



ALLEGATO 14

IN COLLABORAZIONE CON



S G M Ingegneria S.r.l.



UNIMORE

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI
MODENA E REGGIO EMILIA

Ateneo fondato nel 1175



DIPARTIMENTO DI SCIENZE CHIMICHE E GEOLOGICHE

Analisi spettrofluorimetriche di fluocaptori

15 DICEMBRE 2017

A cura di:
Dott. Francesco RONCHETTI
Dott.ssa Manuela DEIANA

REPORT FINALE

Indice

1.	INTRODUZIONE	3
1.1.	PRINCIPIO DELLA TECNICA DI ANALISI	3
1.2.	TRACCIANTI INDAGATI E LORO CARATTERISTICHE	4
2.	METODI	5
2.1.	CAMPIONI ANALIZZATI	5
2.2.	STRUMENTAZIONE UTILIZZATA.....	5
2.3.	METODO DI ANALISI	7
2.4.	PREPARAZIONE CAMPIONI PER ANALISI	8
2.5.	PREPARAZIONE STANDARD DI RIFERIMENTO	9
3.	RISULTATI	12
3.1.	FLUORESCEINA SODICA.....	12
3.2.	SULFORODAMINA G	25
3.3.	TINOPAL CBS-X	37
4.	CONSIDERAZIONI CONCLUSIVE	50
5.	BIBLIOGRAFIA	51

1. INTRODUZIONE

Il presente report riporta i risultati delle analisi spettrofluorimetriche eseguite su campioni di carbone attivo (fluocaptori o fluorocaptori).

1.1. PRINCIPIO DELLA TECNICA DI ANALISI

La fluorescenza è la proprietà di una determinata sostanza di rilasciare un fotone dopo aver assorbito luce visibile o ultravioletta (UV). Il fotone emesso (ad una lunghezza d'onda d'emissione λ_{em}) è sempre meno energetico rispetto a quello assorbito (ad una lunghezza d'onda di eccitazione λ_{ex}) (Figura 1). Quindi la lunghezza d'onda d'emissione λ_{em} è più corta di quella d'eccitazione λ_{ex} . Ogni sostanza ha una λ_{em} caratteristica in funzione della λ_{ex} , dunque ciascuna sostanza avrà uno spettro di emissione tipico che permette di identificarla. Attraverso l'analisi dello spettro di emissione di fluorescenza è quindi possibile verificare l'eventuale presenza della sostanza indagata.

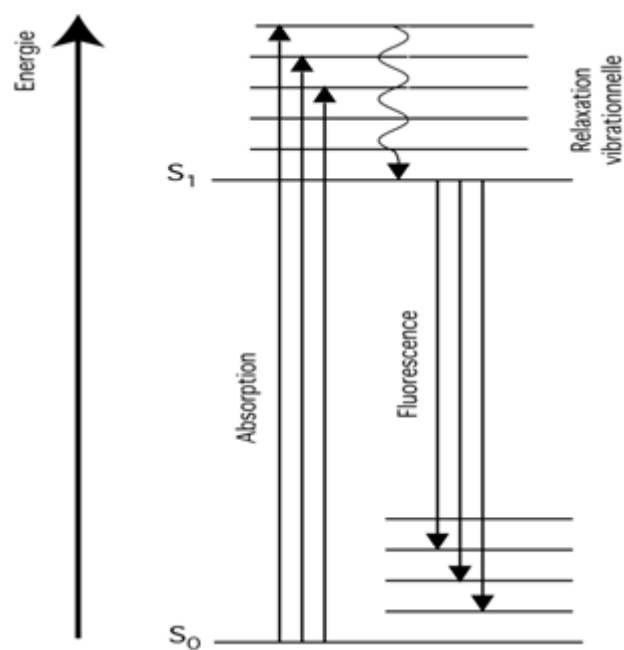


Figura 1: Schema raffigurante il principio della fluorescenza alla base della tecnica di analisi.

1.2. TRACCIANTI INDAGATI E LORO CARATTERISTICHE

I traccianti indagati sono: Fluoresceina sodica, Sulforodamina G e Tinopal CBS-X. Nella tabella 1 sono riportate le lunghezze d'onda di eccitazione λ_{ex} e di emissione λ_{em} tipiche dei traccianti utilizzate per le analisi (Andre et al., 1977; Geyer et al., 2007; Farmer et al., 2011; Licha et al., 2013; Aley and Beeman, 2015).

Tabella 1: per ciascun tracciante viene riportato il numero CAS, la formula chimica e le lunghezze d'onda di eccitazione e di emissione tipiche utilizzate per le analisi.

Tracciante	Numero CAS	Formula Chimica	λ_{ex} (nm)	λ_{em} (nm)
Fluoresceina sodica	518-47-8	$C_{20}H_{10}O_5Na_2$	492	512
Sulforodamina G	5873-16-5	$C_{25}H_{25}N_2NaO_7S_2$	535	550
Tinopal CBS-X	27344-41-8	$C_{28}H_{20}Na_2O_6S_2$	355	429

È opportuno premettere che la tecnica di campionamento con fluocaptori è ottimale per le prime due sostanze, ma presenta limitazioni relativamente al Tinopal CBS-X.

Infatti, i fluocaptori sono caratterizzati da elevato potere d'adsorbimento non solo sui traccianti fluorescenti, ma anche su numerose altre sostanze e sulla materia organica disciolta in acqua, che può essere presente in elevate quantità nelle acque naturali (superficiali o sotterranee). Per la sua forte interferenza con la materia organica, il Tinopal CBS-X è difficilmente rilevabile nei fluocaptori, perchè viene misurato indirettamente per fluorescenza sulle lunghezze d'onda più basse dello spettro UV. In altre parole in fase analitica è molto difficile distinguere il segnale del Tinopal dall'elevato "rumore di fondo" determinato dalla sostanza organica disciolta in acqua e adsorbita dai fluocaptori.

2. METODI

2.1. CAMPIONI ANALIZZATI

I campioni analizzati (fluocaptori) provengono dal Sito impiantistico località Spiritu Santu (Olbia) e sono stati consegnati al laboratorio raggruppati in sei serie distinte:

- La *serie 00*: è stata campionata il 29/05/2017 e rappresenta il bianco pre-immissione;
- La *serie 01*: è stata campionata il 20/06/2017;
- La *serie 02*: è stata campionata il 11/07/2017;
- La *serie 03*: è stata campionata il 02/08/2017;
- La *serie 04*: è stata campionata il 29/08/2017;
- La *serie 05*: è stata campionata il 28/09/2017;
- La *serie 06*: è stata campionata il 27/10/2017.

Nel dettaglio le prime tre serie (*serie 00*, *serie 01* e *serie 02*) sono state consegnate al laboratorio il 14/07/2017, mentre le successive serie (*serie 03*, *serie 04*, *serie 05*, *serie 06*) sono state consegnate il 06/11/2017.

Successivamente alla consegna, il laboratorio ha provveduto ad analizzare i campioni, a preparare e analizzare le soluzioni standard, a processare i dati ottenuti e a redigere il report di restituzione dei dati.

2.2. STRUMENTAZIONE UTILIZZATA

Lo strumento utilizzato per le analisi spettrofluorimetriche è uno Spettrofluorimetro JASCO FP6200 che lavora con software Spectra Manager (Figura 2), disponibile presso il Dipartimento di Scienze Chimiche e Geologiche di Modena.

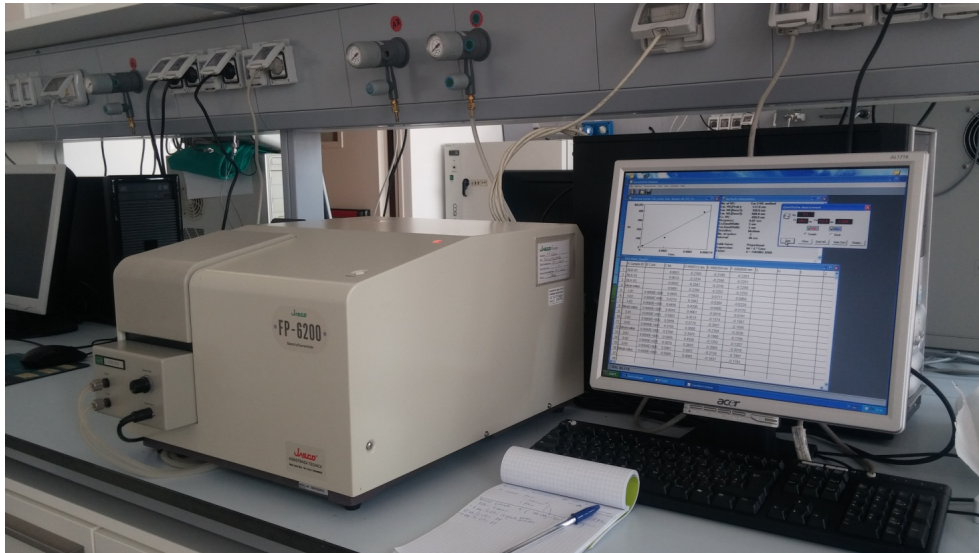


Figura 2: Spettrofluorimetro JASCO FP6200 utilizzato per le analisi.

Il principio di funzionamento di uno spettrofluorimetro è mostrato in Figura 3. La luce prodotta dalla lampada (L), che emette uno spettro continuo nell'ultravioletto, viene focalizzata sull'ingresso di un monocromatore (M1) che seleziona la lunghezza d'onda desiderata. Il fascio monocromatico colpisce il campione (S) posto nel comparto celle. La composizione spettrale della luce emessa viene analizzata dal secondo monocromatore (M2) che invia il fascio al fotomoltiplicatore (PM). Il secondo monocromatore è posto a 90° rispetto al primo, per minimizzare l'entrata della luce diretta della sorgente. Il fotomoltiplicatore trasforma il segnale luminoso in un segnale elettrico.

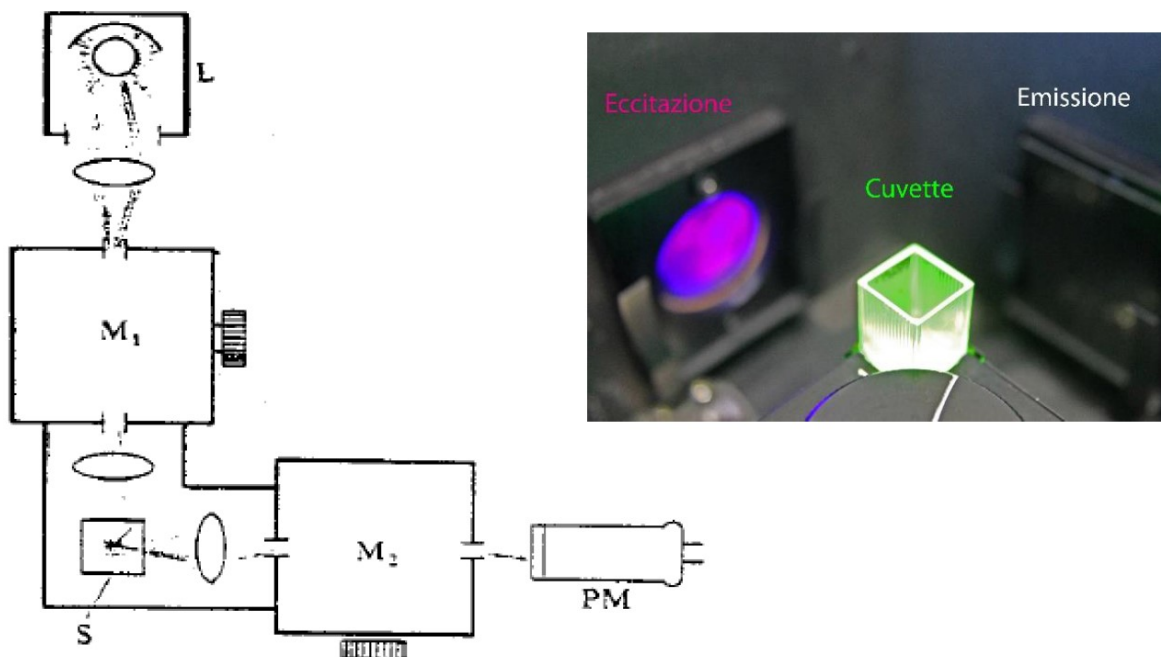


Figura 3: Schema che illustra il principio di funzionamento dello spettrofluorimetro utilizzato per le analisi (spiegazione nel testo).

2.3. METODO DI ANALISI

Il metodo utilizzato è quello dello spettro di emissione. In pratica per ciascun tracciante si fissa una lunghezza d'onda di eccitazione λ_{ex} (nota da bibliografia) che corrisponde alla lunghezza d'onda di assorbimento massimo della sostanza (Tabella 1). Ciascun campione viene quindi colpito da un fascio di luce che fornisce energia agli atomi e permette la transizione degli elettroni verso posizioni energetiche maggiori; questo "salto di energia" avviene con la formazione di uno spettro di eccitazione in corrispondenza della λ_{ex} (Figura 4). Essendo questa configurazione energetica degli atomi instabile, si ha che gli elettroni eccitati tendono a ritornare nella posizione iniziale più stabile. Questo ulteriore passaggio avviene con la formazione di uno spettro di emissione in corrispondenza di una λ_{em} che è maggiore della λ_{ex} (Tabella 1). L'acquisizione dello spettro di emissione consente di individuare l'eventuale presenza della sostanza indagata poiché ciascuna sostanza ha uno spettro di emissione tipico il cui picco di intensità massima sarà in corrispondenza di una lunghezza d'onda λ_{em} caratteristica. Un risultato positivo (presenza della sostanza indagata) si ha quando si ottiene uno spettro di emissione ben definito e con un chiaro picco di massima intensità di fluorescenza in corrispondenza della λ_{em} tipica.

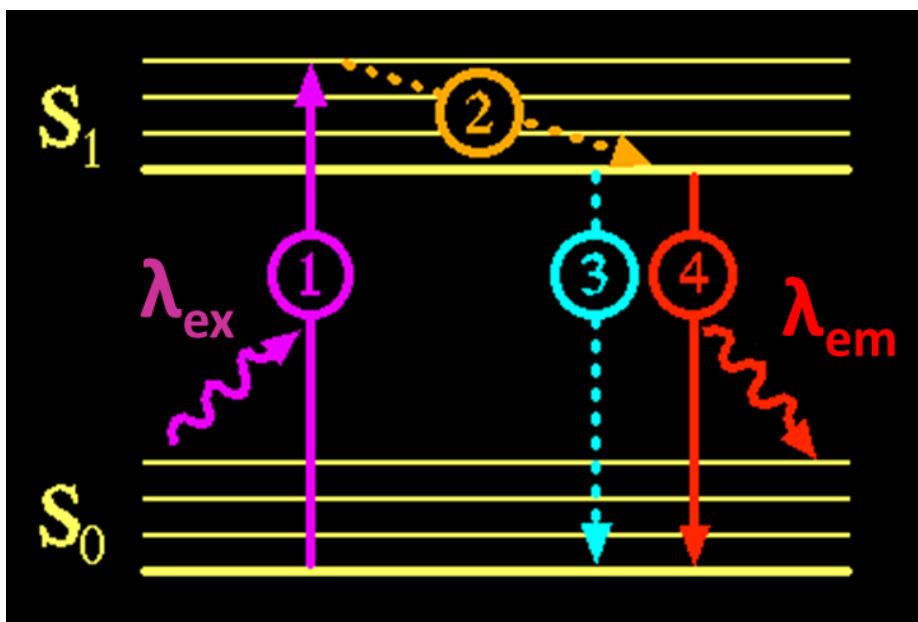


Figura 4: schema relativo alle transizioni energetiche degli elettroni che avvengono negli atomi durante la fluorescenza.

I limiti di rilevabilità raggiungibili con l'applicazione di tale metodo in condizioni ottimali (acque pulite) sono riportati nella seguente tabella per ciascun tracciante.

Tabella 2: limiti di rilevabilità ottenuti con il metodo dello spettro di emissione.

Tracciante	Limite di rilevabilità (ppb)
Fluoresceina sodica	0.01
Sulforodamina G	0.1
Tinopal CBS-X	1

2.4. PREPARAZIONE CAMPIONI PER ANALISI

I campioni sono stati essiccati in stufa a 100°C per almeno 2 ore. In seguito dai carboni è stata prelevata un'aliquota di 2 grammi che è stata immersa in una soluzione eluente. La soluzione eluente utilizzata, composta per il 90% da alcool etilico e per il restante 10% da KOH, è frequentemente applicata in bibliografia (Jones 1984; Tankerley

1984; Cucchi et al. 2000; Audra 2001; Vincenzi et al., 2009). I carboni sono stati lasciati in immersione per una durata di 12-15 ore. La soluzione surnatante (eluato) è stata poi analizzata mediante Spettrofluorimetro JASCO FP6200.

2.5. PREPARAZIONE STANDARD DI RIFERIMENTO

Per ottenere degli spettri di riferimento per ogni tracciante sono state preparate in laboratorio delle soluzioni a concentrazione nota, utilizzando campioni in polvere delle stesse sostanze utilizzate presso il sito di prova. Nella seguente tabella sono riportate le soluzioni standard preparate per ciascun tracciante. Le concentrazioni sono state scelte tenendo conto del potere di fluorescenza dei singoli traccianti e dei limiti di rilevabilità dello strumento.

Tabella 3: Concentrazione delle soluzioni standard preparate in laboratorio.

Tracciante	Soluzione standard (ppb)	
Fluoresceina sodica	0.025	0.1
Sulforodamina G	1	10
Tinopal CBS-X	1	10

Di seguito sono riportati gli spettri di riferimento ottenuti analizzando le soluzioni standard preparate per ciascun tracciante.

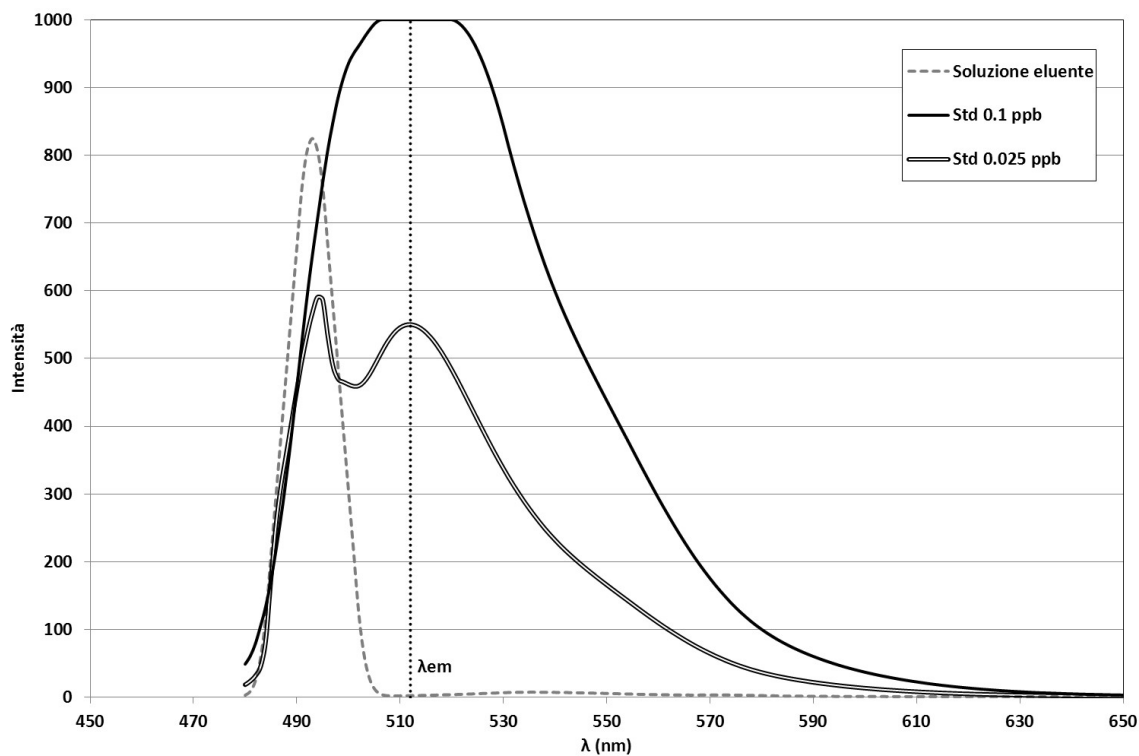


Figura 5: spettri di emissione delle soluzioni standard di Fluoresceina sodica (Std 0.1 ppb e Std 0.025 ppb) e della soluzione eluente pura.

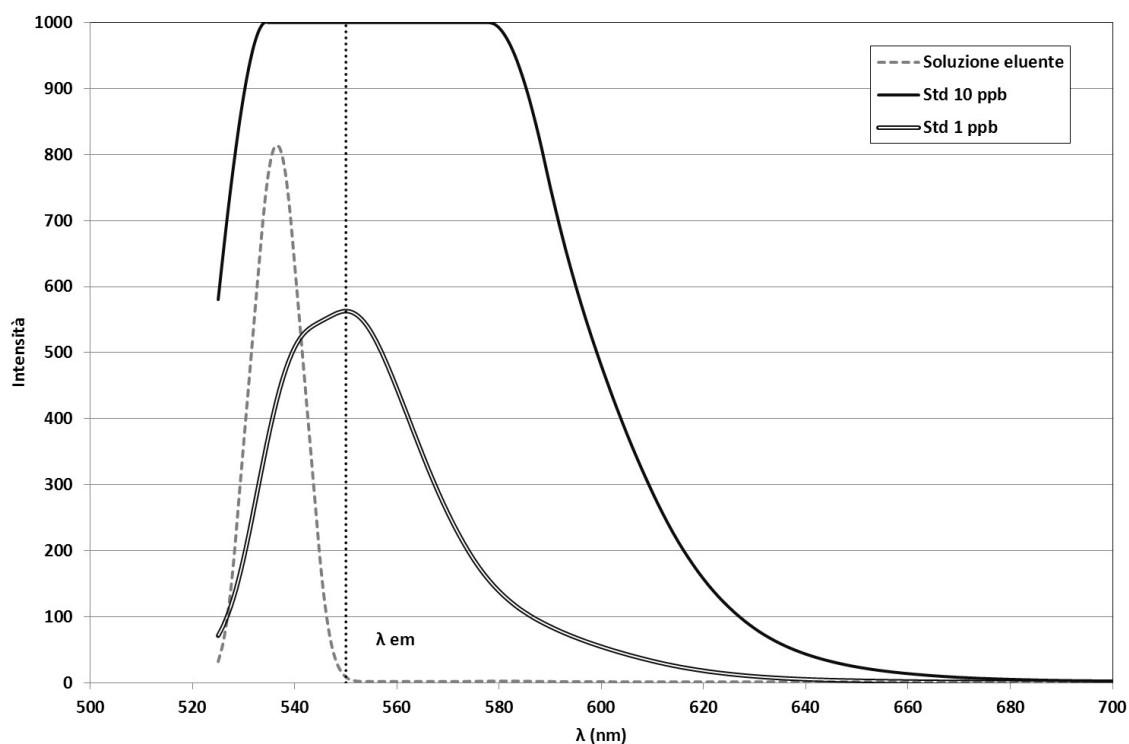


Figura 6: spettri di emissione delle soluzioni standard di Sulforodamina G (Std 10 ppb e Std 1 ppb) e della soluzione eluente pura.

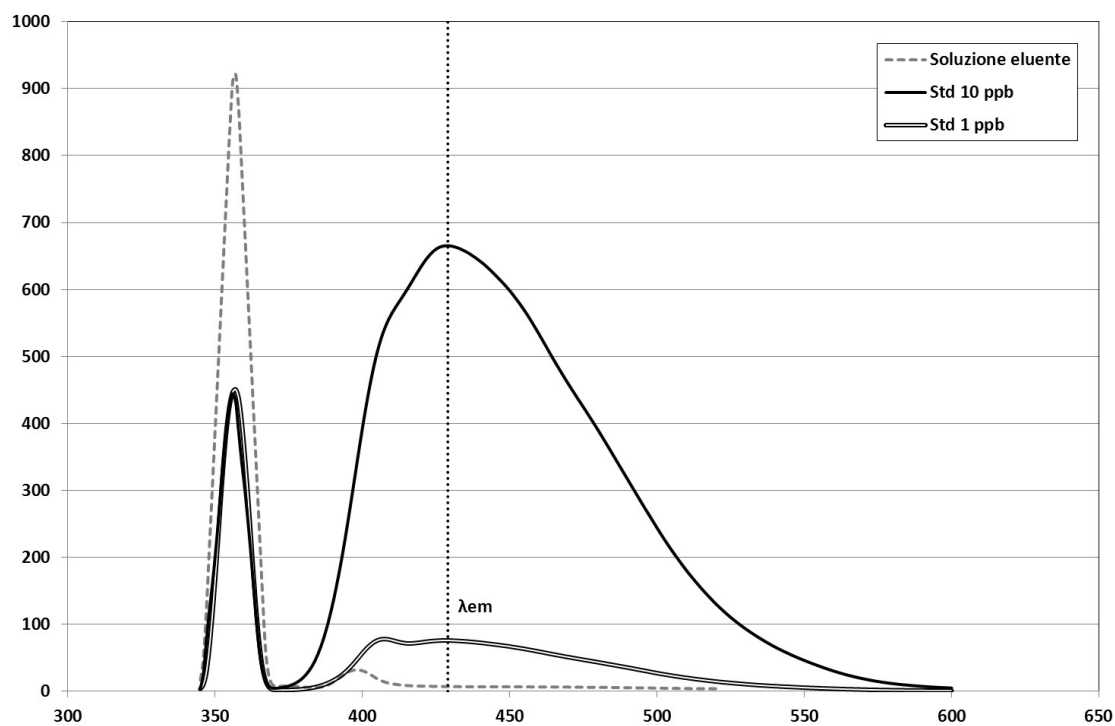


Figura 7: spettri di emissione delle soluzioni standard di Tinopal CBS-X (Std 10 ppb e Std 1 ppb) e della soluzione eluente pura.

3. RISULTATI

3.1. FLUORESCEINA SODICA

I valori dell'intensità di fluorescenza misurata in corrispondenza della λ_{em} :512 nm tipica della Fluoresceina sodica sono riportati nella tabella 4. Nelle soluzioni standard analizzate sono stati rilevati i seguenti valori di intensità di fluorescenza:

- Fuori scala >999.9 (soluzione 0.1 ppb);
- 550.1 (soluzione 0.025 ppb).

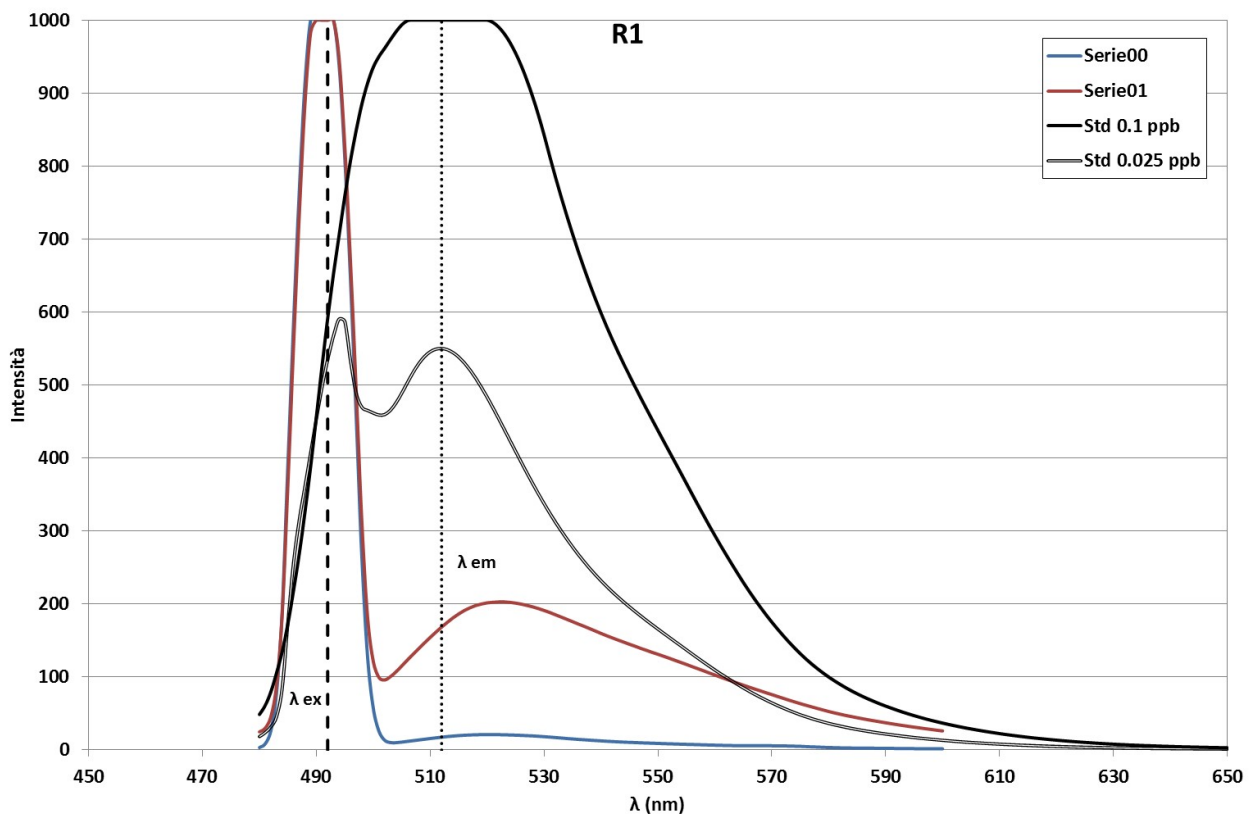
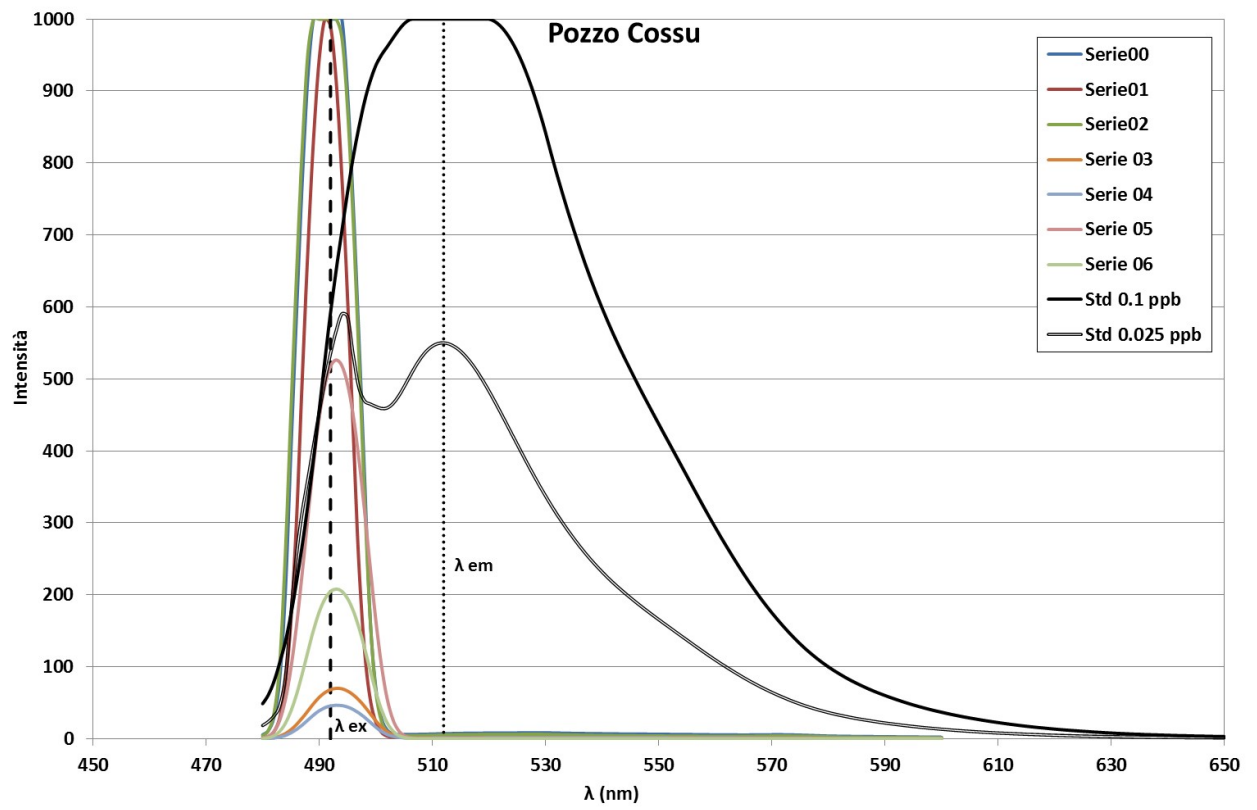
Tabella 4: Valori di intensità di fluorescenza misurati in corrispondenza della λ_{em} :512 nm.

