

**Marlena Szumska (Wilk)\*, Barbara Gworek\*\***

## **METODY OZNACZANIA FRAKCJI METALI CIĘŻKICH W OSADACH ŚCIEKOWYCH**

## **METHODS OF SEARCHING HEAVY METALS IN SEWAGE SLUDGE COMPONENTS**

**Słowa kluczowe:** metale ciężkie, frakcje, osady ściekowe, analiza sekwencyjna.

**Key words:** heavy metals, fractions, sewage sludge, sequential analysis.

*Estimation of the content of heavy metals, which could be included into bio-cycle from sewage sludge when environmentally used, can be based on sewage sludge sequential analyses and compared to the content of heavy metals in plants. The method assesses which sewage sludge components accumulate the biggest amount of heavy metals. The method also permits evaluation of the potential risk for environment and heavy metals bioavailability.*

*This paper presents a review of sequential extraction methods, which are used to estimate heavy metals amount in sewage sludge fractions. The most applied are the two methods: by Tessier et al. and BRC, as well as various modifications of these methods.*

### **1. WPROWADZENIE**

Całkowita zawartość metali ciężkich w próbach środowiskowych np. gleby, osadów dennych czy ściekowych nie jest w stanie określić rzeczywistego ryzyka, jakie stwarzają one dla środowiska, ani także ich dostępności dla organizmów żywych, ryzyka dla zdrowia ludzi, przemieszczania do wód oraz pobierania przez rośliny [Pérez-Cid i in. 2002; Gworek 2004a; Jamali i in. 2007b].

---

\* *Mgr Marlena Szumska (Wilk) – Katedra Nauk o Środowisku Glebowym, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego, ul. Nowoursynowska 159, 02-776 Warszawa; Instytut Ochrony Środowiska, ul Krucza 5/11d, 00-548 Warszawa, tel.: 22 625 10 05, wew. 48; e-mail: marlena.szumska@ios.edu.pl*

\*\* *Prof. dr hab. Barbara Gworek – Instytut Ochrony Środowiska, ul Krucza 5/11d, 00-548 Warszawa, tel.: 22 621 36 70; e-mail: barbara.gworek@ios.edu.pl; Katedra Nauk o Środowisku Glebowym, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego, ul. Nowoursynowska 159, 02-776 Warszawa.*

Mobilność metali ciężkich w osadach ściekowych oraz ich pobieranie przez rośliny można ocenić na podstawie dwóch wskaźników: wskaźnika chemicznego, przez frakcjonowaną analizę osadów ściekowych, oraz wskaźnika biologicznego, informującego o zawartości metali ciężkich w roślinach rosnących na osadach ściekowych.

Całkowita zawartość metali ciężkich w osadach ściekowych nie informuje, jaka ich ilość jest dostępna dla roślin, a zatem wejdzie do obiegu biologicznego. Dopiero analiza sekwencyjna pozwala oszacować, jaki jest procentowy udział metali w postaci mobilnej, dostępnej dla roślin [Tessier i in. 1979; Qiao, Ho 1996].

Do badań najczęściej stosuje się specjację oraz analizę specjacyjną jako metody pozwalające określić formy metali ciężkich w próbach środowiskowych [Dziadek, Waclawek 2005].

**Specjacja.** Metoda ta polega na jakościowym określeniu występowania w badanym materiale, pierwiastka w różnych, wyraźnie zdefiniowanych formach chemicznych oraz fizycznych [Siepak 2003]. Termin ten jest m.in. używany do nazywania różnego rodzaju analiz pozwalających określić stopień utlenienia pierwiastków lub związków metaloorganicznych, ale także form pierwiastków nazywanych biodostępnymi lub mobilnymi [Dziadek, Waclawek 2005; Environmental Health Criteria 2006].

**Analiza specjacyjna.** Metoda ta natomiast polega na identyfikowaniu i określeniu ilościowym występowania pierwiastków w różnych formach chemicznych i fizycznych w środowisku. Zasięg analizy specjacyjnej obejmuje nie tylko jakościową specjację pierwiastków, ale również określenie ilości poszczególnych form w roztworze. W metodzie tej wykorzystuje się fakt, że każda z form badanego analitu posiada inne właściwości biologiczno-chemiczne oraz fizyczne, a co za tym idzie również toksykologiczne.

Na podstawie oznaczonych drogą analizy specjacyjnej form pierwiastków, w połączeniu z nowoczesnymi metodami statystycznymi, można określić szereg czynników takich, jak: biodostępność, migracja, kumulacja, biomagnifikacja, toksyczność, rozpuszczalność czy sorpcja [Siepak 2003]. Z opisywaną metodą wiąże się jednak wiele problemów analitycznych. Należą do nich m.in. problemy ze śladowymi zawartościami niektórych składników. Ważnym problemem jest również nietrwałość i zmienność form w czasie przechowywania próbek badanego materiału. Analityk musi się liczyć z możliwością zachodzenia procesów enzymatycznych i mikrobiologicznych (w materiale biologicznym), a także wpływem tlenu atmosferycznego, temperatury i światła. Analiza specjacyjna powinna, zatem być przeprowadzona szybko, w jak najkrótszym czasie od momentu pobrania próby [Dziadek, Waclawek 2005; Environmental Health Criteria 2006].

Zastosowanie analizy specjacyjnej do badań różnych elementów środowiska spowodowało rozwój różnych typów specjacji. W przypadku badań obejmujących próbki i matryce stałe lub fazowe wyodrębniono z analizy specjacyjnej metodę zwaną frakcjonowaniem. O ile analiza specjacyjna wykorzystywana jest do rozpoznawania form pierwiastków głównie w roztworach i przesączach, o tyle frakcjonowanie doskonale nadaje się do prób stałych i zawiesin [Siepak 2003].

**Fracjonowanie.** Jest to metoda pozwalająca na rozróżnienie form występowania metali w próbach stałych, takich jak: zawiesina, pył zawieszinowy oraz osady ściekowe, komunalne, denne, kompostowe i przemysłowe. Fracjonowanie w tym wypadku oparte jest na klasyfikacji analitu lub grupy analitów z danej próbki, według właściwości fizycznych (np. wielkość cząstek, rozpuszczalność) i chemicznych (reaktywność) [Siepak 2003].

Zasada frakcjonowania została wykorzystana w procedurze **ekstrakcji sekwencyjnej**, która pozwala rozdzielić metale śladowe na formy chemiczne, mogące być uwalniane do roztworu w różnych warunkach środowiskowych. Symulację warunków środowiskowych uzyskuje się przez następujące po sobie kolejne ekstrakcje za pomocą związków o wzrastającej aktywności. W procedurze możliwa jest identyfikacja składników fazy stałej, z którymi wiążą się poszczególne metale. Ostatnim etapem postępowania jest określenie całkowitej zawartości pierwiastków, co stanowi kontrolę względem sumy zawartości oznaczonej w poszczególnych frakcjach. Oprócz ekstrakcji sekwencyjnej w badaniach metali ciężkich w próbach środowiskowych stosuje się **ekstrakcję pojedynczą** (prostą), w której wykorzystuje się symulacje naturalnych warunków przechodzenia składników z badanej próby bezpośrednio do roztworu [Kowalkowski, Buszewski 2002; Dziadek, Waclawek 2005].

W niniejszym opracowaniu opisano metody najczęściej stosowane w postępowaniu z osadami ściekowymi różnego pochodzenia.

## 2. EKSTRAKCJA POJEDYNCZA

Ekstrakcja pojedyncza jest procedurą analityczną z zastosowaniem najczęściej jednego eluentu (odczynnika), którego zadaniem jest oznaczenie form pierwiastków bezpośrednio przyswajalnych dla roślin. Metodę stosuje się w badaniach urodzajności i jakości zbóż w celu określenia niedoborów oraz nadmiarów pierwiastków w materiale, a także do określania właściwości fizykochemicznych zachowania się pierwiastków w środowisku. W mniejszym zakresie metodę stosuje się również w celach pomiarowych oraz do oznaczenia metali ciężkich [Moćko, Waclawek 2004; Dziadek, Waclawek 2005].

Metoda pozwala na określenie aktualnej fitotoksyczności i ekotoksyczności metali w podłożu w momencie, gdy niepotrzebne wydaje się badanie form metali. Wyniki uzyskane na drodze tego typu ekstrakcji pozwalają oszacować biologiczną przyswajalność metalu dla roślin lub mikroorganizmów oraz podatność metali na wymywanie.

