



Università
Ca' Foscari
Venezia

Corso di Laurea magistrale
in Scienze Ambientali

Tesi di Laurea

*Analisi di microplastiche in fanghi provenienti da impianti di
depurazione delle acque reflue urbane: stato dell'arte ed
ottimizzazione del metodo di pretrattamento dei campioni*

Relatore

Prof. Rossano Piazza

Correlatori

Dott. Tiziano Bonato

Dott.ssa Elena Gregoris

Dott. Marco Roman

Laureanda

Laura Lisato

864918

Anno Accademico

2022/2023

Alla mia stella Alice

Ai miei genitori, Emanuela e Ivano

A mia nonna Mirella

INDICE

PREMESSA	4
1. INTRODUZIONE	5
1.1. <i>La plastica</i>	5
1.1.1. Definizione e proprietà	5
1.1.2. Settori di applicazione e produzione mondiale	12
1.1.3. Processi di degradazione e frammentazione	15
1.2. <i>Le microplastiche</i>	17
1.2.1. Classificazione per dimensione.....	18
1.2.2. Classificazione per origine	20
1.2.3. Caratteristiche descrittive dei polimeri: proprietà fisiche e chimiche.....	22
1.2.4. Prodotti di degradazione dei materiali plastici: i polimeri più diffusi in ambiente.....	26
1.2.5. Pericoli e rischi per l'uomo e per l'ambiente	29
1.2.6. La comunità scientifica e la legislazione internazionale	32
1.3. <i>Impianti di trattamento delle acque reflue</i>	36
1.3.1. Linea acque.....	38
1.3.2. Linea Fanghi.....	44
1.3.3. Smaltimento finale dei fanghi di depurazione.....	48
1.4. <i>La presenza di MPs negli impianti di trattamento delle acque reflue</i>	52
1.5. <i>Fanghi e microplastiche: i limiti relativi alla metodica</i>	57
1.5.1. Le problematiche relative al pretrattamento	59
OBIETTIVI DEL LAVORO DI TESI	61
2. MATERIALI E METODI.....	62
2.1. <i>Sito di campionamento</i>	64
2.1.1. Caratteristiche dell'impianto di depurazione delle acque reflue	64
2.1.2. I campioni di fango analizzati	65
2.2. <i>Metodi sperimentali utilizzati in laboratorio</i>	68
2.2.1. Procedure preliminari	68
2.2.2. Pretrattamento del campione	75
2.2.3. Struttura finale del metodo di pretrattamento ottimizzato.....	82
2.3. <i>Valutazione dell'efficacia dei trattamenti e l'influenza sulle microplastiche</i>	86
2.3.1. Efficacia dei trattamenti chimici	86

2.3.2. Influenza dei trattamenti sulle microplastiche	87
2.4. <i>Analisi qualitativa delle microplastiche</i>	88
2.4.1. Microscopia ottica	88
2.4.2. Pirolisi accoppiata con gascromatografia e spettrometria di massa (Pyr-GC/MS)	90
3. RISULTATI E DISCUSSIONE	99
3.1. <i>Caratterizzazione del fango</i>	99
3.2. <i>Efficacia dei trattamenti sul fango e l'influenza sulle microplastiche</i>	100
3.2.1. Trattamento con perossido di idrogeno (H ₂ O ₂).....	100
3.2.2. Reattivo di Fenton	102
3.2.3. Trattamento con enzimi e perossido di idrogeno.....	104
3.3. <i>Analisi qualitativa delle microplastiche</i>	105
3.3.1. Microscopia ottica	105
3.3.2. Pirolisi accoppiata con gascromatografia e spettrometria di massa (Pyr-GC/MS)	111
4. CONCLUSIONI	117
BIBLIOGRAFIA	120
RINGRAZIAMENTI	128

PREMESSA

L'inquinamento da microplastiche (MPs), a causa della loro diffusione e persistenza nell'ambiente, è ora un problema di interesse globale. La presenza di microplastiche è stata rilevata anche in matrici ricche di sostanza organica, come i fanghi provenienti da impianti di trattamento delle acque reflue.

Nonostante i numerosi studi pubblicati, allo stato attuale non esiste una metodica standardizzata a livello nazionale o europeo per la loro identificazione e quantificazione nei campioni di fango, soprattutto per la problematica riguardante la rimozione del materiale organico e l'estrazione delle particelle plastiche.

A partire da questo presupposto, il lavoro di tesi vuole fornire un'ottimizzazione delle fasi di pretrattamento dei fanghi per l'analisi delle MPs, attraverso lo studio e l'applicazione di diverse procedure riscontrabili in letteratura. In particolare, per la valutazione delle prestazioni del metodo proposto sono stati condotti dei test di laboratorio utilizzando diversi tipi di polimeri comuni come materiali di riferimento.

Mediante microscopia ottica e pirolisi accoppiata con gascromatografia e spettrometria di massa (Pyr-GC/MS), è stata effettuata un'analisi qualitativa delle MPs nei campioni trattati con il metodo ottimizzato, dimostrandone l'adeguatezza allo scopo in termini di recupero e di ripetibilità.

1. INTRODUZIONE

1.1. La plastica

1.1.1. Definizione e proprietà

“Plastica” è un termine generico per grandi molecole prodotte dall'uomo chiamate polimeri, i quali sono composti da unità simili o equivalenti ottenuti mediante processi industriali a più fasi. Il termine deriva dalla parola greca “plastikos” utilizzata per indicare un materiale adatto ad essere plasmato o modellato (Chia et al., 2021). Questa definizione si riferisce alla plasticità del materiale durante la produzione: infatti può essere fuso, compresso ed estruso in varie forme come strisce, fibre, fogli, tubi, bottiglie e scatole.

L'uso, la produzione e la fabbricazione della plastica muove i primi passi nel XIX secolo, seguito dalla prima era moderna della plastica negli anni '20 e poi dalla produzione di plastica durevole negli anni '40 (M. Chen et al., 2020).








- Tra il 1861 e il 1862, Alexander Parkes lavorò sul nitrato di cellulosa, isolò e brevettò il primo materiale plastico semisintetico chiamato inizialmente “Parkesine”, ma conosciuto poi con il nome di “Xylonite”. Questo materiale opaco, impermeabile e dai colori vivaci, veniva utilizzato per la produzione di maniglie, scatole, e altri oggetti con un certo grado di flessibilità.
- All'inizio del XX secolo il chimico belga Leo Baekeland riuscì a sintetizzare il primo materiale termoindurente: la “Bakelite”.

- Nel 1940 iniziò a svilupparsi a livello industriale ed economico il Polivinilcloruro (PVC), utilizzato per la produzione di dischi fonografici.

Tutte le plastiche sono costituite da polimeri, ma non tutti i polimeri sono plastiche. I due termini sono di origine greca: "poli" significa "molti", "mar" significa "unità ripetente" e "mono" significa "uno". Ciò significa che un polimero è costituito da molte unità ripetute, i monomeri, legati covalentemente in catene.

Nel 1988, la *Society of the Plastics Industry* (SPI) ha creato un sistema per identificare i diversi tipi di plastica presenti sul mercato. La Tabella 1.1. descrive quelli più diffusi, classificati in base alla loro maggiore (1) o minore (7) possibilità di essere riciclati tramite il codice SPI numerico che, posto al centro della sigla e presente sul fondo della merce, li contraddistingue.

Tabella 1.1. Classificazione delle plastiche secondo SPI (*Society of the Plastics Industry*).

SIMBOLO	SIGLA	APPLICAZIONI
	Polietilene tereftalato	Bottiglie, film, tubi, contenitori ed imballaggi, etichette
	Polietilene ad alta densità	Flaconi per il contenimento di detersivi o alimenti, giocattoli, tappi in plastica, tubi per il trasporto di acqua e gas naturale
	Polivinilcloruro	tubi per edilizia, serramenti, pavimenti vinilici, pellicola rigida e plastificata per imballi, dischi fonografici
	Polietilene a bassa densità	Imballaggi, sacchetti della spesa, tubi per irrigazione, tappi di bottiglia
	Polipropilene	Sacchetti biscotti, sacchetti patate, cassette, vasi per piante
	Polistirene	Appendiabiti, giocattoli, vassoi, contenitori yogurt, scatola uova
	Altre plastiche	Nylon (PA), Policarbonato (PC), Acrilnitrile Butadiene Stirene (ABS)

Le materie plastiche sono composti organici: le loro molecole sono costituite principalmente da atomi di carbonio (C) legati covalentemente ad atomi di idrogeno (H), ossigeno (O) e azoto (N). Queste si combinano tra loro per formare catene polimeriche più o meno lunghe e ramificate.

A differenza di molte sostanze organiche, le plastiche non si trovano in natura e sono sintetizzate artificialmente a partire da risorse naturali come il gas e il petrolio (fonti di origine fossile) oppure da fonti rinnovabili (ad esempio oli vegetali, amido e canna da zucchero). Purtroppo, in Europa il 99% delle plastiche vergini è prodotto attraverso l'utilizzo di petrolio e gas, utilizzati anche per generare il calore necessario al processo di produzione. Considerando la fase di produzione, associata ai processi di estrazione e purificazione dei combustibili fossili, vengono prodotti in totale 1.7 kg di CO₂ per ogni chilogrammo di plastica.

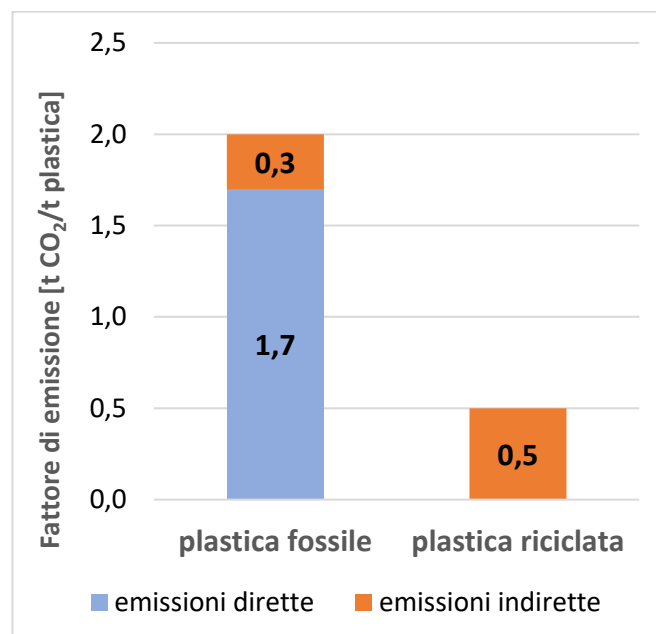


Figura 1.1 Fattori di emissione della plastica di origine fossile e della plastica riciclata (La plastica in Italia vizio o virtù? Technical report, aprile 2022)

I polimeri possono essere classificati in base alla loro origine:

- i polimeri naturali sono il risultato di un processo di polimerizzazione che avviene in natura e la struttura chimica rimane immutata. La cellulosa, l'amido, la lignina e la chitina sono definiti anche biopolimeri perché sono già presenti in forma polimerica.
- i polimeri sintetici, invece, si ricavano dai combustibili fossili come petrolio, gas naturale e carbone. Ne sono un esempio PET, PE, PVC e PU: questi possono essere riciclati ma non sono biodegradabili, ossia non si decompongono velocemente quando vengono disperse nell'ambiente.
- le bioplastiche rappresentano una grande famiglia di plastiche che possono essere a base biologica (*bio-based*), biodegradabili o possedere entrambe le caratteristiche (Eissenberger et al., 2023). Queste possono essere suddivise in tre gruppi:
 1. Le plastiche a base biologica sono quelle derivanti (almeno in parte) da biomasse come il mais, la cellulosa o la canna da zucchero. Tra queste troviamo il PET, il PP e il polietilene furanoato (PEF) e sono *bio-based* ma non biodegradabili.
 2. Le plastiche che possiedono entrambe le caratteristiche, ossia sono a base biologica e biodegradabili, sono invece l'acido polilattico (PLA), i poliidrossialcanoati (PHA) e il polibutilene succinato (PBS).
 3. Sono presenti, inoltre, plastiche che derivano da fonti fossili (*fossil-based*) ma biodegradabili, come il polibutirato-adipato-tereftalato (PBAT) e il policaprolattone (PCL). Possono essere trasformate in composti naturali come acqua, CO₂ e compost da parte di microrganismi presenti in

ambiente che le utilizzano come fonte di sostentamento per la loro crescita. Il 90% del materiale deve essere biodegradato entro sei mesi.

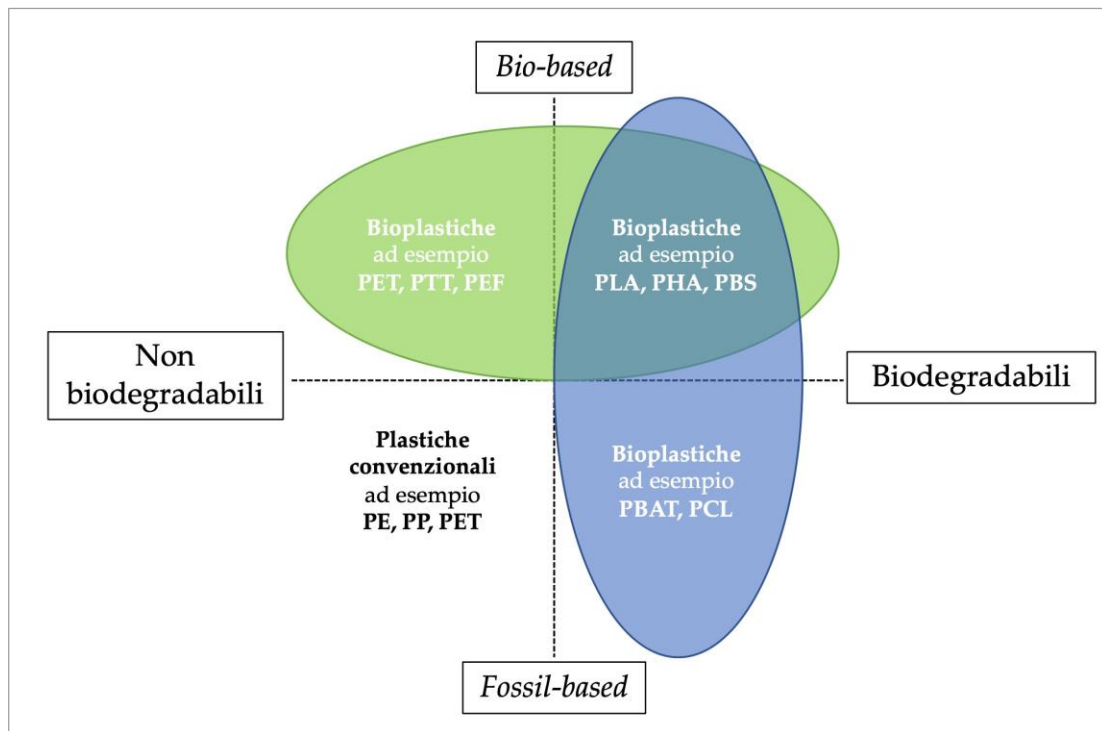


Figura 1.2. Tipi di plastiche biodegradabili e non biodegradabili, bio-based e fossil-based.

Come emerge dalla Figura 1.2., *biobased* non è sinonimo di biodegradabile: infatti, se una plastica viene prodotta a partire da materiali a base biologica non significa necessariamente che sia anche biodegradabile.

L'utilizzo di bioplastiche rispetto a quelle "convenzionali" presenta numerosi vantaggi.

- Hanno un minor impatto sull'ambiente in quanto vengono più facilmente (e rapidamente) riassorbite dall'ambiente riducendo così l'inquinamento e l'impatto sull'ecosistema.
- Sono prodotte a partire da fonti rinnovabili: ciò comporta una minore dipendenza da risorse non rinnovabili e minori emissioni di gas serra.

- L'uso di materie prime organiche può essere da stimolo per le attività agricole, combattendo così l'eccessiva urbanizzazione delle aree rurali.

Purtroppo, però, allo stato attuale, i costi di produzione sono ancora molto elevati e ciò incide sul prezzo del prodotto finale e, di conseguenza, sulla scelta della merce da parte del consumatore.

Inoltre, la maggior parte delle bioplastiche sono composte da farina o amido di mais, e non da scarti agricoli o alimentari: questo potrebbe avere un impatto negativo sulla disponibilità di beni alimentari causando rincari sugli alimenti come pane e pasta.

Infine, spesso non vengono smaltite correttamente perché finiscono in discarica e vengono mantenute in luoghi asciutti che ne impediscono la biodegradazione, che contrariamente deve avvenire in ambienti aerati in condizioni controllate di pH, temperatura e umidità.

Attraverso la lavorazione chimica è possibile ottenere materie plastiche con proprietà adatte alle specifiche applicazioni, ossia utilizzando diversi elementi e aggiungendo una serie di additivi e plasticizzanti, in modo tale da modificarne forma, peso molecolare e altre proprietà chimico-fisiche.

I prodotti finiti, a loro volta, possono essere classificati come materiali termoplastici, termoindurenti o elastomeri.

- **TERMOPLASTICHE:** la caratteristica fondamentale è di fondere quando vengono riscaldate e di solidificare quando vengono raffreddate. Questa proprietà, che dà il nome al materiale, è reversibile: ciò consente un loro utilizzo nelle normali tecnologie di trasformazione (come estrusione, soffiaggio, stampaggio a iniezione, ecc.). Ne fanno parte il maggior numero

di polimeri come: polietilene, polipropilene, polietilene tereftalato, polistirene, cloruro di polivinile, polimetilmetacrilato, policarbonato, acrilonitrile butadiene stirene, poliammide.

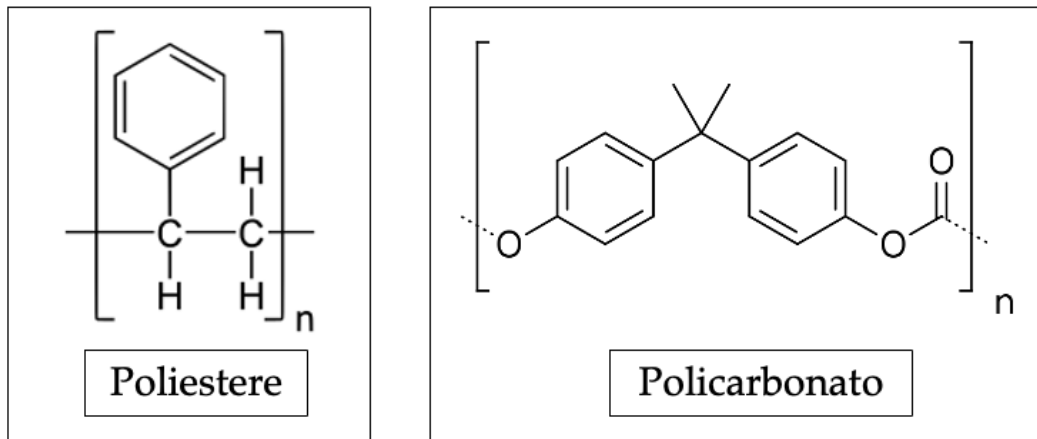


Figura 1.3. Esempi di materiali termoplastici.

- TERMOINDURENTI: il calore ne provoca dei cambiamenti chimici conferendo alla struttura una reticolazione tridimensionale: dunque, a differenza delle precedenti, non possono essere lavorate nuovamente. Queste materie plastiche sono più dure e più fragili rispetto alle materie termoplastiche. Appartengono a questa famiglia il poliuretano, le resine poliesteri insature, le resine epossidiche e le resine fenoliche.

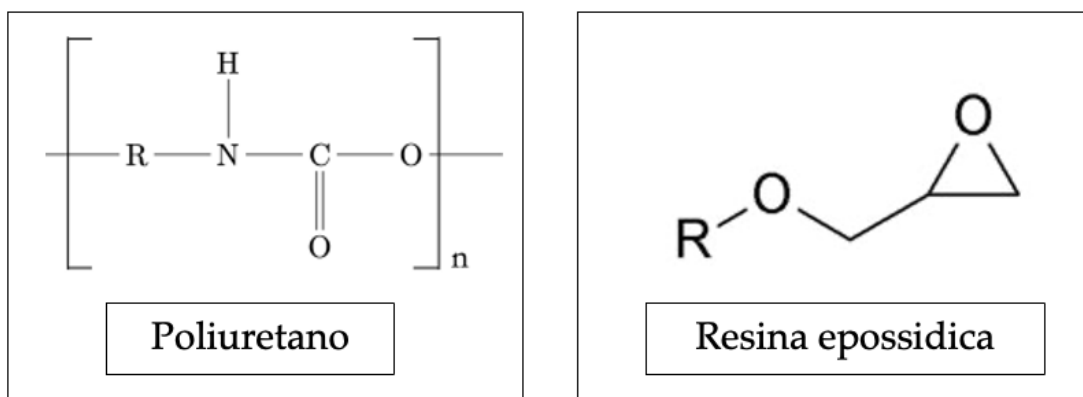


Figura 1.4. Esempi di materiali termoindurenti.

- ELASTOMERI (o gomme): possono essere termoplastici o termoindurenti, ma la loro importante caratteristica è l'elasticità in un ampio range di temperature per effetto della quale possono subire numerose deformazioni ma al termine della sollecitazione riacquistano la forma originale. Ne sono un esempio: la gomma naturale, il polibutadiene, i tioplasti e il policloroprene.

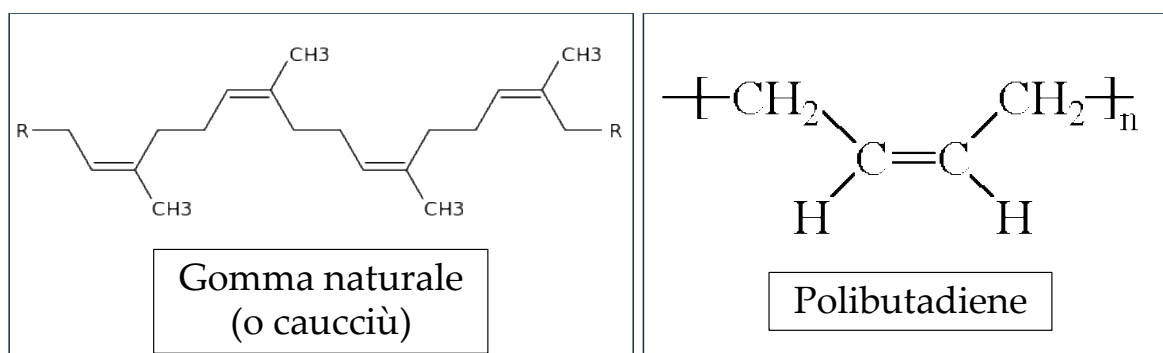


Figura 1.5. Esempi di elastomeri.

1.1.2. Settori di applicazione e produzione mondiale

Le materie plastiche sono utilizzate in un'ampia varietà di applicazioni nella vita quotidiana e stanno sempre più sostituendo i materiali tradizionali come il vetro, il metallo e la carta. Ciò è dovuto principalmente alle loro eccezionali proprietà come: l'isolamento al calore e all'elettricità, la resistenza alla corrosione e all'abrasione; inoltre, sono facilmente modellabili in diverse forme, il che li rende ideali per un'ampia varietà di applicazioni in quasi tutti i settori (Geyer et al., 2017).

Il più noto è quello della vendita al dettaglio, responsabile di circa il 40% della produzione di plastica. Si tratta principalmente di materiali da imballaggio.

Il settore edile produce grandi quantità di rifiuti plastici, soprattutto nei grandi progetti infrastrutturali.

L'industria tessile è anch'essa responsabile dell'inquinamento da plastiche, con 200-500 mila tonnellate all'anno.

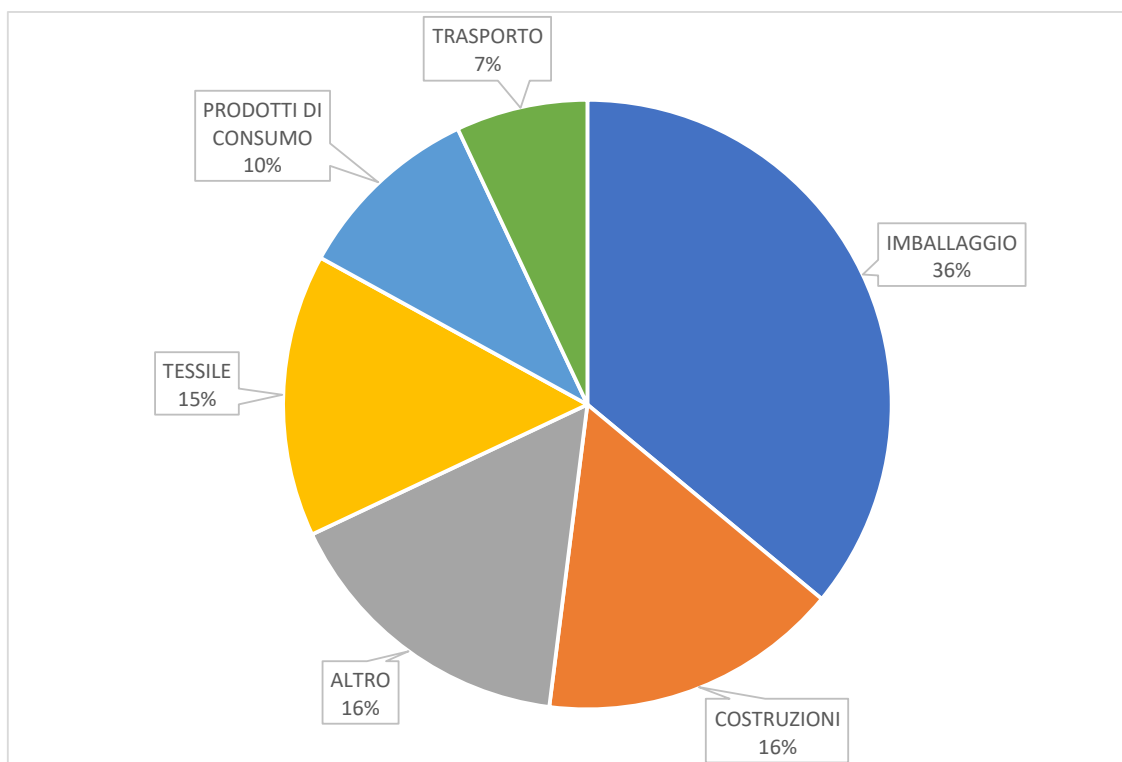


Figura 1.6. Produzione di plastica suddivisa per settori industriali, in percentuale (Geyer et al., 2017)

Negli ultimi decenni vi è stato un aumento nell'utilizzo di plastica a livello globale (Nielsen et al., 2020), dovuto in particolar modo alle loro proprietà chimico-fisiche, al basso costo e alla flessibilità di questo materiale. Nel 1950 la produzione annua di plastica a livello mondiale stimata era di circa 2 milioni di tonnellate (Mt) e nel 2018 è aumentata esponenzialmente fino a 359 Mt (Lebreton & Andrady, 2019). Secondo le previsioni, la produzione potrebbe ulteriormente aumentare del 40% entro il 2030 in assenza di politiche adeguate.

La Figura 1.7. riporta la distribuzione mondiale della produzione di plastica nel 2017 e nel 2021: la Cina nel 2019 rappresentava il 31% della produzione globale di materie plastiche, che corrisponde a più di 120 Mt all'anno (*Plastics Europe, 2022*). L'Italia è il secondo consumatore di plastica in Europa: nel 2020 si sono consumati circa 100 kg a persona, per un totale di 5.9 milioni di tonnellate (*Plastics Europe, 2022*).

