

LABORATORNÍ PŘÍSTROJE A POSTUPY

STANOVENIE OBSAHU BIOPRÍSTUPNÉHO SELÉNU V PŮDACH METÓDOU AAS

DANIEL BAJČAN^a, MÁRIA ŽEMBERYOVÁ^b,
JÁN KLIMEK^c a DARINA RÚRIKOVÁ^b

^aChemický ústav, ^bKatedra analytickej chémie, Prírodovedecká fakulta, Mlynská dolina CH-2, 842 15 Bratislava, ^cVýskumný ústav chemickej technológie, Nobelova 34, 836 03 Bratislava, Slovenská republika, e-mail: bajcan@fns.uniba.sk

Došlo dňa 18.V.2000

Kľúčové slová: selén, biopristupnosť, pôda, extrakcia, AAS

Úvod

V posledných dvoch desaťročiach sa venuje zvýšená pozornosť vplyvu výživy na zdravie človeka, najmä kvôli výraznému nárastu počtu nádorových a kardiovaskulárnych ochorení. Uvedeným ochoreniam sa dá predchádzať zvýšeným príjmom antioxidantov, kde patrí aj selén. Selén je základnou zložkou antioxidantného enzýmu glutationperoxidázy, ktorá katalyzuje redukciu organických peroxidov a peroxidu vodíka, čím chráni bunky pred oxidatívnym poškodením. Bola dokázaná priama súvislosť medzi nízkou koncentráciou selénu v krvi a zvýšeným počtom srdcovo-cievnych a karcinogénnych ochorení¹.

Množstvo Se v ľudskom organizme je dané primárne jeho príjmom z potravín a sekundárne fyziologickým stavom organizmu. Rozdiely v hladinách selénu v potravinách vyplývajú z rôzneho obsahu Se v pôde, ktorý určuje množstvo Se v celom potravinovom reťazci. Celkový obsah selénu v pôde je nedostatočným ukazovateľom jeho biopristupnosti. Rastliny môžu prijímať selén iba v určitých formách (tzv. biopristupné alebo uvoľnitelné formy). Rozlíšenie rozdielnych chemických foriem selénu, a zvlášť formy biopristupnej, je preto veľmi dôležité. Selén sa v pôde nachádza vo viacerých formách, a to vo forme voľných iónov (vodorozpustný), vymeniteľný, viazaný v organickej hmote, viazaný na rôzne minerály, ako sú sulfidy, karbonáty alebo oxidy, prípadne sa vyskytuje v reziduálnom zvyšku. Len prvé dve formy selénu – vodorozpustný a vymeniteľný sú biopristupné pre rastliny. Prijateľnosť selénu rastlinami súvisí s niektorými fyzikálno-chemickými vlastnosťami pôd: pH, redox potenciál, obsah ťvých minerálov, množstvo oxidov železa atd². Najvýznamnejší je efekt pH: v kyslých a neutrálnych pôdach sa selén nachádza viac vo forme selenidov a seleničitanov, pričom dochádza k silnej sorbcii prevažnej časti seleničitanov na oxidy a oxid-hydroxidy železa [Fe(OH)SeO₃]. Selén sa takto stáva pre rastliny neprístupný. V zásaditých pôdach sa Se vyskytuje vo väčšom množstve vo forme selenanov, ktoré sú dobre prístupné pre rastliny.

Na stanovenie množstva uvoľnitelných foriem prvkov

v pôdach sa používajú viackrokové, ale najmä jedнокrokové extrakčné postupy s vhodne zvolenými extrakčnými činidlami. Používané extrakčné činidlá pri jedнокrokových extrakciách sú roztoky neutrálnych solí (CaCl₂, NaNO₃, MgCl₂, KCl, CH₃COONH₄), roztoky chelatačných činidiel (EDTA, DTPA), roztoky kyselín (HNO₃, HCl, CH₃COOH), zásadité roztoky (NaHCO₃, Na₂CO₃). Stanoveniu biopristupného selénu v pôdach sa venuje niekoľko prác a najčastejšie používanými činidlami sú rôzne fosforečnanové roztoky³⁻⁵.

Na stanovenie selénu metódou AAS je možné použiť: plameňovú techniku (FAAS), techniku elektrotermickej atomizácie (ETAAS) a techniku generovania hydridov⁶ (HG AAS). Z nich je najpoužívanejšou HG AAS, ktorá býva spojená s prietokovou injekčnou analýzou (FI HG AAS). Medzi jej hlavné výhody patrí: vysoká citlivosť, nízka cena stanovenia a rýchlosť.

