

Politechnika Gdańska  
Wydział Chemiczny  
Katedra Chemii Analitycznej

Rozprawa doktorska

**OCENA ZDOLNOŚCI BIOWSKAŹNIKOWYCH FOK DO PORÓWNIANIA  
STOPNIA ZANIECZYSZCZENIA  
W RÓŻNYCH CZĘŚCIACH EKOSYSTEMU MORZA BAŁTYCKIEGO**

mgr inż. Gabriela Bajger-Nowak

Promotor: prof. dr hab. inż. Jacek Namieśnik  
dr hab. inż. Piotr Konieczka, prof. nadzw. PG

Gdańsk 2012

*Składam serdeczne podziękowania moim promotorom*

*Panu prof. dr. hab. inż. **JACKOWI NAMIEŚNIKOWI***

*oraz*

*Panu dr. hab. inż. **PIOTROWI KONIECZCE***

*za poświęcony czas, przekazaną wiedzę i pomoc oraz za zaufanie i cierpliwość,*

*a także za mobilizację do pracy*

*Dziękuję również*

*Pani dr **Annie Roos,***

*Pani mgr **Iwonie Pawliczce,***

*Pani dr hab. inż. **Bożenie Zabiegale,***

*Panu dr. hab. inż. **Andrzejowi Wasikowi***

*oraz Panu dr. **Tomaszowi Ciesielskiemu***

*za poświęcony mi czas, przekazaną wiedzę i cenne uwagi*

***Pracownikom i Doktorantom***

***Katedry Chemii Analitycznej***

*za stworzenie wspaniałej i niezapomnianej atmosfery pracy*

*Podziękowania kieruję także do*

***Ministerstwu Edukacji i Nauki***

*za przyznanie środków finansowych na wykonanie części badań*

*szczególnie dziękuję*

***MOIM RODZICOM I BLISKIM***

*za szczerą troskę, wszystkie dobre życzenia i motywowanie mnie do pracy*

*oraz **MOJEMU MĘŻOWI PIOTROWI***

*za cierpliwość, wsparcie duchowe i wiarę we mnie*

## Spis treści

Spis skrótów i akronimów .....	5
Wprowadzenie.....	7
I. CZĘŚĆ TEORETYCZNA.....	9
1. Problem zanieczyszczenia Morza Bałtyckiego .....	9
1.1. Zanieczyszczenia występujące w organizmach morskich .....	12
1.2. Akumulacja zanieczyszczeń w organizmach zwierzęcych z różnych ogniw łańcucha troficznego.....	12
1.3. Wpływ zanieczyszczeń na organizmy morskie .....	14
2. Ssaki morskie jako biowskaźniki poziomu zanieczyszczenia Morza Bałtyckiego .....	15
3. Informacje o foce szarej.....	18
4. Oznaczanie stałych izotopów węgla i azotu .....	20
5. Analiza specjacyjna .....	21
6. Informacje literaturowe o procedurach stosowanych do oznaczania metali ciężkich i związków metaloorganicznych w próbkach biologicznych. ....	22
6.1. Pobieranie próbek .....	23
6.2. Przygotowanie próbki .....	24
6.2.1. Oznaczanie form specjacyjnych metali .....	24
6.3. Rozdzielanie związków metaloorganicznych .....	31
6.4. Techniki oznaczeń końcowych .....	32
II. CEL I ZAKRES PRACY.....	34
III. Część doświadczalna .....	36
1. Aparatura i odczynniki.....	36
1.1. Oznaczanie zawartości pierwiastków śladowych w próbkach wątroby focznej .....	36
1.1.1. Odczynniki i wzorce .....	36
1.1.2. Sprzęt laboratoryjny i aparatura.....	36
1.2. Oznaczanie stałych izotopów węgla i azotu w próbkach wątroby focznej.....	37
1.2.1. Odczynniki i wzorce .....	37
1.2.2. Sprzęt laboratoryjny i aparatura.....	37
1.3. Oznaczanie metylortęci i tributyllocyny w próbkach wątroby focznej .....	38
1.3.1. Odczynniki i wzorce .....	38
1.3.2. Sprzęt laboratoryjny i aparatura.....	38
2. Charakterystyka analizowanych próbek .....	39
3. Procedury analityczne.....	40
3.1. Oznaczanie zawartości pierwiastków śladowych w próbkach wątroby fok.....	40
3.1.1. Procedura oznaczania zawartości pozostałych pierwiastków śladowych w próbkach wątroby fok z wykorzystaniem techniki ICP-MS .....	41

3.1.2. Procedura oznaczania zawartości rtęci w próbkach wątroby fok z wykorzystaniem techniki CV-AAS .....	43
3.2. Oznaczenie zawartości stałych izotopów węgla i azotu w próbkach wątroby fok .....	45
4. Wyznaczenie optymalnych parametrów procedury jednoczesnego oznaczania metylortęci i związków z grupy cynoorganicznych (mono-, di-, tributyllocyny) w próbkach wątroby foczej .....	47
4.1. Przygotowanie roztworów wzorcowych .....	48
4.2. Dobór optymalnych warunków procesu derywatywacji analitów (na podstawie roztworów wzorcowych) .....	49
4.3. Warunki prowadzenia analizy chromatograficznej .....	52
4.4. Identyfikacja i oznaczanie analitów .....	52
4.5. Kalibracja układu GC-MS oraz wyznaczenie granicy wykrywalności i oznaczalności .....	53
4.6. Procedura jednoczesnego oznaczania metylortęci i związków z grupy cynoorganicznych (mono-, di-, tributyllocyny) w próbkach wątroby foczej .....	56
4.7. Dobór optymalnych warunków przygotowania próbki .....	56
4.7.1. Dobór optymalnych warunków derywatywacji analitów w ekstrakcie z próbki wątroby .....	58
4.7.2. Dobór optymalnych warunków ekstrakcji analitów z badanych próbek .....	60
4.7.3. Oczyszczanie ekstraktów i wzbogacanie analitów .....	62
4.8. Walidacja procedury jednoczesnego oznaczania metylortęci i wybranych związków z grupy cynoorganicznych (MBT, DBT, TBT) .....	62
5. Wykorzystanie technik chemometrycznych na etapie opracowania wieloparametrowych zbiorów danych pomiarowych uzyskanych w wyniku badań próbek wątroby .....	66
6. Wyniki oznaczeń zawartości pierwiastków i stałych izotopów w próbkach wątroby .....	69
6.1. Poziomy zawartości stałych izotopów węgla i azotu .....	69
6.2. Poziomy zawartości metali w próbkach wątroby fok szarych .....	70
6.3. Analiza głównych składowych (PCA) .....	78
7. Omówienie uzyskanych wyników .....	82
7.1. Zawartość stałych izotopów węgla i azotu .....	82
7.2. Przestrzenne zróżnicowanie zawartości pierwiastków w próbkach wątroby foczej .....	84
7.3. Wpływ wieku na zawartość wybranych pierwiastków .....	89
7.4. Możliwość wykorzystania fok szarych jako organizmów biowskaźnikowych .....	91
8. Podsumowanie .....	92
Streszczenie .....	93
Abstract .....	94
Literatura .....	95
Dorobek naukowy .....	103
Załączniki .....	107

