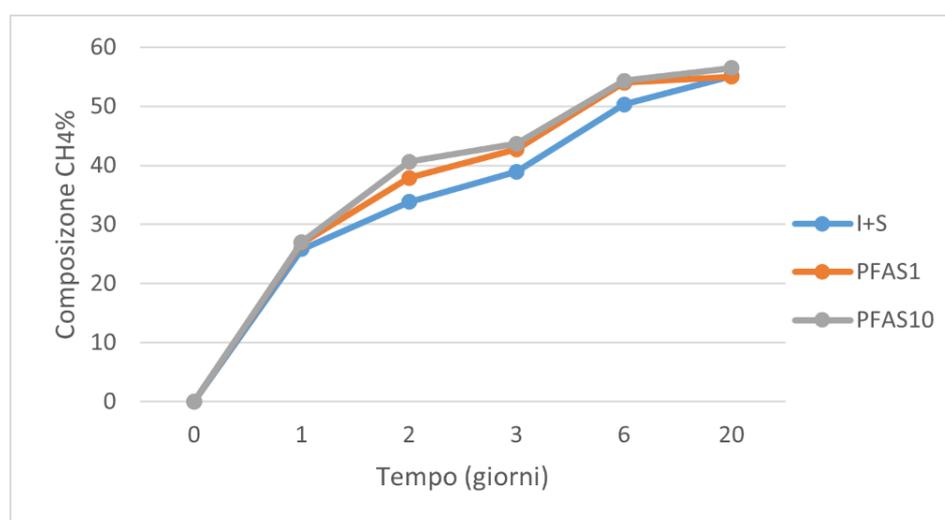


Figura 30 - Variazione nel tempo della composizione del CH<sub>4</sub>

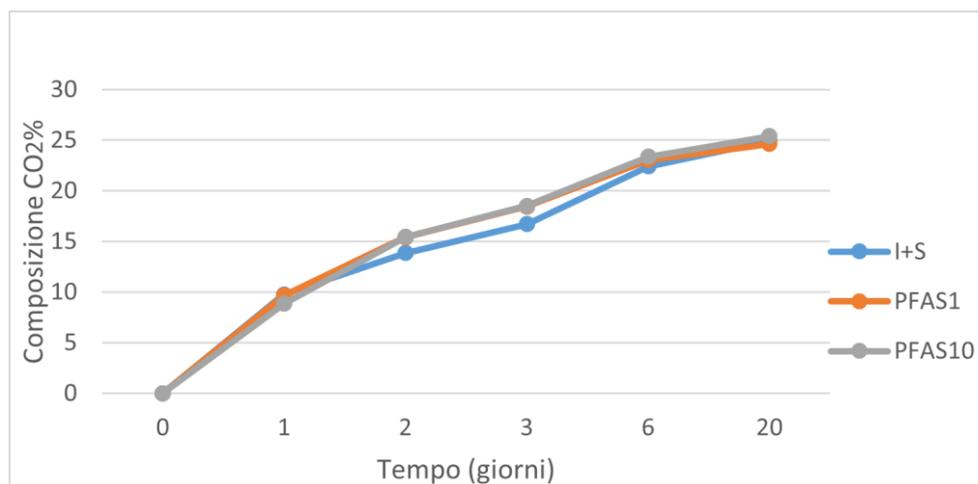


Figura 31- Variazione nel tempo della percentuale di CO<sub>2</sub>

Simili conclusioni possono essere tratte per la % di CO<sub>2</sub> (Figura 31), che raggiunge il 25±0.4% con riferimento a tutte e tre le condizioni. I valori risultano lievemente maggiori rispetto alla produzione del CO<sub>2</sub> riportato in Figura 26 dove i valori massimi si aggiravano intorno al 20%: in questa tabella viene infatti raggiunto il valore massimo di 25.4%.

### 3.2.3 Secondo test con aggiunta di PFOS, PFBA E PFBS

Il primo test con PFOS, PFBA e PFBS è stato replicato nelle condizioni I+S e PFAS1 in vista delle problematiche descritte nel paragrafo precedente. Di seguito nuovamente sono riportati i grafici di attività, SGP, ed SMP (Figure 32, 33 e 34), nonché la variazione nel tempo della % di CH<sub>4</sub> e CO<sub>2</sub> nel biogas (Figure 35 e 36).

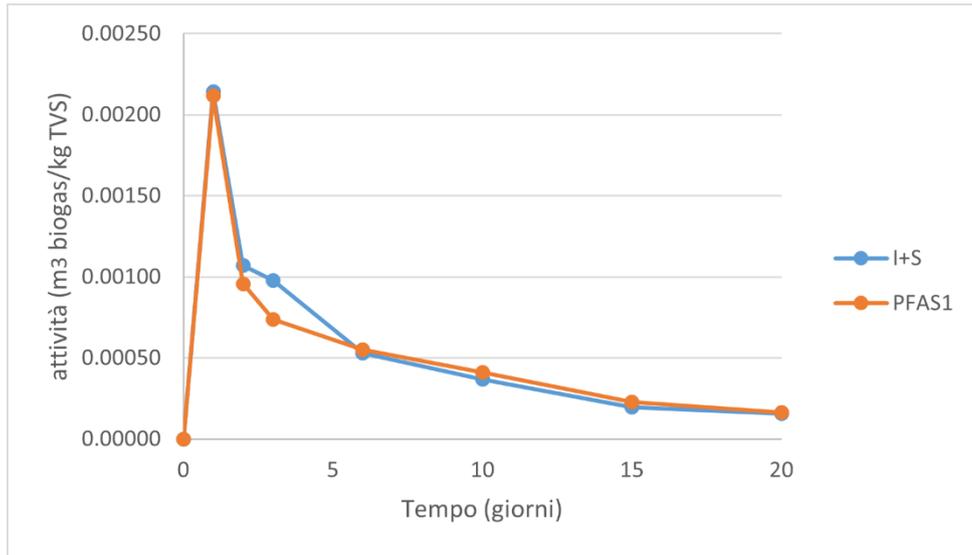


Figura 32- Attività di inoculo e substrato e con aggiunta del PFOA a concentrazione  $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$

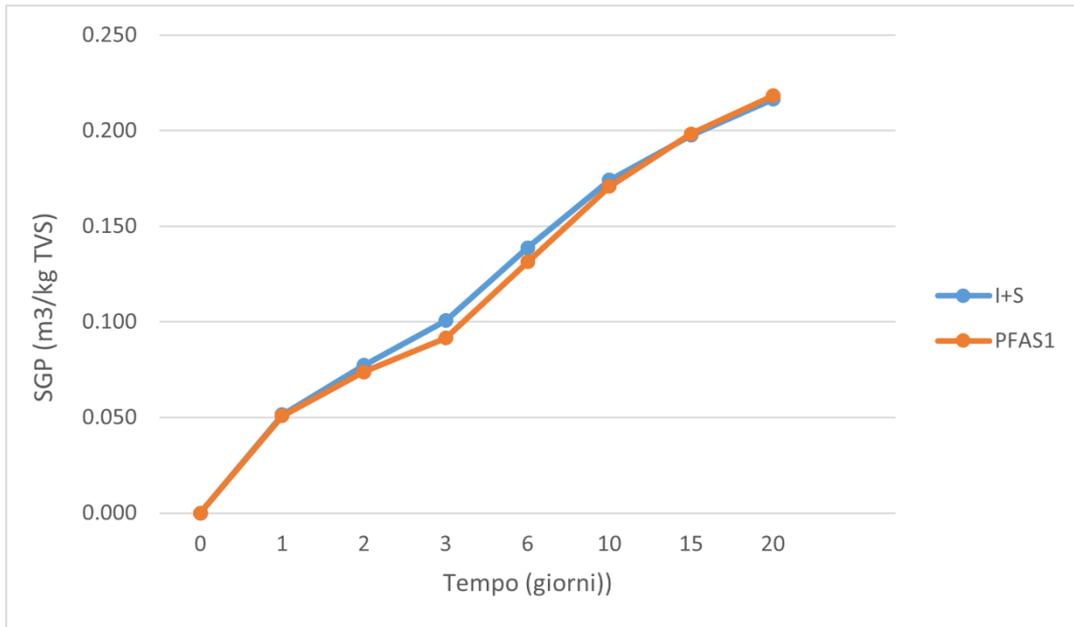


Figura 33-SGP di inoculo e substrato e con aggiunta del PFOA a concentrazione  $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$

La Figura 33 presenta un SGP con valori che determinano una produzione di biogas quasi costante nel tempo per entrambe le condizioni applicate.

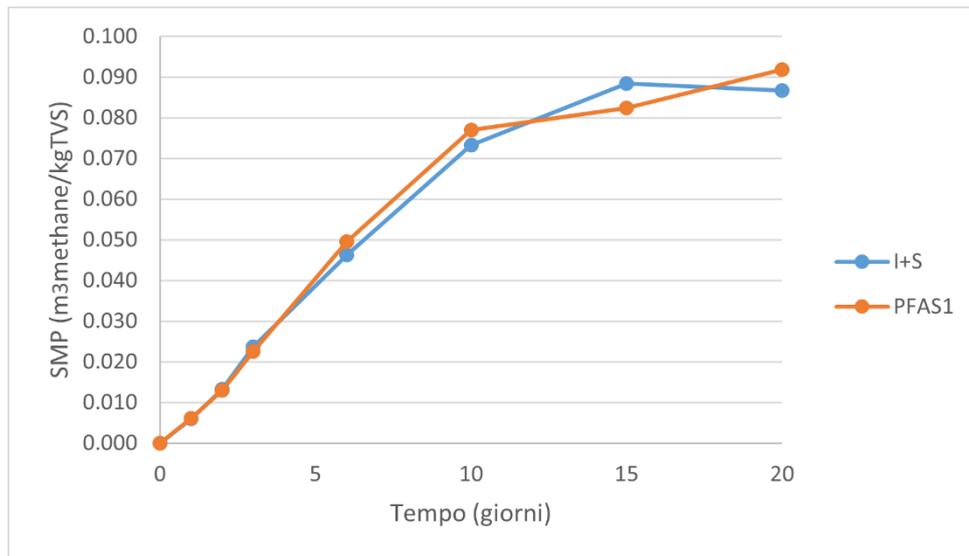


Figura 34- SMP di inoculo e substrato e con aggiunta del PFOA a concentrazione  $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$

L'andamento delle curve della Figura 34 appare sin da subito molto simile tra le due condizioni.

Tabella 17 - valori finali SGP ed SMP

	Unità di misura	I+S	PFOA1
<b>SGP</b>	$\text{m}^3 \text{biogas kgTVS}^{-1}$	0.22	0.22
<b>SMP</b>	$\text{m}^3 \text{CH}_4 \text{ kgTVS}^{-1}$	0.09	0.09

Anche in questo caso i valori di SGP (

I valori di Kid ottenuti nell'ultimo test, come riportato in *Tabella 18*, appaiono quasi opposti a quelli del secondo test (*Tabella 16*): la retta della condizione PFAS10 infatti (*Figura 42* e *Figura 43* dei materiali supplementari) è caratterizzato da una pendenza minore e possiede cioè un coefficiente angolare minore, suggerendo di conseguenza una difficoltà nella degradazione del substrato forse causata dalla presenza di PFOS, FFBS e PFBA. La retta del PFAS1 però, risultando meno inclinata di quella di inoculo e substrato ed indicando quindi una degradazione più agevole non permette di affermare se la presenza dei PFAS portino ad un vantaggio o meno in termini di degradabilità del substrato.) rientrano nel range di  $0.15 - 0.35 \text{ m}^3 \text{biogas/kgTVS}$  riportato in letteratura (Leite et al., 2016; Metcalf, Eddy & Tchobanoglous, 1991).

La composizione di metano e diossido di carbonio nel tempo mostra dei valori finali più bassi rispetto al test precedente, pari a circa 41% e 20% rispettivamente (*Figure 35* e *36*).

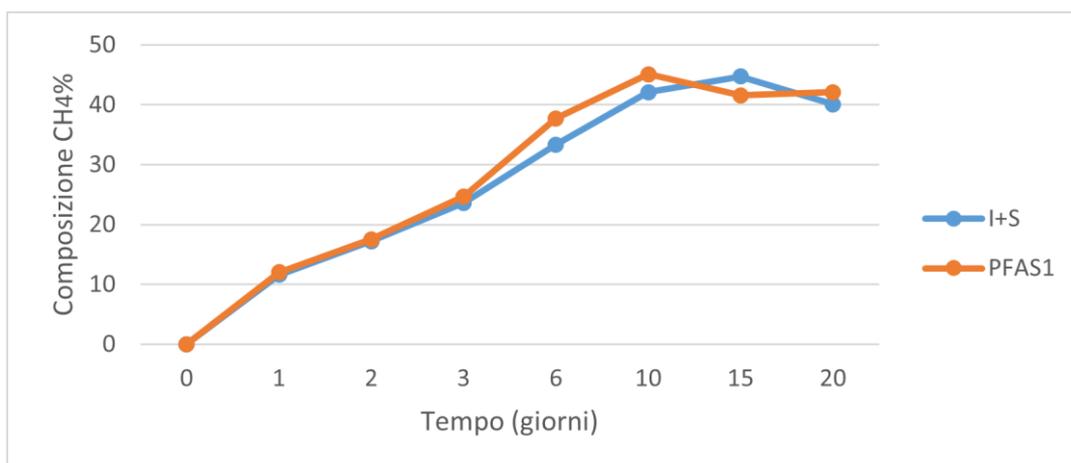


Figura 35 - Variazione nel tempo della composizione del CH<sub>4</sub> (test con aggiunta di 1mg L<sup>-1</sup> PFOS, PFBS E PFOS)

I massimi valori raggiunti sono anche in questo caso dalla condizione contenente PFAS e risultano più bassi rispetto alla concentrazione di 10 mg L<sup>-1</sup>: in questo caso è stato ottenuto il 47.10% (Figura 35) rispetto al 56.50% del test precedente (Figura 30).

