

Karolina Lewińska\*, Anna Karczewska\*

**OCENA PRZYDATNOŚCI METODY DGT DO OKREŚLENIA  
BIODOSTĘPNOŚCI ARSENU I POBRANIA PRZEZ ROŚLINY – NA  
PRZYKŁADZIE KŁOSÓWKI WEŁNISTEJ (*HOLCUS LANATUS*)**

**SUITABILITY OF DGT METHOD FOR ASSESSMENT OF ARSENIC  
BIOAVAILABILITY AND ITS UPTAKE BY PLANTS – TESTED ON THE  
EXAMPLE OF *HOLCUS LANATUS***

**Słowa kluczowe:** arsen, DGT, fosfor, *Holcus lanatus*.

**Key words:** arsenic, DGT, phosphorus, *Holcus lanatus*.

*This work was aimed to assess a suitability of DGT (Diffusive Gradients in Thin-Films) method for determination of arsenic bioavailability from highly polluted soils. DGT method bases on the measurement of effective concentration of trace element in soil, corresponding to its current concentration in soil solution, supplemented with a labile metal pool released from the solid phase. The principle of this method as a passive accumulation of metallic elements in a well-defined diffusion layer of hydrogel. Many authors proved that the effective concentration of heavy metals measured by DGT correlated very well with their uptake by plants. However, only few publications applied DGT to assessment of arsenic phytoavailability. This paper presents effective concentrations of arsenic in soils, measured by DGT method, in relation to extraction of easily soluble forms and As content in the shoots of velvetgrass (*Holcus lanatus* L.). Plant and soil material were collected from a pot experiment, with two types of soil: sandy and loamy, spiked with As (III) in the forms of sodium arsenite, to obtain total As concentration of about 500 mg·kg<sup>-1</sup>. Soils in the part of experimental plots were supplied with 200 mg P·kg<sup>-1</sup> in the form of ammonium phosphate (NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>). Velvetgrass (*Holcus lanatus* L.) seeds were sown to soils and after 3 months, plant shoots were harvested and analysed. Arsenic concentrations in plants showed considerable differences not only among the plots but also between replicates. Phosphorus addition caused increase*

---

\* *Mgr inż. Karolina Lewińska; prof. dr hab. inż. Anna Karczewska – Instytut Nauk o Glebie i Ochrony Środowiska. Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu, ul. Grunwaldzka 53, 50-357 Wrocław; tel.: 71 320 56 39; e-mail: karolina\_lewińska@wp.pl; anna.karczewska@up.wroc.pl*

*of arsenic uptake by plants. Mean concentration of labile arsenic in soils determined by DGT corresponded well with extractable (easily soluble) As forms, but the correlation between DGT results and As concentrations in plant shoots was poor, and proved significant only then when each of soils was analysed separately.*

## 1. WPROWADZENIE

Metoda (Diffusive Gradients on Thin Films (gradientu dyfuzyjnego) polega na pasywnej akumulacji rozpuszczalnych substancji znajdujących się środowisku wodnym, glebowym lub w osadach, w hydrożelu umieszczonym w urządzeniu pomiarowym. Ze względu na niewielkie rozmiary urządzenia metodę tę można wykorzystywać do monitoringu lub pomiaru *in situ* zagrożenia związanego z zanieczyszczeniem gleb metalami ciężkimi, a także fosforanami, siarczanami czy radionuklidami. Szerokie spektrum wykorzystania tej metody opisuje Zhang [Zhang i in. 2001; Zhang 2003] oraz inni autorzy [Koster i in. 2005; Li i in. 2005].

Celem prezentowanej pracy była wstępna ocena przydatności metody Diffusive Gradients In Thin - Films DGT do określenia fitoprzyswajalności arsenu w glebach zanieczyszczonych. Metoda DGT (Diffusive Gradients in Thin-Films) polega na pomiarze tzw. efektywnej koncentracji danego pierwiastka w glebie, odpowiadającej jego aktualnemu stężeniu w roztworze glebowym zwiększonemu o pulę uwalnianą z fazy stałej i dostępną dla roślin. Istota metody polega na pasywnej akumulacji pierwiastków metalicznych w ściśle określonej dyfuzyjnej warstwie żelu. W świetle bogatej bibliografii efektywna koncentracja metali ciężkich, mierzona metodą DGT, wykazuje bardzo dobrą korelację z wielkością pobrania tych pierwiastków przez rośliny. Jednak tylko nieliczne publikacje dotyczą zastosowania DGT do oceny fitoprzyswajalności arsenu.

