

**CHEMIA ANALITYCZNA W BADANIU
I OCHRONIE ŚRODOWISKA**

**ANALYTICAL CHEMISTRY IN INVESTIGATION
AND PROTECTION OF THE ENVIRONMENT**

**Beata Krasnodębska-Ostrega*, Joanna Kowalska,
Katarzyna Kińska, Monika Sadowska, Ewa Biaduń**

*Wydział Chemii, Uniwersytet Warszawski
ul. Pasteura 1, 02-093 Warszawa
e-mail: bekras@chem.uw.edu.pl

*Praca została opublikowana w specjalnym numerze
„Wiadomości Chemicznych”, poświęconym pamięci Profesora Stanisława Głaba,
w 70-tą rocznicę Jego urodzin*

Abstract

Wykaz stosowanych skrótów

Wprowadzenie

1. Woltamperometria w oznaczeniach śladowych zawartości analitu w próbkach naturalnych
2. Pośrednie badanie specjacji w próbkach naturalnych – woltamperometria
3. Badanie mechanizmów obronnych hiperakumulatora roślinnego – analiza specjacyjna
4. Fitoremediacja – oczyszczanie skażonego środowiska
5. Technika ekstrakcji do fazy stałej - wydzielenie i zatężenie analitu z próbek naturalnych
6. Frakcjonowanie w badaniu abiotycznych elementów skażonych ekosystemów

Podsumowanie

Piśmiennictwo cytowane

Dr hab. Beata Krasnodębska-Ostręga jako absolwent Technikum Chemicznego w Warszawie związała się z Wydziałem Chemii Uniwersytetu Warszawskiego. Tytuł doktora habilitowanego uzyskała w 2013 roku. Od początku zajmuje się stosowaną chemią analityczną i analityką środowiskową.

Dr Joanna Kowalska studiowała chemię na kierunku Matematyczno-Fizyczno – Chemicznym Uniwersytetu Łódzkiego. Studia doktoranckie realizowała na Wydziale Chemii Uniwersytetu Warszawskiego uzyskując tytuł doktora w roku 2000. Prowadzi badania z zakresu chemii analitycznej i jej wykorzystania w analityce środowiskowej.

Dr Monika Sadowska studia realizowała w Kolegium Międzywydziałowych Indywidualnych Studiów Matematyczno-Przyrodniczych Uniwersytetu Warszawskiego na kierunku podstawowym chemia. W 2008 roku uzyskała tytuł magistra i rozpoczęła studia doktoranckie na Wydziale Chemii UW. Stopień doktora uzyskała w 2014 roku. Prowadzi badania interdyscyplinarne na pograniczu chemii i biologii.

Mgr Katarzyna Kińska w 2005 roku rozpoczęła jednolite studia na kierunku Chemia na Wydziale Chemii Uniwersytetu Warszawskiego. W 2010 roku rozpoczęła studia doktoranckie na Wydziale Chemii Uniwersytetu Warszawskiego.

Mgr Ewa Biaduń studia realizowała na kierunku Chemia na Wydziale Chemii Uniwersytetu Warszawskiego. Tytuł licencjata uzyskała w 2011 roku, a magistra w 2013 roku. W tym samym roku rozpoczęła studia doktoranckie na Wydziale Chemii Uniwersytetu Warszawskiego.

ABSTRACT

The main goal of studies carried in our research group – analytical chemistry in investigation and protection of the environment is the evaluation of the impact of human activity on environmental pollution, and creation of analytical procedures that can be applied in environmental analysis. Detailed description of our research can be found on webpage <http://www.chem.uw.edu.pl/labs/pcas>. In this paper we would like to present only a few topics and analytical challenges that we were dealing with during the last years. The application of anodic and cathodic stripping voltammetry for trace analysis of hazardous metals (cadmium, lead, thallium, platinum, rhodium) in natural samples is described [4–6]. Voltammetry is also presented as a tool used in speciation analysis, which is particularly important in the case of elements which toxicity and assimilation depends on chemical form of the element that is present in the environment (e.g. As) [8]. Attention is also paid to fractionation, which is a specific case of speciation analysis, extremely important for evaluation of mobility and bioavailability of harmful or nutritious substances from soil. As environmental monitoring often requires carrying measurements at trace levels, it might be necessary to preconcentrate the analytes or simplify the composition of the sample before the analysis. For such purposes solid phase extraction (SPE) is widely used and frequently applied. Another analytical task presented in this work is recognition of the defense mechanisms developed by hyperaccumulating plants, e.g. white mustard. This species was investigated for synthesis of phytochelatins – sulphur-rich polipeptides induced by high concentrations of As, Tl, Cd, Pt, Pd and Rh [14]. It is worth noting that plant species that are able to cumulate high amounts of xenobiotics can be used for phytoremediation, which is one of so called “green technologies”, used for restitution of polluted environment, particularly soil [19].

Keywords: woltamperometria, analiza specjacyjna, frakcjonowanie, fitoremediacja, fitochelatyny

Słowa kluczowe: voltammetric methods, speciation analysis, fractionation, phytoremediation, phytochelatins