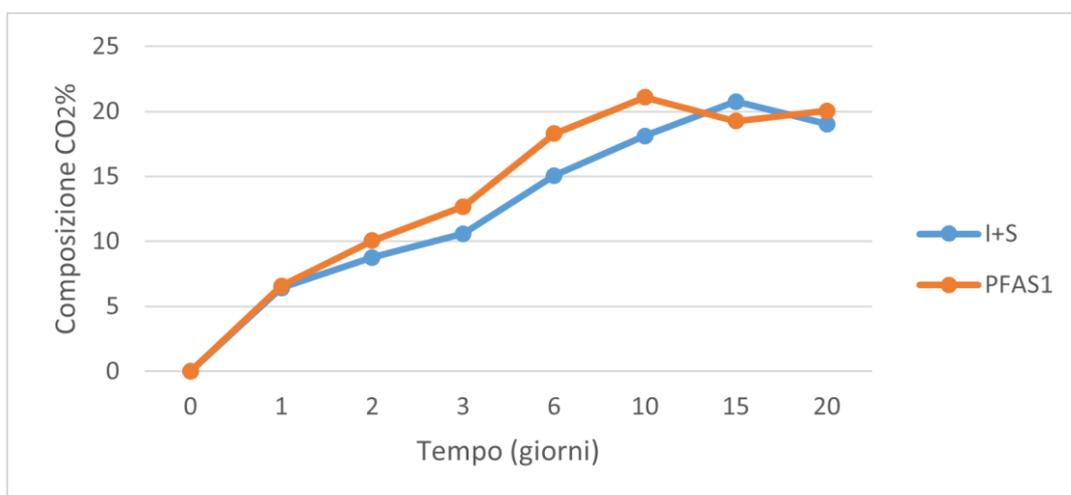


Figura 36 - Variazione nel tempo della composizione del CO<sub>2</sub> (test con aggiunta di 1mg L<sup>-1</sup> PFOS, PFBS E PFOS)

I valori di Kid ottenuti nell'ultimo test, come riportato in *Tabella 18*, appaiono quasi opposti a quelli del secondo test (*Tabella 16*): la retta della condizione PFAS10 infatti (*Figura 42* e *Figura 43* dei materiali supplementari) è caratterizzato da una pendenza minore e possiede cioè un coefficiente angolare minore, suggerendo di conseguenza una difficoltà nella degradazione del substrato forse causata dalla presenza di PFOS, PFBS e PFBA. La retta del PFAS1 però, risultando meno inclinata di quella di inoculo e substrato ed indicando quindi una degradazione più agevole non permette di affermare se la presenza dei PFAS portino ad un vantaggio o meno in termini di degradabilità del

substrato.

Tabella 18 - costante di idrolisi

<b>condizione</b>	<b>Costante di idrolisi (d<sup>-1</sup>)</b>	<b>R<sup>2</sup></b>
<b>I+S</b>	0.178	0.9693
<b>PFAS10</b>	0.204	0.9878

Secondo uno studio condotto da (Ochoa-Herrera et al., 2016) una riduzione dell'attività metanogenica idrogenotrofica pari al 20% rispetto al controllo causata dal PFOS si è verificata quando questo era presente alla concentrazione di 500 mg L<sup>-1</sup>. Lo stesso studio evidenzia tra i diversi composti sottoposti alla medesima sperimentazione che nemmeno il PFBS, utilizzato anch'esso nel secondo e terzo test di biometanazione della presente attività sperimentale, è risultato causare inibizione dell'attività metanogenica alla concentrazione di 200 mg L<sup>-1</sup>.

In questi studi non è stato invece testato il PFOA; sebbene alle concentrazioni testate in questo lavoro di tesi non sia stata riscontrata inibizione in termini di attività metanogenica, sarebbe interessante poter valutare tale molecola a concentrazioni ben maggiori essendo, assieme ad un'altra decina di PFAS, tra quelli più utilizzati in ambito commerciale.

Sempre parlando di contaminanti emergenti Mitchell et al. (Mitchell et al., 2013) hanno voluto approfondire la tematica sulla possibile inibizione nella produzione di biogas causata da diversi antibiotici nei processi di digestione anaerobica. Gli autori hanno osservato una diversa soglia di inibizione a seconda delle concentrazioni di antibiotici aggiunti durante la digestione anaerobica, ma ritengono improbabile che si manifestino riduzioni significative in scenari reali. Se da un lato non sembra essere necessario destare particolare attenzione alla produzione del biogas, d'altro canto non si può dire lo stesso di un problema ambientale con accezione più ampia, dato dalla contaminazione dei solidi digeriti piuttosto che dai prodotti di trasformazione di questi inquinanti e di conseguenza degli impatti a livello ecosistemico. Si osserva quindi ancora una volta l'assenza di fenomeni inibitori nella produzione di biogas anche con differenti contaminanti emergenti, risultati che non si discostano quindi da quelli ottenuti nella presente tesi.

### 3.3 Test statistico di Kolmogorov-Smirnov

Sebbene i grafici di produzione cumulativa ed SGP sembrano indicare un simile andamento per le tre condizioni testate, è necessario applicare dei test di significatività statistica per poter evidenziare una sostanziale equivalenza dell'andamento dei parametri per le tre condizioni. È stato deciso di applicare il test statistico di Kolmogorov-Smirnov, un test non parametrico che confronta la distribuzione cumulativa di due set di dati e la cui ipotesi  $H_0$  vuole che entrambi i set di dati provengano dalla stessa distribuzione. Tale ipotesi è stata testata, applicando il test, ai valori di produzione di biogas non cumulati e di SGP, ad un livello di significatività statistica del 5% ( $\alpha=0.05$ ). Per questo scopo è stato utilizzato il software Rstudio© (versione 4.0.2). Per evitare l'approssimazione dei risultati, i valori ripetuti (ties) sono stati esclusi. I risultati del test (Tabella 19) mostrano come, in base alla statistica D e al p-value sistematicamente  $>0.05$ , l'ipotesi nulla non possa essere rigettata e che quindi i dati provengano dalla stessa distribuzione. Si può quindi affermare come, considerando un livello di significatività statistica del 5%, l'andamento dei parametri considerati sia statisticamente simile.

Tabella 19 - test statistico di Kolmogorov-Smirnov

KS test su valori non cumulati di BIOGAS						valori (cumulati per definizione) di SGP (m3 biogas/ kg TVS)					
TEST CON PFOA						TEST CON PFOA					
I+S		PFOA1		PFOA10		I+S		PFOA1		PFOA10	
D	p-value	D	p-value	D	p-value	D	p-value	D	p-value	D	p-value
I+S		0.25	0.9639	0.25	0.981	I+S		0.125	1	0.25	0.981
PFOA1				0.25	0.981	PFOA1				0.25	0.981
PFOA10						PFOA10					
PRIMO TEST CON PFAS MIX						PRIMO TEST CON PFAS MIX					
I+S		PFAS1		PFAS10		I+S		PFAS1		PFAS10	
D	p-value	D	p-value	D	p-value	D	p-value	D	p-value	D	p-value
I+S		0.25	0.9801	0.25	0.9801	I+S		0.125	1	0.125	1
PFAS1				0.125	1	PFAS1				0.125	1
PFAS10						PFAS10					
SECONDO TEST CON PFAS MIX						SECONDO TEST CON PFAS MIX					
PFAS1						PFAS1					
D			p-value			D			p-value		
I+S	0.14286		1			I+S	0.14286		1		

### 3.4 Calcolo delle costanti di ripartizione

Dai test BMP è stato possibile calcolare il coefficiente di ripartizione solido-liquido ( $K_{SL}$ ) per PFOA, utile per conoscere in che misura i PFAS si distribuiscono nelle matrici acquose e solide, all'interno di un impianto di digestione anaerobica. Questa informazione è inoltre di fondamentale importanza per studiare gli equilibri di ripartizione che si instaurano in ambiente, in modo da poterne modellare il comportamento nei diversi comparti ambientali, con il fine di valutarne il destino ambientale.

$$K_{SL} = \frac{C_S \left(\frac{\text{mg}}{\text{kg}}\right)}{C_L \left(\frac{\text{mg}}{\text{L}}\right)}$$

I coefficienti di ripartizione solido-liquido ( $K_{SL}$ ) sono stati calcolati partendo dall'analisi della sola frazione liquida, in quanto l'analisi dei PFAS in una matrice complessa come possono essere i fanghi da trattamento acque reflue, risulta ad oggi essere ancora un punto critico. Nel dettaglio, l'analisi della frazione liquida è stata condotta rimuovendo la frazione solida tramite centrifugazione e filtrazione, ed analizzando la matrice tal quale tramite LC-MS. Le concentrazioni della frazione solida sono state estrapolate tramite un semplice bilancio di massa conservativo, approssimazione che è lecito condurre in quanto il PFOA è nota essere una sostanza persistente e quindi non subisce trasformazioni biochimiche durante tutta la durata dell'esperimento.

Tabella 20 - Valori del coefficiente di ripartizione ottenuti alla concentrazione di 1 e 10 mg L<sup>-1</sup> nei campioni prelevati in corrispondenza dell'apertura delle bottiglie.

Concentrazioni e giorni di apertura BMP	Log <sub>10</sub> Kd	Media valori
1-5	1.18	1.16
1-10	1.23	
1-15	1.10	
1-20	1.16	

In tabella 19 sono riportati i coefficienti di ripartizione di PFOA nella condizione a 1 mg L<sup>-1</sup>, con un valore medio di 1.16 ± 0.06 LKg<sup>-1</sup>. I dati ottenuti dalla presente attività sperimentale si discostano leggermente dai valori riportati recentemente in letteratura (Tabella 20 e Figura 37), in quanto, come già accennato nel paragrafo 1.2.2.2, i coefficienti di ripartizione dipendono fortemente dalla tipologia del fango che viene utilizzato (soprattutto in termini di tenore lipidico). In particolare, Ebrahimi e

collaboratori (Ebrahimi et al., 2021a) riportano una  $K_{SL} = 2$  per PFOA, utilizzando un diverso approccio sperimentale e un fango e substrato con differenti caratteristiche chimico fisiche. Per contestualizzare meglio questo tipo di dato, sarebbe utile condurre una caratterizzazione più approfondita del fango e del substrato per rilevare il tenore in lipidi e proteine considerando la generale affinità col materiale proteico mostrato dai PFAS, oltre alla diversa idrofilità dei PFAS a catena lunga rispetto a quelli a catena corta.

Un'altra informazione utile che si può ricavare dall'esperimento proposto è il tempo che ci impiega il sistema a raggiungere l'equilibrio. Il coefficiente di ripartizione, infatti, non varia durante tutta la durata dell'esperimento, indicando che l'equilibrio viene raggiunto praticamente nei primi istanti dell'esperimento, e che durante l'attività di digestione anaerobica, i processi biochimici non alterano la composizione dei solidi sospesi in maniera così marcata.

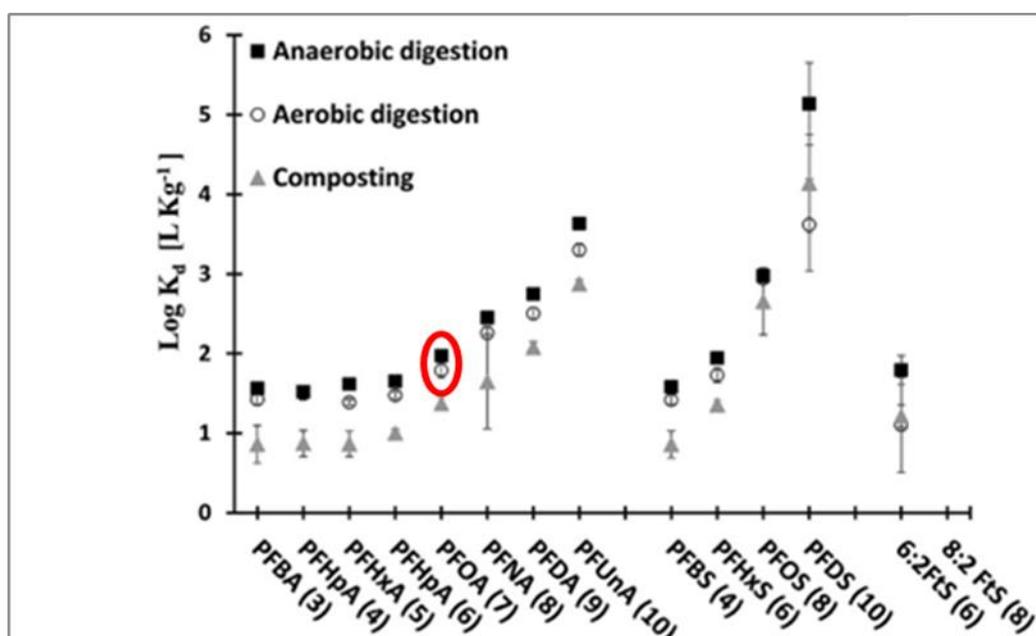


Figura 37- Coefficienti di ripartizione di diversi PFAS relativi a diversi metodi di stabilizzazione dei fanghi (Ebrahimi et al., 2021b)

## 4. Conclusioni e prospettive

In questo lavoro sperimentale sono stati indagati il destino e l'influenza dei PFAS nei processi di digestione anaerobica in modalità batch attraverso test di biometanazione e di ripartizione tra la fase solida e quella liquida. L'interesse ha riguardato quindi la possibilità che PFAS con diverse lunghezze di catena (C8 e C4), ovvero quelli diffusi in ambiente pre e post restrizioni legislative, potessero avere una diversa influenza nella produzione di biogas da fanghi secondari. Considerate le lacune circa il destino dei PFAS nei processi di digestione anaerobica, è stata determinata in secondo luogo la costante di ripartizione del PFOA per poter valutare la loro gestione negli impianti di trattamento delle acque reflue.

Considerando i risultati che sono stati ottenuti è possibile affermare che:

1. Le prove BMP non hanno riscontrato dei fenomeni di inibizione alle concentrazioni di PFAS applicate e si sono infatti rivelati degli andamenti simili tra la condizione di inoculo e substrato e le due concentrazioni di PFAS testate. Nonostante le variazioni talvolta riscontrate per alcune curve, i dati finali confermano che non siano state riscontrate differenze significative nelle tre condizioni. I dati ottenuti inoltre, confrontati con la letteratura non evidenziano particolari differenze in nessuna delle tre condizioni utilizzate, un'ulteriore prova a conferma cioè che i PFAS nelle condizioni applicate non comportano particolari differenze.
2. Per quanto riguarda le analisi relative alla ripartizione solido-liquido del PFOA, l'equilibrio è stato raggiunto in tempi brevi (poche ore) e questa informazione può essere utile in futuro per stabilire gli intervalli di campionamento, ad esempio già a qualche ora dall'inizio del test.
3. In futuro sarebbe interessante effettuare delle caratterizzazioni del fango e del substrato in modo molto più approfondito, in particolare per individuare quale sia la frazione lipidica (o proteica) ed anche quali siano i coefficienti di ripartizione di altri PFAS con minor tendenza di accumulo nelle frazioni lipidiche grazie alle catene carboniose più corte.
4. Queste informazioni aggiuntive, assieme ai valori del coefficiente di distribuzione di ciascun PFAS e le caratteristiche del fango, permetterebbero quindi di avere un quadro più generale per poter prevedere le quantità di PFAS che effettivamente vengono immesse in ambiente con i conseguenti effetti negativi grazie ad una migliore gestione degli impianti di depurazione.