W niniejszej pracy przedstawiono wyniki pomiaru efektywnych koncentracji arsenu w glebach uzyskane metodą DGT (gradientu dyfuzyjnego), w odniesieniu do wyników ekstrakcji form łatwo rozpuszczalnych oraz zawartości As w biomase nadziemnych części kłosa *Hołcus lanatus*).

Szczególnie interesująca wydaje się możliwość wykorzystania tej metody do badań ekotoksykologicznych. Tradycyjne analizy laboratoryjne pozwalają na określenie całkowitej zawartości danego pierwiastka w glebie i udziału jego frakcji związanych z różnymi komponentami gleby, odgrywającymi szczególną rolę w sorpcji metali ciężkich. Różnorodność metod ekstrakcji oraz odczynników chemicznych służących do określania udziału form łatwo rozpuszczalnych, potwierdza jednak trudność w określeniu rzeczywistej mobilności i dostępności pierwiastków w glebie. Wyniki prostej ekstrakcji chemicznej zależą wprawdzie od warunków panujących w glebie, jednak nie uwzględniają zdolności gleby do utrzymywania stałego stężenia pierwiastków w roztworze glebowym i uzupełniania jego poziomu.

Tymczasem w skutek pobierania pierwiastków z roztworu glebowego przez rośliny ich pula w roztworze ulega uszczupleniu i wówczas dodatkowa porcja tych pierwiastków prze-

chodzi z fazy stałej do roztworu. Ma ona istotne znaczenie w zaopatrzeniu roślin w makro- i mikroelementy.

W metodzie DGT, podobnie jak w wyniku pobrania pierwiastków przez rośliny, uzyskuje się lokalne obniżenie stężenia pierwiastka w roztworze glebowym, wskutek czego następuje uzupełnienie puli tego pierwiastka z fazy stałej gleby. W ten sposób DGT mierzy wielkość przepływu strumienia pierwiastka z fazy stałej do roztworu glebowego [Zhang 2003].

Zhang i in. [2001], a także Panther i in. [2008], uzyskali obiecujące wyniki wykorzystania DGT do określania biodostępności pierwiastków w środowisku, jednak inne badania nie potwierdzają uniwersalności tej metody [Koster i in. 2005].

## 2. METODYKA BADAŃ

### 2.1. Doświadczenie wazonowe

W pracy wykorzystano dwa rodzaje materiału glebowego: glinę lekką (I) oraz piasek słabogliniasty (II), które po uprzednim zanieczyszczeniu arseninem (III) sodu, w dawce 500 mg As·kg<sup>-1</sup>, były testowane w doświadczeniu wazonowym. Do części wariantów wprowadzono 0,2 g P·kg<sup>-1</sup>, w formie roztworu fosforanu amonowego NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. W celu zrównoważenia dostarczonej dawki azotu i potasu w glebach w wariantach bez dodatku P zastosowano równoważną dawkę 0,056 g·kg<sup>-1</sup> azotu w formie NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> i 0,054 g·kg<sup>-1</sup> w formie KNO<sub>3</sub>.

Materiałem glebowym wypełniono wazony o pojemności 1 kg i wysiano do nich nasiona kłosołki welnistej (*Holcus lanatus*). Po upływie trzech miesięcy od daty wysiewu materiał roślinny ścięto, wymyto, zważono i wysuszono. Następnie poddano go mineralizacji mieszaniną kwasów azotowego i nadchlorowego, w stosunku 4:1, w systemie otwartym.

Oznaczono zawartość As za pomocą ICP-MS (Elan 9000 DRce; Perkin-Elmer). W celu walidacji metody i weryfikacji wyników wykorzystano materiał referencyjny Certified Reference Material NCS DC 73348 (Bush Branches and Leaves). Analizy materiału roślinnego i gleb przeprowadzono w laboratorium Universität für Bodenkultur w Wiedniu.