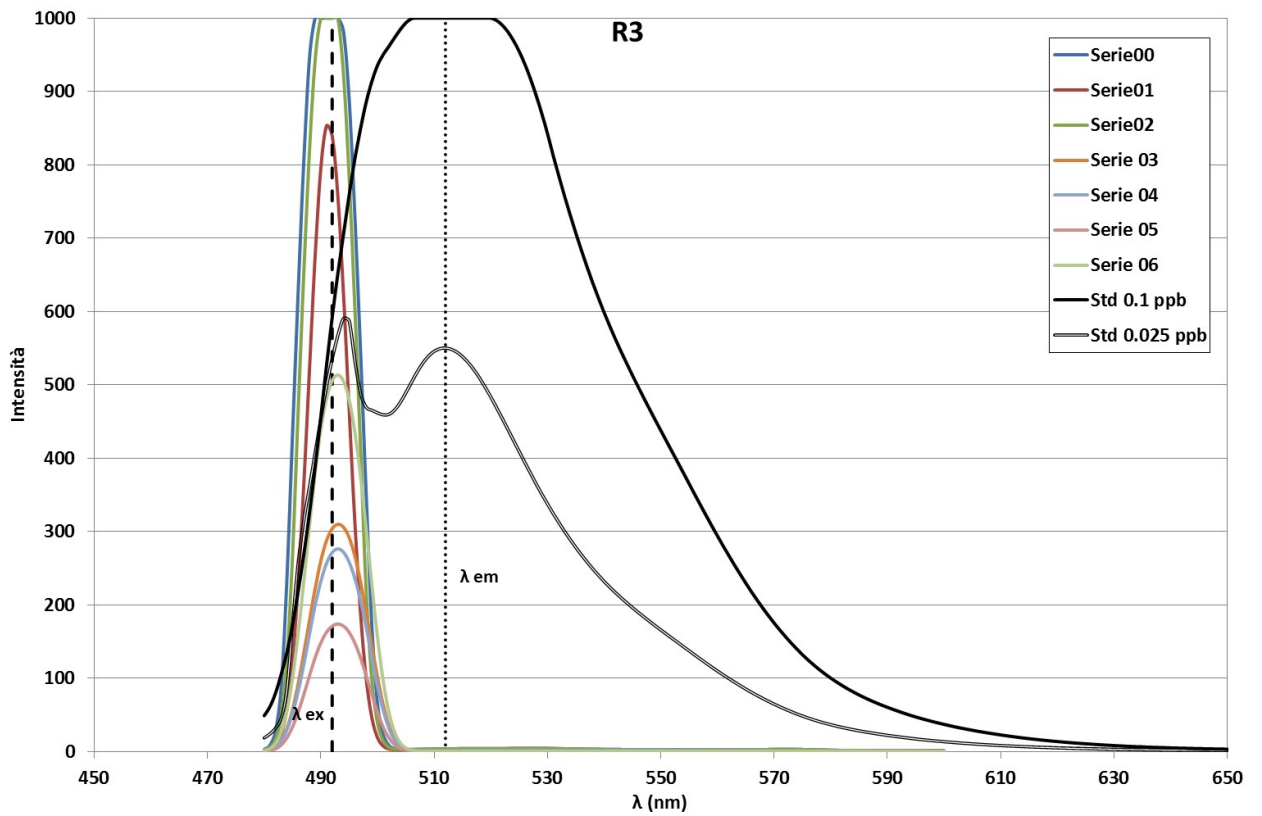
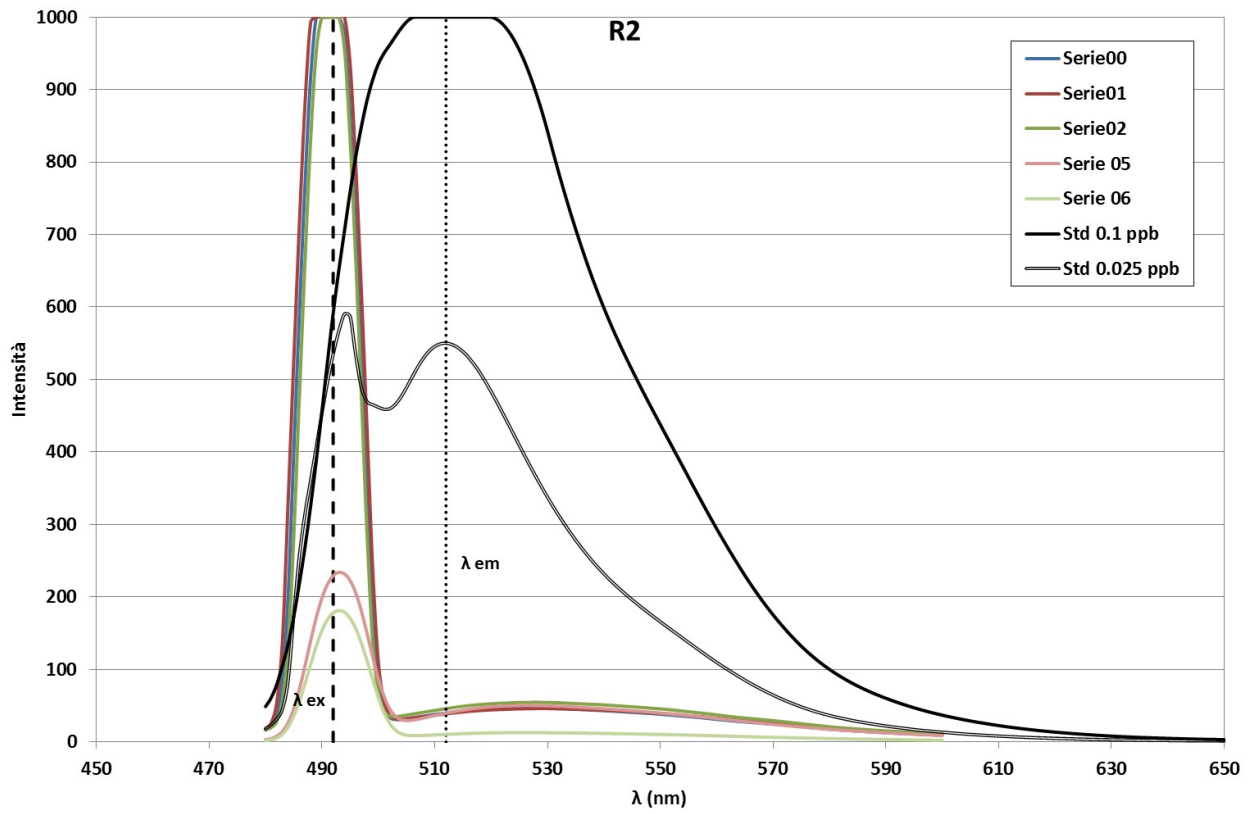
Campione	Intensità di fluorescenza						
	Serie 00	Serie 01	Serie 02	Serie 03	Serie 04	Serie 05	Serie 06
Pozzo Cossu	7.1	2.9	5.4	1.2	1.2	0.4	0.2
R1	17.7	168.5	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.
R2	40.1	38.7	45.9	8.7	7.1	39.7	10.5
R3	3.5	3.2	3.5	0.8	1.2	0.2	0.3
R4	3.8	3.7	3.0	1.0	0.6	0.3	0.5
R5	4.5	4.1	5.0	1.5	1.2	0.2	0.2
R6	n.r.	4.5	n.r.	1.4	1.0	0.2	0.2
S1	5.2	4.2	n.r.	1.4	1.6	0.4	0.2
S2	7.6	20.8	16.7	1.2	1.1	1.1	1.0
S3	4.0	4.3	5.3	1.4	1.3	0.3	0.3
S4	4.9	5.1	4.6	1.4	1.4	n.r.	0.2
S9	80.7	245.5	124.5	5.6	10.7	20.7	27.0

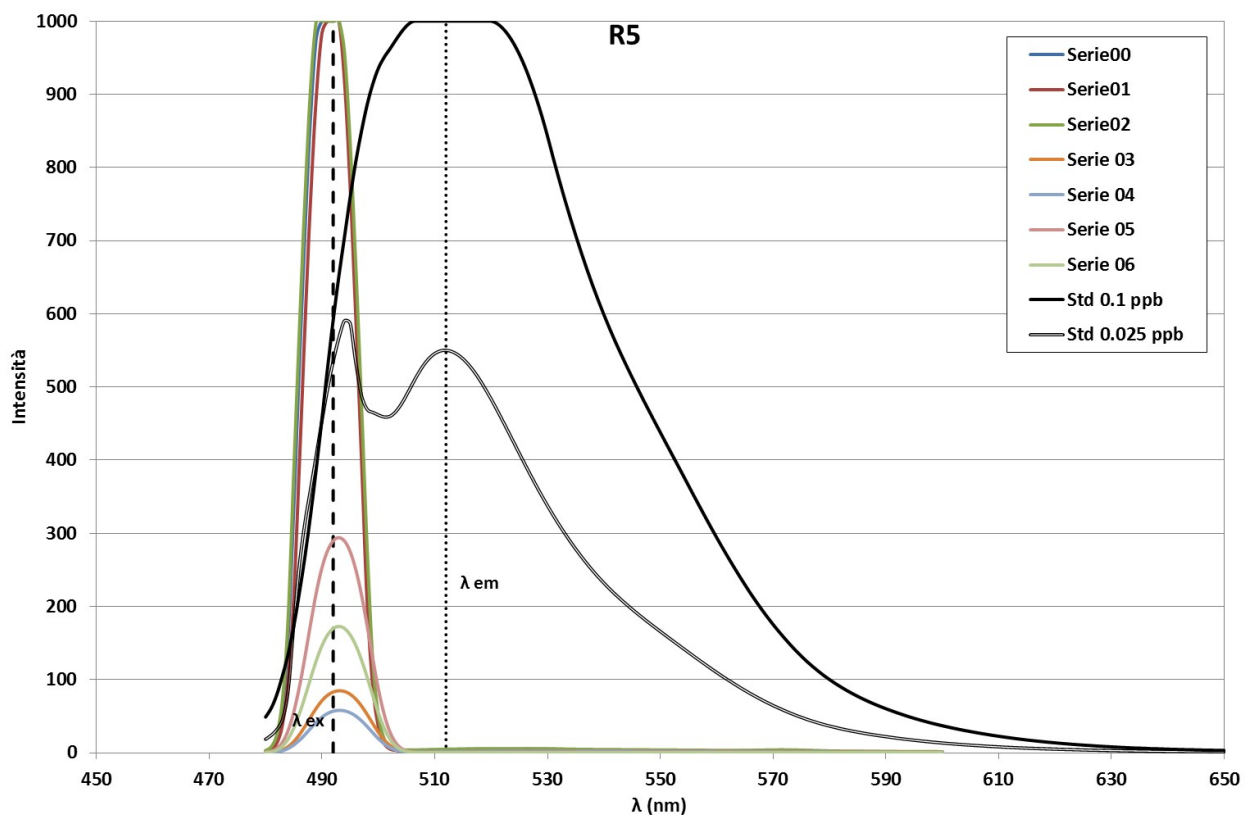
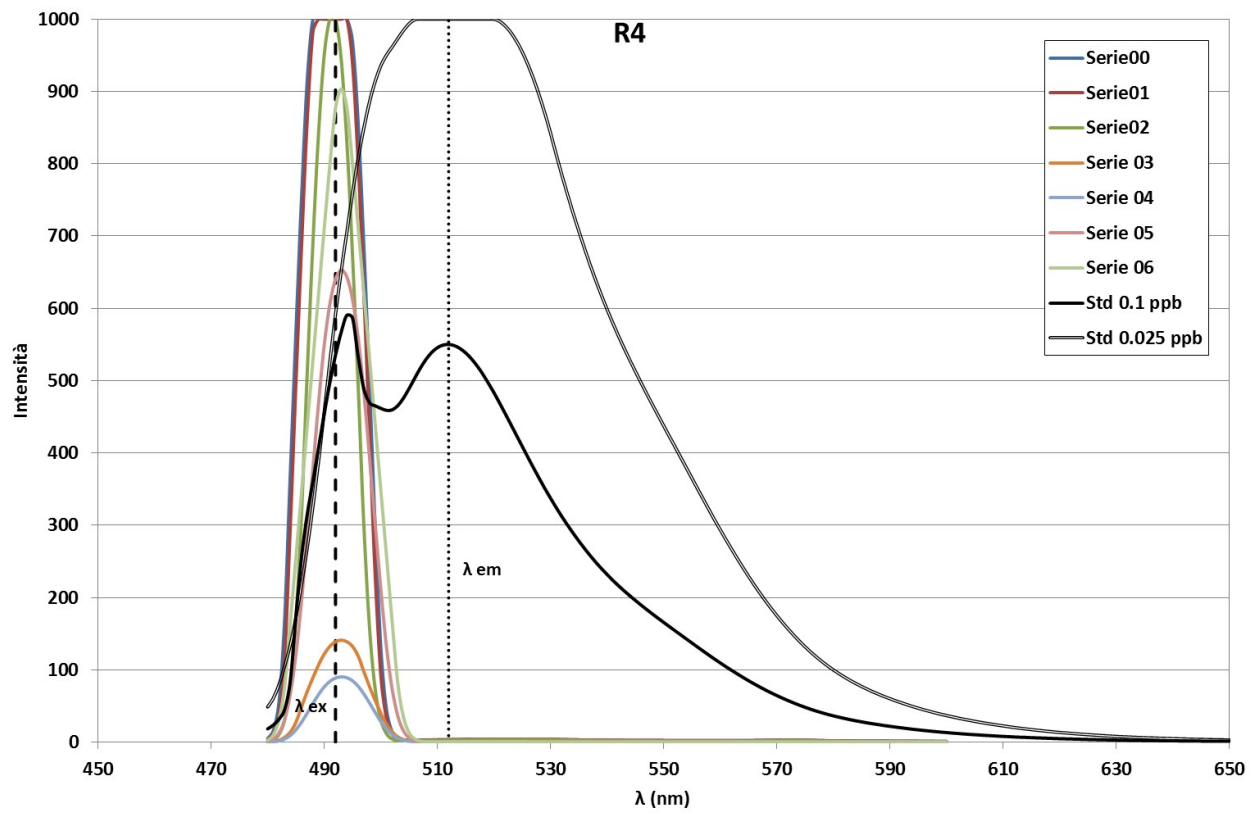
Campione	Intensità di fluorescenza						
	Serie 00	Serie 01	Serie 02	Serie 03	Serie 04	Serie 05	Serie 06
S26	4.4	5.6	4.1	1.4	1.3	0.2	0.2
S28	4.8	5.0	4.7	1.2	1.1	0.3	0.2
S29	8.3	6.6	7.9	1.2	1.5	0.4	0.4
S30	3.5	4.1	3.5	1.4	0.8	0.4	0.2
S31	n.r.	3.4	3.7	1.5	1.4	0.1	0.2
S32	4.1	5.3	4.0	0.9	1.2	0.4	0.3
S34	3.8	3.6	3.4	1.3	1.0	0.2	0.2
c'	12.8	90.6	79.9	2.6	3.5	3.6	9.8
Pozzo Mise	27.0	64.3	121.0	6.9	3.3	2.0	1.6
Sorgente	3.3	3.2	2.2	n.r.	n.r.	0.3	n.r.

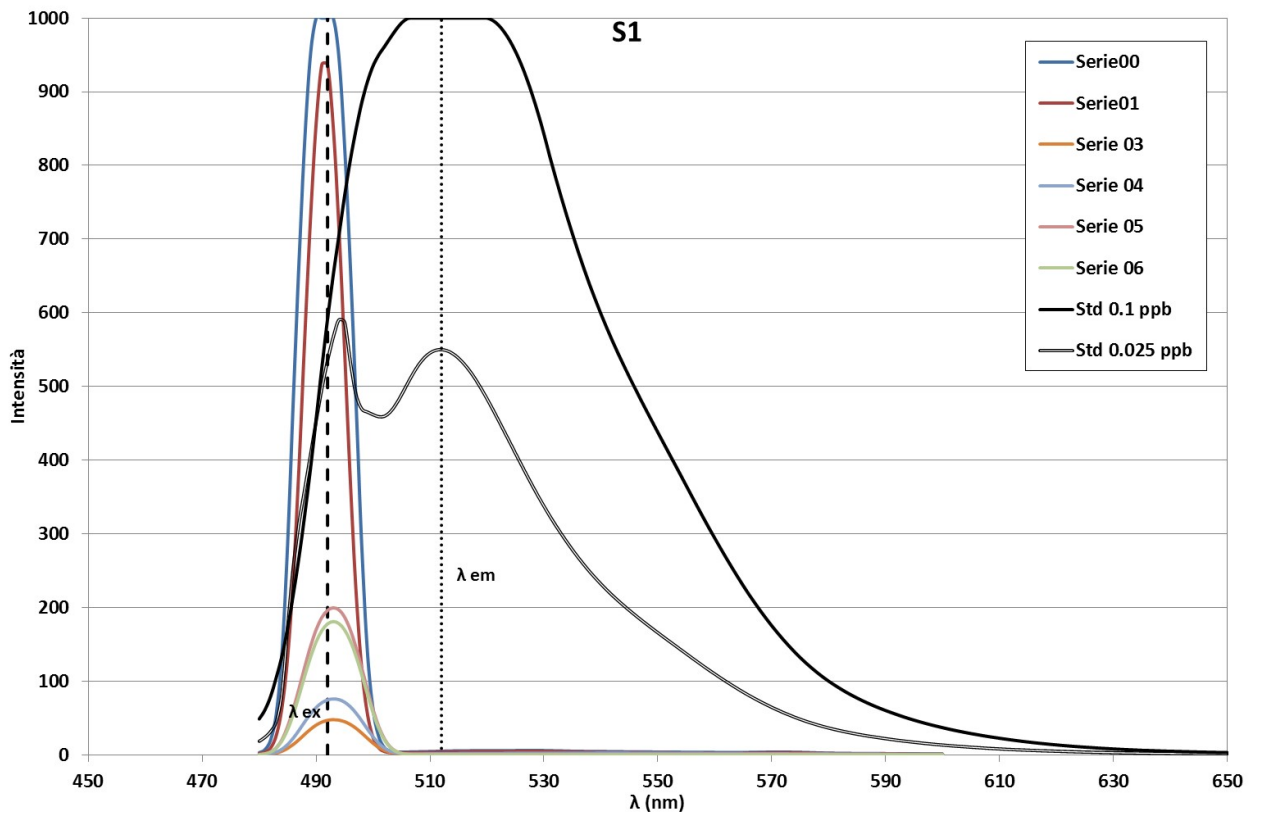
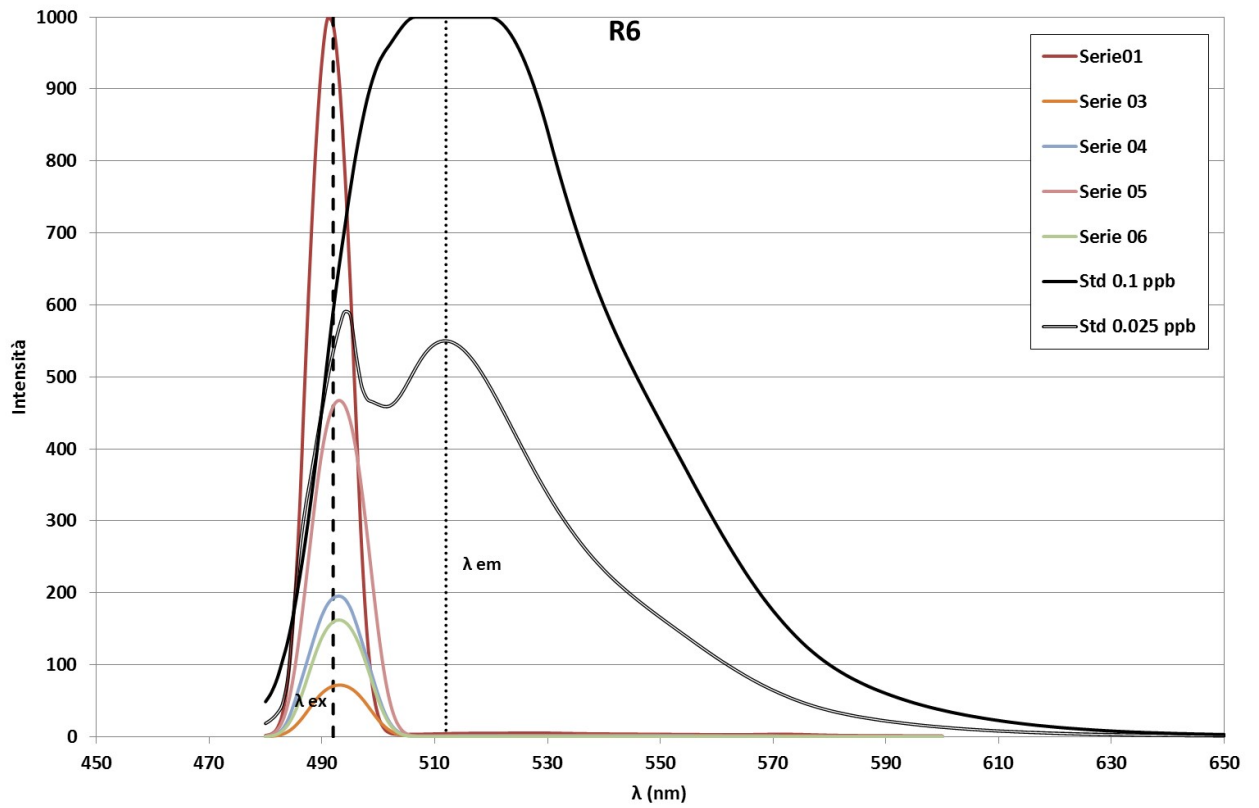
n.r.: campione non recuperato.

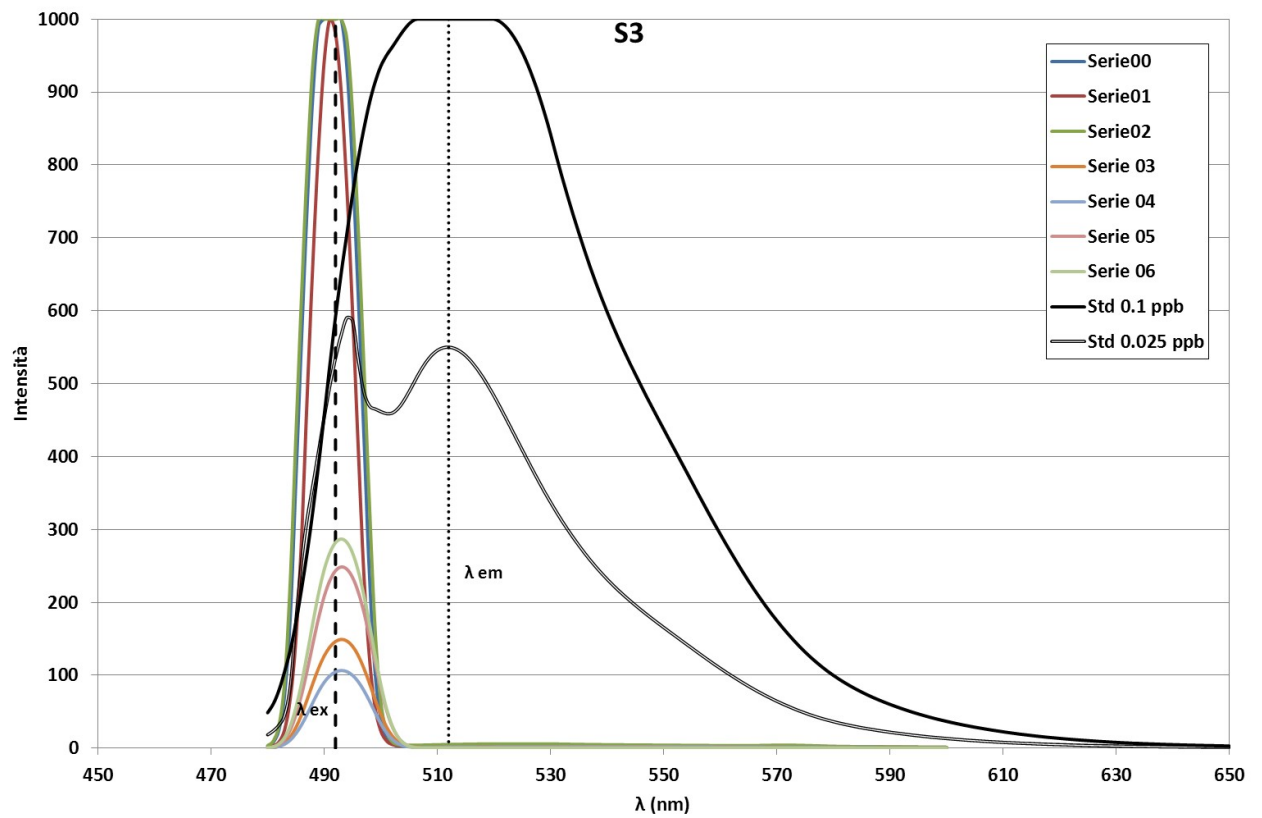
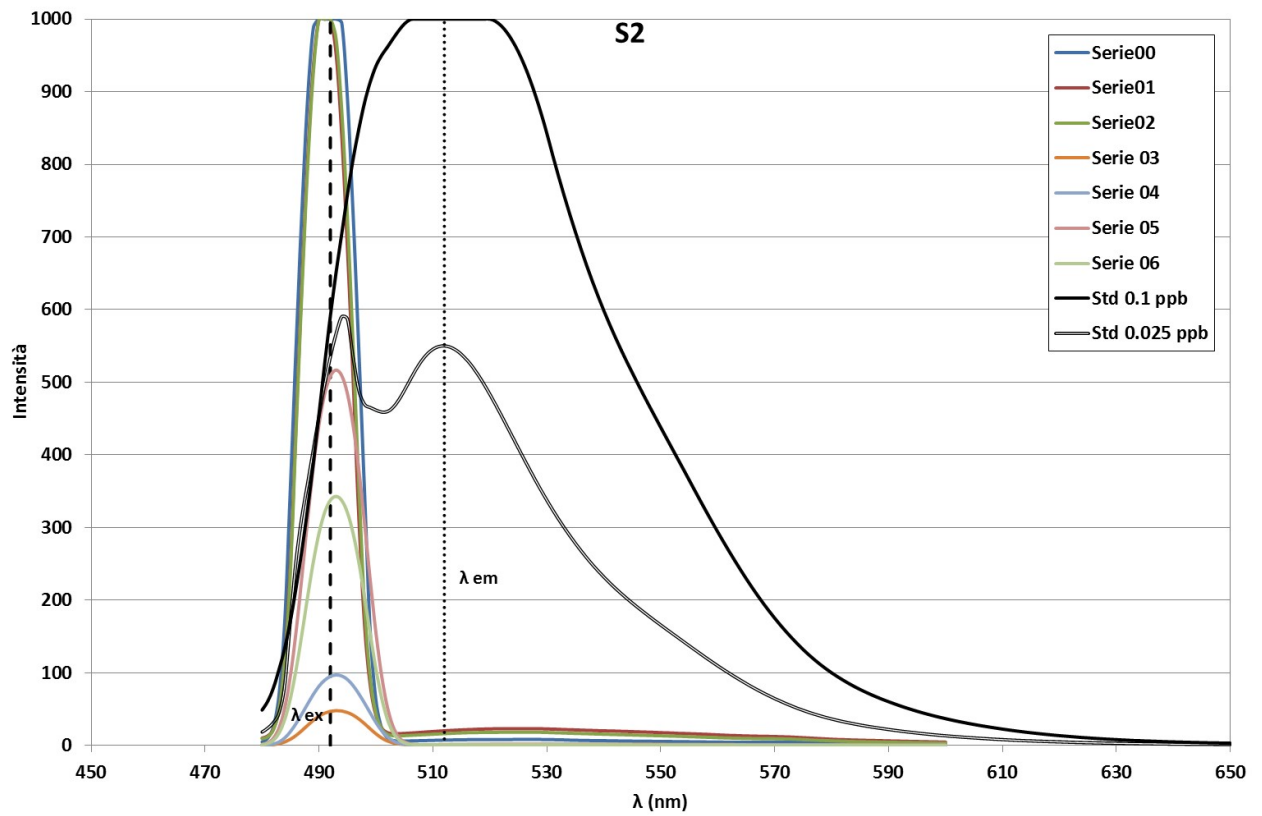
Di seguito sono riportati gli spettri di emissione ottenuti per la Fluoresceina sodica nei diversi punti di campionamento e per le serie disponibili. Nei grafici sono stati inseriti, per confronto, anche gli spettri di emissione ottenuti dall'analisi delle soluzioni standard a concentrazione 0.025 ppb e 0.1 ppb.