## RINGRAZIAMENTI

Al termine di questo lavoro di tesi desidero fare alcuni ringraziamenti.

Innanzitutto, vorrei ringraziare la professoressa e relatrice Cristina Cavinato per avermi permesso di svolgere il tirocinio partecipando a questo studio sperimentale ed essermi stata vicino nei momenti di difficoltà. Ringrazio particolarmente Francesco Calore per avermi seguito nel mio lavoro di tesi durante tutto il periodo di sperimentazione e ringrazio anche Alessandro Bonetto per avermi supportata nelle analisi chimiche.

Un ringraziamento sentito va poi ai miei affetti più importanti, che seppur in modo diverso mi hanno aiutata ogni giorno nel mio percorso di studi e di vita.

Ringrazio Matteo, mio compagno di vita e di sogni, la persona che più amo e che desidero poter continuare a scoprire ogni giorno;

ringrazio mia mamma per essermi stata vicina in ogni strada che ho deciso di percorrere fino ad oggi, restando sempre un passo dietro a me per permettermi di esplorare il mondo ma abbastanza vicino per potermi sorreggere nel bisogno;

ed infine non può mancare un ringraziamento alla persona che negli anni è diventata il mio mentore, Donatella, per aver creduto in me quando ancora sedevo nei banchi di scuola e per essere diventata l'esempio che ogni giorno cerco di seguire.

Vanessa

## 5. Bibliografia

- Abubakar, U.A., Ajibike, M.A., Adie, D.B., 2018. Hydrolysis rates of domestic wastewater sludge using biochemical methane potential tests. *Niger. J. Technol.* 36, 1315. <https://doi.org/10.4314/njt.v36i4.43>
- Angelidaki, I., Alves, M., Bolzonella, D., Borzacconi, L., Campos, J.L., Guwy, A.J., Kalyuzhnyi, S., Jenicek, P., Van Lier, J.B., 2009. Defining the biomethane potential (BMP) of solid organic wastes and energy crops: A proposed protocol for batch assays. *Water Sci. Technol.* 59, 927–934. <https://doi.org/10.2166/wst.2009.040>
- Armstrong, D.L., Lozano, N., Rice, C.P., Ramirez, M., Torrents, A., 2016. Temporal trends of perfluoroalkyl substances in limed biosolids from a large municipal water resource recovery facility. *J. Environ. Manage.* 165, 88–95. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2015.09.023>
- Arvaniti, O.S., Asimakopoulos, A.G., Dasenaki, M.E., Ventouri, E.I., Stasinakis, A.S., Thomaidis, N.S., 2014. Simultaneous determination of eighteen perfluorinated compounds in dissolved and particulate phases of wastewater, and in sewage sludge by liquid chromatography-tandem mass spectrometry †. *Anal. Methods* 6, 1341–1349. <https://doi.org/10.1039/c3ay42015a>
- Arvaniti, O.S., Stasinakis, A.S., 2015. Review on the occurrence, fate and removal of perfluorinated compounds during wastewater treatment. *Sci. Total Environ.* 524–525, 81–92. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.04.023>
- Arvaniti, O.S., Ventouri, E.I., Stasinakis, A.S., Thomaidis, N.S., 2012. Occurrence of different classes of perfluorinated compounds in Greek wastewater treatment plants and determination of their solid-water distribution coefficients. *J. Hazard. Mater.* 239–240, 24–31. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2012.02.015>
- Belkouteb, N., Franke, V., McCleaf, P., Köhler, S., Ahrens, L., 2020. Removal of per- and polyfluoroalkyl substances (PFASs) in a full-scale drinking water treatment plant: Long-term performance of granular activated carbon (GAC) and influence of flow-rate. *Water Res.* 182, 115913. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.115913>
- Benskin, J.P., Ikonomou, M.G., Gobas, F.A.P.C., Begley, T.H., Woudneh, M.B., Cosgrove, J.R., 2013. Biodegradation of N-ethyl perfluorooctane sulfonamido ethanol (EtFOSE) and EtFOSE-based phosphate diester (SAmPAP diester) in marine sediments. *Environ. Sci. Technol.* 47, 1381–1389. <https://doi.org/10.1021/es304336r>

- Bolan, N., Sarkar, B., Yan, Y., Li, Q., Wijesekara, H., Kannan, K., Tsang, D.C.W., Schauerte, M., Bosch, J., Noll, H., Ok, Y.S., Scheckel, K., Kumpiene, J., Gobindlal, K., Kah, M., Sperry, J., Kirkham, M.B., Wang, H., Tsang, Y.F., Hou, D., Rinklebe, J., 2021. Remediation of poly- and perfluoroalkyl substances (PFAS) contaminated soils – To mobilize or to immobilize or to degrade? *J. Hazard. Mater.* 401. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.123892>
- Bolzonella, D., Pavan, P., Battistoni, P., Cecchi, F., 2005. Mesophilic anaerobic digestion of waste activated sludge: Influence of the solid retention time in the wastewater treatment process. *Process Biochem.* 40, 1453–1460. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2004.06.036>
- Bossi, R., Strand, J., Sortkjær, O., Larsen, M.M., 2008. Perfluoroalkyl compounds in Danish wastewater treatment plants and aquatic environments. *Environ. Int.* 34, 443–450. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2007.10.002>
- Brusseau, M.L., Anderson, R.H., Guo, B., 2020. PFAS concentrations in soils: Background levels versus contaminated sites. *Sci. Total Environ.* 740. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140017>
- Buck, R.C., Franklin, J., Berger, U., Conder, J.M., Cousins, I.T., Voogt, P. De, Jensen, A.A., Kannan, K., Mabury, S.A., van Leeuwen, S.P.J., 2011. Perfluoroalkyl and polyfluoroalkyl substances in the environment: Terminology, classification, and origins. *Integr. Environ. Assess. Manag.* 7, 513–541. <https://doi.org/10.1002/ieam.258>
- Carballa, M., Omil, F., Alder, A.C., Lema, J.M., 2006. Comparison between the conventional anaerobic digestion of sewage sludge and its combination with a chemical or thermal pre-treatment concerning the removal of pharmaceuticals and personal care products. *Water Sci. Technol.* 53, 109–117. <https://doi.org/10.2166/wst.2006.241>
- Carballa, M., Omil, F., Ternes, T., Lema, J.M., 2007. Fate of pharmaceutical and personal care products (PPCPs) during anaerobic digestion of sewage sludge. *Water Res.* 41, 2139–2150. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2007.02.012>
- Casal, P., González-Gaya, B., Zhang, Y., Reardon, A.J.F., Martin, J.W., Jiménez, B., Dachs, J., 2017. Accumulation of Perfluoroalkylated Substances in Oceanic Plankton. *Environ. Sci. Technol.* 51, 2766–2775. <https://doi.org/10.1021/acs.est.6b05821>
- Cecchi, F., Battistoni, P., Pavan, P., Bolzanella, D., Innocenti, L., 2005. Digestione anaerobica della frazione organica dei rifiuti solidi. APAT Agenzia per la Prot. dell'ambiente e per i Serv. Tec.

178.

- CECCHI, F., PAVAN, P., MATAALVAREZ, J., BASSETTI, A., COZZOLINO, C., 1991. Anaerobic digestion of municipal solid waste: Thermophilic vs. mesophilic performance at high solids. *Waste Manag. Res.* 9, 305–315. [https://doi.org/10.1016/0734-242x\(91\)90020-8](https://doi.org/10.1016/0734-242x(91)90020-8)
- Cheah, Y.K., Dosta, J., 2018. Study of the effects of temperature and pH on acidogenic fermentation process from organic fraction of municipal solid waste 1–12.
- Collivignarelli, M.C., Abbà, A., Frattarola, A., Miino, M.C., Padovani, S., Katsoyiannis, I., Torretta, V., 2019. Legislation for the reuse of biosolids on agricultural land in Europe: Overview. *Sustain.* <https://doi.org/10.3390/su11216015>
- Cordiano, A.V., Cavasin, F., Bertola, F., 2019. LE SOSTANZE PERFLUOROALCHILICHE (PFAS). Council of European Union, 2020. No Title.
- Cousins, I.T., Goldenman, G., Herzke, D., Lohmann, R., Miller, M., Ng, C.A., Patton, S., Scheringer, M., Trier, X., Vierke, L., Wang, Z., Dewitt, J.C., 2019. The concept of essential use for determining when uses of PFASs can be phased out. *Environ. Sci. Process. Impacts* 1803–1815. <https://doi.org/10.1039/c9em00163h>
- Da Silva, C., Astals, S., Peces, M., Campos, J.L., Guerrero, L., 2018. Biochemical methane potential (BMP) tests: Reducing test time by early parameter estimation. *Waste Manag.* 71, 19–24. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2017.10.009>
- Dassuncao, C., Hu, X.C., Nielsen, F., Weihe, P., Grandjean, P., Sunderland, E.M., 2018. Shifting Global Exposures to Poly- and Perfluoroalkyl Substances (PFASs) Evident in Longitudinal Birth Cohorts from a Seafood-Consuming Population. *Environ. Sci. Technol.* 52, 3738–3747. <https://doi.org/10.1021/acs.est.7b06044>
- Dasu, K., Liu, J., Lee, L.S., 2012. Aerobic Soil Biodegradation of 8:2 Fluorotelomer Stearate Monoester. *Environmental Sci. Technol.* 46, 3831–3836. <https://doi.org/10.1021/es203978g>
- De Baere, L., 2008. Partial stream digestion of residual municipal solid waste. *Water Sci. Technol.* 57, 1073–1077. <https://doi.org/10.2166/wst.2008.078>
- Dean, W.S., Adejumo, H.A., Caiati, A., Garay, P.M., Harmata, A.S., Li, L., Rodriguez, E.E., Sundar, S., 2020. A Framework for Regulation of New and Existing PFAS by EPA. *J. Sci. Policy Gov.* 16.

- Ebrahimi, F., Lewis, A.J., Sales, C.M., Suri, R., McKenzie, E.R., 2021a. Linking PFAS partitioning behavior in sewage solids to the solid characteristics, solution chemistry, and treatment processes. *Chemosphere* 271, 129530. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.129530>
- Ebrahimi, F., Lewis, A.J., Sales, C.M., Suri, R., McKenzie, E.R., 2021b. Linking PFAS partitioning behavior in sewage solids to the solid characteristics, solution chemistry, and treatment processes. *Chemosphere* 271, 129530. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.129530>
- Ellis D.A., Martin J.W., De Silva A.O., Mabury S.A., Hurley M.D., Sulbaek Andersen M.P., W.T.J., 2004. Degradation of Fluorotelomer Alcohols: A Likely Atmospheric Source of Perfluorinated Carboxylic Acids. *Environ. Sci. Technol.* 38, 3316–3321. <https://doi.org/10.1021/es049860w>
- ENEA, 2020. Il problema della rimozione dei PFAS dalle acque per uso civile: trattamento mediante irraggiamento elettronico. 26.
- Eriksson, U., Haglund, P., Kärrman, A., 2017. Contribution of precursor compounds to the release of per- and polyfluoroalkyl substances (PFASs) from waste water treatment plants (WWTPs). *J. Environ. Sci. (China)* 61, 80–90. <https://doi.org/10.1016/j.jes.2017.05.004>
- Eschauzier, C., Raat, K.J., Stuyfzand, P.J., De Voogt, P., 2013. Perfluorinated alkylated acids in groundwater and drinking water: Identification, origin and mobility. *Sci. Total Environ.* 458–460, 477–485. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2013.04.066>
- Fair, P.A., Houde, M., 2018. Poly- and perfluoroalkyl substances in marine mammals, in: *Marine Mammal Ecotoxicology: Impacts of Multiple Stressors on Population Health*. Academic Press, pp. 117–145. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812144-3.00005-X>
- Fricke, K., Santen, H., Wallmann, R., 2005. Comparison of selected aerobic and anaerobic procedures for MSW treatment. *Waste Manag.* 25, 799–810. <https://doi.org/10.1016/J.WASMAN.2004.12.018>
- Gallen, C., Eaglesham, G., Drage, D., Nguyen, T.H., Mueller, J.F., 2018. A mass estimate of perfluoroalkyl substance (PFAS) release from Australian wastewater treatment plants. *Chemosphere* 208, 975–983. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.06.024>
- García, O.D.V., Neto, A.M.P., Moretto, M.R.D., Zaiat, M., Martins, G., 2019. Influence of food-to-microorganism ratio ( F / M ) on methane production in Biochemical Methane Potential ( BMP ) assays with sugarcane vinasse 1–4.
- Gazzetta ufficiale dell'Unione europea, 2017. No Title.