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

ASV	– anodowa woltamperometria ze wstępnym załączeniem (<i>ang. anodic stripping voltammetry</i>)
CSV	– katodowa woltamperometria ze wstępnym załączeniem (<i>ang. cathodic stripping voltammetry</i>)
AdSV	– woltamperometria z adsorpcyjnym załączeniem (<i>ang. adsorptive stripping voltammetry</i>)
ICP MS	– spektrometria mas z indukcyjnie sprzężoną plazmą (<i>ang. inductively coupled plasma mass spectrometry</i>)
DTPA	– sól kwasu dietylenotriaminopentaoctowego (<i>ang. diethylenetriaminepentaacetic acid</i>)
WKER	– wisząca kroplowa elektroda rtęciowa (<i>ang. hanging mercury drop electrode</i>)
HPLC FLD	– wysokosprawna chromatografia cieczowa z detektorem fluorescencyjnym (<i>ang. high performance liquid chromatography with fluorescence detection</i>)
PC _n	– fitochelatyny (<i>ang. phytochelatins</i>) związki tiolowe o wzorze ogólnym ($\gamma\text{Glu-Cys}$) _n -Gly, gdzie n = 2–11
HPLC ESI MS	– wysokosprawna chromatografia cieczowa ze spektrometrią mas z jonizacją przez elektrozpraszanie (<i>ang. high performance liquid chromatography with electrospray ionization mass spectrometry</i>)
SDS	– dodecylosiarczan sodu (<i>ang. sodium dodecylsulfate</i>)
SLE	– ekstrakcja w układzie ciecz–ciało stałe (<i>ang. solid liquid extraction</i>)
SGX C18	– żel krzemionkowy z grupami oktadecylowymi (<i>ang. silicagel with octadecylgroup</i>)
DDTC	– jon dietyloditiokarbaminianu (<i>ang. diethyl dithiocarbamate ion</i>)
AF	– współczynnik załączenia ksenobiotyku przez roślinę (<i>ang. accumulation factor</i>)
TF	– współczynnik transportu (<i>ang. transfer factor</i>)

WPROWADZENIE

Grupa badawcza w składzie dr hab. Beata Krasnodębska-Ostręga, dr Joanna Kowalska, dr Monika Sadowska, dr Natalia Ospina-Alvarez, dr Ewa Stryjewska, mgr Katarzyna Kińska i mgr Ewa Biaduń, prowadzi badania z zakresu stosowanej chemii analitycznej w ocenie stanu skażenia środowiska naturalnego. Nasza grupa może zawsze liczyć na wsparcie prof. Jerzego Golimowskiego (*profesor emeritus*).

Głównym celem badań prowadzonych w grupie badawczej – chemia analityczna w badaniu i ochronie środowiska jest ocena wpływu działalności człowieka na zanieczyszczenie środowiska oraz opracowywanie procedur analitycznych stosowanych w analityce środowiska. Szczegółowo tematyka naszych badań przedstawiona jest na stronie internetowej <http://www.chem.uw.edu.pl/labs/pcas>. W prezentowanej pracy przybliżono jedynie kilka tematów i zadań analitycznych, które były realizowane w ostatnich latach.

1. WOLTAMPEROMETRIA W OZNACZENIACH ŚLADOWYCH ZAWARTOŚCI ANALITU W PRÓBKACH NATURALNYCH

Oznaczanie zawartości wielu pierwiastków w próbkach środowiskowych wymaga zmagania się z ich niewielkimi stężeniami, a tym samym dysponowania metodami analitycznymi charakteryzującymi się odpowiednio niskimi granicami wykrywalności oraz wysoką precyzją pomiaru. Wśród nich wymienić należy woltamperometrię inwersyjną, umożliwiającą wstępne zażęcenie analitu na powierzchni elektrody. Badana jest zależność rejestrowanego prądu od potencjału przyłożonego do elektrody. Zażęcenie analitu prowadzone jest na drodze jego katodowej redukcji lub powierzchniowej adsorpcji jego kompleksów. W drugim etapie rejestrowane są prądy będące wynikiem anodowego utleniania analitu (woltamperometria anodowa ASV), dalszej katodowej redukcji (woltamperometria katodowa CSV) lub redukcji zaadsorbowanego w procesie zażęcenia kompleksu (woltamperometria z adsorpcyjnym zażęceniem AdSV). Można także wykorzystywać efekty katalityczne, które pozwalają znacznie wzmocnić rejestrowane sygnały. Najczęściej stosowane były i są elektrody rtęciowe (kropla lub film), ale coraz częściej zastępowane są przez znacznie mniej toksyczne elektrody metaliczne lub stopowe stałe. Oferowane przez tę metodę granice wykrywalności są porównywalne a czasami konkurencyjne do granic wykrywalności metody ICP MS – dla większości pierwiastków w złożonych matrycach próbki osiągają ułamki, $\mu\text{g L}^{-1}$ a nawet ng L^{-1} .

Poważnym ograniczeniem metod woltamperometrycznych oznaczania są interferencje od metali wykazujących elektroaktywność w zbliżonym zakresie potencjałów. Kadm, ołów i tal utleniają się przy zbliżonych potencjałach, wzajemnie uniemożliwiając ich oznaczanie. Zastosowanie podpotencjałowego rozpuszczania zażęzonych Cd, Pb i Tl na elektrodzie srebrnej oraz wariantu z odejmowaniem prądu tła pozwoliło na oznaczenie Pb w obecności znacznych zawartości

Cd i Tl w różnych próbkach. Należy jednak podkreślić, że tal może interferować sygnał kadmu [1]. Gdy zaś jako elektroda pracująca zostanie zastosowana elektroda srebrno-złota można oznaczyć śladowe zawartości talu w obecności namiarów Cd i Pb, jednak gdy te nadmiary są znaczne, należy do elektrolitu podstawowego dodać komplekson – DTPA [2]. Wiarygodność metod oznaczania Pb i Tl w wodach, osadach i roślinach była sprawdzona w porównaniu międzymetodycznym z oznaczeniami metodą ICP MS. Zaletą proponowanych metod jest bez wątpienia wdrożenie elektrod z metali szlachetnych, biernych chemicznie i nietoksycznych oraz szybkich (bez odtleniania przed pomiarem).