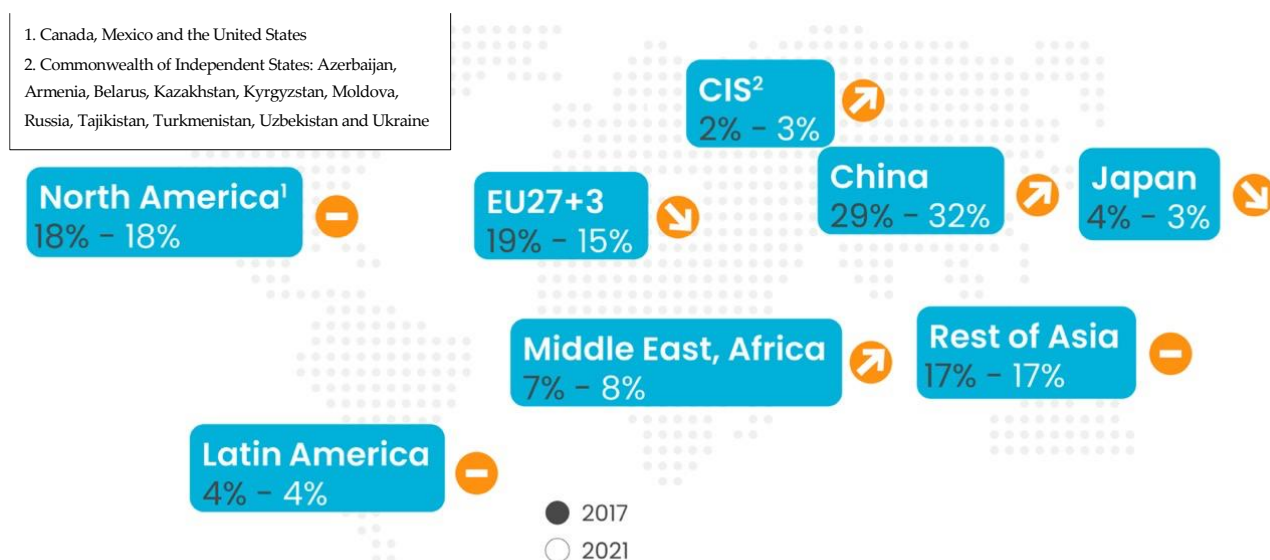


Figura 1.7. Distribuzione della produzione di plastica nel mondo (*Plastics Europe, 2022*)

Purtroppo, l'incessante produzione di materie plastiche non è stata accompagnata da una corretta gestione dei rifiuti. Ad esempio, nel 2018 solo 29,1 tonnellate sono state recuperate e smaltite correttamente: di queste, solo il 32,5% è stato riciclato, circa il 43% è stato recuperato come energia e il restante 25% è stato smaltito in discarica (*Plastics Europe, 2019*). La differenza tra la produzione e il recupero della plastica è evidente e significativa, soprattutto se si considera che circa il 40% è destinata agli imballaggi e quindi ad applicazioni quasi "usa e getta", con una durata inferiore ad un anno.

1.1.3. Processi di degradazione e frammentazione

Le materie plastiche subiscono processi di degradazione da parte di fenomeni meccanici, biologici o fisici che determinano un cambiamento delle proprietà fisiche come, ad esempio, la forma, la dimensione, la porosità, la cristallinità ed in particolare il peso molecolare medio del polimero (Kiran et al., 2022). Poiché la resistenza meccanica dipende sempre dal peso molecolare, la degradazione indebolisce inevitabilmente il materiale, che si sfalda in frammenti di minori dimensioni.

Le plastiche possono, quindi, diffondere micro- e nanoplastiche attraverso processi di degradazione sia biotica che abiotica. In Figura 1.8. sono riportati i principali meccanismi di degradazione della plastica (Liu et al., 2022).

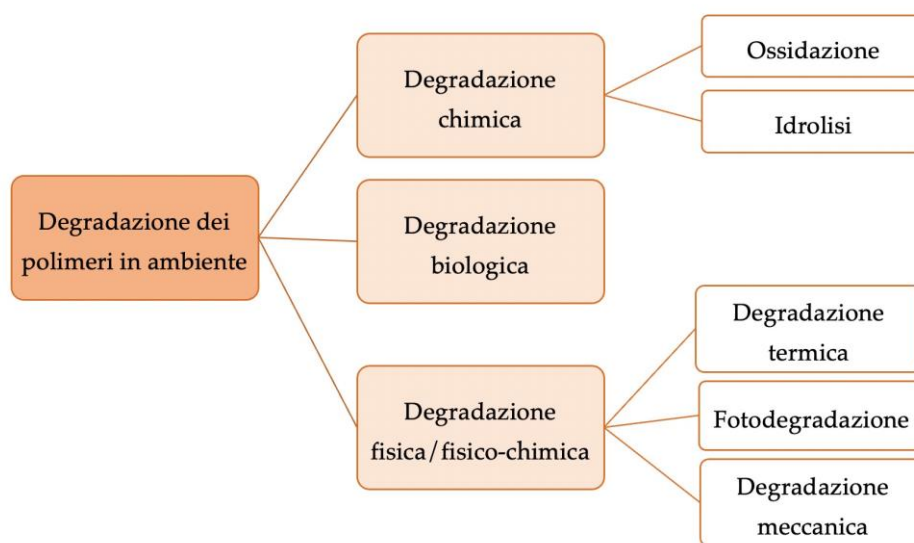


Figura 1.8. Principali meccanismi di degradazione dei polimeri plastici in ambiente.

- Degradazione termo-ossidativa: è l'ossidazione a moderate temperature (circa 30°C), con conseguente deterioramento del materiale; è la principale causa di presenza di nanoplastiche nell'ambiente.

- Idrolisi: è una reazione chimica naturale che utilizza le molecole d'acqua per rompere i legami chimici delle macromolecole in monomeri. Temperatura, pH e tempo di contatto sono i fattori chiave che influenzano l'efficienza del processo (Lucas et al., 2008).
- Degradazione termica: è dovuta all'esposizione ad elevate temperature con conseguente rottura della catena polimerica nelle varie componenti che, reagendo, modificano le proprietà del materiale (principalmente la riduzione di peso, dimensione, duttilità e colore) (D. Chen et al., 2014).
- Fotodegradazione (o degradazione foto-ossidativa): è la principale causa di degradazione della plastica. Si verifica quando il materiale è esposto a radiazioni ultraviolette (UV) e ossigeno: ciò causa una riduzione della massa molare accompagnata da un decadimento delle proprietà meccaniche del polimero. Le materie plastiche di tonalità più scure raggiungono temperature più alte perché tendono ad assorbire maggiore energia infrarossa nello spettro solare (Andrady et al., 1996).
- Degradazione meccanica: è il risultato di sollecitazioni di flessione, torsione e allungamento a cui il materiale è sottoposto.
- Biodegradazione: è il processo mediante il quale la materia organica viene degradata mediante l'attività enzimatica dei microrganismi, come batteri e funghi, in presenza o in assenza di ossigeno (rispettivamente processo aerobico e anaerobico) (Gewert et al., 2015).

1.2. Le microplastiche

Il termine "microplastica" (MP) è stato formalmente introdotto nel 2004 da Richard C. Thompson, un biologo marino dell'Università di Plymouth nel Regno Unito, che per primo lo ha utilizzato per descrivere frammenti di plastica di piccole dimensioni, raccolti durante operazioni di campionamento in mare (Thompson et al., 2004).

Data la complessità e la diversità delle plastiche prodotte direttamente o indirettamente dall'uomo, le microplastiche sono inquinanti con peculiari prerogative. Sono composte da polimeri e additivi funzionali di diversi tipi, forme e colori e sono convenzionalmente definite come particelle polimeriche solide, non biodegradabili di dimensioni inferiori a 5 mm. Si stima che queste particelle rappresentino il 94% del totale dei detriti plastici: la diffusione e la persistenza negli ecosistemi è dovuta proprio alla loro più importante proprietà di lenta degradazione. Per questo negli ultimi anni, l'attenzione della ricerca nel campo della protezione ambientale si è concentrata proprio su queste microparticelle, dato l'elevato impatto ambientale che stanno dimostrando di avere: a causa delle loro dimensioni limitate, possono causare danni diretti e indiretti agli organismi viventi (compreso l'uomo) attraverso il contatto diretto, l'esposizione all'aria e il consumo di alimenti contaminati (Martellone et al., 2022).

1.2.1. Classificazione per dimensione

La degradazione, abiotica o biotica, della plastica è la principale fonte di produzione di microplastiche e nanoplastiche in ambiente. Questo tipo di materiale, infatti, viene classificato e studiato in base alla dimensione.

Ad oggi vi sono molteplici definizioni a riguardo, non essendo ancora stata adottata una classificazione univoca da parte della comunità scientifica. La più completa è quella fornita dal *joint Group of Experts on the Scientific Aspects of Marine Environmental Protection* (GESAMP) (GESAMP, 2015):

- Megaplastiche, di dimensione superiore a 1 m
- Macroplastiche, tra 2.5 cm e 1 m
- Mesoplastiche, tra 1 mm e 2.5 cm
- Microplastiche, tra 1 μm e 1 mm
- Nanoplastiche, di dimensione inferiore a 1 μm

Tuttavia, la classificazione più diffusa è quella che definisce le microplastiche come particelle fino a 5 mm anziché 1 mm. Infatti, questo limite dimensionale superiore è stato adottato in occasione del primo workshop internazionale sul tema MPs nel 2008, organizzato dalla *National Oceanic and Atmospheric Administration* (NOAA), nonché la più frequentemente utilizzata negli articoli scientifici sull'argomento. Questa classificazione è condivisa da molte organizzazioni internazionali come, ad esempio, l'ECHA, Agenzia europea delle sostanze chimiche, l'EFSA, Autorità europea per la sicurezza alimentare e l'UNEP, Programma delle Nazioni Unite per l'Ambiente, principale autorità mondiale in materia (UNEP, 2014). Inoltre, il comitato ISO/TC 61/SC 14, ISO/TR

21960:2020, ha lavorato sulla standardizzazione della nomenclatura e dell'analisi delle microplastiche (Zamfir et al., 2023) e ha definito come:

- "*macroplastics*" le particelle di dimensioni superiori a 5 mm
- "*large microplastics*" le particelle di dimensioni comprese tra 1 e 5 mm
- "*microplastics*" le particelle di dimensioni comprese tra 1 μm e 1 mm
- "*nanoplastics*" le particelle di dimensioni inferiori a 1 μm

La definizione dimensionale è molto efficace nel caso di particelle di forma sferica, ma si complica nella misurazione di frammenti di forma irregolare. I due principali metodi utilizzati sono: l'osservazione visiva, nella quale si fa riferimento alla dimensione massima, e la setacciatura, in cui si considera il diametro equivalente ossia la larghezza dell'apertura minima attraverso la quale la particella passa.

1.2.2. Classificazione per origine

Le microplastiche possono essere suddivise, in base alla loro origine, in due tipologie principali:

- Microplastiche primarie
- Microplastiche secondarie

Le microplastiche primarie sono materiali intenzionalmente prodotti per specifiche applicazioni industriali o per l'uso in molti prodotti commerciali dell'industria cosmetica (come, ad esempio, detergenti per il viso, deodoranti, bagnoschiuma, creme solari). Nonostante siano state considerate a lungo una fonte minoritaria di inquinamento, la costante diffusione di prodotti per la cura personale ne ha aumentato la concentrazione in ambiente. Queste microparticelle, infatti, raggiungono molto facilmente i corpi idrici e sebbene rappresentino solo una piccola percentuale del totale delle microplastiche presenti negli oceani e nei mari, si nota che nelle acque reflue sono la fonte principale: non sembrano essere rimosse dai sistemi di depurazione perché non vengono intercettate dai filtri per via delle loro dimensioni estremamente ridotte (Rubio-Armendáriz et al., 2022). Di questo gruppo fanno parte le *microbeads* (particelle di forma sferoidale) che sono state utilizzate anche come abrasivi nei cosmetici ad azione esfoliante o detergente, e successivamente bandite in Italia, per questo utilizzo, a partire dal 1° gennaio 2020 (Martellone et al., 2022).

Altri prodotti molto diffusi sono i pellet di plastica, generalmente polietilene e polipropilene, acquistati come materie prime industriali per essere lavorate in manufatti di dimensioni maggiori.

Per ridurre l'impatto di questa tipologia di MPs in ambiente è necessario attuare politiche che mirino a una diminuzione della loro produzione. Infatti, l'Unione Europea (UE) ha avviato un processo per limitarne l'uso in conformità alle raccomandazioni dell'ECHA, la quale nel gennaio del 2019 ha proposto delle restrizioni sull'utilizzo di MPs nei prodotti commercializzati nell'UE per ridurre al minimo la loro presenza.

Le microplastiche secondarie, invece, sono particelle originatesi dai processi di usura e deterioramento chimico-fisico di oggetti di plastica, come sacchetti della spesa, bottiglie, buste e reti da pesca. La gestione impropria dei rifiuti plastici e la loro successiva dispersione nell'ambiente fanno sì che, nel tempo, l'integrità strutturale dei detriti di plastica sia compromessa da processi fisici, chimici e biologici, con conseguente frammentazione in particelle di piccole dimensioni (Kiran et al., 2022). Infatti, la rottura meccanica e la luce ultravioletta proveniente dal sole sono i principali responsabili del rilascio di microplastiche secondarie. È importante sottolineare che, nonostante queste siano soggette a continua frammentazione, quelle originate da fonti fossili sono persistenti perché non sono biodegradabili.

Le microplastiche secondarie rappresentano il 70-80% del totale della plastica rilasciata in ambiente, mentre quelle primarie contribuiscono solo al 15-30%.

1.2.3. Caratteristiche descrittive dei polimeri: proprietà fisiche e chimiche

La natura dei polimeri plastici (unitamente agli additivi intenzionalmente aggiunti) gioca un ruolo importante nel determinare non solo la modalità di formazione, ma anche il destino ambientale e il potenziale impatto sugli ecosistemi.

Le proprietà che descrivono le MPs sono:

- proprietà fisiche: dimensione, forma e colore;
- proprietà chimiche: additivi aggiunti, cristallinità, proprietà di superficie.

Proprietà fisiche

La forma è uno dei principali indicatori utilizzati per classificare le microplastiche. Alcuni fattori come, ad esempio, la degradazione, i processi di erosione e il tempo trascorso nell'ambiente ne influenza la tipologia. Le MPs, quindi, si presentano in un'ampia varietà di forme e le principali sono: sfera (*microbeads*), filamento, frammento e fibre. Le ultime due sono quelle più riscontrabili in natura, in particolar modo nelle acque reflue urbane (52,7%) e nelle deposizioni atmosferiche (Annenkov et al., 2021). Le MPs primarie sono per lo più sferiche o fibrose, mentre le secondarie hanno forme più irregolari perché il deterioramento porta ad assumere forme molto diverse da quelle di partenza

Il colore è un altro importante parametro per l'identificazione dei detriti di plastica. Le fibre blu e rosse sono le più abbondanti in ambiente; le particelle

scure, trasparenti o bianche possono essere, invece, sottostimate a causa della colorazione che rende difficile la loro identificazione e quantificazione.

Tabella 1.2. Proprietà fisiche utilizzate per l'identificazione delle microplastiche.

**Granuli di plastica di forma circolare o sferoidale.*

CATEGORIA	DESCRIZIONE	
DIMENSIONE	<ul style="list-style-type: none"> • 1 μm – 5 mm 	
TIPOLOGIA	<ul style="list-style-type: none"> • Frammento • Film • Sfera 	<ul style="list-style-type: none"> • Filamenti • Plastica espansa • Pellet di plastica*
FORMA	<ul style="list-style-type: none"> • Pellet: cilindrico, piatto, ovoidale, sferoidale • Frammento: arrotondato, angolare 	
COLORE	<ul style="list-style-type: none"> • Trasparente • Bianco • Rosso • Arancione • Blu 	<ul style="list-style-type: none"> • Nero • Grigio • Marrone • Giallo • Verde

Proprietà chimiche

Le microplastiche utilizzate nei prodotti industriali e commerciali sono costituite da materiali polimerici di base e da diversi additivi. Questi vengono aggiunti durante il processo di produzione della plastica per ottenere il colore o la trasparenza desiderati, per aumentarne la duttilità o per rendere il polimero più resistente alla degradazione fisica, meccanica, elettrica o biologica. Oltre a migliorare le proprietà della plastica, però, possono essere tossici e potenzialmente contaminanti del suolo, dell'acqua e dell'aria: la loro ingestione può causare problemi al sistema endocrino, respiratorio e riproduttivo

(Schwinghammer et al., 2021). Dunque, la tossicità di questi materiali è correlata alle sostanze chimiche presenti all'interno del materiale come, ad esempio, solventi, catalizzatori, coloranti e plastificanti.

La cristallinità delle materie plastiche può variare da zero (polimero completamente amorfo) a 95% (stato completamente cristallino). Questa proprietà dipende dalla velocità di raffreddamento durante la fase di cristallizzazione: le catene disperse ad elevate temperature possono assumere una configurazione ordinata se hanno il tempo sufficiente per muoversi ed allinearsi. Inoltre, il grado di cristallizzazione è influenzato dalla composizione chimica e dalla configurazione delle catene polimeriche: la cristallinità è favorita nei monomeri semplici (ossia nei polimeri lineari), mentre i polimeri reticolati sono quasi completamente amorfi. Questa proprietà può influenzare la dimensione, l'area superficiale e l'adsorbimento di inquinanti, oltre alla densità, la permeabilità e il grado di "rigonfiamento" del materiale. Infatti, la densità di un polimero amorfo è minore rispetto a quella di un polimero cristallino, perché in questo caso la struttura è compatta (Campanale et al., 2020).

Infine, per quanto riguarda le proprietà superficiali, queste dipendono dalla struttura chimica dei polimeri e la reattività superficiale è inversamente proporzionale alla dimensione delle particelle. La loro superficie è influenzata da processi di degradazione ossidativa: infatti, possono reagire con radicali $\cdot\text{OH}$, ossidi di ossigeno e azoto, e generare nuovi gruppi funzionali. Queste reazioni alterano l'area superficiale della plastica, con conseguente rilascio di MPs (e di NPs da *microbeads* primarie) (kiran et al., 2022).

Tabella 1.3. Proprietà chimiche che influiscono sul comportamento e sulla tossicità delle microplastiche in ambiente.

PROPRIETÀ	CONSEGUENZE
ADDITIVI	Sono intenzionalmente aggiunti per migliorare le qualità del prodotto; sono degli inquinanti ambientali e possono entrare nella catena alimentare
CRISTALLINITA'	Determina la facilità di degradazione ossidativa e frammentazione durante gli agenti atmosferici
PROPRIETA' SUPERFICIALI	L'alterazione dell'area superficiale influenza la degradazione del materiale plastico da agenti atmosferici e il conseguente rilascio di MPs e NPs.

La densità

La densità è una delle proprietà più importanti dei polimeri plastici nello studio della loro distribuzione e diffusione nelle matrici ambientali. Infatti, è possibile prevedere la loro presenza in superficie o sul fondo di un corpo idrico, in base alla differenza di densità del polimero con quella dell'acqua.

Alcuni fenomeni, però, possono alterare la densità del materiale: infatti, le particelle (come il PET) potrebbero risultare più pesanti dell'acqua se sono soggette a corrosione e fessurazione, poiché il materiale organico tende ad accumularsi nelle cavità. Viceversa, la presenza di bolle d'aria ne favorisce il galleggiamento, rendendole più leggere.

1.2.4. Prodotti di degradazione dei materiali plastici: i polimeri più diffusi in ambiente

Quando si considerano i percorsi e i prodotti di degradazione delle plastiche, è utile suddividerle in due gruppi: le plastiche con una struttura costituita da atomi di carbonio, come PE, PP, PS e PVC, e quelle con eteroatomi nella catena principale, come il PET (Gewert et al., 2015).

Il PE è il polimero sintetico più semplice ed economico, e rappresenta il 40% del volume totale della produzione di materie plastiche nel mondo. Ciò è dovuto alle eccellenti proprietà di resistenza agli agenti chimici, all'acqua, alle soluzioni saline, agli acidi, all'alcool e alla benzina. La temperatura di esercizio è compresa tra $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $+80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Le caratteristiche del PE si possono così riassumere: basso costo, facilità di lavorazione, flessibilità anche a basse temperature, trasparenza, inodore e atossico. L'ossidazione abiotica del PE mediante esposizione alle radiazioni ultraviolette è la fase iniziale e determinante per la degradazione nell'ambiente.

Nei prodotti commerciali però il simbolo del è specificato come HDPE (polietilene ad alta densità) o LDPE (polietilene a bassa densità). La principale differenza tra questi due polimeri è la resistenza, che ne influenza i diversi utilizzi. Infatti, la plastica costituita da LDPE è meno resistente a causa della sua forma ramificata ma più economica e di facile produzione, ed è infatti preferita rispetto all'HDPE, utilizzato invece in applicazioni che richiedono un elevato grado di resistenza e di qualità come nel settore alimentare.

Il PP è la più giovane delle materie plastiche ma in pochi anni ha raggiunto uno sviluppo produttivo e una varietà di applicazioni senza precedenti. Le sue caratteristiche sono molto simili al polietilene ma è dotato di una minore densità, e maggiore rigidità e durezza. Infatti, è il materiale più rigido tra i polimeri sintetici e mantiene questa sua importante caratteristica anche a temperature superiori ai 100 °C.

Il PS, conosciuto con il termine "polistirolo", è un polimero termoplastico amorfo appartenente alla famiglia delle resine stireniche. Risulta facilmente lavorabile nelle produzioni industriali e presenta buone proprietà elettriche e dielettriche, per questo viene utilizzato come isolante nei condensatori. Questo polimero è molto suscettibile agli agenti atmosferici.

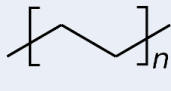
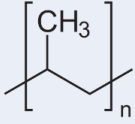
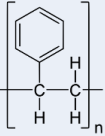
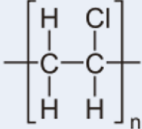
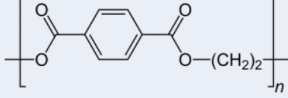
Il PVC, o polivinilcloruro, è il polimero più diffuso perché è una delle materie plastiche di maggiore consumo a livello globale (insieme a PE, PS e PP). Il monomero di partenza è il cloruro di vinile, la cui formula chimica è: $-(CH_2CHCl)_n-$. Appartiene alla categoria dei materiali termoplastici amorfi ma le sue proprietà sono molto variabili a seconda degli additivi chimici aggiunti, ad esempio stabilizzanti, lubrificanti, antiurto, anti-UV, cariche e plastificanti. Infatti, può essere utilizzato nelle tubature dell'acqua come RPVC (dove R sta per rigido), oppure più flessibile in applicazioni di tessuto. Viene utilizzato come materiale industriale con temperatura di esercizio compresa tra -10 °C e +60 °C, ma dal processo di combustione si sprigionano diossine, un gruppo fra le sostanze chimiche più pericolose che può causare malattie gravi al corpo umano, soprattutto al sistema endocrino.

Il PET è un polimero sintetico della famiglia dei poliesteri, parola che deriva dal prefisso greco "poly-", che significa "molti", e "-esteri", composti formati dalla reazione di alcoli e acidi attraverso legami chimici, chiamati legami esteri. In particolare, il poliestere PET è composto dal glicole etilico e dall'acido tereftalico. Questo polimero presenta una buona resistenza chimica, solidità, rigidità, resistenza all'usura e all'abrasione.

È totalmente riciclabile e non perde le sue proprietà fondamentali durante il processo di recupero.

In Tabella 1.4. sono riportate le caratteristiche dei polimeri.

Tabella 1.4. Caratteristiche dei polimeri utilizzati frequentemente come materiali di riferimento di laboratorio.

	POLIETILENE	POLIPROPILENE	POLISTIROLO	CLORURO DI POLIVINILE	POLIETILENTEREFTALATO
sigla	PE	PP	PS	PVC	PET
densità (g/cm³)	0,89 – 0,98	0,83 – 0,92	1,04 - 1,1	1,16 - 1,58	1,3 – 1,4
forma	frammento	fibra; frammento	microsfera	frammento	frammento
colore	bianco trasparente	bianco trasparente rosso	bianco	arancione grigio bianco	blu bianco
struttura					

1.2.5. Pericoli e rischi per l'uomo e per l'ambiente

L'utilizzo della plastica nelle attività umane, come le bottiglie di acqua, gli imballaggi per gli alimenti o i dispositivi medici, ne aumenta l'abbondanza e di conseguenza i rischi per l'ambiente e per l'uomo. Questo grave problema mondiale ha portato la comunità scientifica ed in particolar modo l'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) a interrogarsi circa i possibili effetti tossici sulla salute umana. Gli esperti dell'OMS hanno elaborato un documento relativo alle fonti, alla presenza e alla rimozione di MPs nelle acque potabili e negli impianti di trattamento delle acque reflue urbane, e come l'interazione delle MPs con l'acqua, l'aria e il biota promuova il trasporto e l'entrata nella catena alimentare umana (Martellone et al., 2022).

Il principale problema nello studio degli effetti tossici è dovuto all'eterogeneità, alla dimensione, e alle diverse modalità attraverso cui le microplastiche potrebbero risultare dannose per l'uomo. A tal proposito sono state proposte due modalità di interazione: tossicità diretta ed indiretta.

La prima è legata alle proprietà fisiche delle MPs, in particolare alla forma e alla dimensione. Questi fattori ne influenzano un possibile assorbimento, infatti:

- le particelle più piccole (con dimensioni inferiori a 150 μm) possono essere assorbite da uno o più tessuti (o su specifici organi) e causare effetti sistemici all'uomo;
- le particelle più grandi, invece, pur non essendo assorbibili, possono essere assunte e produrre occlusioni ai sistemi respiratorio e gastrointestinale (senza essere assorbite).

La tossicità indiretta è legata alle proprietà chimiche, ovvero alla possibilità che le microplastiche possano agire come vettori di altri prodotti tossici. Questi possono essere già presenti nel materiale, perché aggiunte nel processo di produzione, oppure adsorbite dall'ambiente circostante.

Infatti:

- possono assorbire inquinanti organici persistenti (POP) sulla superficie, come idrocarburi policiclici aromatici (IPA), policlorobifenili (PCB) o pesticidi, i quali favoriscono la crescita di biofilm batterici.
- gli additivi chimici, che apportano un miglioramento alle proprietà del materiale, possono essere rilasciati nei comparti ambientali come risultato della degradazione.

Al diminuire delle dimensioni di una particella, aumenta il rapporto tra superficie e volume, e di conseguenza la capacità di adsorbire sostanze inquinanti.

In Italia sono state avviate alcune attività di ricerca finalizzate allo sviluppo di metodologie di monitoraggio preliminare delle MPs, ma l'affidabilità dei dati non consente attualmente una solida valutazione dell'esposizione. In questo contesto, l'Istituto Superiore di Sanità (ISS), ha dichiarato che i rischi derivanti dall'inquinamento da microplastiche per la salute umana sono di tre tipi: rischi fisici, rischi chimici e rischi microbiologici.

1. I rischi fisici sono correlati alla dimensione delle MPs perché le particelle più piccole possono facilmente attraversare le barriere biologiche e causare problemi all'apparato respiratorio e digerente.

2. I rischi chimici sono legati alla presenza di additivi, che rappresentano una minaccia soprattutto per il sistema endocrino e riproduttivo.
3. I rischi microbiologici dipendono dalla presenza di batteri, come *Escherichia coli* o *Bacillus cereus*.

Le microplastiche forniscono un substrato di sospensione favorevole per le comunità microbiche, alterando la loro composizione negli ambienti acquatici. Inoltre, l'elevata mobilità e persistenza delle particelle può facilitare il trasporto su larga scala degli organismi, con il rischio che agenti patogeni entrino in nuovi luoghi o che agenti non patogeni acquisiscano rapidamente una resistenza agli antibiotici e si diffondano.