Experimentálna časť

Použitie prístroje a zariadenia

Na stanovenie selénu bol použitý atómový absorpčný spektrometer Perkin-Elmer 1100B so zariadením na generovanie a atomizáciu hydridov Perkin-Elmer FIAS-200 s automatickým dávkovačom Perkin-Elmer AS-90. Na prípravu pôdných výluhov bola použitá trepačka KS 125 fy Ika Labortechnik (SRN) a odstredivka K70D fy MLW (NDR).

Podmienky merania

Na stanovenie selénu bola použitá katódová výbojka, prúd lampy 18 mA, vlnová dĺžka 196,0 nm, šírka štrbiny 2,0 nm, prietok argónu 60 ml.min⁻¹ a dávkovaný objem vzorky 0,5 ml. Atomizačným prostredím bola kremenná kveta vyhrievaná na 900 °C. Nosným roztokom bola 3 % HCl a redukčným činidlom bol 0,2 % NaBH₄ v 0,05 % NaOH.

Chemikálie a roztoky

EDTA p.a. (Lachema Brno, ČR), amoniak konc. p.a. (Slavus, SR), kyselina octová konc. p.a. (Slavus, SR), kyselina dusičná konc. p.a. (Slavus, SR), kyselina chlorovodíková konc. p.a. (Slavus, SR), dihydrogénfosforečnan draselný p.a. (Lachema Brno, ČR), hydrogénfosforečnan draselný p.a. (Lachema Brno, ČR), hydroxid sodný p.a. (Merck, SRN), tetrahydridoboritan sodný p.a. (Merck, SRN), deionizovaná voda (Water Pro PS, Labconco, USA). 0,05 mol.l⁻¹ EDTA, pH 7 upravené amoniakom; 0,43 mol.l⁻¹ kyselina octová; 0,1 a 1,0 mol.l⁻¹ KH₂PO₄; 2,0 mol.l⁻¹ HNO₃; 0,05 mol.l⁻¹ KH₂PO₄ + 0,05 mol.l⁻¹ K₂HPO₄ pH 7; kalibračný roztok selénu (0,5–8 µg.l⁻¹) v deionizovanej vode získaný riedením základného roztoku Se o konc. 1000 mg.l⁻¹ (Merck, SRN); roztoky selénu (8 µg.l⁻¹) v: 0,02; 0,05; 0,1; 0,2; 0,5; 1,0 mol.l⁻¹ KH₂PO₄; 0,2; 0,4; 0,6 mol.l⁻¹ CH₃COOH; 0,2; 0,5; 1,0; 2,0; 3,0 mol.l⁻¹ HNO₃; 0,025; 0,05 mol.l⁻¹ EDTA; deionizovanej vode.

Tabuľka I
Analyzované pôdy a niektoré ich charakteristiky¹²

Pôda	Miesto odberu/ okres	Pôdny typ	pH/H ₂ O	Celkový obsah Se [mg.kg ⁻¹]	Poľnoh. využitie	Hĺbka odberu [mm]
MI-094	Vrbnica	fluvizem	5,70	1,8	orná	0–125
NZ-053	Michalovce	glejová			pôda	
	Komoča	čiernica	6,60	2,5	orná	0–125
	N. Zámky	glejová			pôda	
HN-070	Ublá	kambizem	5,73	3,4	pasienky	0–125
	Humenné	pseudoglejová				
ZH-071	B. Hodruša	kambizem	4,91	1,8	pasienky	0–125
	Žiar n. Hronom	typická				

Charakterizácia vzoriek a referenčných materiálov

Analyzované vzorky pôd boli odobraté a dodané VÚPOP, Bratislava, SR a ich charakteristiky sú uvedené v tabuľke I.

Príprava pôdnych výluhov použitím extrakcie

Na prípravu pôdnych výluhov sa použilo 6 postupov jednokrakových extrakcií. Prvé dva s 0,43 mol.l⁻¹ kys. octovou a s 0,05 mol.l⁻¹ EDTA (amónna soľ), pH 7 boli doporučené Európskou komisiou „Bureau of reference“ (BCR), overené 30 laboratóriami a boli použité na prípravu certifikovaných referenčných materiálov pôd pre biopristupné obsahy niektorých prvkov. Ďalšie tri extrakčné postupy s 0,1 mol.l⁻¹ KH₂PO₄; 1,0 mol.l⁻¹ KH₂PO₄ resp. 0,05 mol.l⁻¹ KH₂PO₄ + 0,05 mol.l⁻¹ K₂HPO₄, pH 7 (ďalej bude používaná skratka 0,1 mol.l⁻¹ KH₂PO₄ + K₂HPO₄) vychádzajú zo sekvenčných extrakcií vyvinutých pre selén. Posledný extrakčný postup s 2 mol.l⁻¹ HNO₃ je používaný v ČR na stanovenie množstva maximálne možných rastlinám prístupných foriem niektorých prvkov⁷ a je legislatívne zakotvený.