Woltamperometria z adsorpcyjnym załężaniem ma z kolei istotne znaczenie podczas oznaczeń zawartości platynowców w próbkach środowiskowych [3]. Zainteresowanie pierwiastkami tej grupy jest konsekwencją powszechnego stosowania katalizatorów samochodowych i obserwowanego powolnego wzrostu ich ilości w środowisku. Platyna oznaczana jest na wiszącej kroplowej elektrodzie rtęciowej (WKER). W roztworze elektrolitu tworzy się kompleks metalu z ligandem, który jest adsorbowany przy odpowiednim potencjale na powierzchni elektrody. Bardzo niskie granice wykrywalności platynowców (poniżej 1 ng L^{-1}) osiągnane są dzięki wykorzystaniu procesu katalicznego wydzielania wodoru. Zao i Fresier po raz pierwszy zastosowali do oznaczeń Pt elektrolit podstawowy zawierający formaldehyd, wodorosiarczan hydrazyny (lub wodorosiarczan hydroksyloaminy) i kwas siarkowy. Ale stosowane mogą być także elektrolity, w których hydrazynę zastępuje semikarbazyd, tiosemikarbazyd czy oksym acetonu [4, 5]. Metoda pozwala także na jednoczesne oznaczanie platyny i rodu obok siebie. Śladowe ilości obu pierwiastków były oznaczane w próbkach roślin, gleb i piasku kwarcowego [4–6].

2. POŚREDNIE BADANIE SPECJACJI W PRÓBKACH NATURALNYCH – WOLTAMPEROMETRIA

Analiza specjacyjna jest jednym z największych wyzwań analitycznych, szczególnie jeżeli dotyczy to analityki środowiska. Pośrednie badanie specjacji opiera się na oznaczeniu jednej z form pierwiastka bezpośrednio, a drugiej zaś matematycznie, poprzez odjęcie od całkowitej zawartości analitu – zawartości formy uprzednio oznaczonej. Metody te są istotnym elementem analizy specjacyjnej, mogą być także metodami porównawczymi w walidacji metodyki opartej na rozdzieleniu chromatograficznym i detekcji pierwiastkowej (najpopularniejsza metodyka specjacyjna). Woltamperometria wychodzi naprzeciw konieczności rozróżniania form chemicznych pierwiastków śladowych [7]. Szczególnie istotne jest to w przypadku analitów, których toksyczne właściwości oraz przyswajalność zależne są od tego, w postaci jakiego związku pierwiastek jest obecny w środowisku.

Klasycznym przykładem takiego analitu jest arsen. Dla organizmów najbardziej szkodliwe działanie wykazują nieorganiczne arseniany(III), charakteryzujące się silnym powinowactwem do grup tiolowych i dezaktywujące działanie wielu enzymów,

oraz arseniany(V), które ze względu na swoje podobieństwo do fosforanów zaburzają cykl Krebsa. Kwasy monometyloarsenowy i dimetyloarsenowy są znacznie mniej szkodliwe, podczas gdy arsenobetaina i arsenocholina uznawane są za całkowicie nieszkodliwe. Selektywne oznaczenie nieorganicznych form As(III) i As(V) może być prowadzone metodą woltamperometrii inwersyjnej na wiszącej kroplowej elektrodzie rtęciowej. W roztworach kwasów nieorganicznych jedynie nieorganiczny As(III) jest aktywną elektrochemicznie formą tego pierwiastka. Ze względu na niewielką jego rozpuszczalność w rtęci przeprowadzenie oznaczeń wymaga obecności w elektrolicie podstawowym, którym jest najczęściej kwas solny, jonów miedzi (II). Oznaczenie zawartości nieorganicznych związków As(V) wymaga przeprowadzenia wstępnej chemicznej redukcji As(V) za pomocą KI i kwasu askorbinowego, chlorowodoru hydroksyloaminy czy ditionianu sodu. Metoda woltamperometrii katodowej umożliwiła nam oznaczenie nieorganicznych arsenianów(III) i (V) w ekstraktach gleb, pobranych na terenach skażonych tym pierwiastkiem [8]

Metody anodowej woltamperometrii inwersyjnej ze wstępnym załączeniem (ASV) cechują się bardzo niskimi granicami oznaczalności w przypadku talu, dlatego z powodzeniem mogą być wykorzystywane do oznaczania zawartości śladowych ilości tego metalu w próbkach naturalnych. Fakt, że obie formy (Tl(I) i Tl(III)) występują w środowisku naturalnym i różnią się reaktywnością oraz toksycznością powoduje, że w przypadku tego pierwiastka badanie specjacji w środowisku jest także konieczne [9, 10]. Jon talu(I) nie napotyka praktycznie żadnych barier w organizmie, ze względu na podobieństwo do jonu potasu, zaś szkodliwość talu(III) jest porównywalna do Hg(II). Związki talu(I) i talu(III) różnią się szeregiem właściwości, między innymi elektroaktywnością. Można wykorzystać tę różnicę w definiowaniu specjacji. W celu oznaczenia specjacji talu w próbce wody morskiej metodą różnicowej woltamperometrii inwersyjnej z anodowym załączeniem (DPASV) należy wykonać dwie serie oznaczeń. Pierwsza to oznaczenie całkowitej zawartości talu, czyli sumy Tl(I) i Tl(III) po redukcji do Tl(I). Drugie oznaczenie polega na określeniu zawartości Tl(I) bezpośrednio w próbkach, w których Tl(III) pozostaje w postaci nieaktywnego elektrodowo kompleksu z DTPA. Metoda ta umożliwia rozróżnienie obu tych form, gdy zawartość Tl(III) stanowi co najmniej 3% całkowitej zawartości talu. Nie jest zaś wrażliwa na znaczne zasolenie próbki, czy wysokie zawartości Pb i Cd, jonów interferujących pomiar talu [11]. Dużo trudniejszym obiektem badań jest ekstrakt roślinny. Wymaga to przygotowania roztworu elektrolitu podstawowego tak, aby umożliwiał pomiar śladowych ilości metalu w obecności związków organicznych, które także są elektroaktywne. Schemat analizy jest oparty na oznaczeniu całkowitej zawartości talu po mineralizacji ekstraktu w piecu mikrofalowym i oznaczeniu zawartości Tl(I) po dodatku do naczynia pomiarowego roztworu DTPA i żywicy anionowymiennej. W tych warunkach jedynie jednowartościowy kation talu ulega załączeniu na elektrodzie rtęciowej [12]. Obie metody pośredniego oznaczania specjacji talu zostały ocenione poprzez

badania odzysku i porównanie międzymetodyczne z wynikami oznaczenia metodą ICP MS po rozdzieleniu na kolumnie wykluczania.