Molti studi hanno riportato che le microplastiche sono facilmente ingerite da una varietà di specie, tra cui pesci, tartarughe, uccelli acquatici e mammiferi, a causa delle loro piccole dimensioni. La preoccupazione maggiore è la possibilità che la plastica ingerita venga trasferita agli organismi di livello trofico superiore: gli effetti negativi e la biodisponibilità dei contaminanti sono ancora oggetto di studio (Wang et al., 2016).

1.2.6. La comunità scientifica e la legislazione internazionale

La contaminazione da microplastiche interessa anche la comunità scientifica che fornisce un importante supporto a sostegno di questo crescente problema mondiale. Gli esperti impegnati nelle diverse attività di ricerca hanno un ruolo fondamentale nel:

- armonizzare i metodi di campionamento, estrazione, identificazione e quantificazione;
- definire materiali di riferimento di laboratorio, che simulino in maniera più fedele possibile il comportamento dei frammenti che si trovano in ambiente;
- fornire dati quantitativi confrontabili;
- definire procedure per l'analisi in matrici complesse, che garantiscano le caratteristiche del campione durante la preparazione;
- sviluppare programmi di monitoraggio che consentano di controllarne la quantità e l'efficacia di rimozione degli impianti di trattamento delle acque reflue;
- monitorare le fonti più diffuse per indirizzare le future azioni normative.

Utilizzando una banca dati accessibile online (ad esempio, *Scopus*) è possibile effettuare un'indagine bibliografica riguardante il numero di pubblicazioni scientifiche (Figura 1.9.) e la loro distribuzione geografica (Figura 1.10.) utilizzando come *keyword* "microplastiche" considerando un arco temporale dal 2010 all'anno corrente.

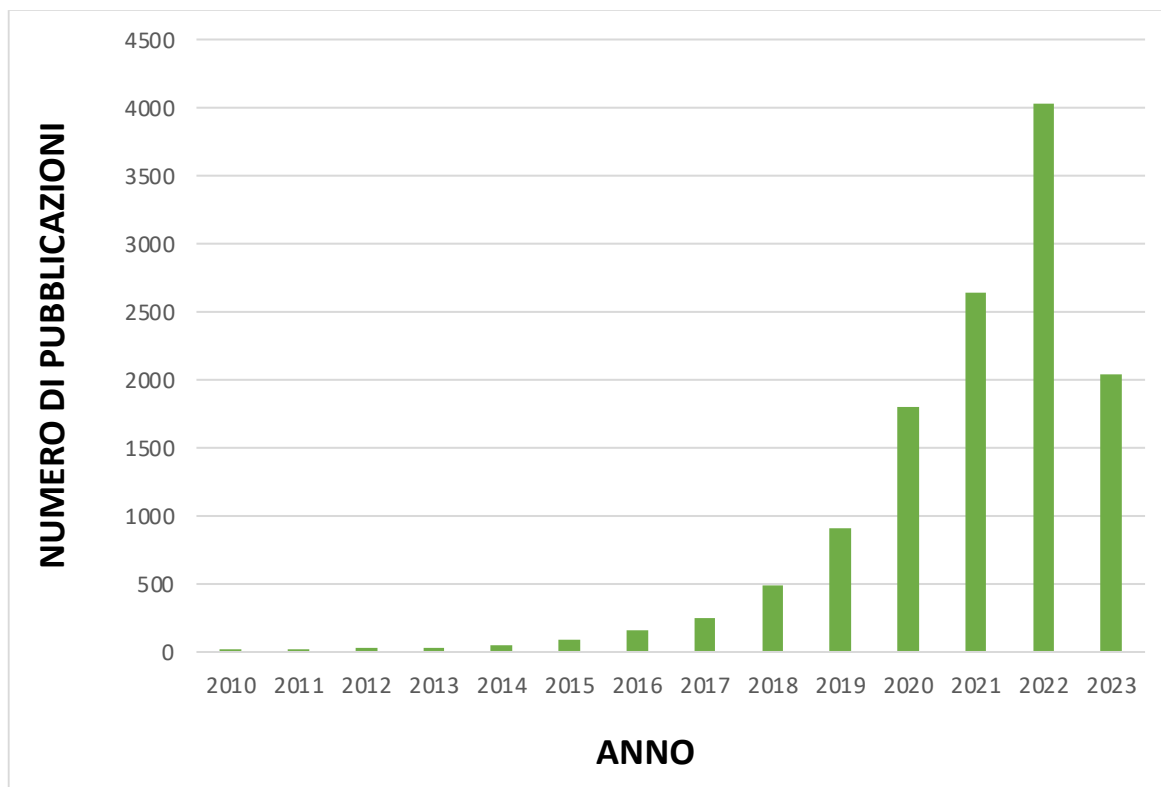


Figura 1.9. Numero di pubblicazioni scientifiche suddivise per anno di pubblicazione, utilizzando come banca dati "Scopus" e come Keyword "microplastiche", nell'intervallo di anni 2010-2023 (dati aggiornati ad agosto 2023).

Tra il 2016 e il 2017 il numero di articoli e *review* riguardanti tali frammenti è aumentato notevolmente unitamente all'utilizzo di materie plastiche nella vita quotidiana e alla crescente preoccupazione della loro dispersione negli ecosistemi ambientali.

Inoltre, pur essendo molto elevato il numero di pubblicazioni in Cina, il contributo complessivo dell'Europa si avvicina notevolmente, a dimostrazione dello sforzo scientifico del territorio riguardo questo importante problema ambientale.

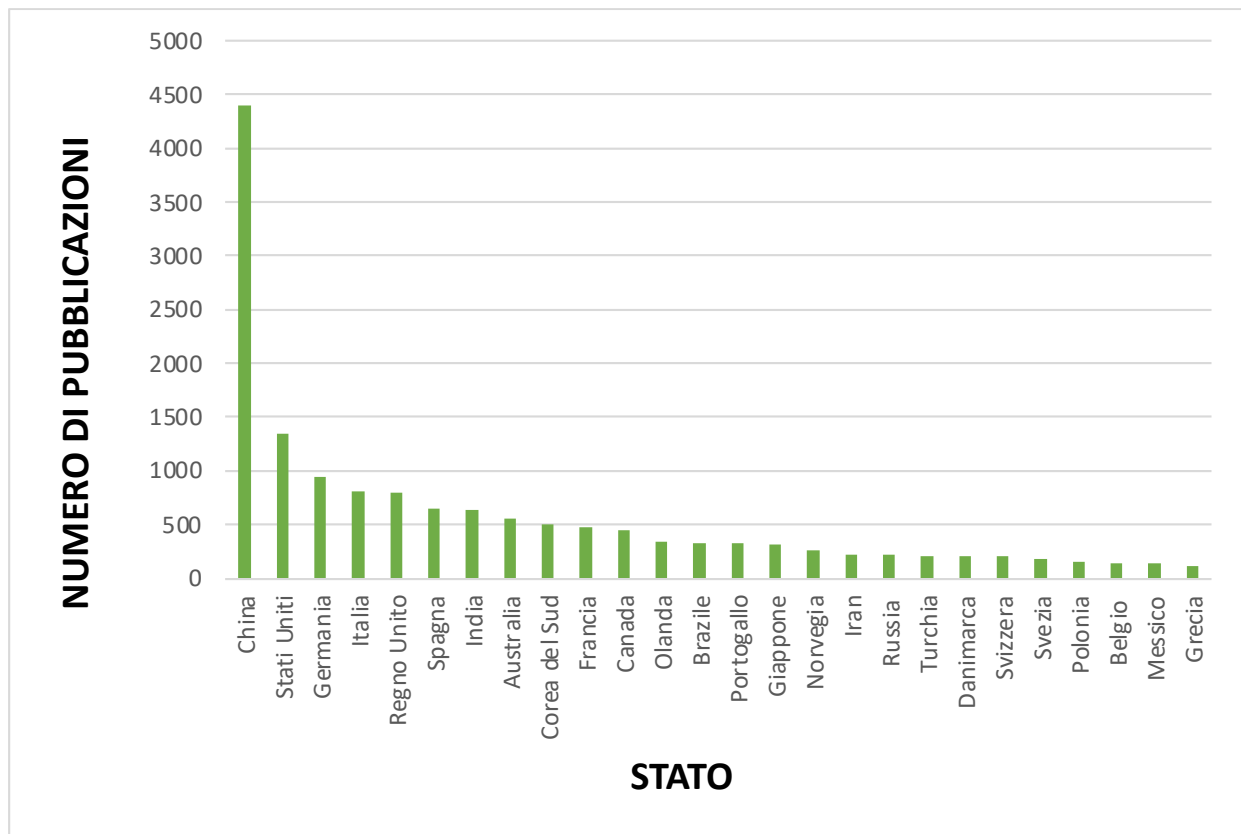


Figura 1.10. Numero di pubblicazioni scientifiche suddivise per Stato, utilizzando come banca dati "Scopus" e come Keyword "microplastiche", nell'intervallo di anni 2010-2023 (dati aggiornati ad agosto 2023).

È importante sottolineare che la ricerca sulle microplastiche non può essere sviluppato senza un ampio approccio multidisciplinare ed istituzionale.

La legislazione a livello internazionale in tema microplastiche è molto frammentata, con leggi, regolamenti, strategie, programmi e linee guida appartenenti a diversi enti e organizzazioni. L'obiettivo principale dei governi di tutto il mondo è stato quello di limitare o vietare la vendita di sacchetti di plastica.

Le microplastiche sono state incluse come contaminanti nella Direttiva europea 2020/2184 sulle acque potabili, che riporta un elenco delle sostanze considerate tossiche per l'uomo.

Dal punto di vista internazionale, l'ISO (Organizzazione Internazionale per la Standardizzazione), che coinvolge 167 paesi nel mondo e si occupa dello sviluppo di protocolli, raggruppa più di 800 comitati tecnici (TC) alcuni dei quali impegnati nel tema delle microplastiche nelle matrici acqua, aria e suolo; sono, infatti, già stati pubblicati più di 30 standard riguardanti la caratterizzazione e il monitoraggio delle MPs.

A livello europeo, il CEN (Comitato Europeo di Normazione) collabora attivamente con l'ISO: in particolare, il comitato tecnico 249 (CEN/TC 249) coinvolge un gruppo di esperti che lavora sugli aspetti ambientali legati all'inquinamento da MPs. Le future attività di normazione del CEN/TC 249 potrebbero continuare a sostenere la transizione verso un'economia circolare della plastica.

Ad oggi, però, sono molti gli aspetti da approfondire nel campo delle microplastiche e appare sempre più evidente la crescente necessità di standardizzare aspetti legati alla loro definizione e dimensione, per consentire lo sviluppo di metodi normalizzati necessari alla quantificazione, identificazione ed al confronto tra dati provenienti da diverse fonti.

1.3. Impianti di trattamento delle acque reflue

Le attività domestiche, industriali e ricreative utilizzano grandi quantità di acqua con conseguente produzione di scarichi che devono essere sottoposti ad un trattamento depurativo prima di essere reimmessi in ambiente. Le acque reflue contengono elevate quantità di composti chimici di origine sintetica e possono essere inquinanti o dannose per l'uomo e per l'ambiente, oltre a causare molteplici problemi ai processi di smaltimento. Infatti, gli ecosistemi acquatici (mare, laghi, fiumi, etc.) sono aree caratterizzate da un'elevata diversità ecologica e da una forte fragilità ambientale, aggravata dalle ingenti quantità di sostanze inquinanti che alterano la qualità delle proprie acque a causa dell'insufficiente capacità autodepurativa del sistema.

Appare evidente come la corretta gestione delle acque reflue rappresenti un importante sostegno alla salvaguardia ambientale e alla qualità della vita dei territori urbanizzati, attraverso sistemi di trattamento artificiali che riproducano i processi biologici che avvengono in ambiente naturale (autodepurazione) ma in tempi ridotti, grazie all'utilizzo della tecnologia e dell'energia. Il trattamento del refluo è tanto più spinto quanto più il corpo idrico recettore è soggetto a rischio di inquinamento permanente.

La stretta connessione esistente tra fognature, impianti di depurazione e vasche di raccolta richiede un accurato studio dell'intero sistema: infatti, negli ultimi due decenni si è assistito ad un'evoluzione di tecniche civili e industriali per la progettazione, la costruzione, la manutenzione e la gestione dei sistemi di drenaggio urbano e degli impianti settici. Questo importante sviluppo e

miglioramento è dovuto principalmente alla necessità di soddisfare alcune esigenze, tra cui:

- aumentare la potenzialità degli impianti di depurazione a causa dell'intensificazione dei territori urbanizzati e, di conseguenza, delle portate volumetriche di acque reflue in entrata;
- migliorare il controllo della qualità degli scarichi e i sistemi di rimozione delle sostanze inquinanti;
- limitare l'impatto sui corpi recettori, nel rispetto della salute ambientale e parallelamente alle politiche e normative nazionali e locali.

Un impianto di trattamento delle acque reflue è costituito da una serie di processi di natura fisica, chimica e biologica che consentono la rimozione delle sostanze inquinanti dalla matrice acquosa, la quale può essere poi reimpressa nel ciclo dell'acqua tramite i corpi recettori. È suddiviso in:

- Linea acque (Figura 1.11.)
- Linea fanghi (Figura 1.12.)

1.3.1. Linea acque

La linea acque convoglia i liquami grezzi provenienti dalle fognature ed è composta da tre stadi: pretrattamento, trattamento ossidativo biologico e trattamenti ulteriori.

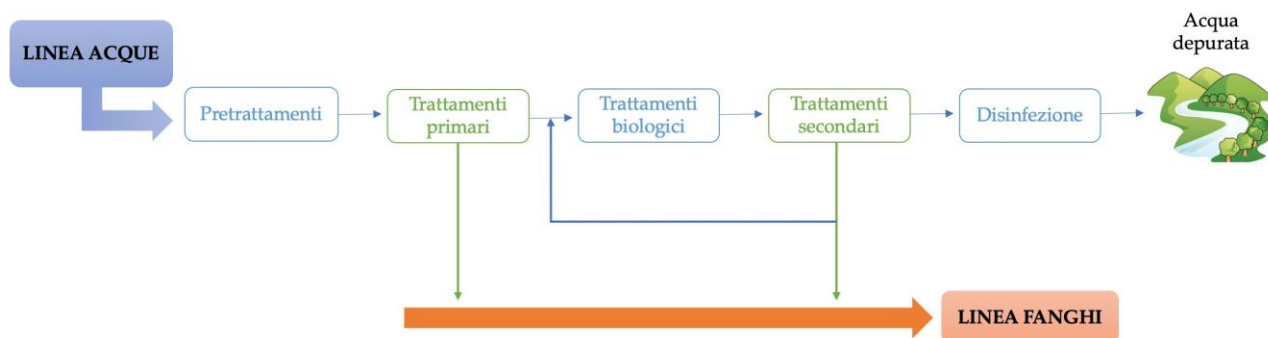


Figura 1.11. Fasi di processo della linea acque in un impianto di trattamento delle acque reflue.

1) I **pretrattamenti** sono processi meccanici utilizzati per rimuovere dal liquame le sostanze solide estranee in grado di creare problemi agli impianti di depurazione (detriti, rifiuti solidi, oli, sabbie) e comprendono:

- grigliatura/stacciatura
- dissabbiatura
- disoleatura
- equalizzazione e omogeneizzazione
- sedimentazione primaria

La grigliatura è un'operazione di filtrazione meccanica necessaria per rimuovere i solidi grossolani sedimentabili e non sedimentabili. La distanza tra le griglie, poste parallelamente tra loro, determina il tipo di grigliatura:

- grossolana, interasse tra 5 e 10 cm;
- media (la più comune), interasse tra 2,5 e 5 cm;

- fine, interasse tra 1 e 2,5 cm.

Un'alternativa alla grigliatura è la stacciatura (o vagliatura) che consiste nel passaggio del liquame attraverso una rete metallica o una lamiera forata.

La dissabbiatura viene utilizzata per l'allontanamento di materiali inorganici di dimensione inferiore a 0.2 mm e il processo avviene nei dissabbiatori: all'interno di queste vasche le particelle solide, aventi peso specifico maggiore rispetto all'acqua, si depositano sul fondo.

La sabbia e il materiale grigliato devono essere necessariamente rimossi per evitare una riduzione della relativa capacità utile delle vasche dell'impianto e/o il danneggiamento delle apparecchiature meccaniche poste a valle delle operazioni di pretrattamento.

La disoleatura consente la rimozione di oli e grassi dalla superficie del liquame: questo trattamento sfrutta la minore densità rispetto all'acqua delle componenti, consentendo una facile separazione in superficie sulla base delle proprietà chimico-fisiche tramite l'insufflazione di aria compressa dal fondo della vasca. La presenza di ingenti quantità di oli e grassi può interferire negativamente con i trattamenti biologici in quanto, interagendo con i fiocchi di fango (creando un film sulla superficie), impediscono il contatto con l'ossigeno (O_2) e con i nutrienti, riducendone l'adsorbimento nutritivo e dunque le attività biologiche.

Un impianto di trattamento è dimensionato in maniera tale da trattare una determinata portata media in ingresso all'impianto (calcolata sulla base del numero di Abitanti Equivalenti serviti). Giornalmente, però, le volumetrie trattate variano con conseguente riduzione dell'efficienza di depurazione. Per

ovviare a questo problema, quindi, si ricorre all'utilizzo di vasche di equalizzazione (per la portata) e di omogeneizzazione (per il carico inquinante) che possono essere situate:

- "in linea", lungo il deflusso dei reflui e quindi ricevente l'intera portata;
- "fuori linea", ricevente solamente il flusso eccedente.

La sedimentazione primaria è l'ultimo processo meccanico e separa i solidi sospesi sedimentabili (SSS), riducendo del 30% circa il BOD (Domanda Biochimica di Ossigeno). In questa fase, la profondità della vasca non deve essere eccessiva, in modo da favorire la miscelazione del refluo, viceversa deve essere tale da consentire la decantazione dei fanghi.

2) I **trattamenti biologici** a cui è sottoposto uno scarico si basano su fenomeni che si verificano normalmente in natura ma in un sistema che consente un controllo ottimale dei parametri di processo, in tempi e in uno spazio ridotto. La popolazione microbica, formata da organismi già presenti nelle acque reflue ed altri introdotti dall'ambiente esterno, svolge un ruolo fondamentale nella depurazione. Infatti, le sostanze inquinanti vengono biodegrate e raccolte in un materiale semisolido (fango), separato dalla fase acquosa per sedimentazione, mentre la sostanza organica è utilizzata come substrato di crescita dei microrganismi. Dunque, il trattamento ossidativo biologico comporta la biodegradazione delle sostanze organiche presenti nel liquame, l'intercettazione dei solidi colloidali sospesi e non sedimentabili, il loro inglobamento nei fiocchi biologici e la rimozione nutrienti.

Dal punto di vista ingegneristico, l'ossidazione biologica può essere svolta in:

- impianti a filtri percolatori, dove il refluo viene fatto fluire dall'alto verso il basso su di una struttura composta da strati di materiale drenante ("letto di percolazione"), dove la concentrazione microbica è sempre molto elevata;
- impianti a fanghi attivi, dove la biomassa responsabile del trattamento viene mantenuta in sospensione nella fase liquida e dunque con il liquame da trattare, consentendo una stabilizzazione di quest'ultimo. Questo tipo di sistema è preferito per l'alta efficienza di abbattimento del BOD.

A valle del processo di biodegradazione, la sedimentazione secondaria opera una separazione solido-liquido del fango biologico (o secondario), in parte ricircolato in testa al trattamento biologico e in parte indirizzato alla linea fanghi, dal refluo chiarificato.

3) All'interno della linea acque sono previsti anche dei trattamenti che consentono di ottenere un ulteriore miglioramento del processo di depurazione come, ad esempio, la disinfezione, la chiariflocculazione, la nitrificazione e denitrificazione. Sono posti in prossimità della vasca di ossidazione:

- a monte, aumentano la resa ossidativa biologica del fango;
- a valle, migliorano la qualità dell'acqua chiarificata (che verrà poi scaricata nei corpi recettori) e del fango secondario.

La disinfezione riduce drasticamente la presenza di batteri, funghi e virus nell'acqua chiarificata; il metodo tradizionale è la clorazione: l'azione battericida del cloro modifica la struttura chimica degli enzimi, inibendo lo

sviluppo e la vita degli stessi, e ossida le sostanze organiche ed inorganiche presenti in acqua (rimozione della carica batterica residuale). La disinfezione può essere svolta anche tramite l'utilizzo di ozono (O_3), acido peracetico (CH_3COOH) o raggi ultravioletti (UV).

La chiariflocculazione consente la rimozione per precipitazione delle sostanze sospese non sedimentabili, grazie alla formazione di agglomerati di dimensioni e peso crescenti.

Le forme azotate presenti nel refluo (azoto organico, ammoniacale, nitroso e nitrico) vengono eliminate dai processi di nitrificazione e denitrificazione. La prima avviene in vasca aerata e prevede l'ossidazione dell'azoto ammoniacale (NH_4^+) a nitrito (NO_2^-), e da nitrito a nitrato (NO_3^-), mentre la seconda porta alla riduzione dei nitrati ad azoto gassoso (N_2) in condizioni anossiche.

Dunque, la linea di trattamento acque costituisce una filiera di operazioni unitarie che trasformano l'acqua reflua in ingresso all'impianto in acqua depurata, avente caratteristiche idonee per un suo rilascio nello specifico corpo recettore.

I fanghi derivanti dalla linea acque di un impianto di trattamento di depurazione delle acque reflue possono essere:

- Fanghi primari, in uscita dal processo di sedimentazione primaria, sono caratterizzati da un'elevata quantità di sostanza organica e un elevato grado di umidità (~95%). Questi fanghi si degradano più velocemente per via anaerobica rispetto alle altre tipologie e producono più biogas;

- Fanghi secondari o biologici (o attivi), in uscita dai processi di ossidazione biologica, sono caratterizzati da un'umidità maggiore e da elevate concentrazioni di azoto e fosforo.
- Fanghi chimici, in uscita dai processi di chiariflocculazione. Sono chiamati anche "fanghi combinati", ossia primari e secondari.

Nella progettazione e gestione di un impianto di trattamento è necessario considerare anche la gestione dei flussi di scarto provenienti dalla prima linea:

- per quanto riguarda il materiale grigliato e la sabbia, è prevista una compattazione e un lavaggio prima del loro smaltimento finale come rifiuti;
- i fanghi, separati dal refluo chiarificato durante le fasi di sedimentazione primaria e secondaria, subiscono ulteriori trattamenti, come riportato in Figura 1.12.

1.3.2. Linea Fanghi

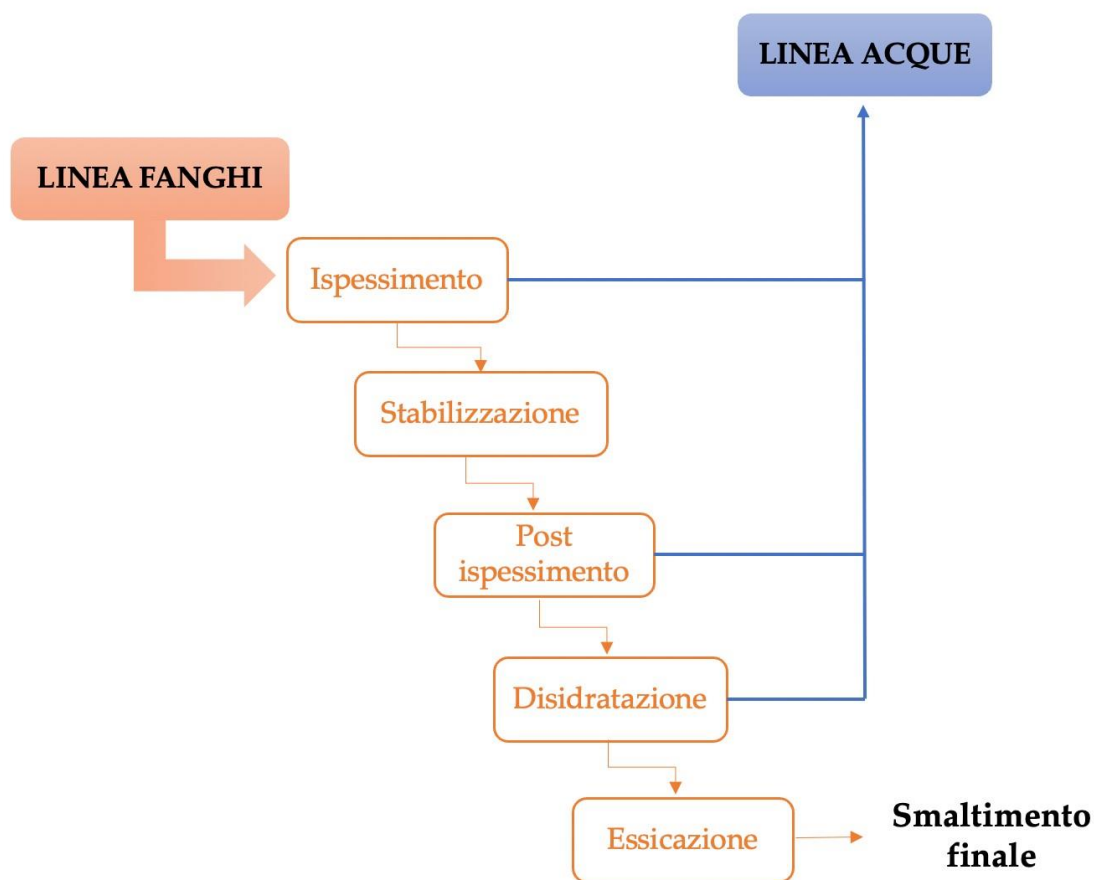


Figura 1.12. Fasi di processo della linea fanghi in un impianto di trattamento delle acque reflue.

Il fango grezzo è costituito dal materiale di scarto del trattamento delle acque reflue, principalmente da acqua, sostanze nutritive e materia organica, (carbonio 25-35% sostanza secca (s.s.), azoto 4-5% s.s., ossigeno 20-25% s.s., fosforo 2-3% s.s., oligoelementi e metalli) (EurEau, 2021), ma anche da sostanze tossiche. Essendo un rifiuto organico putrescibile ad elevato tenore di acqua, per rendere lo smaltimento finale meno oneroso sia dal punto di vista ambientale che economico, tale matrice andrà necessariamente incontro a disidratazione e stabilizzazione.

Si stima che ogni abitante equivalente contribuisca alla produzione di circa 70-100 kg di fanghi di depurazione, che corrispondono a 20-25 kg di solidi secchi per anno.

La prima operazione unitaria relativa al fango è l'ispessimento: questo viene compattato per rimuovere l'acqua presente al suo interno (che verrà reindirizzata in testa alla linea acque) e per aumentare la concentrazione di solidi. L'ispessimento può essere di tipo:

- "statico" (o "per gravità"), processo simile alla sedimentazione secondaria nella linea acque ma, poiché la matrice da trattare è più concentrata rispetto alla precedente, la velocità con cui le particelle solide si depositano sul fondo è minore e avviene in vasche a volumetria ridotta.
- "dinamico" (o "per flottazione"), prevede l'insufflazione di aria dal fondo della vasca per favorire l'interazione delle bolle di gas con i solidi e di conseguenza la loro risalita sino alla superficie libera della vasca.

L'utilizzo di ispessitori di tipo "dinamico" consente di raggiungere concentrazioni di solidi maggiori. In alcuni casi può essere richiesta una seconda fase di disidratazione a valle del processo di stabilizzazione, per ridurre le volumetrie di fango da trattare.

Il fango, poi, subisce un trattamento atto a ottenere un prodotto biologicamente inattivo (o quasi), più facilmente disidratabile. La stabilizzazione può essere ottenuta mediante processo specifico di tipo chimico o biologico.