## Spis skrótów i akronimów

SKRÓT/AKRONIM	NAZWA ANGLOJĘZYCZNA	NAZWA POLSKOJĘZYCZNA
AAS	Atomic Absorption Spectrometry	Atomowa spektrometria absorpcyjna
AES	Atomic Emission Spectrometry	Atomowa spektrometria emisyjna
ANCOVA	Analysis of covariance	Analiza kowariancji
ANOVA	Analysis of variance	Analiza wariancji
APCI	Atmospheric pressure chemical ionization	Jonizacja chemiczna pod ciśnieniem atmosferycznym
APPI	Atmospheric pressure photoionization	Fotojonizacja pod ciśnieniem atmosferycznym
CEC	Capillary Electrochromatography	Kapilarna elektrochromatografia
CRM	Certified Reference Material	Certyfikowany materiał odniesienia
CV	Coefficient of Variation	Współczynnik zmienności
CV-AAS	Cold Vapor Atomic Absorption Spectrometry	Atomowa spektrometria absorpcyjna z generowaniem zimnych par
CZE	Capillary Zone Electrophoresis	Kapilarna elektroforeza strefowa
DBT	Dibutyltin	Dibutylocyna
DDE	Dichlorodiphenyldichloroethylene	Dichlorodifenylodihloroeten
DDT	Dichlorodiphenyltrichloroethane	Dichlorodifenylotrchloroetan
DNA	Deoxyribonucleic acid	Kwasdeoksyrybonukleinowy
ECD	Electron Capture Detector	Detektor wychwytyelektronów
EDL	Electrodeless Discharge Lamp	Lampa z wyładowaniem bezelektrodowym
ESI	Electrospray ionization	Jonizacja poprzez elektrorozpylanie
ET-AAS	Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry	Atomowa spektrometria absorpcyjna z atomizacją elektrotermiczną
F-AAS	Flame Atomic Absorption Spectrometry	Atomowa spektrometria absorpcyjna z atomizacją w płomieniu
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations	Organizacja do Spraw Wyżywienia i Rolnictwa Narodów Zjednoczonych
FIMS	Flow Injection Mercury System	Przepływowy wstrzykowy układ do oznaczania rtęci
GC	Gas Chromatography	Chromatografia gazowa
GF-AAS	Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry	Atomowa spektrometria absorpcyjna z atomizacją w piecu grafitowym
HELCOM	Baltic Marine Environment Protection Commission	Komisja Ochrony Środowiska Morskiego Bałtyku
HG-AAS	Hydride Generation Atomic Absorption Spectrometry	Atomowa spektrometria absorpcyjna z generowaniem wodorków

HPLC	High Performance Liquid Chromatography	Wysokosprawną chromatografią cieczową
HS-SPME	Headspace Solid-Phase Microextraction	Mikroekstrakcja do fazy stacjonarnej z fazy nadpowierzchniowej
IAEA	International Atomic Energy Agency	Międzynarodowa Agencja Energii Atomowej
ICP-AES	Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectrometry	Atomowa spektrometria emisyjna z plazmą wzbudzoną indukcyjnie
ICP-MS	Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry	Spektrometria mas z plazmą wzbudzoną indukcyjnie
IFE	Institute of Energy Technology	Instytut Technologii Energetycznych
in vitro		procesy biologiczne przeprowadzane w warunkach laboratoryjnych, poza organizmem
in vivo		procesy biologiczne przeprowadzane wewnątrz żywego organizmu
INAA	Instrumental Neutron Activation Analysis	Instrumentalna neutronowa analiza aktywacyjna
IRMM	Institute of Reference Materials and Measurements	Instytut Materiałów Odniesienia i Pomiarów (UE)
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry	Międzynarodowa Unia Chemii Czystej i Stosowanej
LC	Liquid chromatography	Chromatografia cieczowa
LLE	Liquid-liquid extraction	Ekstrakcja ciecz-ciecz
LOD	Limit of Detection	Granica wykrywalności
LOQ	Limit of Quantification	Granica oznaczalności
LPME	Liquid phase microextraction	Mikroekstrakcja do fazy ciekłej
MALDI	Matrix-assisted laser desorption/ionization	Wspomagana matrycą jonizacja światłem laserowym
MBT	Monobutyltin	Monobutylocyna
MeHg	Methylmercury	Metylortęć
MEK	Micellar Electrochromatography	Elektrochromatografia micelarna
MIP-AED	Microwave Induced Plasma Atomic Emission Detector	Detektor emisji atomowej z plazmą indukowaną mikrofalowo
NaBEt <sub>4</sub>	Sodium tetraethylborate	Tetraetyloboran sodu
NaBPh <sub>4</sub>	Sodium tetraphenylborate	Tetrafenyloboran sodu
NIST	National Institute of Standards and Technology	Narodowy Instytut Wzorców i Technologii (USA)
NRCC	National Research Council Canada	Kanadyjska Rada Badań Naukowych
PCA	Principal component analysis	Analiza głównych składowych
PCB	Polychlorinated biphenyls	Polichlorowane bifenyle
QA/QC	Quality assurance/ Quality control	Zapewnienie i kontrola jakości wyników pomiarów analitycznych
REE	Rare earth elements	Pierwiastki ziem rzadkich
RSD	Relative Standard Deviation	Względne odchylenie standardowe

S	Standard Deviation	Odchylenie standardowe
SBSE	Stir bar sorptive extraction	Ekstrakcja z zastosowaniem wirującego elementu sorpcyjnego
SDME	Single drop microextraction	Mikroekstrakcja do pojedynczej kropli
SIA	Stable isotope analysis	Oznaczanie stałych izotopów
SPME	Solid phase microextraction	Mikroekstrakcja do fazy stacjonarnej
TBT	Tributyltin	Tributylocyna
TMAH	Tetramethylammonium hydroxide	Wodorotlenek tetrametyloamoniowy
TPrT	Tripropyltin	Tripropylocyna
TZO	Persistent organic pollutants	Trwałe zanieczyszczenia organiczne
WHO	World Health Organization	Światowa Organizacja Zdrowia

## Wprowadzenie

Intensywny rozwój różnych gałęzi przemysłu i wzrost populacji ludzkiej sprawia, że do poszczególnych elementów ekosystemów morskich emitowane są duże ilości różnych zanieczyszczeń. Jako najważniejsze należy wymienić:

- związki organiczne, w tym trwałe zanieczyszczenia organiczne (TZO),
- nutrieny,
- metale w postaci różnych związków [1].