### 2.2. Podstawowe właściwości gleb

Materiał glebowy z doświadczenia wazonowego został pobrany tuż po jego zakończeniu, wysuszony i przesiany przez sита o średnicy oczek 2 mm. Podstawowe właściwości gleb przedstawiono w tabeli 1. Przyswajalne formy fosforu i potasu oznaczono metodą Egnera-Riehma w 0,04 M Ca(CH<sub>3</sub>CHOHCOO)<sub>2</sub> · 5 H<sub>2</sub>O, a przyswajalne formy magnezu metodą Schachtschabela w 0,0125 M CaCl<sub>2</sub>. Sumę wymiennych kationów zasadowych w kompleksie sorpcyjnym wyliczono na podstawie analizy wykonanej zmodyfikowaną metodą Palmiana w 1M CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub> (pH 7,0).

**Tabela 1.** Podstawowe właściwości gleb I i II użytych w doświadczeniu**Table 1.** Basic properties of soils I and II used in the experiment

Właściwości	Gleba I	Gleba II
Grupa granulometryczna	głina lekka *	piasek słabogliniasty *
C org, %	1,8	1,7
pH: KCl	6,75	6,12
H <sub>2</sub> O	6,01	5,53
Formy przyswajalne, mg·kg <sup>-1</sup>		
P	75,0	28,0
K	68,0	10,0
Mg	200	80,0
Suma kationów zasadowych, cmol·kg <sup>-1</sup>	11,4	6,96
Kwasowość hydrolityczna, cmol·kg <sup>-1</sup>	2,00	2,40
Całkowita pojemność sorpcyjna T, cmol·kg <sup>-1</sup>	13,4	9,36

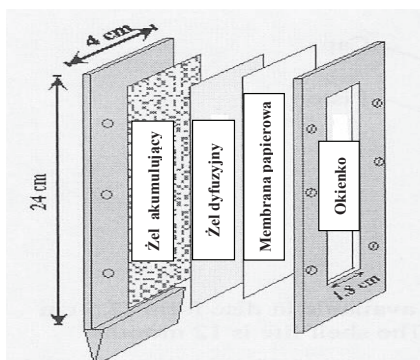
**Objaśnienie:** \*Grupy granulometryczne – wg PTG 2008.

W materiale glebowym oznaczono również udział łatwo rozpuszczalnych form As w ekstrakcji 0,05 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1:25, 4 godz. na mieszadło rotacyjnym), która stanowi pierwszy krok w ekstrakcji sekwencyjnej zaproponowanej przez Wenzla i in. [2001]. Stężenie As w ekstraktach oznaczono za pomocą ICP-MS (Elan 9000 DRc; Perkin-Elmer).

### 2.3. Metoda DGT

Urządzenie DGT składa się z trzech warstw:

- 1) warstwy żel żwycznego, akumulującego pierwiastki, o grubości 0,4 mm;
  - 2) warstwy żel dyfuzyjnego (diffusive gel) o grubości 0,82 mm;
- oraz
- 3) membrany papierowej, zabezpieczającej żel przed bezpośrednim kontaktem z glebą.



**Rys. 1.** Budowa urządzenia DGT [Zhang 2003, w modyfikacji Lewińskiej]

**Fig. 1.** Structure of DGT [Zhang 2003, modified by Lewińska]

Wodę dejonizowaną wprowadzono do próbki gleby, tak by osiągnąć 100 % połowej pojemności wodnej. Tak przygotowaną glebę, a także cały układ DGT, poddano inkubacji w 20°C, przez 24 godz. Po upływie tego czasu materiał glebowy umieszczono w okienku urządzenia DGT i poddano, przez 48 godzin ponownej inkubacji. Po zakończeniu inkubacji poddano analizie żel akumulujący, uwalniając z niego zgromadzony arsen przez 24-godziną ekstrakcją w 1M HNO<sub>3</sub> (cz.d.a., Merck). Stężenie As w ekstrakcie oznaczano na aparacie ICP-MS (Elan 9000 DRCE, Perkin-Elmer), w Instytucie Nauk o Glebie, Universität für Bodenkultur w Wiedniu.

Na tej podstawie obliczono stężenie labilnego As na granicy faz układu DGT ( $C_{DGT}$ ), proporcjonalne do efektywnej koncentracji arsenu w glebie. W tym celu zastosowano wzory uwzględniające czas inkubacji próbek, powierzchnię ekspozycji w okienku, grubość warstw żelu dyfuzyjnego, a także współczynnik dyfuzji przez żel, zróżnicowany w zależności od rodzaju badanego pierwiastka [Zhang 2003].