La stabilizzazione chimica prevede la realizzazione di un ambiente fortemente limitante per la vita microbiologica: infatti, l'aggiunta di additivi chimici permette di raggiungere livelli di pH intorno a 11-12,5, inibendo qualsiasi attività batterica in vasca.

Il trattamento di stabilizzazione dei fanghi più comunemente adottato utilizza processi biologici e, in questo caso, si parla di "digestione". A differenza della stabilizzazione chimica, oltre alla riduzione della putrescibilità, si ottiene anche una riduzione sostanziale della quantità di solidi sospesi presenti inizialmente nel fango. Ciò comporta una notevole diminuzione della quantità di fango da inviare a smaltimento finale. Il processo di digestione dei fanghi può utilizzare:

- processi biologici aerobici, con produzione di CO₂;
- processi biologici anaerobici, con produzione di biogas.

La digestione aerobica è un processo di mineralizzazione della frazione organica contenuta nei fanghi attivi, mantenuti in costante aerazione. Questo processo consente la riduzione del contenuto di sostanze volatili, della putrescibilità, del volume e della carica batterica (velocità di morte superiore alla crescita delle cellule batteriche) della matrice trattata.

La digestione anaerobica consiste nella degradazione biologica di sostanze organiche complesse in altre più semplici, in un ambiente totalmente privo di ossigeno.

Al fine di ridurre l'umidità del fango ispessito e digerito, possono essere impiegate diverse soluzioni tecnologiche, alcune basate su fenomeni naturali (letti di essiccazione) altre utilizzando apparecchiature meccaniche. Nel primo caso la disidratazione avviene inizialmente per drenaggio, attraverso strati di

sabbia e ghiaia, e successivamente per evaporazione naturale dell'acqua. Negli impianti di depurazione di maggiori dimensioni la disidratazione viene condotta in sistemi meccanici come filtropresse, nastropresse, filtri a vuoto o centrifughe: essi garantiscono un'elevata efficienza di rimozione dell'acqua a scapito di maggiori costi di impianto e di esercizio.

Il fango disidratato può, in alcuni casi, subire un ulteriore trattamento termico di essiccazione, che consente di raggiungere l'80% di tenore in secco della matrice trattata.

1.3.3. Smaltimento finale dei fanghi di depurazione

Poiché i fanghi derivanti dal trattamento delle acque reflue sono considerati "rifiuti speciali", il loro destino finale è disciplinato dal Decreto Legislativo n. 152/06: possono essere inviati direttamente in discariche controllate, smaltiti dopo incenerimento oppure utilizzati in agricoltura. Le ultime fasi di trattamento previste nella seconda linea, disidratazione ed essiccamento, risultano essere di fondamentale importanza perché il costo relativo allo smaltimento finale dipende dal tenore in secco della matrice.

In Italia, l'entrata in vigore della legge 319/76 ("Legge Merli"), primo riferimento normativo in materia "acque" e per la gestione degli impianti di trattamento delle acque reflue, ha favorito il recupero e la valorizzazione dei fanghi in agricoltura, ad oggi disciplinato dal D. lgs. n. 99/92 che regola a livello nazionale le attività di raccolta, trasporto, stoccaggio e condizionamento della matrice trattata (ISPRA, 2015).

La direttiva europea del 12 giugno 1986 (DIR 86/278/CEE) regolarizza un corretto utilizzo agronomico dei fanghi, in sostituzione ai fertilizzanti chimici, per prevenire effetti nocivi sulla vegetazione, sugli animali, sul suolo e sull'uomo, attraverso la definizione di concentrazioni limite dei metalli pesanti e di requisiti agronomici e chimici.

In accordo con il D. lgs. n. 99/92, ogni regione deve predisporre ed inviare annualmente al Ministero dell'Ambiente una relazione riguardante la quantità totale, la composizione e le caratteristiche di fanghi prodotti, e le relative percentuali riguardo lo smaltimento finale.

L'Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale (ISPRA) redige annualmente un documento aggiornato sui dati riguardanti la produzione annua, espressa in tonnellate, di fanghi prodotti dal trattamento delle acque reflue urbane: la Tabella 1.5. riporta i valori negli anni 2015, 2018 e 2021 (ISPRA, 2020) (ISPRA, 2023).

Tabella 1.5. Quantità di fanghi in tonnellate prodotta dal trattamento delle acque reflue urbane suddivise per regione e negli anni 2015, 2018, 2021 (ISPRA, 2020) (ISPRA, 2023).

REGIONE	2019	2020	2021
<i>Piemonte</i>	301.897	303.653	324.823
<i>Valle d'Aosta</i>	4.470	4.998	8.563
<i>Lombardia</i>	466.295	468.784	487.371
<i>Trentino</i>	140.393	135.646	142.246
<i>Veneto</i>	399.958	409.896	409.500
<i>Friuli-Venezia Giulia</i>	82.618	83.293	81.218
<i>Liguria</i>	41.926	46.859	48.990
<i>Emilia-Romagna</i>	439.492	406.294	372.871
NORD	1.877.049	1.859.423	1.875.582
<i>Toscana</i>	303.135	288.954	277.290
<i>Umbria</i>	43.380	44.788	40.838
<i>Marche</i>	79.357	80.908	86.063
<i>Lazio</i>	409.997	332.347	234.775
CENTRO	835.869	746.997	638.966
<i>Abruzzo</i>	60.862	73.502	71.974
<i>Molise</i>	3.004	2.437	3.085
<i>Campania</i>	180.099	228.321	217.555
<i>Puglia</i>	299.814	334.526	267.465
<i>Basilicata</i>	4.391	2.330	1.858
<i>Calabria</i>	34.072	31.695	29.838
<i>Sicilia</i>	30.575	29.809	56.424
<i>Sardegna</i>	90.668	81.327	74.394
SUD	703.485	783.947	722.593
TOTALE	3.416.403	3.390.367	3.237.141

Nonostante la produzione nazionale sia aumentata di circa 200 mila tonnellate (+ ~5%) rispetto al 2015, i quantitativi di fanghi totali prodotti nelle regioni settentrionali sono molto maggiori rispetto al centro e al sud Italia.

In riferimento ai dati relativi al 2021, la Lombardia e il Veneto sono le regioni che contribuiscono maggiormente alla produzione annua di fanghi del totale nazionale (in termini percentuale rispettivamente il 15.1% e il 12.6%) (Figura 1.13.).

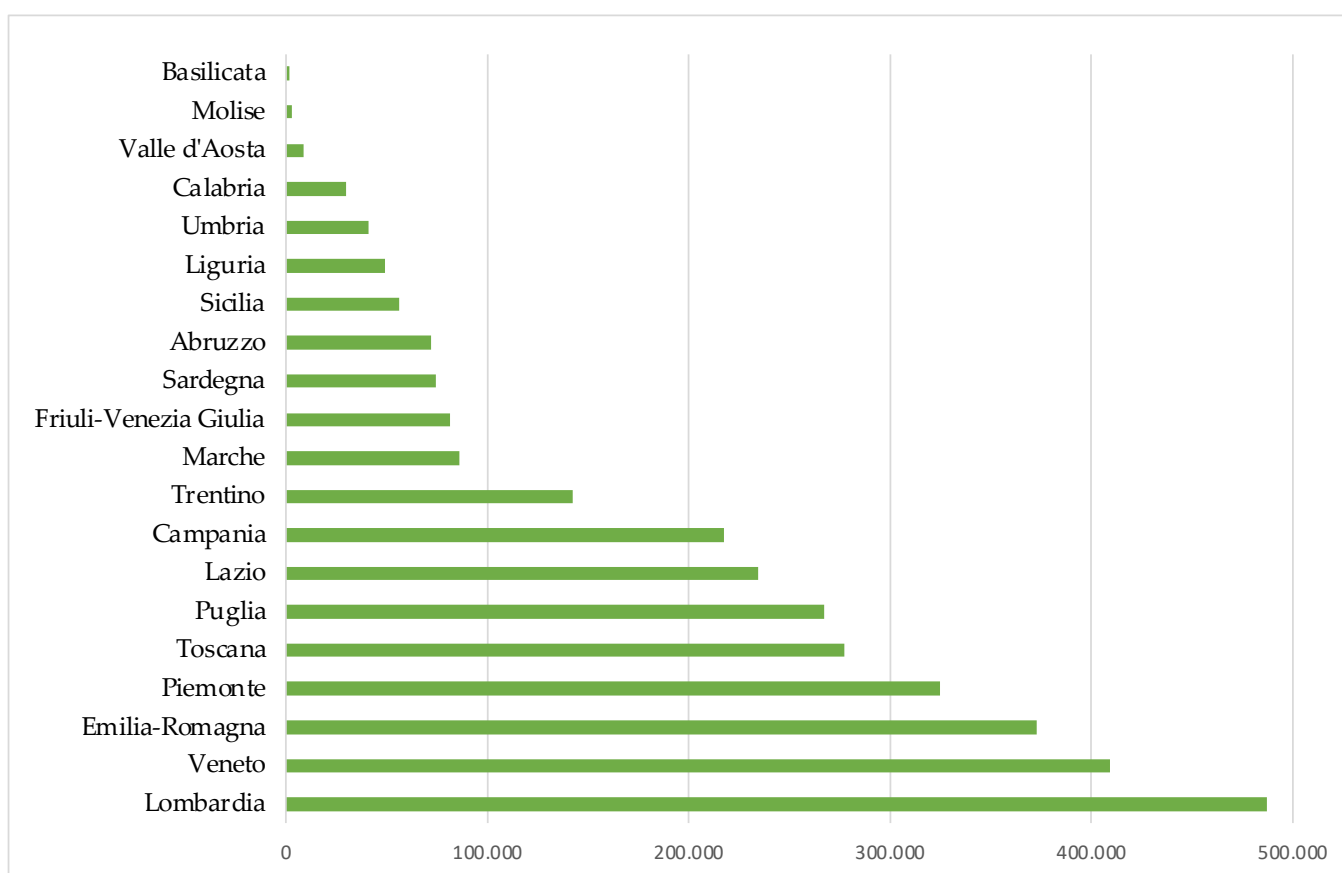


Figura 1.13. Quantità di fanghi (espressa in tonnellate) prodotta dal trattamento delle acque reflue urbane suddivise per regione nel 2021 (ISPRA, 2023).

Infine, per quanto riguarda la gestione dei fanghi prodotti, dei 3 milioni di tonnellate (ISPRA, 2023):

- ~ 55% viene smaltito in discarica;
- ~ 35% viene utilizzato come fertilizzante in agricoltura;
- ~ 10% viene mandato ad incenerimento.

1.4. La presenza di MPs negli impianti di trattamento delle acque reflue

Un'importante fonte di inquinamento da microplastiche è stata identificata negli scarichi delle acque reflue, un sottoprodotto degli impianti di trattamento (Sun et al., 2019). La presenza di MPs è stata rilevata, di conseguenza, anche nei terreni agricoli, soprattutto nelle aree in cui è stato adottato il compostaggio dei fanghi, nei rifiuti e nelle discariche. L'effetto combinato di queste particelle con gli inquinanti adsorbiti come metalli pesanti e inquinanti organici persistenti potrebbe arrecare gravi danni alla sicurezza del suolo e agli organismi del suolo (Lares et al., 2019).

Poiché le plastiche non sono biodegradabili, non vengono rimosse nei processi di trattamento delle acque reflue ma sono trasferite dalle acque reflue ai fanghi residui, contaminando anche i corpi idrici e il comparto terrestre (utilizzo agronomico dei fanghi o smaltimento in discarica). I processi di post-trattamento, come la stabilizzazione termica e la digestione anaerobica, non sono in grado di rimuovere efficacemente questi frammenti (Okelly et al., 2021). Inoltre, il legame tra microplastiche, materia organica e i batteri patogeni riduce l'efficacia di rimozione degli inquinanti, alterando il funzionamento dell'impianto.

Infatti, la digestione anaerobica è un approccio comune per la gestione dei fanghi di depurazione, e la prima fase consiste nel convertire i rifiuti organici particellari in substrati solubili. Il polietilene, la poliammide, il cloruro di

polivinile e il polistirene presenti nei fanghi attivi inibiscono la digestione anaerobica e hanno effetti diversi a seconda delle loro proprietà fisico-chimiche (Kiran et al., 2022); gli additivi e le sostanze chimiche tossiche rilasciate dalle micro e nanoparticelle di plastica possono portare alla distruzione delle cellule microbiche ed influire sulla produzione di acidi, inibendo gli enzimi chiave coinvolti nella produzione di acido (idrolisi e fermentazione) e nella metanogenesi.

Molti studi presenti in letteratura hanno dimostrato che la concentrazione di MPs negli effluenti degli impianti di trattamento delle acque reflue è influenzata dai tipi di processi applicati. Infatti, in generale, gli impianti con processi di trattamento terziario presentano concentrazioni inferiori di microplastiche nell'effluente (0 - 51 particelle L⁻¹) rispetto a quelli con processi di trattamento solo primari o secondari (10 - 447 particelle L⁻¹).

Inoltre, i sistemi di fognatura combinata (con un unico collettore sia per le acque reflue che combinate) sono stati associati ad un aumento del numero di MPs nelle acque reflue: ciò potrebbe essere correlato all'uso del terreno circostante adiacente, nonché l'inquinamento da microplastiche da usura di pneumatici e freni (Sun et al., 2019). Se da un lato le reti di fognatura combinata hanno il potenziale di aumentare i carichi di microplastiche negli impianti di depurazione, dall'altro svolgono un ruolo importante nel ridurre il rilascio di microplastiche nelle acque superficiali.

Le microplastiche sono trattenute in varia misura durante le prime fasi della linea acque, con tassi di rimozione complessiva del trattamento del 90-99% in sistemi ben progettati (Hale et al., 2020). Murphy et al. (2016) hanno osservato

che la maggior parte delle microplastiche in sospensione, in particolare derivanti dai prodotti per l'igiene personale, sono intrappolate nella frazione di olio in sospensione. Pertanto, la rimozione degli oli e grassi (fase di disoleatura) e dei fanghi primari dalle applicazioni terrestri può ridurre la quantità di microplastiche trasferite al suolo.

Gran parte delle microplastiche che entrano negli impianti di trattamento delle acque reflue può essere trattenuta nei fanghi di depurazione e applicata come fertilizzante sul terreno. L'applicazione a terra può ridurre i costi di discarica e di smaltimento. Negli Stati Uniti, circa il 60% dei fanghi di depurazione viene applicato a terreni agricoli e bonificati, o venduto direttamente ai consumatori per l'uso in giardini. Mahon et al. (2017) hanno stimato che il carico di microplastiche dei fanghi destinati all'applicazione a terra in Irlanda era compreso tra 4196 e 15385 microplastiche kg^{-1} di campione. Poiché le particelle presentavano dimensioni intorno a 1 μm , si suppone che il contenuto totale reale di MPs sia superiore. Gli autori suggeriscono che l'elevata concentrazione di particelle rilevata nei campioni studiati sia dovuta anche a teli di plastica ampiamente utilizzati in agricoltura per conservare l'umidità e il calore del suolo o per prevenire la crescita di erbe infestanti.

Anche quando gli impianti di trattamento utilizzano tecnologie di rimozione altamente efficienti, scaricano grandi volumi di acque reflue che possono contenere quantità significative di microplastiche.

- Mason, et al. (2016) hanno studiato 17 impianti con trattamento secondario negli Stati Uniti: questi emettono in media più di 4 milioni di microparticelle

al giorno per impianto e i processi di filtrazione terziaria sono inefficaci nel ridurre ulteriormente gli scarichi di microplastiche.

- Murphy et al. (2016) hanno riscontrato che gli impianti di trattamento secondario in Scozia emettevano ancora 65 milioni di microplastiche al giorno. Gli scarichi degli impianti di trattamento delle acque reflue sono spesso collocati in fiumi, estuari e coste marine e sono quindi una fonte significativa di microplastiche per questi corpi idrici
- McCormick et al. (2014) hanno riportato che le concentrazioni di microplastiche a valle di un impianto di trattamento delle acque reflue municipali (negli Stati Uniti) erano paragonabili alle concentrazioni massime sulla costa in seguito a un evento di tempesta. L'impianto, inoltre, scarica le acque depurate sul fiume Illinois, uno dei principali affluenti del fiume Mississippi.

In Tabella 1.6. sono riportati i dati di alcuni studi presenti in letteratura che riportano le concentrazioni di microplastiche nei fanghi provenienti da impianti di trattamento delle acque reflue, il tipo di polimero e la forma.

Tabella 1.6. Concentrazione di MPs nei fanghi provenienti da impianti di trattamento delle acque reflue.
(s.s. = sostanza secca)

Stato	Riferimento bibliografico	Campione	Concentrazione microplastiche	Tipo di polimero	Forma
Spagna	Bretas Alvim et al., 2020	Fanghi attivi	112 MPs g ⁻¹ s.s.	PE, PP, PS	fibre (>90%), frammenti
Marocco	EL Hayany et al., 2020	Fango tal quale	40.5 ± 11.9 × 10 ³ MPs kg ⁻¹	PP (35.21%), PE (21.13%), PA (16.9%), PS (26.76%)	fibre, frammenti
Italia	Magni et al., 2019	Fanghi attivi riciccolati	113 ± 57 MPs g ⁻¹ s.s.	PE (18%) PS (15%), PP (9%), PA (6%), altro (27%)	film (51%) frammenti (34%) altro (15%)
Francia	Kazour et al., 2019	Fanghi di depurazione	16.13 ± 1.2 MPs g ⁻¹	PS (25%), PE (20%), PET (20%), PP (15%), altro (20%)	fibre (12.46 ± 1.08 MPS g ⁻¹), frammenti
Finlandia	Lares et al., 2018	Fanghi attivi	23.0 (± 4.2) MPs g ⁻¹ s.s.	PS (95%), PE (5%)	fibre (95%), frammenti (5%)
Australia	Raju et al., 2020	Fanghi attivi	7.91 ± 0.44 MPs L ⁻¹	LDPE (2.31%), PA (19.63%), PE (5.31%), PS (8.08%), PET (26.33%), PMMA (4.39%), PP (7.39%)	fibre (30%), frammenti (25%), microbeads (5%), film (7%)

1.5. Fanghi e microplastiche: i limiti relativi alla metodica

Le microplastiche sono ampiamente rilevate negli impianti di trattamento delle acque reflue: questi possono rimuovere le microparticelle dalle acque reflue, ma ciò significa che vengono trasferite e accumulate nei fanghi di depurazione. Ultimamente, una crescente attenzione da parte della comunità scientifica è stata prestata alle microplastiche nelle acque reflue grezze e trattate, ma in particolare nei fanghi. Nonostante i numerosi studi pubblicati, allo stato attuale, però, non esiste una metodica standardizzata a livello nazionale o europeo per la loro identificazione e quantificazione, soprattutto per la problematica riguardante la rimozione del materiale organico e l'estrazione delle particelle plastiche.

Gli studi presenti in bibliografia (riguardanti i metodi di campionamento, pretrattamento, tecniche di identificazione e unità di misura per l'espressione dei risultati) sono recenti e limitati se confrontati con quelli relativi ai comparti acquatici come fiumi, mari e laghi.

Infatti, utilizzando come banca dati *Scopus* è possibile confrontare il numero di pubblicazioni scientifiche riguardanti l'analisi di microplastiche:

- nel comparto acquatico, utilizzando come *query* di ricerca:

"water" and "microplastic" and "method" or "identification"*

- nei fanghi di depurazione, utilizzando come *query* di ricerca:

"sludge" or "biosolid" or "sewage and sludge" and "microplastic" and "method" or "identification"*

Come emerge dalle Figure 1.14. e 1.15., il numero di testi scientifici riguardanti il comparto acquatico è molto maggiore e ricopre un arco temporale più esteso (dal 2010 ad oggi in totale 2681) rispetto ai fanghi di depurazione (in totale 571 dal 2016 ad oggi).

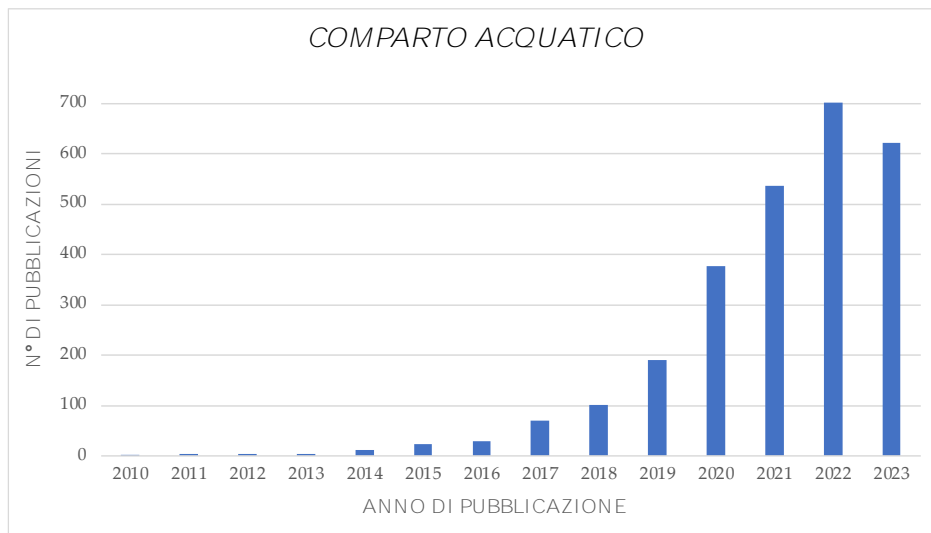


Figura 1.14. Numero di pubblicazioni scientifiche riguardanti l'analisi di MPs nel comparto acquatico (dati aggiornati a luglio 2023).

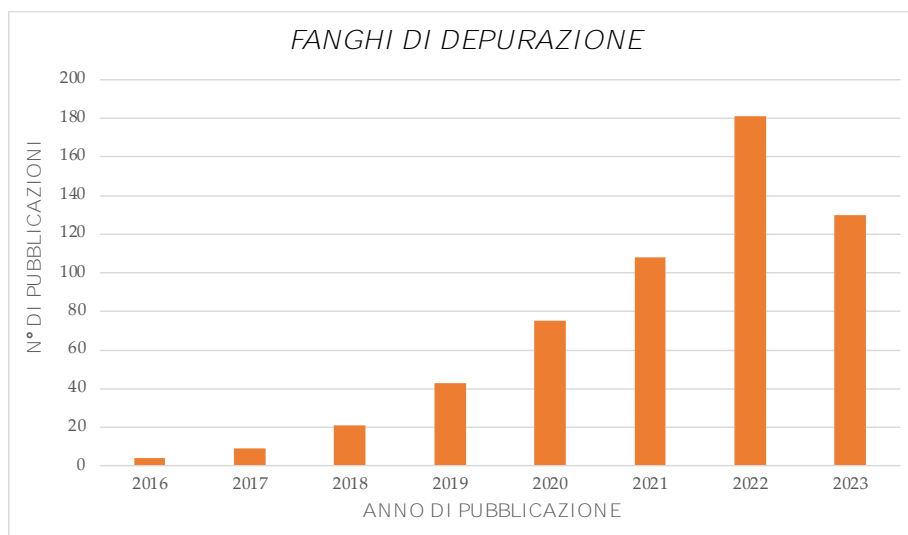


Figura 1.15. Numero di pubblicazioni scientifiche riguardanti l'analisi di MPs nei fanghi di depurazione (dati aggiornati a luglio 2023).

1.5.1. Le problematiche relative al pretrattamento

Esistono diversi standard EN e ISO relative alle matrici acquose: nessuno di questi si riferisce al pretrattamento di campioni solidi per analisi sulla presenza e/o sul contenuto di microplastiche, ma possono servire come potenziale fonte per procedure di pretrattamento.

Il principale problema relativo al trattamento dei fanghi di depurazione è rappresentato dall'elevato contenuto organico: questo aderisce alle microplastiche, rendendone difficile l'identificazione al microscopio. Inoltre, questa matrice contiene cellule formatesi grazie alla presenza di sostanze polimeriche extracellulari (EPS); l'EPS può essere considerato un fattore limitante per l'estrazione delle microplastiche, poiché queste possono rimanere intrappolate nei fiocchi (Tagg et al., 2017).

I metodi principalmente utilizzati per la rimozione della sostanza organica, descritti negli articoli scientifici, prevedono l'utilizzo del reagente di Fenton, il perossido di idrogeno (H_2O_2) o la digestione mediante idrossido di sodio (NaOH). Questi trattamenti presentano alcuni limiti perché:

- richiedono molto tempo
- necessitano di elevati quantitativi di agenti ossidanti
- non devono modificare l'integrità delle particelle plastiche

Infatti, recenti studi hanno dimostrato che l'utilizzo di NaOH favorisce la degradazione superficiale di diversi tipi di polimeri (Hurley et al., 2018). Inoltre, il reagente di Fenton produce una reazione esotermica, che potrebbe comportare a sua volta la degradazione termica dei polimeri stessi. Pertanto,

durante la reazione, la temperatura deve essere mantenuta inferiore a 40°C con l'aiuto di un bagno di ghiaccio per non danneggiare le microparticelle (Liu et al., 2022). Uno studio ha valutato l'efficienza di estrazione di alcuni polimeri plastici in diverse matrici ambientali solide: fanghi di depurazione, sedimenti, letame bovino e terreno (Li et al., 2020). Dai risultati emerge come i fanghi presentano valori molto più bassi (circa dell'80% in meno) a causa della presenza di EPS che modificano il comportamento delle particelle plastiche, ostacolandone il galleggiamento.

Gli studi scientifici per l'analisi di MPs raramente riportano una valutazione dell'efficienza del metodo utilizzato e dei possibili effetti ai materiali plastici dei diversi trattamenti termici, chimici o fisici.

In assenza di dati relativi al recupero, vi è infatti il rischio di sottostimare o sovrastimare le concentrazioni di MPs (Lares et al., 2019): a tal proposito, risulta di fondamentale importanza la creazione di materiali di riferimento di laboratorio (che rientrano nella definizione convenzionale di MPs), intenzionalmente aggiunti al campione per valutare i possibili effettivi negativi dei trattamenti sulla composizione dei polimeri e l'efficacia dei metodi di separazione, sospensione ed identificazione dalla matrice. Questi materiali possono essere realizzati operando una frammentazione meccanica in condizioni criogeniche di prodotti commerciali di plastica (ad esempio, bicchieri o sacchetti). I polimeri più utilizzati a tal scopo sono: PVC, PE, PET, PP e PS.

OBIETTIVI DEL LAVORO DI TESI

Il presente lavoro di tesi si propone di ottimizzare le fasi di trattamento di matrici ricche di materia organica, quali campioni di fango provenienti da impianti di trattamento delle acque reflue, per l'analisi qualitativa di microplastiche.

Questa matrice può rappresentare una fonte significativa di materie plastiche nell'ambiente perché, durante i processi depurativi che portano all'emissione dell'acqua depurata, i solidi e i sedimenti potenzialmente contaminati da microplastiche, vengono separati e accumulati nei fanghi di depurazione: l'impiego in agricoltura, unitamente allo sversamento nei corpi idrici, può comportare il rilascio di tali particelle nell'ambiente.

Allo stato attuale, infatti, non esiste un metodo univoco e standardizzato, ma sono disponibili in letteratura diverse tecniche per il trattamento preliminare del campione. Da questo presupposto, si è voluto studiare l'efficienza dei diversi metodi in termini di rimozione della sostanza organica, che può influenzare negativamente nell'analisi qualitativa dei polimeri modificando il comportamento nelle matrici ambientali, e l'influenza dei reagenti sull'integrità delle particelle plastiche.