W przeciwieństwie do innych zanieczyszczeń (np. organicznych), metale stanowią bardzo trwałe i trudne do zneutralizowania zanieczyszczenia. Po wprowadzeniu do środowiska morskiego pozostają tam przez długi czas w formie niezmięnionej lub w postaci produktów przemian chemicznych, biochemicznych, fotochemicznych, dlatego też morska fauna i flora są narażone na zanieczyszczenie metalami ciężkimi.

Problem ten odnosi się również do środowiska Morza Bałtyckiego, które jest szczególnie podatne na zanieczyszczenia. Jest połączone z oceanem tylko przez wąskie i płytkie wody Cieśnin Duńskich, które ograniczają wymianę wód z Morzem Północnym, więc zanieczyszczenia występujące w wodach Bałtyku mogą pozostawać tam przez długi czas [2]. Ze względu na swoje położenie geograficzne i ustrój hydrologiczny, Bałtyk jest nieustannie narażony na różne przejawy antropopresji. Należą do nich:

- eutrofizacja,
- zanieczyszczanie przez substancje niebezpieczne, w tym pestycydy, metale ciężkie i odpady przemysłowe i wojskowe;

- niszczenie siedlisk,
- stosowanie niebezpiecznego sprzętu wędkarskiego
- wprowadzanie gatunków obcych [3, 4].

Emisja zanieczyszczeń do środowiska przyczynia się do zmian składu chemicznego ekosystemu i zakłócania jego równowagi biologicznej. Zmiany te działają jako czynnik stresowy wpływając na prawidłowe funkcjonowanie organizmów żyjących w danym ekosystemie [5]. Dotyczy to również fok bałtyckich, które będąc reprezentantami końcowych ogniw łańcucha pokarmowego ekosystemu Bałtyku, narażone są na niekorzystne działanie różnorodnej i dynamicznej mieszanki antropogenicznych czynników wywołujących stres środowiskowy. Stres ten może wywoływać różne efekty toksyczne – od toksyczności chemicznej poprzez toksyczność ostrą aż do tak zwanych odległych skutków toksycznych. Szczególnie niebezpiecznymi ksenobiotykami są metale ciężkie, które wykazują dużą zdolność do wiązania się z grupami tiolowymi, karboksylowymi i aminowymi aminokwasów, przez co powodują blokowanie biochemicznych funkcji tych związków lub ich denaturację. Długi okres życia osobników należących do grupy ssaków morskich, jak również długi okres wydalania toksyn z organizmu sprzyjają procesowi kumulacji znacznych ilości różnych zanieczyszczeń. Głównym źródłem narażenia fok na zanieczyszczenie metalami jest układ pokarmowy. Dlatego też różna zawartość zanieczyszczeń w organizmach wchodzących w skład diety fok może prowadzić do różnych zawartości metali u osobników tego samego gatunku, ale bytujących w różnych rejonach [6, 7].

Spośród pierwiastków uznanych za potencjalnie niebezpieczne przez ekspertów Komisji Ochrony Środowiska Morskiego Bałtyku (HELCOM), szczególną uwagę należy zwrócić na Hg, Cd i Pb, a także Cu i Zn. Mimo, że stężenia miedzi i cynku, jako pierwiastków niezbędnych dla prawidłowego funkcjonowania organizmu, mogą być naturalnie regulowane przez organizm, to jednak zawartość znacznie przekraczająca poziom niezbędności może prowadzić do zaburzeń zdrowotnych [5].

Biorąc pod uwagę, możliwy szkodliwy wpływ metali i innych pierwiastków śladowych na organizmy żywe, istnieje potrzeba przeprowadzania badań obejmujących duże grupy zwierząt z różnych obszarów Morza Bałtyckiego w celu lepszego poznania wpływu metali ciężkich i innych zanieczyszczeń na stan zdrowotny organizmów morskich. Jednym z narzędzi do oceny stopnia zanieczyszczenia środowiska morskiego jest stała kontrola poziomów zawartości zanieczyszczeń w poszczególnych częściach biotycznych i biotycznych ekosystemu morskiego. Szczególną uwagę należy zwłaszcza poświęcić różnym formom



chemicznym najbardziej toksycznych pierwiastków, tj. między innymi metylortęci i tributyllocyny, ponieważ już od dawna wiadomo, że toksyczność i biodostępność metali zależy od formy chemicznej w jakiej występują w środowisku. Ze względu na skażenie środowiska mieszaniną różnorodnych zanieczyszczeń, niezbędne wydaje się opracowywanie nowych procedur analitycznych, które zapewnią możliwość jednoczesnego oznaczania różnych analitów występujących w badanej próbce na zróżnicowanych poziomach zawartości.