### 3. WYNIKI I DYSKUSJA

W czasie doświadczenia porównywano wzrost i zdrowotność roślin w poszczególnych wariantach eksperymentu. W wariantach z dodatkiem fosforu uzyskano większą biomasę roślin niż w wariantach bez tego dodatku, przy czym większą masę części nadziemnych roślin uzyskano na glebie II. Średnia biomasa części nadziemnych kłosówki wełnistej mieściła się w przedziale od 0,85 g s.m./wazon do 2,93 g s.m./wazon w wariantach z dodatkiem fosforu, a w wariantach bez dodatku, biomasa była podobna i średnio wynosiła 1,1 g s.m./wazon.

W czasie wzrostu roślin we wszystkich wariantach zaobserwowano nieznaczne objawy chlorozy oraz ogólnie słabszy wzrost w porównaniu z roślinami wysianymi w równoległym doświadczeniu, na glebach niezanieczyszczonych.

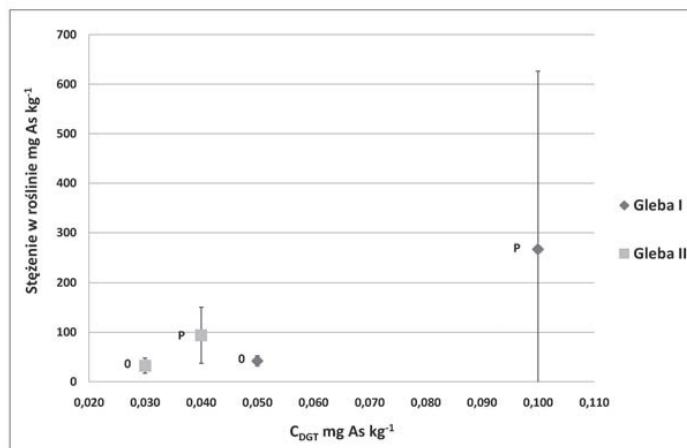
Również w nadziemnych częściach roślin stężenia As były wyższe w wariantach z dodatkiem fosforu w porównaniu z wariantami bez tego dodatku. Średnia zawartość As w roślinach z wazonów bez dodatku P wynosiła 42,3 mg·kg<sup>-1</sup>s.m. na glebie I oraz 32,5 mg·kg<sup>-1</sup> s.m. na glebie II. Wzbogacenie gleb w fosfor spowodowało zwiększenie stężeń arsenu w roślinach, gdzie średnia dla gleby I wynosiła 268 mg·kg<sup>-1</sup> s.m., a dla gleby II: 94,0 mg·kg<sup>-1</sup> s.m. Bleeker i in. [2003] w doświadczeniu z kłosówką wełnistą na bogatych w arsen glebach pochodzących z rejonu kopalni złota uzyskali od 130 do 166 mg As·kg<sup>-1</sup> s.m. w częściach nadziemnych roślin, co jest zbliżone do wyników uzyskanych w wariantach z dodatkiem fosforu, przy czym całkowita zawartość arsenu w glebie w doświadczeniu Bleeker'a była większa niż w eksperymencie tu opisywanym i wynosiła 1325 mg·kg<sup>-1</sup>. W jednym z powtórzeń opisywanego doświadczenia, w wariantcie z dodatkiem P do gleby I, uzyskano w biomasie kłosówki bardzo wysokie stężenie As, na poziomie 630 mg·kg<sup>-1</sup>s.m., a wynik ten został potwierdzony w dwóch niezależnych laboratoriach. Prawdopodobnie w tym wypadku została

przełamana bariera tolerancji roślin, co spowodowało gwałtowne zwiększenie pobrania As przez kłosówkę. Ponieważ wynik ten został uwzględniony w analizie statystycznej, uzyskano bardzo duże wartości odchylenia standardowego, a w konsekwencji stwierdzone zależności między wpływem dodatku P a zwiększonym pobraniem As nie zostały potwierdzone statystycznie na poziomie istotności  $P=95\%$ .