2. MATERIALI E METODI

Il campionamento ed in particolare il pretrattamento di matrici complesse e ricche di materiali interferenti, quali i fanghi provenienti da impianti di depurazione delle acque reflue, rappresentano le fasi preliminari dell'analisi.

Per la rimozione della sostanza organica sono stati studiati diversi protocolli che prevedono l'utilizzo di reagenti, come il perossido di idrogeno (H_2O_2), il reattivo di Fenton e le miscele enzimatiche (in questo caso proteasi e cellulasi). Successivamente, al fine di effettuare una valutazione qualitativa delle microplastiche presenti, la separazione delle MPs è stata eseguita utilizzando soluzioni contenenti cloruro di sodio (NaCl) e cloruro di zinco ($ZnCl_2$), a densità nota. L'analisi qualitativa delle microplastiche è stata eseguita utilizzando un microscopio ottico, che ha permesso di ricavare informazioni riguardo le caratteristiche dei polimeri (come forma, colore e dimensione), e pirolisi accoppiata con gascromatografia e spettrometria di massa (Pyr-GC/MS), da cui è stato possibile definire la natura dei diversi polimeri.

Per valutare l'efficienza le prestazioni dei metodi applicati, in termini di efficienza di rimozione della sostanza organica, i trattamenti sono stati dapprima studiati su di un "fango di prova"; mentre, i possibili effetti negativi sui frammenti plastici sono stati studiati su materiali di riferimento da laboratorio che rientrano nella definizione convenzionale di microplastiche, ottenuti a partire da prodotti commerciali.

Per il presente lavoro di tesi, le fasi procedurali sono state svolte durante il periodo di tirocinio nel laboratorio dell'azienda S.E.S.A. (Società Estense Servizi Ambientali) situato a Monselice (PD).

2.1. Sito di campionamento

Il presente lavoro di tesi si è focalizzato sullo studio di microplastiche in campioni di fango provenienti da un depuratore biologico situato in provincia di Padova. La potenzialità dell'impianto è di circa 200.000 abitanti equivalenti: il sistema fognario raccoglie le acque reflue provenienti dalle reti del centro storico e della zona industriale della città, oltre a ricevere quelle dei comuni limitrofi.

2.1.1. Caratteristiche dell'impianto di depurazione delle acque reflue

All'interno dell'impianto, le acque reflue vengono sottoposte a un trattamento primario per la rimozione dei materiali in sospensione (come la vagliatura, la rimozione della graniglia e la sedimentazione primaria), a un trattamento secondario, dove i nutrienti disciolti nelle acque reflue vengono rimossi dalla biomassa batterica, e infine a un trattamento terziario, tra cui la defosfatazione chimica e la disinfezione. L'acqua trattata confluisce in una sezione di pompaggio finale e viene scaricata nei corsi d'acqua limitrofi. Il depuratore è dotato anche di una linea di trattamento dei fanghi, che vengono stabilizzati mediante digestione anaerobica di tipo mesofilo e successivamente disidratati. Alla fine del processo, i fanghi sono sottoposti a un'ulteriore essiccazione naturale (bioessiccazione) in una serra solare e un essiccatore biologico. Il sistema, infatti, sfrutta due fonti di calore rinnovabili a costo zero, l'energia solare e quella proveniente dal metabolismo batterico. Questa tecnologia

consente di ottenere un fango disidratato con un volume ridotto (di circa il 50% in peso), utilizzabile poi come fertilizzante in agricoltura, chiudendo dunque il cerchio del pieno recupero delle risorse. Ciò comporta anche una riduzione del numero di spostamenti e delle emissioni di CO₂ emesse in atmosfera dai mezzi pesanti adibiti al trasporto del fango trattato.

2.1.2. I campioni di fango analizzati

Per il campionamento dei fanghi all'interno di un impianto di trattamento delle acque reflue devono essere seguite diverse strategie di raccolta che consentano un corretto e rappresentativo monitoraggio dei campioni e di conseguenza delle microplastiche eventualmente presenti. Infatti, è necessario considerare che queste particelle possono trovarsi nella frazione acquosa e/o in quella solida: sulla base della densità del polimero che le compone possono galleggiare, depositarsi sul fondo o rimanere in sospensione.

Il metodo più comune per il prelievo dei campioni di fango è la raccolta tramite secchio o spatola in acciaio; successivamente questi sono stati conservati all'interno di bottiglie al buio ad una temperatura di 4°C, per ridurre al minimo qualsiasi contaminazione che potrebbe modificare la composizione dei polimeri e della matrice.

In questo lavoro di tesi, per una maggiore rappresentatività e omogeneità della matrice analizzata, il campionamento è stato effettuato in quattro diversi punti dell'impianto, tenendo conto sia della composizione del campione (liquido e solido) che della filiera di trattamenti previsti nella linea fanghi:

1. Fango in uscita dal processo biologico a fanghi attivi ed ispessito

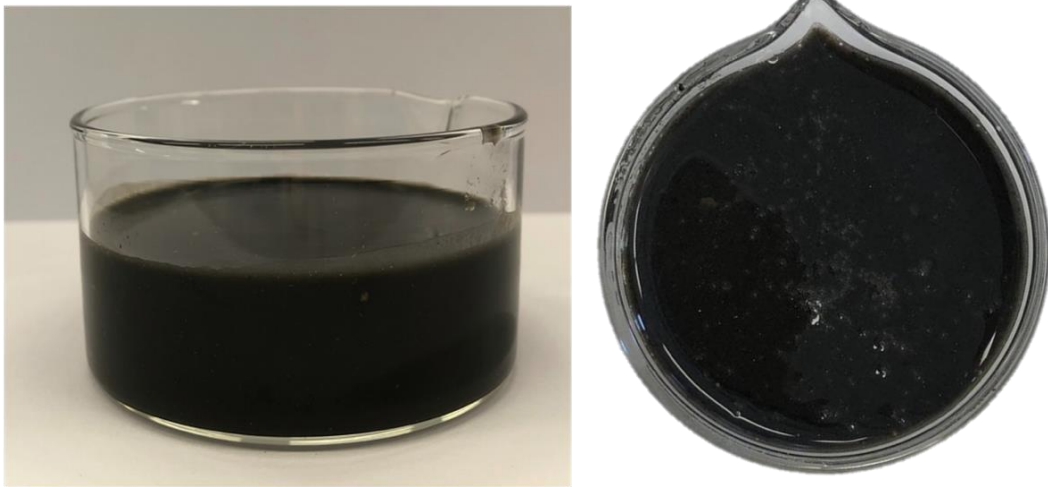


Figura 2.1. Fango in uscita dal processo di ispessimento.

2. Fango da digestione anaerobica

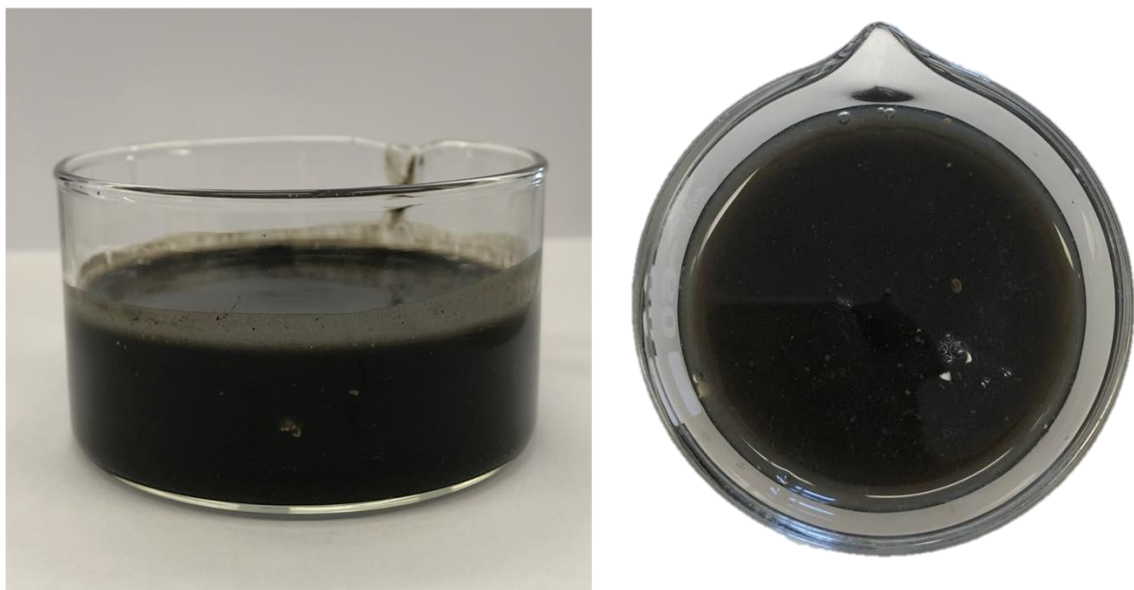


Figura 2.2. Fango in uscita dal processo di digestione anaerobica.

3. Digestato separato solido (disidratazione tramite centrifuga)



Figura 2.3. Digestato disidratato tramite centrifugazione.

4. Digestato essiccato in serra

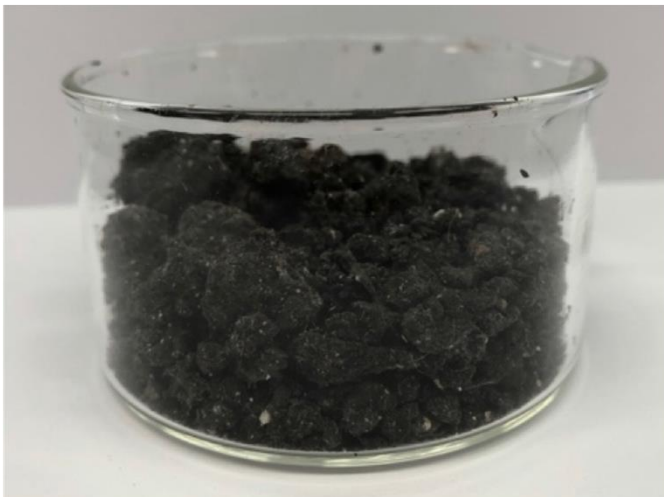


Figura 2.4. Digestato essiccato in serra (bioessiccazione).

2.2. Metodi sperimentali utilizzati in laboratorio

2.2.1. Procedure preliminari

Fango di prova

Le metodiche studiate sono state applicate su di un "fango di prova" (Figura 2.5.) esente da materiali interferenti: ciò ha consentito di valutare l'efficacia di rimozione del materiale organico dei metodi proposti.



Figura 2.5. "Fango di prova" utilizzato per l'applicazione delle diverse metodiche (trattamenti chimici e fisici).

Inizialmente si è reso necessario una caratterizzazione preliminare del fango, per la determinazione dell'umidità totale e del contenuto di sostanze volatili nel fango in accordo con il metodo analitico CNR IRSA 2 Q 64 Vol 2 (1984).

L'umidità totale (U_t) viene determinata sul campione umido mediante essiccamento in stufa ad una temperatura pari a $105^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ fino a raggiungimento del peso costante (indicativamente 12 ore): conoscendo il contenuto di umidità, è possibile riferire i dati analitici, ottenuti sul campione umido, alla sostanza secca (s.s.). Essa viene espressa in percentuale tramite la formula:

$$Umidità\ totale\ (U_t) = \frac{Peso\ umido - Peso\ secco}{Peso\ umido} \cdot 100$$

Dove:

- Peso umido: peso del campione di fango tal quale, espresso in grammi;
- Peso secco: peso del campione di fango essiccato in stufa a 105°C , espresso in grammi.

La differenza tra 100 e il contenuto di umidità totale rappresenta il contenuto percentuale di residuo.

Di seguito invece la formula per il calcolo del fattore analitico (F) necessario per riportare il dato analitico, ottenuto sul campione umido, alla sostanza secca:

$$F = \frac{100}{100 - U_t} \cdot 100$$

Per la determinazione del contenuto di sostanze volatili (SV), il campione, previamente essiccato in stufa a 105°C , viene esposto ad una temperatura pari a 550°C per circa 2 ore: la perdita in peso corrisponde al contenuto in sostanza organica totale del campione. Il residuo (o solidi volatili fissi, STF) è

rappresentato dal contenuto di ceneri. La percentuale di sostanze volatili (o solidi totali volatili, STV) viene determinata tramite la formula:

$$\text{Sostanze Volatili (SV)} = \left(\frac{\text{Peso secco} - \text{Peso ceneri}}{\text{Peso umido}} \right) \cdot 100 \cdot F$$

Dove:

- Peso umido: peso del campione di fango tal quale, espresso in grammi;
- Peso secco: peso del campione di fango essiccato in stufa a 105°C, espresso in grammi;
- Peso ceneri: peso del campione di fango dopo esposizione a 550°C, espresso in grammi.

La caratterizzazione è stata effettuata sia sul "fango di prova" che sui fanghi provenienti dall'impianto di trattamento di Padova.

Materiali di riferimento di laboratorio

Per valutare l'efficacia dei trattamenti fisici, necessari alla separazione delle microplastiche dal campione, sono state intenzionalmente aggiunte al "fango di prova" quantità note di materiali di riferimento di laboratorio, seguendo quanto proposto dagli autori Lares et al. (2019): frammenti plastici, di origine primaria o secondaria, che rientrano nella definizione convenzionale di microplastiche, ossia di dimensioni comprese tra 1 e 5000 μm . Questi materiali sono stati, inoltre, utilizzati per valutare la possibile influenza sull'integrità dei polimeri da parte dei trattamenti utilizzati per la rimozione della sostanza organica.

Le particelle sono state ottenute a partire da sacchetti, bicchieri, bottiglie e tubi, triturandone dei macro-frammenti in un mulino a taglienti, utilizzando setacci di dimensioni pari a 10 mm, 4 mm e 1 mm. Al fine di evitare le possibili contaminazioni, il dispositivo utilizzato è stato pulito prima di ogni separazione aspirando tutti i residui depositati sulla superficie delle sue componenti. Sono da escludersi, quindi, possibili contaminazioni provenienti dall'esterno. Successivamente è stato utilizzato un setaccio a maglie con rete metallica di dimensioni pari a 5 mm (Figura 2.6.), per raccogliere le particelle di diametro conforme alla definizione di MPs.



Figura 2.6. Setaccio a maglie con rete metallica di 5 mm.

I materiali plastici utilizzati come materiali di riferimento da laboratorio (Figura 2.7.) sono descritti in Tabella 2.1., in cui sono riportate anche le caratteristiche dei polimeri: la sigla, la morfologia, il colore e la densità, i cui valori ricoprono un intervallo tra 0.9 e 1.6 g cm⁻³.

Il PE a bassa densità e il PS sono stati utilizzati variando rispettivamente la morfologia (frammento e film) e il colore (bianco e verde).

Tabella 2.1. Polimeri utilizzati come materiali di riferimento di laboratorio.

POLIMERI SINTETICI	Sigla	Densità (g cm ⁻³)	Morfologia	Colore
POLIETILENE A BASSA DENSITÀ	HDPE	1,04 - 1,1	frammenti	bianco - trasparente
	LDPE - FILM	0,91- 0,94	film	grigio
POLIETILENE A ALTA DENSITÀ	HDPE	0,91- 0,94	frammenti	bianco - trasparente
POLISTIROLO	PS	1,04 - 1,1	sfere	bianco
			frammenti	verde
POLIPROPILENE	PP	0,83 - 0,92	fibre - frammenti	bianco
POLIETILENE TEREFALATO	PET	1,38	frammenti	grigio - blu
CLORURO DI POLIVINILE	PVC	1,16 - 1,58	frammenti	grigio scuro

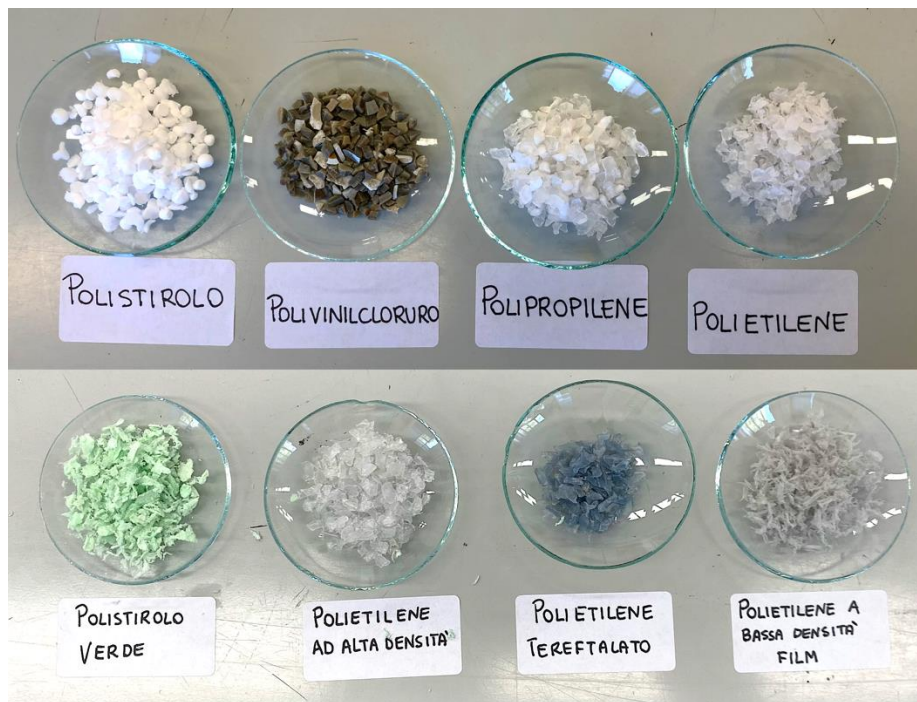


Figura 2.7. Frammenti di plastica di dimensioni inferiori a 5 mm utilizzati come materiali di riferimento di laboratorio.

Inoltre, si è deciso di utilizzare anche due tipi di bioplastiche compostabili e biodegradabili (Figura 2.8.).

- L'acido polilattico (PLA) prodotto dall'azienda *NatureWorks Llc*, il cui monomero è prodotto a partire da amido vegetale fermentato (ad esempio mais, manioca, canna da zucchero o polpa di barbabietola da zucchero).
- Il Mater-Bi, nome commerciale per indicare una bioplastica brevettata e prodotta dall'azienda Novamont a partire da amido di mais. È un materiale formato da una fase cristallina e una fase amorfa, composte rispettivamente da amilosio e da amilopectina che sono i costituenti dell'amido utilizzato come materia prima, e da un agente complessante aggiunto durante il processo produttivo.

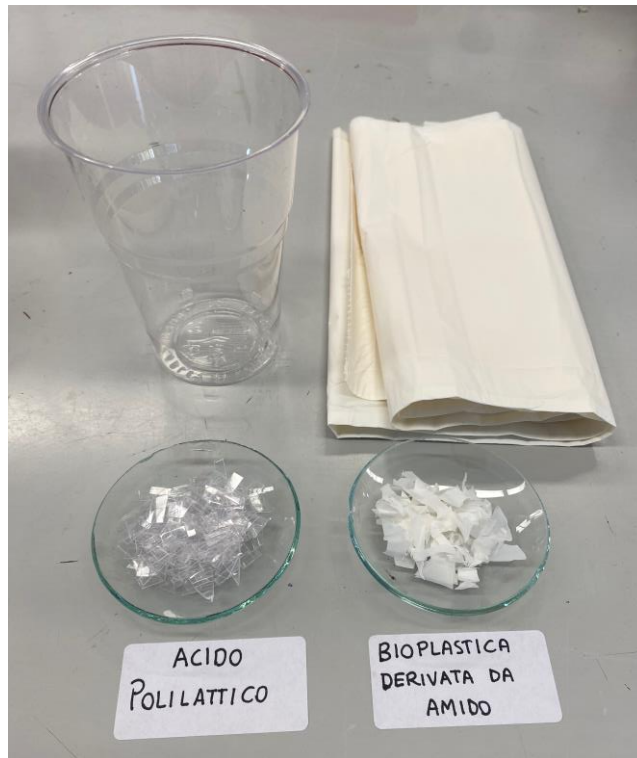


Figura 2.8. Acido polilattico (PLA) e Mater-Bi utilizzati come materiali di riferimento di laboratorio.

2.2.2. Pretrattamento del campione

Il fango è una matrice complessa e ricca di sostanza organica: ciò rende assolutamente necessaria l'applicazione di metodi specifici per la rimozione del materiale interferente e la separazione delle microplastiche dal resto del campione, per semplificare la successiva fase di riconoscimento strumentale.

Ad oggi non esiste un metodo univoco e standardizzato, ma nella letteratura scientifica sono descritte diverse tecniche riguardanti il trattamento preliminare del campione in questione.

Le prove sperimentali svolte in laboratorio si sono focalizzate sullo studio di alcuni aspetti principali per l'ottimizzazione dei trattamenti chimici e fisici (Figura 2.9.):

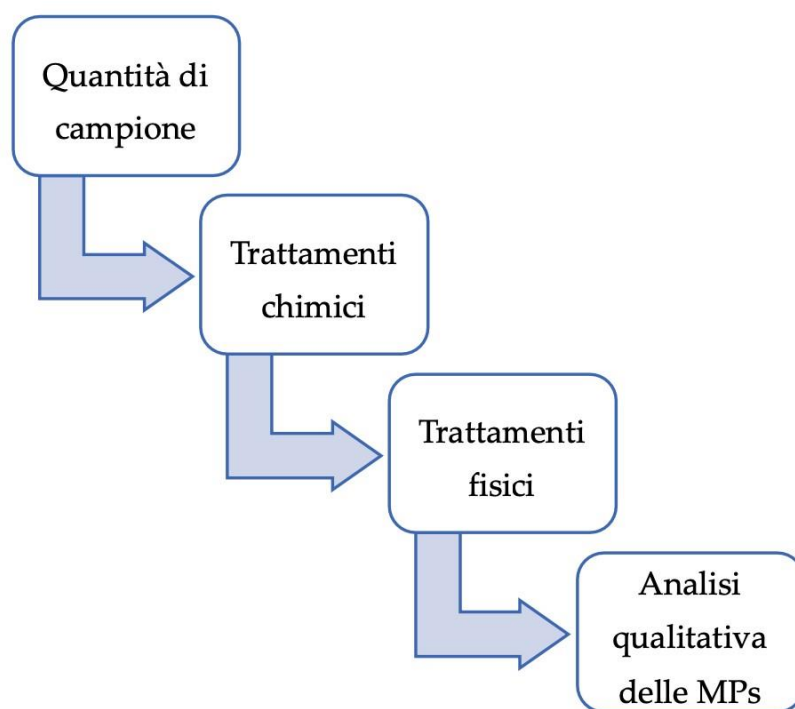


Figura 2.9. Schema di lavoro per le prove sperimentali in laboratorio per l'ottimizzazione del metodo di pretrattamento.

Trattamenti chimici

I reagenti utilizzati, studiati ed applicati al "fango di prova" per la rimozione della sostanza organica sono riportati in Tabella 2.2.:

Tabella 2.2. Trattamenti chimici per la rimozione di sostanza organica

Reagente	Concentrazione	Tempo	Temperatura
H₂O₂	35 %	3 giorni	Temperatura ambiente
		48 ore	50°C
			60°C
Reattivo di Fenton (Hurley et al., 2018)	–	48 ore	60°C
Reattivo di fenton (Hurley et al., 2018)	–	24 ore	
		48 ore	
Enzimi e H₂O₂	35 % (H ₂ O ₂)	24 ore	60°C
		48 ore	
		4 giorni	

Le prove sperimentali si sono focalizzate inizialmente sul perossido di idrogeno (H₂O₂) al 35%, acquistato dell'azienda *Chemlab*, reagente utilizzato in molti articoli scientifici: in particolare, è stato studiato il rapporto ottimale tra la quantità di campione (espressa in grammi), il volume di perossido di idrogeno aggiunto, la temperatura di esposizione e il tempo di contatto fra reagente e matrice.

Le prime prove sono state condotte su una quantità di fango tal quale pari a 100 g con l'aggiunta di 100 ml di H₂O₂, ossia un rapporto di 1:1 tra reagente e campione. A causa dell'eccessiva reazione sviluppata (Figura 2.10.) e dell'elevata quantità di reagente richiesto, si è deciso di diminuire le

componenti utilizzate. In particolare, le prove successive sono state condotte partendo da una quantità di fango tal quale pari a 5 g e 25 ml di H_2O_2 (rapporto 1:5).



Figura 2.10. Reazione sviluppata da 100 g di fango e 100 ml di H_2O_2 .

Seguendo quanto indicato dagli autori Tun et al. (2022), l'aliquota di fango è stata posta in un becher di vetro contenente perossido di idrogeno per tre giorni a temperatura ambiente: queste condizioni, però, non consentono la decomposizione della materia organica. Infatti, non si è sviluppata alcuna reazione (Figura 2.11).

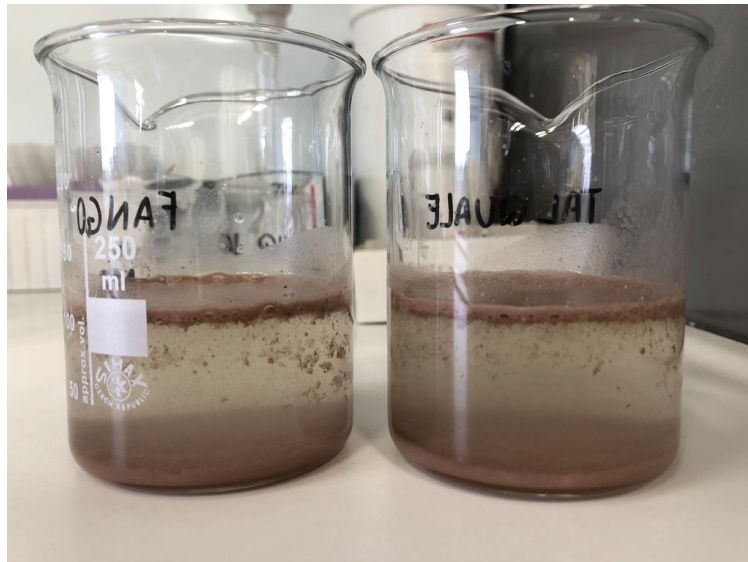


Figura 2.11. Fango trattato con H_2O_2 a temperatura ambiente.

a. Dunque, sono stati pesati circa 5 g di fango all'interno di beute in vetro, a cui sono stati aggiunti 15 ml di H_2O_2 . Trascorse 24 ore in stufa a $50^\circ C$ sono stati aggiunti altri 10 ml di H_2O_2 . Per omogeneizzare e favorire l'interazione tra reagente e materia organica, i campioni sono stati messi in agitazione per 60 minuti a 260 RPM su un agitatore orbitale e infine per 30 minuti all'interno di un bagno ad ultrasuoni. Poi, i campioni sono stati sottoposti ai trattamenti fisici. Al metodo appena descritto sono state apportate alcune modifiche per migliorare l'efficienza dei trattamenti chimici:

b. la temperatura in stufa è stata innalzata a $60^\circ C$ (Bretas Alvim, Bes-Piá, et al., 2020);

c. i campioni di fango sono stati mantenuti in agitazione durante il tempo di permanenza in stufa, grazie all'ausilio di un agitatore magnetico;

d. infine, la matrice è stata trattata aggiungendo l'intero volume di perossido di idrogeno, pari a 25 ml, all'inizio del trattamento. Dunque, non suddividendo la quantità.

La Figura 2.12. riporta lo schema di lavoro finale, descritto all'ultimo punto (d.).