- Glüge, J., Scheringer, M., Cousins, I.T., Dewitt, J.C., Goldenman, G., Herzke, D., Lohmann, R., Ng, C.A., Trier, X., Wang, Z., 2020. An overview of the uses of per- And polyfluoroalkyl substances (PFAS). *Environ. Sci. Process. Impacts* 22, 2345–2373. <https://doi.org/10.1039/d0em00291g>
- Gobelius, L., Hedlund, J., Dürig, W., Tröger, R., Lilja, K., Wiberg, K., Ahrens, L., 2018. Per- and Polyfluoroalkyl Substances in Swedish Groundwater and Surface Water: Implications for Environmental Quality Standards and Drinking Water Guidelines. *Environ. Sci. Technol.* 52, 4340–4349. <https://doi.org/10.1021/acs.est.7b05718>
- Guerra, P., Kim, M., Kinsman, L., Ng, T., Alaei, M., Smyth, S.A., 2014. Parameters affecting the formation of perfluoroalkyl acids during wastewater treatment. *J. Hazard. Mater.* 272, 148–154. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2014.03.016>
- Hamid, H., Li, L., 2016. Role of wastewater treatment plant (WWTP) in environmental cycling of poly- and perfluoroalkyl (PFAS) compounds. *Ecocycles* 2, 43–53. <https://doi.org/10.19040/ecocycles.v2i2.62>
- Hu, X.C., Andrews, D.Q., Lindstrom, A.B., Bruton, T.A., Schaider, L.A., Grandjean, P., Lohmann, R., Carignan, C.C., Blum, A., Balan, S.A., Higgins, C.P., Sunderland, E.M., 2016. Detection of Poly- and Perfluoroalkyl Substances (PFASs) in U.S. Drinking Water Linked to Industrial Sites, Military Fire Training Areas, and Wastewater Treatment Plants. *Environ. Sci. Technol. Lett.* 3, 344–350. <https://doi.org/10.1021/acs.estlett.6b00260>
- ITRC, 2017. History and Use of Per- and Polyfluoroalkyl Substances (PFAS).
- Jacob, P., Barzen-Hanson, K.A., Helbling, D.E., 2021. Target and nontarget analysis of per- And polyfluoroalkyl substances in wastewater from electronics fabrication facilities. *Environ. Sci. Technol.* 55, 2346–2356. <https://doi.org/10.1021/acs.est.0c06690>
- Kelleher, B.P., Leahy, J.J., Henihan, A.M., O'Dwyer, T.F., Sutton, D., Leahy, M.J., 2002. Advances in poultry litter disposal technology - A review. *Bioresour. Technol.* 83, 27–36. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(01\)00133-X](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(01)00133-X)
- KEMI, 2015. Occurrence and use of highly fluorinated substances and alternatives.
- Land, M., De Wit, C.A., Bignert, A., Cousins, I.T., Herzke, D., Johansson, J.H., Martin, J.W., 2018. What is the effect of phasing out long-chain per- and polyfluoroalkyl substances on the concentrations of perfluoroalkyl acids and their precursors in the environment? A systematic review. *Environ. Evid.* 7, 1–13. <https://doi.org/10.1186/s13750-017-0114-y>

- Lange, C.C., Lundberg, J.K., Services, P.A., Division, S.S., 2000. Aerobic Biodegradation of N-EtFOSE alcohol. Solutions.
- Leea et al., 2020, 2020. Concentration and distribution of per- and polyfluoroalkyl substances (PFAS) in the Asan Lake area of South Korea. *J. Hazard. Mater.* 381, 13.
- Leite, W.R.M., Gottardo, M., Pavan, P., Belli Filho, P., Bolzonella, D., 2016. Performance and energy aspects of single and two phase thermophilic anaerobic digestion of waste activated sludge. *Renew. Energy* 86, 1324–1331. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2015.09.069>
- Letcher, R.J., Chu, S., Smyth, S.A., 2020. Side-chain fluorinated polymer surfactants in biosolids from wastewater treatment plants. *J. Hazard. Mater.* 388, 122044. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.122044>
- Li, Y., Bräunig, J., Angelica, G.C., Thai, P.K., Mueller, J.F., Yuan, Z., 2021. Formation and partitioning behaviour of perfluoroalkyl acids (PFAAs) in waste activated sludge during anaerobic digestion. *Water Res.* 189, 116583. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.116583>
- Lindstrom, A.B., Strynar, M.J., Libelo, E.L., 2011. Polyfluorinated compounds: Past, present, and future. *Environ. Sci. Technol.* 45, 7954–7961. <https://doi.org/10.1021/es2011622>
- Liu, J., Mejia Avendaño, S., 2013. Microbial degradation of polyfluoroalkyl chemicals in the environment: A review. *Environ. Int.* 61, 98–114. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2013.08.022>
- Liu, J., Wang, N., Szostek, B., Buck, R.C., Panciroli, P.K., Folsom, P.W., Sulecki, L.M., Bellin, C.A., 2010. 6-2 Fluorotelomer alcohol aerobic biodegradation in soil and mixed bacterial culture. *Chemosphere* 78, 437–444. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.10.044>
- M. Ateia, M.A. et al., 2019. Cationic polymer for selective removal of GenX and short-chain PFAS from surface waters and wastewaters at ng/L levels | Elsevier Enhanced Reader [WWW Document]. *Water Res.* URL <https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S0043135419306402?token=EA0DEF467673C8E234DA44775438F76AA4BEED7A0663FCFF23FD3F1D1C3EBA62CA7CD09EFB0D63FFF0DDA2EDCD099AE&originRegion=eu-west-1&originCreation=20210721104226> (accessed 7.21.21).
- Mace, S., Bolzonella, D., Cecchi, F., Mata-Alvarez, J., 2003. Comparison of the biodegradability of the grey fraction of municipal solid waste of Barcelona in mesophilic and thermophilic conditions, in: *Water Science and Technology*. pp. 21–28. <https://doi.org/10.2166/wst.2003.0212>

- Mitchell, S.M., Ullman, J.L., Teel, A.L., Watts, R.J., Frear, C., 2013. The effects of the antibiotics ampicillin, florfenicol, sulfamethazine, and tylosin on biogas production and their degradation efficiency during anaerobic digestion. *Bioresour. Technol.* 149, 244–252. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.09.048>
- Moodie, D., Coggan, T., Berry, K., Kolobaric, A., Fernandes, M., Lee, E., Reichman, S., Nuggeoda, D., Clarke, B.O., 2021. Legacy and emerging per- and polyfluoroalkyl substances (PFASs) in Australian biosolids. *Chemosphere* 270, 129143. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.129143>
- Munoz, G., Labadie, P., Botta, F., Lestremay, F., Lopez, B., Geneste, E., Pardon, P., Dévier, M.H., Budzinski, H., 2017. Occurrence survey and spatial distribution of perfluoroalkyl and polyfluoroalkyl surfactants in groundwater, surface water, and sediments from tropical environments. *Sci. Total Environ.* 607–608, 243–252. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.06.146>
- Neves, L., Oliveira, R., Alves, M.M., 2004. Influence of inoculum activity on the bio-methanization of a kitchen waste under different waste/inoculum ratios. *Process Biochem.* 39, 2019–2024. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2003.10.002>
- Nordic Council, 2019. PFASs in the Nordic Environment.
- Ochoa-Herrera, V., Field, J.A., Luna-Velasco, A., Sierra-Alvarez, R., 2016. Microbial toxicity and biodegradability of perfluorooctane sulfonate (PFOS) and shorter chain perfluoroalkyl and polyfluoroalkyl substances (PFASs). *Environ. Sci. Process. Impacts* 18, 1236–1246. <https://doi.org/10.1039/c6em00366d>
- Ojo, A.F., Peng, C., Ng, J.C., 2021. Assessing the human health risks of per- and polyfluoroalkyl substances: A need for greater focus on their interactions as mixtures. *J. Hazard. Mater.* 407, 124863. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.124863>
- Oliaei, F., Kriens, D., Weber, R., Watson, A., 2013. PFOS and PFC releases and associated pollution from a PFC production plant in Minnesota (USA). *Environ. Sci. Pollut. Res.* 20, 1977–1992. <https://doi.org/10.1007/s11356-012-1275-4>
- Organtini, K., Rosnack, K., Stevens, D., Ross, E., 2020. Analysis of Legacy and Emerging Perfluorinated Alkyl Substances (PFAS) in Environmental Water Samples Using SPE and LC-MS/MS. *Waters* 1–10.

- Oyedun, A.O., 2015. OPTIMISATION OF SEWAGE SLUDGE LOGISTICS IN WASTEWATER TREATMENT PLANTS.
- Pan, Y., Zhang, H., Cui, Q., Sheng, N., Yeung, L.W.Y., Sun, Y., Guo, Y., Dai, J., 2018. Worldwide Distribution of Novel Perfluoroether Carboxylic and Sulfonic Acids in Surface Water. *Environ. Sci. Technol.* 52, 7621–7629. <https://doi.org/10.1021/acs.est.8b00829>
- Paul, A.G., Jones, K.C., Sweetman, A.J., 2009. A First Global Production , Emission , And Environmental Inventory For Perfluorooctane Sulfonate. *Environ. Sci. Technol.* 43, 386–392.
- Pérez, F., Nadal, M., Navarro-Ortega, A., Fàbrega, F., Domingo, J.L., Barceló, D., Farré, M., 2013. Accumulation of perfluoroalkyl substances in human tissues. *Environ. Int.* 59, 354–362. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2013.06.004>
- Raposo, F., De La Rubia, M.A., Fernández-Cegrí, V., Borja, R., 2011. Anaerobic digestion of solid organic substrates in batch mode: An overview relating to methane yields and experimental procedures. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 16, 861–877. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2011.09.008>
- Rashid, R., Shafiq, I., Akhter, P., Iqbal, M.J., Hussain, M., 2021. A state-of-the-art review on wastewater treatment techniques: the effectiveness of adsorption method. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 28, 9050–9066. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-12395-x>
- Rodowa, A.E., Knappe, D.R.U., Chiang, S.Y.D., Pohlmann, D., Varley, C., Bodour, A., Field, J.A., 2020. Pilot scale removal of per- and polyfluoroalkyl substances and precursors from AFFF-impacted groundwater by granular activated carbon. *Environ. Sci. Water Res. Technol.* 6, 1083–1094. <https://doi.org/10.1039/c9ew00936a>
- Ross, I., McDonough, J., Miles, J., Storch, P., Thelakkat Kochunarayanan, P., Kalve, E., Hurst, J., S. Dasgupta, S., Burdick, J., 2018. A review of emerging technologies for remediation of PFASs. *Remediation* 28, 101–126. <https://doi.org/10.1002/rem.21553>
- Royer, L.A., Lee, L.S., Turco, R., Nies, L.F., Filley, T., Anderson, J., 2011. An Investigation of the Biodegradation Potential of 8:2 Fluorotelomer Esters in Environmentally Relevant Systems.
- Ruiz-Hernando, M., Martín-Díaz, J., Labanda, J., Mata-Alvarez, J., Llorens, J., Lucena, F., Astals, S., 2014. Effect of ultrasound, low-temperature thermal and alkali pre-treatments on waste activated sludge rheology, hygienization and methane potential. *Water Res.* 61, 119–129. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.05.012>

- Scheringer, M., Trier, X., Cousins, I.T., de Voogt, P., Fletcher, T., Wang, Z., Webster, T.F., 2014. Helsingør Statement on poly- and perfluorinated alkyl substances (PFASs). *Chemosphere* 114, 337–339. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.05.044>
- Schmidt, N., Fauvelle, V., Castro-Jiménez, J., Lajaunie-Salla, K., Pinazo, C., Yohia, C., Sempéré, R., 2019. Occurrence of perfluoroalkyl substances in the Bay of Marseille (NW Mediterranean Sea) and the Rhône River. *Mar. Pollut. Bull.* 149, 110491. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2019.110491>
- Seo, S.H., Son, M.H., Shin, E.S., Choi, S.D., Chang, Y.S., 2019. Matrix-specific distribution and compositional profiles of perfluoroalkyl substances (PFASs) in multimedia environments. *J. Hazard. Mater.* 364, 19–27. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2018.10.012>
- Sinclair, E., Kannan, K., 2006. Research Mass Loading and Fate of Perfluoroalkyl Surfactants in Wastewater Treatment Plants. *Environ. Sci. Technol.* 40, 1408–1414. <https://doi.org/10.1021/es051798v>
- Stasinakis, A.S., 2012. Review on the fate of emerging contaminants during sludge anaerobic digestion. *Bioresour. Technol.* 121, 432–440. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.06.074>
- Stasinakis, A.S., Thomaidis, N.S., Arvaniti, O.S., Asimakopoulos, A.G., Samaras, V.G., Ajibola, A., Mamais, D., Lekkas, T.D., 2013. Contribution of primary and secondary treatment on the removal of benzothiazoles, benzotriazoles, endocrine disruptors, pharmaceuticals and perfluorinated compounds in a sewage treatment plant. *Sci. Total Environ.* 463–464, 1067–1075. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.06.087>
- Sunderland, E.M., Hu, X.C., Dassuncao, C., Tokranov, A.K., Wagner, C.C., Allen, J.G., 2019. A review of the pathways of human exposure to poly- and perfluoroalkyl substances (PFASs) and present understanding of health effects. *J. Expo. Sci. Environ. Epidemiol.* 29, 131–147. <https://doi.org/10.1038/s41370-018-0094-1>
- Tabatabaei, M., Rahim, R.A., Abdullah, N., Wright, A.D.G., Shirai, Y., Sakai, K., Sulaiman, A., Hassan, M.A., 2010. Importance of the methanogenic archaea populations in anaerobic wastewater treatments. *Process Biochem.* <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2010.05.017>
- Trojanowicz, M., Bojanowska-Czajka, A., Bartosiewicz, I., Kulisa, K., 2018. Advanced Oxidation/Reduction Processes treatment for aqueous perfluorooctanoate (PFOA) and perfluorooctanesulfonate (PFOS) – A review of recent advances. *Chem. Eng. J.* 336, 170–199.