---

# I. CZĘŚĆ TEORETYCZNA

---

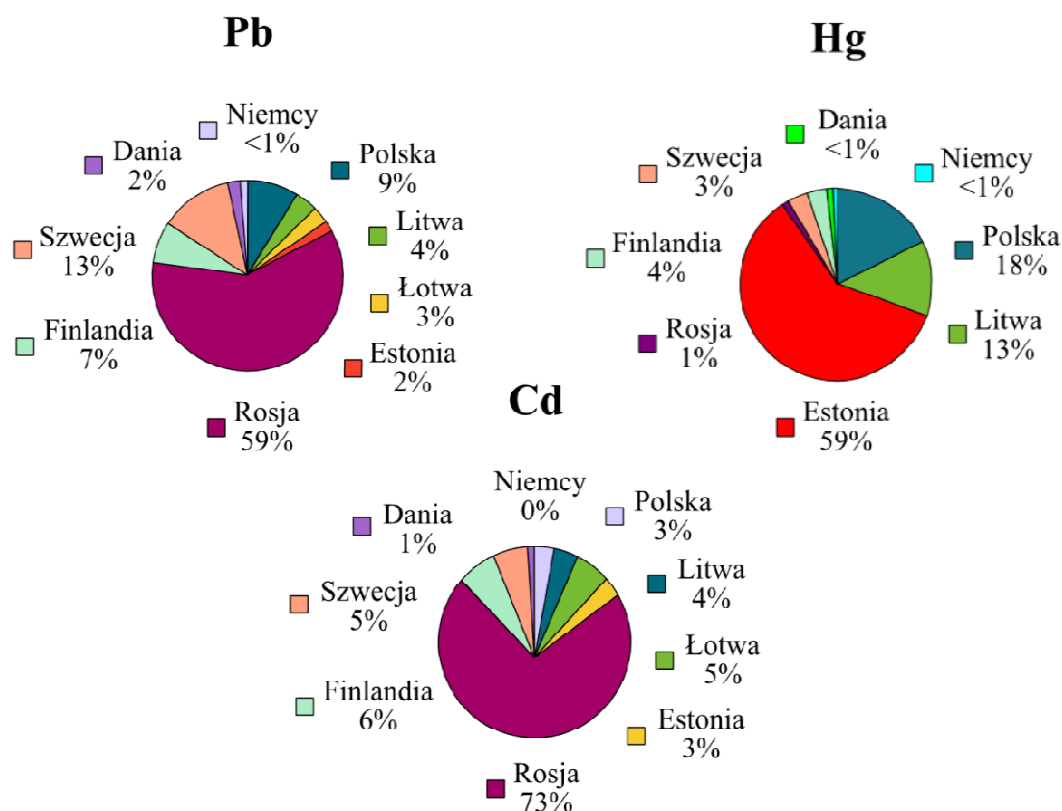
## 1. Problem zanieczyszczenia Morza Bałtyckiego

Morze Bałtyckie jest największym na świecie zbiornikiem wód słonawych, którego objętość wynosi ok. 21 tys. km<sup>3</sup>, a powierzchnia ok. 370 tys. km<sup>2</sup>. Mimo, że jest morzem stosunkowo młodym (powstałym około 10-15 tys. lat temu), to niestety intensywny rozwój przemysłu w XX wieku przyczynił się do znacznego wzrostu poziomu jego zanieczyszczenia. Niski poziom zasolenia Bałtyku sprawia, że organizmy morskie w nim żyjące znajdują się na krawędzi tolerancji fizjologicznej, a stres wywołany obecnością złożonej mieszaniny zanieczyszczeń dodatkowo czyni je podatnymi na negatywne skutki skażenia środowiska wywołane przez ksenobiotyki, w tym między innymi metale ciężkie i organiczne związki metali.

Metale mogą łatwo przedostawać się do środowiska morskiego, m.in. z wodami rzek, w wyniku procesów suchej i mokrej depozycji pyłów do wód morskich, poprzez spływy nawozów z pól uprawnych lub też spływy z miejsc składowania odpadów. W przeciwieństwie do innych zanieczyszczeń (np.: organicznych), metale ciężkie charakteryzują się bardzo długim okresem półtrwania i nie podlegają biodegradacji [8]. Zatem, jeśli raz pojawią się w środowisku, pozostają w nim przez bardzo długi okres czasu. Może to prowadzić do zaburzenia równowagi chemicznej danego ekosystemu, co w efekcie działa jako czynnik stresowy wpływający na prawidłowe funkcjonowanie organizmów roślinnych i zwierzęcych.

Problem ten dotyczy również Morza Bałtyckiego, które ze względu na rozwiniętą linię brzegową i cztery razy większy niż powierzchnia własna obszar zlewni, jest szczególnie narażone na zanieczyszczenia spływające z nurtem rzek i z otaczających je obszarów lądowych. Na rysunku 1 przedstawiono informacje o udziale emisji ze źródeł

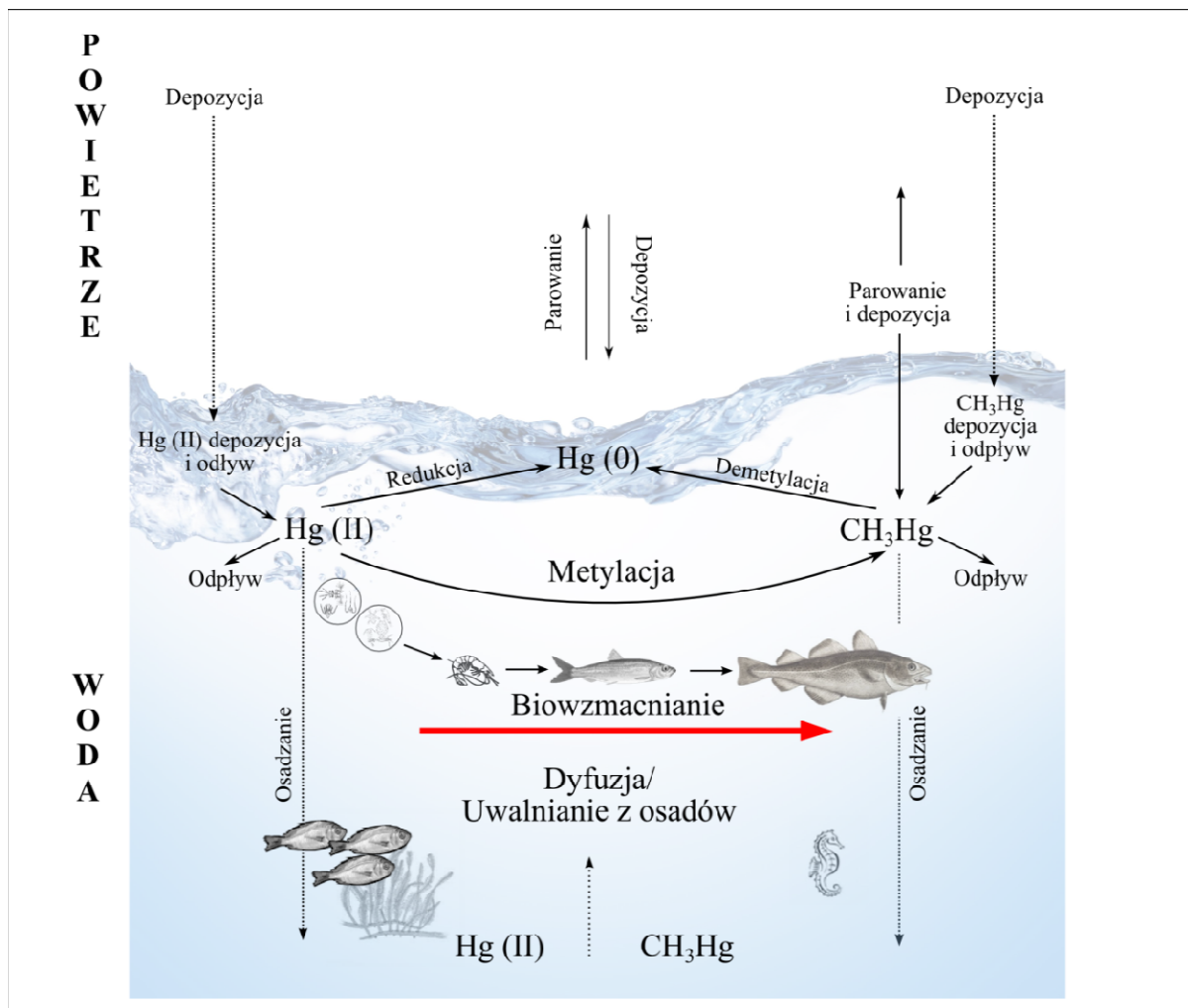
zlokalizowanych w poszczególnych państwach nadbałtyckich w całkowitym ładunku zanieczyszczeń odprowadzanych (w skali roku) do wód Morza Bałtyckiego. Śródlądowe położenie Morza Bałtyckiego i stosunkowo mała intensywność wymiany wód z Morzem Północnym sprawiają, że ta sama woda pozostaje w nim przez 25-30 lat, wraz ze wszystkimi zawartymi w niej zanieczyszczeniami. Ponadto Bałtyk jest zimnym morzem, co sprawia, że proces biodegradacji zanieczyszczeń przebiega wolniej niż w cieplejszych wodach morskich [9, 10].