Do tego typu ekstrakcji są stosowane najczęściej roztwory soli o odczynie obojętnym np.  $\text{CaCl}_2$  [Jamali i in. 2007a] oraz roztwory kompleksujące albo o niższej sile jonowej, które wpływają na uwalnianie zaadsorbowanych składników. Stosowane są również kwasy, m.in. azotowy (V), chlorowodorowy i octowy. Kwas azotowy stosowany jest do ekstrakcji wszystkich mikro- i makroelementów, ponieważ jest silnym roztworem ekstrakcyjnym. Obok kwasu azotowego stosuje się ekstrakcje za pomocą kwasu solnego. Jednak dla środowisk bardzo zanieczyszczonych ekstrakcja 1 M HCl nie jest odbiciem faktycznego zagrożenia dla

roślin [Dziadek, Waclawek 2005; Rao i in. 2008]. Ekstrakcję frakcji dostępnych można wykonać również kwasami organicznymi, np. octowym. Przykłady najczęściej stosowanych odczynników zostały przedstawione w tabeli 1. Zarówno przy zastosowaniu kwasów mineralnych, jak i organicznych, roztwory ekstrakcyjne pozwalają na częściowe rozpuszczenie frakcji: wymiennej, węglanowej oraz związanej z tlenkami Fe/M, a także materii organicznej. Przy zastosowaniu eluentów organicznych proces wymycia metali jest jednak mniejszy (jedynie 5%) niż przy zastosowaniu kwasów nieorganicznych (wymycie 65% całkowitej zawartości metali) [Moćko, Waclawek 2004; Dziadek, Waclawek 2005].

**Tabela 1.** Najczęściej stosowane odczynniki w ekstrakcji pojedynczej [wg Waclawek, Moćko 2000]

**Table 1.** The most often applied reagents in single extraction [by Waclawek, Moćko 2000]

Grupa eluentów	Typ i siła roztworu
Ekstrakcja kwasem	HNO <sub>3</sub> 0,43 ÷ 2,0 M Woda królewska HCl 0,1 ÷ 1,0 M CH <sub>3</sub> COOH 0,1 M HCl 0,05 M + H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,0125 M
Reagenty chelatujące	EDTA 0,01 ÷ 0,05 M (przy różnym pH) DTPA 0,005 ÷ 0,1 M + TEA 0,1 M CaCl <sub>2</sub> 0,01 M CH <sub>3</sub> COOH 0,02 M NH <sub>4</sub> F 0,015 M HNO <sub>3</sub> 0,013 M EDTA 0,001 M
Roztwory buforowanych soli	NH <sub>4</sub> OAc, CH <sub>3</sub> COOH (pH=7) 1,0 M NH <sub>4</sub> OAc, CH <sub>3</sub> COOH (pH=4,8) 1,0 M
Roztwory niebuforowanych soli	CaCl <sub>2</sub> 0,1 M CaCl <sub>2</sub> 0,05 M CaCl <sub>2</sub> 0,01 M NaNO <sub>3</sub> 0,1 M NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> 1,0 M AlCl <sub>3</sub> 0,3 M BaCl <sub>2</sub> 0,1M

### 3. EKSTRAKCJA SEKWENCYJNA

#### 3.1. Rozwój i modyfikacja

Wyraźny wzrost zainteresowania ekstrakcją sekwencyjną nastąpił w latach siedemdziesiątych XX wieku. Według Karczewskiej [2002] pierwsze metody służyły określeniu potencjalnej i aktualnej przyswajalności mikroelementów dla roślin. Prace m.in. Grimme'a [1967] czy McLaren'a i Crawforda [1973] dotyczyły oznaczania miedzi w glebach uprawnych. Równoległe tworzone były również metody ekstrakcji sekwencyjnej, zwłaszcza metali ciężkich, z takich materiałów jak osady dennie [Gupta i Chen 1975] czy osady ściekowe [Lake i in. 1984].

Największe uznanie i szerokie zastosowanie znalazła opublikowana w 1979 r. przez Tessiera, Bisonsa i Campbella metoda, w której przedstawili i opisali zasadę pięciostopniowego oznaczania metali ciężkich (Cd, Co, Cu, Fe, Pb, Mg, Ni, Zn) w osadach pochodzenia rzeczynego [Karczewska 2002; Bacon, Davidson 2008]. Metoda pierwotnie sekwencyjnej ekstrakcji przeznaczona była do oznaczania pierwiastków śladowych tylko w osadach rzeczynych, z czasem została adoptowana również do badań osadów innego pochodzenia, np. ściekowych [Dąbrowska 2004; Renoux i in. 2007; Shrivastava, Banerjee 2003; Gupta, Sinha 2006], oraz produktów ich przetwarzania (komposty) [Planquart i in. 1999], jak również stałych elementów środowiska, np. takich jak gleba [Maiz i in. 2000; Murphy i in. 2000; Narwall i Singh 2001; Karczewska 2002; Vilar i in. 2005; Jalali i Khanlari 2006], pochodząca z terenów uprzemysłowionych [Zhang i in. 2006] czy nawożona osadami ściekowymi [Chandra Sekhar i in. 2001; Turek i in. 2005; Shober i in. 2007]. Oczywiście nadal z powodzeniem metoda ekstrakcji sekwencyjnej jest stosowana do badań metali ciężkich w osadach rzeczynych [Joksič i in. 2005; Alomary, Belhadj 2007].

Przez wiele lat opisywana metoda była wielokrotnie modyfikowana, zaczęto stosować inne odczynniki, wyodrębniano wiele różnych frakcji. Odczynniki stosowane w różnych wariantach metody były selekcjonowane na podstawie zdolności do usuwania analizowanych substancji ze specyficznych faz osadów, albo na zasadzie zmiany procesu, albo przez rozpad faz docelowych. Etapy ekstrakcji korespondują ze zmianami, jakie zaobserwować można w warunkach środowiska naturalnego i wykorzystują takie naturalne zjawiska, jak: zakwaszenie, redukcja lub utlenianie [Bacon, Davidson 2008].

Ze względu na użycie wielu procedur ekstrakcji sekwencyjnej, z różną liczbą etapów, jakością zastosowanych odczynników i różnymi warunkami procesu pojawił się problem porównywalności wyników uzyskanych w różnych laboratoriach [Wang i in 2003]. W związku z tym w 1973 r. powstały organ European Community Bureau of Reference (agencja rządowa do spraw standaryzacji materiałów i metod badawczych – BRC, obecnie Standards, Measurements and Testing Programmed) podjął starania ujednoczenia procedur badawczych analizy sekwencyjnej i stworzył protokół analizy sekwencyjnej opartej na trzystopniowej ekstrakcji z zastosowaniem kwasu octowego – metoda BRC [Jamali i in. 2007a]. Pierwsze dwa etapy procedury zaczerpnięte z metody Tessiera zostały połączone w jeden etap. Również masa używanych w badaniach prób oraz ilość odczynników uległa modyfikacji. Rezultatem pracy BRC są certyfikowane materiały odniesienia CRMs, które pozwalają w każdym laboratorium wykonać analizę sekwencyjną według tej samej procedury i opartej na wielokrotnie przebadanych materiałach referencyjnych, o znanych zawartościach badanych związków [Bacon, Davidson 2008].

W latach dziewięćdziesiątych dwudziestego wieku analiza sekwencyjna stała się jedną z najbardziej popularnych metod oznaczania metali ciężkich. Liczne modyfikacje przystosowały metodę do oznaczania metali ciężkich w takich materiałach, jak: gleba uprawna, gleba nawożona nawozami organicznymi, gleba terenów leśnych i miejskich o małym oraz dużym

wpływie antropopresji, osady ściekowe, osady rzeczne [Šömen Joksič i in. 2005], komposty, popioły i in. Jednak pomimo różnych protokołów metoda Tessiera i in. oraz BRC są używane najczęściej [Bacon, Davidson 2008, Rao i in 2008].

### 3.2. Ogólna zasada sekwencyjnej ekstrakcji

Metodę sekwencyjnej ekstrakcji chemicznej metali ciężkich oparto na ekstrakcji form metali związanych z poszczególnymi składnikami prób osadowych, przez działanie na tę samą próbkę różnymi roztworami o wzrastającej agresywności [Perez-Cid i in. 1996]. Kolejne ekstrakty oddzielane zostają od fazy stałej przez wirowanie, stałą pozostałość natomiast poddaje się kolejnemu etapowi ekstrakcji.

W procesie analizy sekwencyjnej wykorzystuje się podstawowe mechanizmy fizykochemiczne, takie jak:

- rozpuszczalność w wodzie,
- wymiana jonowa,
- utlenianie i redukcja,
- kompleksowanie oraz roztwarzanie mineralnych i organicznych komponentów badanego materiału.

Dotychczas opracowano wiele procedur analizy sekwencyjnej, które różnią się m.in. rodzajem i kolejnością wydzielanych frakcji, rodzajem i stężeniem użytych odczynników, parametrami procesu, a także sposobami pozyskiwania z fazy stałej roztworu resztkowego po kolejnych fazach ekstrakcji. Kolejne frakcje są wydzielane z zastosowaniem coraz silniejszych odczynników. Najczęściej wyodrębnianych jest od 3 do 7 frakcji [Karczewska 2002].