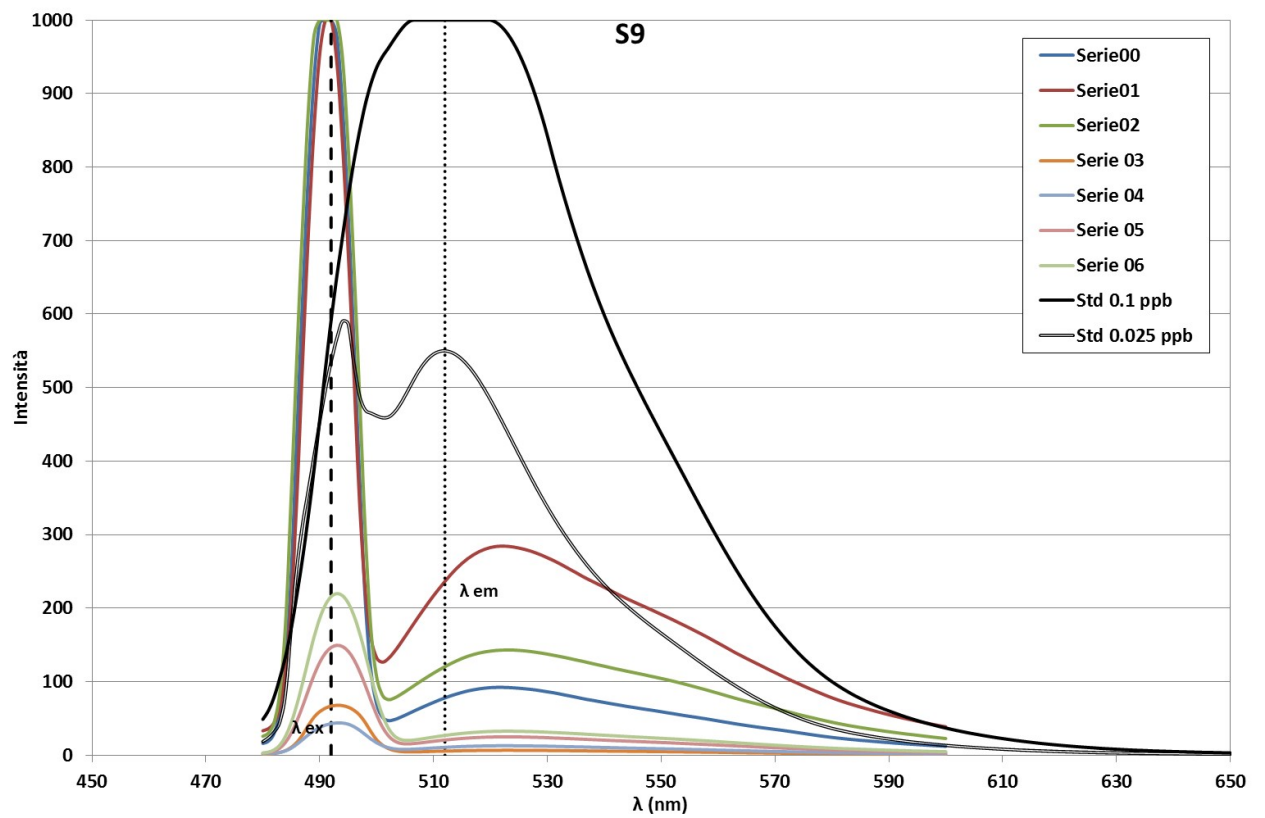
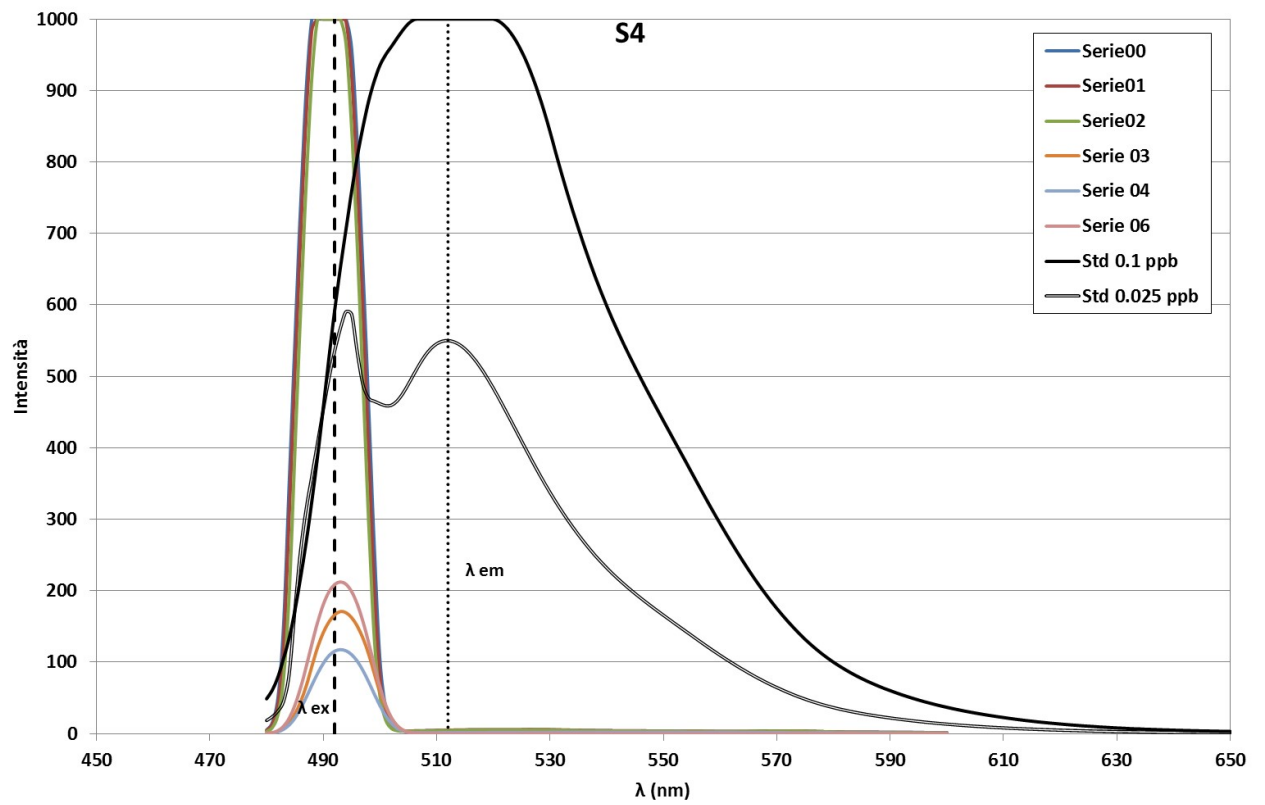


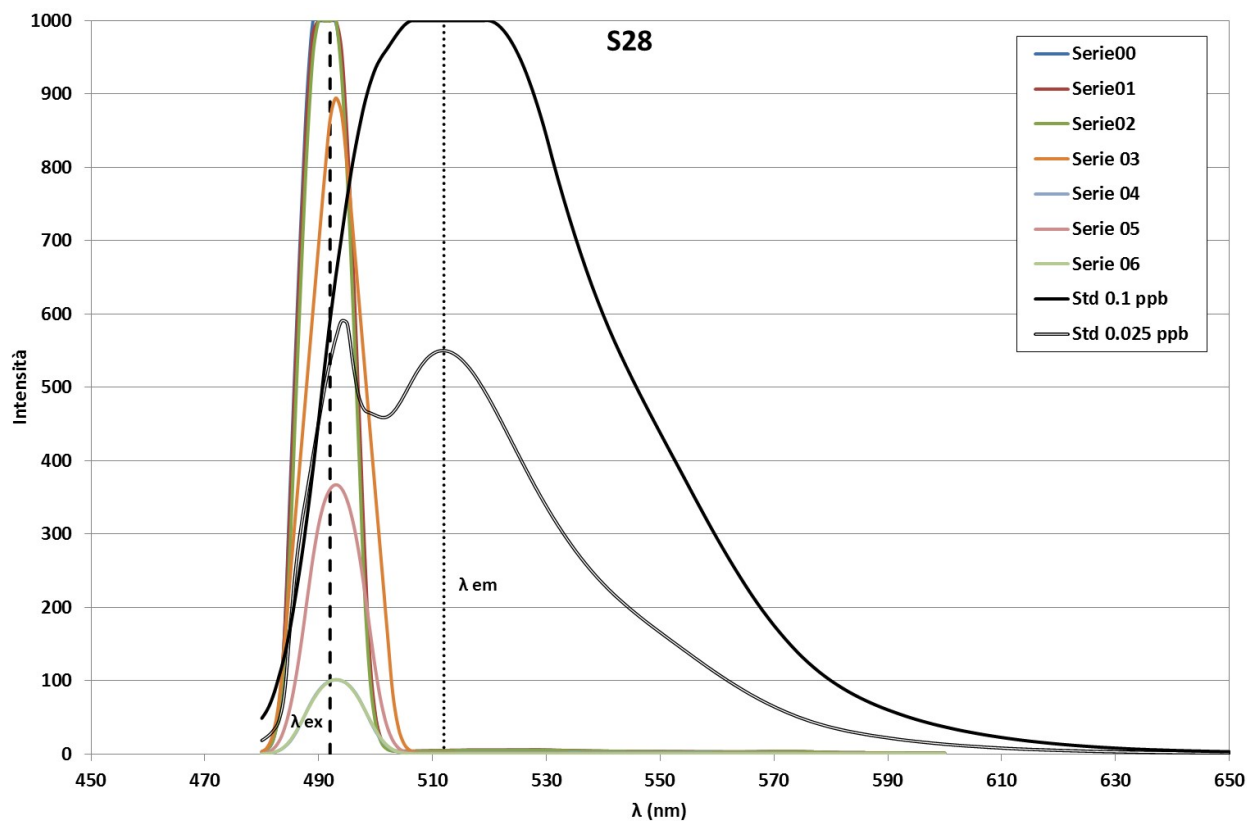
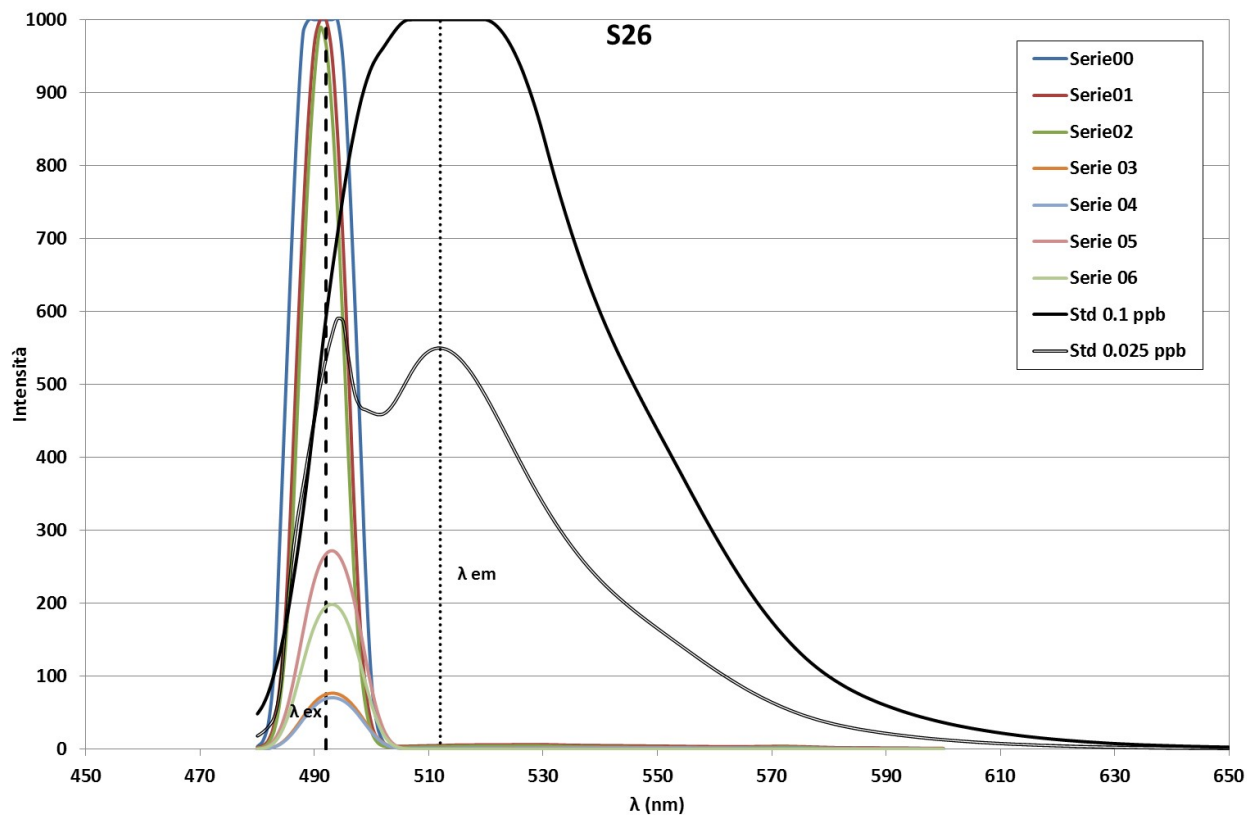


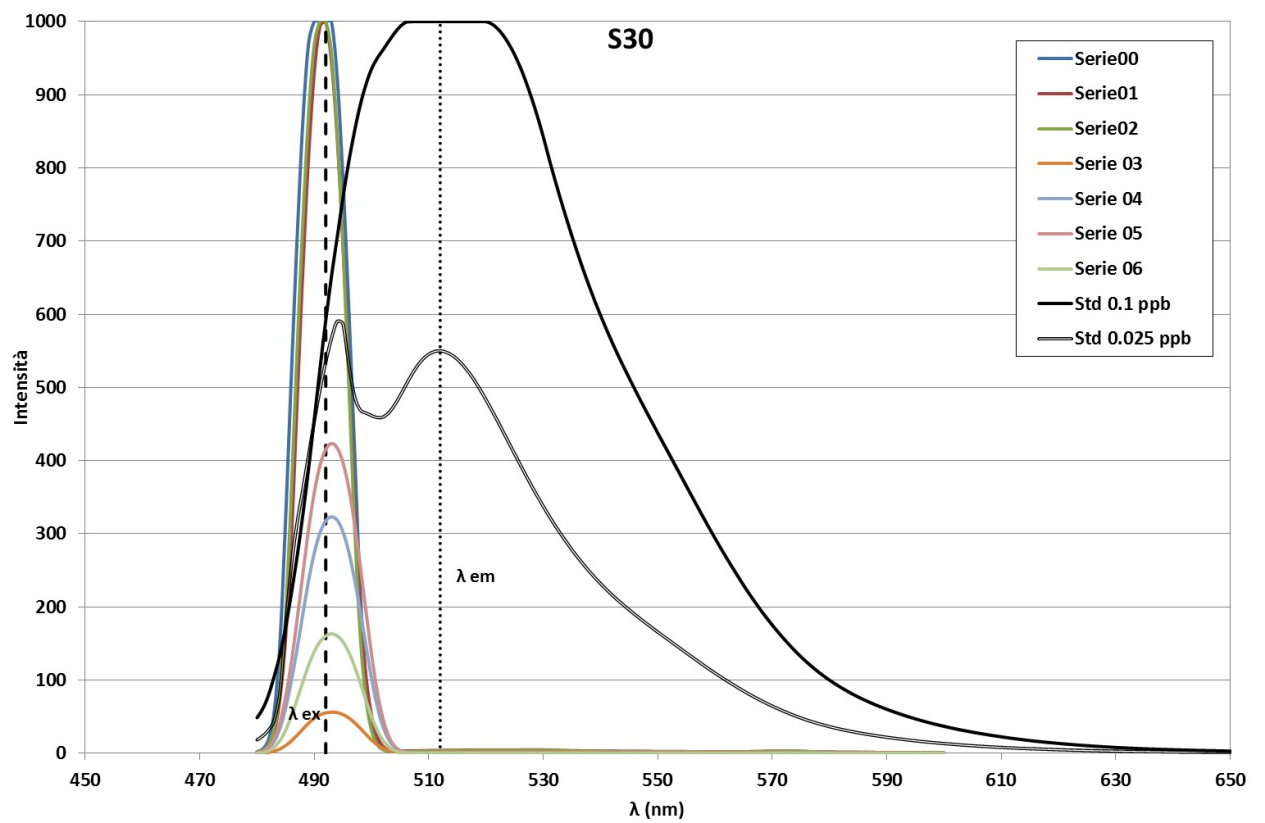
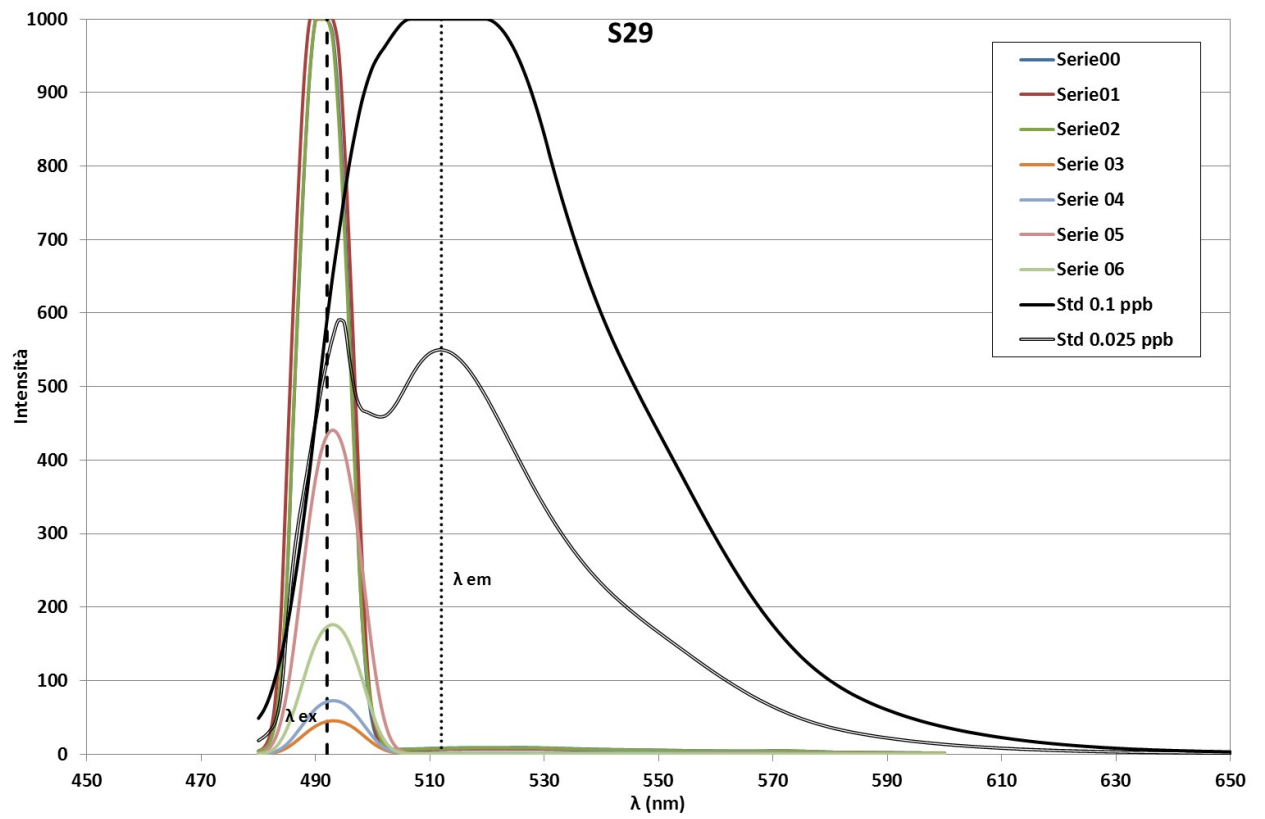


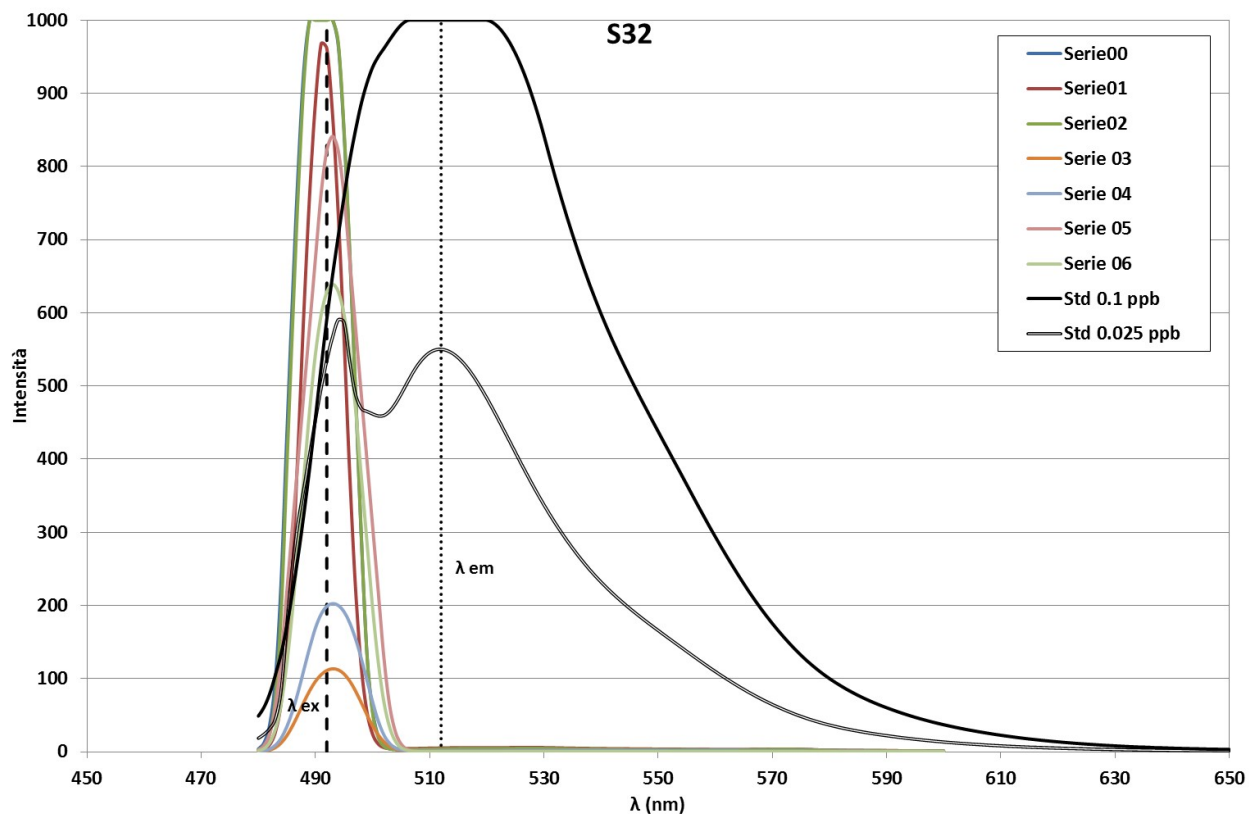
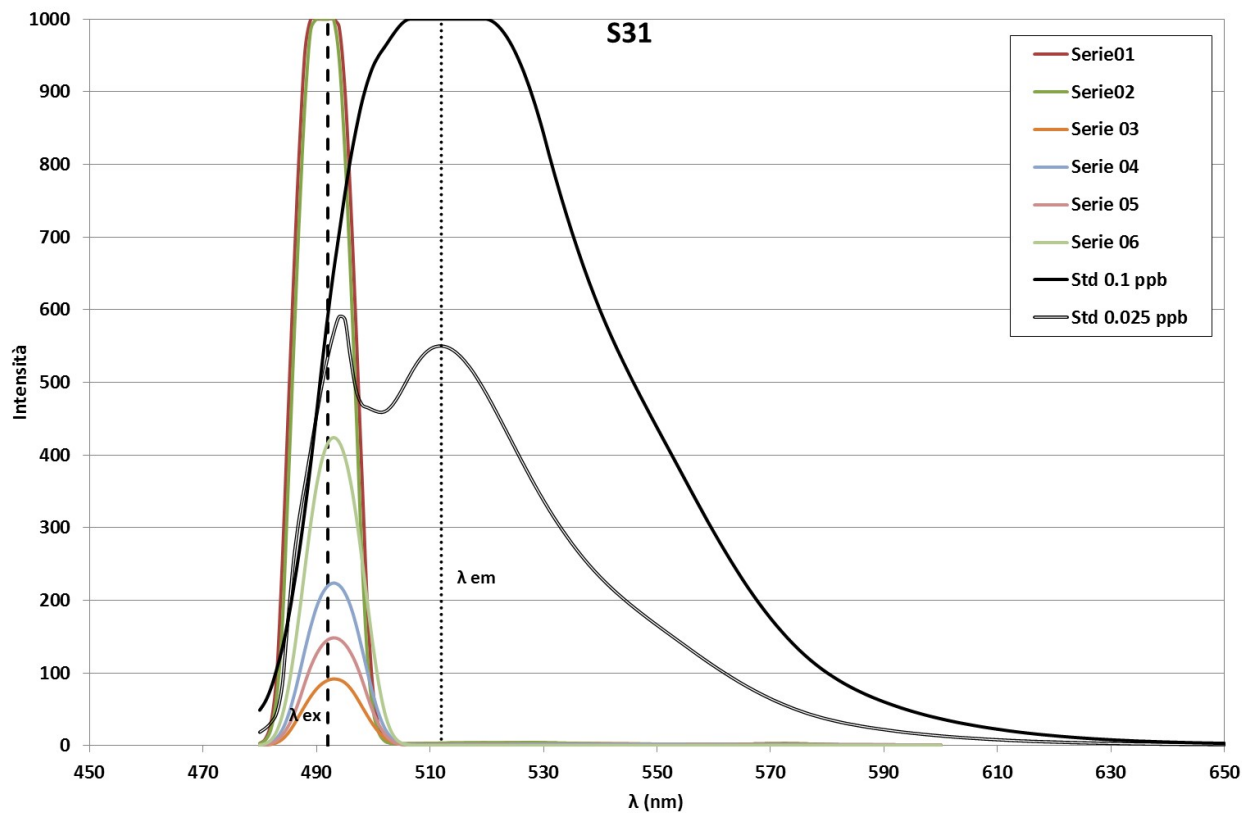


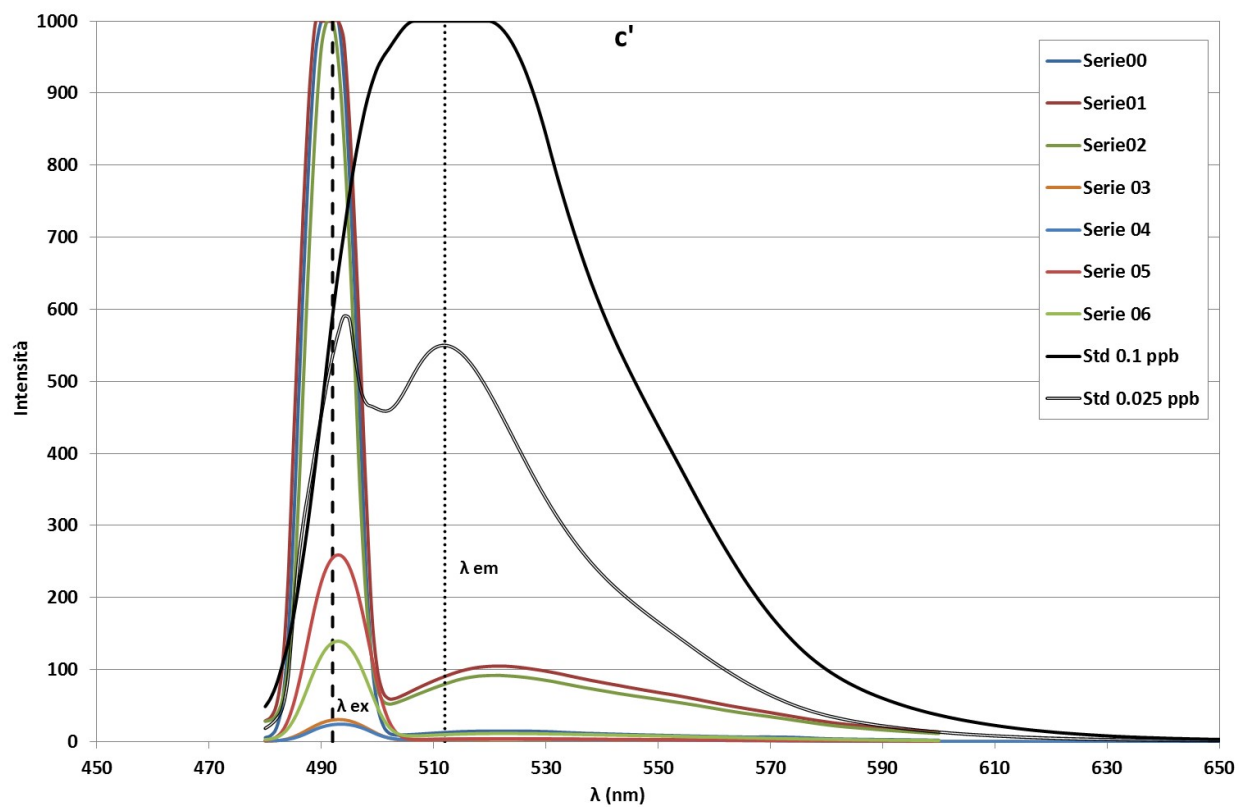
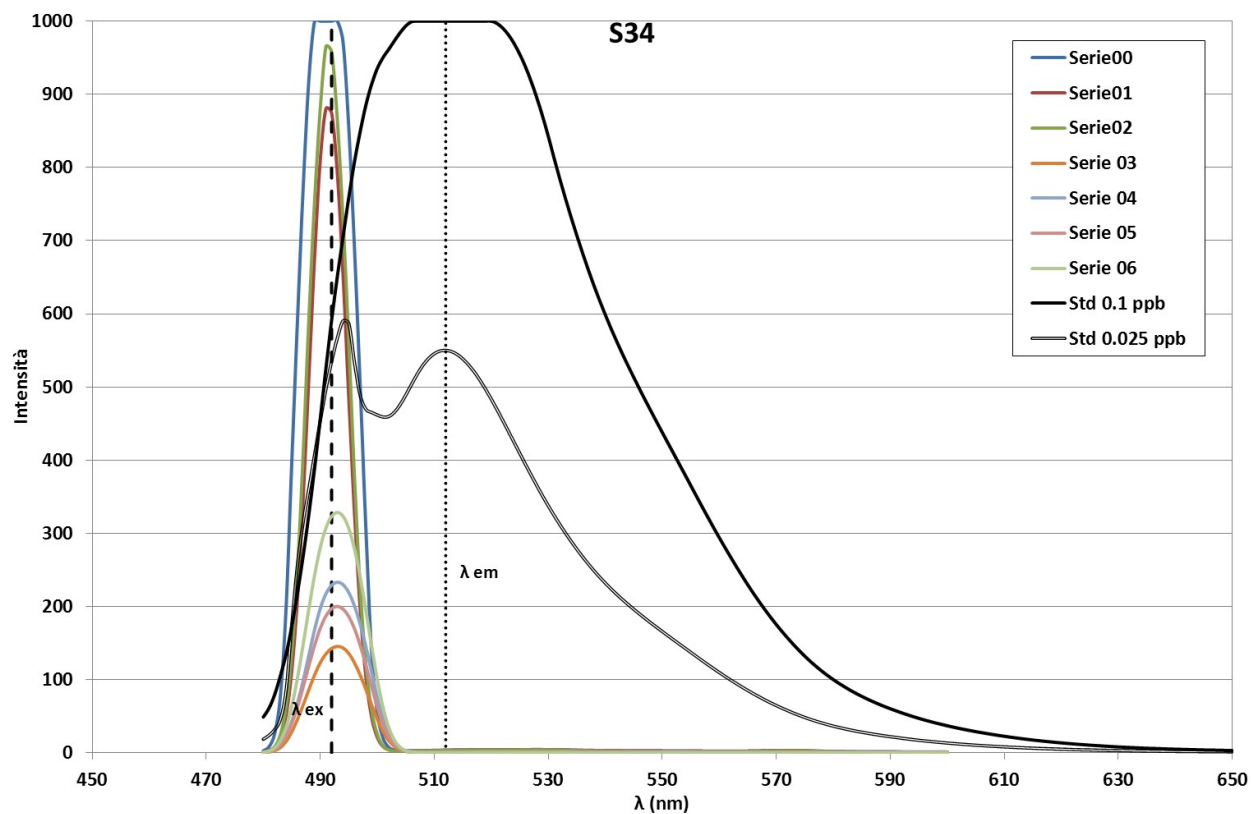