Rysunek 1. Udział emisji ze źródeł zlokalizowanych w poszczególnych państwach nadbałtyckich w całkowitym ładunku zanieczyszczeń odprowadzanych (w skali roku) do wód Morza Bałtyckiego w 2004 roku [11].

W ostatnich latach znacznie wzrosło również zainteresowanie środowisk naukowych stanem zdrowotnym organizmów morskich występujących w rejonie Arktyki, w tym także Grenlandii. Obszary Arktyki znajdują się zwykle w znacznej odległości od głównych źródeł emisji zanieczyszczeń pochodzenia antropogenicznego, co nie oznacza jednak, że jest to obszar wolny od zanieczyszczeń środowiska. Wręcz przeciwnie, flora i fauna obszaru Arktyki są narażone na działanie zanieczyszczeń spowodowane ich transgranicznym napływem z dużych odległości w wyniku zjawisk atmosferycznych [12]. Przykładowo, co roku znaczne ilości rtęci atmosferycznej ulegają depozycji na warstwach lodu i śniegu,

które topniejąc wiosną uwalniają część rtęci do środowiska. Następnie w środowisku rtęć może ulegać różnym przemianom (rysunek 2) w wyniku czego biologicznie dostępne formy rtęci mogą ulec włączeniu w ogniwa łańcuchów pokarmowych organizmów zamieszkujących dany obszar i wpływać negatywnie na ich rozwój [13]. Poza transportem transgranicznym znaczny udział w poziomie emisji zanieczyszczeń w rejonie Grenlandii ma również emisja związana z takimi przejawami działalności człowieka jak górnictwo, przemysł metalurgiczny, a także poszukiwanie i wydobywanie ropy naftowej i gazu ziemnego [14-17]. Oprócz rtęci, niepokój mogą również budzić podwyższone poziomy kadmu i ołowiu, czyli metali, które podobnie jak rtęć nie wykazują żadnego pozytywnego wpływu na organizm, a jednocześnie mogą podlegać bioakumulacji [18].



Rysunek 2. Obieg rtęci w środowisku wodnym.

### **1.1. Zanieczyszczenia występujące w organizmach morskich**

Związki chemiczne zawierające w swoim składzie metale, które trafiają do środowiska morskiego poddawane są różnym procesom. Mogą ulegać degradacji oraz przekształceniom do innych form, które z kolei mogą podlegać bioakumulacji w organizmach żywych, adsorpcji na powierzchni materii zawieszanej lub też depozycji w osadach dennych.

Główną drogą przedostawania się zanieczyszczeń do organizmów żywych jest układ pokarmowy i/lub oddechowy. Część z nich może zostać wydalona z powrotem do wody, natomiast pozostałe mogą być wykorzystane przez organizm (mikroelementy, np.: Zn, Fe, Cr, Cu, Se), a ich nadmiar oraz metale zbędne dla organizmu (np. Hg, Pb, Sn, Cd, As) mogą podlegać akumulacji w mięśniach i narządach wewnętrznych wraz z przyjmowaniem kolejnych porcji pokarmu.

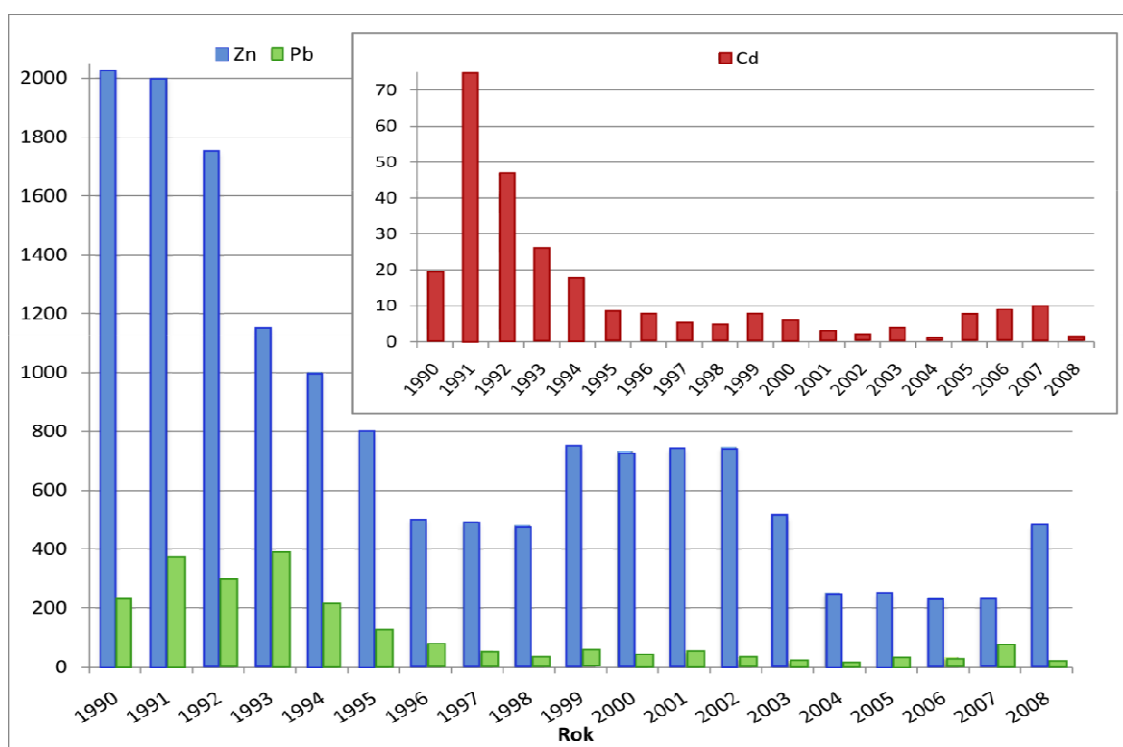
### **1.2. Akumulacja zanieczyszczeń w organizmach zwierzęcych z różnych ogniw łańcucha troficznego**