Metoda sekwencyjnej ekstrakcji ma swoich zwolenników oraz przeciwników. Za wady metody najczęściej podawane są:

- długi czas inkubacji i wykonania całej procedury (czasochłonność i pracochłonność) oraz bardzo duża wrażliwość metody na wszelkie nieprawidłowości podczas jej trwania;
- wyodrębnione w procedurze frakcje są umowne (zdefiniowane operacyjnie) i w sposób przybliżony charakteryzują formy występowania metali w próbce; powoduje to trudności w ustaleniu granic między poszczególnymi fazami (poekstrakcyjna ponowna adsorpcja badanych związków oraz wtórna redystrybucja pierwiastków między poszczególnymi fazami);
- stosowane w procedurze odczynniki działają w sposób nieselektywny (tzn. mogą służyć do ekstrakcji kilku frakcji), dlatego należy stosować je w odpowiedniej kolejności, ze szczególnym uwzględnieniem czasu działania poszczególnych odczynników oraz pozostałych parametrów procedury;
- trudności w interpretacji wyników – wyniki z niektórych procedur mogą być dla poszczególnych faz zawyżone lub zaniżone [Lopez-Sanchez i in. 1993; Karczewska 2002; Bacon, Davidson 2008];

- często pojawiają się problemy z walidacją metody, czyli jej zatwierdzeniem do użycia w odniesieniu do określonego materiału;
- metoda jest bardzo wrażliwa na nawet niewielkie zmiany w procedurze [Garcia-Delgado i in. 2007].

Metody nie są uniwersalne, dlatego ich wybór powinien być przede wszystkim uzależniony od właściwości badanego materiału [Dziadek, Waclawek 2005], m.in. od potencjału oksydo-redukcyjnego, wilgotności, pH oraz zawartości i przemian materii organicznej w badanych próbach, które wpływają na mobilność pierwiastków śladowych [Karczewska 2002].

Pomimo licznych wad metoda sekwencyjnej ekstrakcji jest uznawana za najbardziej dostępną. Jest z całą pewnością ważnym źródłem informacji o ruchliwości oraz stabilności metali ciężkich we frakcjach badanego materiału, co ma przełożenie na mechanizmy zachowania się metali ciężkich w środowisku, m.in. na ich biodostępność, mobilizację oraz transport [Ma i Rao 1997; Garcia-Delgado i in. 2007].

### 3.3. Odczynniki stosowane w analizie sekwencyjnej

**Dobór odczynników i warunków ekstrakcji.** Właściwy dobór odczynników oraz warunków ekstrakcji jest jedną z najważniejszych kwestii prawidłowo dobranej procedury analizy sekwencyjnej. Ze względu na różnorodność metod, kwestia ta była wielokrotnie poruszana przez autorów, m.in. Filgueiras i in. [2002], Jamali i in. [2007b], Bacon, Davidson [2008], Rao i in. [2008].

Odczynniki są aplikowane w ściśle określonej kolejności, zależnej od:

- liczby faz ekstrakcji,
- rodzaju wybranych do analizy odczynników,
- celu ekstrakcji czy też od charakterystyki przeznaczonych do analiz prób.

Wybór typu odczynników musi być ściśle skorelowany z naturą (zachowaniem) metali, ich chemicznymi formami w badanym materiale, fazą, z której będą ekstrahowane oraz z dostępną w laboratorium aparaturą [Filgueiras i in. 2002].

Poniżej przedstawiono odczynniki najczęściej stosowane w poszczególnych etapach ekstrakcji sekwencyjnej, z uwzględnieniem ich wad oraz zalet. Przedstawiono również opis procedur służących do oznaczania poszczególnych frakcji, z którymi związane są metale ciężkie. Zamieszczone odczynniki służą do ekstrakcji w wielu metodach, nie tylko oznaczania metali ciężkich w osadach ściekowych. Opracowanie przygotowano opierając się na pracach Tessiera i in. [1979], Becketta [1989], Shumana [1991], Filgueiras i in. [2002], Karczewskiej [2002], Bacona i Davidsona [2008] oraz Rao i in. [2008]. Zestawienie stosowanych w różnych etapach odczynników zamieszczono w tabeli 2.

**Tabela 2.** Zestawienie odczynników najczęściej używanych w procedurze sekwencyjnej ekstrakcji (wg Karczewskiej [2002], zmodyfikowane)

**Table 2.** The composition of reagents commonly used in sequential extraction procedures [by Karczewskia 2002, modified]

Nazwa funkcji	Odczynniki
Rozpuszczalna w wodzie	H <sub>2</sub> O
Niespecyficznie (wymienne) sorbowana	Sole – Ca, K, (Ba, Pb, Sr) – Cl, NO <sub>3</sub> , OA <sub>c</sub> , np. KNO <sub>3</sub> , MgCl <sub>2</sub> , BaCl <sub>2</sub> , CaCl <sub>2</sub> , KCl, NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> , NH <sub>4</sub> OAc
Specyficznie sorbowana	HOAc, KF
Związana z tlenkami Mn	Związki redukujące – NH <sub>2</sub> OH, NH <sub>2</sub> OH-HCl, ditionit CBD (Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>4</sub> ), NH <sub>4</sub> Ox Silne utleniacze H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
Związana z amorficznymi tlenkami Fe	NH <sub>4</sub> Ox, ditionit (CBD)
Związana z krystalicznymi tlenkami Fe	NH <sub>4</sub> Ox +UV, NH <sub>4</sub> Ox + kwas askorbinowy, CBD
Związana z substancją organiczną	Silne utleniacze – NaOH, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , NaOCl, NH <sub>4</sub> OAc Związki dyspergujące – K <sub>4</sub> P <sub>2</sub> O <sub>7</sub> Związki kompensujące – EDTA, DTPA
Węglanowa	HCl, NaOAc + HOAc, Na <sub>2</sub> EDTA
Siarczkowa	HNO <sub>3</sub> , KCN
Rezydualna	HF, woda królewska, HNO <sub>3</sub> , HClO <sub>4</sub>

**Frakcja rozpuszczalna w wodzie.** Frakcja ta jest jedną z najrzadziej wyodrębnionych frakcji w metodzie sekwencyjnej ekstrakcji. Do wyodrębnienia tej frakcji używana jest woda destylowana, jednak ze względu na niskie stężenia metali ciężkich w roztworach wodnych stosowana jest bardzo rzadko, tylko w analizie materiałów silnie zanieczyszczonych. Pierwiastki śladowe ekstrahowane za pomocą wody są najbardziej mobilne oraz potencjalnie dostępne. Użycie wody jako odczynnika wiąże się z problemami analitycznymi i metodologicznymi, a mianowicie:

- rozpuszczalność materii organicznej zawartej w próbkach może wpływać na interferencje między wodą a fazą stałą próby,
- woda nie ma zdolności buforujących, w związku z czym łatwo rozpuszczalne komponenty silnie wpływają na rezultat długiej inkubacji – istnieje problem z readsorpcją, efektywność ekstrakcji jest zbyt mała.

**Frakcja wymienna, niespecyficznie sorbowana.** W ekstrakcji tej frakcji wykorzystuje się zmiany w połączeniu między jonami na drodze adsorpcji i desorpcji. Do ekstrakcji tej frakcji stosowane są najczęściej sole obojętne np. azotany, chlorki lub octany: wapnia, magnezu oraz amonu: MgCl<sub>2</sub>, CaCl<sub>2</sub>, NaNO<sub>3</sub>, Mg(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, BaCl<sub>2</sub>, KNO<sub>3</sub>, Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, NH<sub>4</sub>Oac, Sr(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>. Stosowane w metodzie roztwory soli charakteryzują wysokie stężenia molowe, rzędu 0,5–1,0 M, dzięki czemu równowaga wymiany jonowej między fazą stałą a roztworem ulega przesunięciu w kierunku desorpcji. Po zastosowaniu chlorków: KCl, MgCl<sub>2</sub> i CaCl<sub>2</sub>, uzysku-

je się wyższe wyniki niż po zastosowaniu analogicznych roztworów azotanów o identycznym stężeniu. Jest to związane z tworzeniem się kompleksowych połączeń metali ciężkich z jonami chloru. Ekstrakcja za pomocą octanów również daje wyniki wyższe, ze względu na częściowe roztwarzanie węglanów oraz kompleksowanie i rozpuszczanie części metali sorbowanych specyficznie oraz okludowanych na powierzchni tlenków żelaza. Sole amonowe ze względu na stosunkowo niewielkie interferencje analityczne są stosowane przy oznaczaniu zawartości metali ciężkich w ekstraktach z użyciem techniki AAS. Prawdopodobność uzyskanych wyników zależy również od czasu kontaktu badanej próby z ekstrahentem oraz odczynu roztworu.

**Frakcja specyficznie sorbowana.** Frakcja ta jest wyróżniana najczęściej podczas oznaczeń metali ciężkich w glebie oraz osadach ściekowych. Rzadko jest stosowana do oznaczania metali ciężkich w osadach dennych oraz do badania prób skał. Metodyka ekstrakcji w tym wypadku oparta jest na użyciu 2,5% kwasu octowego HOAc lub rzadziej fluorków (np. KF, pH 6,5), które tworzą kompleksy rozpuszczalne z metalami przez uwalnianie ich z pozycji wymienionych na powierzchni tlenków oraz krawędzi minerałów.