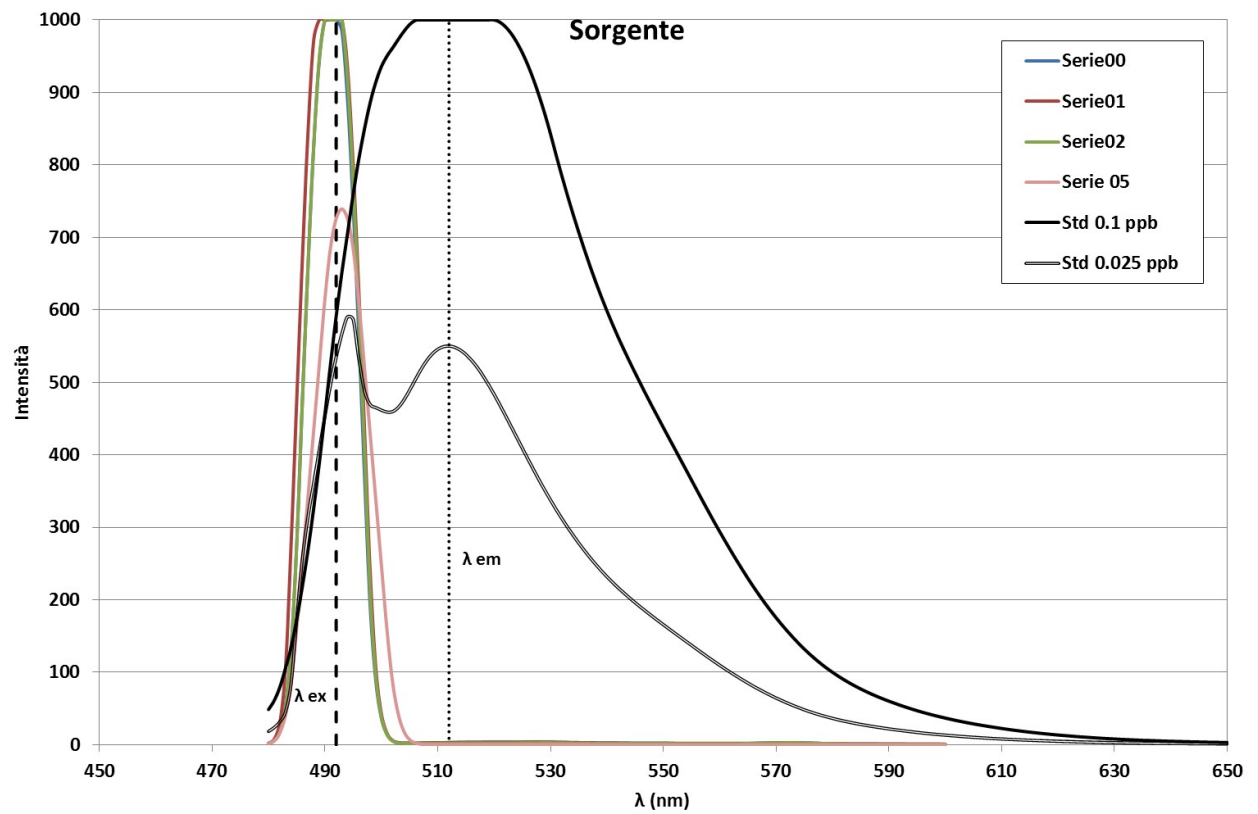
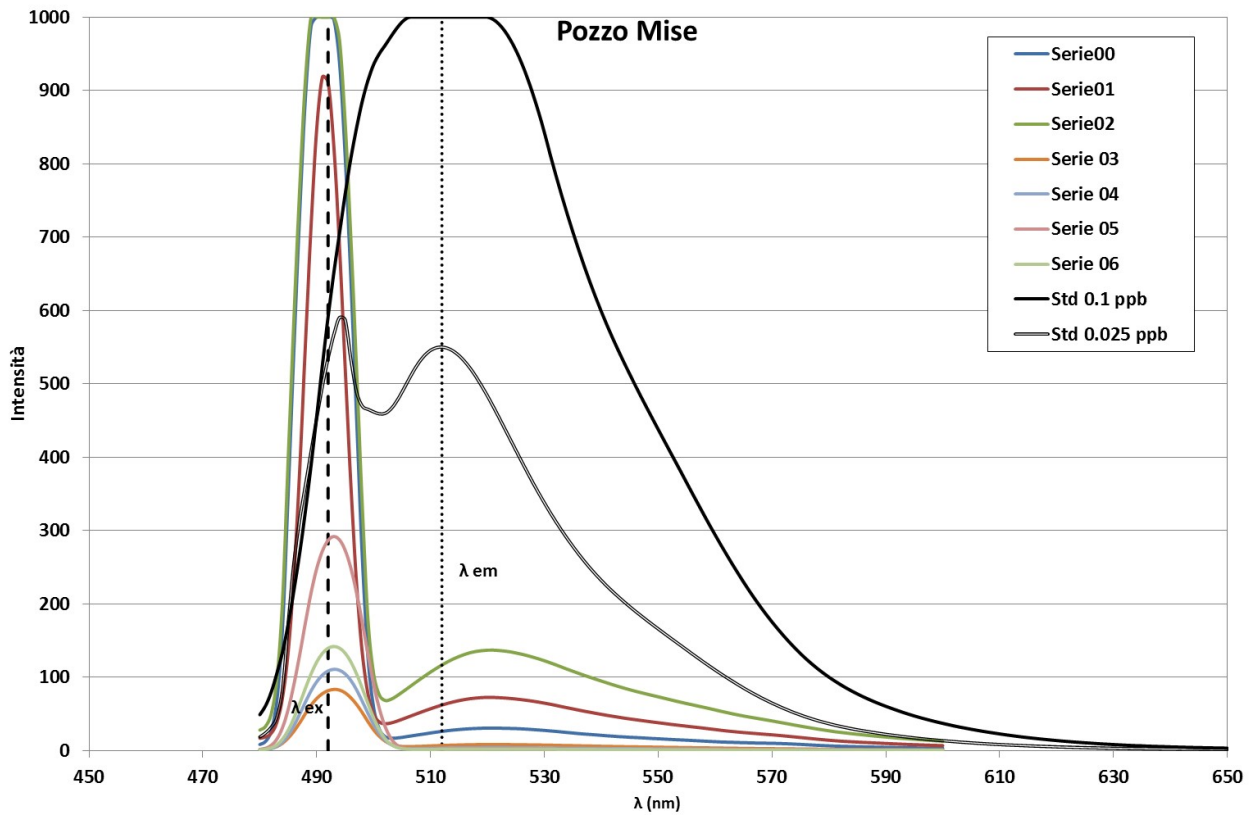












3.2. SULFORODAMINA G

I valori dell'intensità di fluorescenza misurata in corrispondenza della λ_{em} : 550 nm tipica della Sulforodamina G sono riportati nella tabella 5. Nelle soluzioni standard analizzate sono stati rilevati i seguenti valori di intensità di fluorescenza:

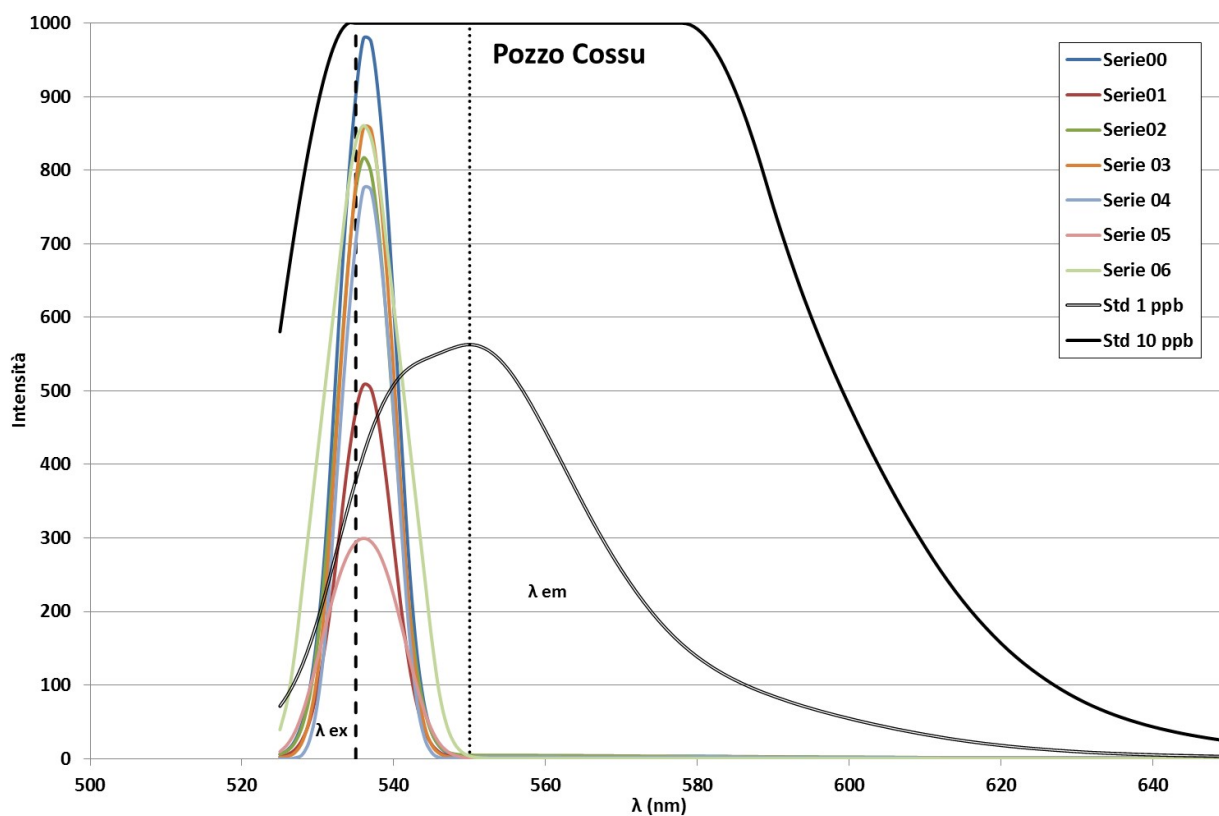
- Fuori scala >999.9 (soluzione 10 ppb);
- 563.0 (soluzione 1 ppb).

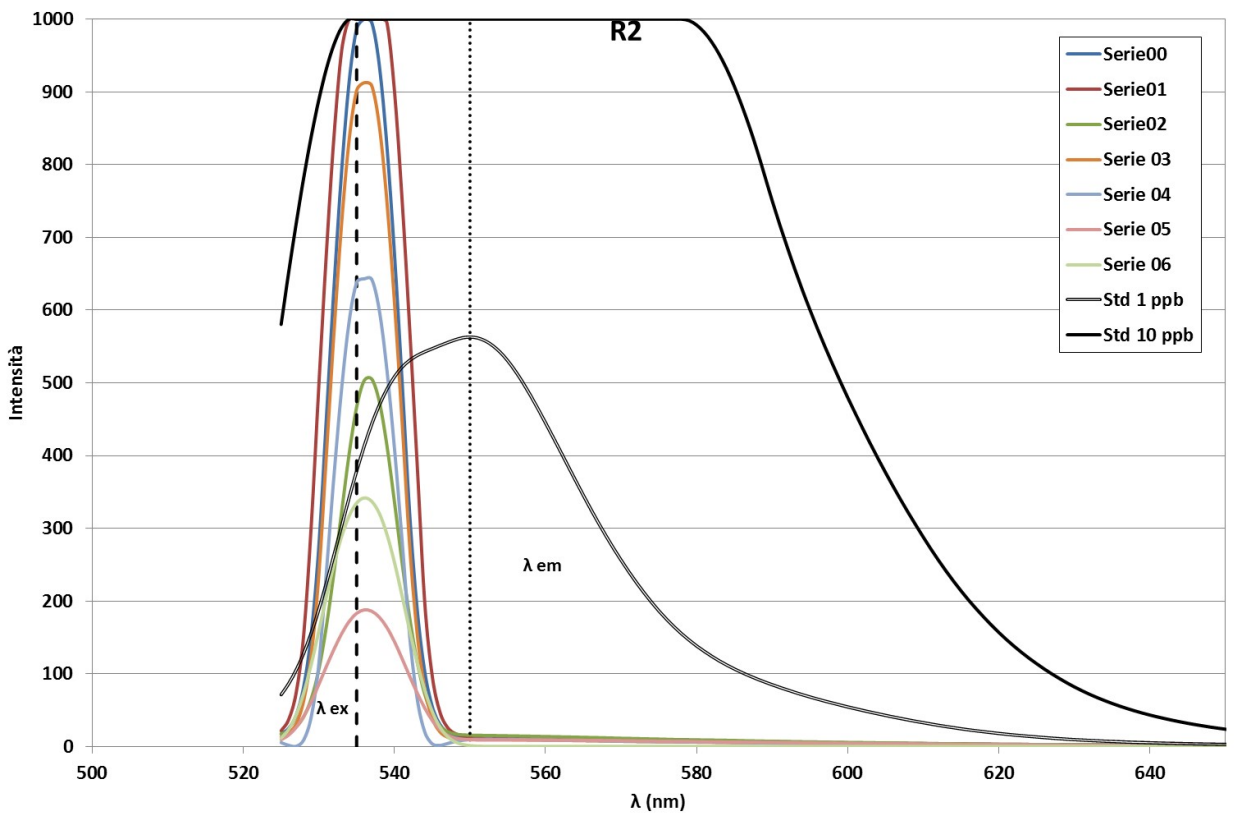
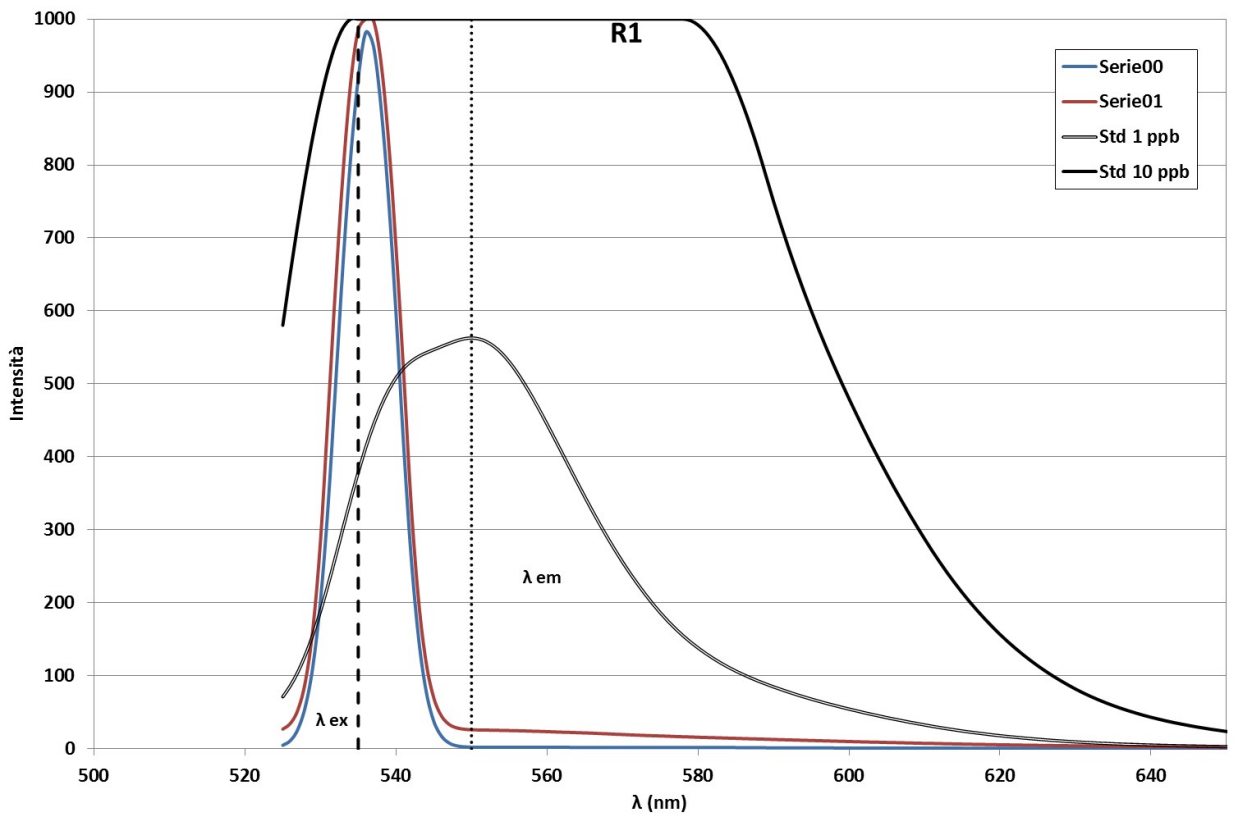
Tabella 5: Valori di intensità di fluorescenza misurati in corrispondenza della λ_{em} :550 nm.

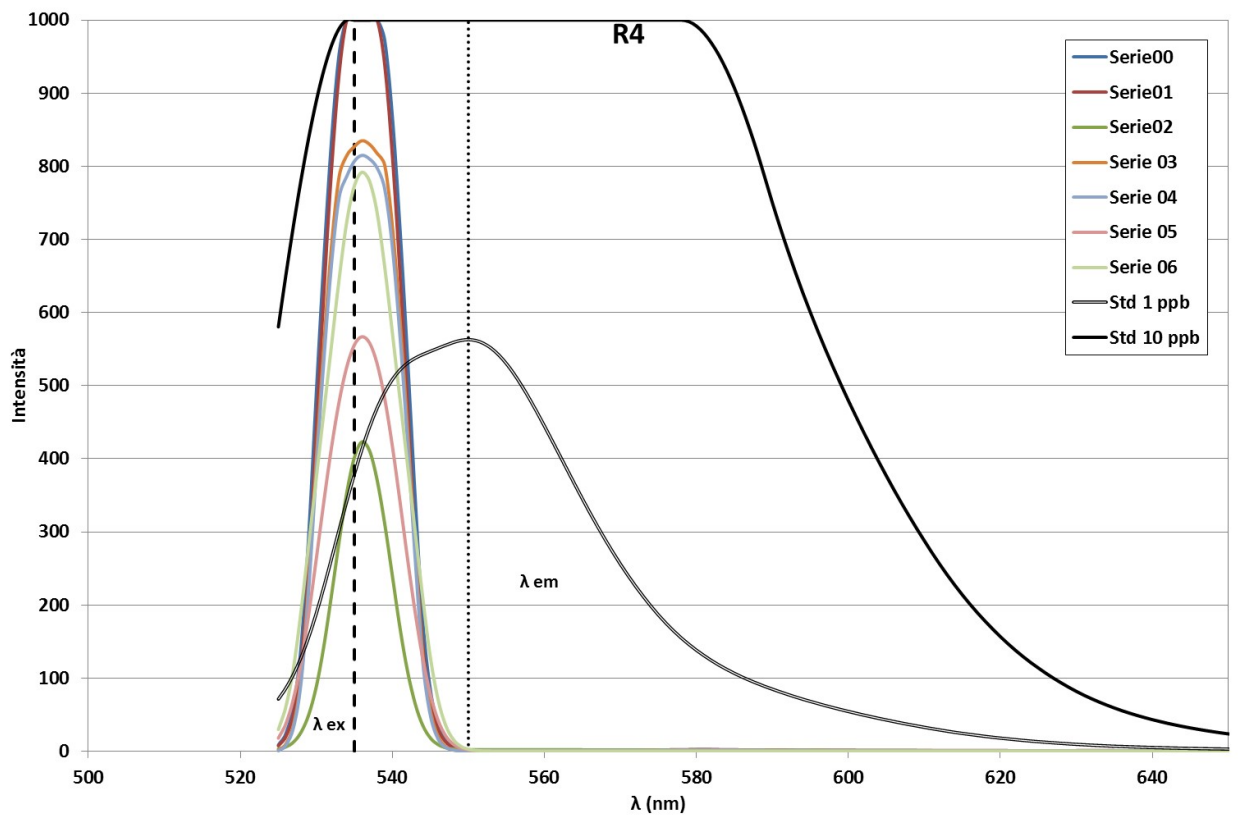
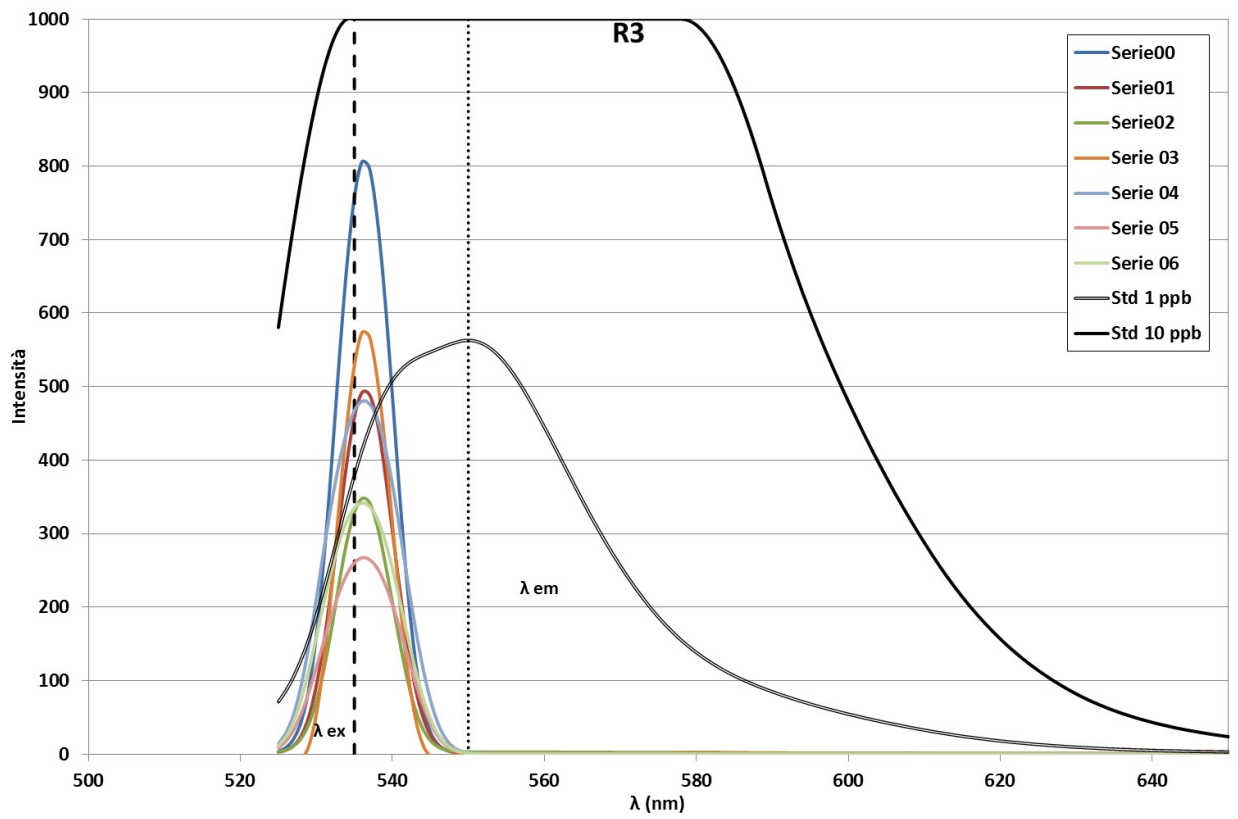
Campione	Intensità di fluorescenza						
	Serie 00	Serie 01	Serie 02	Serie 03	Serie 04	Serie 05	Serie 06
Pozzo Cossu	3.0	1.1	4.5	2.1	2.0	1.0	3.5
R1	2.1	25.0	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.
R2	11.8	13.0	14.7	9.9	9.5	9.3	1.2
R3	1.4	1.5	2.9	0.2	2.0	1.0	1.2
R4	1.5	1.7	2.1	0.5	0.8	1.7	2.7
R5	1.4	1.9	7.0	0.3	0.1	1.4	0.9
R6	n.r.	1.9	n.r.	1.9	1.6	0.7	0.5
S1	1.8	1.7	n.r.	0.6	0.3	0.9	0.4
S2	2.5	6.7	5.5	1.4	1.3	1.2	0.7
S3	1.7	2.2	7.7	6.2	6.7	0.6	1.1
S4	2.2	2.0	5.6	4.4	4.3	n.r.	4.1
S9	14.1	46.9	27.5	12.7	11.6	4.8	8.4
S26	1.8	2.2	4.3	1.2	1.2	0.5	0.4
S28	1.7	1.8	4.3	2.8	0.8	0.8	0.4
S29	2.4	2.2	4.1	1.7	1.9	1.1	0.5
S30	1.3	1.4	4.6	1.3	1.3	1.2	0.3
S31	n.r.	1.3	4.2	1.6	1.8	2.9	0.6
S32	1.9	1.8	4.9	2.2	4.0	1.3	2.2
S34	1.8	1.5	2.4	1.5	1.1	1.3	0.5
c'	3.4	21.7	18.4	2.5	2.4	1.7	4.3
Pozzo Mise	4.3	8.8	14.6	4.8	4.9	1.1	0.9
Sorgente	1.4	1.2	3.7	n.r.	n.r.	2.3	n.r.

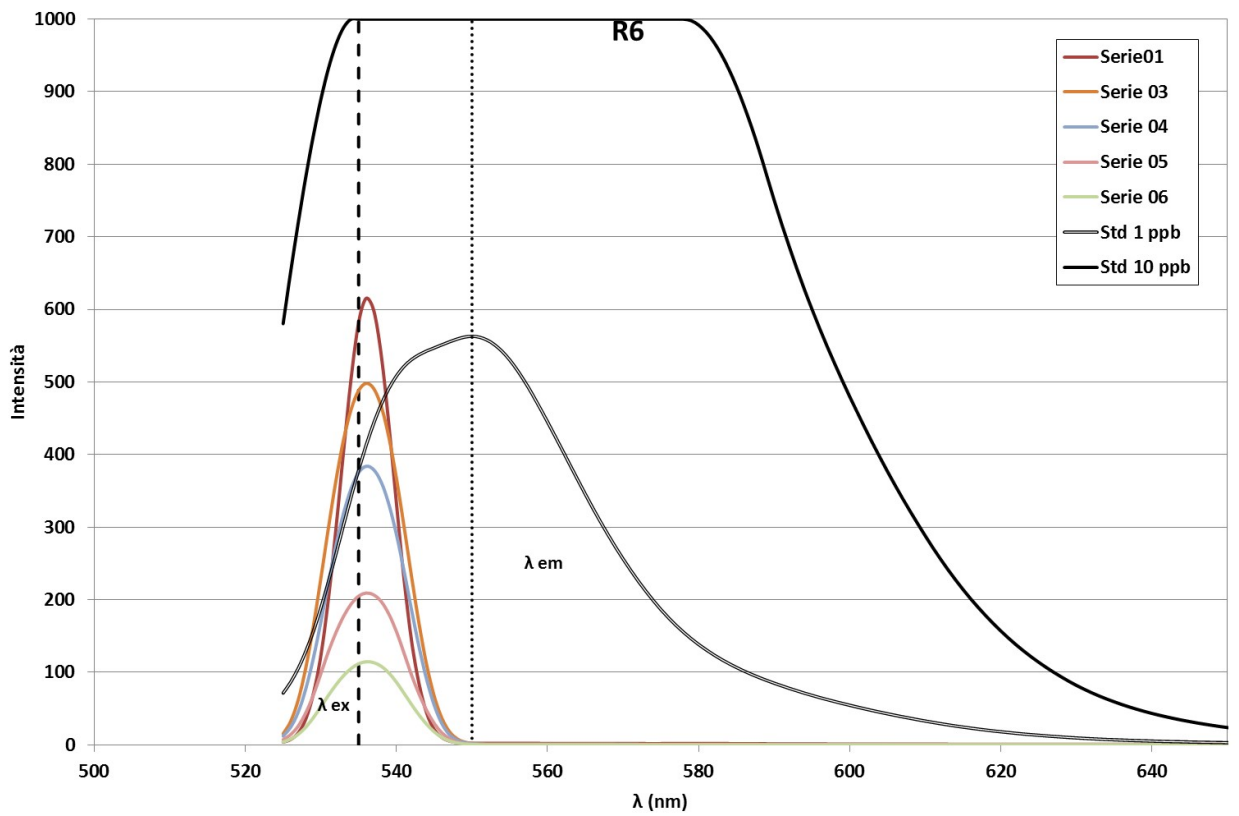
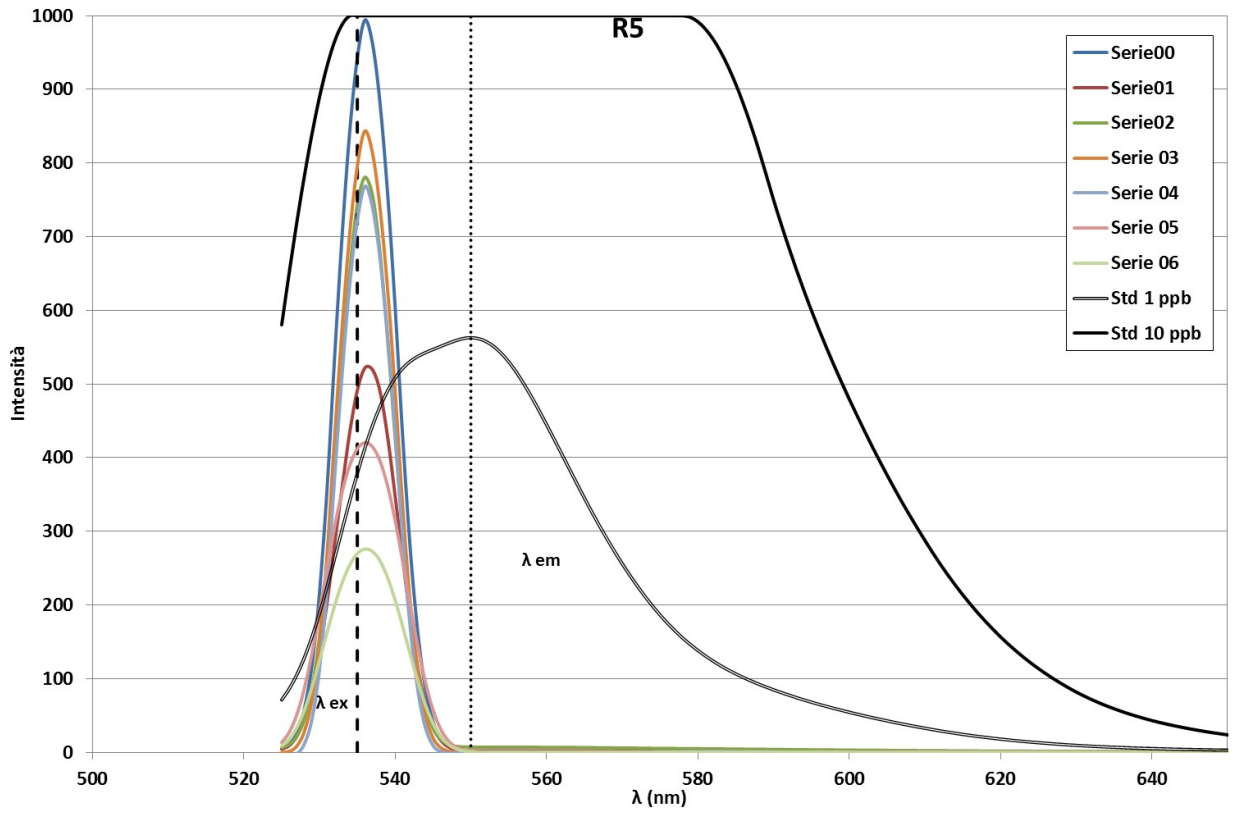
n.r.: campione non recuperato.