Zanieczyszczenia akumulowane w organizmach jako efekt ich pobierania różnymi drogami (drogi pokarmowe, drogi oddechowe, przenikanie przez skórę), biorą udział w transporcie biologicznym wzdłuż łańcucha pokarmowego począwszy od planktonu i roślin, poprzez organizmy roślinożerne do drapieżników. Ze względu na łatwość wnikania ekotoksyn do organizmu żywego i ich kumulowanie się w ciągu całego życia, zagrażają one głównie osobnikom starszym i przedstawicielom tych gatunków, które znajdują się na końcu łańcucha pokarmowego, w tym również człowiekowi [19]. Przykładowo stężenie rtęci w tkankach i narządach ryb, ptaków i ssaków wodnych może być nawet 10 tysięcy razy większe niż w otaczającym je środowisku wodnym [20, 21]. Jest to spowodowane tym, że zanieczyszczenia w organizmach podlegają procesom biowzmacniania i biowzbogacania. Proces biowzmacniania, czyli proces wzrostu stężenia substancji toksycznych w tkankach i narządach organizmów na wyższych poziomach łańcucha pokarmowego poprzez przyjmowane porcje pokarmu, a także biowzbogacania, czyli proces kumulowania ksenobiotyków w organizmach w wyniku ich kontaktu ze środowiskiem bytowania, prowadzi do występowania tych ksenobiotyków na wyższych poziomach zawartości niż poziomy dopuszczalne (wynikające z uregulowań prawnych).

Pomimo zwiększonej świadomości o toksycznym działaniu metali ciężkich i ich bioakumulacji w organizmach żywych, są one nadal stosowane w wielu gałęziach przemysłu,

zwiększając ryzyko skażenia środowiska i zatrucia organizmów morskich oraz żywiących się wodną fauną i florą, w tym również dla człowieka. Rtęć jest nadal stosowana w wydobyciu złota w wielu rejonach Ameryki Łacińskiej. Arsenu używa się często w środkach do konserwacji drewna, a tetraetylołów nadal używany jest jako dodatek do paliw (od 2005 roku jego stosowanie zabronione jest w Polsce i Unii Europejskiej w paliwach samochodowych, ale nadal jest używany w paliwach lotniczych).

W ostatnich latach zanotowano zmniejszenie emisji niektórych metali (takich jak Cd, Pb czy Zn) ze źródeł antropogenicznych (rysunek 3), co jednak nie oznacza, że od razu zostanie zaobserwowany spadek zawartości tych metali w środowisku. Obecny poziom zanieczyszczenia przez te pierwiastki wynika z ich emisji w przeszłości oraz ich uwalniania do wody z osadów, w których nie są trwale wiązane [11, 22].



Rysunek 3. Ładunek zanieczyszczeń wprowadzanych do Morza Bałtyckiego z dorzeczy Wisły, Odry i rzek przymorza w latach hydrologicznych 1990-2008 [23].

Jednym z narzędzi do oceny negatywnego wpływu zanieczyszczeń na środowisko jest stała kontrola ich obecności w środowisku. Dlatego też w literaturze można znaleźć liczne informacje na temat wyników badań monitoringowych ukierunkowanych na oznaczenie zawartości metali ciężkich w tkankach i narządach organizmów na wszystkich poziomach łańcucha troficznego [24-30] oraz we wszystkich elementach środowiska nieożywionego (woda, osady, gleba, powietrze) [31-36]. Poznanie poziomów zawartości i procesów przemian

zanieczyszczeń w organizmach żywych i w środowisku, w którym te organizmy żyją, stwarza możliwość prawidłowego zarządzania zagrożonymi gatunkami i ich ochronę.

### **1.3. Wpływ zanieczyszczeń na organizmy morskie**

Analiza danych literaturowych dotyczących zawartości różnego typu ksenobiotyków w próbkach tkanek i narządów pochodzących od ssaków i ptaków morskich wskazuje, że poszczególne pierwiastki docelowo mogą podlegać procesowi akumulacji w różnych tkankach lub organach organizmu, np.: Pb w kościach, Cd w nerkach, nieorganiczne formy Hg w wątrobie, a metylortęć (MeHg) w mięśniach i mózgu [37], przez co mogą wpływać na ich funkcjonowanie i występowanie niekorzystnych zmian w procesach życiowych.

Zawartość Cu czy Zn, które są pierwiastkami niezbędnymi do prawidłowego funkcjonowania organizmu, jest regulowana homeostatycznie i zależy od stanu fizjologicznego, składu diety, a także zwiększonych ilości metioniny w organizmie, do której metale wykazują znaczne powinowactwo. Dlatego też poziom ich zawartości w tkankach nie odzwierciedla ich zawartości w środowisku. Z drugiej strony niedobór tych pierwiastków lub ich nadmiar może powodować zaburzenia w przebiegu funkcji biochemicznych. Małe stężenie miedzi może wzmacniać wchłanianie kadmu w jelitach, który jest pierwiastkiem toksycznym i zbędnym dla organizmu. W procesach regulacji zawartości Cu i Zn istotną rolę odgrywa metionina, która w stanach niedoboru pierwiastków uwalnia je ze zgromadzonych zasobów, natomiast w przypadku nadmiaru wiąże je lub pomaga usuwać z organizmu [38].