1) extrakcia roztokom CH₃COOH

Na extrakciu sa použil 1 g zhomogenizovanej pôdnej vzorky, pričom celý postup sa uskutočnil v teflónových nádobkách. Navážená vzorka sa extrahuje so 40 ml 0,43 mol.l⁻¹ kyseliny octovej 16 hodín na mechanickej trepačke pri 300 ot.min⁻¹ pri teplote 20 °C. Potom sa zmes 15 min odstreďuje na centrifúge pri 3000 ot.min⁻¹. Nakoniec sa extrakt prefiltruje cez filtračný papier Whatman 42 do PE nádobiek a uskladní sa do stanovenia v chladničke⁸.

2) extrakcia roztokom EDTA

Na extrakciu sa použilo 2 g zhomogenizovanej pôdnej vzorky, pričom celý postup sa uskutočnil v teflónových nádobkách. Navážená vzorka sa extrahuje s 20 ml 0,05 mol.l⁻¹ EDTA, pH 7, 2 hodiny na mechanickej trepačke pri 300 ot.min⁻¹ pri teplote 20 °C. Potom sa zmes 15 min odstreďuje na centrifúge pri 3000 ot.min⁻¹. Nakoniec sa extrakt prefiltruje

cez filtračný papier do PE nádobiek a uskladní sa do stanovenia v chladničke⁸.

3) extrakcia 0,1 mol.l⁻¹ roztokom KH₂PO₄

Na extrakciu sa použilo 5 g zhomogenizovanej pôdnej vzorky, pričom celý postup sa uskutočnil v teflónových nádobkách. Navážená vzorka sa extrahuje s 25 ml 0,1 mol.l⁻¹ KH₂PO₄ 2 hodiny na mechanickej trepačke pri 300 ot.min⁻¹ pri teplote 20 °C. Potom sa zmes 15 min odstreďuje na centrifúge pri 3000 ot.min⁻¹. Nakoniec sa extrakt prefiltruje cez filtračný papier do PE nádobiek a uskladní sa do stanovenia v chladničke³.

4) extrakcia 1,0 mol.l⁻¹ roztokom KH₂PO₄

Na extrakciu sa použilo 5 g zhomogenizovanej pôdnej vzorky, pričom celý postup sa uskutočnil v teflónových nádobkách. Navážená vzorka sa extrahuje s 25 ml 1,0 mol.l⁻¹ KH₂PO₄ 2 hodiny na mechanickej trepačke pri 300 ot.min⁻¹ pri teplote 20 °C. Potom sa zmes 15 min odstreďuje na centrifúge pri 3000 ot.min⁻¹. Nakoniec sa extrakt prefiltruje cez filtračný papier do PE nádobiek a uskladní sa do stanovenia v chladničke⁴.

5) extrakcia 0,1 mol.l⁻¹ roztokom KH₂PO₄ + K₂HPO₄

Na extrakciu sa použilo 5 g zhomogenizovanej pôdnej vzorky, pričom celý postup sa uskutočnil v teflónových nádobkách. Navážená vzorka sa extrahuje s 25 ml 0,1 mol.l⁻¹ KH₂PO₄ + K₂HPO₄, pH 7, 2 hodiny na mechanickej trepačke pri 300 ot.min⁻¹ pri teplote 20 °C. Potom sa zmes 15 min odstreďuje na centrifúge pri 3000 ot.min⁻¹. Nakoniec sa extrakt prefiltruje cez filtračný papier do PE nádobiek a uskladní sa do stanovenia v chladničke⁵.