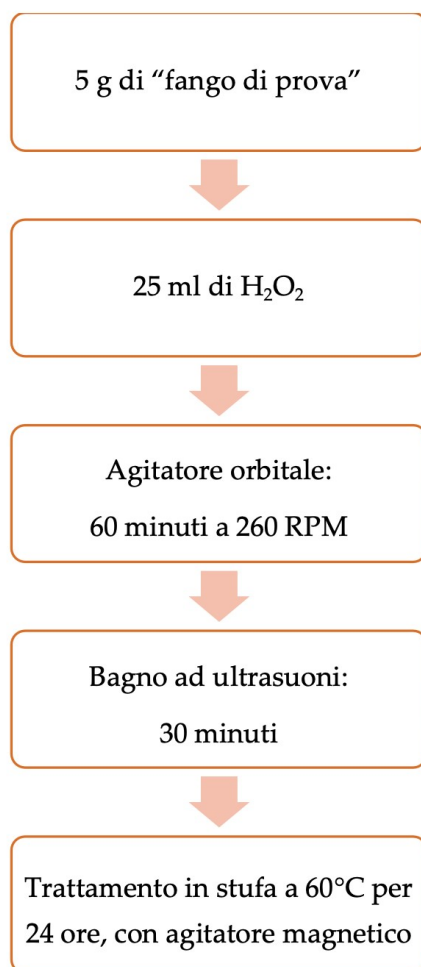


Figura 2.12. Trattamento chimico con l'utilizzo di H₂O₂.

Il secondo reagente chimico studiato è il reattivo di Fenton: una soluzione di perossido di idrogeno e ferro (II), utilizzata per l'ossidazione di contaminanti organici nelle acque di scarico in numerose pubblicazioni. La reazione con i composti organici è fortemente esotermica; pertanto, è stato preparato un bagno di ghiaccio per mantenere la temperatura di reazione al di sotto di 40°C poiché temperature troppo elevate possono degradare alcuni tipi di particelle microplastiche (Munno et al., 2018). Sono stati testati due protocolli: entrambi

prevedono l'aggiunta di 25 ml di H₂O₂ al 35% e 25 ml di una soluzione di Fe (II) a due diverse concentrazioni.

a) Nel primo protocollo la soluzione di Fe(II) è composta da: 7.5 g di solfato di ferro[II] eptaidrato [FeSO₄×7H₂O] in 500 ml di acqua ultrapura e 3 ml di acido solforico concentrato (Möller et al., 2022).

b) Nel secondo protocollo, invece, il reattivo di Fenton è stato così preparato: 20 g di solfato di ferro (II) eptaidrato [FeSO₄×7H₂O] in 1 litro di acqua ultrapura (Hurley et al., 2018).

Lo schema di lavoro, in entrambi i casi, è descritto in Figura 2.13.

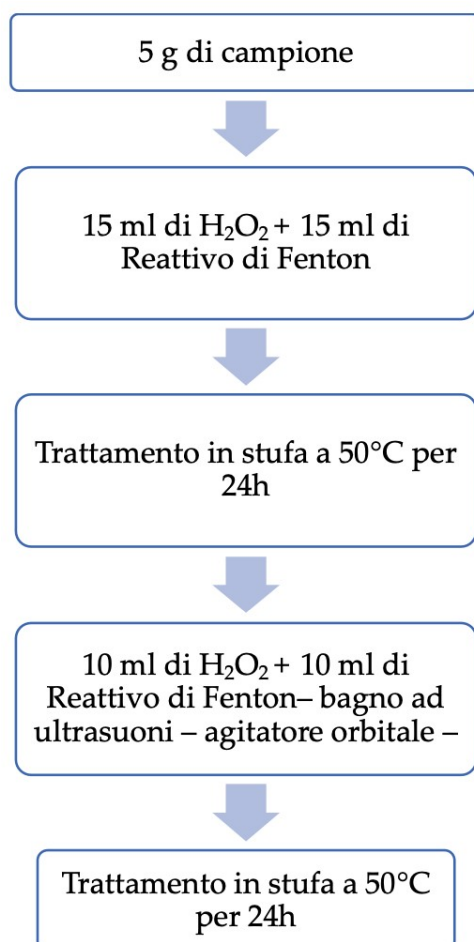


Figura 2.13. Trattamento chimico con perossido di idrogeno e il reattivo di Fenton.

Il terzo ed ultimo tipo di trattamento prevede la disgregazione del materiale organico con miscele enzimatiche commerciali (cellulasi e proteasi): l'approccio, combinato con un precedente passaggio con sodio dodecilsolfato (SDS) e infine con H_2O_2 , (Möller et al., 2022) si è rivelato essere il più efficace (Löder et al., 2017).

La Proteasi idrolizza le proteine presenti nei composti organici: sono in grado di rompere i legami peptidici che uniscono i vari amminoacidi, dalla cui ripetuta concatenazione originano le molecole proteiche.

Le cellulasi sono costituite da tre tipi di enzimi che agiscono in sinergia e degradano la cellulosa con una reazione di idrolisi.

Trattamenti fisici

La procedura più comunemente impiegata per separare le microplastiche dalla matrice campionata è la separazione per densità mediante una soluzione ipersalina che consente alle MPs di rimanere in superficie, mentre il resto del materiale tende a precipitare sul fondo.

Nella maggior parte degli articoli scientifici viene utilizzata una soluzione di cloruro di sodio (NaCl) con densità pari a 1.2 g cm^{-3} . Una volta aggiunta al campione, questo è stato sottoposto ad agitazione e lasciato poi sedimentare. Dunque, il surnatante è stato filtrato su filtri a membrana in esteri misti di cellulosa (*Whatman*), a $0.45 \mu\text{m}$ di porosità.

L'impiego di NaCl, però, implica un'importante limitazione: la densità massima raggiungibile non consente un'efficace separazione dei polimeri a maggiore densità, quali il PVC e il Pet. Per questo, è stato effettuato un secondo

trattamento fisico per coprire un range di densità più ampio, attraverso l'utilizzo di cloruro di zinco ($ZnCl_2$) (Möller et al., 2022).

2.2.3. Struttura finale del metodo di pretrattamento ottimizzato

Il metodo ottimizzato per il pretrattamento di matrici complesse e ricche di materia organica è stato applicato ai campioni provenienti dall'impianto di Padova.

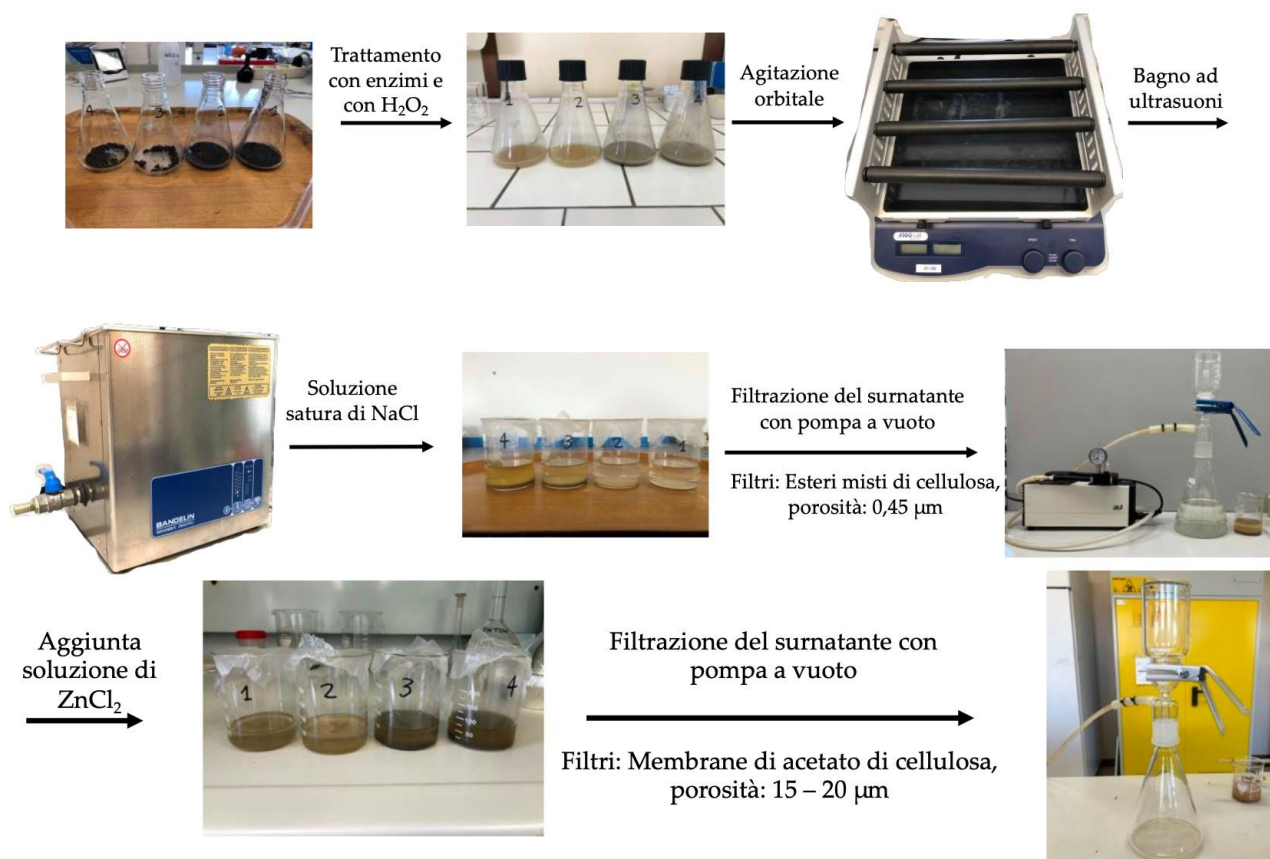


Figura 2.14. Metodo ottimizzato per il pretrattamento di campioni di fango provenienti da impianti di trattamento delle acque reflue.

La degradazione della sostanza organica è stata eseguita tramite l'utilizzo di miscele enzimatiche e di perossido di idrogeno (H₂O₂).

- 1) L'incubazione iniziale è stata eseguita utilizzando SDS, un tensioattivo anionico che aumenta la superficie di contatto per i successivi trattamenti enzimatici. Sono stati aggiunti 30 ml di una soluzione di SDS (Sigma-Aldrich) al 5% (% massa/massa).
- 2) La prima purificazione enzimatica è stata condotta con l'enzima proteasi A-01 (*ASA Spezialenzyme GmbH*), che raggiunge la sua attività ottimale a pH 9.0. In totale, sono stati aggiunti 2.5 ml di proteasi alla matrice del campione con 12.5 ml di soluzione salina tamponata con fosfato (PBS), a pH 9.0 aggiungendo idrossido di sodio.
- 3) La seconda purificazione enzimatica è stata condotta con l'enzima cellulasi TXL (*ASA Spezialenzyme GmbH*), che raggiunge la sua attività di reazione ottimale a pH 5.0. Sono stati aggiunti, quindi, 5 mL di Cellulasi TXL e 25 mL della soluzione PBS a pH 5.0 mediante l'aggiunta di acido cloridrico.
- 4) Infine, sono stati aggiunti in totale 50 ml di perossido di idrogeno suddivisi in quattro giorni per evitare un'eccessiva reazione del campione. Per consentire una maggiore interazione del reagente con la materia organica i campioni sono stati mantenuti in agitazione per 60 minuti a 260 RPM su un agitatore orbitale e infine per 30 minuti all'interno di un bagno ad ultrasuoni

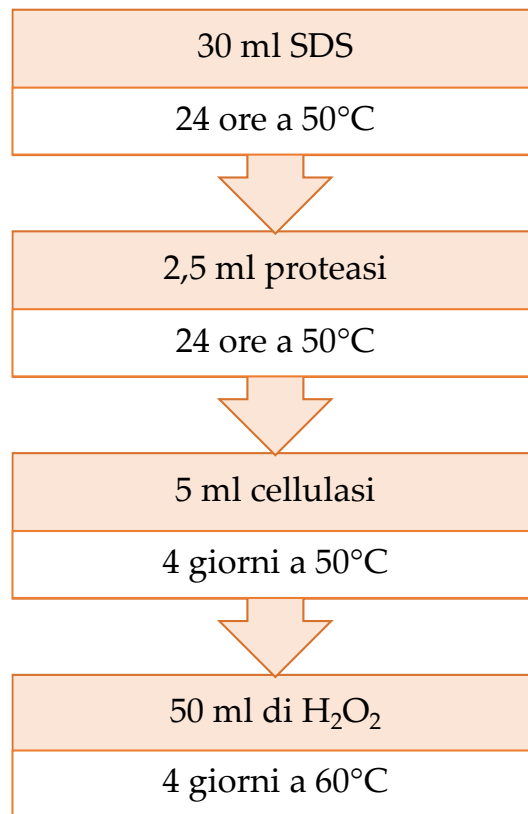


Figura 2.15. Trattamenti utilizzati per la rimozione della sostanza organica.

La separazione delle particelle plastiche è stata realizzata tramite l'aggiunta di soluzioni saline a densità nota: dopo una breve agitazione, i campioni sono stati mantenuti a temperatura ambiente per 24 ore. Successivamente, il processo di filtrazione è stato svolto utilizzando un imbuto, un mezzo filtrante e un sistema a vuoto.

- 1) Sono stati aggiunti circa 50 ml di una soluzione contenente cloruro di sodio (NaCl) con densità pari a 1.2 g cm^{-3} . Poi, il surnatante è stato filtrato su filtri a membrana in esteri misti di cellulosa (*Whatman*), a $0.45 \mu\text{m}$ di porosità.
- 2) Successivamente è stata preparata una soluzione contenente cloruro di zinco (ZnCl_2) con densità pari a 1.9 g cm^{-3} . In questo caso, però, l'elevata densità del sale ha richiesto la diluizione del surnatante in acqua

demineralizzata precedentemente riscaldata e l'utilizzo di filtri in acetato di cellulosa a maggiore porosità (15 μm) per la filtrazione.

I filtri ottenuti (Figura 2.16. e 2.17.) sono stati poi analizzati per la valutazione qualitativa delle microplastiche.

1. Filtro ottenuto dal campione di fango ispessito
2. Filtro ottenuto dal campione di fango digerito
3. Filtro ottenuto dal campione di digestato separato solido
4. Filtro ottenuto dal campione di digestato essiccato

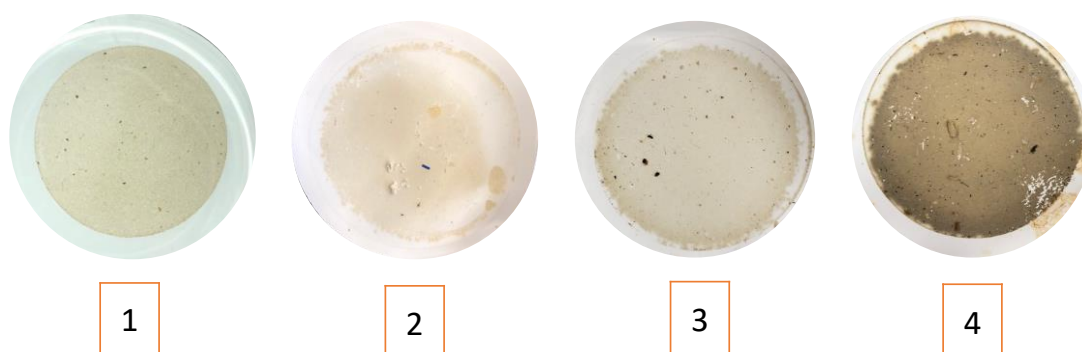


Figura 2.16. Filtri in esteri misti di cellulosa ottenuti mediante filtrazione del surnatante con l'utilizzo di una soluzione satura di NaCl.



Figura 2.17. Filtri a membrana in acetato di cellulosa ottenuti mediante filtrazione del surnatante con l'utilizzo di una soluzione salina di ZnCl_2 .

2.3. Valutazione dell'efficacia dei trattamenti e l'influenza sulle microplastiche

2.3.1. Efficacia dei trattamenti chimici

Per valutare l'efficacia di rimozione della sostanza organica sono stati utilizzati i seguenti parametri, espressi in percentuale:

- Perdita in peso del fango
- Perdita di sostanze volatili nel fango

Sono state eseguite tre repliche per ogni protocollo utilizzato: terminato il processo di trattamento chimico, i campioni sono stati essiccati a 105°C e successivamente a 550°C per stabilire rispettivamente il peso secco e il contenuto di ceneri del fango dopo l'applicazione dei diversi trattamenti.

Di seguito le formule utilizzate.

$$\% \text{ perdita peso del fango} = \frac{P_{pre \text{ trattamento, s.s.}} - P_{post \text{ trattamento, s.s.}}}{P_{pre \text{ trattamento, s.s.}}} \cdot 100$$

Dove:

- $P_{pre \text{ trattamento, s.s.}}$ = Peso del campione di fango, espressa in grammi su sostanza secca, prima del trattamento
- $P_{post \text{ trattamento, s.s.}}$ = Peso del campione di fango, espressa in grammi su sostanza secca, dopo il trattamento

$$\% \text{ SV eliminati} = \frac{SV_{\text{pre trattamento, s.s.}} - SV_{\text{post trattamento, s.s.}}}{SV_{\text{pre trattamento, s.s.}}} \cdot 100$$

Dove:

- $SV_{\text{pre trattamento, s.s.}}$ = Contenuto di sostanze volatili nel fango, espresso in grammi su sostanza secca, prima del trattamento
- $SV_{\text{post trattamento, s.s.}}$ = Contenuto di sostanze volatili nel fango, espresso in grammi su sostanza secca, dopo il trattamento

2.3.2. Influenza dei trattamenti sulle microplastiche

La valutazione dell'influenza dei diversi trattamenti sull'integrità delle particelle plastiche è stata eseguita valutando la variazione del peso delle microplastiche. In particolare, sono state eseguite tre repliche per ogni tipo di protocollo e di polimero studiato: le microplastiche sono state pesate prima e dopo l'applicazione dei diversi trattamenti chimici.

2.4. Analisi qualitativa delle microplastiche

Terminata la fase di trattamento chimico del campione e di separazione delle microplastiche, la successiva identificazione delle particelle nel filtro è stata eseguita mediante microscopia ottica e pirolisi accoppiata con gascromatografia e spettrometria di massa (Pyr-GC/MS).

2.4.1. Microscopia ottica

Per l'identificazione delle MPs è stato utilizzato un microscopio ottico (OPTIKA) provvisto di una telecamera da 12 Mpx (zoom 2.5x) e una torcia UV (Figura 2.19.). L'analisi qualitativa prevede una classificazione in base alle loro caratteristiche fisiche come dimensione, forma e colore (Marine & Environmental Research Institute, 2015).

Uno svantaggio legato a questo metodo è la soggettività nella valutazione, in grado di produrre risultati diversi a seconda dell'osservatore, oltre ad essere dispendioso in termini di tempo. Inoltre, alcuni frammenti presenti nel filtro come materia organica o pezzi di carta possono essere erroneamente identificati come microplastiche. A tal scopo, in alcuni casi è stato applicato *The Hot Needle Test*, come suggerito dagli autori Beckingham et al. (2023): è necessario preriscaldare un ago ad una elevata temperatura e toccare la superficie del frammento in questione (Figura 2.18.). I pezzi di plastica si arricciano o si sciolgono, a differenza degli altri materiali.



Figura 2.18. The Hot Needle Test utilizzato per verificare la natura dei frammenti nel filtro.



Figura 2.19. Microscopio ottico utilizzato per l'analisi delle microplastiche.

2.4.2. Pirolisi accoppiata con gascromatografia e spettrometria di massa (Pyr-GC/MS)

I filtri ottenuti sono stati ulteriormente analizzati con un metodo di analisi chimica in cui il campione subisce una decomposizione termica, producendo molecole più semplici: questi prodotti di degradazione termica vengono separati in gascromatografia ed infine analizzati e identificati con spettrometria di massa (Pyr-GC/MS). Gli spettri dei prodotti di pirolisi sono quindi confrontati con un database di tipi di plastica comuni.

Funzionamento GC-MS

La gascromatografia accoppiata alla spettrometria di massa (GC/MS) è una tecnica di indagine analitica che unisce le caratteristiche della cromatografia con la spettrometria di massa: gli analiti presenti nel campione vengono separati dal gascromatografo e identificati dallo spettrometro di massa, che funge da rivelatore.

La gascromatografia si basa sulla diversa ripartizione delle diverse sostanze tra una fase stazionaria contenuta in una colonna capillare posta in un forno, ed una fase mobile (un gas carrier inerte), in funzione della differente affinità di ogni sostanza con la fase stazionaria. Gli analiti con punto di ebollizione più basso tenderanno ad evaporare prima, quindi ad essere trasportati prima dalla fase mobile in testa alla colonna.

Dopo un certo tempo, definito tempo di ritenzione (t_R), i componenti separati fuoriescono col flusso di gas dall'estremità opposta della colonna cromatografica, ed entrano nella camera di ionizzazione dello spettrometro di

massa. Qui gli analiti vengono ionizzati in una sorgente a ionizzazione elettronica (EI) ed indirizzati all'analizzatore. Esso è composto da un quadrupolo che, grazie alla formazione di un campo elettrico alternato e continuo, permette di separare gli ioni secondo il loro rapporto massa/carica (m/z); gli ioni così separati raggiungono il rivelatore, il cui compito è quello di amplificare la corrente ionica e di restituire il segnale analitico.

Pyr-GC/MS

L'apparato è composto da un pirolizzatore a filamento Pyroprobe 5150 (*CDS Analytical*) accoppiato ad un gascromatografo ad alta risoluzione HP 6890 - spettrometro di massa quadrupolare 5973 N (*Agilent Technologies*).

Questa tecnica accoppiata consente di identificare il tipo di polimero, ma non permette di ricavare alcuna informazione sulla forma, sul numero e sul colore delle particelle. È una tecnica distruttiva, che non consente analisi multiple o in parallelo

Il metodo prevede l'analisi di singoli frammenti di filtro che vengono posti in un tubo di quarzo (1.9 mm di diametro) decontaminato a 400°C per 4 ore, tra due dischetti di filtro di fibra di quarzo, decontaminati nello stesso modo, come mostrato in Figura 2.22c. Dal filtro si ricavano delle sezioni circolari (Figura 2.20.), circa otto in totale per raggiungere un peso compreso tra 100 e 500 mg. Il tubicino così preparato viene poi alloggiato all'interno delle spire del filamento del pirolizzatore, anche chiamato "sonda".

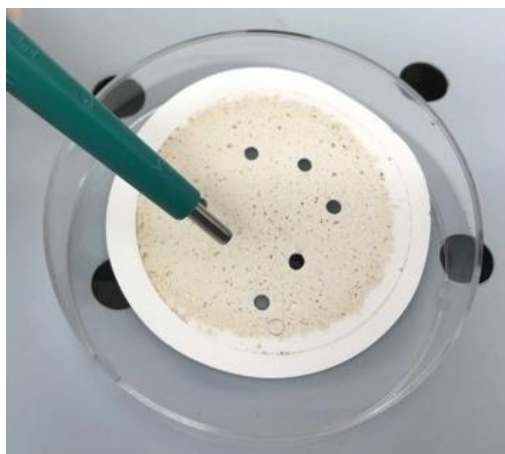


Figura 2.20. Sezioni circolari sul filtro per l'analisi di MPs al Pyr-GC/MS.

La sonda (Figura 2.21.) viene quindi inserita all'interno di una camera di pirolisi termostata (o "interfaccia"), collegata al sistema GC/MS attraverso un tubo termostato ("transfer line"): quindi, le specie chimiche generate vengono spinte dal flusso di elio attraverso la *transfer line* nella colonna termostata, separate dal GC e infine rilevate dallo spettrometro di massa. Si è deciso di utilizzare un rapporto di *split* pari a 1:20 per i campioni e di 1:50 per gli standard, in modo tale da garantire un buon trasferimento del pirolizzato al gascromatografo.



Figura 2.21. Sonda a filamento del pirolizzato. All'interno è posizionato il tubicino di quarzo dove viene inserito il campione da analizzare.

Prima della pirolisi viene effettuata una ventilazione del campione per eliminare possibili interferenti volatili e semi-volatili. Al termine della pirolisi viene effettuata una pulizia della sonda a temperatura più elevata rispetto a quella di analisi. La Figura 2.22. mostra lo schema di funzionamento del Pyr-GC/MS (Rosso et al., 2023), sia per l'analisi (A) sia per la ventilazione del campione (B).

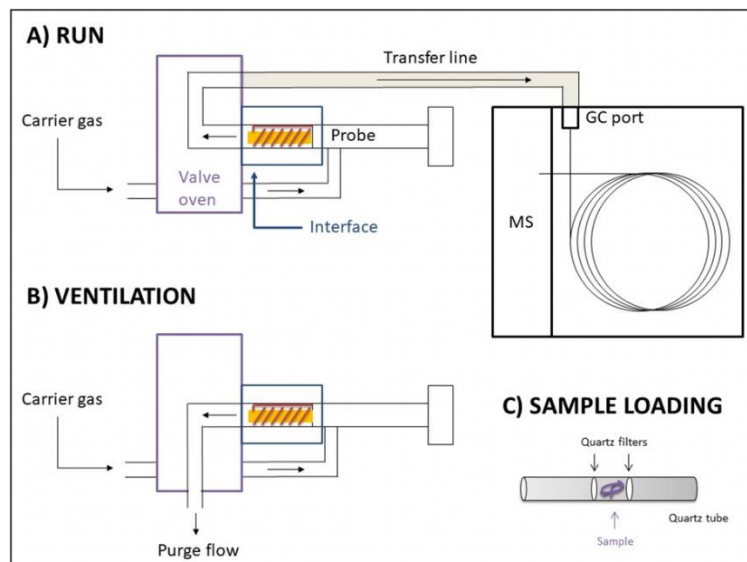


Figura 2.22. Schema di funzionamento del Pyr-GC/MS per l'analisi (A) e per la ventilazione (B) del campione (Rosso et al., 2023).

Di seguito vengono riportate le condizioni operative dello strumento.

Metodo pirolizzatore

Sonda (pirolisi):

- Temperatura: 750°C
- Tempo: 15 s

Interfaccia:

- Temperatura iniziale: 200°C, per 3 min
- Temperatura finale (durante la pirolisi): 280°C, per 5 min

Altre temperature:

- Pulizia: 1200°C, per 10 s
- *Valve oven*: 250°C
- *Transfer line*: 250°C

Metodo GC/MS

Programmata rampa di temperatura:

- 50°C, per 2 min
- 10°C/min fino a 320°C, mantenuto per 3 min
- Post-run a 320°C per 10 min

Altre impostazioni GC:

- Temperatura iniettore: 300°C
- Rapporto di *split*: 1:50 per gli standard, 1:20 per i campioni

Impostazioni spettrometro di massa:

- Temperatura quadrupolo: 150°C
- Temperatura sorgente: 230°C
- Modalità: scansione
- Intervallo: 45-400 m/z

Una prima analisi è stata eseguita sui materiali di riferimento da laboratorio (un polimero alla volta), per valutare l'effettivo riconoscimento dei polimeri studiati, oltre ad utilizzarli come riferimento nelle analisi successive. A seguire, è stato analizzato un bianco procedurale per valutare una possibile contaminazione durante le diverse fasi di trattamento della matrice e/o dell'ambiente di laboratorio. Infine, è stata effettuata l'analisi qualitativa delle microplastiche nei filtri ottenuti dai campioni di fango trattati provenienti dall'impianto di depurazione di Padova.

Il Software AMDIS

Come suggerito dagli autori Gregoris et al. (2023) e Primpke et al. (2020), i picchi cromatografici sono stati analizzati utilizzando il software AMDIS (*Automated Mass Spectral Deconvolution and Identification System*), un programma per l'interpretazione dei dati GC/MS sviluppato dal NIST (*National Institute of Standards and Technology*).

Il programma effettua una scansione dei cromatogrammi ionici e una deconvoluzione dei picchi in base al comportamento cromatografico degli ioni, ad esempio, sulla base di un simile tempo di ritenzione o sulla forma dei picchi. Per ogni picco deconvoluto, vengono estratti gli spettri di massa e, grazie al confronto con una libreria *homemade* che raccoglie gli spettri di massa dei prodotti pirolitici tipici delle plastiche, viene identificata la presenza di tali composti indicatori nel pirogramma campione.