Mechanizm toksycznego działania kadmu związany jest z jego dużym powinowactwem do wiązania się z grupami tiolowymi (-SH) w proteinach, enzymach i kwasach nukleinowych, a także podstawianie innych metali w metaloenzymach, zwłaszcza cynku. Kadm może wpływać na pobieranie i działanie Zn ze względu na łatwość wiązania się z metioniną. Oba pierwiastki mogą również wywoływać produkcję metioniny, co ma znaczenie w przypadku detoksykacji kadmu (a także Hg i Pb), gdyż wiązanie metali ciężkich z metalotioneinami ogranicza ich toksyczne oddziaływanie na organizm oraz umożliwia ich transport i wydalanie. Z drugiej jednak strony, zmiany w homeostazie cynku wywołane obecnością kadmu mogą powodować zwiększone zatrzymywanie Zn w wątrobie i nerkach, co zmniejsza jego dostępność dla innych organów i reakcji biochemicznych [38].

Podwyższone zawartości kadmu w nerkach mogą wskazywać na długotrwałe narażenie zwierząt na małe dawki tego pierwiastka [39]. W zależności od obszaru bytowania, warunków klimatycznych, stanu fizjologicznego i diety organizmy morskie mogą

akumulować różne ilości tego toksycznego pierwiastka. W wyniku przeprowadzonych badań stwierdzono, że foki szare z Bałtyku zazwyczaj mają niższą zawartość kadmu w tkankach niż foki szare z *Sable Island* czy też foki obrączkowane ze *Svalbardu* [7]. Przypuszczalnie jest to związane z większą zawartością Cd w pożywieniu organizmów żyjących w wodach morskich charakteryzujących się wysokim poziomem zasolenia. Sugerowano nawet, że ssaki morskie żyjące w rejonie Arktyki, a zwłaszcza foki obrączkowane wykazują się zdolnością do akumulacji znacznej ilości kadmu i co najważniejsze nie stwierdza się przy tym objawów uszkodzenia nerek [40].

Natomiast ołów obecny w organizmie może hamować i naśladować działanie wapnia, przez co zaburzane są procesy z udziałem Ca, a także poprzez wzajemne oddziaływanie z białkami zawierającymi grupy tiolowe, aminowe i fosforanowe może wywoływać zakłócenia w przebiegu procesów biochemicznych.

Metale, które ulegają procesowi akumulacji w organizmach ssaków morskich mogą negatywnie wpływać na prawidłowe funkcjonowanie organizmu. W literaturze można znaleźć informacje dotyczące oceny wpływu obecności metali w organizmach morskich na ich stan zdrowotny [41-43]. Zauważono, że nagromadzenie znacznych ilości rtęci i cynku w tkankach było przyczyną zwiększonej śmiertelności ssaków wodnych [10, 44], co było związane z zaburzeniami układu odpornościowego [45]. Długotrwała ekspozycja na te pierwiastki może powodować immunosupresję lub nadmierną aktywność układu odpornościowego [15, 46], co w efekcie końcowym może prowadzić do chorób zakaźnych i ostatecznie śmierci w zależności od stanu zdrowia zwierzęcia. Z drugiej strony, zmiany w zawartości pierwiastków śladowych mogą występować w wyniku stanów zakaźnych lub zapalnych [47]. W tabeli 1 zestawiono informacje obrazujące rolę i wpływ wybranych metali ciężkich na organizmy z różnych poziomów łańcucha troficznego.

## **2. Ssaki morskie jako biowskaźniki poziomu zanieczyszczenia Morza Bałtyckiego**

Określanie zmian zachodzących w środowisku za pomocą różnego rodzaju wskaźników biologicznych nazywa się bioindykacją, która ma zastosowanie jako jedna z podstawowych metod w monitoringu zanieczyszczeń środowiska. Ponieważ organizmy żywe są najbardziej miarodajnym źródłem informacji o procesach zachodzących w środowisku, w literaturze naukowej można znaleźć liczne doniesienia na temat wykorzystania organizmów żywych jako biowskaźników.

Tabela 1. Rola i wpływ wybranych metali ciężkich na organizmy z różnych poziomów łańcucha troficznego

	Podtyp	Gromada (przykładowe organizmy)	Rola i wpływ pierwiastków z grupy metali ciężkich						Dodatkowe informacje	Literatura
			Cu	Cd	Zn	Hg i MeHg	Pb	Inne metale lub ich związki		
Ogniwa łańcucha troficznego w ekosystemie morskim	Bezkręgowce	Mięczaki (ostrygi, ślimaki morskie, łodziki, ośmiornice, małże)	Regulowany metabolicznie; wchodzi w skład enzymów i hemocyjanin u niektórych organizmów; składnik pigmentu oddechowego; w dużych ilościach może powodować peroksydację tłuszczów i tworzenie adduktów DNA	W dużych ilościach może powodować peroksydację tłuszczów i tworzenie adduktów DNA	Poziom regulowany metabolicznie; składnik wielu enzymów (m.in. proteolitycznych) i hemocyjanin u niektórych organizmów oraz pigmentu oddechowego	W dużych ilościach może powodować peroksydację tłuszczów i tworzenie adduktów DNA, wpływa na metabolizm komórki		Mn: składnik wielu enzymów, metaloenzymów i pigmentu oddechowego	Pb, Cd, Hg, As, Se, Sb (dotyczy wszystkich organizmów): Atakują wiązania z siarką, grupę karboksylową i aminową białka w enzymach; usuwają fosforan ze związków lub katalizują ich rozkład; wywołują reakcje redoks generujące reaktywne formy tlenu (RFT), jak np. anionorodnik tlenowy O <sub>2</sub> <sup>-</sup> , nadtlenuk wodoru (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ), rodnik hydroksylowy (OH), tlen singletowy ( <sup>1</sup> O <sub>2</sub> ) itd.	[48-59]
		Skorupiaki (widłonogi, krewetki, homary, kraby)	Składnik enzymów i hemocyjanin (u dziesięcionogów; inne skorupiaki nie posiadają hemocyjanin), wpływa na aktywność enzymatyczną, decyduje o prawidłowym przebiegu wielu procesów życiowych (np. produkcja jaj, wzrost organizmu).	Zwiększone pobieranie Cd następuje ze względu na brak selektywności procesu absorpcji Cu – Cd jest pobierany w przypadku niedoboru Cu	Składnik wielu enzymów, bierze udział w wielu procesach enzymatycznych i metabolicznych			U samic skorupiaków narażonych na działanie TBT stwierdzono: • rozwój cech męskich • podwyższony poziom androgenów • obniżony poziom estrogenu w tkankach		[49-61]
		Szkarłupnie (rozgwiazdy)	Element wielu enzymów, bierze udział w reakcjach biologicznych		Uczestniczy w reakcjach metabolicznych					
	Kręgowce	Ryby (włóczęk, tuńczyk, koryfena, dorada, cefal, sardynka, śledź, szprot, dorsz, krokodylec)	Składnik wielu enzymów; regulowany metabolicznie		Składnik wielu enzymów; regulowany metabolicznie	Może powodować wycieńczeniu organizmu, zmniejszenie koordynacji, utratę apetytu, śmierć; wpływa negatywnie na centralny układ nerwowy i układ hormonalny oraz prowadzi do zaburzeń rozmnażania, osmoregulacji, orientacji, lokalizacji ofiary i komunikacji między osobnikami danego gatunku; powstaje metylortęć (MeHg) rozpuszczalna w tłuszczach wykazująca podobne drogi akumulacji co związki chloroorganiczne jak np. DDT	Powoduje zaburzenia behawioralne, wpływając na przeżycie, wzrost, naukę i metabolizm; związki nieorganiczne Pb są rakotwórcze	Se: bierze udział w usuwaniu Hg z organizmu (jak u ptaków). Mn: Składnik wielu enzymów; regulowany metabolicznie TBT: wywiera toksyczny wpływ na: • czerwone ciałka krwi, skrzela i wątrobę, • może powodować zanik grasicy i zmiany w rogówce		[58,59, 62-73]