6) extrakcia 2,0 mol.l⁻¹ roztokom HNO₃

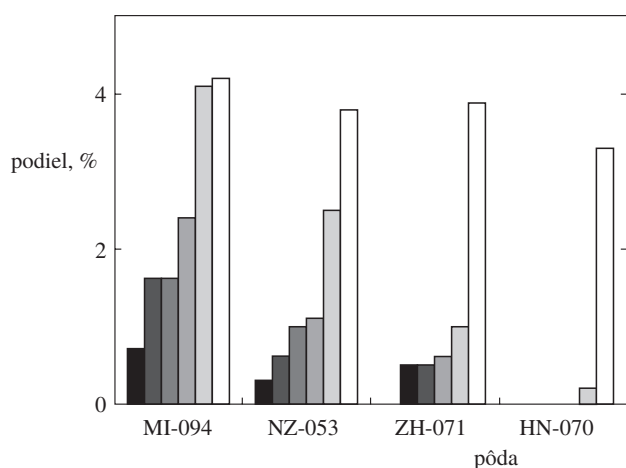
Na extrakciu sa použilo 2 g zhomogenizovanej pôdnej vzorky, pričom celý postup sa uskutočnil v teflónových nádobkách. Navážená vzorka sa zaleje s 20 ml 2,0 mol.l⁻¹ HNO₃, nádobka sa uzavrie a zmes sa nechá 16 hodín stáť. Potom sa zmes pretrepáva 2 hodiny na mechanickej trepačke pri 300 ot.min⁻¹

Tabuľka II

Výsledky stanovenia extrahovateľného selénu ($\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$) vo vybraných pôdach použitými extrakčnými činidlami (AVG – aritmetický priemer, RSD – relatívna smerodajná odchýlka (%), LOD – detekčný limit stanovenia, ND – nedetekovateľné)

Vzorka	$1,0 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1} \text{KH}_2\text{PO}_4$		$0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1} \text{KH}_2\text{PO}_4$		$0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1} \text{KH}_2\text{PO}_4 + \text{K}_2\text{HPO}_4$		
	AVG	RSD	AVG	RSD	AVG	RSD	
MI-094	74	7,2	29	6,7	44	3,3	
NZ-053	64	5,5	25	7,8	27	10,8	
ZH-071	18	15,8	9	11,8	10	16,8	
HN-070	8	14,4	ND	–	ND	–	
LOD	2,9		1,6		1,2		

Vzorka	$0,43 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1} \text{HAc}$		$0,05 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1} \text{EDTA}$		$2,0 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1} \text{HNO}_3$		Celkový obsah
	AVG	RSD	AVG	RSD	AVG	RSD	
MI-094	12	11,8	29	12,2	75	7,1	1800
NZ-053	7	16,5	15	8,9	96	9,2	2500
ZH-071	ND	–	9	7,8	71	5,0	1800
HN-070	ND	–	ND	–	112	6,3	3400
LOD	1,4		2,2		15,5		–

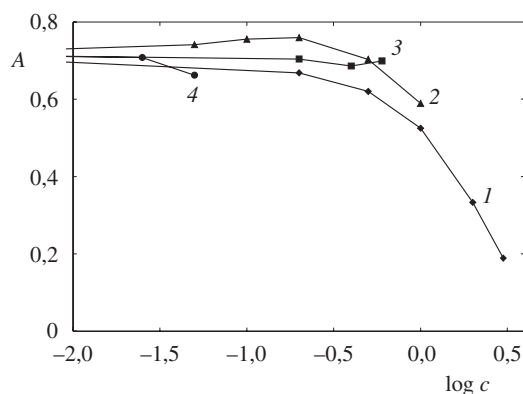


Obr. 1. Percentuálny podiel selénu stanoveného v extraktoch pôd z celkového obsahu Se v pôde; extrakčné činidlá: ■ 0,43 M- CH_3COOH , ■ 0,05 M-EDTA, ■ 0,1 M- KH_2PO_4 , ■ 0,1 M- $\text{KH}_2\text{PO}_4 + \text{K}_2\text{HPO}_4$, ■ 1 M- KH_2PO_4 , □ 2 M- HNO_3

pri teplote 20°C a neskôr 15 min odstreduje na centrifúge pri $3000 \text{ ot}\cdot\text{min}^{-1}$. Nakoniec sa extrakt prefiltruje cez filtračný papier do PE nádobiek a uskladní sa do stanovenia v chladničke⁹.

Redukčná predúprava vzoriek

Do vzduchotesnej PE nádobiek bolo napipetované 5 ml vzorky, 2 ml štand. prídavku roztoku selénu(0; 7 alebo $14 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1} \text{Se}^{4+}$) a 5 ml konc. kys. chlorovodíkovej. Následne boli nádoby vložené do sušiarne vyhriatej na 95°C na 30 min, ochladené v studenej vode a meranie sa uskutočnilo v ten istý deň.