La libreria è stata costruita analizzando le singole plastiche pure ed inserendovi le caratteristiche (spettro di massa e tempo di ritenzione) dei picchi dei composti indicatori della presenza di tali plastiche (Gregoris et al., 2023).

Per questo lavoro di tesi, il software AMDIS è stato impostato utilizzando anche i tempi di ritenzione. Questo perché, contrariamente a quanto accade con altri software, AMDIS consente di ottenere un *match* di identificazione basato non solo sulla corrispondenza tra lo spettro di massa del campione e quello di riferimento, ma anche sulla similarità tra i tempi di ritenzione. Per questo motivo è stata utilizzata una libreria *homemade*: in questo modo, i tempi di ritenzione della molecola di riferimento vengono registrati esattamente con lo stesso strumento e nelle stesse condizioni di analisi dei campioni.

In Tabella 2.3. sono riportati i parametri utilizzati nel software AMDIS. In questo caso, il *match* di identificazione minimo è stato impostato al 60%, come previsto dalle impostazioni predefinite, ed è stata data una "penalità" tanto più grande quanto più si differenziano tra loro i tempi di ritenzione previsto (nel riferimento) e reale (nel campione). Nel caso in cui la differenza di tempo di ritenzione tra campione e riferimento superasse il minuto, il picco è stato considerato non identificato.

Tabella 2.3. Parametri utilizzati nel software AMDIS.

<i>Match di identificazione minimo</i>	60%
<i>Tipo di analisi</i>	"Use retention time"
<i>Livello di penalità</i>	Medio
<i>Penalità massima</i>	20
<i>Massima differenza di tempo di ritenzione consentita</i>	1 minuto

I traccianti dei polimeri

Attualmente non esiste un metodo standard per l'identificazione dei polimeri attraverso i loro prodotti della pirolisi, ma per alcuni vengono utilizzati dei traccianti specifici condivisi in letteratura. Per questo lavoro di tesi sono stati monitorati dei composti indicatori dei polimeri comunemente riconosciuti come traccianti univoci, come mostrato in Tabella 2.4.

I tipici prodotti di pirolisi del PE sono una serie di alcani, alcheni e alcadieni con un caratteristico pirogramma a triplette (Ribeiro et al., 2020). Poiché alcani e alcheni possono essere prodotti anche da sostanze naturali nel campione, è comunemente riconosciuto in letteratura che l'identificazione di PE necessita della presenza di almeno un alcadiene. In questo lavoro di tesi il PE è stato identificato con la presenza riconosciuta di almeno 2 alcadieni.

Per il PVC è stato scelto come tracciante il clorobenzene, per il PP il 2,3-dimetil-1-eptene, per il PET il vinil benzoato, per il PS lo stirene dimero (o trimero, anche se meno abbondante), in accordo con la letteratura (Gregoris et al., 2023;

Bouزيد et al., 2022; Hermabeissiere et al. 2018; La Nasa et al. 2020). Nonostante non siano stati utilizzati come materiale di riferimento da laboratorio, si è deciso di investigare anche la presenza del Nylon 6 e il politetrafluoroetilene (PTFE) poiché ampiamente diffusi in ambiente, i cui traccianti sono rispettivamente il caprolattame e il tetrafluoroetilene (Gregoris et al., 2023).

Tabella 2.4. Traccianti dei polimeri monitorati.

PE (almeno due alcadieni)	Alcadieni (C₈-C₁₈)
PET	Vinil benzoato
PS	Stirene dimero Stirene trimero
PP	2.4-dimetil-1-eptene
PVC	Clorobenzene
Nylon 6	Caprolattame
PTFE	Tetrafluoroetilene

3. RISULTATI E DISCUSSIONE

3.1. Caratterizzazione del fango

In Tabella 3.1. sono riportati i dati riguardanti la caratterizzazione del "fango di prova" espressi come media ("m") e deviazione standard ("s") delle tre repliche.

Tabella 3.1. Caratterizzazione del "fango di prova" come media e deviazione standard delle tre repliche: % di umidità e % di sostanze volatili su sostanza secca (s.s.).

CARATTERIZZAZIONE FANGO	
Umidità totale (%)	81.84 ± 0.07
Sostanze Volatili (% su s.s.)	77.71 ± 0.07

La Tabella 3.2. mostra, invece, i dati riguardanti la caratterizzazione dei quattro campioni di fango provenienti dall'impianto di Padova.

Tabella 3.2. Caratterizzazione dei fanghi dell'impianto di Padova, come media e deviazione standard delle tre repliche: % di umidità e % di sostanze volatili su sostanza secca (s.s.).

	CARATTERIZZAZIONE FANGO	
	Umidità totale (%)	Sostanze Volatili (% su s.s.)
Fango ispessito	96.18 ± 0.04	61.14 ± 1.31
Fango digerito	97.11 ± 1.72	56.81 ± 0.12
Digestato separato solido	59.52 ± 0.68	50.80 ± 0.91
Digestato essiccato	25.50 ± 9.18	56.30 ± 0.24

3.2. Efficacia dei trattamenti sul fango e l'influenza sulle microplastiche

Di seguito vengono presentati i valori dell'efficienza dei diversi trattamenti studiati in termini di perdita in peso e di rimozione di sostanze volatili dal campione, espressi in percentuale. I dati sono espressi come media ("m") e deviazione standard ("s") delle tre repliche, e relativo coefficiente di variazione in percentuale (CV in %) come rapporto tra "m" e "s", che rappresenta il valore di ripetibilità. L'influenza dei trattamenti sul peso dei materiali plastici, invece, viene espressa come percentuale di recupero (% recupero).

3.2.1. Trattamento con perossido di idrogeno (H_2O_2)

Dai valori in Tabella 3.3., il trattamento con H_2O_2 comporta una perdita in peso del fango dal 50% al 60%, e una rimozione della sostanza organica dal 65% al 75% circa, con valori di ripetibilità (CV%) sempre inferiori al 10%. Dunque, dai risultati si evince che l'aumento della temperatura (da 50°C a 60°C) unitamente all'utilizzo dell'agitatore orbitale e del bagno ad ultrasuoni, hanno apportato un miglioramento delle prestazioni del metodo. Inoltre, i dati relativi all'efficienza di rimozione di sostanze volatili, pari al 75% circa, sono condivisi da altri autori come, ad esempio, Hurley et al. (2018), i quali registrano valori pari a $80.2\% \pm 4.2\%$.

Tabella 3.3. Efficienza di rimozione della sostanza organica dei trattamenti con perossido di idrogeno.

% PERDITA PESO	CV %	% SV ELIMINATI	CV %
a. Trattamento con H₂O₂ a 50°C			
52.9 ± 1.3	2.38	66.2 ± 0.1	0.2
b. Trattamento con H₂O₂ a 60°C			
55.3 ± 0.8	0.58	71.3 ± 0.5	1.24
c. Trattamento con H₂O₂ a 60°C con agitatore magnetico in stufa			
55.4 ± 1.6	2.89	71.9 ± 1.8	2.44
d. Trattamento con H₂O₂ NON frazionati a 60°C con agitatore magnetico in stufa			
59.9 ± 6.1	9.22	75.4 ± 5.6	7.46

Per quanto riguarda la variazione del peso dei polimeri, dai grafici in Figura 3.1., la percentuale di recupero del Mater-Bi (bioplastica prodotta a partire da amido di mais) è molto inferiore rispetto agli altri tipi di polimeri sintetici e al PLA. Infatti, l'utilizzo di perossido di idrogeno ha comportato una perdita in peso del Mater-Bi di circa il 40%, diversamente dalle plastiche di origine fossile e dal PLA i cui valori sono sempre maggiori del 10%, confermando quanto riportato dagli autori Hurley et al. (2018).

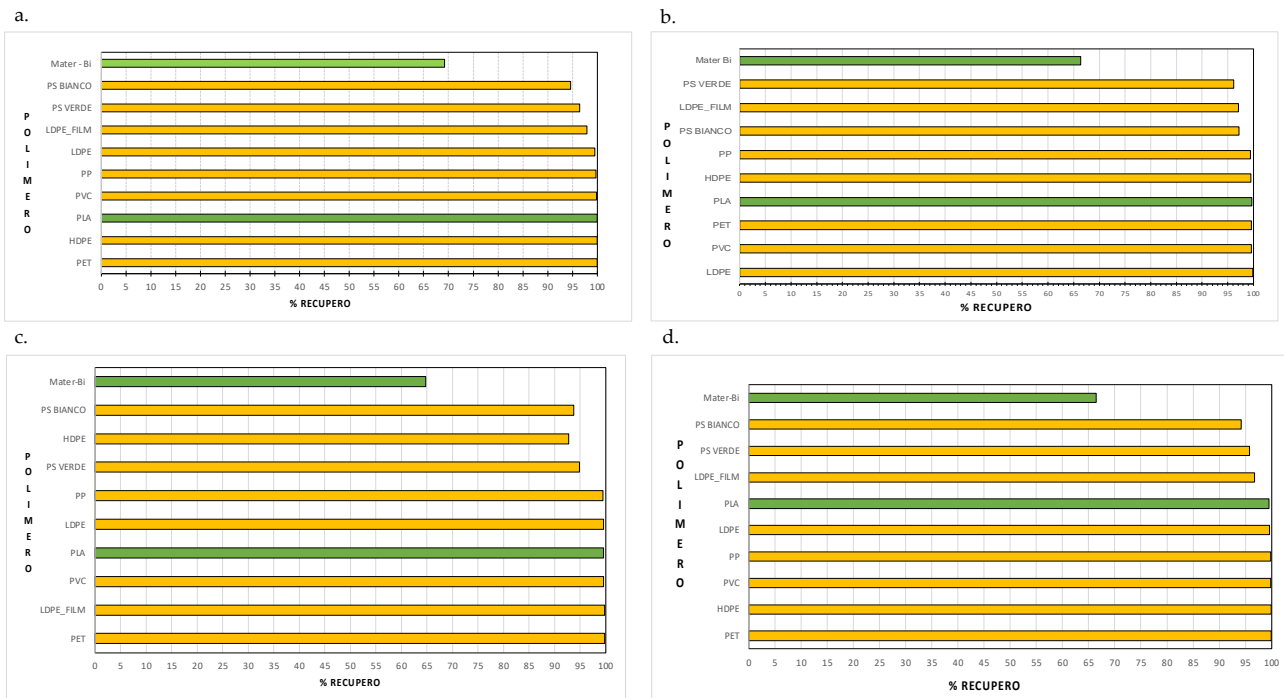


Figura 3.1. Influenza dei trattamenti con perossido di idrogeno sul peso delle particelle.

3.2.2. Reattivo di Fenton

Dai dati in Tabella 3.4., i valori relativi all'efficienza di rimozione della sostanza organica mediante il reattivo di Fenton, in entrambi i protocolli testati, si aggirano intorno al 45% circa; le basse prestazioni del metodo proposto sono condivise anche dagli autori Hurley et al. (2018) e Möller et al. (2020), nonostante questi utilizzino un rapporto tra campione e reagente 1:2, mentre in questo lavoro di tesi è stato utilizzato un rapporto 1:5.

Tabella 3.4. Efficienza di rimozione della sostanza organica dei trattamenti con il reattivo di Fenton.

% PERDITA PESO	CV %	% SV ELIMINATI	CV %
A. REATTIVO DI FENTON (Möller et al.. 2021)			
12.2 ± 1.0	8.18	44.7 ± 0.4	0.93
B. REATTIVO DI FENTON (Hurley et al.. 2018)			
6.0 ± 1.2	20.01	45.9 ± 0.7	1.6

In questo caso, sia i polimeri di origine fossile che le bioplastiche non hanno evidenziato sostanziali perdite in peso dopo il trattamento: come mostrato Figura 3.2., le percentuali di recupero sono maggiori del 90/95%, a conferma di quanto riportato dagli autori Bretas et al. (2020).

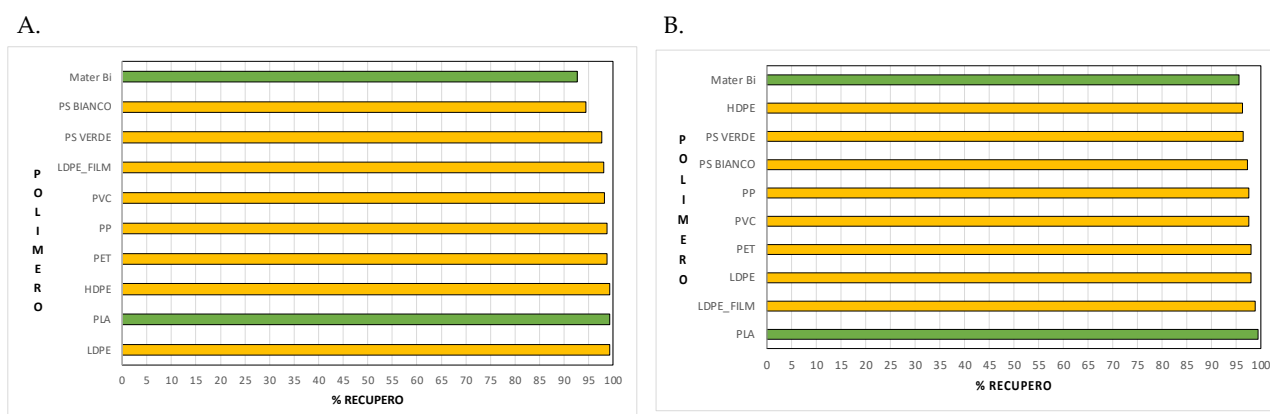


Figura 3.2. Influenza dei trattamenti con il reattivo di Fenton sul peso delle particelle.

3.2.3. Trattamento con enzimi e perossido di idrogeno

Il trattamento con enzimi (in questo caso proteasi e cellulasi) e H₂O₂ è risultato essere il metodo migliore per la degradazione della materia organica, come si evince dai risultati presentati in Tabella 3.5., sia in termini di perdita in peso del fango (85% circa) che di rimozione di sostanze volatili (90% circa). Le ottime prestazioni del metodo studiato sono riportate anche dagli autori Löder et al. (2017).

Tabella 3.5. Efficienza di rimozione della sostanza organica del trattamento con enzimi e H₂O₂.

% PERDITA PESO	CV %	% SV ELIMINATI	CV %
85.4 ± 1.6	1.88	89.9 ± 1.0	1.06

La Figura 3.3. mostra graficamente le percentuali di recupero dei materiali plastici: per i polimeri sintetici e per il PLA i valori sono maggiori del 90%, a differenza del Mater-Bi: questo tipo di bioplastica, infatti, ha subito una perdita in peso di circa il 20%.

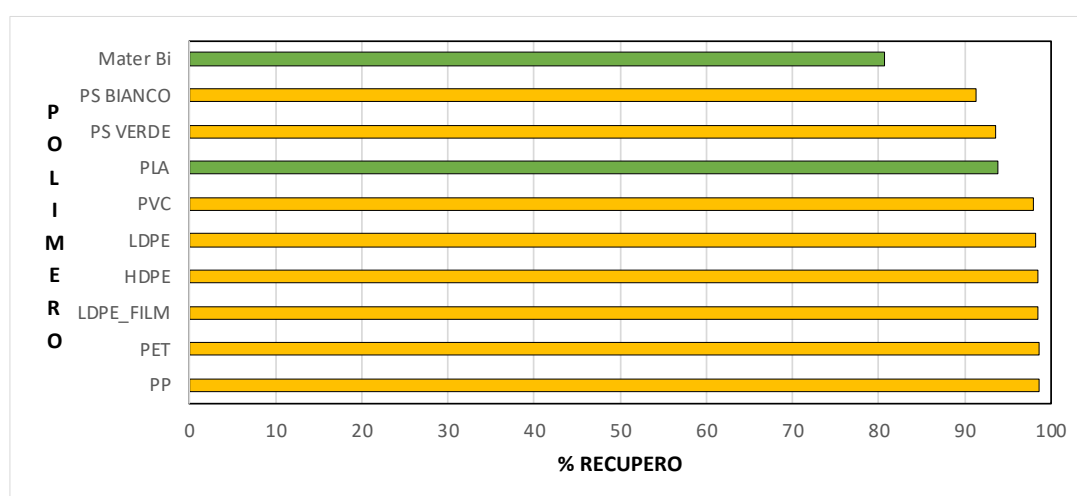


Figura 3.3. Influenza dei trattamenti con il reattivo di Fenton sul peso delle particelle.

3.3. Analisi qualitativa delle microplastiche

3.3.1. Microscopia ottica

Di seguito vengono riportati i risultati dell'analisi qualitativa al microscopio ottico delle microplastiche, individuate nei campioni di fango trattato provenienti dall'impianto di depurazione di Padova.

1. FANGO ISPESSITO

Nel primo filtro sono state individuate quattro microplastiche con caratteristiche simili, ossia filamenti di colore nero di lunghezza totale compresa tra 1 mm e 2 mm. Una MP, però, presenta dimensioni maggiori, pari a 3.57 mm (Figura 3.4.).

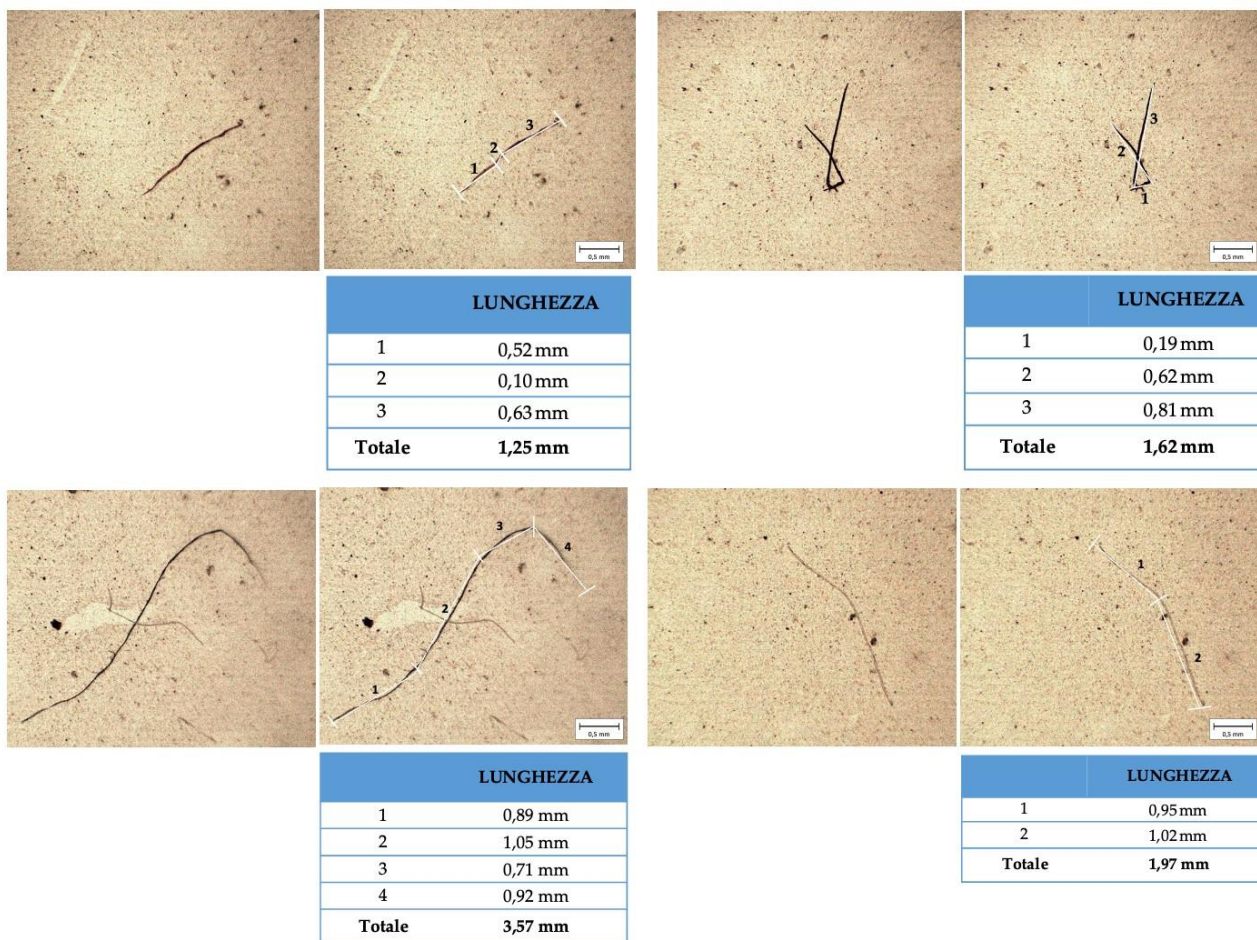


Figura 3.4. Microplastiche individuate al microscopio ottico nel campione di fango ispessito.

2. FANGO DIGERITO

Nel secondo filtro sono state individuate tre microplastiche, di cui due filamenti di colore nero e un frammento di colore blu scuro (Figura 3.5.).

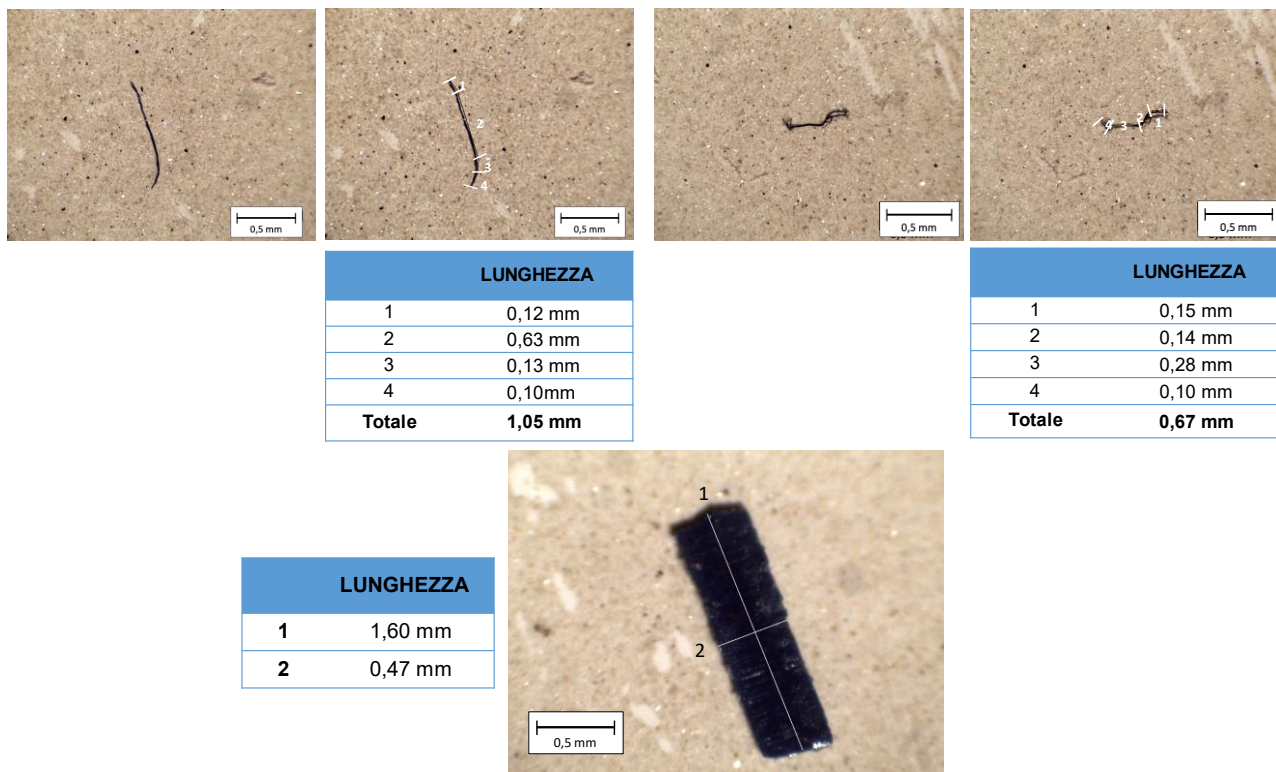


Figura 3.4. Microplastiche individuate al microscopio ottico nel campione di fango digerito.

3. DIGESTATO SEPARATO SOLIDO

Nel terzo filtro sono state individuate sei microplastiche di dimensioni inferiori a 2 mm (Figura 3.6.):

- due filamenti (bianco e blu);
- tre particelle di colore bianco, di cui due di forma arrotondata e una di forma irregolare.

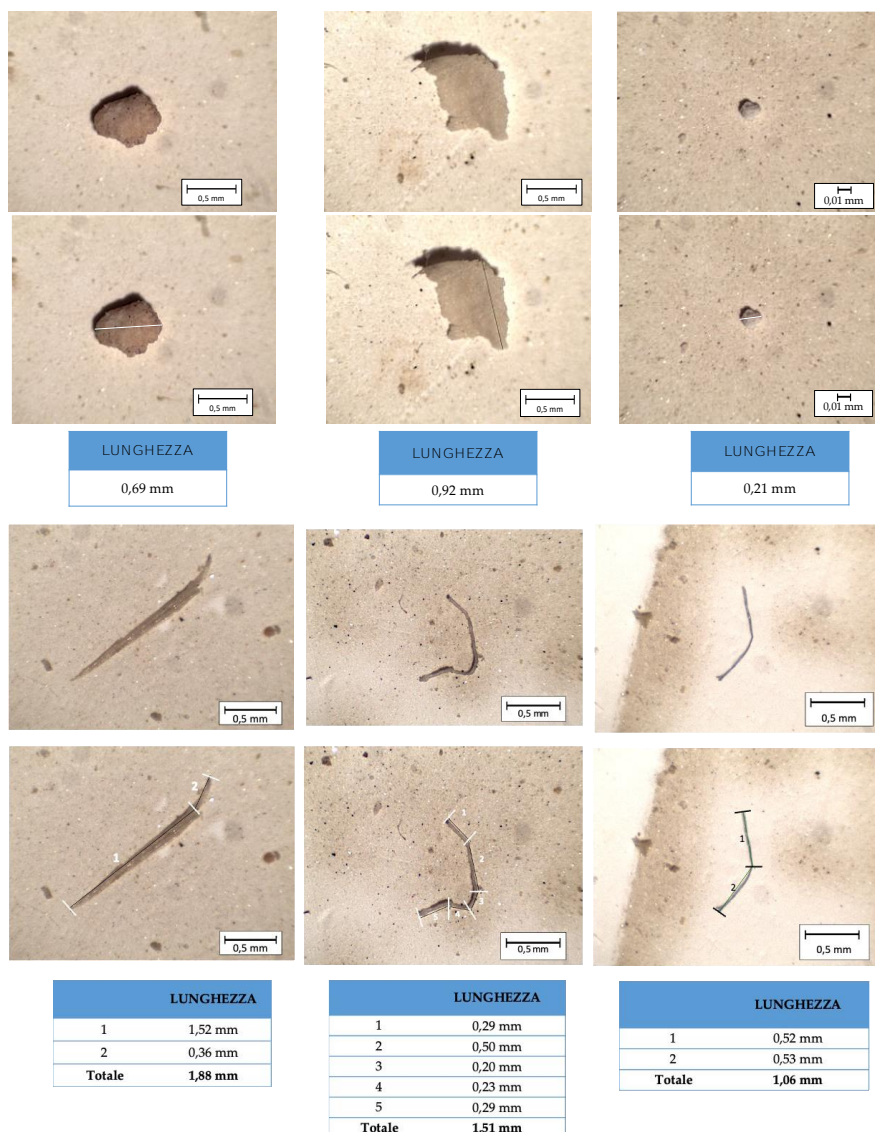


Figura 3.5. Microplastiche individuate al microscopio ottico nel campione di digestato separato solido.