**Frakcja metali okludowanych (współstrąconych) w tlenkach Mn.** Wyodrębnienie metali ciężkich związanych z tą frakcją możliwe jest dzięki zastosowaniu odczynników posiadających właściwości redukcyjne w stosunku do tlenków Mn. Należy jednak pamiętać, aby nie doprowadzić do redukcji tlenków Fe. Jest to możliwe po zastosowaniu wysoce specyficznej w stosunku do tlenków Mn hydroksylaminy  $\text{NH}_2\text{OH}$  w rozcieńczonym kwasie  $\text{HNO}_3$  lub HCl w formie  $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$ . Związek ten o wiele skuteczniej redukuje tlenki Mn w porównaniu do hydrochinonu, który bywa stosowany alternatywnie. Niektóre z tlenków jednak nie są w stanie rozpuścić się w hydroksylaminie i ponadto związek ten częściowo rozpuszcza metale ciężkie związane organicznie.

Do wyodrębnienia metali ciężkich związanych z tlenkami Mn można używać również odczynników utleniających, np.  $\text{H}_2\text{O}_2$  w środowisku kwaśnym. Użycie tego typu odczynnika może być uznane za specyficzne dla tlenków Mn tylko w razie wcześniejszego usunięcia z badanej próby substancji organicznej podatnej na utlenianie.

Bardzo często frakcja metali związanych z tlenkami Mn jest połączona w metodyce z frakcją metali związanych z tlenkami Fe. W tym wypadku stosowane są silniejsze odczynniki o charakterze redukującym, niż w odniesieniu do samej frakcji Mn. W praktyce prawie wszystkie metody roztwarzania tlenków Fe są skuteczne również do roztwarzania tlenków Mn.

**Frakcja metali okludowanych w amorficznych tlenkach Fe.** Odczynnikiem działającym w sposób selektywny na tlenki żelaza amorficzne lub mikrokryształiczne, a jednocześnie nieroztwarzającym form krystalicznych, jest 0,02 M szczawian amonu o pH 3,0 (stosowany w ciemności). Zastosowanie szczawianów wiąże się jednak z problemami analitycznymi, ze względu na szybką ich krystalizację z roztworów, co znacznie ogranicza możliwość stosowania metod instrumentalnych, takich jak ICP czy AAS.

W ekstrakcji metali związanych z tlenkami Fe najczęściej wykorzystuje się właściwości redukcyjne związków. Właściwości te są ściśle związane z takimi parametrami procesu jak czas i temperatura reakcji. Za skuteczny odczynnik do tego typu oznaczeń uważany jest również chlorowoderek hydroksylaminy (związek specyficzny dla oznaczeń tlenków Mn), ale w podwyższonej temperaturze 50°C. Do wyodrębnienia tej fazy testowano również Tiron (sól dwusodowa kwasu 4,5-dihydroksy-m-benzo-disulfonowego) oraz EDTA (kwas wersetowy, zazwyczaj stosowany do oznaczeń frakcji organicznej). Wykazano, że szczególnie EDTA bardzo powoli rozтворяja amorficzne tlenki Fe.

**Frakcja metali okludowanych w krystalicznych tlenkach Fe.** Frakcję tą można ekstrahować za pomocą wielu metod. Jednym z powszechniej stosowanych odczynników jest ditionit ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ ) z dodatkiem buforu cytrynianowo-wodorowęglanowego (metoda CBD), dzięki któremu możliwe jest nie tylko rozтворzenie tlenków Fe i Al, ale także rozpuszczenie amorficznych i krystalicznych tlenków Mn i Fe. Do ekstrakcji krystalicznych tlenków Fe stosowane są również roztwory szczawianów, wspomagane przez naświetlanie UV lub redukujące działanie kwasu askorbinowego w temperaturze 80°C. Czasem stosowana jest również hydroksylamina  $\text{NH}_2\text{OH}$ , w roztworze np. 25% kwasu octowego, ale tak sporządzony roztwór przy niskim pH rozтворяja częściowo minerały ilaste. Zamiast kwasu octowego stosowany jest też niekiedy bufor cytrynianowy o pH 5.

**Frakcja związana z substancją organiczną.** Do ekstrakcji tej frakcji najczęściej stosowane są cztery grupy odczynników:

- odczynniki działające utleniająco (najczęściej  $\text{H}_2\text{O}_2$  lub  $\text{NaOCl}$ ), które powodują rozkład substancji organicznej i uwalnianie metali z nią związanych;
- odczynniki, które powodują dyspersję koloidów organicznych oraz kompleksowanie uwolnionych kationów (pirofosforany, np.  $\text{K}_4\text{P}_2\text{O}_7$ );
- substancje chelatujące, powodujące silną kompleksację metali takie jak: EDTA, DTPA, octan miedzi;
- roztwory silnych zasad (np.  $\text{NaOH}$ ), które powodują rozтворяanie substancji próchnicznych.

Stosowane w metodzie mocne odczynniki powodują dodatkowo utlenianie siarczków metali.

Silny związek utleniający, jakim jest  $\text{H}_2\text{O}_2$ , zastosowany w środowisku kwaśnym, powoduje skuteczny rozkład substancji organicznej, ale powoduje również utlenienie frakcji manganowej oraz indukuje powstawanie wtórnych szczawianów, działających na frakcje związane z tlenkami Fe.

Spośród utleniaczy największe działanie selektywne w stosunku do materii organicznej wykazuje podchloryn sodu  $\text{NaOCl}$  w środowisku zasadowym (pH 8–9,5), ale w warunkach niskiego pH może następować wtórne wytrącanie niektórych metali z roztworu.

Zaletą pirofosforanów (np. pirofosforanu potasu) jest brak ich działalności na siarczki, jednak ich skuteczność na wydzielanie frakcji organicznej nie jest zadowalająca. Wadą jest jednak to, że przy okazji częściowo roztwarzają różne formy tlenków Fe.

Najczęściej do ekstrakcji formy metali związanych z materią organiczną stosuje się związki kompleksujące, np. EDTA czy dwuetylenotrójaminopentaocjan DTPA. Obydwa związki mogą jednak częściowo roztworzać również niektóre tlenki Fe.

**Frakcje chemicznie sorbowane (wtórne węglany, siarczany, fosforany).** Określenie ilości metali związanych z frakcją węglanową opiera się głównie na rozтворzeniu minerałów węglanowych, takich jak kalcyt czy dolomit. Roztworzenie węglanowej frakcji metali odbywa się najczęściej z zastosowaniem kwasów o niewielkiej mocy oraz stężeniu. Przykładem takiego związku jest 1M octan sodu NaOAc, o pH 5. Wadami odczynnika jest to, że powoduje częściowe uwolnienie metali sorbowanych specyficznie, a także działa kompleksująco i uwalnia metale z frakcji organicznej.

Do ekstrakcji frakcji węglanowej niekiedy są używane również takie związki jak EDTA (po rozłożeniu frakcji organicznej) lub kwasy mineralne, np. 0,1 M lub 1 M HCl.

Frakcja metali związanych z siarczkami jest rzadko wydzielana jako odrębna podczas sekwencyjnej analizy materiału. Najczęściej łączona jest z frakcją organiczną ekstrahowaną metodą utleniania. Jeśli już zostaje wyodrębniona, to stosuje się wówczas  $\text{HNO}_3$  lub KCN.

**Frakcja rezydualna.** Frakcja ta oznaczana jest jako ostatnia, po całkowitym rozтворzeniu fazy stałej badanego materiału. Do tego celu najczęściej używane są kwasy HF lub  $\text{HClO}_4$ . Jednak kwasy te są niebezpieczne w użyciu – HF wykazuje silną toksyczność,  $\text{HClO}_4$  natomiast jest wybuchowy. W związku z tym często zamiast nich stosuje się mineralizację w wodzie królewskiej ( $\text{HNO}_3 + 3\text{HCl}$ ). Skuteczność tego wariantu zależy jednak od zawartości metali we frakcjach krzemianowych minerałów pierwotnych. Możliwe jest także zastosowanie stapiania z  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  w celu całkowitego rozтворzenia frakcji rezydualnej. Jednak metoda ta jest mało skuteczna ze względu na duże stężenie Na w roztworze, powodujące silne interferencje analityczne.

### 3.4. Przegląd najczęściej stosowanych metod sekwencyjnej ekstrakcji

Od momentu opracowania pierwszej metody sekwencyjnej, wielu autorów starało się adaptować metody do oznaczeń różnych materiałów z zastosowaniem najbardziej odpowiednich odczynników. Poniżej przedstawiono przegląd metod sekwencyjnej ekstrakcji, stosowanych najczęściej do oznaczania metali ciężkich w osadach ściekowych.

**Metoda Tessiera i in.** W metodzie Tessiera i in. [1979] wyróżnia się pięć operacyjnie zdefiniowanych frakcji metali ciężkich. Odczynniki wybrane do poszczególnych etapów są potencjalnie selektywne w stosunku do badanych elementów. Zestawienie odczynników najczęściej stosowanych w tej metodzie zostało przedstawione w tabeli 3.