Obr. 2. Vplyv extrakčného činidla a jeho koncentrácie na absorpčný signál selénu. (8 ng Se/ml činidla) 1 – HNO_3 , 2 – KH_2PO_4 , 3 – CH_3COOH , 4 – EDTA

Výsledky a diskusia

Šesť extrakčných postupov bolo aplikovaných na štyri vzorky pôd so známym obsahom celkového selénu. Boli robené dve paralelné extrakcie pre každú vzorku a extrakčný postup. Všetky roztoky získané po extrakciách boli analyzované technikou FI HG AAS. Dosiahnuté výsledky vyhodnotené metódou štandardných prídavkov sú zhrnuté v tabuľke II.

Z výsledkov je možné určiť silu jednotlivých vyluhovadiel, ktorá klesá v poradí $2 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1} \text{HNO}_3 > 1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1} \text{KH}_2\text{PO}_4 > 0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1} \text{KH}_2\text{PO}_4 + \text{K}_2\text{HPO}_4 > 0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1} \text{KH}_2\text{PO}_4 > 0,05 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1} \text{EDTA}$, $\text{pH } 7 > 0,43 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1} \text{CH}_3\text{COOH}$. Podiel vyextrahovaného Se $0,43 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1} \text{CH}_3\text{COOH}$ je veľmi malý, z čoho možno usúdiť, že toto činidlo nie je schopné z pôdy uvoľniť najmä vymeniteľný selén. Preto $0,43 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1} \text{CH}_3\text{COOH}$, ktorá býva často používaná pri stanovení bioprístupnosti ťaž-

kých kovov, má pri stanovení uvoľnitelného Se malý význam. Najviac selénu z pôd extrahuje 2 mol.l⁻¹ HNO₃, avšak množstvo selénu stanoveného extrakciou s týmto činidlom závisí priamo úmerne na celkovom obsahu Se v pôdach. Preto je tiež nevhodné na stanovenie bioprístupnosti Se v pôde. Výsledky stanovenia Se použitím zostávajúcých štyroch extrakčných činidiel medzi sebou lineárne korelujú a teoreticky sú všetky štyri vhodnými činidlami. Niektoré štúdie však ukazujú, že kyslá povaha činidiel 0,1 mol.l⁻¹ KH₂PO₄ a 1 mol.l⁻¹ KH₂PO₄ môže spôsobiť vyluhovanie selénu špecificky naviazaného na niektoré amorfné zložky pôd ako napr. oxid-hydroxidy železa¹⁰. Výsledky analýzy však túto teóriu potvrdzujú iba v prípade 1 mol.l⁻¹ KH₂PO₄. Aj cez malú početnosť dát sa ako najvhodnejšie extrakčné činidlo na stanovenie množstva bioprístupného selénu javí 0,1 mol.l⁻¹ KH₂PO₄ + K₂HPO₄, pretože ide o tlmivý roztok s neutrálnym pH, čím sú potlačené nežiaduce reakcie činidla s pôdou, ktoré vedú k vyluhovaniu nebioprístupných foriem selénu.

Percentuálny podiel selénu stanoveného v extraktoch pôd z celkového obsahu Se v pôde ukazuje obr. 1. O všetkých štyroch pôdach môžeme povedať, že podiel uvoľnitelného selénu v nich je veľmi nízky. Tento jav súvisí s kyslým a neutrálnym pH slovenských pôd, pri ktorom sa Se vyskytuje prevažne v nižších oxidačných stavoch, čím sa stáva pre rastliny neprístupným (až 42 % slovenských pôd má kyslú reakciu; 38 % neutrálnu a iba 20 % má zásaditú reakciu¹¹).

K interferenciám pri stanovení Se v pôdach technikou HG AAS môže dochádzať vo všetkých štyroch fázach stanovenia: príprava vzorky: rozklad vzorky → generovanie hydridu → atomizácia hydridu → detekcia. Z týchto rušivých vplyvov sa najviac prejavili interferencie pri generovaní hydridu spôsobené prítomnosťou vyššej koncentrácie niektorých ťažkých kovov (Cu, Al, Bi ...) a vplyvom použitého extrakčného činidla. Ako vidieť na obr. 2 výraznejší vplyv na absorpčný signál selénu majú iba HNO₃ od koncentrácie 0,2 mol.l⁻¹ a KH₂PO₄ od koncentrácie 0,5 mol.l⁻¹. Tieto rušivé vplyvy sa však dali ľahko eliminovať zriedením vzorky a použitím metódy štandardných prídavkov.