<https://doi.org/10.1016/j.cej.2017.10.153>

- Van Velsen, A.F.M., 1979. Adaptation of methanogenic sludge to high ammonia-nitrogen concentrations. *Water Res.* 13, 995–999. [https://doi.org/10.1016/0043-1354\(79\)90194-5](https://doi.org/10.1016/0043-1354(79)90194-5)
- Venegas, M., Leiva, A.M., Reyes-Contreras, C., Neumann, P., Piña, B., Vidal, G., 2021. Presence and fate of micropollutants during anaerobic digestion of sewage and their implications for the circular economy: A short review. *J. Environ. Chem. Eng.* 9. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2020.104931>
- Wang, N., Liu, J., Buck, R.C., Korzeniowski, S.H., Wolstenholme, B.W., Folsom, P.W., Sulecki, L.M., 2011. Chemosphere 6 : 2 Fluorotelomer sulfonate aerobic biotransformation in activated sludge of waste water treatment plants. *Chemosphere* 82, 853–858. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.11.003>
- Wang, Q., Ye, L., Jiang, G., Jensen, P.D., Batstone, D.J., Yuan, Z., 2013. Free nitrous acid (FNA)-based pretreatment enhances methane production from waste activated sludge. *Environ. Sci. Technol.* 47, 11897–11904. <https://doi.org/10.1021/es402933b>
- Wang, Z., Cousins, I.T., Scheringer, M., Buck, R.C., Hungerbühler, K., 2014. Global emission inventories for C4-C14 perfluoroalkyl carboxylic acid (PFCA) homologues from 1951 to 2030, Part I: Production and emissions from quantifiable sources. *Environ. Int.* 70, 62–75. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2014.04.013>
- Wang, Z., Dewitt, J.C., Higgins, C.P., Cousins, I.T., 2017. A Never-Ending Story of Per- and Polyfluoroalkyl Substances (PFASs)? *Environ. Sci. Technol.* 51, 2508–2518. <https://doi.org/10.1021/acs.est.6b04806>
- Wei, W., Zhou, X., Wang, D., Sun, J., Wang, Q., 2017. Free ammonia pre-treatment of secondary sludge significantly increases anaerobic methane production. *Water Res.* 118, 12–19. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.04.015>
- Wen, W., Xia, X., Zhou, D., Wang, H., Zhai, Y., Lin, H., Chen, J., Hu, D., 2019. Bioconcentration and tissue distribution of shorter and longer chain perfluoroalkyl acids (PFAAs) in zebrafish (*Danio rerio*): Effects of perfluorinated carbon chain length and zebrafish protein content. *Environ. Pollut.* 249, 277–285. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.03.003>
- Zhang, D.Q., Zhang, W.L., Liang, Y.N., 2019. Adsorption of perfluoroalkyl and polyfluoroalkyl substances (PFASs) from aqueous solution - A review. *Sci. Total Environ.*

<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.133606>

Zhang, W., Cao, H., Mahadevan Subramanya, S., Savage, P., Liang, Y., 2020. Destruction of Perfluoroalkyl Acids Accumulated in *Typha latifolia* through Hydrothermal Liquefaction. *ACS Sustain. Chem. Eng.* 8, 9257–9262. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.0c03249>

Zhang, W., Liang, Y., 2021. Effects of hydrothermal treatments on destruction of per- and polyfluoroalkyl substances in sewage sludge. *Environ. Pollut.* 285, 117276. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.117276>

Zhou, Y., Meng, J., Zhang, M., Chen, S., He, B., Zhao, H., Li, Q., Zhang, S., Wang, T., 2019. Which type of pollutants need to be controlled with priority in wastewater treatment plants: Traditional or emerging pollutants? *Environ. Int.* 131. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.104982>

## 6. Sitografia

Agenzia regionale per la protezione dell'ambiente (ARPA LOMPARDIA) (2021)

Fonte: <https://www.arpalombardia.it/Pages/Acque-Reflue/Di-cosa-si-tratta.aspx>

Commissione Europea (2013). DIRETTIVA 2013/39/UE.

Fonte: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/IT/TXT/PDF/?uri=CELEX:32013L0039&from=EN>

Council of European Union (2020). Review of the drinking water directive.

Fonte: [https://ec.europa.eu/environment/water/water-drink/review\\_en.html](https://ec.europa.eu/environment/water/water-drink/review_en.html)

European Environment Agency (EEA) (2019). Emerging chemical risks in Europe – “PFAS”

Fonte: <https://www.eea.europa.eu/publications/emerging-chemical-risks-in-europe>

European Environment Agency (EEA) (2019). Urban waste water treatment for 21<sup>st</sup> century challenges. Fonte: <https://www.eea.europa.eu/publications/urban-waste-water-treatment-for>

Eureau (2017). PFAS and drinking water.

Fonte: <https://www.eureau.org/resources/briefing-notes/5236-briefing-note-on-pfas-and-drinking-water/file>

Gazzetta ufficiale della repubblica italiana (2016). D.Lgs. 13 ottobre 2015, n° 172 che recepisce la direttiva 2013/39/UE sull'ampliamento dell'elenco delle sostanze prioritarie contenuto nella direttiva 2000/60/CE.

Fonte:

[http://www.gazzettaufficiale.it/atto/serie\\_generale/caricaDettaglioAtto/originario?atto.dataPubblicazioneGazzetta=2016-07-16&atto.codiceRedazionale=16A05182&elenco30giorni=true](http://www.gazzettaufficiale.it/atto/serie_generale/caricaDettaglioAtto/originario?atto.dataPubblicazioneGazzetta=2016-07-16&atto.codiceRedazionale=16A05182&elenco30giorni=true)

Gazzetta ufficiale della repubblica italiana (2016). Decreto MATT 06/07/2016 “Recepimento Direttiva 2014/80/UE che modifica l'allegato II alla direttiva 2006/18/CE sulla protezione delle acque sotterranee dall'inquinamento e dal deterioramento”

Gazzetta ufficiale dell'Unione europea (2017)

Fonte:

[http://www.gazzettaufficiale.it/atto/serie\\_generale/caricaDettaglioAtto/originario?atto.dataPubblicazioneGazzetta=2016-07](http://www.gazzettaufficiale.it/atto/serie_generale/caricaDettaglioAtto/originario?atto.dataPubblicazioneGazzetta=2016-07)

Tutto ambiente (). Le differenze tra acque reflue domestiche e industriali.

Fonte: <https://www.tuttoambiente.it/commenti-premium/le-differenze-tra-acque-reflue-domestiche-e-industriali/>

Fonte: <https://guelph.ca/wp-content/uploads/IntroductionToWastewater.pdf>

Fonte: <https://www.tuttoambiente.it/commenti-premium/le-differenze-tra-acque-reflue-domestiche-e-industriali/>

## 7. Materiali supplementari:

### 7.1 Appendice I: valori composizione biogas

Tabella 21 - composizione biogas PFOA

ORE	GIORNI	CH <sub>4</sub>			CO <sub>2</sub>			O <sub>2</sub>			H <sub>2</sub> S		
		PFOA1	PFOA10	A	PFOA1	PFOA10	A	PFOA1	PFOA10	A -	PFOA1	PFOA10	A
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
20	1 *	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
48	2	16.84	18.98	14.77	9.50	10.47	10.55	3.00	1.16	0.68	37	74	100
72	3	24.99	20.34	21.54	12.79	13.35	9.51	1.74	0.98	8.48	71	93	29
96	4	32.59	27.10	27.76	15.39	13.32	9.51	1.60	1.05	5.70	61	86	23
168	7	42.17	42.98	36	17.40	18.25	14.90	1.60	0.86	6.10	65	82	70
240	10	44.80	44.83	38.58	19.19	19.26	17.20	2.27	1.89	3.50	105	82	102
360	15	47.84	48.39	39.9	20.69	21.39	17.89	2.56	2.13	4.89	68	95	83
504	21 *	27.44	42.61	38.91	11.89	19.09	17.82	10.72	5.84	6.58	16	56	68

\*poco gas nelle gas bag: misurazioni poco affidabili

Tabella 22 - composizione biogas PFOS, PFBS e PFBA (primo test)

ORE	GIORNI	CH <sub>4</sub>			CO <sub>2</sub>			O <sub>2</sub>			H <sub>2</sub> S	
		PFAS1	PFAS10	A	PFAS1	PFAS10	A	PFAS1	PFAS10	A	PFAS1	PFAS10
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
20	1	26.88	27.02	25.80	9.67	8.84	9.77	0.77	0.63	0.95	28.00	41.00
48	2	37.90	40.62	33.8	15.43	15.45	13.86	1.51	0.77	2.42	104	87
72	3	42.73	43.70	38.96	18.47	18.53	16.72	1.50	0.87	2.65	19	43
144	6	53.99	54.32	50.33	23.04	23.37	22.41	0.69	0.66	0.85	62	71
/	7*	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
240	10	38.68	47.05	33.85	18.01	21.24	15.08	8.68	5.16	9.90	54	60
360	15	24.37	35.93	31.46	11.08	15.22	14.63	15.50	11.48	12.49	-12	0
480	21	55.02	56.50	55.1	24.65	25.40	24.95	3.59	3.20	3.12	47	63

\*Misurazione non effettuata e accumulata quindi con la seguente

Note:

Nel diciassettesimo giorno vi è stata un'interruzione della corrente;

Le misurazioni del PFAS1 presentano delle concentrazioni errate e la composizione reale è quindi stata misurata nel test successivo (Tabella 23)

Tabella 23 - composizione biogas PFOS, PFBS e PFBA (secondo test)

ORE	GIORNI	CH <sub>4</sub>		CO <sub>2</sub>		O <sub>2</sub>		H <sub>2</sub> S	
		PFAS1	A	PFAS1	A	PFAS1	A	PFAS1	A
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
24	1	12.03	11.61	6.59	6.42	3.69	1.33	29	90
47	2	17.52	17.23	10.07	8.77	2.83	4.27	8	44
71	3	24.66	23.6	12.69	10.60	3.04	4.20	-6	27
95	6	37.74	33.36	18.30	15.07	1.07	3.06	80	50
215	10	47.10	42.1	21.08	18.10	1.22	3.14	116	116
335.5	15	41.54	44.72	19.25	20.76	2.86	2.26	90	68
455.5	210	42.08	40.08	20.03	19.02	4.49	4.68	29	6