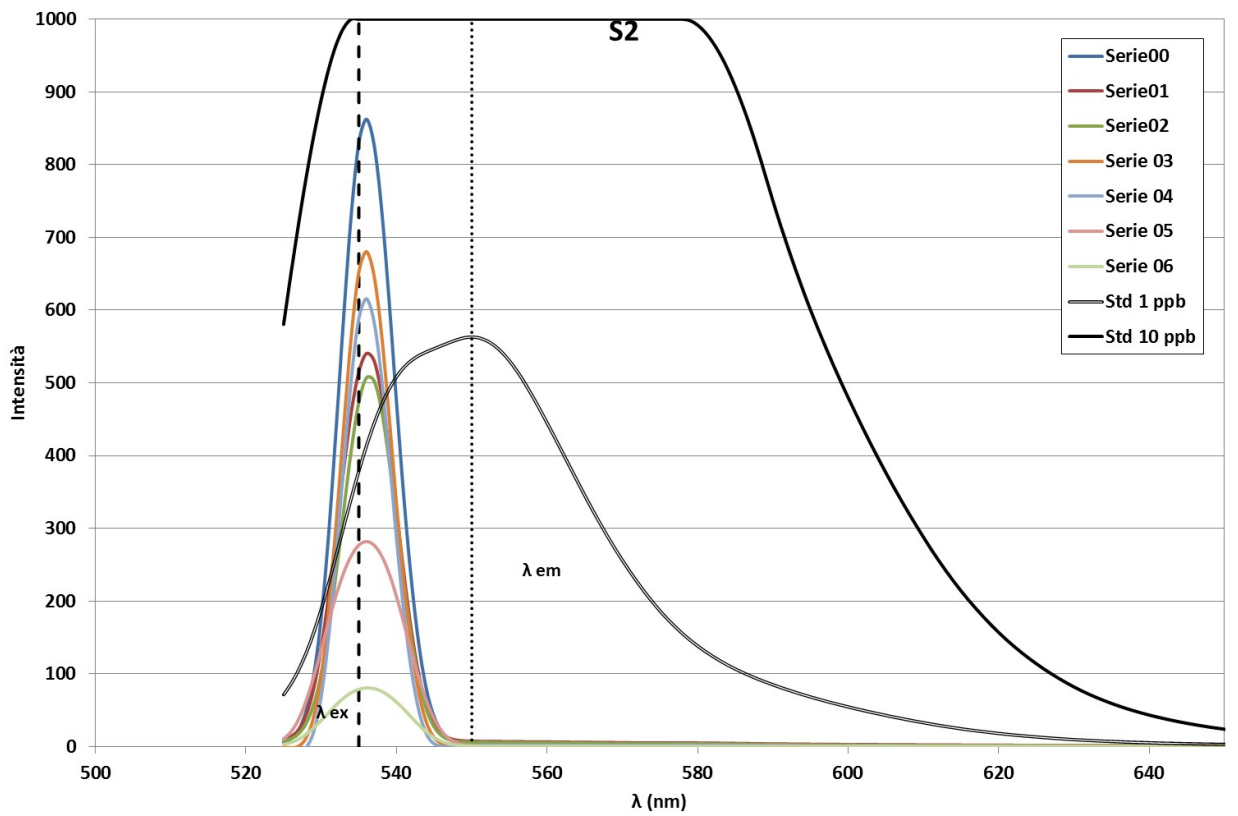
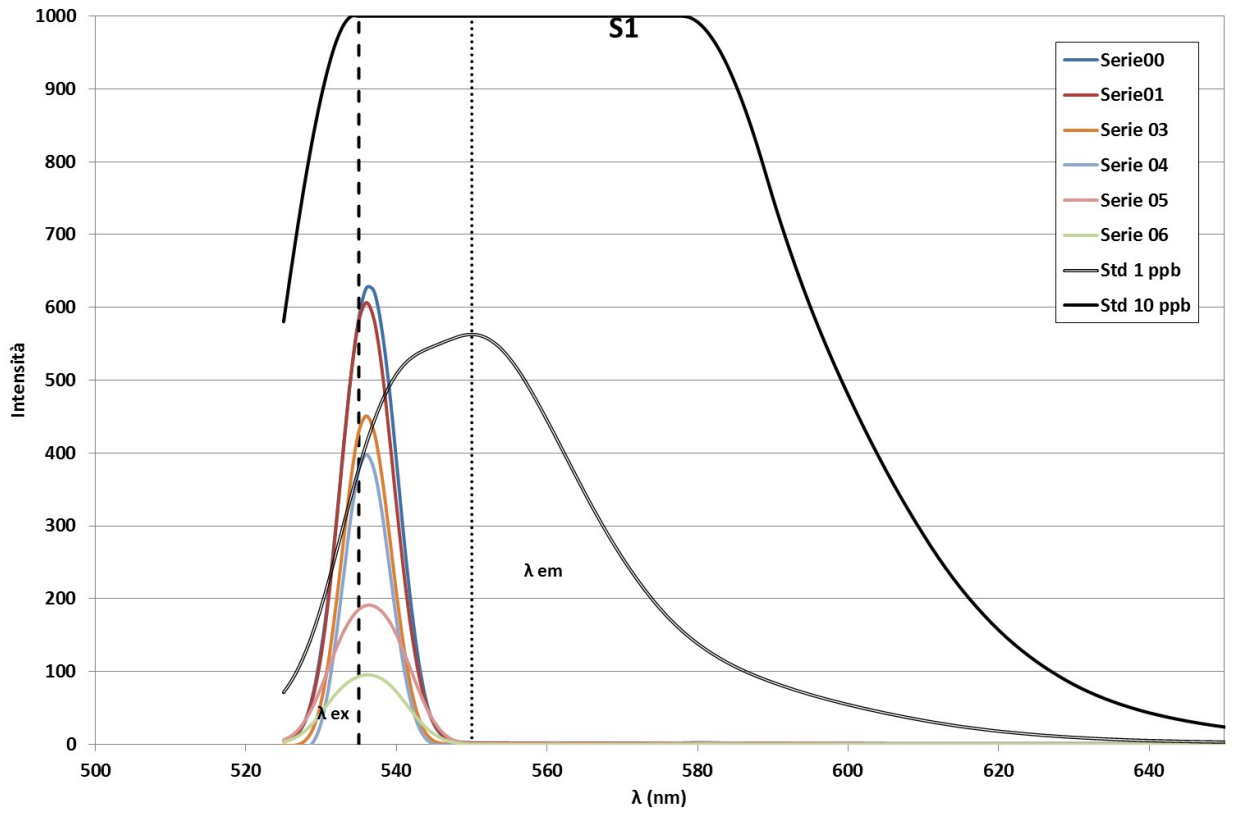
Di seguito sono riportati gli spettri di emissione ottenuti per la Sulfrodamina G nei diversi punti di campionamento e per le serie disponibili. Nei grafici sono stati inseriti, per confronto, anche gli spettri di emissione ottenuti dall'analisi delle soluzioni standard a concentrazione 1 ppb e 10 ppb.

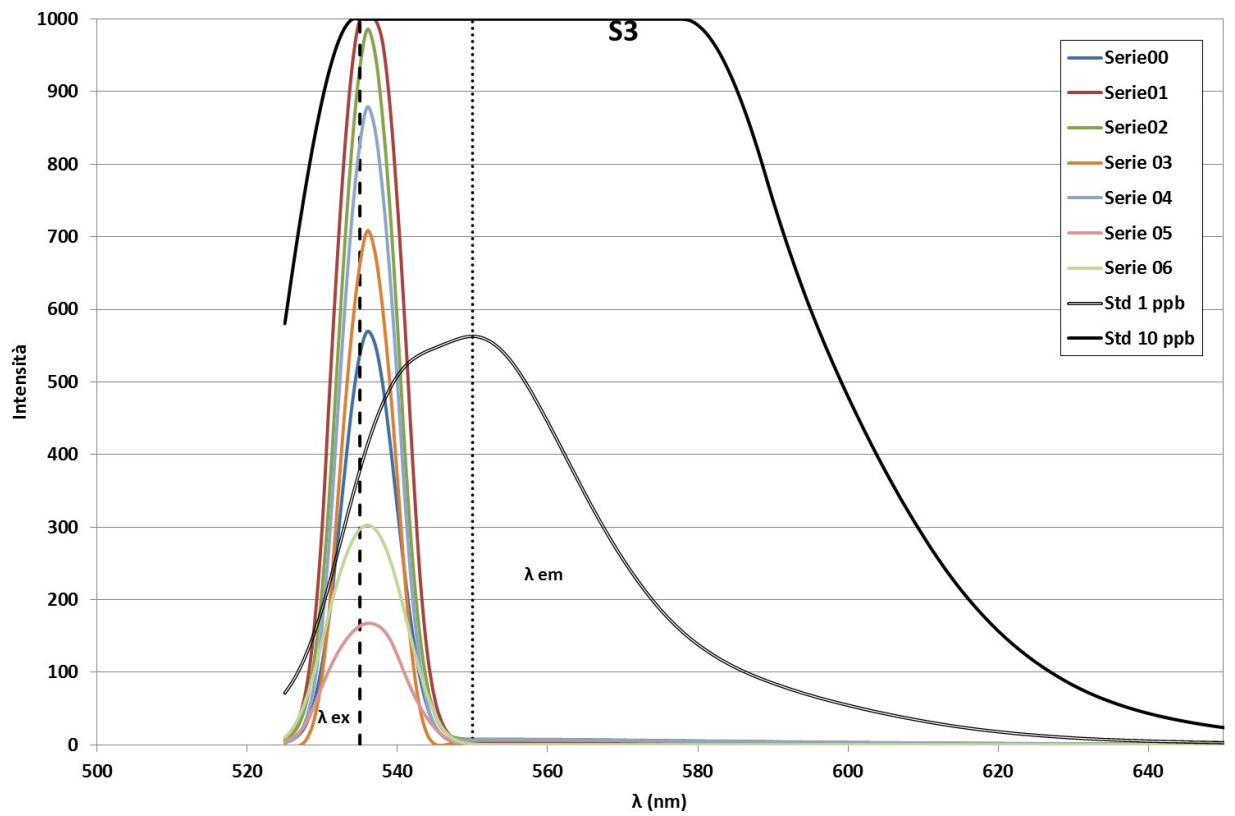
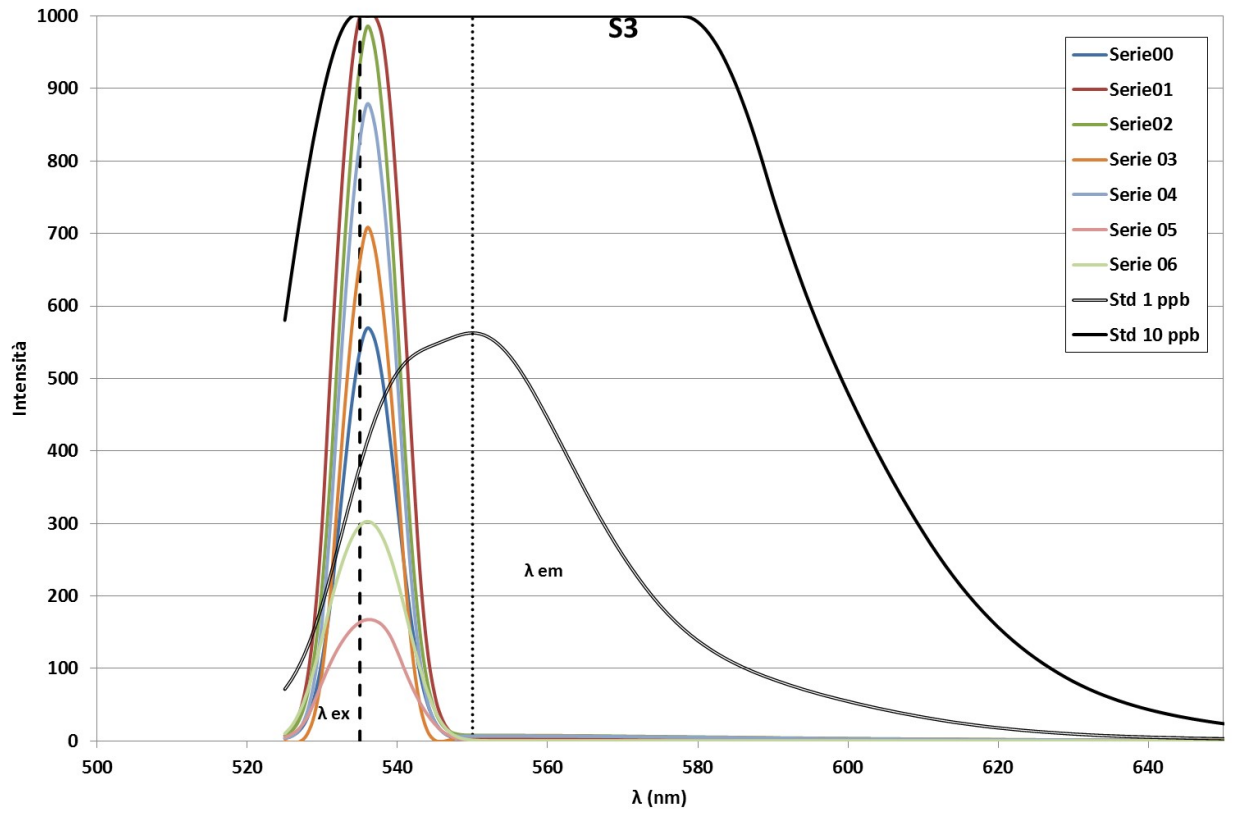


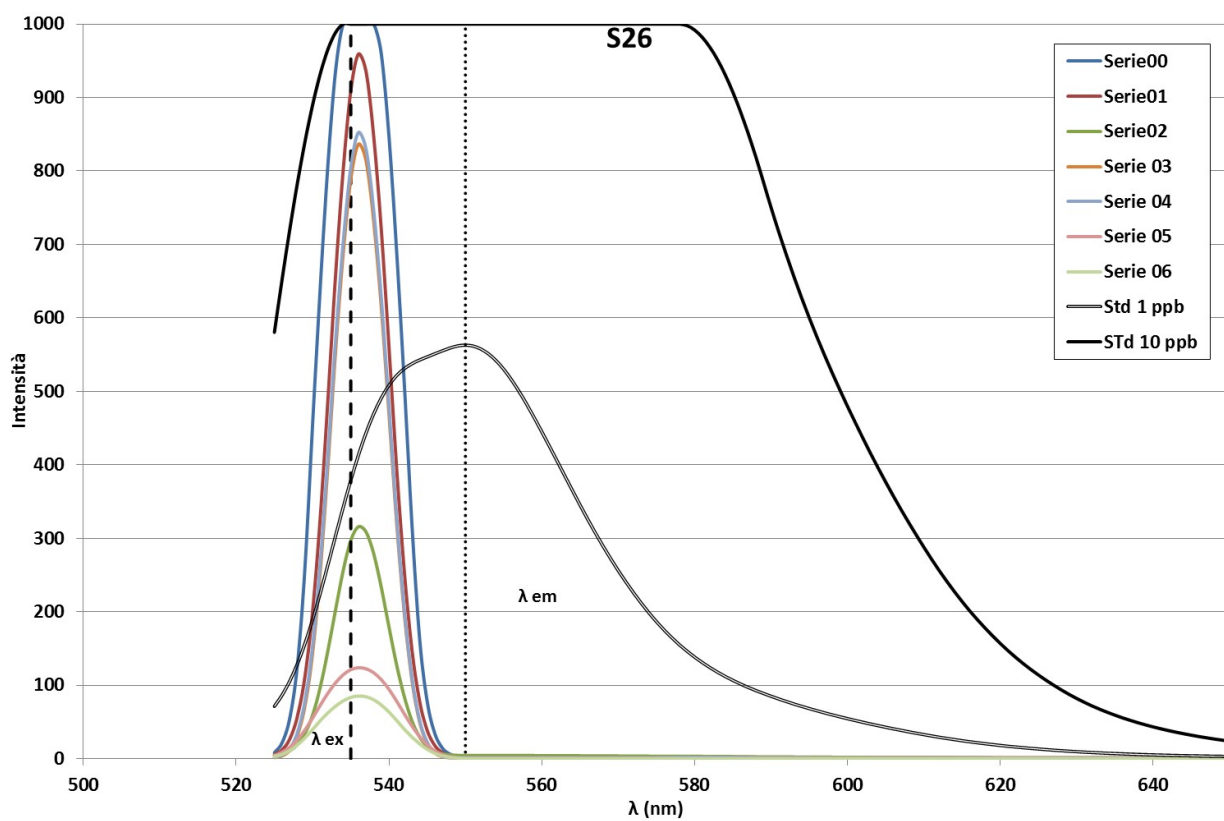
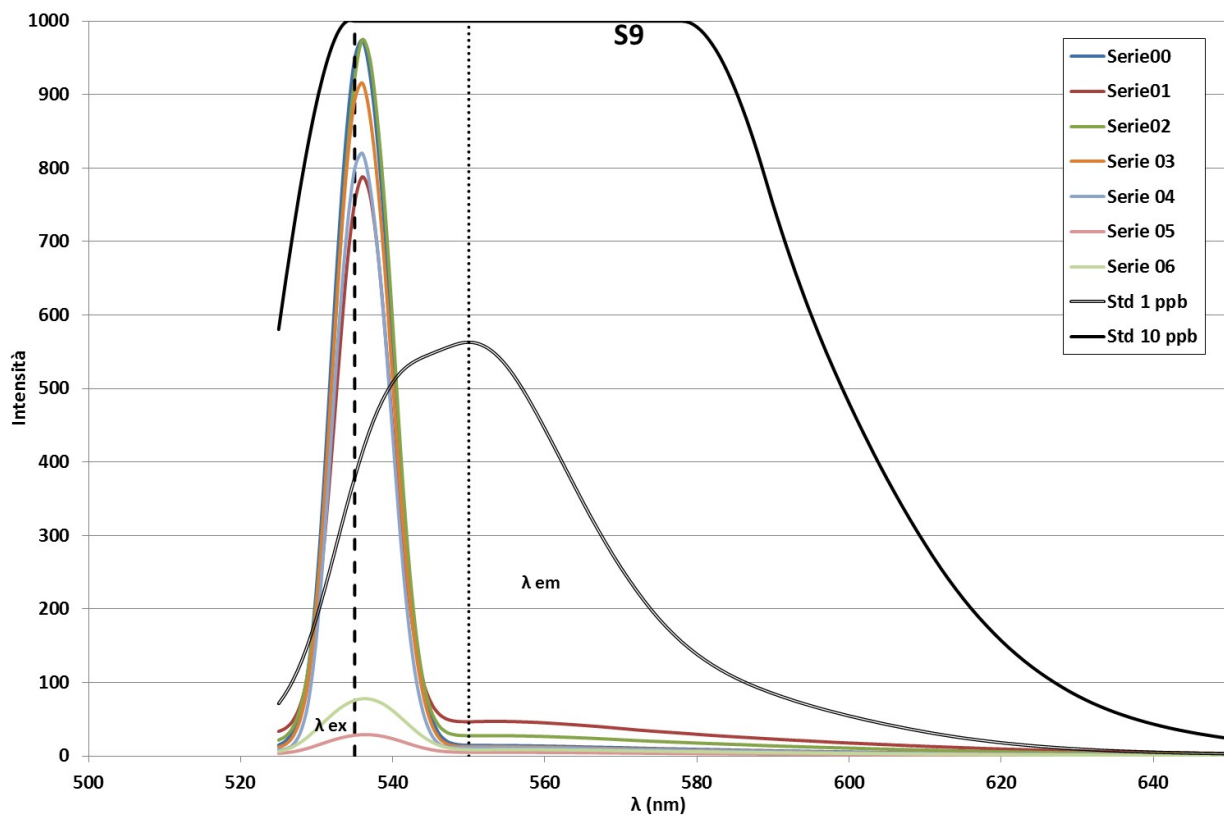


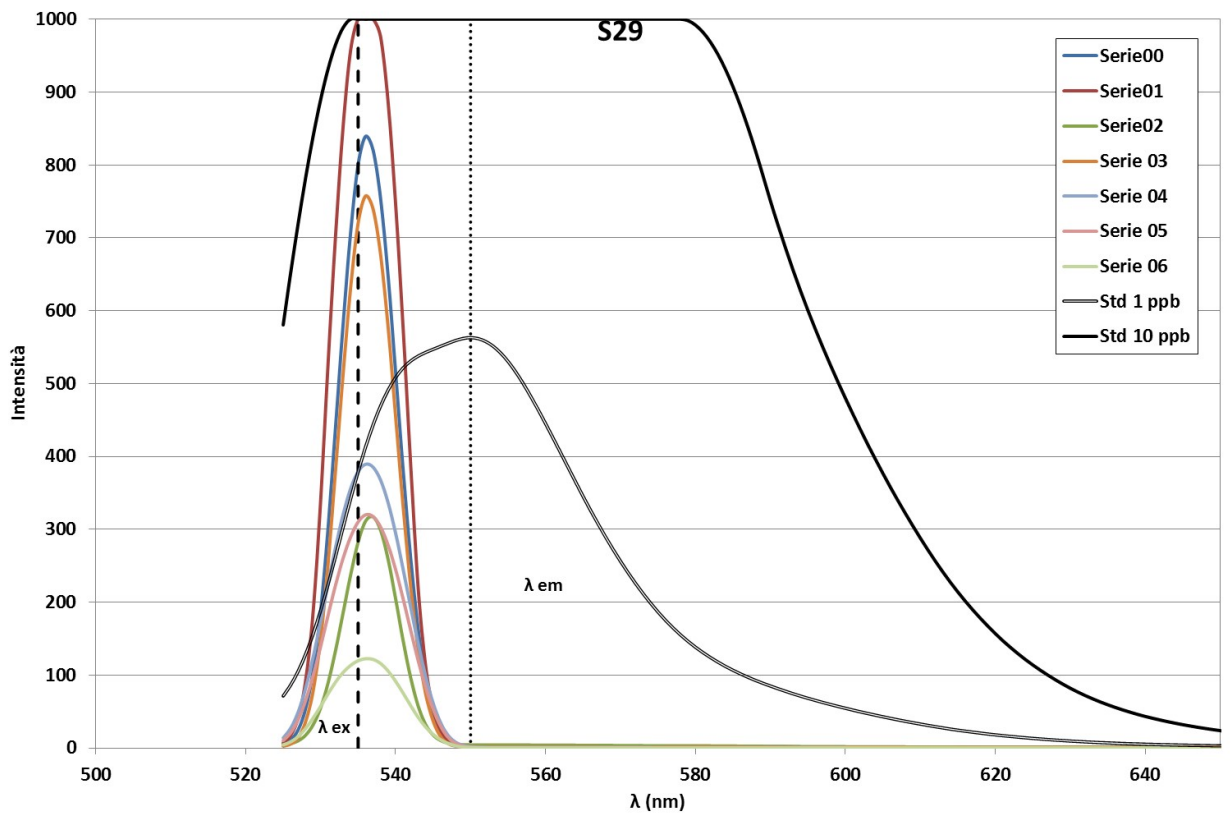
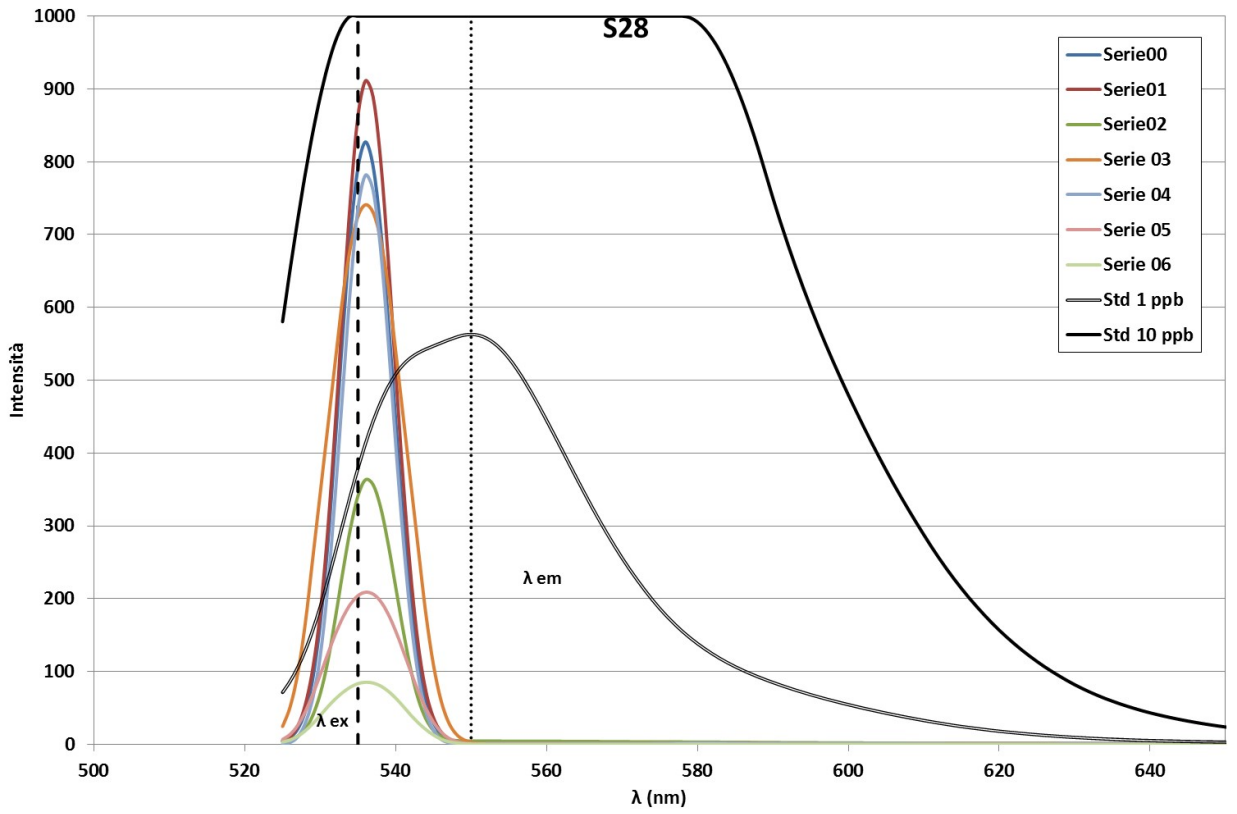


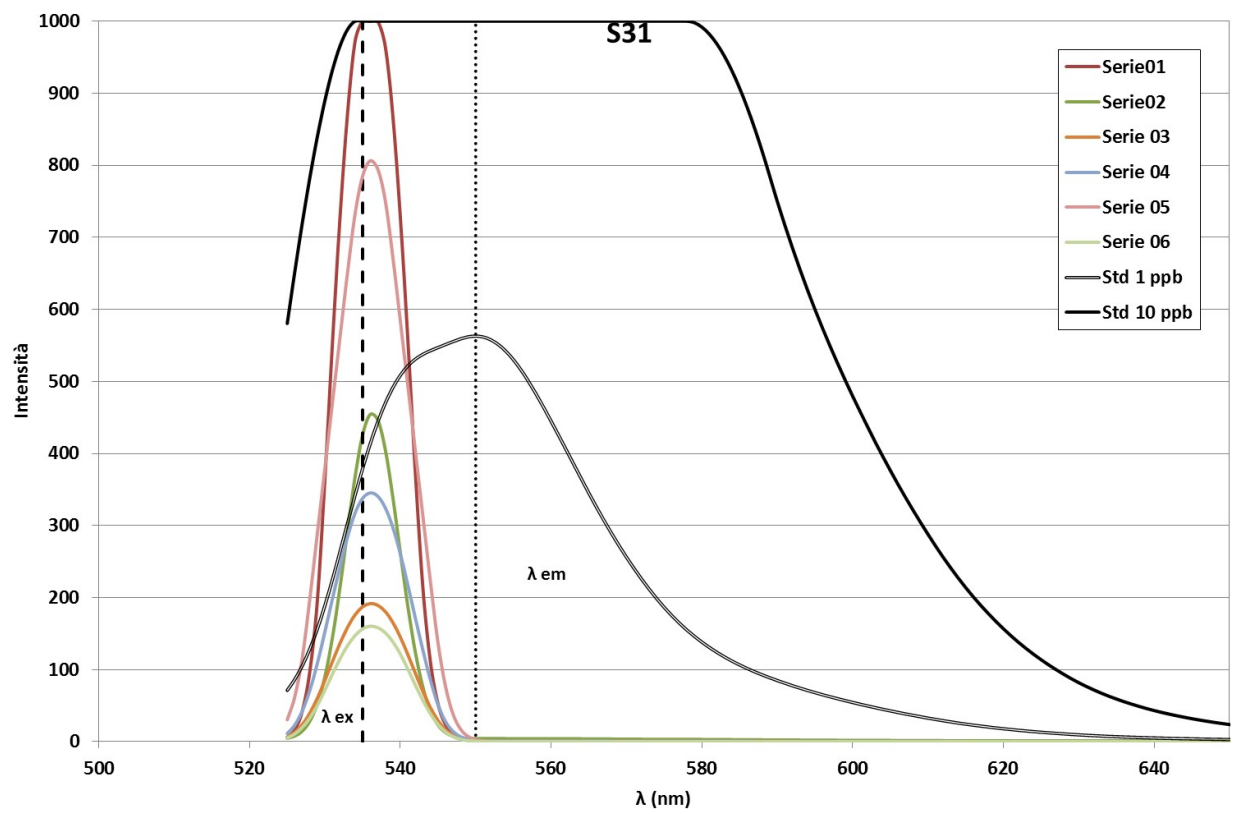
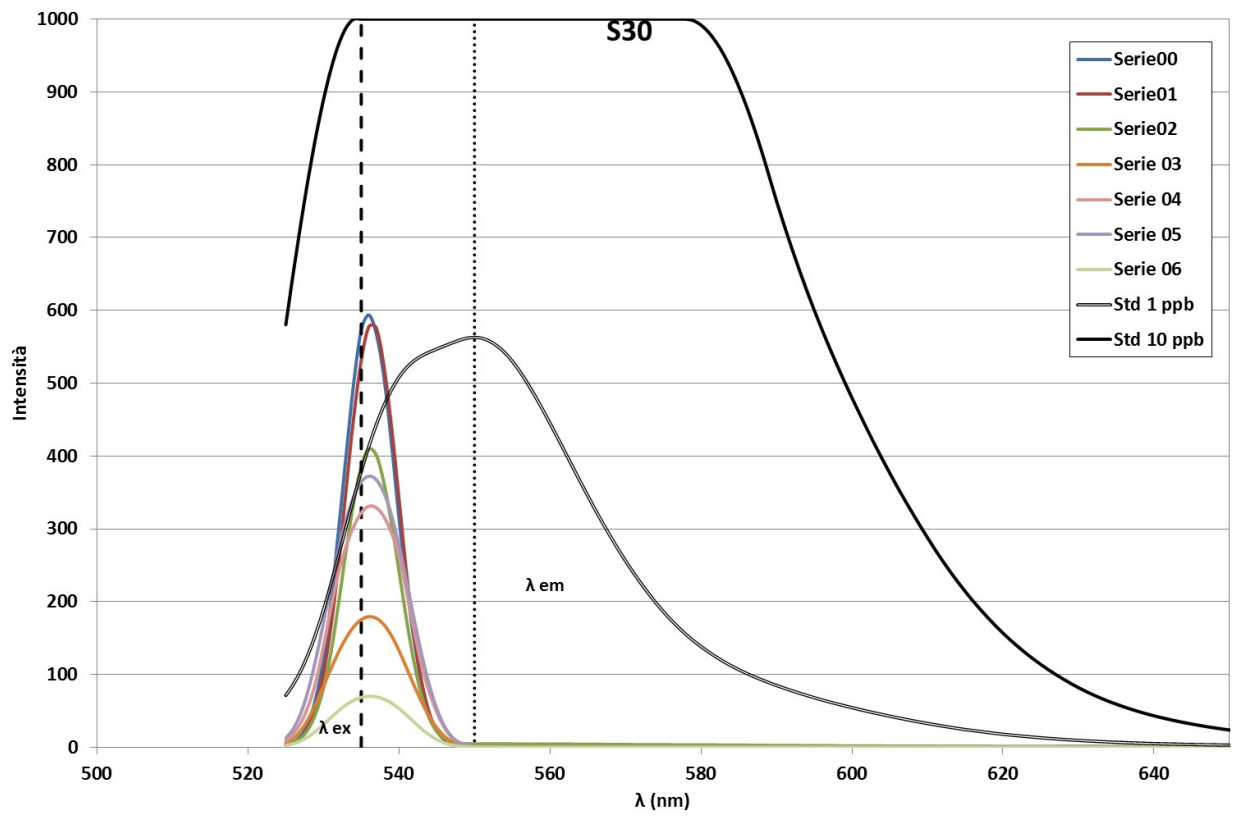