3. BADANIE MECHANIZMÓW OBRONNYCH HIPERAKUMULATORA ROŚLINNEGO – ANALIZA SPECJACYJNA

Rośliny porastające zanieczyszczone tereny narażone są na wpływ podwyższonych zawartości wielu pierwiastków, których obecność stanowi poważne zagrożenie dla przebiegu ich wegetacji. Istnieją jednak gatunki wykazujące zdolność bardzo efektywnego zateżnienia ksenobiotyków (substancji chemicznych niebędących naturalnym składnikiem organizmu) w tkankach, bez widocznych zmian w ich morfologii czy też produkcji biomasy. Jakie mechanizmy obronne wykorzystują? Jedną z reakcji organizmów na działanie czynnika stresowego, jakim jest podwyższona zawartość niektórych pierwiastków, jest synteza bogatych w grupy tiolowe związków – fitochelatyn. Fitochelatyny są niskocząsteczkowymi peptydami, stanowiącymi III klasę metalotionein i pełniącymi niezwykle istotną funkcję, ponieważ są zdolne do bezpośredniego kompleksowania jonów „metali ciężkich”. Tak skompleksowane jony transportowane są do wakuoli, gdzie nie stanowią już zagrożenia.

Badania związane z tą tematyką, podjęte w naszej grupie wykorzystują gatunek wykazujący zdolność akumulacji pierwiastków o toksycznych właściwościach (m.in. As, Pt, Tl) [13]. Jest to gorczyca biała (*Sinapis alba* L.), roślina powszechnie uprawiana, a także dziko występująca w Polsce oraz w wielu innych krajach znajdujących się w strefie klimatu umiarkowanego. Należy do rodziny krzyżowych (*Brassicaceae*), zwyczajowo nazywanych kapustnymi.

Oznaczenia fitochelatyn syntezowanych w tkankach roślin prowadzone są po ich chromatograficznym rozdzieleniu (HPLC) wykorzystując detektor fluorescencyjny (FLD), detektor UV lub spektrometr mas z jonizacją przez elektrorozpraszanie (ESI MS). Przed oznaczeniami fitochelatyn i innych związków tiolowych, aby zapewnić ich trwałość stosowana jest często derywatywacja przedkolumnowa z użyciem monobromobimanu, który reaguje z tiolami szybko w temperaturze pokojowej w roztworach o pH 8, dając tioetery charakteryzujące się wysoką emisją promieniowania fluorescencyjnego. Zastosowanie metody HPLC FLD w derywatywowanych próbkach roślinnych pozwoliło ustalić, czy gorczyca biała w obecności związków arsenu [14], platyny, palladu, rodu czy talu syntezuje fitochelatyny. W trakcie badań wykazano obecność fitochelatyn PC2, PC3 i PC4 w liściach i korzeniach oraz fitochelatyny PC3 w łodygach gorzycy białej uprawianej z dodatkiem nieorganicznych soli arsenu. Zastosowanie metody HPLC ESI MS w próbkach nie poddawanych procesowi umożliwiło identyfikację kompleksów arsenu As-PC3 i As-PC4 w korzeniach gorzycy. W przypadku pierwiastków z grupy platynowców największe zawartości fitochelatyn (PC2, PC3 i PC4) znaleziono w liściach roślin porażonych przez sole palladu. W przypadku talu nie stwierdzono syntezy fitochelatyn. Podjęto zaś badania, które miały na celu określenie frakcji różnych form talu występujących w tkan-

kach roślinnych, a różniących się hydrofobowością. W celu określenia, jaka część talu zawartego w tkankach gorczyicy uprawianej hydroponicznie jest łatwo rozpuszczalna, zastosowano ekstrakcję wodą. Wytrząsanie w obecności buforu octanowego i DTPA miało z kolei na celu wymycie frakcji rozpuszczalnej w obecności jonów kompleksujących, a w szczególności wymycie talu z ewentualnych połączeń Tl(III). Użycie 4% SDS (dodecylsulfianu sodu) miało na celu sprawdzenie, czy tal występuje w roślinie w połączeniach hydrofobowych (np. białkowe kompleksy). Uzyskane wyniki wskazały, że 50% całkowitej zawartości talu w liściach jest rozpuszczalna w wodzie. Wzrost wydajności ekstrakcji roztworem wodnym DTPA i octanów do 65% może sugerować, że DTPA podstawia ligandy w słabych kompleksach z Tl(III). Porównywalna wydajność ekstrakcji roztworem SDS i wodą świadczy o braku połączeń hydrofobowych talu [15].

Kolejne badania dotyczyły specjacji chemicznej talu w próbkach gorczyicy białej. Zastosowano metodę LC ICP MS z kolumną anionowymienną oraz wykluczania. Rozdzielenie Tl(I) i Tl(III) z użyciem kolumny anionowymiennej trwa prawie 4-krotnie krócej niż w kolumnie wykluczania, metoda ta jest jednak zbyt mało selektywna w przypadku znacznego nadmiaru Tl(I) w stosunku do Tl(III). Do takich próbek należy stosować kolumnę wykluczania, aby uniknąć nakładania się sygnałów obu form talu. Obecność Tl(III) stwierdzono w roślinach uprawianych w różnych warunkach – zarówno w kulturach hydroponicznych, jak i na podłożu stałym [16]. W uzyskanym materiale Tl(III) stanowił do 10% całkowitej zawartości wyekstrahowanego Tl [10]. Większy udział formy utlenionej zaobserwowano w przypadku roślin zdrowych, nie wykazujących zmian w morfologii, co wskazuje na istnienie mechanizmu obronnego, polegającego na utlenianiu Tl(I) do Tl(III) w celu jego detoksykacji [17]. Analiza pożywki, w której uprawiane były rośliny, nie wykazała obecności Tl(III). Tal jest zatem pobierany jako Tl(I) i utleniany dopiero w tkankach roślin. Możliwość istnienia mechanizmu detoksykacyjnego Tl polegającego na jego utlenianiu potwierdzają także badania oddziaływań różnych form chemicznych Tl z syntetycznymi oligonukleotydami – chelat Tl(III), w przeciwieństwie do jonów Tl(I), nie powoduje uszkodzeń nici DNA [18].