**Tabela 3.** Odczynniki używane do oznaczania frakcji metali ciężkich w metodzie Tessiera i in. [1979]**Table 3.** Reagents used in the Tessier et al. [1979] method to evaluate heavy metals fraction

Nr	Nazwa frakcji	Odczynnik ekstrahujący	pH
1	Wymienna	1 M MgCl <sub>2</sub>	7,0
2	Rozpuszczalna w kwasach (węglanowa)	1M NaOAc + HOAc	5,0
3	Redukowalna (związana z tlenkami Fe/Mn)	0,04 M NH <sub>2</sub> OH * HCl + 25% HOAc, 90°C	2,0
4	Utleniaalna (związana z mat. organiczną oraz siarczkowa)	30% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + 0,02 M HNO <sub>3</sub> , 85°C 2 M NH <sub>4</sub> OAc+20% HNO <sub>3</sub>	2,0
5	Rezydualna (krzemianowa)	HF/HClO <sub>4</sub> lub woda królewska	–

Metodą Tessiera i in. można wyodrębnić następujące frakcje:

- frakcję wymienną F1 – zawierającą metale najłabiej związane z osadem ściekowym lub innym materiałem, przez co jest frakcją najbardziej podatną na włączanie do łańcucha biologicznego; obejmuje pierwiastki połączone ze sobą siłą wzajemnego przyciągania elektromagnetycznego na zasadzie przeciwnych ładunków; uwalnianie metali związanych z tą frakcją odbywa się w drodze prostej wymiany jonowej, przez przesunięcie równowagi w procesach sorpcji i desorpcji; frakcja jest ekstrahowana za pomocą 8 cm<sup>3</sup> 1,0 M MgCl<sub>2</sub> lub Ca Cl<sub>2</sub> (chlorku magnezu lub wapnia) przy pH 7, wytrąsana przez godzinę w temperaturze 25°C (temperatura pokojowa);
- frakcję węglanową F2, obejmującą formy metali ciężkich związane z węglanami, siarczanami i fosforanami; mobilizacja metali następuje w konsekwencji obniżenia odczynu roztworu ekstrakcyjnego; pierwiastki związane z tą fazą stosunkowo łatwo mogą przechodzić do roztworu i stanowić zagrożenie dla łańcucha pokarmowego; frakcja jest ekstrahowana za pomocą 8 cm<sup>3</sup> 1,0 M NaOAc (octanu sodu) przy pH 5 (odczyn sprawdzony za pomocą roztworu kwasu octowego), wytrąsana przez pięć godzin w temperaturze pokojowej;
- frakcję związaną z tlenkami żelaza i manganu F3, związaną lub współstrąconą z tlenkami lub wodorotlenkami Fe i Mn (również Al), frakcja ta jest wrażliwa na zmiany termodynamiczne potencjału oksydo-redukcyjnego; ekstrahowana jest za pomocą 20 cm<sup>3</sup> 0,04 M NH<sub>2</sub>OH \* HCl (chlorowodoru hydroksylaminy), rozpuszczonego w 25% HOAc (kwasie octowym) przy pH 2, ogrzewana w łaźni wodnej w temperaturze 96 ± 3°C przez pięć godzin, mieszana od czasu do czasu;
- frakcję związaną z materią organiczną F4, zawierającą formy metali związane z materią organiczną o różnej stabilności, ale również z siarczkami na drodze adsorpcji fizycznej, chemisorpcji, wytrącania, tworzenia połączeń kompleksowych; frakcja jest stabilna i ulega uruchomieniu w warunkach redukcyjnych; mobilizacja metali związanych z tą fazą następuje w wyniku mineralizacji materii; ekstrahowana za pomocą 3 cm<sup>3</sup> 0,02 M HNO<sub>3</sub> (kwasu azotowego) i 5 cm<sup>3</sup> 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (nadtlenku wodoru) przy pH 2 (odczyn sprawdzony roztworem kwasu azotowego), grzana w łaźni wodnej w temperatu-

rze  $85 \pm 2^\circ\text{C}$  przez dwie godziny, mieszana od czasu do czasu; następnie ekstrahowana za pomocą  $3 \text{ cm}^3$  30%  $\text{H}_2\text{O}_2$  i grzana dalej w łaźni wodnej w temperaturze  $85 \pm 2^\circ\text{C}$  przez 3 godziny, mieszana od czasu do czasu; po schłodzeniu poddawana działaniu  $5 \text{ cm}^3$  3,2 M  $\text{NH}_4\text{OAc}$  (octanu amonu) rozpuszczonego w 20%  $\text{HNO}_3$  (kwasie azotowym) i wytrąsana przez pół godziny w temperaturze pokojowej;

- frakcję rezydualną F5, obejmującą formy wbudowane w sieć krystaliczną minerałów pierwotnych lub wtórnych oraz połączone z minerałami (głównie krzemianami) poprzez chemisorpcję i adsorpcję fizyczną; frakcja ta jest praktycznie niepodatna na włączanie do obiegu biologicznego; ekstrahowana za pomocą HF,  $\text{HClO}_4$  lub na drodze mineralizacji mikrofalowej.

Próbki po każdej ekstrakcji, oprócz ostatniej, są poddawane wirowaniu przez 30 minut z prędkością od 3000 do 10 000 obrotów na minutę. Ekstrakt z nad osadu przenosi się do kolbek o pojemności  $25 \text{ cm}^3$ . Pozostałości po ekstrakcji przemywa  $8 \text{ cm}^3$  wody dejonizowanej, wiruje ponownie przez 30 minut i przenosi się supernatant do kolby. Każdy ekstrakt zakwasza się dodając po 2 krople roztworu kwasu azotowego.

Metoda Tessiera i in. była wielokrotnie przedmiotem sporów i dysput. Była również modyfikowana wiele razy lub stosowana w oryginale. Metoda ma wiele wad, ale ma też i zalety. Przede wszystkim zaniżana jest zawartość metali we frakcji organicznej (oznaczanej jako przedostatnia frakcja w procedurze), zawyżana natomiast zawartość metali związanych z frakcją podatną na redukcję (tlenki Mn i Fe) oraz rezydualną. Zastrzeżenia budzą również wyniki wskazujące na znaczny udział frakcji węglanowej, nawet po zastosowaniu bardzo kwaśnego odczynu. W zasadzie omówiona dalej metoda BRC daje lepsze rezultaty i jest bardziej wydajna niż metoda Tessiera i in. [Karczewska 2002]. Jednak przy pracy z osadami ściekowymi za stosowaniem metody Tessiera przemawiają następujące argumenty:

- metoda pozwala na rozdzielne określenie frakcji najbardziej mobilnych (wymiennej i węglanowej), co jest niemożliwe w metodzie BRC [Filgueiras 2002];
- metoda pozwala na dokładniejsze określenie całkowitej zawartości metali ciężkich w badanej próbce – rozbieżność wyników pomiędzy tradycyjną mineralizacją a sumą frakcji oznaczanych tą metodą jest rzędu 10%, według oryginalnych danych Tessiera i in. [1979] oraz Lake i in. [1984] lub 3 – 5% według danych Ščančar i in. [2001] oraz Filgueiras i in. [2002];
- powszechna dostępność metody oraz dokładne opisanie jej aspektów przez wielu autorów, pozwalające na dokładne porównanie uzyskanych wyników;
- stosunkowo krótki czas wykonania poszczególnych etapów metody w porównaniu z innymi metodami sekwencyjnej ekstrakcji;
- możliwość stosowania do materiałów różnego pochodzenia, zarówno do gleb, osadów oraz pyłów, jak i do innych materiałów.

Metoda sekwencyjna Tessiera i in. [1979] była wielokrotnie wykorzystywana do frakcjonowanej analizy osadów ściekowych. Wyniki analiz, co prawda pozwalają na wykazanie pewnego powinowactwa metali do występowania w określonej frakcji, ale ze względu na zmienny skład ścieków często pojawiają się bardzo sprzeczne wyniki (tab. 5).

**Metoda BRC.** Mimo dużej popularności metoda Tessiera i in. ani żadna z innych metod sekwencyjnej ekstrakcji nie zyskała pełnej akceptacji oraz nie została uznana za uniwersalną. Na licznych konferencjach oraz w licznych artykułach wielokrotnie poruszano kwestię ujednoczenia metody. W pracach nad frakcjonowaniem metali, ze względu na umowność, dominuje tendencja upraszczania metod badawczych. W ostatnim czasie zaczęto stosować procedury czterostopniowe [Karczewska 2002].

Metoda BRC powstała na skutek działalności Measurements and Testing Programme (dawnego Community Bureau of Reference – BRC), którego zadaniem było zharmonizowanie i ujednoczenie metodologii procedur ekstrakcyjnych [Arain i in. 2008].