4. DIGESTATO ESSICCATO

Nel quarto filtro sono state individuate cinque microplastiche, di dimensioni inferiori a 2 mm (ad eccezione di un frammento) (Figura 3.7.):

- un filamento di colore nero;
- due frammenti di forma irregolare, uno bianco e uno blu;
- un frammento trasparente di forma angolare.



Figura 3.6. Microplastiche individuate al microscopio ottico nel campione di digestato essiccato.

Dunque, dalle immagini acquisite al microscopio ottico, in tutti i campioni è stata rilevata la presenza di MPs, costituite per la maggior parte da filamenti di piccole dimensioni (inferiori a 2 mm) di colore bianco o nero. I filamenti sono particolarmente diffusi in ambiente ma soprattutto negli impianti di trattamento delle acque reflue. Gli autori Sun et al. (2019) hanno studiato l'abbondanza dei diversi tipi di polimeri nelle acque reflue e nei fanghi: le fibre e i frammenti sono le forme più diffuse, anche se gli autori Magni et al. (2018) riportano concentrazioni molto elevate di film di microplastiche nei fanghi in uscita dall'impianto.

3.3.2. Pirolisi accoppiata con gascromatografia e spettrometria di massa (Pyr-GC/MS)

Di seguito vengono riportati i risultati dell'analisi qualitativa dei polimeri nei materiali di riferimento e nei filtri tramite Pyr-GC/MS. Le tabelle riportano i *markers*, ossia i composti identificativi per ogni tipo di polimero, come già descritto nella sezione "Materiali e metodi".

Materiali di riferimento da laboratorio

La Tabella 3.6. riporta i traccianti identificativi del polimero di polietilene, ossia gli alchadieni tra 8 e 18 atomi di carbonio (C₈-C₁₈) con il corrispondente tempo di ritenzione.

Tabella 3.6. Traccianti del PE e tempo di ritenzione.

Tracciante	Tempo di ritenzione (in minuti)
1,7-ottadiene	4.04
1,8-nonadiene	5.52
1,9-decadiene	7.30
1,10-undecadiene	8.96
1,11-dodecadiene	10.51
1,12-tridecadiene	11.98
1,13-tetradecadiene	13.34
1,14-pentadecadiene	14.64
1,15-esadecadiene	15.85
1,16-eptadecadiene	17.02
1,17-ottadecadiene	18.11
1,18-nonadecadiene	19.16

La Tabella 3.7. riporta i traccianti univoci per il PS, PVC, PET e PS.

Tabella 3.7. Traccianti del PS, PVC, PET e PS e tempi di ritenzione.

Polimero	Tracciante	Tempo di ritenzione (in minuti)	Match di identificazione (%)
PP	2,4-dimetil-1-eptene	4.95	100
PVC	clorobenzene	5.00	86
PET	vinil benzoato	9.85	98
PS	stirene dimero	17.57	93

Le analisi sui singoli polimeri dei materiali di riferimento di laboratorio, ed in particolare lo spettro di massa ed il tempo di ritenzione, sono servite poi come riferimento per le successive analisi.

Bianco di processo

Nel bianco procedurale è stata rilevata la presenza di stirene dimero, come mostrato in Tabella 3.8.:

Tabella 3.8. Analisi del bianco procedurale

Polimero	Tracciante	Tempo di ritenzione (in minuti)	Match di identificazione (%)
PS	stirene dimero	17.57	97

Ciò potrebbe indicare una possibile contaminazione da polistirene in una delle fasi della procedura pre-analitica o nell'ambiente di laboratorio in generale. Di conseguenza, l'eventuale presenza di stirene dimero nei filtri campione non porterà alla diretta identificazione del polimero corrispondente.

Campioni di fango dell'impianto di depurazione di Padova

Dai risultati dell'analisi dei polimeri nei campioni trattati provenienti dall'impianto di depurazione di Padova, la presenza di PS non può essere effettivamente confermata poiché è stato identificato anche nel bianco di processo.

Nel campione di fango ispessito sono stati identificati PET (vinil benzoato) e PS (stirene dimero). La presenza di PE è confermata dall'identificazione di quattro alcadieni C₉, C₁₁, C₁₂, C₁₃ (Tabella 3.9.).

Tabella 3.9. Identificazione dei polimeri nel campione di fango ispessito.

<i>Campione</i>	<i>Polimero</i>	<i>Composto identificato</i>	<i>Tempo di ritenzione (in minuti)</i>	<i>Match di identificazione (%)</i>
1. Fango ispessito	PET	vinil benzoato	9.99	62
	PS	stirene dimero	17.54	79
	PE	1,8-nonadiene	5.91	78
		1,10-undecadiene	9.10	89
		1,11-dodecadiene	10.64	88
		1,12-tridecadiene	12.07	74

Nel secondo campione, il fango proveniente da digestione anaerobica, è stata rilevata la presenza di PP (2,4-dimetil-1-eptene), PS (stirene dimero), Nylon 6 (caprolattame) ed infine PE (3 alcadieni C₉, C₁₃, C₁₄) (Tabella 3.10.).

Tabella 3.10. Identificazione dei polimeri nel campione di fango digerito.

<i>Campione</i>	<i>Polimero</i>	<i>Composto identificato</i>	<i>Tempo di ritenzione (in minuti)</i>	<i>Match di identificazione (%)</i>
2. Fango digerito	PP	2,4-dimetil-1-eptene	5.01	88
	PS	stirene dimero	17.55	87
	Nylon 6	caprolattame	11.97	63
	PE	1,8-nonadiene	5.47	63
		1,12-tridecadiene	12.05	67
		1,13-tetradecadiene	13.36	89

La Tabella 3.11. riporta i polimeri identificati nel campione di digestato separato solido: PET (vinil benzoato), PTFE (tetrafluoroetilene), PS (stirene dimero), PP (2,4-dimetil-1-eptene) e PE (serie di alcadieni C₈-C₁₄).

Infine, nel campione di digestato essiccato sono stati identificati: PS (stirene dimero), PP (2,4-dimetil-1-eptene), PTFE (tetrafluoroetilene) e PE (serie di alcadieni C₁₂-C₁₇) (Tabella 3.12.).

Tabella 3.11. Identificazione dei polimeri nei campioni di digestato separato solido.

<i>Campione</i>	<i>Polimero</i>	<i>Composto identificato</i>	<i>Tempo di ritenzione (in minuti)</i>	<i>Match di identificazione (%)</i>
3. Digestato separato solido	PET	vinil benzoato	9.9	62
	PTFE	Tetrafluoroetilene	1.79	81
	PS	Stirene dimero	17.55	79
	PP	2,4-dimetil-1-eptene	2.27	94
	PE	1,7-ottadiene	4.08	90
		1,8-nonadiene	5.54	66
		1,9-decadiene	7.3	76
		1,10-undecadiene	8.94	88
		1,11-dodecadiene	10.49	75
		1,12-tridecadiene	11.94	69
	1,13-tetradecadiene	13.3	74	

Tabella 3.12. Identificazione dei polimeri nei campioni di digestato essiccato.

<i>Campione</i>	<i>Polimero</i>	<i>Composto identificato</i>	<i>Tempo di ritenzione (in minuti)</i>	<i>Match di identificazione (%)</i>
4. Digestato essiccato	PS	Stirene dimero	17.58	86
	PP	2,4-dimetil-1-eptene	2.27	94
	PTFE	Tetrafluoroetilene	1.8	83
	PE	1,11-dodecadiene	10.52	77
		1,12-tridecadiene	11.95	73
		1,13-tetradecadiene	13.31	84
		1,14-pentadecadiene	14.6	63
	1,15-esadecadiene	15.82	80	
	1,16-eptadecadiene	16.97	85	

Dunque, dall'analisi di MPs condotta al Pyr-GC/MS in tutti i fanghi trattati provenienti dall'impianto di depurazione di Padova è stata rilevata la presenza di almeno due alchadieni, identificativi del polimero di polietilene. Il polivinilcloruro, invece, non è stato riscontrato in nessuno dei campioni analizzati. Ad eccezione del fango ispessito, nelle altre matrici si conferma la presenza di polipropilene, dal tracciante 2,4-dimetil-1- eptene. Questi risultati sono in accordo con la letteratura: gli autori Sun et al. (2019) e da Möller et al. (2020), infatti, riportano che il PE e il PP sono i polimeri più diffusi negli impianti di trattamento delle acque reflue, mentre il PVC è il meno abbondante.

4. CONCLUSIONI

Negli ultimi anni sono aumentate le preoccupazioni riguardanti gli impatti ambientali e sanitari associati all'inquinamento da microplastiche, poiché la loro presenza ubiquitaria nelle diverse matrici ambientali è stata confermata da diversi studi. Nonostante siano ormai evidenti i fenomeni e le conseguenze che interessano le MPs, non è ancora chiaro quale sia l'effettiva distribuzione spaziale ed in particolare la loro presenza negli impianti di trattamento delle acque reflue. Quest'ultimo aspetto rappresenta un importante problema ambientale poiché i fanghi trattati in uscita dall'impianto possono essere utilizzati, ad esempio, come fertilizzanti agricoli: le MPs potenzialmente presenti rappresentano un mezzo di trasporto degli inquinanti organici persistenti, essendo assorbiti sulla superficie dei polimeri.

Poiché al momento non esiste una metodica riconosciuta a livello internazionale, lo scopo principale del presente lavoro di tesi è stato quello di ottimizzare la fase di pretrattamento in fanghi provenienti da impianti di depurazione (ossia in matrici ricche di sostanza organica che può interferire con la corretta identificazione dei polimeri andando a modificare la densità) necessaria per un'analisi qualitativa e/o quantitativa delle MPs.

Dai risultati relativi all'efficienza dei diversi trattamenti studiati è emerso che il metodo ottimale prevede l'utilizzo combinato di miscele enzimatiche (in questo caso proteasi e cellulasi) con perossido di idrogeno: questo metodo, infatti, comporta una rimozione di sostanze volatili pari a circa il 90% e una perdita dell'85% circa in peso del fango. Le ottime prestazioni riguardano

anche le percentuali di recupero dei polimeri testati poiché, ad eccezione del Mater-Bi, tutte le plastiche di origine sintetica e il PLA non hanno subito perdite in peso, come testimoniano i valori di recupero maggiori del 90/95%.

Per quanto riguarda invece i trattamenti chimici mediante il perossido di idrogeno le efficienze di rimozione della sostanza organica raggiungono valori pari al 75%; infine, l'utilizzo del reattivo di Fenton nei due protocolli testati si è rivelato essere il meno efficace: infatti il valore relativo all'eliminazione di sostanze volatili è circa la metà (45%) rispetto al trattamento con enzimi e perossido di idrogeno.

La seconda parte del lavoro sperimentale è stata dedicata all'identificazione dei polimeri plastici. Le analisi al microscopio ottico hanno evidenziato, in tutti i campioni di fango trattato, la presenza di MPs: la maggior parte filamentosi e di dimensioni inferiori ai 2 mm. Invece, le analisi al Pyr-GC/MS hanno permesso di identificare la natura dei polimeri grazie alla presenza di composti indicatori ed univoci del tipo di plastica nel pirogramma risultante. In tutti i campioni sono stati identificati almeno due alchadieni che confermano la presenza di polietilene, mentre il polipropilene non è stato riscontrato solo nel campione di fango ispessito. Per contro, il polivinilcloruro non è mai stato identificato. La presenza di stirene dimero nei filtri analizzati non ha portato alla diretta identificazione del polimero corrispondente poiché è stato riscontrato anche nel bianco di processo.

L'analisi delle MPs al microscopio ottico presenta alcuni svantaggi legati alla soggettività e alle tempistiche richieste; inoltre consente di definire solamente le proprietà fisiche dei polimeri come la dimensione, la forma e il colore. La

scelta di utilizzare il Pyr-GC/MS si è rilevata efficace poiché ha consentito di riconoscere la natura dei polimeri di plastica presenti nei campioni.

Dunque, il metodo ottimizzato (mediante miscele enzimatiche e perossido di idrogeno) nel presente lavoro di tesi può rappresentare una valida soluzione per il pretrattamento di matrici ricche di sostanza organica, ma è necessario proseguire tale studio scientifico per ulteriori conferme dei dati presentati.

BIBLIOGRAFIA

- Andrady, A. L., Pegram, J. E., & Searle, N. D. (1996). Wavelength sensitivity of enhanced photodegradable polyethylenes, ECO, and LDPE/MX. *Journal of Applied Polymer Science*, 62(9), 1457–1463. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4628\(19961128\)62:9<1457::AID-APP15>3.0.CO;2-W](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4628(19961128)62:9<1457::AID-APP15>3.0.CO;2-W)
- Annenkov, V. V., Danilovtseva, E. N., Zelinskiy, S. N., & Pal'shin, V. A. (2021). Submicro- and nanoplastics: How much can be expected in water bodies? *Environmental Pollution*, 278, 116910. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.116910>
- Bretas Alvim, C., Bes-Piá, M. A., & Mendoza-Roca, J. A. (2020). Separation and identification of microplastics from primary and secondary effluents and activated sludge from wastewater treatment plants. *Chemical Engineering Journal*, 402(April), 126293. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2020.126293>
- Bretas Alvim, C., Mendoza-Roca, J. A., & Bes-Piá, A. (2020). Wastewater treatment plant as microplastics release source – Quantification and identification techniques. *Journal of Environmental Management*, 255(September 2019). <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.109739>
- Bouزيد, C. Anquetil, R. Dris, J. Gasperi, B. Tassin, and S. Derenne. (2022). Quantification of Microplastics by Pyrolysis Coupled with Gas Chromatography and Mass Spectrometry in Sediments: Challenges and Implications," *Microplastics*, vol. 1, no. 2, pp. 229–239, 2022, doi: 10.3390/microplastics1020016.

- Campanale, C., Savino, I., Pojar, I., Massarelli, C., & Uricchio, V. F. (2020). A practical overview of methodologies for sampling and analysis of microplastics in riverine environments. *Sustainability (Switzerland)*, *12*(17). <https://doi.org/10.3390/SU12176755>
- Chen, D., Yin, L., Wang, H., & He, P. (2014). Pyrolysis technologies for municipal solid waste: A review. *Waste Management*, *34*(12), 2466–2486. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2014.08.004>
- Chen, M., Du, M., Jin, A., Chen, S., Dasgupta, S., Li, J., Xu, H., Ta, K., & Peng, X. (2020). Forty-year pollution history of microplastics in the largest marginal sea of the western Pacific. *Geochemical Perspectives Letters*, *13*, 42–47. <https://doi.org/10.7185/geochemlet.2012>
- Chia, R. W., Lee, J. Y., Kim, H., & Jang, J. (2021). Microplastic pollution in soil and groundwater: a review. *Environmental Chemistry Letters*, *19*(6), 4211–4224. <https://doi.org/10.1007/s10311-021-01297-6>
- Eissenberger, K., Ballesteros, A., Bisschop, R. De, Bugnicourt, E., Cinelli, P., Defoin, M., Demeyer, E., Fürtauer, S., Gioia, C., Lola, G., Hornberger, R., Ißbrücker, C., Mennella, M., Pogrell, H. Von, Rodriguez-turienzo, L., Romano, A., Rosato, A., Saile, N., Schulz, C., ... Spinelli, D. (2023). *Packaging Solutions*.
- EurEau. (2021). Waste water treatment - sludge management. Briefing note. *European Federation of National Associations of Water Services*, May. <https://www.eureau.org/resources/briefing-notes/5629-briefing-note-on-sludge-management/file>

- GESAMP. (2015). Sources, fate and effects of microplastics in the marine environment (Part 1). *Journal Series GESAMP Reports and Studies, No 90*, 96. <http://www.gesamp.org/publications/reports-and-studies-no-90>
- Gewert, B., Plassmann, M. M., & Macleod, M. (2015). Pathways for degradation of plastic polymers floating in the marine environment. *Environmental Sciences: Processes and Impacts*, 17(9), 1513–1521. <https://doi.org/10.1039/c5em00207a>
- Geyer, R., Jambeck, J. R., & Law, K. L. (2017). Production, use, and fate of all plastics ever made. *Science Advances*, 3(7), 25–29. <https://doi.org/10.1126/sciadv.1700782>
- Gregoris, E., Gallo, G., Rosso, B., Piazza, R., Corami, F., & Gambaro, A. (2023). Microplastics analysis: can we carry out a polymeric characterisation of atmospheric aerosol using direct inlet Py-GC/MS? *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 170(December 2022), 105903. <https://doi.org/10.1016/j.jaap.2023.105903>
- Hale, R. C., Seeley, M. E., Guardia, M. J. La, Mai, L., & Zeng, E. Y. (2020). *A Global Perspective on Microplastics Journal of Geophysical Research: Oceans*. 1–40. <https://doi.org/10.1029/2018JC014719>
- Hermabessiere, L., Himber, C., Boricaud, B., Kazour, M., Amara, R., Cassone, A., Laurentie, M., Paul-Pont, I., Soudant, P., Dehaut, A., Duflos, G. (2018) Optimization, performance, and application of a pyrolysis-GC/MS method for the identification of microplastics, *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 410, no. 25, pp. 6663–6676, 2018, doi: 10.1007/s00216-018-1279-0

Hurley, R. R., Lusher, A. L., Olsen, M., & Nizzetto, L. (2018). Validation of a Method for Extracting Microplastics from Complex, Organic-Rich, Environmental Matrices. *Environmental Science and Technology*, *52*(13), 7409–7417. <https://doi.org/10.1021/acs.est.8b01517>

ISPRA. (2015). Uso dei fanghi di depurazione in agricoltura: attività di controllo e vigilanza sul territorio. In *ISPRA, Rapporto n. 228/2015* (Vol. 228). <http://www.isprambiente.gov.it/it/pubblicazioni/rapporti/uso-dei-fanghi-di-depurazione-in-agricoltura-attivita-di-controllo-e-vigilanza-sul-territorio>

ISPRA. (2023). Rapporto Rifiuti Speciali Edizione 2023. In *ISPRA, Rapporto 389/2023* (Vol. 389).

Kiran, B. R., Kopperi, H., & Venkata Mohan, S. (2022). Micro/nano-plastics occurrence, identification, risk analysis and mitigation: challenges and perspectives. In *Reviews in Environmental Science and Biotechnology* (Vol. 21, Issue 1). Springer Netherlands. <https://doi.org/10.1007/s11157-021-09609-6>

J. La Nasa, G. Biale, D. Fabbri, and F. Modugno (2020). A review on challenges and developments of analytical pyrolysis and other thermoanalytical techniques for the quali-quantitative determination of microplastics. *J. Anal. Appl. Pyrolysis*, vol. 149, no. March, p. 104841, 2020, doi: 10.1016/j.jaap.2020.104841.

Lares, M., Ncibi, M. C., Sillanpää, M., & Sillanpää, M. (2019). Intercomparison

study on commonly used methods to determine microplastics in wastewater and sludge samples. *Environmental Science and Pollution Research*, 26(12), 12109–12122. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-04584-6>

Lebreton, L., & Andrady, A. (2019). Future scenarios of global plastic waste generation and disposal. *Palgrave Communications*, 5(1), 1–11. <https://doi.org/10.1057/s41599-018-0212-7>

Li, X., Chen, L., Ji, Y., Li, M., Dong, B., Qian, G., Zhou, J., & Dai, X. (2020). Effects of chemical pretreatments on microplastic extraction in sewage sludge and their physicochemical characteristics. *Water Research*, 171, 115379. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2019.115379>

Liu, L., Xu, M., Ye, Y., & Zhang, B. (2022). On the degradation of (micro)plastics: Degradation methods, influencing factors, environmental impacts. *Science of the Total Environment*, 806, 151312. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.151312>

Löder, M. G. J., Imhof, H. K., Ladehoff, M., Löschel, L. A., Lorenz, C., Mintenig, S., Piehl, S., Primpke, S., Schrank, I., Laforsch, C., & Gerdt, G. (2017). Enzymatic Purification of Microplastics in Environmental Samples. *Environmental Science and Technology*, 51(24), 14283–14292. <https://doi.org/10.1021/acs.est.7b03055>

Lucas, N., Bienaime, C., Belloy, C., Queneudec, M., Silvestre, F., & Nava-Saucedo, J. E. (2008). Polymer biodegradation: Mechanisms and estimation techniques - A review. *Chemosphere*, 73(4), 429–442. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.06.064>

- Marine & Environmental Research Institute. (2015). *Guide to Microplastics Identification*. 14. http://sfyl.ifas.ufl.edu/media/sfylifasufledu/flagler/seagrant/pdf-files/microplastics/MERI_Guide-to-Microplastic-Identification.pdf
- Martellone, L., Mattei, D., Lucentini, L., & Favero, G. (2022). *Microplastiche nelle acque potabili*. *904*(2), 3–8.
- Möller, J. N., Heisel, I., Satzger, A., Vizsolyi, E. C., Oster, S. D. J., Agarwal, S., Laforsch, C., & Löder, M. G. J. (2022). Tackling the Challenge of Extracting Microplastics from Soils: A Protocol to Purify Soil Samples for Spectroscopic Analysis. *Environmental Toxicology and Chemistry*, *41*(4), 844–857. <https://doi.org/10.1002/etc.5024>
- Nielsen, T. D., Hasselbalch, J., Holmberg, K., & Stripple, J. (2020). Politics and the plastic crisis: A review throughout the plastic life cycle. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Energy and Environment*, *9*(1), 1–18. <https://doi.org/10.1002/wene.360>
- Okelly, B. C., El-Zein, A., Liu, X., Patel, A., Fei, X., Sharma, S., Mohammad, A., Goli, V. S. N. S., Wang, J. J., Li, D., Shi, Y., Xiao, L., Kuntikana, G., Shashank, B. S., Sarris, T. S., Hanumantha Rao, B., Mohamed, A. M. O., Paleologos, E. K., Nezhad, M. M., & Singh, D. N. (2021). Microplastics in soils: An environmental geotechnics perspective. In *Environmental Geotechnics* (Vol. 8, Issue 8). <https://doi.org/10.1680/jenge.20.00179>
- Ribeiro, F., Okoffo, E. D., O'Brien, J. W., Fraissinet-Tachet, S., O'Brien, S., Gallen, M., Samanipour, S., Kaserzon, S., Mueller, J. F., Galloway, T., & Thomas, K. V. (2020). Quantitative Analysis of Selected Plastics in High-Commercial-Value

Australian Seafood by Pyrolysis Gas Chromatography Mass Spectrometry. *Environmental Science and Technology*, 54(15), 9408–9417. <https://doi.org/10.1021/acs.est.0c02337>

Rosso, B., Gregoris, E., Litti, L., Zorzi, F., Fiorini, M., Bravo, B., Barbante, C., Gambaro, A., & Corami, F. (2023). Identification and quantification of tire wear particles by employing different cross-validation techniques: FTIR-ATR Micro-FTIR, Pyr-GC/MS, and SEM. *Environmental Pollution*, 326(March), 121511. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2023.121511>

Rubio-Armendáriz, C., Alejandro-vega, S., Paz-montelongo, S., Guti, Á. J., Carrascosa-iruzubieta, C. J., & Torre, A. H. (2022). *Microplastics as Emerging Food Contaminants: A Challenge for Food Safety In fact, the EU, following the recommendations of the Europe (ECHA) [6], has started a process to limit the use of these material applied voluntary steps in this regard [7].* 1–14.

Schwinghammer, L., Krause, S., & Schaum, C. (2021). Determination of large microplastics: Wet-sieving of dewatered digested sludge, co-substrates, and compost. *Water Science and Technology*, 84(2), 384–392. <https://doi.org/10.2166/wst.2020.582>

Sun, J., Dai, X., Wang, Q., van Loosdrecht, M. C. M., & Ni, B. J. (2019). Microplastics in wastewater treatment plants: Detection, occurrence and removal. In *Water Research* (Vol. 152, pp. 21–37). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.12.050>

Tagg, A. S., Harrison, J. P., Ju-Nam, Y., Sapp, M., Bradley, E. L., Sinclair, C. J., & Ojeda, J. J. (2017). Fenton's reagent for the rapid and efficient isolation of

microplastics from wastewater. *Chemical Communications*, 53(2), 372–375.
<https://doi.org/10.1039/c6cc08798a>

Thompson, R. C., Olson, Y., Mitchell, R. P., Davis, A., Rowland, S. J., John, A. W. G., McGonigle, D., & Russell, A. E. (2004). Lost at Sea: Where Is All the Plastic? *Science*, 304(5672), 838. <https://doi.org/10.1126/science.1094559>

Wang, J., Tan, Z., Peng, J., Qiu, Q., & Li, M. (2016). The behaviors of microplastics in the marine environment. *Marine Environmental Research*, 113, 7–17.
<https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2015.10.014>

Zamfir, C., Ivanov, A. A., Grigore, G., & Rahim, N. (2023). *INVESTIGATION OF MICROPLASTICS PRESENCE IN*. 14(2), 663–670.
<https://doi.org/10.36868/IJCS.2023.02.19>

RINGRAZIAMENTI

Un sentito ringraziamento va al mio relatore Piazza Rossano, per i suoi preziosi consigli e per la sua disponibilità, per avermi fornito spunti fondamentali nella stesura di questo lavoro, per avermi indirizzato, aiutato e supportato nei momenti di indecisione e di difficoltà. Porterò sempre con me il bagaglio culturale che mi ha trasmesso.

Grazie al Dottor Bonato Tiziano che mi ha dato l'opportunità di svolgere questo progetto, mi ha seguito con infinita pazienza e disponibilità nella stesura del mio elaborato. Un ringraziamento anche a tutto il gruppo di lavoro del laboratorio S.E.S.A. per avermi accolta, messo a mio agio e soprattutto per tutte le conoscenze che ho acquisito.

Ringrazio la Dottoressa Gregoris Elena e il Dottor Roman Marco per la disponibilità e la professionalità: senza le vostre preziose indicazioni sarebbe stato certamente più difficile districarmi tra le insidie della scrittura della tesi.

Un grazie a tutta la mia famiglia.

Ai miei genitori, per avermi dato la possibilità di seguire i miei sogni e studiare quello che poi si è rivelata essere la mia passione; per avermi aiutato a superare i momenti di sconforto e di difficoltà: senza di voi non avrei mai potuto raggiungere questo importante traguardo!

A mia mamma con le sue cure e il suo infinito amore.

A mio papà che mi ha insegnato la Forza e il Coraggio di lottare.

A Carlo per avermi insegnato a non abbassare mai la guardia, al nostro legame

fraterno, al suo modo di essere protettivo e infinitamente amorevole.

A Ilaria per i suoi messaggi di incoraggiamento a non mollare mai. Grazie per esserci sempre, per i tuoi consigli, per la tua Forza e immenso Coraggio.

A nonna Mirella per le lunghe telefonate e per tutte le preghiere quando avevo un esame: mi hai insegnato che corpo e mente non invecchiano mai, ma hanno solo bisogno di essere allenati.

A Gianmarco che mi ha accompagnato in questi lunghi anni universitari, per la sua pazienza e infinità bontà, per avermi strappato un sorriso quando ne avevo più bisogno, per esserci stato nei momenti di crisi anche quando nascondevo tutto dietro la mia corazza.

A voi Alice, nonno Antonio, nonno Mario e nonna Maria, che siete sempre nei miei pensieri... spero di avervi reso orgogliosi.

A tutti i miei amici che non hanno mai smesso di credere in me e che hanno condiviso gioie e dolori di questo percorso universitario.

Infine grazie ai miei bimbi, ormai ragazzi, di nuoto che mi hanno insegnato a non mollare mai e a sorridere alle piccole cose. Perché anche quando il mondo mi crollava addosso, entrando in piscina e guardando i loro occhi entusiasti la mia giornata ripartiva con il sorriso.

Grazie.

Laura