## 7.2 Appendice 2: Grafici BMP

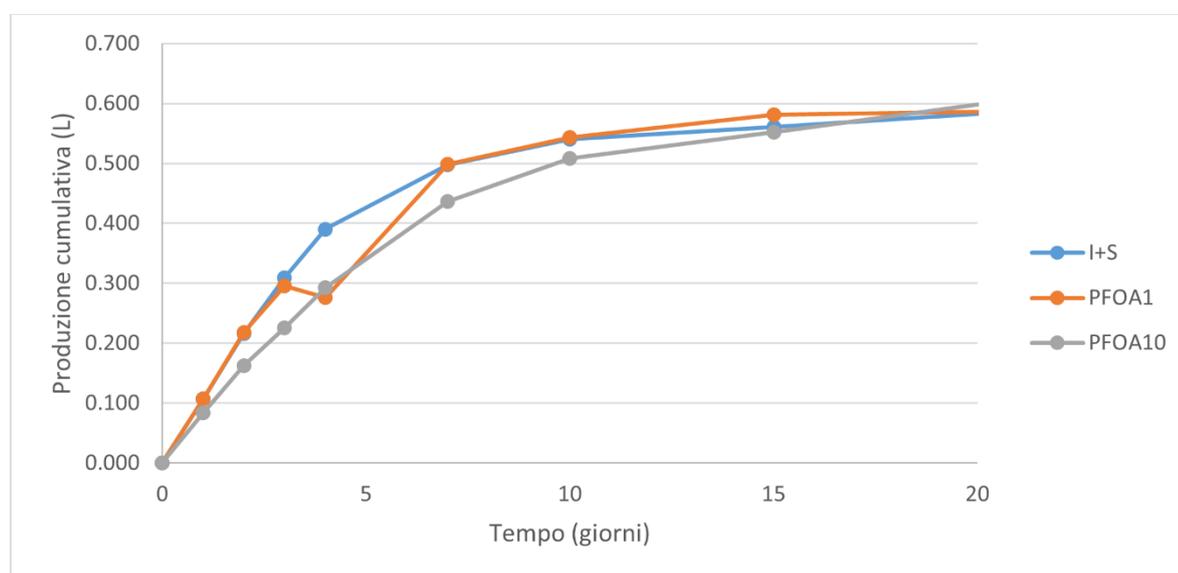


Figura 38 - Produzione cumulativa del test con PFOA

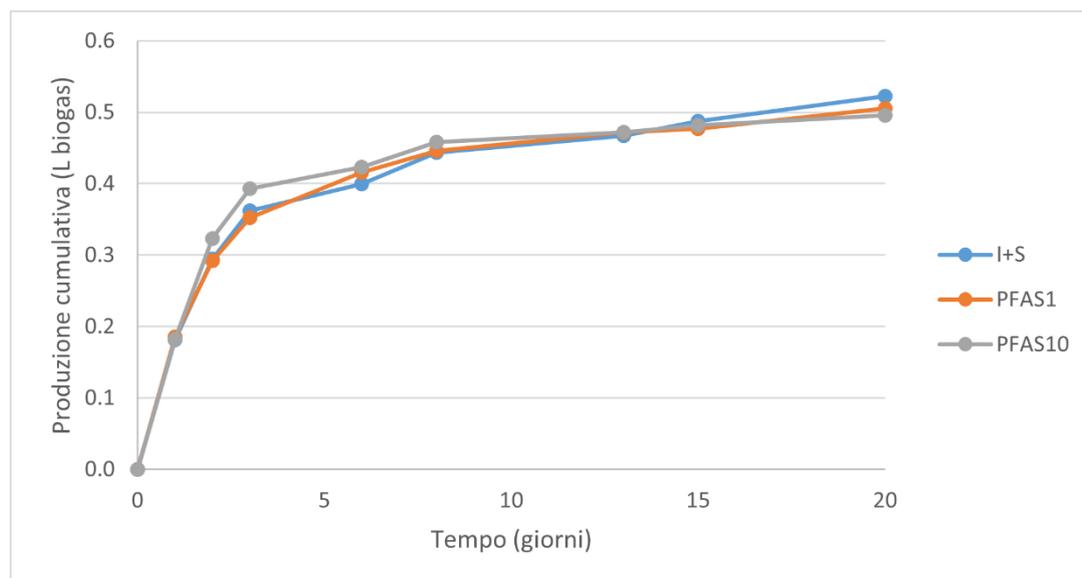


Figura 39 - Produzione cumulativa del primo test con PFOS, PFBA, PFBS

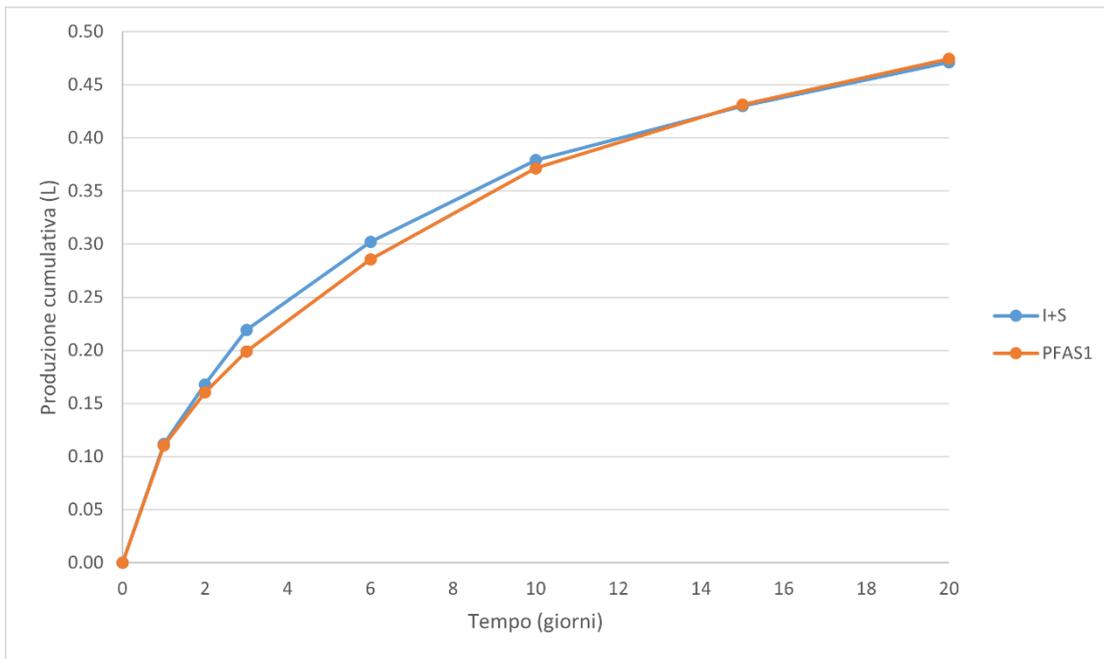


Figura 40. – Produzione cumulativa del secondo test con PFOS, PFBA, PFBS

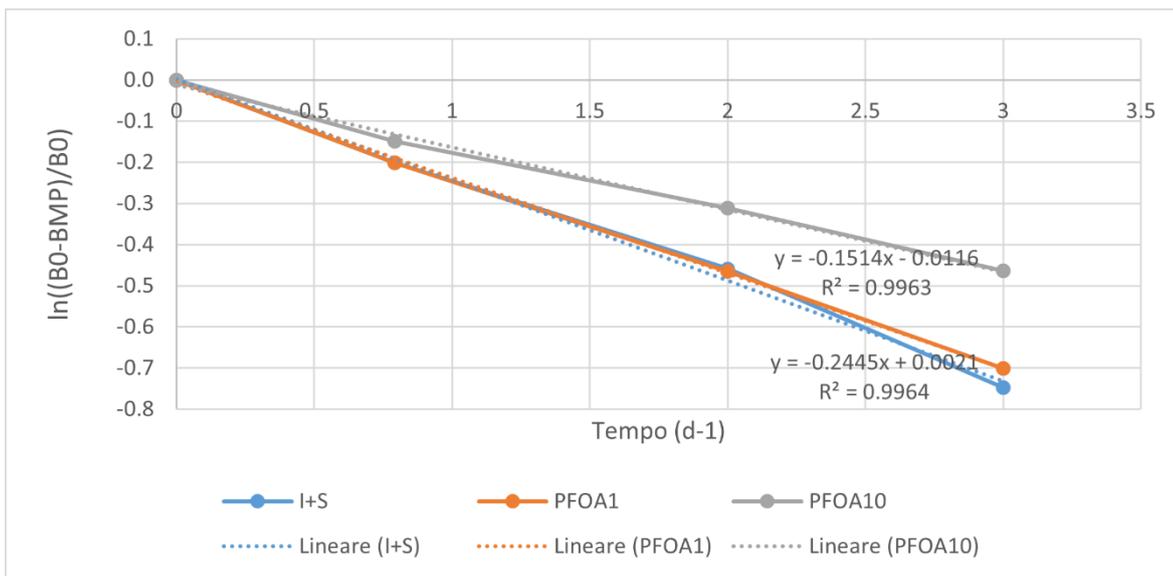


Fig 41 - Costante di idrolisi test con PFOA

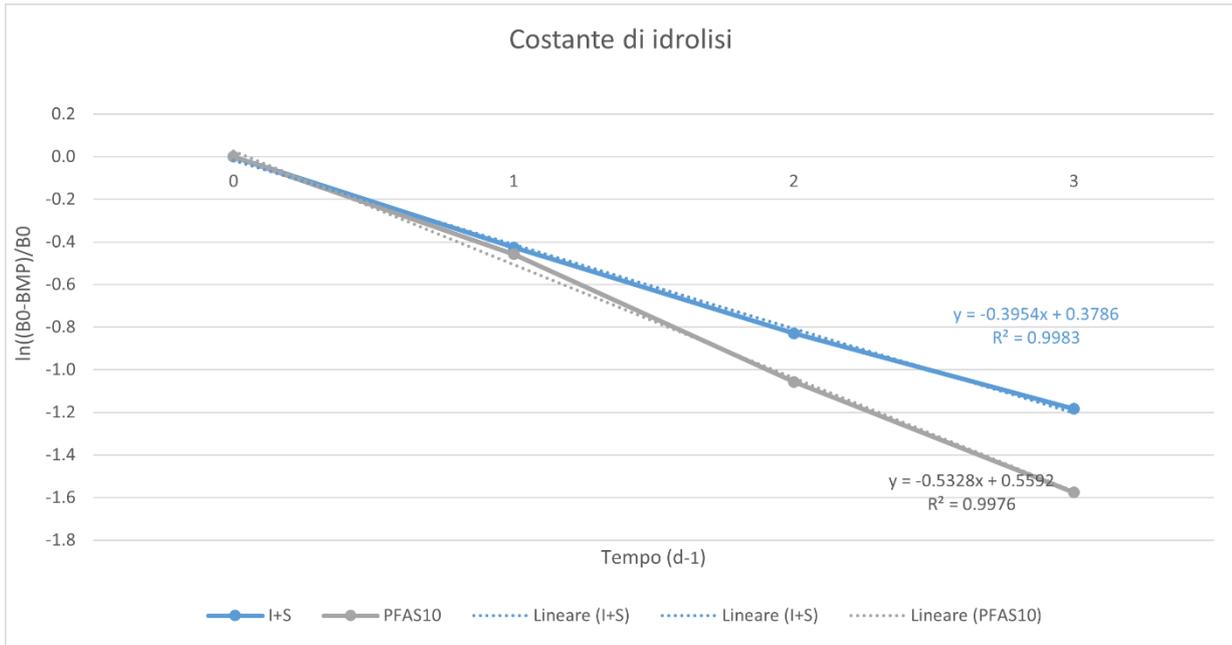


Figura 42 - Costante di idrolisi primo test con PFOA, PFBS, PFBA.

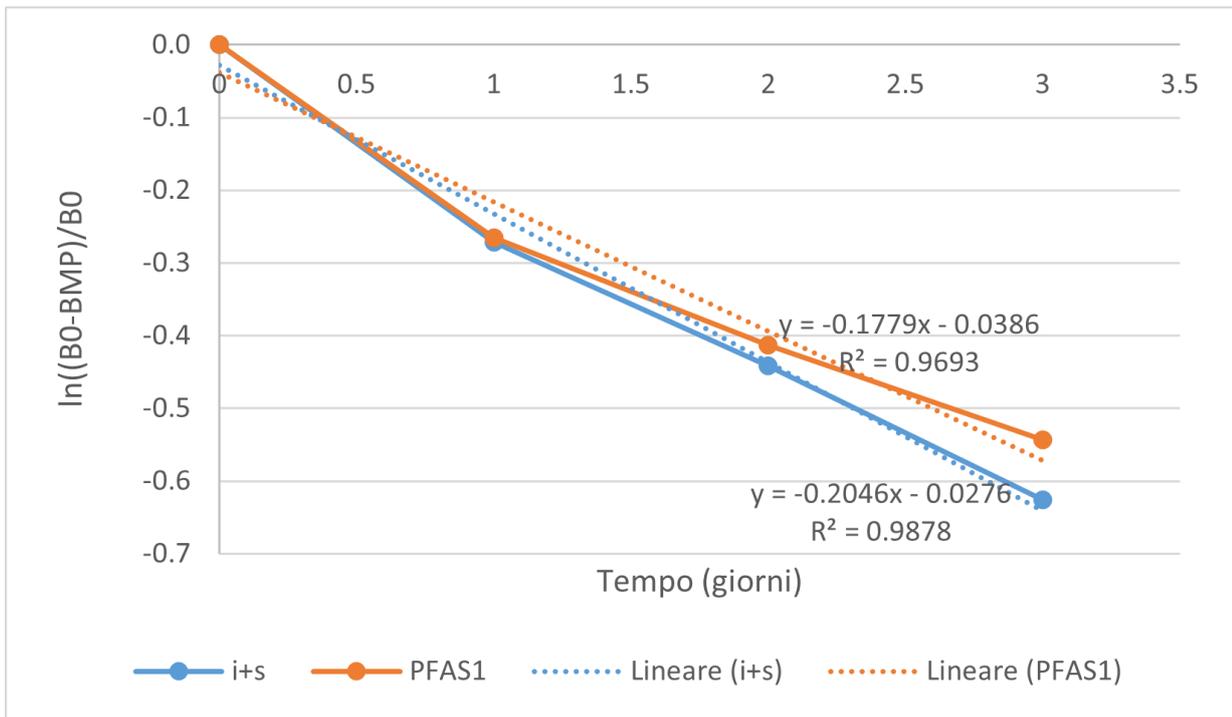


Figura 43 - Costante di idrolisi secondo test con PFOA, PFBS, PFBA.

### 7.3 Appendice 3: metodi analitici

**TS/TVS:** il procedimento per la misurazione di questo parametro ha previsto l'utilizzo di crogioli dei quali si misurano quattro pesate consecutive Figura 44 la prima ( $P_0$ ) del solo crogiolo vuoto dopo averlo posto per una ventina di minuti in stufa ed aver segnato una sigla per il suo successivo riconoscimento; nella seconda pesata ( $P_1$ ) viene aggiunto il digestato (circa 50 mL e previa agitazione del campione); il medesimo crogiolo viene poi posto in stufa a  $105^{\circ}\text{C}$  per almeno 24 ore e, dopo essersi raffreddato nell'essiccatore, viene effettuata la terza pesata ( $P_3$ ) ed infine il crogiolo viene lasciato in muffola per almeno 4 ore alla temperatura di  $550^{\circ}\text{C}$  dove dopo un sufficiente raffreddamento viene pesato nuovamente ( $P_4$ ).

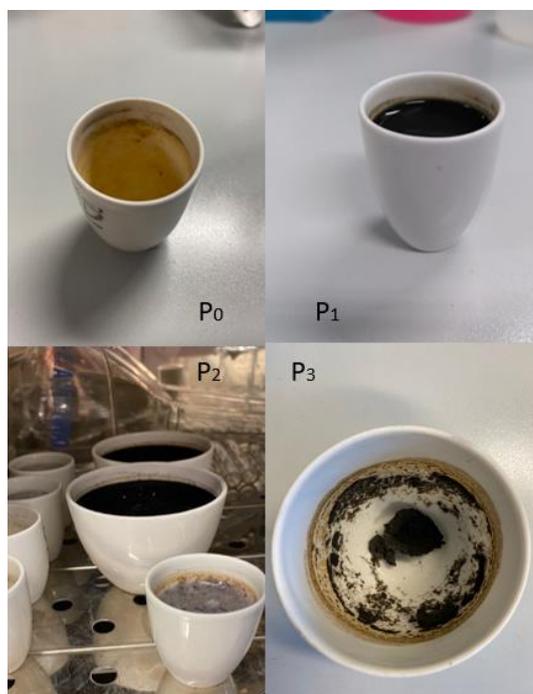


Figura 44 - crogioli contenenti il digestato nelle quattro fasi precedentemente descritte ( $P_0$ ,  $P_1$ ,  $P_2$  e  $P_3$ )

**Alcalinità:** la misura di questo parametro prevede la lettura nella buretta da titolazione del volume di HCl 0.1 N necessario per arrivare a pH 6 e successivamente 4. L'interesse è quindi quello di valutare quanto varia il volume per arrivare da pH a 6 a pH 4. Il campione di digestato/fango è stato precedentemente centrifugato per un tempo di 5 minuti, ad una rotazione di 9000 giri per minuto e a  $23^{\circ}\text{C}$  e successivamente filtrato con un filtro a fascia nera. È stato poi prelevato un volume noto di digestato che verranno utilizzati per la titolazione.

Conoscendo il volume di campione, il volume della soluzione utilizzato nella titolazione ed infine la normalità dell'acido è possibile calcolare l'alcalinità in termini di mg L CaCO<sub>3</sub><sup>-1</sup>.

$$Alk = \frac{50000 \cdot a \cdot N}{V} \quad \text{eq.12}$$

a = volume (mL) di soluzione di HCl impiegato nella titolazione

N = normalità della soluzione di HCl

V = volume (mL) di campione prelevato

5000 = fattore di conversione per ottenere il dato in L CaCO<sub>3</sub><sup>-1</sup>

### Composizione del biogas

lo strumento utilizzato è un misuratore portatile del biogas (marcata "Supelco") (Figura 15) e permette di conoscere la % di CH<sub>4</sub>, CO<sub>2</sub>, O<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>S nel biogas nelle bottiglie in batch. Nelle analisi in batch il biogas viene precedentemente raccolto nelle apposite *gas bags* (Figura 16) dalle quali verrà poi analizzato il biogas contenuto. Con i comandi "control" e "pump" lo strumento esercita una depressione che permette l'entrata del biogas in esso,

**sCOD:** La procedura prevede:

- 1) Centrifugazione del campione contenuto nelle provette da 50 mL per 5 minuti a 9000 giri.
- 2) Filtrazione con l'uso dei filtri monouso a trottola da 0.45 µm
- 3) Prelievo di 2.5 mL del campione precedentemente filtrato e trasferimento nelle cuvette in vetro (ogni campione analizzato prevede almeno una replica)
- 4) Preparazione del bianco analitico con l'utilizzo di sola acqua distillata (2.5 mL)
- 5) Aggiunta di 1.5 mL di soluzione ossidante e 3.5 mL di soluzione catalizzante a ciascuna cuvetta.
- 6) Trasferimento delle provette nel fornello (digestione del campione) per un tempo di 2 ore a 150 °C (Figura 45)
- 7) Lettura allo spettrofotometro (UV-VIS, serie HE1901004) a 600 nm (Figura 46)
- 8) dalla misura dell'assorbanza si risale infine alla concentrazione di mgCOD L<sup>-1</sup> della frazione solubile, attraverso l'equazione di primo grado che lega assorbanza e concentrazione ottenuta con la retta di calibrazione.