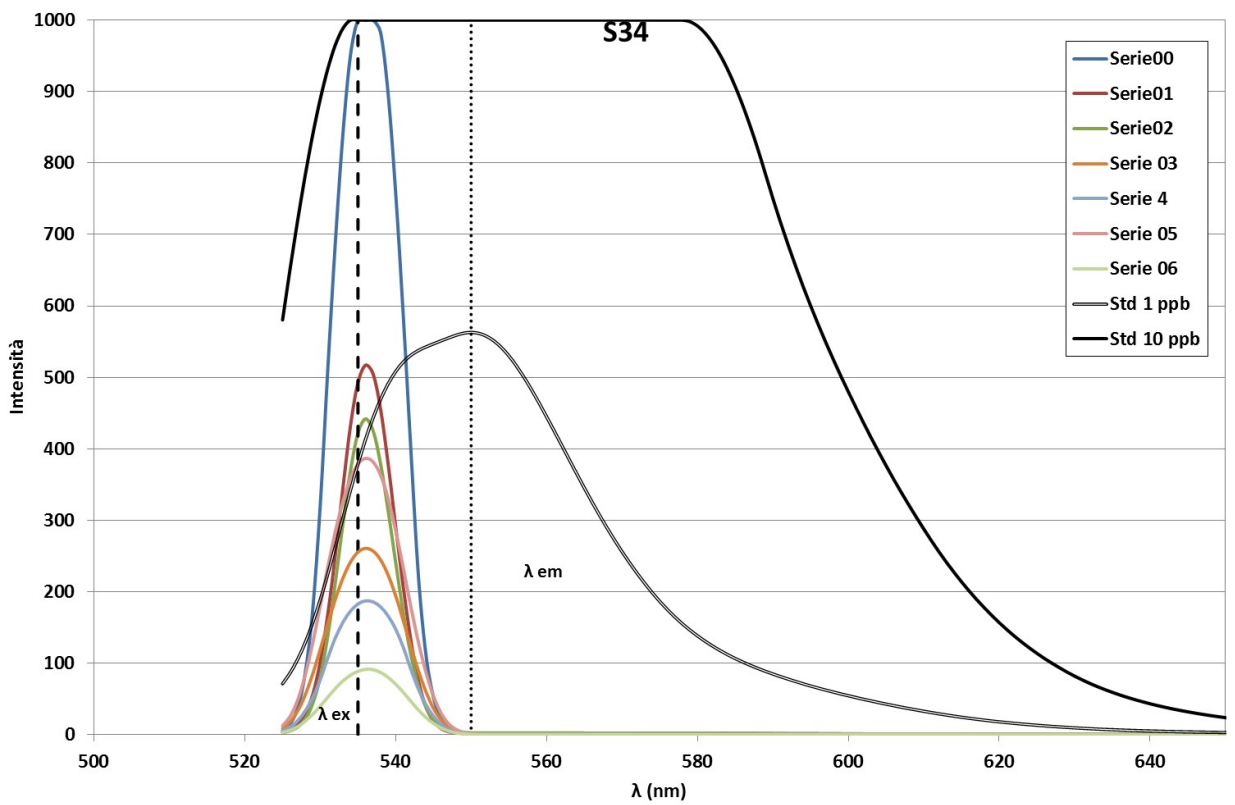
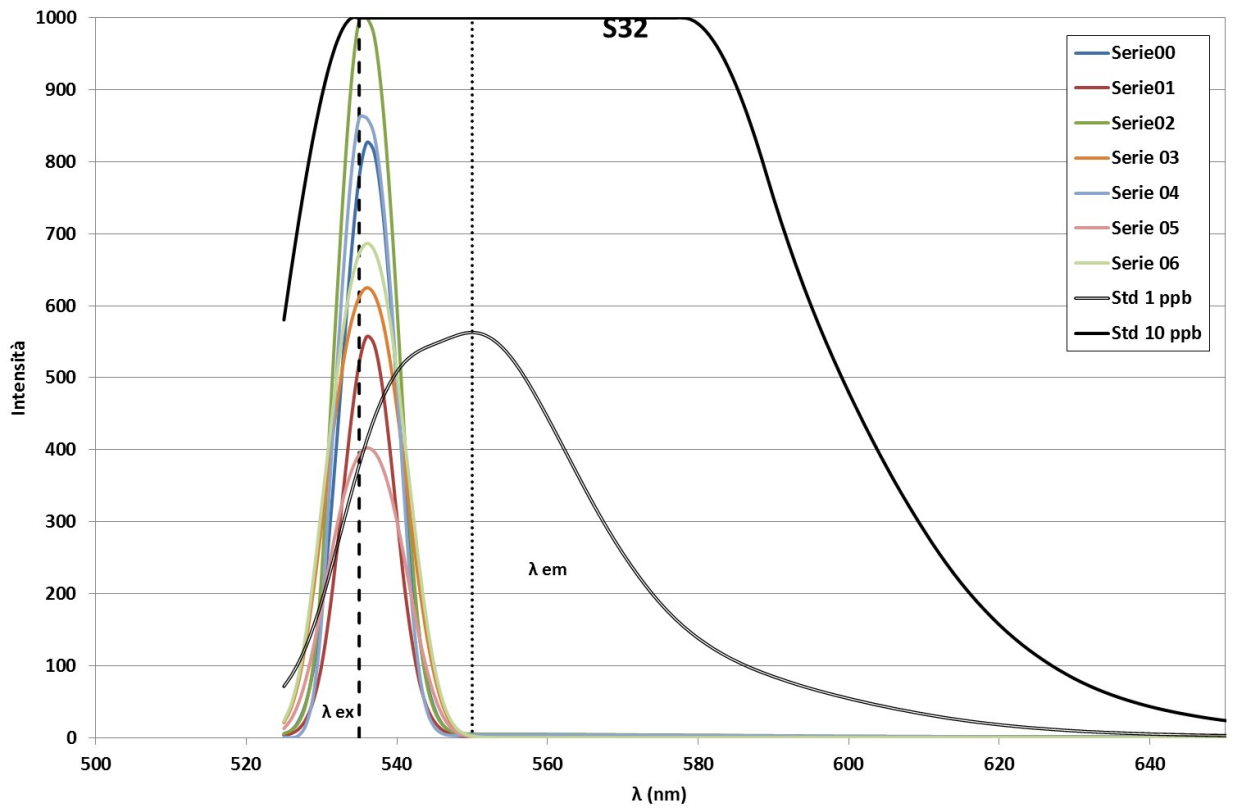


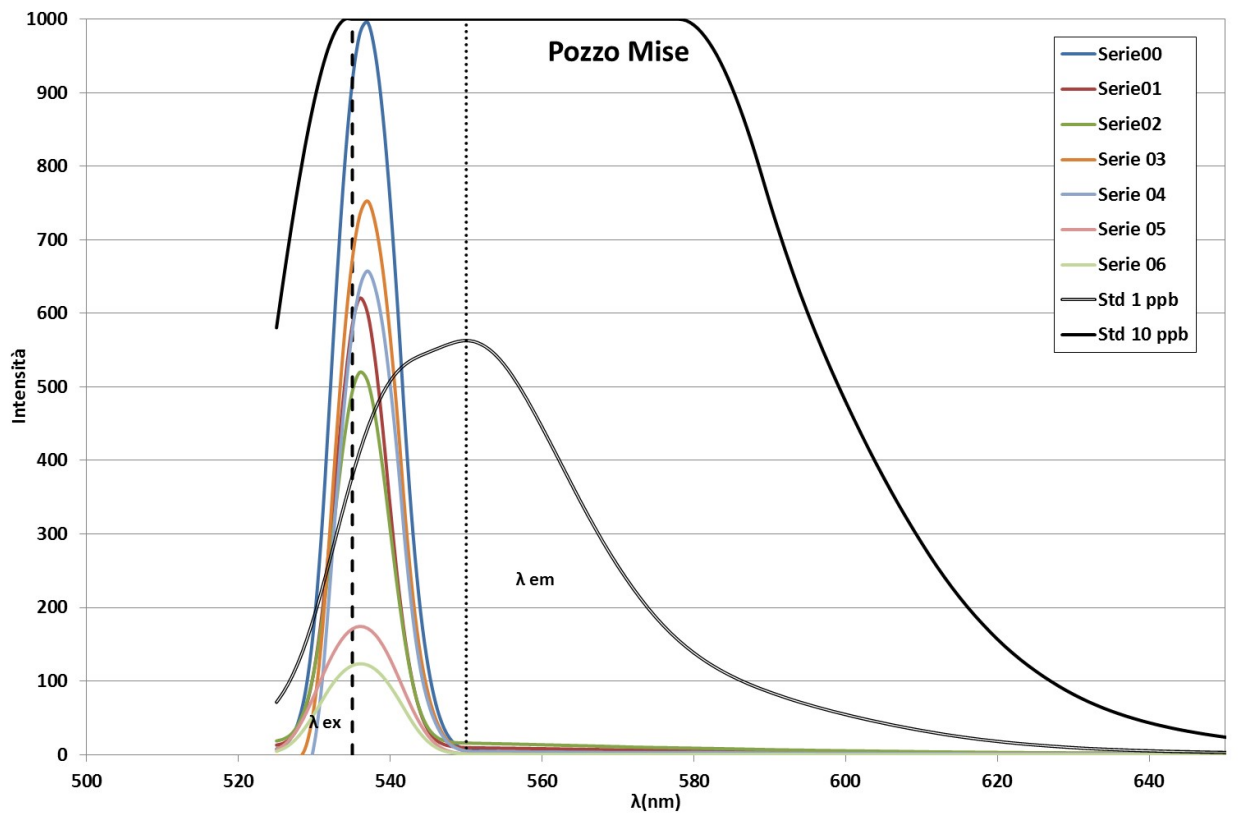
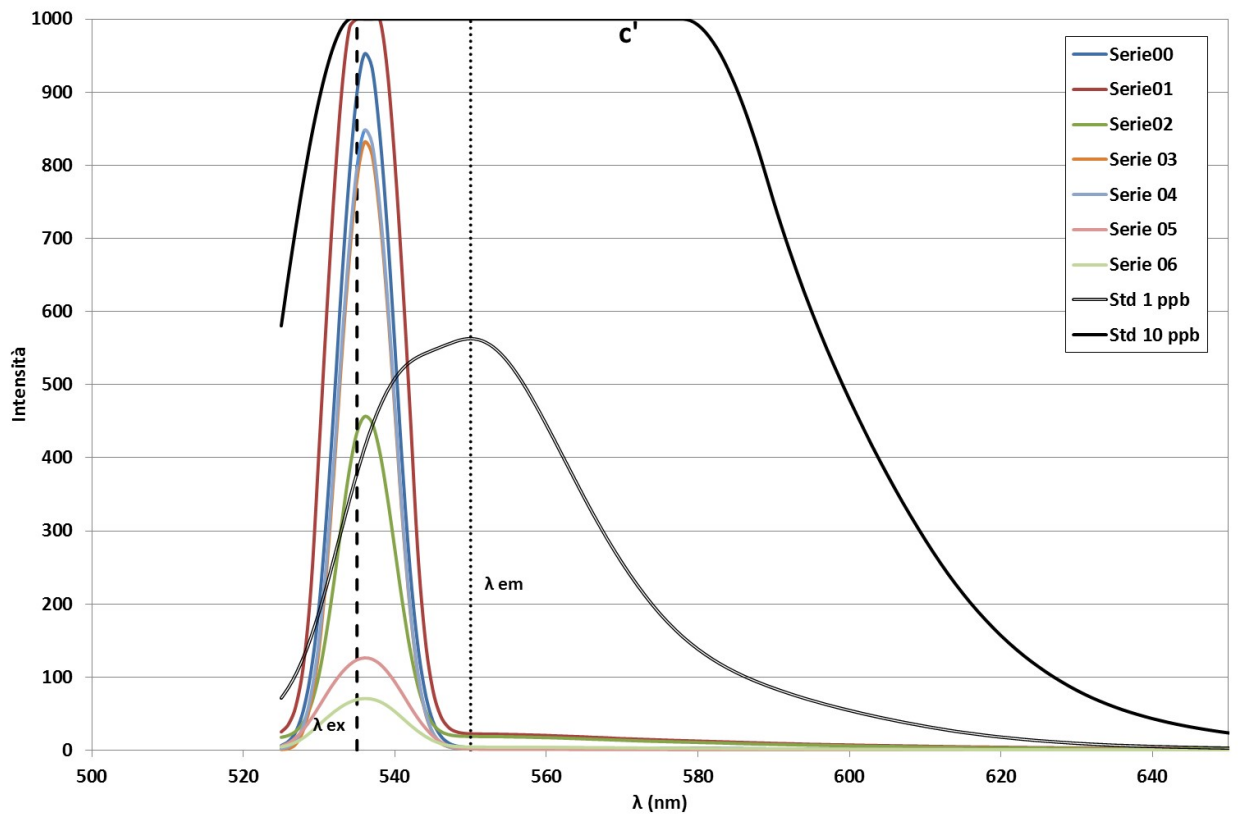


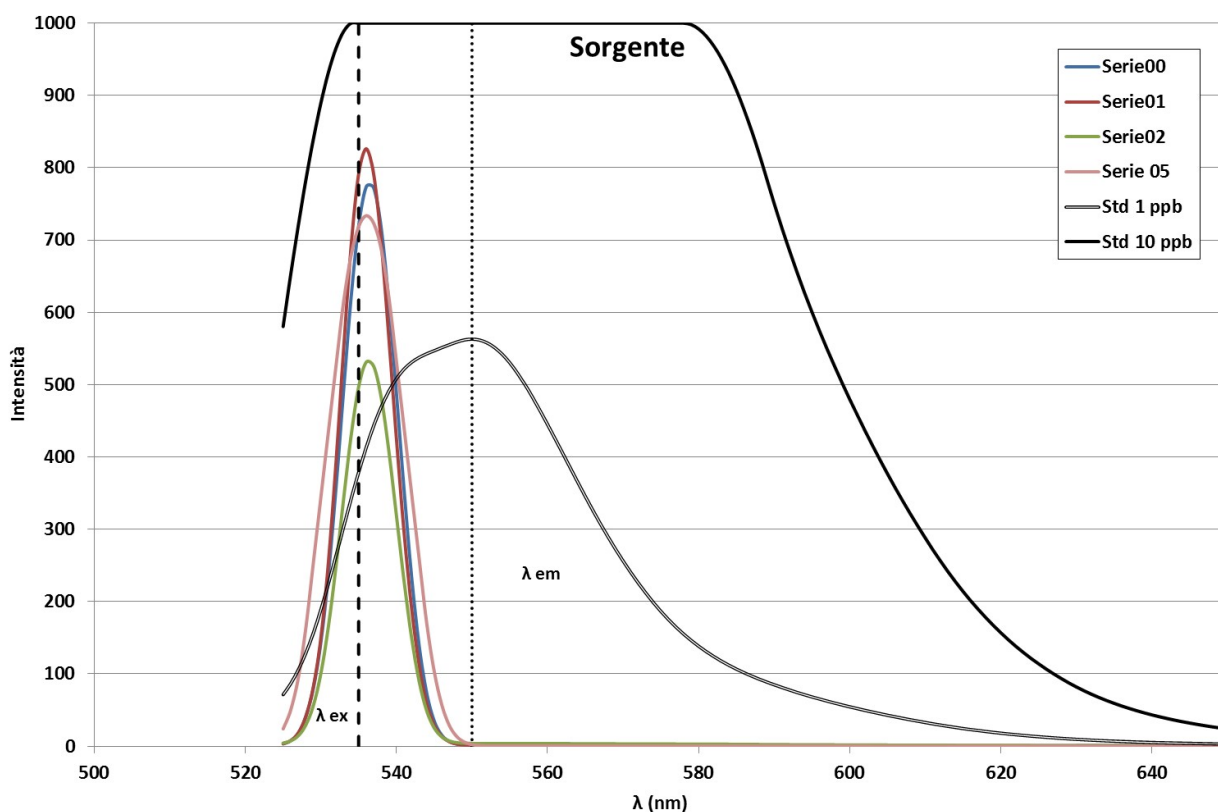












3.3. TINOPAL CBS-X

I valori dell'intensità di fluorescenza misurata in corrispondenza della λ_{em} : 429 nm tipica del Tinopal CBS-X sono riportati nella tabella 6. Nelle soluzioni standard analizzate sono stati rilevati i seguenti valori di intensità di fluorescenza:

- 665.4 (soluzione 10 ppb);
- 75.9 (soluzione 1 ppb).

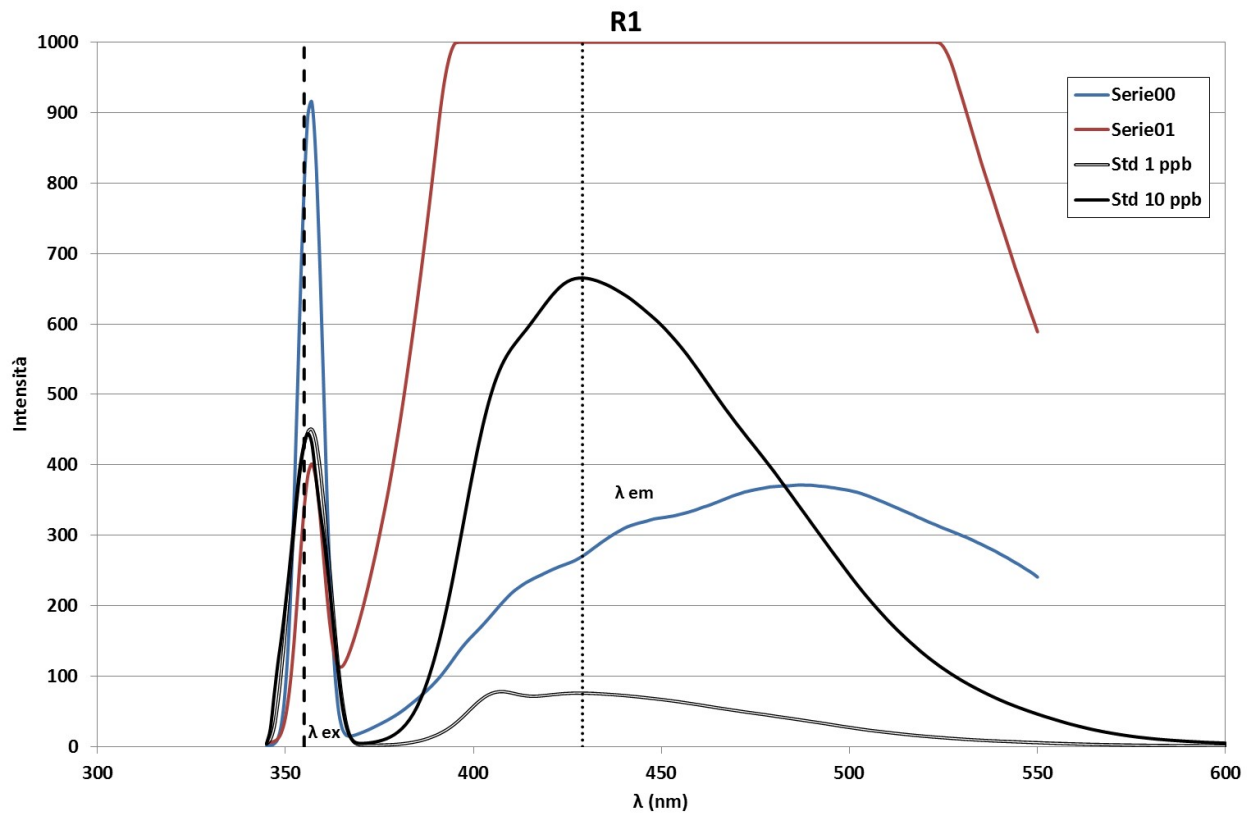
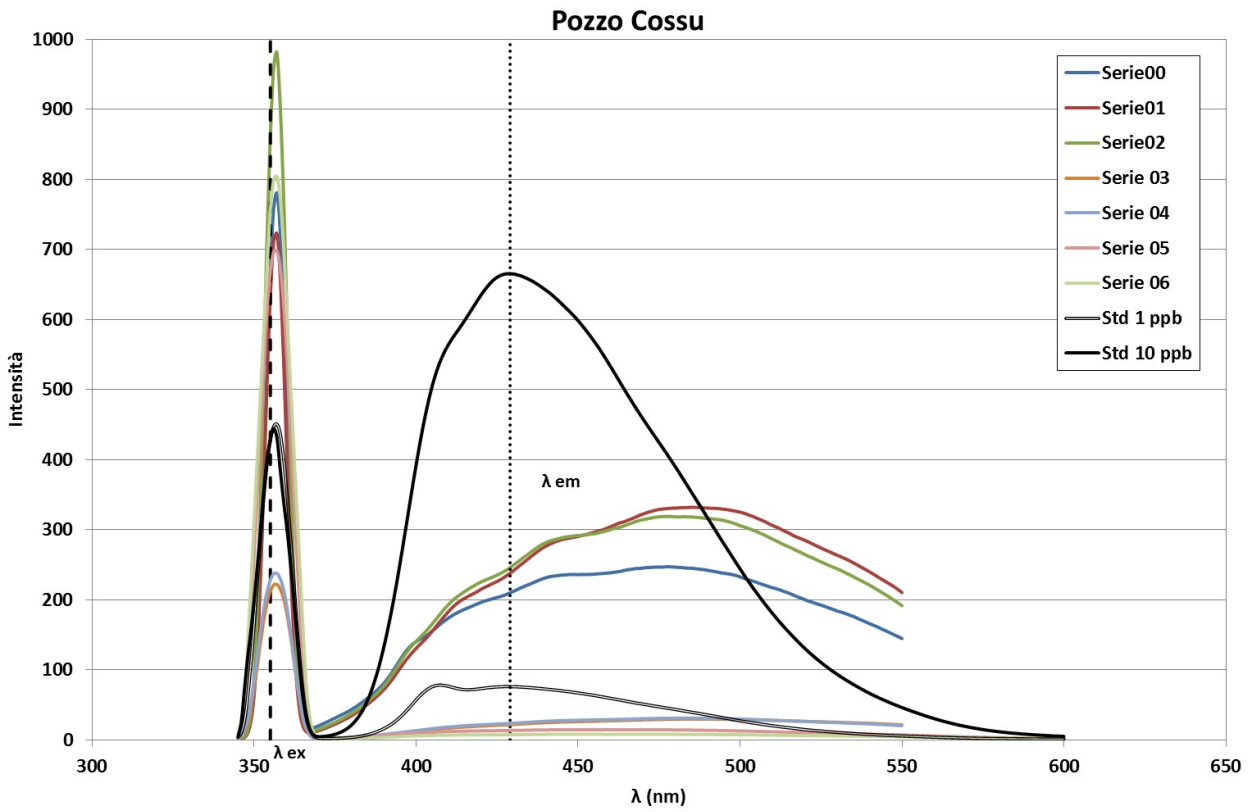
Tabella 6: Valori di intensità di fluorescenza misurati in corrispondenza della λ_{em} :429 nm.

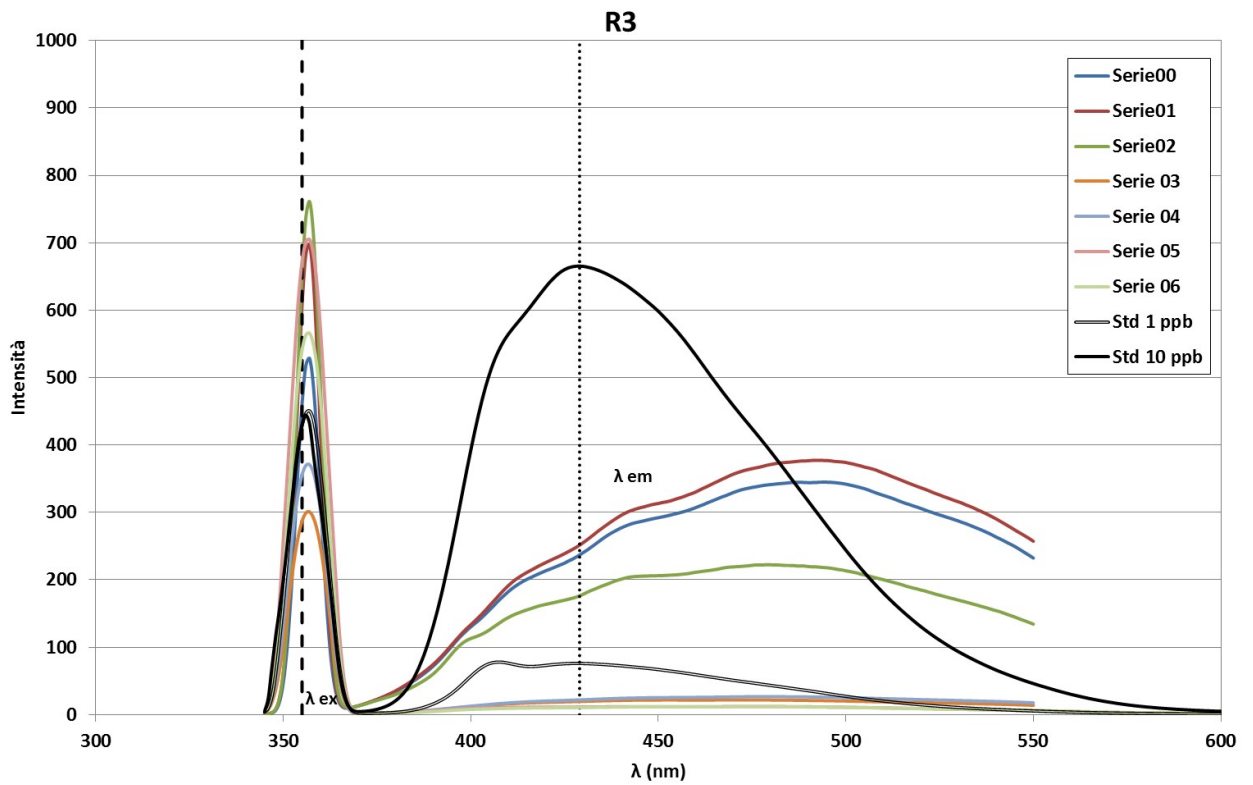
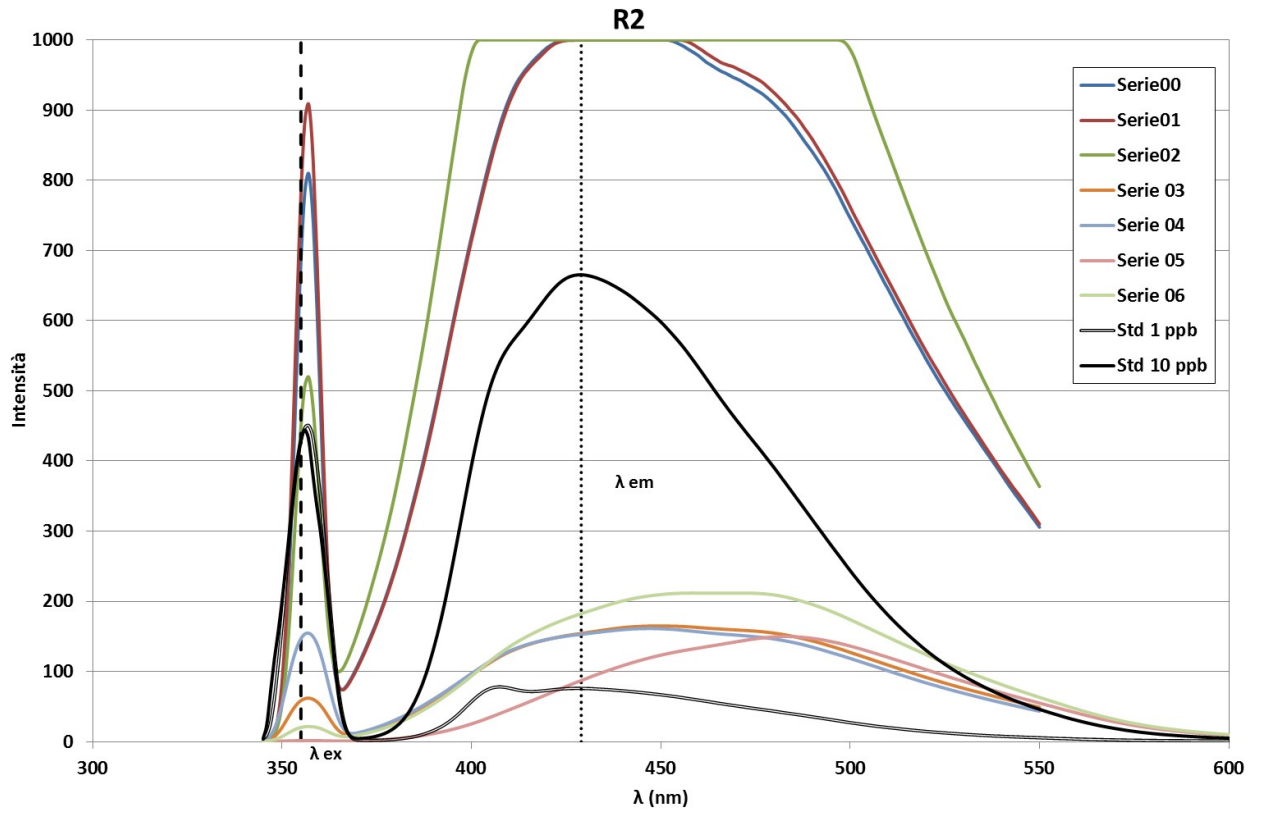
Campione	Intensità di fluorescenza						
	Serie 00	Serie 01	Serie 02	Serie 03	Serie 04	Serie 05	Serie 06
Pozzo Cossu	221.1	259.8	266.5	21.7	23.5	13.3	7.3
R1	293.4	>999.9	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.
R2	>999.9	>999.9	>999.9	154.3	153.1	87.3	182.5
R3	260.5	276.6	190.9	19.6	21.9	11.4	10.5