Metoda BRC należy dziś do najpowszechniej zaadoptowanych metod o dużej powtarzalności wyników i odtwarzalności warunków reakcji. Jednak podczas stosowania tej metody do sekwencjonowania gleb i osadów o ekstremalnie różnym składzie należy zachować ostrożność. Wówczas bowiem może być mniej przydatna. Za główną wadę metody uważa się długi czas przeprowadzania kolejnych etapów ekstrakcji [Jamali i in. 2007b].

Standardowa metoda BRC powoduje wyodrębnienie metali związanych z trzema frakcjami (3 etapy procedury):

- rozpuszczalnej w kwasach (związanej z węglanami),
- redukowalnej (związanej z tlenkami Mn i Fe),
- utleniającej (związanej z materią organiczną) [Chandra Sekhar i in 2001].

Wielu autorów w celu uzupełnienia swoich badań dodaje jeszcze czwarty etap – frakcję rezydualną, ekstrahowaną za pomocą wody królewskiej [Fuentes i in. 2004, Wang i in. 2005, Walter i in. 2006].

Zestawienie odczynników używanych do ekstrakcji metodą BRC przedstawiono w tabeli 4.

**Tabela 4.** Odczynniki używane do oznaczania frakcji metali ciężkich według procedury BRC [za Ure i in. 1993]

**Table 4.** Reagents used in the BRC method [by Ure et al. 1993] to evaluate heavy metals fraction

Nr	Nazwa frakcji	Odczynniki	Cm mol/dm <sup>3</sup>	pH
I	Rozpuszczalna w kwasach	HOAc (CH <sub>3</sub> COOH)	0,11	7,0
II	Związana z wodorotlenkami Fe/Mn	NH <sub>2</sub> OH * HCl	0,1	1,5
III	Związana z materią organiczną i siarczkami	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> NH <sub>4</sub> OAc (CH <sub>3</sub> COOHNH <sub>4</sub> )	7,94 1,0	2
IV	Rezydualna	HNO <sub>3</sub> HCl	4 12	–

W metodzie sekwencyjnej ekstrakcji BRC wyróżnić można następujące frakcje:

- frakcję rozpuszczalną w kwasach F1, związaną z węglanami – acid soluble – ekstrahowaną w następujący sposób: 0,5 g powietrznie suchych osadów zalać 20 ml kwasu octowego w butelce z jodem na 100 ml; mieszać 16 godzin w temperaturze pokojowej z prędkością 30 rpm. Ekstrakt odseparować w wirówce z prędkością 3700 rpm, supernatant przelać do pojemnika polietylenowego; ekstrakt przeanalizować i przechowywać w temperaturze 4°C; pozostałość przepłukać 10 ml wody dejonizowanej, mieszać 15 minut, a następnie odwirować; otrzymany supernatant odrzucić, zwracając uwagę, żeby nie odrzucić fazy stałej pozostałości, które będą wykorzystane w etapie II;
- frakcję redukowalną F2, związaną z tlenkami Fe/Mn – reducible – 20 ml chlorku hydroksylaminy (doprowadzonego do pH 2 za pomocą kwasu azotowego) dodać do fazy stałej uzyskanej w etapie I; procedurę powtórzyć jak wyżej;
- frakcję utleniającą F3, związaną z materią organiczną i siarczkami; ekstrahowaną w następujący sposób: pozostałości z etapu II zalać bardzo powoli 5 ml nadtlenu wodoru, umieścić w przezroczystym szkle i pozostawić w temperaturze pokojowej przez 1 godzinę, mieszając od czasu do czasu; następnie kontynuować mieszanie w temperaturze 85°C przez 1 godzinę; objętość ulega redukcji do kilku ml podczas gotowania w odkrytym naczyniu w łaźni wodnej; do pozostałości dodać 5 ml nadtlenu wodoru; ponownie inkubować do łaźni wodnej w temperaturze 85°C przez 1 godzinę; podczas procesu objętość ulega redukcji, a próba jest prawie sucha; dodać 25 ml octanu amonu (sprowadzonego do pH 2 za pomocą kwasu azotowego); postępować jak w etapie I i II [Chandra Sekhar 2001];
- frakcję rezydualną (opcjonalnie) F4, oznaczaną za pomocą wody królewskiej (3HCl + HNO<sub>3</sub>) i określaną jako zawartość metali w pozostałości po poprzednich ekstrakcjach; w celu ekstrakcji 5 ml HNO<sub>3</sub> i 15 ml HCl dodać do pozostałości po frakcji III, gotować do prawie całkowitego wyparowania i po schłodzeniu pozostałości rozpuścić w 5% HNO<sub>3</sub> [Chen i in. 2008].

### 3.5. Kierunki modyfikacji metod ekstrakcji sekwencyjnej

Wśród metod sekwencyjnej ekstrakcji pojawiło się wiele modyfikacji. Celem każdej modyfikacji jest dobranie warunków przebiegu poszczególnych etapów, najbardziej wydajnych i selektywnych odczynników, a także dostosowanie procedury do badanego materiału i jego właściwości.

Istnieje niewiele dobrze opisanych metod sekwencyjnej ekstrakcji przeznaczonych do frakcjonowanej analizy osadów ściekowych. Najbardziej popularne okazały się metody Tesiera i BRC oraz niewielkie ich modyfikacje. Oprócz wymienionych metod na uwagę zasługują jeszcze inne o zupełnie odrębnej procedurze badawczej.

Jedną z nich jest zaproponowana przez Stovera i in. [1976] i Rudda i in. [1988] metoda siedmiostopniowej ekstrakcji, w której wyróżnić można następujące frakcje:

- rozpuszczalną ekstrahowaną za pomocą wody,
- wymienną – ekstrahowaną  $\text{KNO}_3$ ,
- absorbowalną – KF,
- związaną z materią organiczną –  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ ,
- związaną z węglanami – czynnikiem ekstrahującym jest EDTA,
- związaną z siarczkami –  $\text{HNO}_3$ ,
- nierozpuszczalną – HCl,  $\text{HNO}_3$ .

Inną metodą czasami stosowaną do frakcjonowanej analizy osadów jest metoda SSE (Selective Sequential Extraction Method) opracowana przez Oake i in. [1984], będąca po części uproszczeniem metody Rudda. W metodzie tej można wyróżnić pięć frakcji:

- rozpuszczalną – ekstrahowana za pomocą wody dejonizowanej,
- wymienną – 1 M  $\text{KNO}_3$ ,
- absorbowalną – 0,5 M KF,
- związaną z materią organiczną – 0,1 M  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ ,
- związaną z węglanami – 0,1 M  $\text{Na}_4\text{EDTA}$ .

Również pięciostopniową metodę sekwencyjną osadów ściekowych zaproponował Elliot i in. [1990]. W metodzie wyróżniono następujące frakcje:

- wymienną – ekstrakcja 1 M  $\text{MgCl}_2$  w pH 7,0;
- ekstrahowaną w kwasach – 1 M NaOAc przy pH 5 sprowadzonym za pomocą HOAc;
- związaną z tlenkami Fe/Mn – ekstrahowaną 0,175 M  $(\text{NH}_4)_2\text{C}_2\text{O}_4$  i 0,1 M  $\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4$ ;
- organiczną – ekstrahowaną 0,1 M  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$

oraz

- rezydualną – oznaczaną za pomocą wody królewskiej.

Bez względu na rodzaj metody badawczej, stosowanej do przeprowadzenia analizy sekwencyjnej osadów ściekowych, wyniki oznaczeń mogą być bardzo różne. W tabeli 5 przedstawiono zestawienie wyników badań zawartości metali ciężkich **we frakcjach osadów ściekowych** przeprowadzonych metodami Tessiera i in. oraz BRC. Badania były prowadzone przez zespoły krajowe oraz zagraniczne. W tabeli uwzględniono średnie procentowe występowanie metali ciężkich w kolejnych frakcjach, w porównaniu do sumy danego metalu w badanej próbce.