Figura 45 - fornello per preparare i campioni alla lettura dell'SCOD



Figura 46 - spettrofotometro UV/VIS

### **Ammoniaca:**

#### 1) analisi cromatografica.

In questo caso la fase liquida di un campione precedentemente centrifugato e filtrato a  $0.2 \mu\text{m}$  è stata opportunamente diluita con acqua milliQ e analizzata con un cromatografo Dionex© (software di interfaccia e calcolo: Chromeleon 6.50) caratterizzato da:

- a. precolonna CG12A 2x50 mm,
- b. colonna analitica CS12A 2x250 mm
- c. soppressore CSRS ULTRA II 4x250 mm
- d. detector a cella conduttimetrica (Thermo Scientific©). È stata effettuata

La fase mobile utilizzata è una soluzione acquosa di  $\text{H}_2\text{SO}_4$  22mM.

Lo strumento riporta direttamente la concentrazione in massa\*volume<sup>-1</sup> di  $\text{NH}_4^+$

#### 2) Spettrofotometria.

Il campione viene centrifugato e filtrato, dopodiché viene aggiunto NaOH per garantire un ambiente basico ed evitare quindi la perdita di ammoniaca per volatilizzazione ed un passaggio di questa in fase gassosa: l'azoto ammoniacale si trova infatti disciolto nel campione sia in forma ammoniacale (NH<sub>3</sub>, che può essere persa per volatilizzazione) che protonata (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>). Viene fatto passare del vapore che strappa l'ammoniaca del campione, convogliandola verso un matraccio con H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, per cui l'azoto ammoniacale è presente nella forma protonata. La soluzione viene portata a volume ed è aggiunto del reagente di Nessler, a cui l'ammoniaca si lega, per poi essere rilevata con la lettura allo spettrofotometro dopo opportuna diluizione.

La concentrazione viene infine determinata mediante la retta di calibrazione:

$$[\text{N-NH}_4^+] = (m * \text{ABS} * \text{FD}) \text{ [mg(N-NH}_4^+) \text{ L}^{-1}] \quad \text{eq.13}$$

dove:

AB: è il valore di assorbanza del campione determinato allo spettrofotometro

FD: è il fattore di diluizione operato nel campione prima di inserire il reattivo di Nessler (riferito alla diluizione finale che è il prodotto delle diluizioni intermedie)

M: è il coefficiente angolare dalla retta di calibrazione per l'analisi del N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>

### **CONCENTRAZIONE DI VFA:**

Lo strumento che è stato utilizzato è un HPLC (High Performance Liquid Chromatography), nello specifico un cromatografo HPLC Agilent© 1100 SERIES con colonna cromatografica Acclaim™ Organic Acid 4x150 mm (Thermo Fisher). È stata effettuata un'eluizione a gradiente dove la fase mobile è costituita da una soluzione di un solvente acquoso - acido metansolfonico 2.5 mM- e un solvente organico - acetonitrile ≥99.9% HPLC grade (flusso=1mL\*min<sup>-1</sup>; T=20°C).

### **Ortofosfati con metodo colorimetrico:**

Il campione richiede, prima di essere analizzato, una filtrazione a 0.22 μm. Il fosforo può essere infatti presente in forma solubile e particellata e, nelle acque di scarico così come in quelle naturali, può essere legato ai composti organici o sotto forma di ione ortofosfato. Quest'ultimo viene fatto reagire con il molibdato di ammonio e il potassio antimonil tartrato, in ambiente acido, dove viene a formarsi un eteropoliacido che viene ridotto con acido ascorbico a blu di molibdeno, la cui assorbanza prevede una lettura allo spettrofotometro alla lunghezza d'onda di 710 nm.

La concentrazione dello ione ortofosfato viene determinata con la seguente equazione:

$[\text{PO}]_4^{3-} = m * \text{F.D.} * \text{ABS}$  e viene espresso in  $\text{mg (P-PO}_4^{3-}) \text{ L}^{-1}$ .

Eq.14

### **Procedimento ortofosfati con metodo colorimetrico**

#### Materiali:

##### Materiali

- Centrifuga
- Filtri fascia nera
- Soluzione di NaOH 35%
- Matracci
- Fenolftaleina
- Provette Falcon da 50 mL e da 15 mL
- Pipette automatiche con puntali sterili monouso 36

##### Pipette pasteur

- Reagente misto
- Cuvette per spettrofotometro
- Porta cuvette per spettrofotometro
- Spettrofotometro

#### Preparazione delle soluzioni:

Soluzione di eptamolibdato di ammonio  $((\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O})$

- Porre 15 g di sale in 500 mL di acqua distillata. Conservare in frigorifero.

Soluzione di acido solforico 2,5 M:

- Porre 140 mL di acido solforico concentrato in 900 mL di acqua. La quantità di acido da preparare può ovviamente essere ridotta mantenendo tuttavia le medesime proporzioni.

Soluzione di acido ascorbico: • Porre 27 g di sale in 500 mL di acqua distillata. Conservare in frigorifero.

Soluzione di potassio antimonil tartrato  $(\text{C}_8\text{H}_4\text{K}_2\text{O}_{12}\text{Sb}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O})$ :

- Porre 0,34 g di sale in 250 mL di acqua distillata. Conservare in frigorifero.

Soluzione di NaOH 35%:

- Porre 700 g di NaOH in un matraccio da 2 L e portare a volume con acqua distillata; gestire la temperatura della dissoluzione della soda aggiungendo l'acqua progressivamente.

Reagente misto: Il Reagente misto è stabile per circa 6h; di conseguenza occorre prepararlo al momento dell'analisi. La quantità di reagente misto da preparare è chiaramente in funzione alla quantità necessaria il giorno in cui si effettua questa analisi. Il reagente misto viene inserito in ciascun campione in proporzione 1:10

(ad esempio 10 mL per 100 mL di campione o 5 mL per 50 mL di campione). Ad esempio, si voglia preparare 30 mL di reagente misto (in una falcon da 50 mL).

- Inserire 6 mL della soluzione di eptamolibdato di ammonio ( $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ )
- Aggiungere, facendo particolare attenzione, 15 mL della soluzione di  $\text{H}_2\text{SO}_4$  2,5 M
- Aggiungere 6 mL della soluzione di acido ascorbico
- Aggiungere 3 mL della soluzione di potassio antimonil tartrato ( $\text{C}_8\text{H}_4\text{K}_2\text{O}_{12}\text{Sb}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ )
- Agitare la soluzione (assume colore giallo paglierino)

#### Procedimento:

- Centrifugare il campione
- Filtrare il surnatante mediante filtri a fascia nera
- Filtrare con siringa e filtro NY da 0.2  $\mu\text{m}$ . Se la filtrazione risulta particolarmente resistente, filtrare dapprima con filtra NY da 0.45  $\mu\text{m}$ . In alternativa utilizzare filtri a membrana della stessa porosità impiegando una pompa da vuoto. E' anche possibile diluire il campione qualora fosse particolarmente ricco in solidi, per facilitarne la filtrazione.
- Diluire eventualmente il campione impiegando matracci e acqua distillata. Se la diluizione da fare è abbastanza alta ( $\geq 100$ ) è conveniente operare per diluizioni successive.
- Aggiungere nel matraccio del campione diluito 2 gocce di fenoltaleina mediante pipetta pasteur
- Aggiungere 1 goccia di NaOH 30-35% mediante pipetta pasteur. Il colore vira immediatamente a fucsia intenso in quanto la basicità della soluzione è determinata solo dalla soda aggiunta.
- Prelevare 10 mL del campione diluito e virato e trasferirlo in una provetta sterile monouso da 15 mL.
- Aggiungere in un'altra provetta 10 mL di acqua distillata; esso sarà il bianco per l'analisi allo spettrofotometro (non aggiungere fenoltaleina e soda al bianco).
- Preparare il reagente misto.
- Aggiungere 1 mL di reagente al bianco ed osservarne la reazione: se avviene un viraggio di colore, rifare il bianco. Se il problema persiste rifare anche il reagente misto
- Se il bianco non subisce alcun viraggio di colore procedere aggiungendo 1 mL di reagente misto al campione in provetta e agitare. Avviene un viraggio di colore inizialmente da fucsia intenso a trasparente ed in seguito ad azzurro la cui intensità dipende dalla concentrazione dell'ortofosfato in soluzione.
- Lasciar reagire per 10 minuti.
- Nel frattempo, accendere lo spettrofotometro Spekol 1500 e selezionare "Photometric mode"
- Cliccare su "SET WL" e impostare la lunghezza d'onda  $\lambda = 710 \text{ nm}$ , quindi cliccare su "start"
- Prepararsi un becher "waste" pulito e della carta scottex assorbente vicino allo strumento
- Trascorsi i 10 minuti inserire il bianco nella cuvetta di quarzo dello spettrofotometro avvinandola prima e inserirla nel porta-cuvette nello strumento.
- Cliccare su "100% baseline". Lo strumento misura il rumore di fondo e registra l'assorbanza a 000. Cliccare poi "measure" per verificare quest'ultima.

- Inserire il campione in cuvetta cercando di effettuare prima almeno 2 avvinate e asciugare bene la cuvetta esternamente con lo scottex.

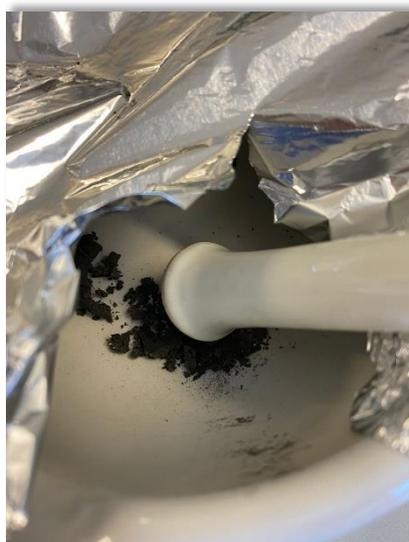
Cliccare “measure” e annotarsi il valore di assorbanza misurato.

- Ripetere per ogni campione da analizzare. L’analisi deve essere il più rapida possibile in quanto il reagente misto continua a reagire.

- La risposta dello strumento è lineare in un intervallo di valori di assorbanza che derivano dalla retta di calibrazione; se l’assorbanza di un campione non rientra in tale intervallo è necessario diluire maggiormente il campione prima di inserire il reagente misto.

## TKN

la preparazione del campione per le analisi del fosforo richiede l’essiccazione del campione (digestato e fango) in stufa a 105°C i quali verranno successivamente tritato con l’utilizzo del mortaio per ottenere una polvere fine ed omogenea con lo scopo di aumentare la superficie esposta del campione in esame.



*Figura 47 – Digestato frantumato con il mortaio dopo essiccazione in stufa a 105°C*

Viene quantificato secondo la formula:

$$\text{TKN} = \text{N}_{\text{ORG}} + \text{N-NH}_3 + \text{N-NH}_4^+ \quad [\text{g}_{\text{azoto}}/\text{kg}_{\text{TS}}] \quad \text{eq.15}$$

L’azoto in forma ammoniacale viene aggiunto a quello già presente in soluzione e verrà determinato quantitativamente con un metodo colorimetrico. Affinché vi sia una completa trasformazione ad azoto ammoniacale la digestione acida del campione deve avvenire alla temperatura di 370°C, dove avverrà una mineralizzazione dell’azoto organico presente nella matrice, il quale si trasformerà in solfato di ammonio ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) che verrà successivamente distillato.

I materiali e la procedura sperimentale specifici sono riportati nei materiali supplementari.

### **Procedimento TKN**

#### materiali:

- Mineralizzatore speedwave
- Vessels DAP 100
- Navette monouso per pesate analitiche
- Perossidissolfato di potassio
  - Acido solforico concentrato con dosatore
- Acqua ossigenata
- Filtro fascia nera
- Tanica con soluzione di NaOH 35%:
  - Tanica con soluzione di  $\text{H}_3\text{BO}_3$  20  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$
  - Tanica con soluzione di acido citrico ( $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$ )
- Tanica con acqua distillata
- Distillatore a corrente di vapore
- Provettone
- Pinze
  - Matracci da 250 mL e 50 mL
- reattivo di Nessler
- Cuvette per spettrofotometro
- Porta cuvette per spettrofotometro
  - Spettrofotometro

#### Preparazione soluzioni

- NaOH 35%: Porre 700 g di NaOH in un matraccio da 2 L e portare a volume con acqua distillata; gestire la temperatura della dissoluzione della soda aggiungendo l'acqua progressivamente.
- $\text{H}_3\text{BO}_3$  20  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ : Porre 20 g di  $\text{H}_3\text{BO}_3$  in polvere, in un matraccio da 1 L e portare a volume con acqua distillata. Per favorire la dissoluzione inserire un'ancoretta magnetica e porre il matraccio nell'apposito agitatore.