Analiza danych z ekstrakcji form As łatwo rozpuszczalnych obecnych w glebie również wskazuje na zwiększoną rozpuszczalność As w wariantach z dodatkiem fosforu, co zostało potwierdzone statystycznie. Średnio dodatek fosforu zwiększył rozpuszczalność As o 45% w glebie I i o 18% w glebie II. Ogólna ilość łatwo ekstrahowalnego As była mniejsza w glebie II.

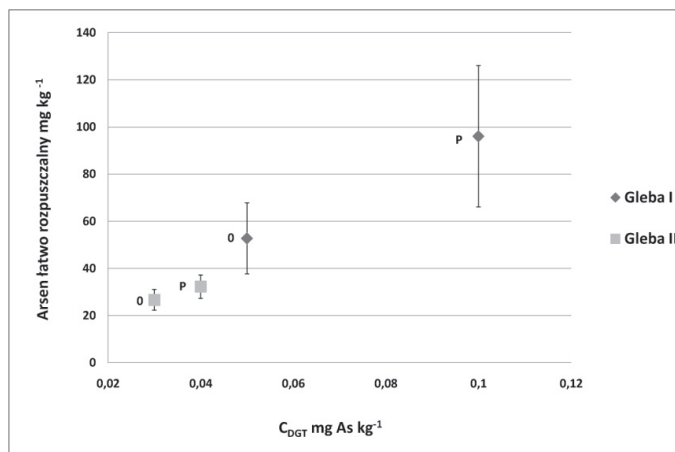
Zestawienie wyników średniego stężenia labilnego As na granicy faz ( $C_{DGT}$ ), oznaczonego metodą DGT, z wynikami ilustrującymi stężenie As w biomacie roślin oraz stężenie łatwo ekstrahowalnego As w glebach przedstawiono na rysunkach 2 i 3. Wyniki uzyskane z analizy materiału roślinnego i stężenia  $C_{DGT}$  (rys. 2), wskazują, że dodatek P do danej gleby (I lub II) powoduje wzrost stężenia As w biomacie kłosówki wełnistej i jednocześnie wzrost oznaczonego stężenia  $C_{DGT}$ . Jednak efekt ten obserwuje się tylko wtedy, gdy analizowana jest każda z gleb z osobna. Nie udało się potwierdzić jednoznacznej liniowej zależności stężeń As w biomacie kłosówki i stężeń  $C_{DGT}$  w takim wypadku, gdy zestawiane są wyniki dotyczące różnych gleb (rys. 2).

Porównując stężenia  $C_{DGT}$  arsenu z wynikami ekstrakcji łatwo rozpuszczalnych form tego pierwiastka (rys. 3), uzyskano między tymi parametrami zależność rosnącą, zbliżoną do liniowej ( $R=0,993$ ).



**Rys. 2.** Zależność między stężeniem efektywnym As oznaczonym metodą DGT a stężeniem arsenu w częściach nadziemnych kłosówki wełnistej (*Holcus lanatus* L.)

**Fig. 2.** Dependence of effective arsenic concentration in soil, determined by DGT method, and As concentrations in the shoots of velvetgrass (*Holcus lanatus* L.)



**Rys. 3.** Zależność między stężeniem efektywnym As oznaczonym metodą DGT a wynikami ekstrakcji łatwo rozpuszczalnych form As roztworem 0,05 M  $(NH_4)_2SO_4$

**Fig. 3.** Dependence of effective arsenic concentration in soil, determined by DGT method, and the concentrations of easily soluble As, extractable with 0,05 M  $(NH_4)_2SO_4$

Podobne wyniki do otrzymanych w omawianym doświadczeniu otrzymał Koster i in. [2005], którzy testowali kilka odczynników służących do ekstrakcji przyswajalnych form cynku oraz porównywali wyniki DGT z faktycznym pobraniem cynku przez rośliny: sałatę, łubin i życię trwałą, a także przez równonogi. W doświadczeniu tych autorów również nie udało się potwierdzić jednoznacznej zależności między wartościami efektywnego stężenia Zn oznaczonego metodą DGT a pobraniem Zn z gleby przez rośliny i równonogi.