Správnosť stanovenia selénu vo výluhoch by bolo možné overiť iba použitím inej metódy stanovenia, pretože v komerčnej ponuke neexistuje certifikovaný referenčný materiál pre extrahovateľné obsahy selénu v pôdach. Detekčné limity stanovenia Se v pôdach sú uvedené v tabuľke II.

Záver

Sledovaním množstva uvoľneného selénu z pôd jednotlivými extrakčnými činidlami je možné určiť silu jednotlivých vyluhovadiel, ktorá klesá v poradí 2 mol.l⁻¹ HNO₃ > 1 mol.l⁻¹ KH₂PO₄ > 0,1 mol.l⁻¹ KH₂PO₄ + K₂HPO₄ > 0,1 mol.l⁻¹ KH₂PO₄ > 0,05 mol.l⁻¹ EDTA, pH 7 > 0,43 mol.l⁻¹ CH₃COOH. Ako najvhodnejšie extrakčné činidlo na stanovenie množstva bioprístupného selénu sa javí 0,1 mol.l⁻¹ KH₂PO₄ + K₂HPO₄.

Obsah uvoľnitelného Se v sledovaných vzorkách pôd bol veľmi nízky, čo má súvislosť s kyslým a neutrálnym pH slovenských pôd. Uvedený fakt je aj príčinou nízkeho obsahu Se v našich potravinách, čo má za následok nízku koncentráciu selénu v krvnom sére slovenského obyvateľstva, ktoré je tým vo zvýšenej miere postihované nádorovými a kardiovaskulárnymi ochoreniami.

Práca bola vypracovaná v rámci grantu VEGA č. 1/6266/99. Za dodanie pôdnych vzoriek ďakujeme RNDr. P. Šefčíkovi z VÚPOP, Bratislava, SR.

LITERATÚRA

1. Kadrabová J., Maďarič A.: *Vyziva Zdravie* 3, 50 (1997).
2. Merian E.: *Metals and Their Compounds in the Environment. Selenium*. VCH, Weinheim 1991.
3. Chao T. T., Sanzalone R. F.: *Soil Sci. Soc. Am. J.* 53, 385 (1989).
4. Sharmasarkar S., Vance G.: *Soil Sci.* 26, 43 (1995).
5. Martens D. A., Suarez D. L.: *Environ. Sci. Technol.* 31, 133 (1997).
6. Farkašová I., Žemberyová M.: *Chem. Listy* 93, 633 (1999).
7. Boruvka L., Kozák J., Křištouková S.: *Chem. Listy* 91, 868 (1997).
8. Ure A., Quevauviller P., Muntau H., Griepink B.: *BCR Information EUR 14763 EN*. CEC, Brussels 1993.
9. Kozák J.: *Zpráva katedry pedologie*. VŠZ, Praha 1990.
10. Lipton D. S.: *Dissertation*. University of California, Davis 1991.
11. Fecenko J.: *51. Zjazd chemických spoločností, Nitra, 6.–9. septembra 1999*, zborník príspevkov, M-P1.
12. Čurlík J., Šefčík P.: *Geochemický atlas SR časť V. – Pôdy*. VÚPOP, Bratislava 1999.

D. Bajčan^a, M. Žemberyová^b, J. Klimek^c, and D. Rúriková^b (^a*Institute of Chemistry*, ^b*Department of Analytical Chemistry, Faculty of Science, Comenius University*, ^c*Research Institute of Chemical Technology, Bratislava, Slovak Republic*): **Determination of Bioavailable Selenium in Soils Using Atomic Absorption Spectrometry**

Bioavailable Se was determined by AAS after extraction from soil with various extractants. Six extraction agents were tested for the determination of plant-available selenium. The Se extractability from soils decreased in the order: 2 mol.l⁻¹ HNO₃ > 1 mol.l⁻¹ KH₂PO₄ > 0.1 mol.l⁻¹ KH₂PO₄ + K₂HPO₄ > 0.1 mol.l⁻¹ KH₂PO₄ > 0.05 mol.l⁻¹ EDTA (pH 7) > 0.43 mol.l⁻¹ CH₃COOH. The 0.1 mol.l⁻¹ KH₂PO₄ + K₂HPO₄ (pH 7) seemed to be the most suitable. The amount of the bioavailable Se in soils was very low (max. 2.5 %) due to acid and neutral pH of the soils.