### Procedura sperimentale:

- Pesare 0,1 g di campione secco (conservato in stufa) in bilancia analitica impiegando una navetta in plastica monouso. Per stabilizzare la pesata coprire eventuali fonti di spifferi d'aria.
- Trasferire il campione in un vessel in teflon. ATTENZIONE: evitare la perdita di campione durante il trasferimento. Il campione pesato deve entrare tutto dentro il vessel e arrivare fino al fondo, senza restare adeso alle pareti per elettrostatica; potrebbe infatti non essere digerito completamente e portare alla sottostima del valore di TKN. Per evitare ciò, è consigliabile: o svolgere le attività di pesatura senza guanti o pesare il campione su navette in plastica usa e getta o Piegare a metà la navetta lungo una diagonale facendo combaciare i due angoli, prendere quest'ultimi con una pinza sufficientemente lunga da poter inserire la navetta in fondo al vessel tenendo quest'ultimo in posizione orizzontale. Dopo aver depositato sul fondo quanto più campione possibile, estrarre la navetta con le pinze e, aiutandosi con una spruzzetta di acqua distillata a punta fine, far scendere dentro al vessel le tracce di campione rimaste adese alla navetta, cercando di utilizzare meno acqua distillata possibile (pochi mL).
- Aggiungere mezzo cucchiaino di perodisolfato di potassio ( $K_2S_2O_8$ )
- Aggiungere 15 mL di  $H_2SO_4$  concentrato (96%) utilizzando l'apposito dosatore
- Chiudere il vessel con l'apposito tappo in teflon; se il tappo non fa tenuta sul vessel è necessario allargarlo utilizzando l'apposito strumento
- Mettere l'apposita copertura in alluminio sopra il tappo
- Avvitare sul vessel il coperchio a vite numerato
- Ripetere la procedura per ogni campione da analizzare. NOTA BENE: Deve sempre essere impiegato il coperchio n° 1 in quanto in esso è contenuto un prisma sensore di pressione, necessario durante l'analisi.
- Accendere il mineralizzatore Speedwave
- Nello schermo touch screen selezionare (utilizzando il pennino posto dietro) "utente" quindi cliccare il rettangolo con gli asterischi per inserire la password di accesso (0000), quindi cliccare "ok"
- Cliccare "apri" per l'apertura automatica del mineralizzatore
- Inserire all'interno dello strumento i vessel nell'apposita posizione (il numero 1 va posizionato nella postazione più a destra). Essi devono essere posizionati in modo da bilanciare il carosello. Evitare di avviare lo speedwave con un solo vessel.
- Coprire le postazioni non utilizzate con gli appositi tappi
- Dopo aver richiuso lo sportello cliccare "metodo" e successivamente su "TKN 1STEP", quindi cliccare "seleziona".
- Cliccare quindi "avvia", "avanti" arrivando così alla schermata con le rampe di temperatura:

	T [°C]	p [bar]	Rampa	Stasi	P [%]
1	200	35	10	60	80
2	50	35	10	5	0

- Assicurarsi che in tale schermata sia segnato “REATTORE DAP 100” in caso contrario cliccare su “REATTORE” per cambiare.
- Sul riquadro “Reattori: 12” si può sapere dallo strumento qual è la posizione ottimale dei vessel in base al loro numero al fine di garantire l’ottimale bilanciamento del carosello.
- Cliccare, quindi, “avvia” per far partire la mineralizzazione che durerà 85 min • Al termine della digestione cliccare “termina”, aprire lo sportello ed estrarre i vessel
- Aggiungere sotto cappa a ciascun vessel 5 mL di acqua ossigenata (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e attendere qualche momento prima di richiuderli in modo che il vapore sviluppato dall’acqua ossigenata fuoriesca. Chiudere quindi il vessel (può essere necessario ri-allargare i tappi in teflon).
- Riposizionare quindi i vessel all’interno dello speedwave nella loro corretta posizione
- Selezionare il metodo “TKN 2STEP” che presenta le seguenti rampe di temperatura:

	T [°C]	p [bar]	Rampa	Stasi	P [%]
1	200	35	20	60	80
2	50	35	10	5	0

- Avviare la digestione che durerà 95 minuti.
- Al termine della digestione, aspettare qualche minuto prima di estrarre i vessel dallo strumento
- Prendere quindi i vessel e metterli sottocappa; spegnere lo speedwave
- Aprire i vessel. L’acqua ossigenata ha sviluppato vapore all’interno di essi, quindi, risultano essere in pressione; è necessario svitare il coperchio gradualmente tenendolo fermo con una mano e con lo sfiato rivolto verso la cappa e ruotando il vessel con l’altra mano. Una volta sfiatato il vapore all’interno, svitare il tappo comodamente.
- Aggiungere acqua distillata fino a riempire il vessel permettendo sia il raffreddamento sia la diminuzione dell’acidità del digerito
- Una volta raffreddato, filtrare il contenuto del vessel con un filtro a fascia nera trasferendolo in un matraccio (da 250 mL). Sciacquare bene il filtro con acqua distillata nonché l’imbuto in modo da non perdere campione.
- Portare a volume il matraccio con acqua distillata. Il volume del matraccio (V = 250 mL) servirà nel calcolo del TKN
- Procedere con l’analisi del contenuto di azoto ammoniacale prelevando 25 mL di campione digerito dal matraccio e seguendo la stessa procedura sperimentale già descritta (distillazione in corrente di vapore, reattivo di Nessler ecc...).

Smaltimento speciali: La soluzione nei matracci da 50 mL e nel “waste” impiegato durante l’analisi allo spettrofotometro contenente il campione e il reattivo di Nessler, va smaltita nella tanica contenente gli scarti basici.

### **Procedimento cod su campione secco mediante mineralizzatore a microonde (speedwave)**

Anche in questo caso la preparazione dei campioni quali digestato e fango prevede la loro essiccazione in stufa a 150°C per 24/48 h e una successiva frantumazione con il mortaio con lo scopo di ottenere il campione che potrà così essere pesato, inserito nelle vessel (C) e successivamente analizzato.

Dopo la lettura del campione con una titolazione colorimetrica (B) i calcoli finali prevedono l’applicazione della seguente equazione:

$$[COD] = \frac{(B - C) * (V * N T) * 8}{P} \quad \text{eq.16}$$

Espresso in  $\text{mgO}_2 * \text{gTS}^{-1}$

dove:

B: volume di FAS usato per la titolazione del bianco (mL)

C: volume di FAS usato per la titolazione del campione (mL)

N: normalità del bicromato (0,25 N)

V: volume di  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  usato (mL)

T: volume di FAS usato per la titolazione del titolo (mL)

P: peso del secco ( $\text{g}_{\text{TS}}$ )

8: peso equivalente dell’ossigeno ( $\text{gO}_2 \text{eq}^{-1}$ )

.

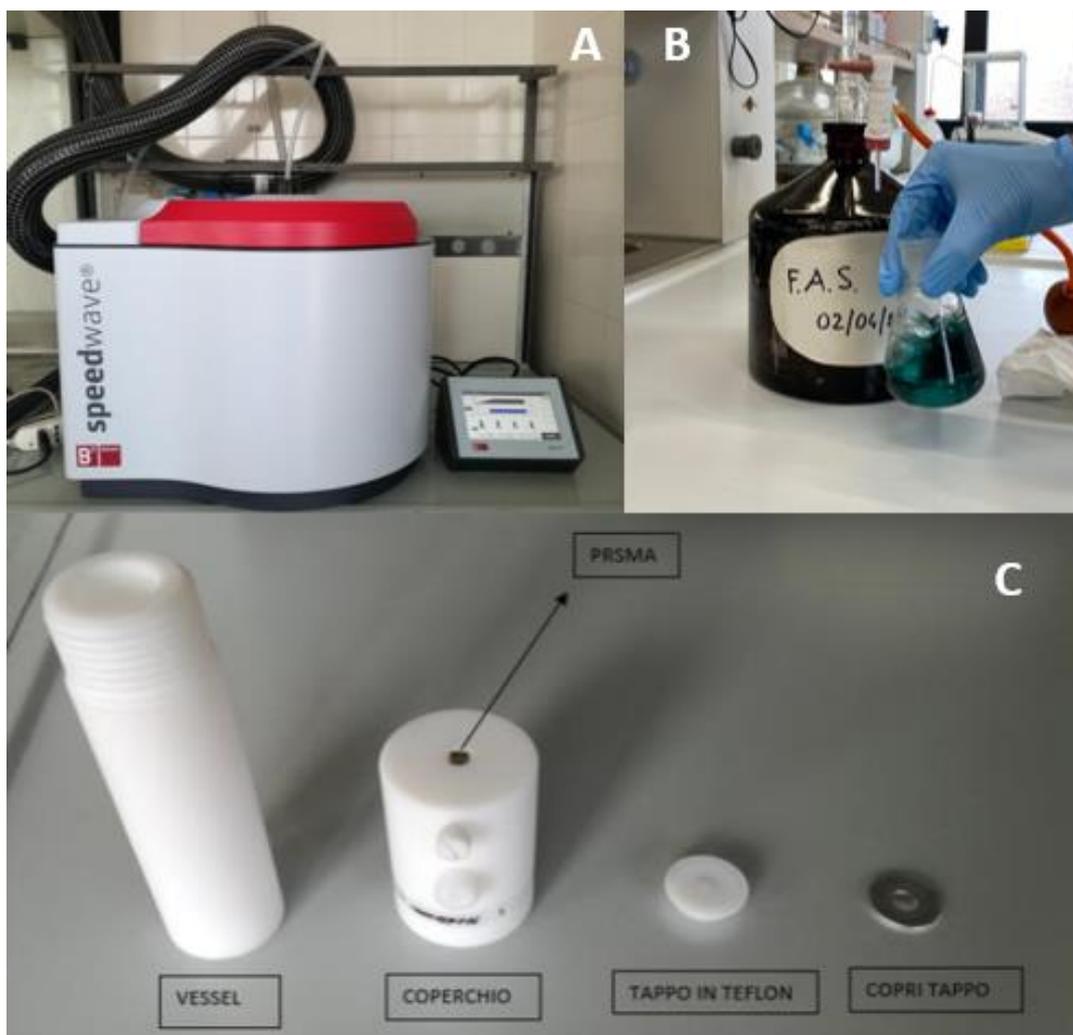


Figura 48 – A: mineralizzatore a microonde; B: titolazione colorimetrica; C: Vessel, coperchio e copri tappo da assemblare

### Materiali

- Set di vessel per mineralizzatore SpeedWave (in teflon) con rispettivi tappi.
- Bilancia analitica • Navette per pesata analitica monouso
- Soluzione di  $K_2Cr_2O_7$  0,25 N
- $Ag_2SO_4$
- $HgSO_4$
- $H_2SO_4$  concentrato (96%)
- Soluzione di FAS 0,25 N su bottiglia e buretta
- Indicatore Ferroina

### Procedura sperimentale

- Porre il campione solido in stufa a  $105^\circ C$  per 24/48 h per ottenere il secco da analizzare
- Se necessario polverizzare con mortaio il campione solido per ottenere una grana fine, quindi seccare nuovamente in stufa

- Pesare 0,02 g di campione secco (conservato in stufa) in bilancia analitica impiegando una navetta in plastica monouso. Per stabilizzare la pesata coprire eventuali fonti di spifferi d'aria
- Trasferire il campione in un vessel in teflon. ATTENZIONE: evitare la perdita di campione durante il trasferimento. Il campione pesato deve entrare tutto dentro il vessel e arrivare fino al fondo, senza restare adeso alle pareti per elettrostatica; potrebbe infatti non essere digerito completamente e portare alla sottostima del valore di COD. Per evitare ciò, è consigliabile:
  - svolgere le attività di pesatura senza guanti
  - pesare il campione su navette in plastica usa e getta
  - Piegare a metà la navetta lungo una diagonale facendo combaciare i due angoli, prendere quest'ultimi con una pinza sufficientemente lunga da poter inserire la navetta in fondo al vessel tenendo quest'ultimo in posizione orizzontale. Dopo aver depositato sul fondo quanto più campione possibile, estrarre la navetta con le pinze e, aiutandosi con una spruzzetta di acqua distillata a punta fine, far scendere dentro al vessel le tracce di campione rimaste adese alla navetta, cercando di utilizzare meno acqua distillata possibile (pochi mL)
- Aggiungere una punta di spatola di  $\text{Ag}_2\text{SO}_4$  e  $\text{HgSO}_4$ . Aggiungere 15 mL di  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  0,25 N. Aggiungere 15 mL di  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrato.
- Preparare il bianco, in un vessel: mettere 10 mL di acqua distillata, aggiungere una punta di spatola di  $\text{Ag}_2\text{SO}_4$  e di  $\text{HgSO}_4$ , aggiungere 15 mL di  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  0,25 N e 15 mL di  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrato. Il bianco serve a verificare eventuali contaminazioni dei reagenti e dei sali.
- Preparare il titolo, in una beuta: mettere 10 mL di acqua distillata, aggiungere 15 mL di  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  0,25 N e 15 mL di  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrato. Il titolo serve per determinare la normalità esatta del FAS che si degrada nel tempo.
- Chiudere i vessel con l'apposito tappo in teflon; se il tappo non fa tenuta sul vessel è necessario allargarlo utilizzando l'apposito strumento
- Mettere la copertura in alluminio sopra il tappo
- Avvitare sul vessel il coperchio a vite numerato
- Ripetere la procedura per ogni campione da analizzare e per il bianco. Ovviamente non si deve digerire il titolo. NOTA BENE: Deve sempre essere impiegato il coperchio n° 1 in quanto in esso è contenuto un prisma sensore di pressione, necessario durante l'analisi.
- Accendere il mineralizzatore Speedwave
- Nello schermo touch screen selezionare (utilizzando il pennino posto dietro) "utente" quindi cliccare il rettangolo con gli asterischi per inserire la password di accesso (0000), quindi cliccare "ok"
- Cliccare "apri" per l'apertura automatica del mineralizzatore
- Inserire all'interno dello strumento i vessel nell'apposita posizione (il numero 1 va posizionato nella postazione più a destra). Essi devono essere posizionati in modo da bilanciare il carosello.
- Dopo aver richiuso lo sportello cliccare "metodo" e successivamente su "COD", quindi cliccare "seleziona".
- Cliccare "avanti" arrivando così alla schermata con le rampe di temperatura:

	T (°C)	p (bar)	Rampa	Stasi	P (%)
1	175	35	7	40	80
2	50	35	3	10	0

La tabella indica che inizialmente (1) il mineralizzatore si porta alla temperatura (T) impiegandoci 7 minuti (rampa) e vi rimane per 40 minuti (stasi) per poi passare allo step successivo (2).

- Assicurarsi che in tale schermata sia segnato “REATTORE DAP 100” in caso contrario cliccare su “REATTORE” per cambiare.
  - Sul riquadro “Reattori: 12” si può sapere dallo strumento qual è la posizione ottimale dei vessel in base al loro numero al fine di garantire l’ottimale bilanciamento del carosello.
  - Cliccare, quindi, “avvia” per far partire la mineralizzazione che durerà 60 min
  - Al termine della digestione cliccare “termina” e aprire lo sportello ed estrarre i vessel
  - Attendere una decina di minuti prima di estrarre i vessel dallo strumento per lasciarli raffreddare. Poi riporre quest’ultimi sotto cappa, svitare i coperchi e aggiungere un po’ d’acqua distillata; aspettare quindi il raffreddamento dei vessel. Trasferire il contenuto in beute di vetro.
  - Aggiungere 2-3 gocce di ferroina
  - Impiegando il FAS, procedere con la titolazione del titolo, del bianco e del campione. Il FAS che si utilizza deve essere alla medesima normalità del  $K_2Cr_2O_7$
  - Il viraggio coincide con il passaggio del colore della soluzione da verde-azzurro a rosso-marrone scuro.
  - Annotarsi il valore del volume di FAS al punto di fine titolazione (chiaramente sia per il campione che per il bianco e il titolo)
- Smaltimento speciali: Le beute titolate vanno smaltite nella tanica per gli scarti di  $K_2Cr_2O_7$  (presente sottocappa).