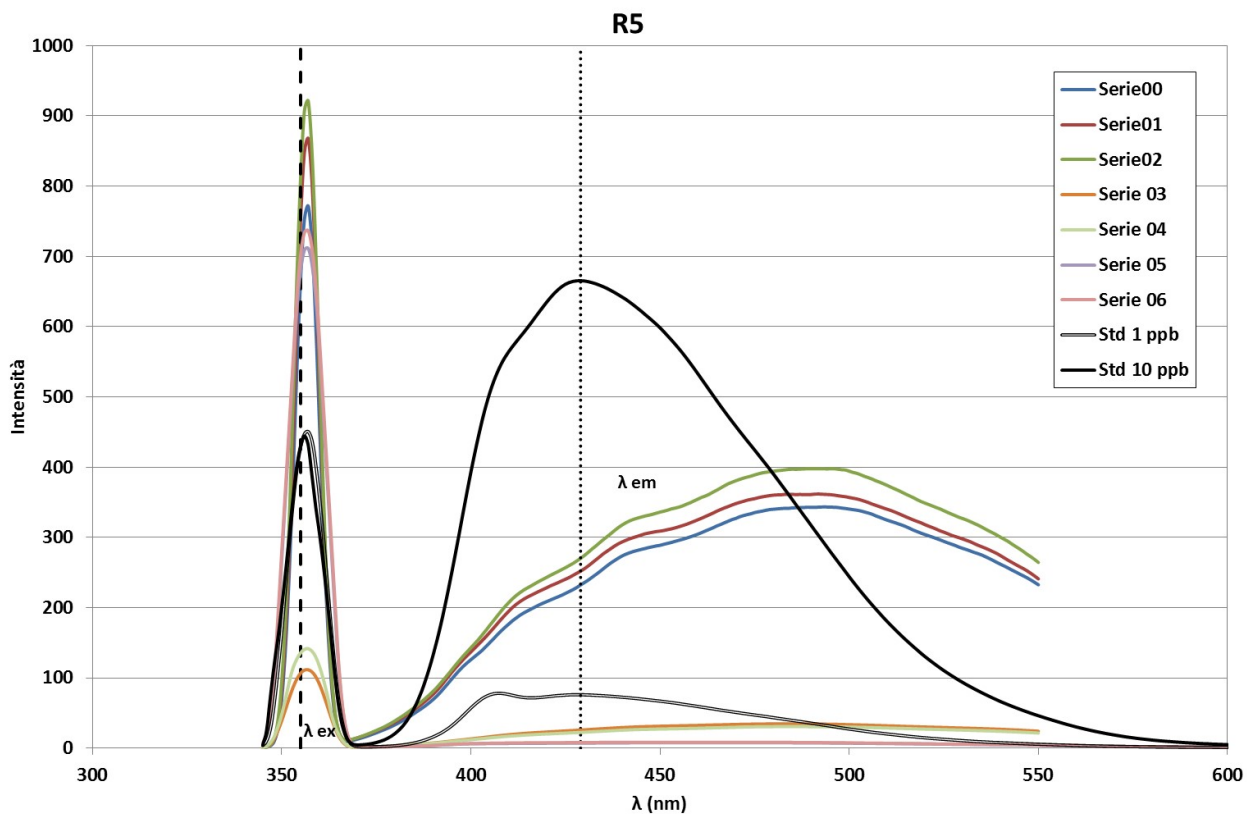
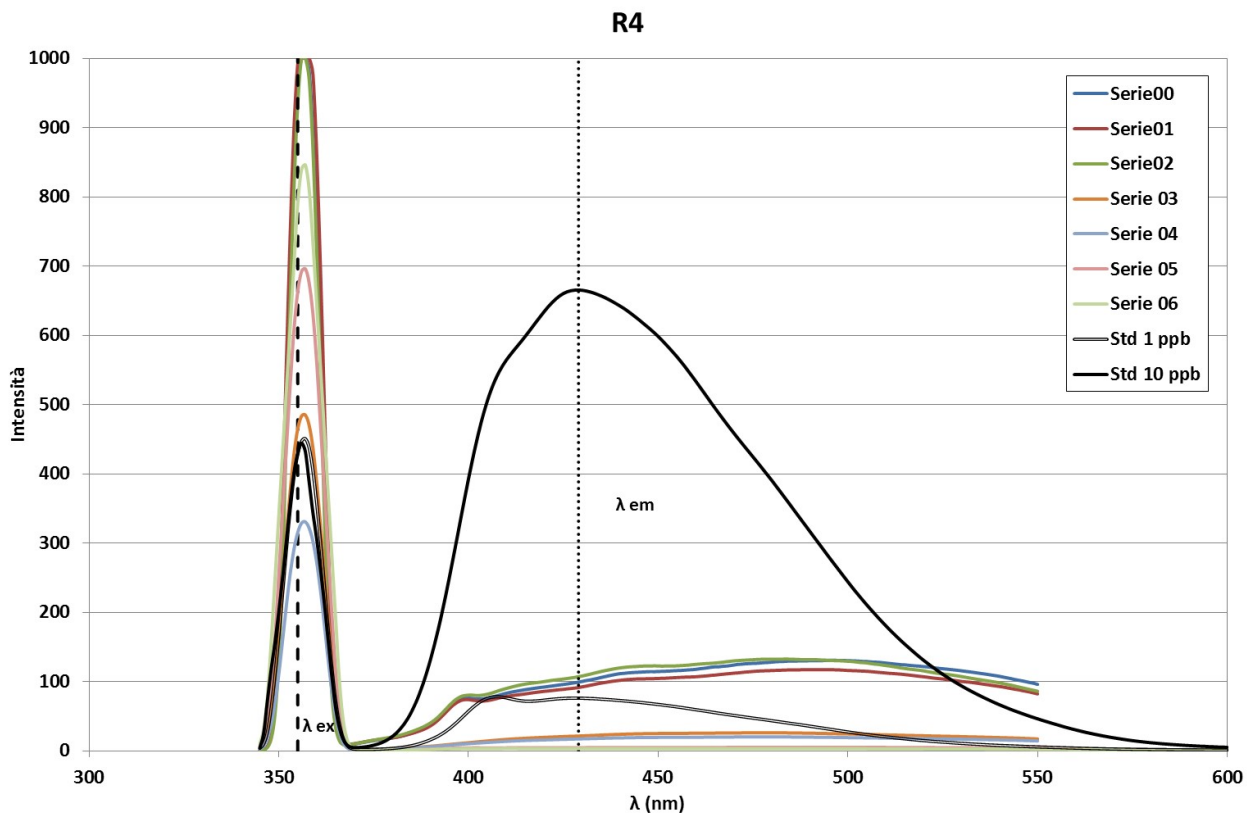
Campione	Intensità di fluorescenza						
	Serie 00	Serie 01	Serie 02	Serie 03	Serie 04	Serie 05	Serie 06
R4	105.9	97.8	114.6	21.3	17.1	4.4	3.2
R5	255.4	276.7	296.8	25.8	22.4	7.1	7.9
R6	n.r.	283.1	n.r.	23.7	21.7	4.7	10.8
S1	286.7	191.4	n.r.	24.8	27.5	16.	10.1
S2	282.4	565.6	545.4	26.3	24.3	41.6	41.0
S3	265.4	292.1	297.1	23.0	23.6	16.6	17.5
S4	273.3	286.2	248.3	22.5	23.7	n.r.	15.8
S9	935.2	>999.9	>999.9	76.1	132.5	238.4	184.4
S26	268.3	235.2	251.0	23.9	23.1	9.3	5.3
S28	263.4	202.6	239.6	25.4	21.3	10.6	8.6
S29	329.7	294.0	319.7	27.3	34.2	10.1	16.9
S30	244.6	208.2	231.7	25.8	18.1	7.0	5.2
S31	n.r.	123.7	252.0	24.4	23.7	7.0	6.0
S32	270.6	290.1	249.7	18.2	22.7	5.7	6.1
S34	266.0	249.5	156.7	23.9	21.4	10.4	3.8
c'	337.3	>999.9	>999.9	44.4	66.1	95.5	254.2
Pozzo Mise	395.5	848.8	>999.9	66.5	42.7	48.1	52.9
Sorgente	257.1	198.1	232.5	n.r.	n.r.	4.0	n.r.

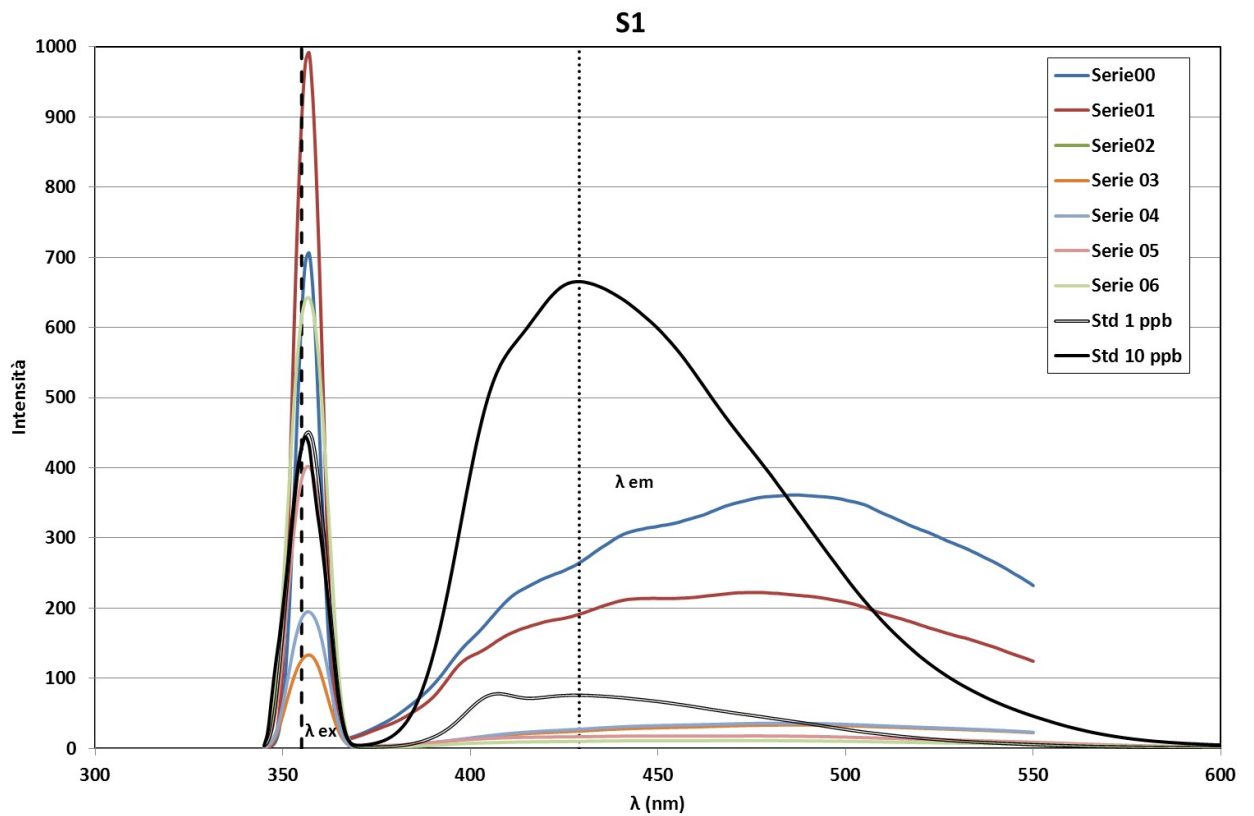
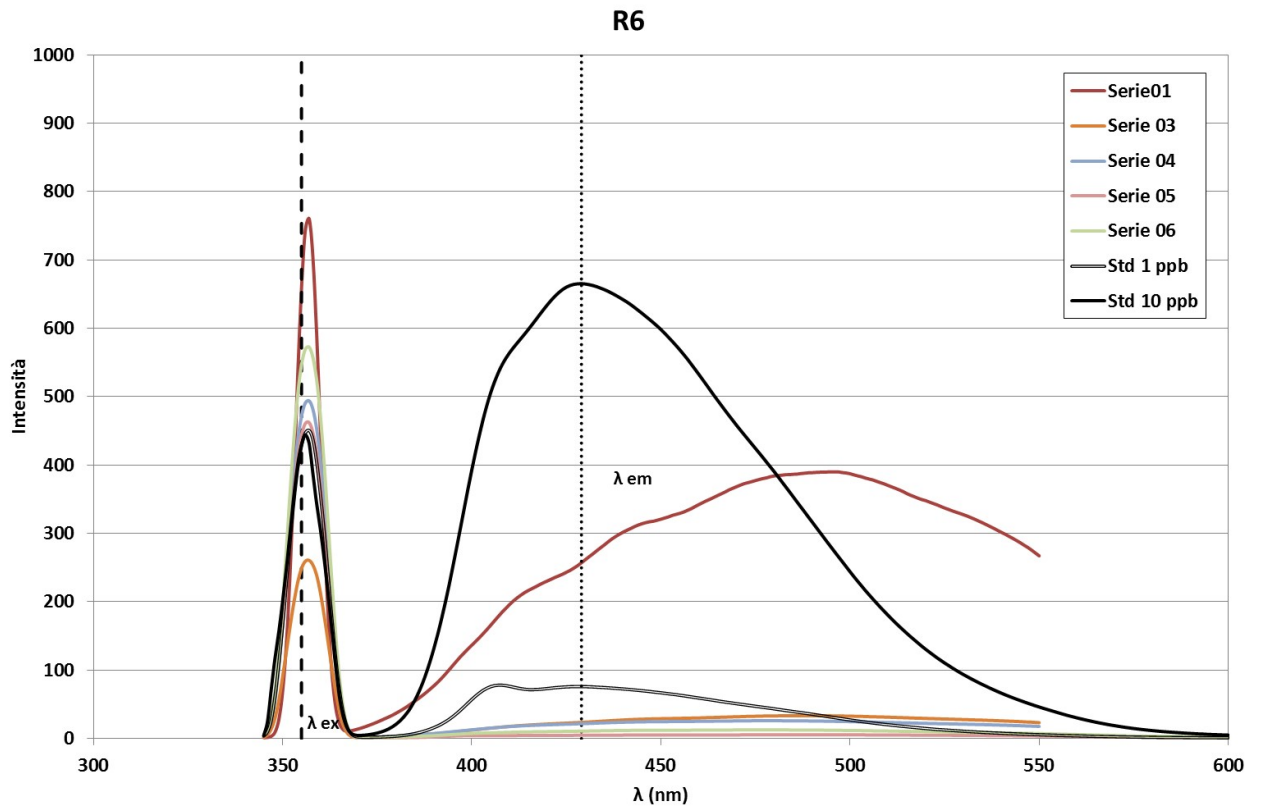
n.r.: campione non recuperato.

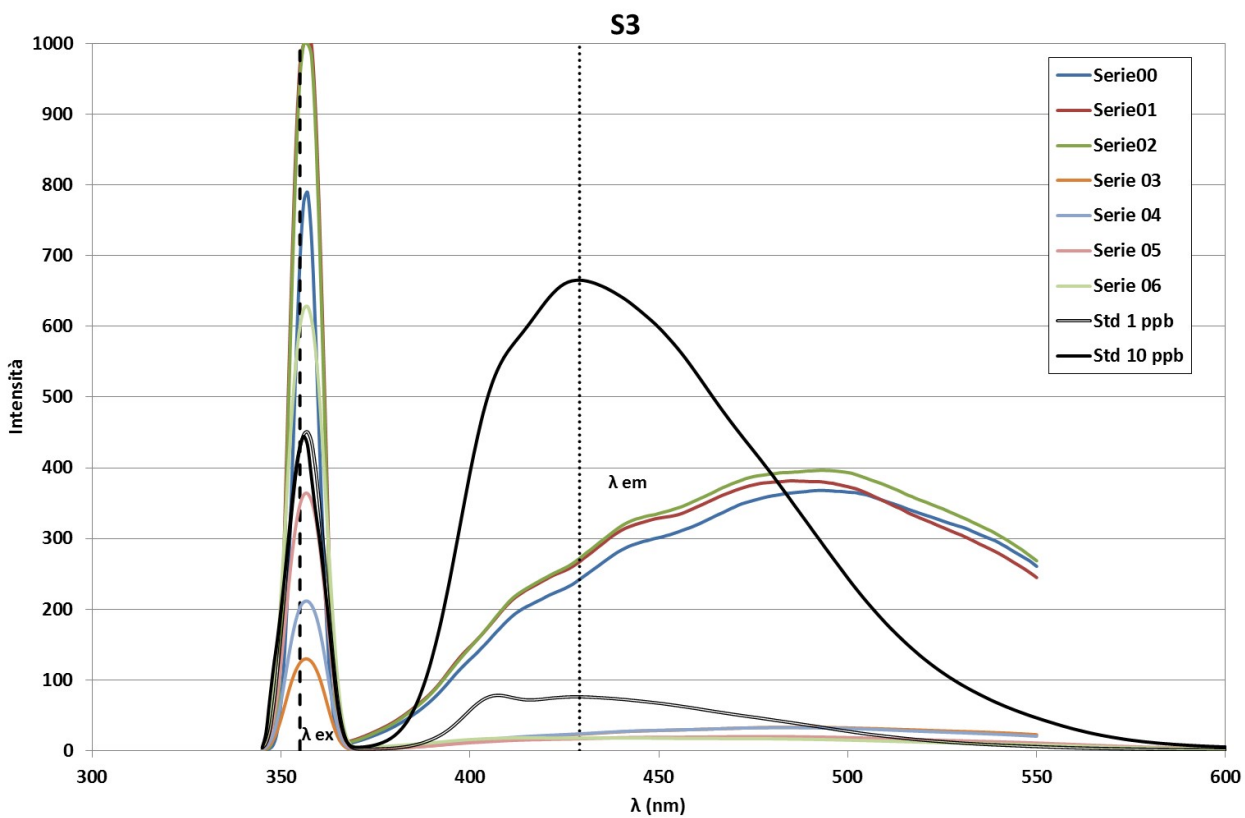
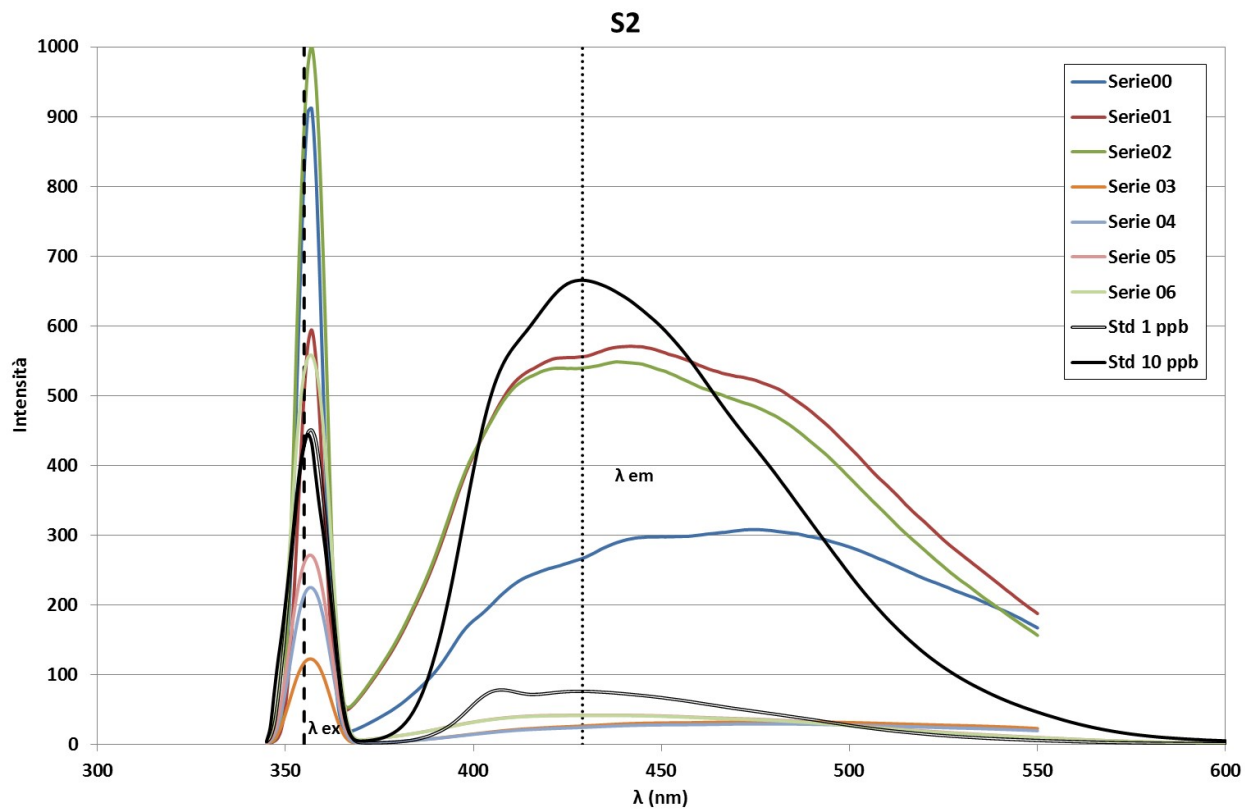
Di seguito sono riportati gli spettri di emissione ottenuti per il Tinopal CBS-X nei diversi punti di campionamento e per le serie disponibili. Nei grafici sono stati inseriti, per confronto, anche gli spettri di emissione ottenuti dall'analisi delle soluzioni standard a concentrazione 1 ppb e 10 ppb.



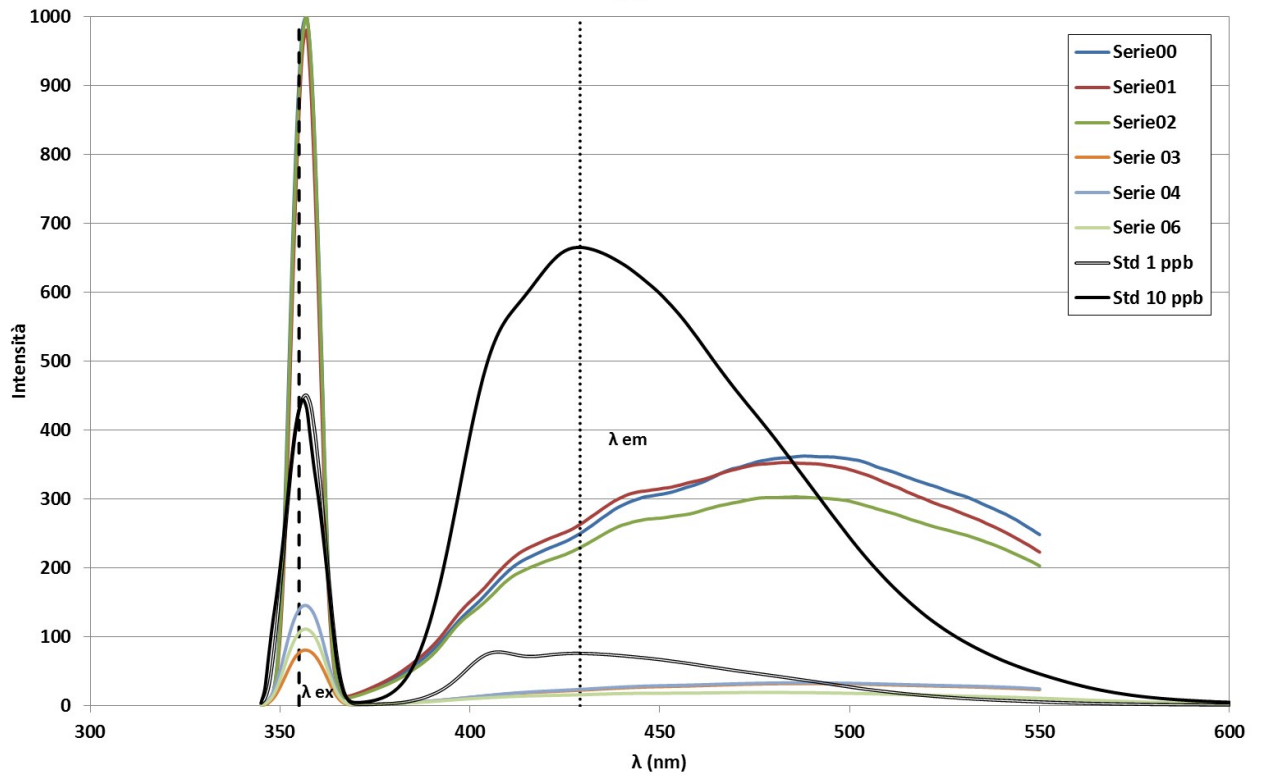




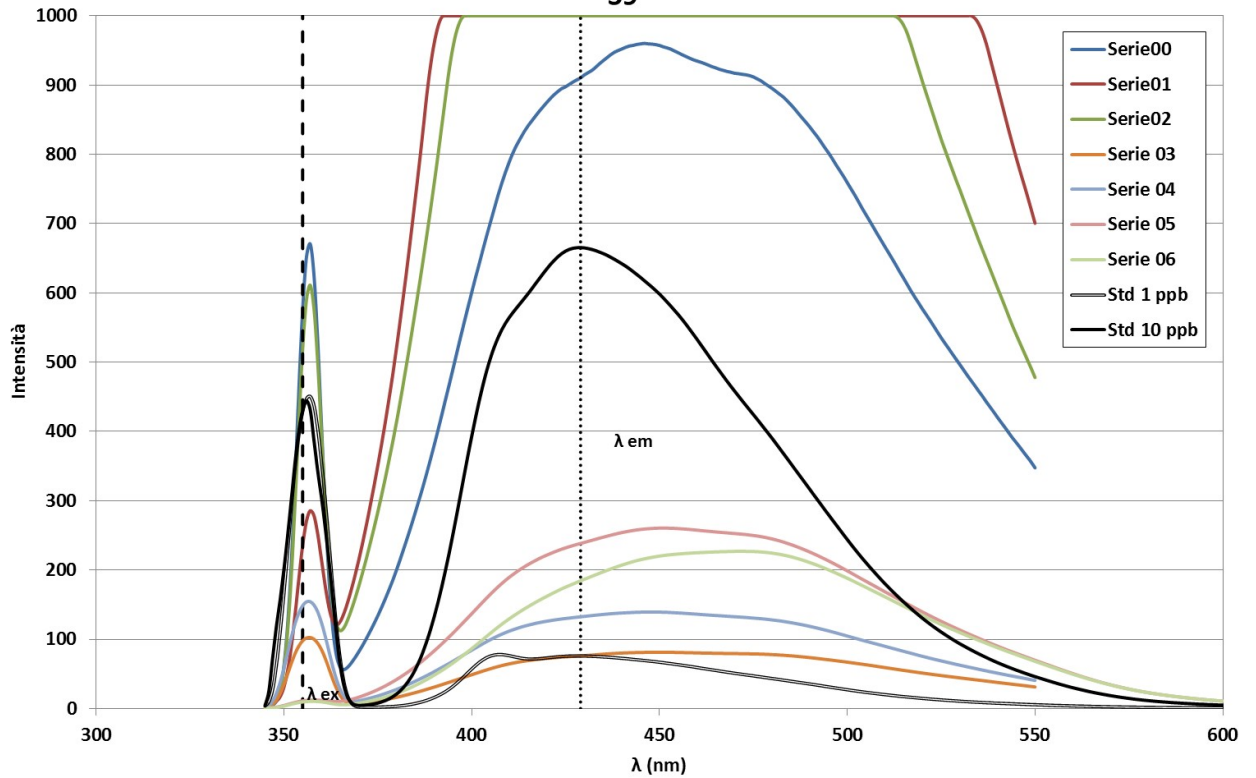


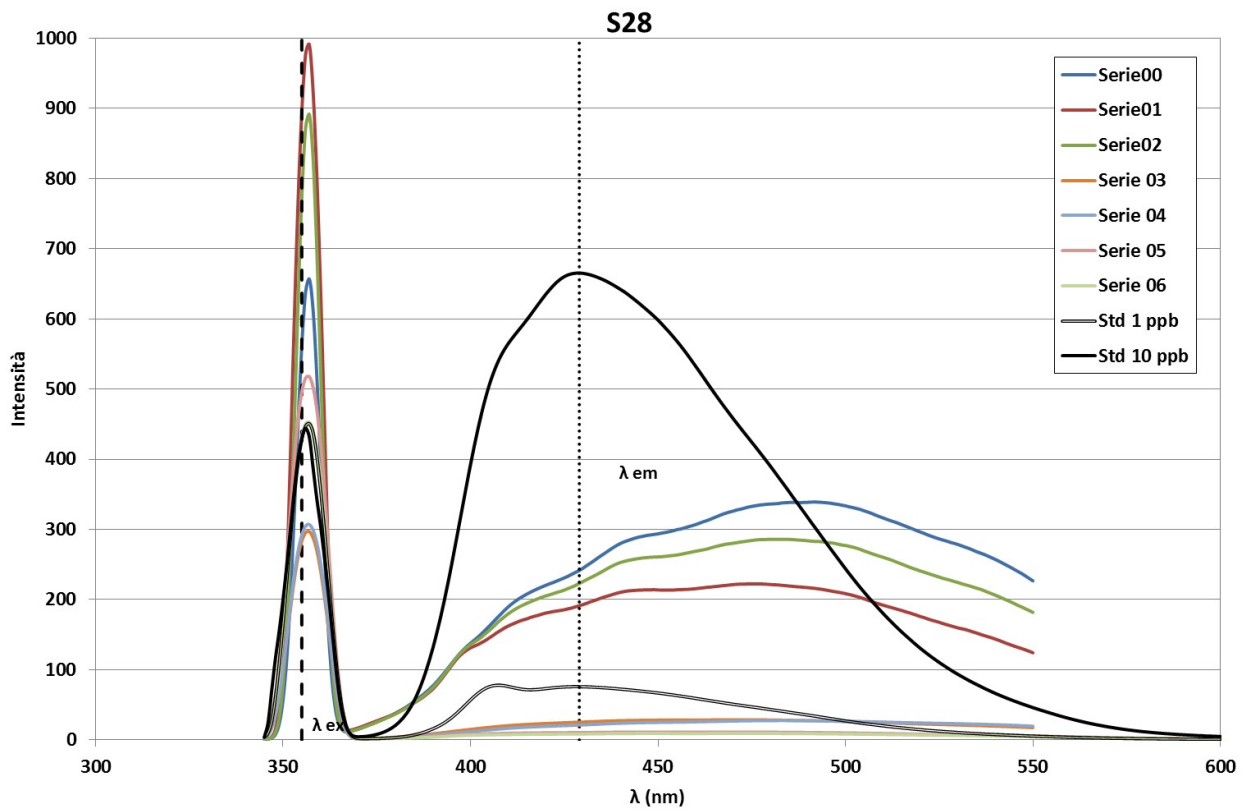
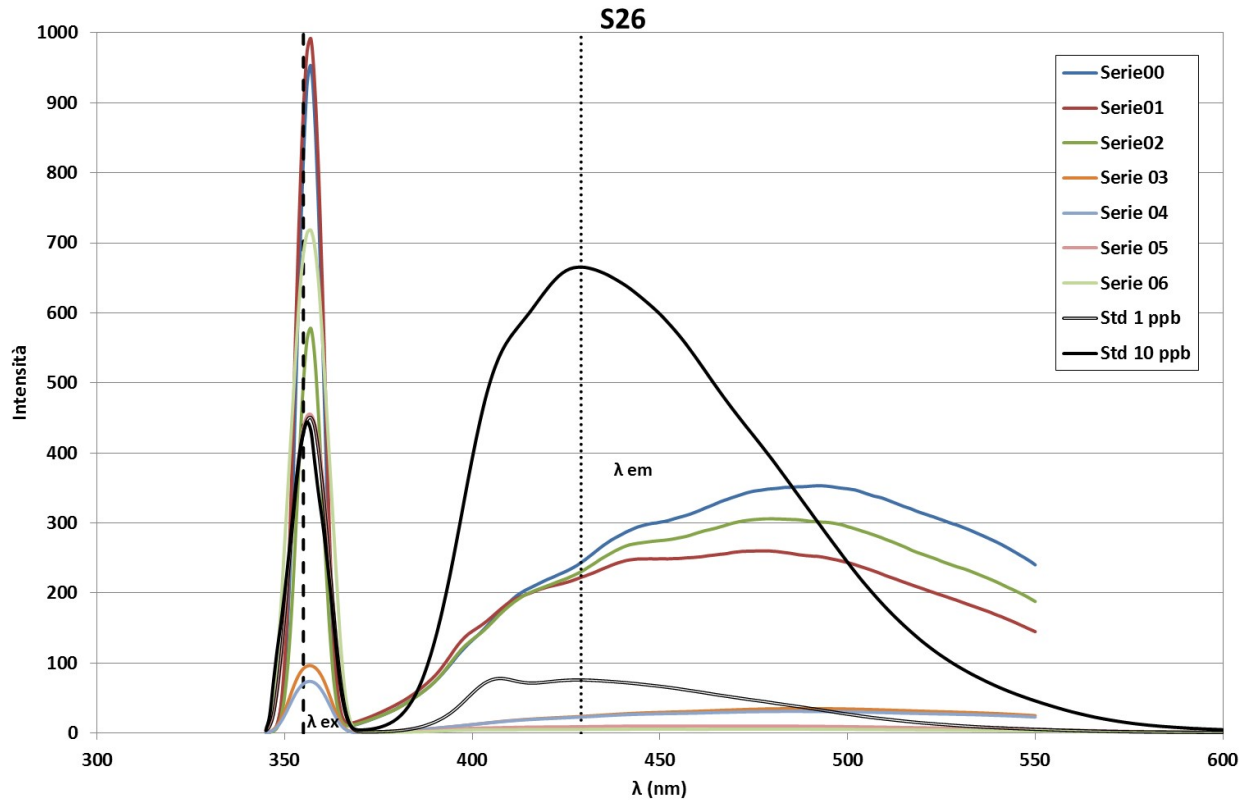