4. FITOREMEDIACJA – OCZYSZCZANIE SKAŻONEGO ŚRODOWISKA

Fitoremediacja jest jedną z proponowanych obecnie metod oczyszczania skażonego środowiska, szczególnie gleb [19]. Ta metoda, zaliczana do tzw. „zielonych technologii”, wymaga wskazania roślinnych remediatorów. Są to takie gatunki roślin, które wykazują zdolność zateżnienia znacznych ilości ksenobiotyków w swoich tkankach, a także charakteryzują się szeregiem cech pożądaných z punktu widzenia fitoremediacji – szybkim przyrostem biomasy, niewielkimi wymaganiami glebowymi oraz odpornością na niekorzystne warunki atmosferyczne.

Ocena przydatności gatunku do fitoremediacji rozpoczyna się od jego charakterystyki w warunkach laboratoryjnych [20]. Początkowo badania prowadzone

są na roślinach uprawianych w hodowlach hydroponicznych, co pozwala na pełną kontrolę warunków rozwoju roślin i gwarantuje, że jedynym stresorem jest dodawany do pożywki ksenobiotyki. W kręgu naszych zainteresowań są związki arsenu, talu i metali z grupy platynowców. Tolerancja gorczycy na obecność ksenobiotyki określana jest na podstawie wizualnej oceny stanu roślin uprawianych w obecności różnych stężeń soli badanego pierwiastka w pożywce. Obserwowane są nieswoiste zmiany w morfologii roślin, obejmujące spadek produkcji biomasy, ograniczony wzrost, odbarwienia i deformacje liści. Najistotniejsze zmiany obserwowano u roślin narażonych na obecność soli talu, już wtedy, gdy jego stężenie w pożywce przekraczało $100 \mu\text{g L}^{-1}$. Stopień deformacji był większy przy jednoczesnym oddziaływaniu na roślinę talu oraz kadmu [17]. Nie obserwowano znacznych efektów fitotoksycznych u roślin uprawianych w obecności jonów platyny i rodu nieprzekraczających $500 \mu\text{g L}^{-1}$, podczas gdy rośliny narażone na obecność $500 \mu\text{g L}^{-1}$ palladu oraz wyższe stężenia Pt i Rh charakteryzowały się zahamowanym wzrostem oraz obsychaniem i zmianami w kolorze liści. Z kolei obecność związków arsenu, nawet na poziomie $1000 \mu\text{g L}^{-1}$ nie tylko nie wpływa negatywnie na rozwój roślin, lecz wręcz przyspiesza ich wzrost (Rys. 1).



Rysunek 1. Porównanie roślin pochodzących z wybranych upraw: gorczyca biała po 4-tygodniowej uprawie w pożywkach zawierających sole talu, kadmu, arsenu ($500 \mu\text{g L}^{-1}$) oraz bez obecności ksenobiotyki (K)

Figure 1. White mustard plants after 4 weeks of hydroponic cultivation in nutrient solutions containing inorganic salts of thallium, cadmium, arsenic ($500 \mu\text{g L}^{-1}$) and without any xenobiotics (K)

Całkowitą zawartość wybranych pierwiastków w poszczególnych organach roślin oznaczono metodą ICP MS i na tej podstawie wyznaczono współczynniki załężania (AF) oraz współczynniki transportu (TF). Wartości te posłużyły do oceny efektywności pobierania ksenobiotyki z podłoża oraz ich translokacji do nadziemnych części rośliny. Gorczyca biała wykazuje zdolność załężania znacznych ilości talu w tkankach ($AF = 200\text{--}600$), a także efektywnie transportuje ten pierwiastek do

nadziemnych organów rośliny ($TF > 1$). Kadm przeciwnie, jest zatrzymywany głównie w korzeniach, podobnie jak arsen i platynowce. Jony platyny podawane w formie azotanu są znacznie lepiej przyswajane i efektywniej transportowane do części nadziemnych ($AF = 50-1500$; $TF \sim 0,1$) niż te znajdujące się w formie chlorkowej ($AF = 5-1500$; $TF \ll 0,1$) czy też w postaci nanocząstek ($AF = 1-200$; $TF \ll 0,1$) [21]. Związki arsenu akumulowane są głównie w korzeniach gorczycy – ponad 80%, ale w istotny sposób zależy to od formy tego pierwiastka w pożywce. Najwyższy współczynnik translokacji (0,5–2,7) obserwowany jest w przypadku wprowadzenia do pożywki dimetylowych pochodnych tego pierwiastka.

Kolejny etap to badania roślin uprawianych na stałym podłożu w warunkach laboratoryjnych oraz zebranych w miejscach ich naturalnego występowania, także na terenach zanieczyszczonych. W przypadku upraw na stałym podłożu, gdzie zachodzi częściowe unieruchomienie pierwiastków w glebie, często nie obserwuje się zmian w morfologii roślin. Uprawy gorczycy w obecności osadów dennych [10], zawierających odpady przeróbki rud siarczkowych, stanowiące źródło skażenia wieloma metalami, potwierdzają zdolność gorczycy do selektywnej ekstrakcji talu z podłoża (znacznie wyższe współczynniki zateżenia Tl niż Cd, Zn czy Pb), co jest interesującą właściwością i może zostać wykorzystane do oczyszczania metodą fitoremediacji terenów skażonych odpadami poflotacyjnymi, które w Polsce stanowią główne źródło zanieczyszczenia środowiska talem [22]. Badania roślin naturalnie porastających tereny skażone arsenem – takie jak trawy czy paprocie w Żłotym Stoku – wykazały – podobnie jak w przypadku upraw hydroponicznych, że arsen kumulowany jest głównie w podziemnych częściach roślin. Ale, co warto podkreślić, w liściach traw wykazano obecność organicznych pochodnych arsenu [23].