Brak dobrej korelacji pomiędzy wynikami uzyskanymi metodą ekstrakcji form łatwo rozpuszczalnych arsenu i wynikami DGT a rzeczywistym pobraniem As przez rośliny może wynikać z tego, że przy odpowiednio wysokich stężeniach toksycznego pierwiastka w glebie przestają działać mechanizmy tolerancji i detoksykacji, warunkujące proporcjonalną zależność pobrania przez rośliny od stężenia w roztworze glebowym. Taką reakcję kłosówki wełnistej na skrajnie wysokie stężenie As w roztworze glebowym opisywali Quaghebeur i Rengel [2003]. Choć układ DGT niejako naśladuje warunki panujące w strefie korzeniowej roślin, czyli lokalnie zmniejsza koncentrację danego pierwiastka w roztworze glebowym (w wyniku sorpcji w warstwie żelu), wymuszając jednocześnie ponowne jego uzupełnienie z fazy stałej gleby, to jednak nie może w pełni odtworzyć innych, specyficznych, mechanizmów biorących udział w pobraniu danego pierwiastka przez rośliny.

Warto na koniec wspomnieć, że koszt zakupu zestawów DGT i wykonania analiz jest nieporównywalnie większy od kosztów standardowo przyjętych testów ekstrakcji. Tymczasem prosta ekstrakcja, np. z wykorzystaniem  $(NH_4)_2SO_4$ , daje wyniki, które dobrze korelują z wynikami DGT, a jest tańsza i szybsza.

#### 4. WNIOSKI

1. Wzrost rozpuszczalności arsenu na skutek wprowadzenia fosforu do każdej z badanych gleb został odzwierciedlony przez wzrost stężeń  $C_{DGT}$ , co potwierdza przydatność metody DGT do oceny zmian mobilności arsenu w danej glebie.
2. Stężenia labilnych form As oznaczone metodą DGT w glebach o różnych właściwościach nie obrazują faktycznego pobrania As przez kłosówkę wełnistą z tych gleb.
3. Na podstawie uzyskanych wyników można twierdzić, że efektywne stężenia As w glebach, oznaczone metodą DGT, korelują dobrze z wynikami ekstrakcji form łatwo rozpuszczalnych, a zatem raczej metoda ekstrakcji, jako tańsza i szybsza od DGT, powinna być preferowana do oceny fitoprzyzwajalności tego pierwiastka.

#### PIŚMIENICTWO

- BLEEKER P.M., TEIGA P.M, SANTOS M.H, DE KOE T., VERKLEIJ J.A.C. 2003. Ameliorating effects of industrial sugar residue on the Jales gold mine spoil (NE Portugal) using *Holcus lanatus* and *Phaseolus vulgaris* as indicators. *Environmental Pollution* 125: 237–244.
- KOSTER M., REIJNDERS L., VAN OOST N.R., PEIJNENBURG W.J.G.M. 2005. Comparison of the method of diffusive gels in thin films with conventional extraction techniques for evaluating zing accumulation in plants and isopods. *Environmental Pollution* 133: 103–116.
- Li W., ZHAO H., TEASDALE P.R., JOHN R., WANG F. 2005. Metal speciation measurement by diffusive gradients in thin films technique with different binding phases. *Anal. Chim. Acta* 533: 193–202.
- MEHARG A.A., MACNAIR M.R. 1991. Uptake, accumulation and translocation of arsenate in arsenate-tolerant and non-tolerant *Holcus lanatus* L. *New Phytology* 117: 225–231.
- QUAGHEBEUR M., RENGEL Z. 2003. The distribution of arsenate and arsenite in shoots and roots of *Holcus lanatus* is influenced by arsenic tolerance and arsenate and phosphate supply. *Plant Physiology* 132: 1600–1609
- PANTHER J.G., STILLWELL K.P., POWELL K.J., DOWNARD A.J. 2008. Development and application of the diffusive gradients in thin films technique for the measurement of total dissolved inorganic arsenic in waters. *Anal. Chim. Acta* 622: 133–142.
- WENZEL W.W., KIRCHBAUMER N., PROCHASKA T., STINGEDER G., LOMBI E., ADRIANO D.C. 2001. Arsenic fractionation in soils using improved sequential extraction procedure. *Anal. Chim. Acta* 436:309–32.
- ZHANG H., ZHAO F., SUN B., DAVISON W., MCGRATH S.P. 2001. A new method to measure effective soil solution concentration predicts copper availability to plants. *Environ. Sci. Tech.* 35: 2602–2607.
- ZHANG H. 2003. DGT – for measurements in waters, soils and sediments. *Materiały techniczne*: <http://www.dgtresearch.com>.