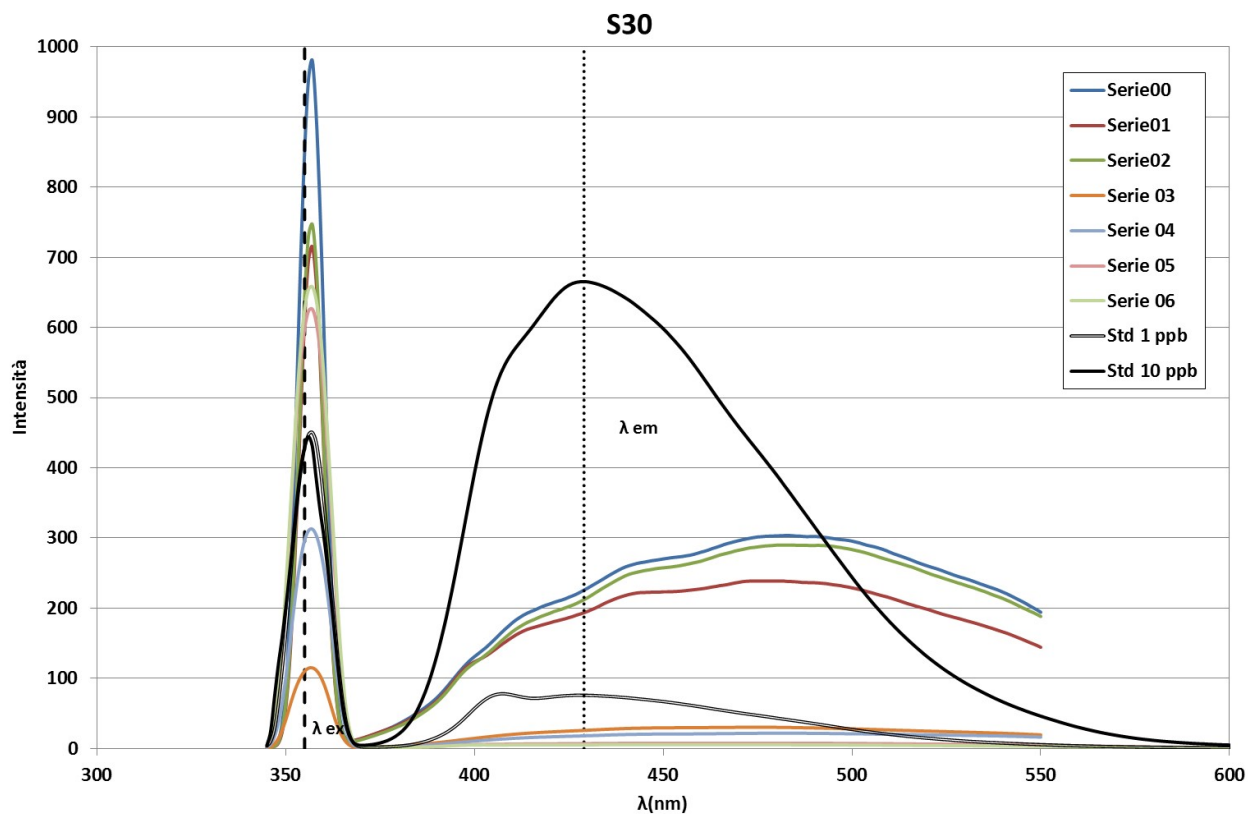
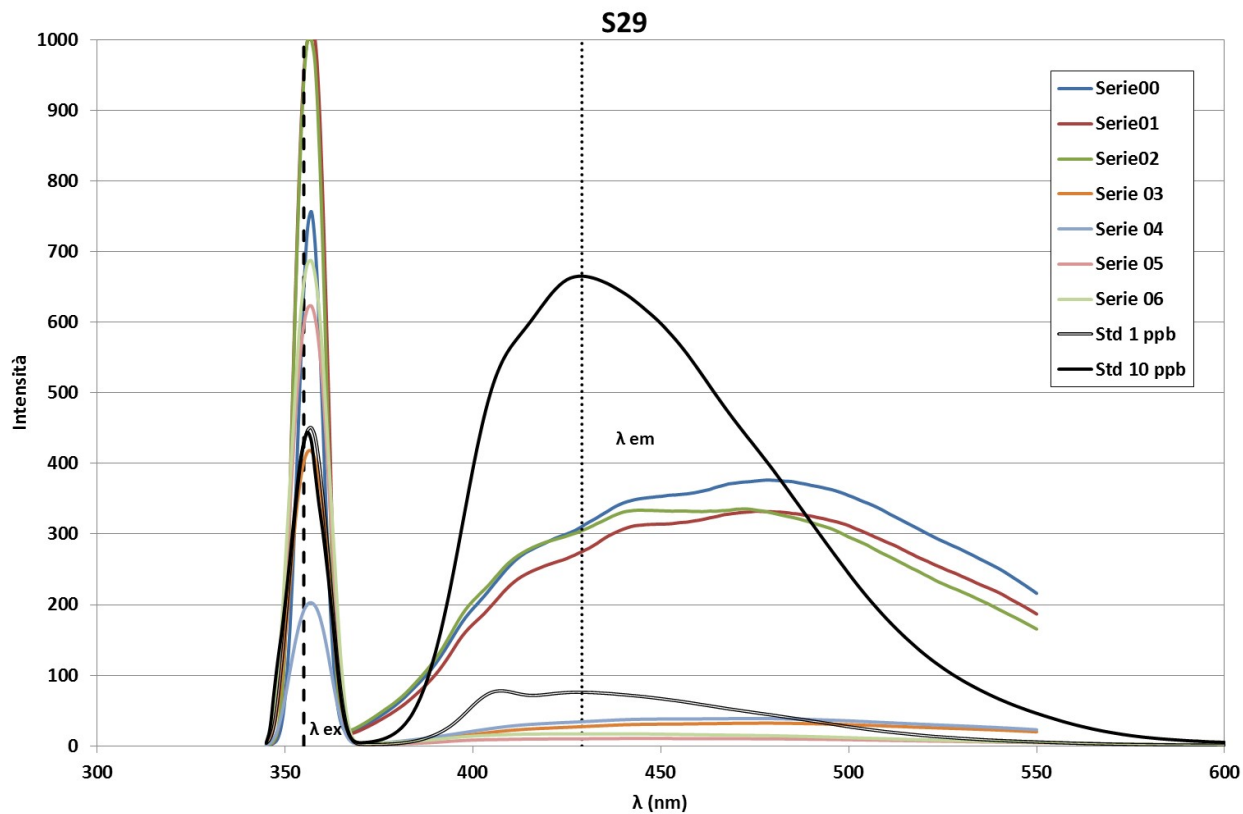
S4

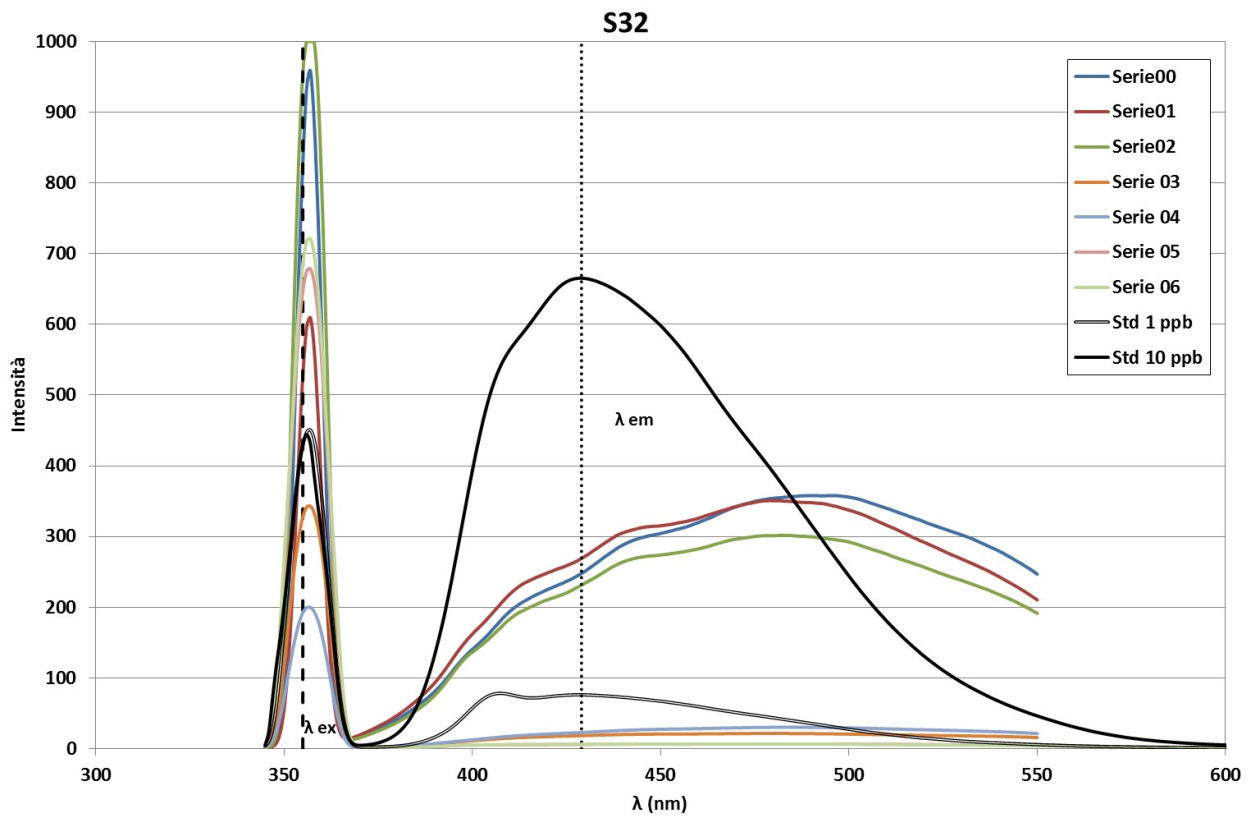
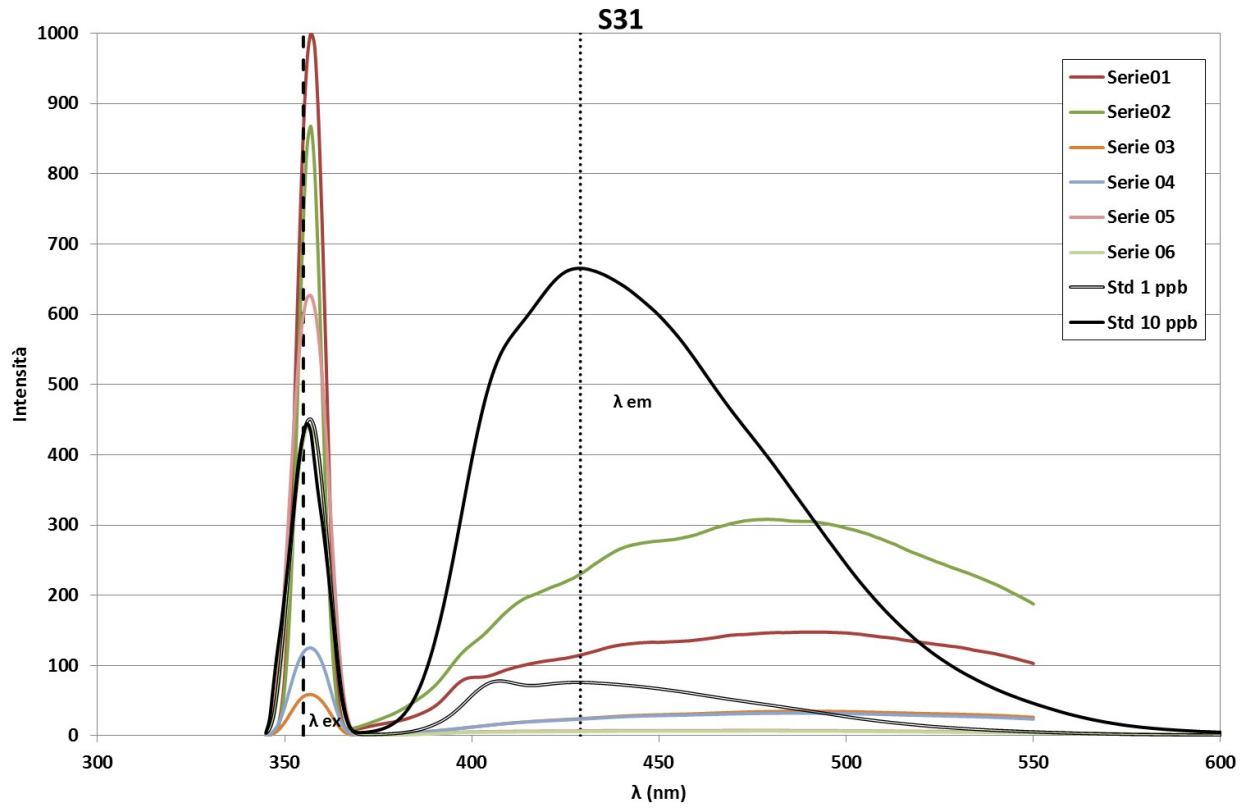


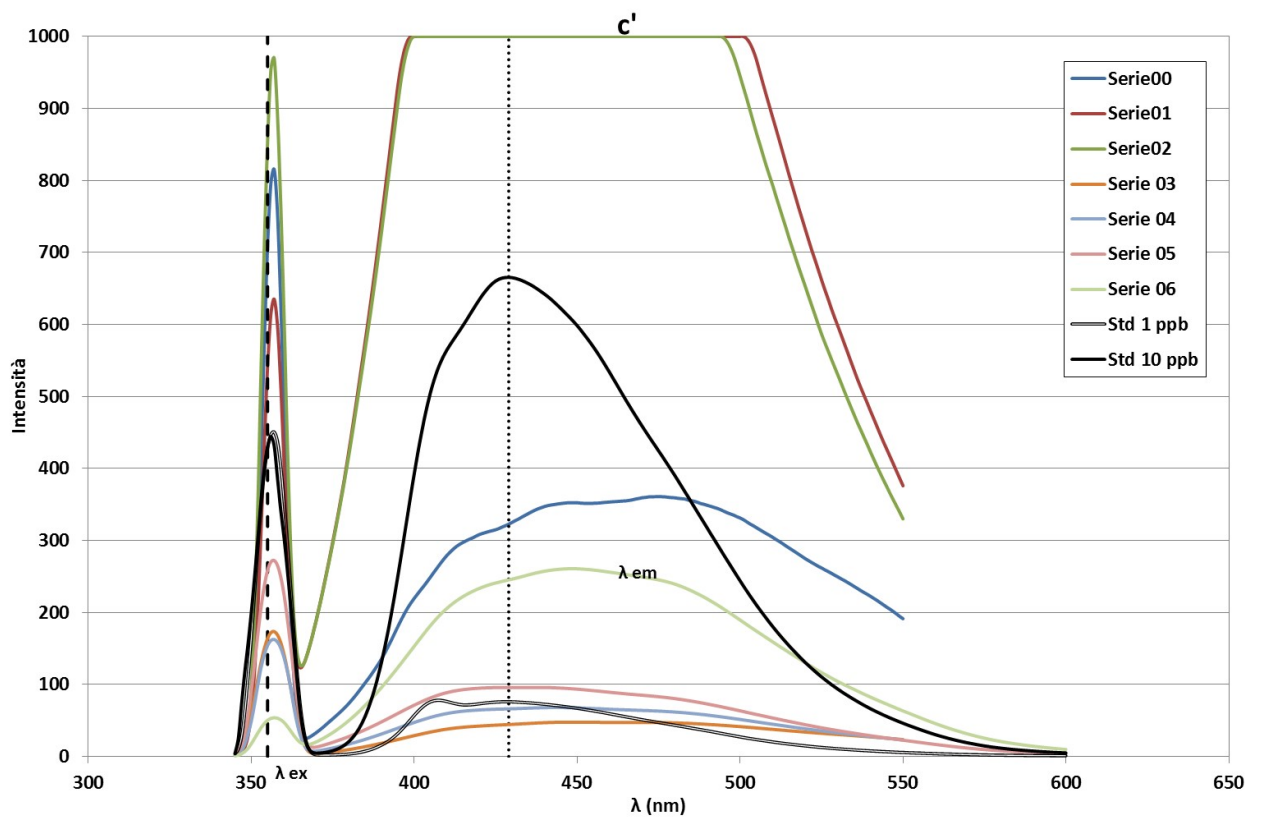
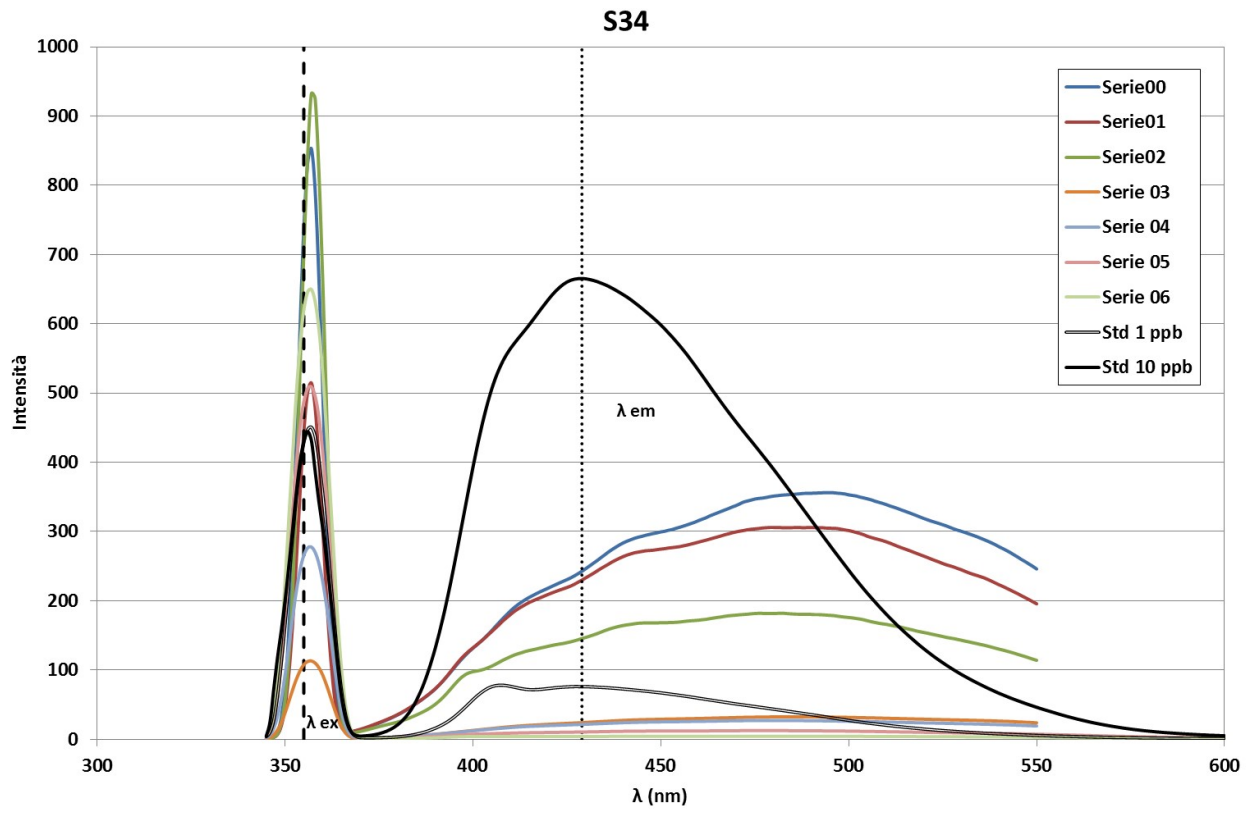
S9

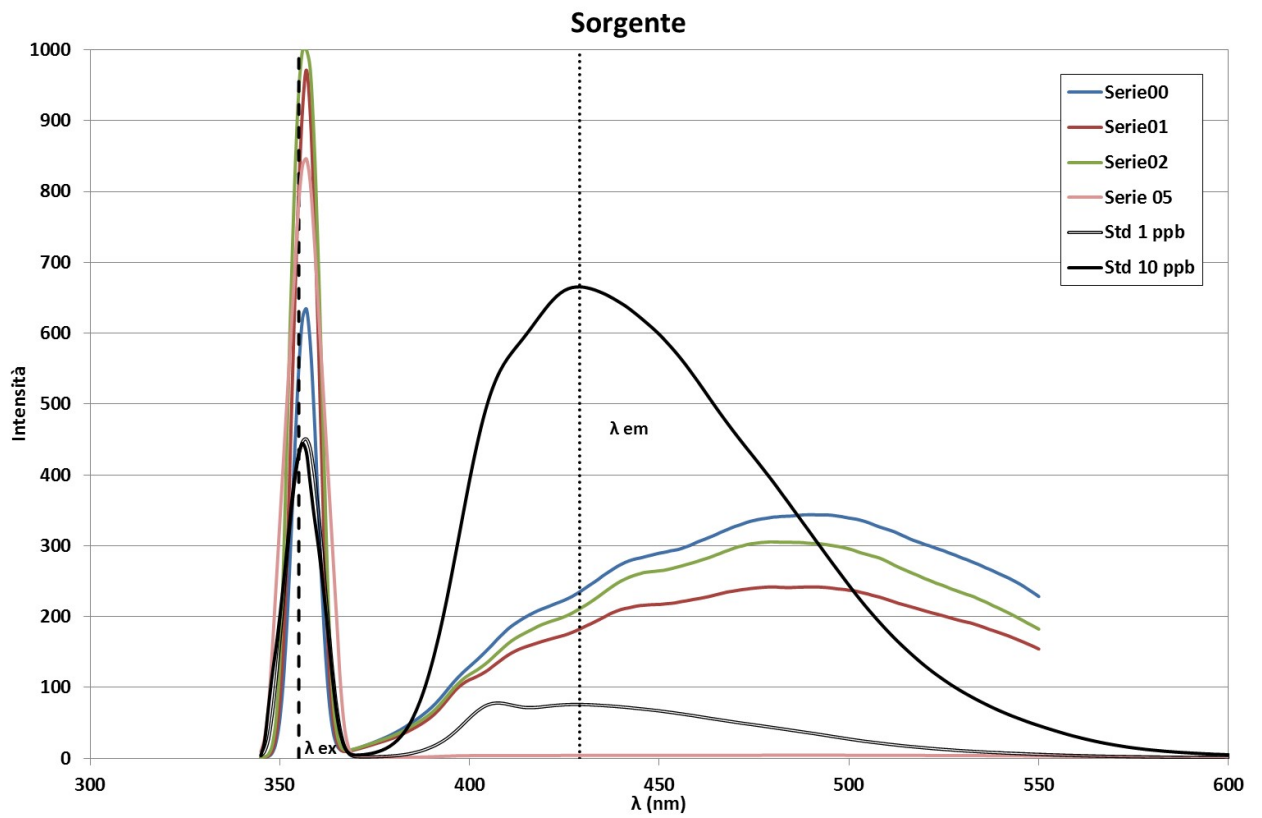
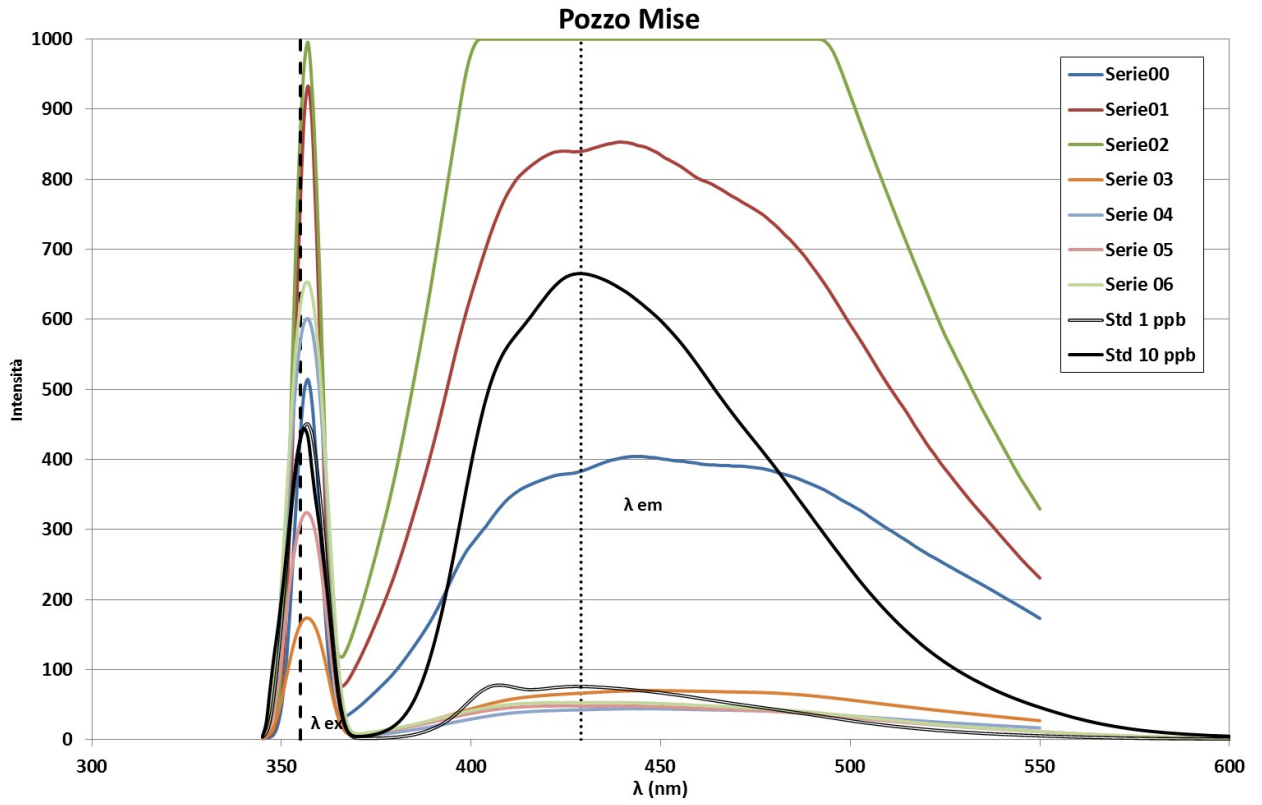












4. CONSIDERAZIONI CONCLUSIVE

Le analisi eseguite non hanno riscontrato la presenza dei traccianti indagati all'interno dei campioni analizzati.

Tutti i campioni analizzati hanno dato esito negativo relativamente alle sostanze Fluoresceina sodica e Sulforodamina G. Sugli spettri di emissione di tutti i campioni non sono, infatti, stati evidenziati picchi di fluorescenza centrati sulle rispettive lunghezze d'onda di emissione. Tale risultato è confermato e validato dal confronto con i risultati analitici dei campioni di bianco ambientale, degli standard di riferimento e dal bianco di laboratorio (soluzione eluente).

La ricerca del Tinopal CBS-X nei fluocaptori, invece, ha presentato le limitazioni note da letteratura (Riva., 1999). infatti in alcuni campioni il valore di background (serie 00) risulta maggiore rispetto ai valori successivi (da serie 01 a serie 06). Questo è maggiormente visibile nei punti di monitoraggio S1, S26, S28, S30, S34, Sorgente. Esse probabilmente sono dovute alla materia organica presente negli ambienti naturali che in sede di analisi può dare origine a fenomeni di interferenza. Le curve ottenute negli altri campioni, nonostante siano ben definite, non sviluppano picchi in corrispondenza della lunghezza d'onda di emissione caratteristica della sostanza e sono da considerarsi dei riscontri negativi.

5. BIBLIOGRAFIA

Aley T, Beeman S. (2015). Procedures and criteria analysis of fluorescent dyes in water and charcoal samplers: fluorescein, eosine, rhodamine wt, and sulforhodamine b dyes. Ozark Underground Laboratory, Inc, Protem, Missouri.

Andre JC, Bouchy M, Niclause M, Baudot P. (1977). Quantitative studies of the synchronous excitation method in spectrofluorimetry: application to tracer concentration measurements in hydrology. *Analytica Chimica Acta*, 92: 369-378.

Audra P. (2001). Valeur et répartition de la dissolution spécifique dans les karsts des montagnes Nakanai, Nouvelle-Bretagne, Papouasie-Nouvelle-Guinée (Karst solution and denudation assessment in Nakanai Mountains). In: Audra P., de Coninck P. and Sounier J.-P. (Ed.), *Nakanai 1978-1998. 20 years of exploration*, Antibes. *Hémisphère Sud*. 77-86.

Cucchi F, Forti P, Marinetti E, Zini L. (2000). Recent developments in knowledge of the hydrogeology of the Classical Karst – *Acta Carsologica*, 29 (1): 55-78.

Farmer N, Blew D, Power I (2011). Fluorescent dye tracer tests and hydrogeology near the Malad Gorge State park (Hopper well test). Open File Report, Idaho Department of Water Resources.

Geyer T, Birk S, Licha T, Liedl R, and Sauter M. (2007). Multitracer Test Approach to Characterize Reactive Transport in Karst Aquifers. *Groundwaters*, 45 (1): 36-45.

Jones W. K. (1984). Dye tracer in karst areas, in *The NSS Bulletin*, Vol.46, n.2, National Speleological Society, Huntsville Alabama, ottobre 1984.

Käss W (1998) *Tracing technique in geohydrology*. Balkema, Rotterdam, The Netherlands, 581 pp.

Licha T, Niedbala A, Bozau E, Geyer T. (2013). An assessment of selected properties of the fluorescent tracer, Tinopal CBS-X related to conservative behavior, and suggested improvements. *Journal of Hydrology* 484: 38–44.

Morgan-Jones M, Bennett S, Kinsella J V. (1984). The Hydrological Effects of Gravel Winning in an Area West of London, United Kingdom. *Ground Water*, 22: 154–161.

Riva A. (1999). Tinopal CBS-XI: un tracciante per lo studio dell 'idrologia degli acquiferi carsici. Gruppo Grotte SolveCai, Belluno.

Tankersley K. B. (1984) Tracing recharge water to porous colluvium in archeological sites, in The NSS Bulletin, Vol.46, n.2, National Speleological Society, Huntsville Alabama, ottobre 1984.

Vincenzi V., Gargini A., Goldscheider N. (2009) Using tracer tests and hydrological observations to evaluate effects of tunnel drainage on groundwater and surface waters in the Northern Apennines (Italy). Hydrogeology Journal, 17(1):135-150. DOI: 10.1007/s10040-008-0371-5.