Wyzwaniem dla współczesnych technologii jest dobór korzystnych ekonomicznie metod, które są najbardziej efektywne, opłacalne i zgodne z wytycznymi dla „zielonych technologii”. Prowadzenie fitoodzysku talu na terenie olkuskiego rejonu wydobywania rud ołowiuowo-cynkowych z wykorzystaniem gatunku *Sinapis alba* L. [10] bez wątpienia stanowi tego rodzaju technologię. Zastosowanie fitoremediacji w skali technologicznej wymaga szeregu działań, między innymi oceny ekonomicznej opłacalności. Stwierdziliśmy, na podstawie danych literaturowych i własnych symulacji ekonomicznych, że ze względu na parametry fizykochemiczne gleb w rejonie olkuskim [24], zastosowanie fitoekstrakcji talu bez wspomaganie chemicznego może nie przynieść pożądanego rezultatu. Długotrwałość procesu redukcji stężenia metali do pożądanego poziomu przemawia na ekonomiczną niekorzyść zastosowania remediacji w oparciu o fitoekstrakcję. Wymienione trudności jakie dotyczą fitoekstrakcji, skłaniać mogą do pochopnych wniosków, iż daje ona nieopłacalne rezultaty zastosowania. Stanowi ona jednak doskonałe uzupełnienie metod tradycyjnie stosowanych w oczyszczaniu gruntów skażonych. Warto zatem podjąć próbę jej stosowania dla uzyskania trwałych efektów oczyszczania i ochrony gleb [25].

5. TECHNIKA EKSTRAKЦИИ DO FAZY STAŁEJ – WYDZIELENIE I ZATĘŻENIE ANALITU Z PRÓBEK NATURALNYCH

Pierwiastki w środowisku bardzo często występują na bardzo niskim poziomie stężeń, poniżej granicy wykrywalności metod oznaczania, a ich oznaczanie jest niezbędne. Aby poprawić granicę oznaczalności procedury analitycznej należy analit wydzielić lub/i zatężyć. Technika idealnie nadająca się do tego celu analitycznego jest ekstrakcja do fazy stałej (SPE). W SPE, podobnie jak w technice chromatografii cieczowej, rozdzielanie następuje między fazę ciekłą (matryca próbki), a fazę stałą (sorbent). Pierwszy etap ekstrakcji to przemywanie sorbentu odpowiednim rozpuszczalnikiem w celu aktywacji grup znajdujących się na nim. W drugim etapie następuje wprowadzenie badanej próbki. W czasie przepuszczania próbki następuje częściowe oddzielenie matrycy. Część matrycy może zostać współzatrzymana na sorbencie. Następnie składniki matrycy są wymywane w obecności odpowiedniego rozpuszczalnika, który nie wymyje analitu z sorbentu. Ostatni etap polega na wymyciu analitu.

W badaniach wykorzystaliśmy metodykę SPE do wydzielenia i zatężenia Tl(III) z wody morskiej zawierającej obie formy talu (Tl(I) i Tl(III)). Zastosowaliśmy żel krzemionkowy z grupami oktadecylowymi (SGX C18) modyfikowany chemicznie poprzez nałożenie na sorbent dietyloditiokarbaminianu (DDTC). Wykazano, że dopiero tysiąckrotny nadmiar Zn(II), Sn(II), Cd(II) oraz już siedemsetkrotny nadmiar Pb(II) zaburza prawidłową pracę sorbentu, natomiast dużo wyższe nadmiary Cu(II) oraz obecność chlorków (do 3%) nie mają wpływu na zatężanie Tl(III). Prawidłowość działania sorbentu SGX C18 i trwałość kompleksu Tl(III)DDTC są zachowane w przypadku próbek o objętości 2–20 mL. Tal(III) w postaci wewnętrznego kompleksu z karbaminianem wymywano etanolem, który można było odparować (zatężenie). W próbkach naturalnych, w których przeważał tal (I) względem talu (III) zredukowana forma tego pierwiastka po etapie nakładania próbki częściowo pozostawała w kolumnie i zawyżała wartości odzysku Tl(III). Dlatego dodano dodatkowy etap „domywania” Tl(I) wodą DI i rozcieńczonym roztworem kwasu azotowego [26].

Oznaczanie Pt oraz Rh w próbkach gleb i piasków zbieranych podczas długoterminowego monitoringu wpływu szlaków komunikacyjnych na stan środowiska wzdłuż tych tras jest praktycznie niemożliwe bez wydzielenia tych metali z matrycy próbki i ich zatężenia. W tym celu w naszych badaniach wykorzystaliśmy anionowy-mienny sorbent Cellex-T. Przeprowadzona optymalizacja procedury wykazała, że sorbent ten efektywnie zatrzymuje platynę (>95%), natomiast nie zatrzymuje rodu (<10%). Efektywne wymycie zatrzymanych na kolumnie platynowców (Pt i Pd) najczęściej prowadzone jest z wykorzystaniem roztworu tiomocznika. Na podstawie badań stwierdzono, że niezależnie od pH roztworu tiomocznika jedynie odzysk palladu jest ilościowy (100 ± 9%), podczas gdy odzysk platyny nie przekracza 75%. Zastąpienie roztworu tiomocznika 2 mol L⁻¹ HCl pozwoliło na 100% odzysk Pt, co więcej stwierdzono, że platyna może być zatężona z 50 mL próbki. Obecność jonów

Pb(II), Cd(II), Zn(II), Ni(II) oraz Fe(II) nie wpływa na zatrzymanie i wymycie platyny. Opracowaną procedurę ekstrakcji do fazy stałej zastosowano przed woltamperometrycznym oznaczaniem Pt w próbkach gleb. Podobnie jak w przypadku certyfikowanego materiału odniesienia BCR-723 (pył drogowy) zaobserwowano znaczne poprawienie czułości i powtarzalności metody po procesie ekstrakcji. Wyniki otrzymane metodą woltamperometryczną były zgodne z tymi otrzymanymi metodą ICP MS [6].