#### 4. PODSUMOWANIE

Całkowita zawartość metali ciężkich w osadach ściekowych służy jedynie ocenie ich jakości lub zanieczyszczenia. Na jej podstawie nie można określić puli pierwiastków potencjalnie biodostępnych. Dlatego bardzo ważne jest rozpoznanie, z jakimi składnikami osadów ściekowych związane są poszczególne metale. Jednym z narzędzi do uzyskania

**Tabela 5.** Zestawienie wyników badań frakcjonowanej analizy sekwencyjnej metodą Tessiera i in. oraz BRC uzyskanych przez różne zespoły badawcze z uwzględnieniem powinowactwa metali ciężkich (%) do poszczególnych frakcji osadów ściekowych  
**Table 5.** Summary of the results of sequential analyses with the use of the Tessier et al. and BRC methods, obtained by different authors with regard to the relation of heavy metals contents (%) to sewage sludge fraction

Odhiesienie literaturowe	Kadm Cd	Nikiel Ni	Ołów Pb	Chrom Cr	Miedź Cu	Cynk Zn
<b>Metoda Tessiera i in. [1979]</b>						
Piotrowska, Dudka [1987]	F3(55,5)> F5 (29,3)> F2 (6,9)> F4 (5,5) > F1 (2,8)	F5 (64)> F4 (12,1) > F2 (11,1)> F3 (7,5) > F1 (5,3)	F4 (51,9)> F5 (22,9)> F3 (19,4)> F2 (5,8)> F1 (0)	F3 (55,1)> F4 (29,5)> F5 (15,2)> F2 (0,2)> F1 (0)	F4(73,4)> F3 (14,3)> F5 (12,3)> F2 (0)> F1 (0)	F3 (47,8)> F2 (23,7)> F4 (23,5)> F1 (2,6)> F5 (2,4)
Siedlecka, Bojanowska [2004]	F3 (66)> F5 (19)> F4 (15)> F1=F2 (0)	brak badań	F4 (60)> F5(40)> F1=F2=F3 (0)	brak badań	F4 (52)> F5 (44)> F3 (3)> F1= F2 (1)	F5 (65)> F3 (24)> F4 (10)> F1=F2 (1)
Shrivastava i Benerjee [2003]	F5 (65,7)> F2 (14,4)> F3 (14,4)> F4 (7,3)> F1 (2,4)	F5 (61,4)> F4 (15,8)> F3 (11,9)> F2 (5,6)> F1 (5,3)	F5 (72,8)> F3 (15,9)> F4 (6,6)> F2 (3,9)> F1 (0,8)	F5 (79,1)> F4 (8,2)> F2 (6,3)> F3 (3,7)> F1 (2,7)	F5 (61,0)> F2 (17,2)> F4 (10,1)> F3 (8,1)> F1 (3,6)	F5 (50,3)> F3 (19,9)> F2 (15)> F4 (11,4)> F1 (3,4)
Gupta, Sinha [2007]	F3 (65,6)> F2 (23,7)> F1 (5,9)> F4 (4,8)> F5 (0)	F5 (52,5)> F3 (29,5)> F4 (14,6)> F1 (1,9)> F2 (1,5)	F3 (51)> F4 (35,5)> F5 (11,8)> F2 (1,4)> F1 (0,3)	F3 (62,1)> F5 (27,5)> F4 (10,2)> F2 (0,1)> F1 (0,1)	F4 (82,7)> F5 (11,4)> F3 (3,7)> F2 (1,5)> F1 (0,7)	F3 (69,3)> F4 (12)> F2 (11,6)> F5 (6,3)> F1 (0,8)
<b>Metoda BRC</b>						
Hanay Ö. i in. [2008]	F4 (70)> F2 (18,5)> F1(10,5)> F3 (0,2)	brak badań	F4 (56,7)> F2 (43)> F1 (0,3)> F3 (0)	F3 (83,1)> F2 (9,9)> F4 (3,8)> F1 (3,2)	F3(42,2)> F2 (24)> F4 (19,2)> F1 (14,6)	brak badań
Jamali i in. [2007 b]	F2 (47,8)> F1 (31)> F3 (13,2) > F4 (8)	F3 (42,1)> F4 (36,4)> F2 (23,9)> F1 (7,6)	F4 (57,7)> F3 (31,7)> F2 (8)> F1 (3,6)	F4 (55,7)> F3 (35,1)> F2 (6,1)> F1 (3,1)	F4 (54,3)> F3 (32,6)> F2 (10,6)> F1 (2,5)	F3 (48,0)> F2 (24,3)> F4 (19,3)> F1 (8,4)

**Objaśnienia:** Metoda Tessiera i in.: F1 – frakcja wymienna, F2 – frakcja rozpuszczalna w kwasach, F3 – frakcja redukowalna, F4 – frakcja utleniaalna, F5 – frakcja rezydualna.  
 Metoda BRC: F1 – frakcja rozpuszczalna w kwasach, F2 – frakcja utleniaalna, F3 – frakcja redukowalna, F4 – frakcja rezydualna.

takiej informacji jest metoda sekwencyjnej ekstrakcji. Pozwala ona modelować zmiany, jakie mogą zachodzić w środowisku przyrodniczym, pod wpływem takich czynników jak: odczyn, potencjał redoks, zasolenie itp. W efekcie analiza sekwencyjna pozwala oszacować ilość danego pierwiastka, jaka może być włączona do obiegu biologicznego w wyniku wymienionych zmian w środowisku przyrodniczym.

## PIŚMIENNICTWO

- ALOMARY A.A., BELHADJ S. 2007. Determination of heavy metals (Cd, Cr, Cu, Fe, Ni, Pb, Zn) by ICP – OES and their speciation in Algerian Mediterranean Sea sediments after a five – stage sequential extraction procedure. *Environmental Monitoring and Assessment* 135: 265–280.
- ARAIN M.B., KAZI T.G., JAMALI M.K., JALBANI N., AFRIDI H.I., BAIG J.A. 2008. Speciation of heavy metals in sediment by conventional, ultrasound and microwave assisted single extraction methods: A comparison with modified sequential extraction procedure. *Journal of Hazardous Materials* 154: 998–1006.
- BACON J.R., DAVIDSON C.M. 2008. Is there a future for sequential chemical extraction? *The Analyst. Section: Critical Review* 122: 25–46.
- BECKETT P.H. 1989. The use of extractants in studies of trace metals in soils, sewage sludges and sludge-treated soils. *Advances in Soil Science* 9: 143–176.
- CHANDRA SEKHAR K., RAJNI SUPRIYA K., KAMALA C.T., CHARY N.S., NAGESWARA RAO T., ANJANEYULU Y. 2001. Speciation, accumulation of heavy metals in vegetation grown on sludge amended soils and their transfer to human food chain – a case study. *Toxicological and Environmental Chemistry* 88: 33–43.
- CHEN M., LI X.M., YANG Q., ZENG G.M. ZHANG Y., LIAO D.X., LIU J.J., HU J.M., GUO L. 2008. Total concentrations and speciation of heavy metals in municipal sludge from Changsha, Zhuzhou and Xiangtan in middle – south region of China. *Journal of Hazardous Materials*. 160: 324–329.
- DĄBROWSKA L. 2004. Speciation of heavy metals in sewage sludge, in: “Pathways of pollutants and migration strategies of their impact on the ecosystems” edited by Dudzińska M.R. and Pawłowska M. Lublin: 38–47.
- DZIADEK K., WACŁAWEK W. 2005. Metale w środowisku. Cz. I. Metale ciężkie (Zn, Cu, Ni, Pb, Cd) w środowisku glebowym. *Chemia. Dydaktyka. Ekologia. Meteorologia*, R.10, nr 1–2: 33–44.
- Elemental speciation in human health risk assessment.** 2006. International Programme on Chemical Safety (IPCS). *Environmental Health Criteria* 234. World Health Organization (WHO), Geneva.
- ELLIOTT H.A., DEMPSEY B.A., MAILLE P.J. 1990. Content and fractionation of heavy metals in water treatment sludges. *Journal of Environmental Quality* 19: 330–334.

- FILGUEIRAS A.V., LAVILLA I., BENDICHO C. 2002. Chemical sequential extraction for metal partitioning in environmental solid samples. *Journal of Environmental Monitoring* 4: 823–857.
- FUENTES A., LIORÉNS M., SÁEZ J., SOLER A., AGUILAR M., ORTUÑO F., MESEGUER V.F. 2004. Simple and sequential extraction of heavy metals from different sewage sludges. *Chemosphere* 54: 1039–1047.
- GARCIA-DELGADO M., RODRIGUEZ-CRUZ M.S., LORENZO L.F., ARIENZO M., SANCHEZ-MARTIN M.J. 2007. Seasonal and time variability of heavy metal content and of its chemical forms in sewage sludges from different wastewater treatment plants. *Science of the Total Environment* 382: 82–92.
- GRIMME H. 1967. Die fractionierte Extraktion von Kupfer aus Böden. *Z. Pflanzenernähr. Düng. Bodenk.* 116: 207–222.
- GUPTA S., CHEN 1975. Partitioning of trace metals in selective chemical fractions of near-shore sediments. *Environmental Lett.* 10: 129–158.
- GUPTA A.K., SINHA S. 2007. Phytoextraction capacity of the plants growing on tannery sludge dumping sites. *Bioresource Technology* 98: 1788–1794.
- GWOREK B. 2004 a. Assessment of heavy metal availability in the environment by using sequential extraction method in: *Pathways of pollutants and migration strategies of their impact on the ecosystems* edited by Dudzińska M.R. and Pawłowska M. Lublin: 31–36.
- HANAY Ö., HASAR H., KOCER N.N., ASLAN S. 2008. Evaluation for Agricultural Usage with Speciation of Heavy Metals in a Municipal Sewage Sludge. *Bull Environ Contam Toxicol* 81:42–46.
- JALALI M., KHANLARI Z.V. 2006. Mobility and Distribution of Zinc, Cadmium and Lead in Calcareous Soils Receiving Spiked Sewage Sludge. *Soil & Sediment Contamination* 15: 603–620.
- JAMALI M.H., KAZI T.G., ARAIN M.B., AFRIDI H.I., JALBANI N., MEMON A.U.R., ANSARI R., SHAH A. 2007a. The feasibility of using an industrial sewage sludge produce in Pakistan as agricultural fertilizer used for cultivation of *Sorghum Bicolor* L. *Archives of Agronomy and Soil Science* 53(6): 659–671.
- JAMALI M.H., KAZI T.G., AFRIDI H.I., ARAIN M.B., JALBANI N., MEMON A.U.R. 2007b. Speciation of heavy metals in untreated domestic wastewater sludge by time saving BRC sequential extraction method. *Journal of Environmental Science and Health. Part A* 42: 649–659.
- JOKSIČ A.S., KATZ S.A., HORVAT M., MILAČIČ R. 2005. Comparison of single and sequential extraction procedures for assessing metal leaching from dredged coastal sediments. *Water, Air, and Soil Pollution* 162: 265–283.
- KARCZEWSKA A. 2002. Metale ciężkie w glebach zanieczyszczonych emisjami hut miedzi – formy i rozpuszczalność. *Zeszyty Naukowe Akademii Rolniczej we Wrocławiu*, nr 432: 159.