6. FRAKCJONOWANIE W BADANIU ABIOTYCZNYCH ELEMENTÓW SKAŻONYCH EKOSYSTEMÓW

Do abiotycznych elementów środowiska przyrodniczego zalicza się wodę oraz glebę, które pozostają w ścisłej zależności z biocenozą. Składają się one z roztworów, substancji mineralnych oraz fazy organicznej, która jest środowiskiem życia dla wielu organizmów. Odgrywają one ważną rolę w funkcjonowaniu ekosystemów, a także w obiegu pierwiastków w środowisku, dlatego tak ważne jest ich badanie i to nie tylko oznaczanie całkowitych zawartości ksenobiotyków. Bardzo istotna jest ocena ich mobilności, wskazanie faz odpowiadających za ich retencję. Tego typu analizę nazywa się analizą specyjalną. Szczególnym przypadkiem tego typu analizy jest frakcjonowanie. Frakcjonowanie to proces klasyfikacji analitu lub grupy związków ze szczególnej próbki względem ich fizycznych (rozmiar, rozpuszczalność) lub chemicznych (wiązania, reaktywność) właściwości. Izolując określoną frakcję i określając jej skład ilościowy oraz jakościowy prowadzimy frakcjonowanie definiowane operacyjnie. W tym ujęciu, pod pojęciem frakcji, rozumiane jest ilościowe zdefiniowanie analitu wymywanego określonym ekstrahentem w danych warunkach. Głównym narzędziem pracy analitycznej z osadami, a także z glebami, jest ekstrakcja próbki stałej roztworem określonego reagenta. Ekstrakcja tego typu zwana jest potocznie SLE z angielskiego *Solid Liquid Extraction*. Natomiast jako faza rozumiana jest ta część osadu, z której uwalniana jest frakcja w danych warunkach [27].

Ekstrakcję pojedynczą, czyli jednokrotne działanie danym odczynnikiem na porcję osadu, stosuje się najczęściej w celu określenia mobilności oraz biodostępności pierwiastków toksycznych lub substancji odżywczych dla roślin. Przez biodostępność rozumiana jest tu ekstrapolacja dostępności na podstawie ogólnie przyjętych schematów ekstrakcji typu SLE badanych pierwiastków dla organizmów żywych. Pojęcie mobilności definiuje ilość analitu, która w wyniku zmian np. potencjału „redox” lub pH gleby może ulec transformacji i redystrybucji w obrębie badanej matrycy. Ekstrakcja pojedyncza kwasem octowym jest powszechnie akceptowanym narzędziem analitycznym w definiowaniu mobilności metali w glebach. Można skrócić czas trwania ekstrakcji z 16 godzin do 45 minut wspomagając ją ultradźwiękami [28]. Wykorzystując pojedyncze ekstrakcje kwasem octowym, octanem amonu oraz nadtlenkiem wodoru stwierdziliśmy, że 15% całkowitej zawartości

metali w zawieszynie odcieków łatwo zostanie wymyta podczas procesu biodegradacji odpadów.

Ekstrakcja w układzie sekwencyjnym polega na następujących kolejno po sobie wymyciach z tej samej próbki z użyciem ekstrahentów o coraz większej mocy. Każdym z kolejnych roztworów działa się na pozostałość próbki po reakcji z poprzednim odczynnikiem. Stosowanie ekstrakcji sekwencyjnej daje szerszy obraz wiązania wybranych ksenobiotyków z matrycą gleby. Wskazać można poszczególne frakcje mineralne odpowiadające za retencję wybranych analitów oraz określić warunki, kiedy zostaną one włączone w obieg chemiczny. W przypadku osadów takie badania też były prowadzone, i potwierdziły tezę, że węglany są głównym źródłem mobilnych metali domieszkujących rudy Pb-Zn [29]. W przypadku odpadów z hałd odpadów przemysłu metalurgicznego zastosowanie frakcjonowania w układzie ekstrakcji sekwencyjnej jest źródłem cennych informacji o mobilności przed i po bioługowaniu określonymi szczepami bakterii [30, 31].

Specjacja fizyczna uwzględnia występowanie analitu w badanej próbce w postaci wolnej bądź związanej. W przypadku próbek wód część analitu występuje w postaci rozpuszczonej, zaś pozostała część związana jest z zawiesziną. Przesączenie próbki na sączku umożliwi rozdzielenie obu frakcji. W przypadku próbek wodnych najczęściej w celu rozfrakcjonowania stosuje się sączenie na filtrze o średnicy 0,45 μm . Wykorzystując połączenie frakcjonowania fizycznego (filtracja) w układzie pojedynczym i sekwencyjnym oraz ekstrakcji chemicznej z fazy zawiesiny udało się ocenić zawartość całkowitą [24] oraz udziały poszczególnych frakcji w tej zawartości dla szeregu metali w wodzie odpadowej. Stwierdzono, że zawieszina odgrywa istotną rolę w ich dystrybucji [9], a zmienność opadów jest czynnikiem istotnym w ograniczeniu migracji tych metali, szczególnie w rejonach silnej eksploatacji złóż rud metali.