- KOWALKOWSKI T., BUSZEWSKI B. 2002. Specjacja i modelowanie transportu metali ciężkich w glebach. *Ekologia i Technika* 10 (1): 3–11.
- LAKE D.L., KRIK P.W., LESTER J.N. 1984. Fractionation, characterization and speciation of heavy metals in sewage sludge and sludge – amended soils. A review. *Journal of Environmental Quality* 13: 175–183.
- LOPEZ-SANCHEZ J.F., RUBIO R., RAURET G. 1993. Comparison of two sequential extraction procedures for trace metal partitioning in sediments. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* 51: 113–121.
- MA Q.L., RAO N.G. 1997. Chemical fractionation of cadmium, copper, nickel and zinc in contaminated soils. *Journal of Environmental Quality* 26: 259–64.
- MAIZ I., ARAMBARRI R., GARCIA R., MILLAN E. 2000. Evaluation of heavy metal availability in polluted soils by two sequential extraction procedures using factor analysis. *Environmental Pollution* 110: 3–9.
- MCLAREN R.G., CRAWFORD D.V. 1973. Studies on soil copper. I. The fractionation of copper in soils. *Journal of Soil Science* 24: 172–181.
- MOĆKO A., WACŁAWEK W. 2004. Ocena zanieczyszczenia gleb metalami ciężkimi metodą ekstrakcji pojedynczej z zastosowaniem HCl, HNO<sub>3</sub> i CH<sub>3</sub>COOH jako eluentów. *Archiwum Ochrony Środowiska* 30(3): 51–58.
- MURPHY A.P., COUDERT M., BARKER J. 2000. Plants as biomarkers for monitoring heavy metal contaminants on landfill sites using sequential extraction and inductively coupled plasma atomic emission spectrophotometry (ICP – AES). *Journal of Environmental Monitoring* 2: 621–627.
- NARWALL R.P., SINGH B.R. 2001. Solid phase speciation of iron and manganese in Alum Shale soils studied by parallel and sequential extraction. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 32 (3&4): 331–349.
- OAKE R.J., BOOKER C.S., DAVIS R.D. 1984. Fractionation of heavy metals in sewage sludges. *Water Science and Technology* 17: 587–598.
- PÉREZ-CID B., DE JESÚS-GONZÁLEZ M., FERNÁNDEZ-GÓMEZ E. 2002. Comparison of single extraction procedures, using either conventional shaking or microwave heating, and the Tessier sequential extraction method for the fractionation of heavy metals from environmental samples. *Analyst* 127: 681–688.
- PÉREZ-CID B., LAVILLA I., BENDICHO C. 1996. Analytical assessment of two sequential extraction schemes for metal partitioning in sewage sludge. *Analyst* vol. 121: 1474–1484.
- PIOTROWSKA M., DUDKA S. 1987. Frakcje metali śladowych w osadach ściekowych jako kryterium ich przydatności w rolnictwie. *Archiwum Ochrony Środowiska PAN* nr 1–2: 65–72.
- PLANQUART P., BONIN G., PRONE A., MASSIANI C. 1999. Distribution, movement and plant availability of trace metals in soils amended with sewage sludge composts: application to low metal loadings. *Science of the Total Environment* 241: 161–179.

- QIAO L., HO G. 1996. The effect of clay amendment on speciation of heavy metals in sewage sludge. *Wat. Sci. Tech.* vol. 34, no: 7–8: 413–420.
- RAO C.R.M., SAHUQUILLO A., LOPEZ SANCHEZ F. 2008. A review of the different methods applied in environmental geochemistry for single and sequential extraction of trace elements in soils and related materials. *Water, Air, and Soil Pollution* 189: 291–333.
- RENOUX A.Y., ROCHELEAU S., SARRAZIN M., SUNAHARA G.I., BLAIS J.F. 2007. Assessment of a sewage sludge treatment on cadmium, copper and zinc bioavailability in barley, ryegrass and earthworms. *Environmental Pollution* 145: 41–50.
- RUDD T., LAKE D.J., MEHROTA J., STERRITT R.M., KIRK P.W.W., CAMPBELL J.A., LES-TER J. 1988. Characterization of metal forms in sewage sludge by chemical extraction and progressive acidification. *Science of the Total Environment* 74: 149–175.
- ŠČANČAR J., MILAČIČ R., STRAŽAR M., BURICA O., BUKOVEC P. 2001. Environmentally safe sewage sludge disposal: The impact of liming on the behaviour of Cd, Cr, Fe, Mn, Ni, Pb and Zn. *Journal Environmental Monitoring* 3: 226–231.
- SHOBER A.L., STEHOUWER R.C., MACNEAL K.E. 2007. Chemical Fractionation of Trace Elements in Biosolid–Amended Soil and Correlation with Trace Elements in Crop Tissue. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 38: 1029–1046.
- SHRIVASTAVA S.K., BANERJEE D.K. 2004. Speciation of metals in sewage sludge and sludge–amended soils. *Water, Air and Soil Pollution* 152: 219–232.
- SHUMAN L.M. 1991. Chemical forms of micronutrients in soils. In: *Micronutrients in agriculture*. Chapter 5, 113–144. Eds. Martvedt J.J, Cox F.R., Shuman L.M., Welch R.M. Soil Science Society of America, Inc. Madison, Wisconsin.
- SIEDLECKA E.M., BOJANOWSKA I. 2004. Speciation of heavy metals in the municipal sewage sludge. *Chemia i inżynieria ekologiczna* t.11, nr 10: 1105–1110.
- SIEPAK J. 2003. Kierunki i tendencje rozwoju współczesnej analityki próbek środowiskowych. VI Ogólnopolska Konferencja Naukowa. Ustronie Morskie: 56–78. [http://wbiis.tu.koszalin.pl/konferencja/konferencja2003/2003/03\\_siepak.pdf](http://wbiis.tu.koszalin.pl/konferencja/konferencja2003/2003/03_siepak.pdf)
- ŠÖMEN JOKSIČ A., KATZ S.A., HORVAT M., MILAČIČ R. 2005. Comparison of single and sequential extraction procedures for assessing metal leaching from dredged coastal sediments. *Water, Air, and Soil Pollution* 162: 265–283.
- STOVER, R.C., SOMMERS L.E., SILVIERA D.J. 1976. Evaluation of metals in wastewater sludge. *Journal Water Pollut. Control Fed.* 48: 2165–2175.
- TESSIER A., CAMPBELL P.G.C., BISSON M. 1979. Sequential extraction procedure for the speciation of particulate trace metals. *Analytical Chemistry* vol. 51, n. 7: 344–351.
- TUREK M., KOROLEWICZ T., CIBA J. 2005. Removal of Heavy Metals from Sewage Sludge Used as Soil Fertilizer. *Soil & Sediment Contamination* 14: 143–154.
- URE A.M., QUEVAUVILLER P., MANTAU H., GRIEPINK B. 1993. Speciation of heavy metals in soils and sediments. An account of the improvement and harmonization of extraction techniques undertaken under the auspices of the BRC of the Commission of the

European Communities. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* vol. 51: 135–151.

VILAR S., GUTERREZ A., ANTEZANA J., CARRAL P., ALVAREZ A. 2005. A comparative study of three different methods for the sequential extraction of heavy metals in soil. *Toxicological & Environmental Chemistry* 87 (1): 1–10.

WALTER I., MARTINEZ F., CALA V. 2006. Heavy metal speciation and phytotoxic effects of tree representative sewage sludges for agricultural uses. *Environmental Pollution* 139: 503–514.

WANG W.S., SHAN X.Q., WEN B., ZHANG S.Z. 2003. Relationship between the extractable metals from soils and metals taken by maize roots and shoots. *Chemosphere* 53: 523–530.

ZHANG M., ZHOU C., HUANG CH. 2006. Relationship Between Extractable Metals in Acid Soils and Metals Taken up by Tea Plants. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 37: 347–361.