PODSUMOWANIE

Nasza praca badawcza jest nie tylko związana z badaniami podstawowymi, służącymi zrozumieniu natury zjawisk zachodzących w środowisku naturalnym. Często jej efekty mogą być bezpośrednio wykorzystane w procesie oceniania skutków skażenia różnych ekosystemów. Dostarczają narzędzi – procedur analitycznych, które definiują metodę pobrania i przygotowania próbki, podają sposób rozkładu próbki oraz jej analizy, a także metodykę oceny jakości uzyskanych wyników.

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] B. Krasnodębska-Ostręga, J. Piekarska, *Electroanal.*, 2005, **17**, 815.
- [2] B. Krasnodębska-Ostręga, J. Pałdyna, J. Golimowski, *Electroanal.*, 2007, **19**, 620.
- [3] J. Kowalska, M.G. Sawicki, *Platynowce – zastosowanie i metody oznaczania. Metody elektrochemiczne*, Malamut, Warszawa 2012, str. 203.

- [4] S. Huszał, J. Kowalska, M. Krzezińska, J. Golimowski, *Electroanal.*, 2005, **17**, 299.
- [5] S. Huszał, J. Kowalska, M. Sadowska, J. Golimowski, *Electroanal.*, 2005, **17**, 1841.
- [6] J. Kowalska, K. Kińska, J. Pałdyna, M. Czyżewska, K. Boder, B. Krasnodębska-Ostręga, *Talanta*, 2014, **127**, 250.
- [7] J. Kowalska, *Specjacja chemiczna. Problemy i możliwości. Metody elektrochemiczne w analizie specjacyjnej wybranych pierwiastków (As, Se, Cr) i w oznaczaniu związków tiolowych*, Malamut, Warszawa 2009, str. 246.
- [8] J. Kowalska, K. Chałko, E. Stryjewska, *Electroanal.*, 2002, **14**, 1508.
- [9] N. Ospina-Alvarez, P. Burakiewicz, M. Sadowska, B. Krasnodębska-Ostręga, *Environ. Chem.*, 2015, **12** (4), 374.
- [10] B. Krasnodębska-Ostręga, M. Sadowska, S. Ostrowska, *Talanta*, 2012, **93**, 326.
- [11] B. Krasnodębska-Ostręga, J. Pałdyna, M. Wawrzyńska, E. Stryjewska, *Electroanal.*, 2011, **23**, 605.
- [12] J. Pałdyna, B. Krasnodębska-Ostręga, M. Sadowska, J. Gołębiwska, *Electroanal.*, 2013, **25**, 1926.
- [13] J. Kowalska, I. Giska, Ł. Jedynak, B. Krasnodębska-Ostręga, J. Pałdyna, M. Sadowska, J. Golimowski, *Electroanal.*, 2012, **24**, 1109.
- [14] Ł. Jedynak, J. Kowalska, *Microchem. J.*, 2011, **98**, 163.
- [15] B. Krasnodębska-Ostręga, M. Asztemborska, K. Strusińska, J. Golimowski, *J. Anal. Atom. Spectrom.*, 2008, **23**, 1632.
- [16] B. Krasnodębska-Ostręga, M. Sadowska, *Analityka – nauka i praktyka*, 2011, **2**, 12.
- [17] B. Krasnodębska-Ostręga, M. Sadowska, A. Wiśniewska, *Progress on Heavy Metals in the Environment*, Chapter 29, Maralte Books, 2012 online.
- [18] A.M. Nowicka, B. Krasnodębska-Ostręga, B. Wrzosek, M. Jastrzębska, M. Sadowska, M. Mackiewicz, Z. Stojek, *Electroanal.*, 2014, **26**, 340.
- [19] E. Zabłudowska, J. Kowalska, Ł. Jedynak, S. Wojas, A. Skłodowska, M. Antosiewicz, *Chemosphere.*, 2009, **77**, 301.
- [20] Ł. Jedynak, J. Kowalska, M. Kossykowska, J. Golimowski, *Microchem. J.*, 2010, **94**, 125.
- [21] M. Asztemborska, R. Stęborowski, J. Kowalska, G. Bystrzejewska-Piotrowska, *Water, Air Soil Poll.*, 2015, **226**, 126.
- [22] K. Dmowski, M. Rossa, J. Kowalska, B. Krasnodębska-Ostręga, *Environ. Monit. Assess.*, 2015, **187**, 4141.
- [23] Ł. Jedynak, J. Kowalska, J. Harasimowicz, J. Golimowski, *Sci. Total Environ.*, 2009, **407**, 945.
- [24] B. Krasnodębska-Ostręga, K. Dmowski, E. Stryjewska, J. Golimowski, *J. Soils Sediments*, 2005, **5**, 71.
- [25] B. Krasnodębska-Ostręga, S. Szczypior, *Analityka - nauka i praktyka*, 2014, **4**, 54.
- [26] B. Krasnodębska-Ostręga, M. Sadowska, K. Piotrowska, M. Wojda, *Talanta*, 2013, **112**, 73.
- [27] B. Krasnodębska-Ostręga, *Specjacja chemiczna. Problemy i możliwości*, Malamut, Warszawa 2009, str. 274.
- [28] B. Krasnodębska-Ostręga, M. Kaczorowska, J. Golimowski, *Microchim. Acta*, 2006, **154**, 39.
- [29] N. Ospina-Alvarez, Ł. Głaz, K. Dmowski, B. Krasnodębska-Ostręga, *Environ. Chem. Lett.*, 2014, **12**, 435.
- [30] B. Krasnodębska-Ostręga, J. Pałdyna, J. Kowalska, Ł. Jedynak, J. Golimowski, *J. Hazard. Mater.*, 2009, **167**, 128.
- [31] J. Pałdyna, B. Krasnodębska-Ostręga, K. Kręgielewska, J. Kowalska, Ł. Jedynak, J. Golimowski, T. Grobelski, J. Farbiszevska-Kiczma, T. Farbiszevska, *Environ. Earth Sci.*, 2013, **68**, 439.