Tabela 1. c.d.

		Ptaki (alka, pterodroma, burzyk, mewa, szablodziób, rybitwa, kormoran, burzyk)	Składnik wielu enzymów; regulowany metabolicznie; wiązana przez eumelaninę (pigment) w piórach, akumulowana w piórach ze względu na silne powinowactwo do grupy tiolowej (SH) keratyny; równomiernie rozmieszczona w tkankach młodych ptaków; akumulowana z wiekiem ze względu na wysokie powinowactwo do MT; nadmiar usuwany w procesie linienia	Akumulowana z wiekiem ze względu na powinowactwo do MT	Wiązany przez eumelaninę (pigment) w piórach; Składnik wielu enzymów; regulowany metabolicznie	Silne powinowactwo do grupy tiolowej (SH) keratyny powoduje akumulację w piórach; wpływa negatywnie na centralny układ nerwowy i układ hormonalny oraz prowadzi do zaburzeń rozmnażania, osmoregulacji, orientacji, lokalizacji ofiary i komunikacji między osobnikami danego gatunku; akumulowana z wiekiem ze względu na powinowactwo do MT; usuwana w procesie linienia; powstaje metylortęć (MeHg) rozpuszczalna w tłuszczach wykazująca podobne drogi akumulacji co związki chloroorganiczne jak np. DDT	Silne powinowactwo do grupy tiolowej (SH) keratyny powoduje akumulację w piórach; powoduje zaburzenia behawioralne, wpływając na przeżycie, wzrost, naukę i metabolizm; związki nieorganiczne Pb są rakotwórcze	Se: Bierze udział w demetylacji MeHg i w usuwaniu rtęci z organizmu poprzez utworzenie nietoksycznego selenku rtęci (HgSe); selen pomaga w tworzeniu i wykorzystaniu glutationu, który pełni rolę przeciwutleniaacza oraz funkcję ochronną przed wolnymi rodnikami. Mn: Składnik wielu enzymów; regulowany metabolicznie Tlenek tri-n-butylocynny wywiera negatywny wpływ na płodność i układ immunologiczny	Zależność między Zn-Cu-Hg; podobne drogi metabolizmu i magazynowania tych metali; Zależność między Se-As i Se-Cr w nerkach; ważna rola Se w magazynowaniu i detoksykacji As i Cr	
Ogniwa łańcucha troficznego w ekosystemie morskim	Kręgowce	Gady (żółw zielony, kareta, żółw szylkretowy, żółw oliwkowy)		Może negatywnie wpływać na DNA, RNA, syntezę rybosomu oraz może dezaktywować wiele enzymów systemowych; posiada właściwości teratogenne i embriotoksyczne; przewlekłe narażenie może zaburzać rozmnażanie, zaburzać reakcje estrogenne, antyestrogenne i endokryne		Wpływa negatywnie na centralny układ nerwowy i układ hormonalny oraz prowadzi do zaburzeń rozmnażania, osmoregulacji, orientacji, lokalizacji ofiary i komunikacji między osobnikami danego gatunku; powstaje metylortęć (MeHg) rozpuszczalna w tłuszczach wykazująca podobne drogi akumulacji co związki chloroorganiczne jak np. DDT	Powoduje zaburzenia behawioralne, wpływając na przeżycie, wzrost, naukę i metabolizm; związki nieorganiczne Pb są rakotwórcze	As: Nieorganiczne związki As są toksyczne, zwiększają ryzyko zachorowania na raka płuc, skóry, wątroby, nerek, pęcherza moczowego; związki te zwiększają ilość powstających nadtlenków tłuszczów i wolnych rodników, wpływają na spadek poziomu selenu; związki organiczne As (np. aresnobetaina, kwas dimetyloarsynowy) mogą wywoływać efekty toksyczne np. DNA może być niszczone przez wolne rodniki (jak np. nadtlenek dimetyloarsynowy) będące metabolitami kwasu dimetyloarsynowego (DMA) czy dimetyloarsyny. Ni: Powoduje śmiertelność, zmniejsza tempo wzrostu organizmu; w obecności miedzi toksyczność Ni wzrasta. Se: bierze udział w usuwaniu Hg z organizmu (jak u ptaków).		[50, 52, 53, 58-60, 62, 64, 74-78]
		Ssaki (kotlik, delfin Risso, pręgoboki, płetwał, wieloryb grenlandzki, pływacz szary)	Regulowany przez mechanizm homeostazy; wysoki poziom Cu może spowolnić ATPazę sodowo-potasową w błonie komórkowej i może ograniczyć możliwość regulacji potasu i równowagi osmotycznej; poziom Cu może wpłynąć na absorpcję innych metali		Regulowany przez mechanizm homeostazy; chroni przed światłem UV niszczącym DNA	Wpływa negatywnie na centralny układ nerwowy i układ hormonalny oraz prowadzi do zaburzeń rozmnażania, osmoregulacji, orientacji, lokalizacji ofiary i komunikacji między osobnikami danego gatunku; powstaje metylortęć (MeHg) rozpuszczalna w tłuszczach wykazująca podobne drogi akumulacji co związki chloroorganiczne jak np. DDT	Powoduje zaburzenia behawioralne, wpływając na przeżycie, wzrost, naukę i metabolizm; związki nieorganiczne Pb są rakotwórcze	Se: Chroni przed światłem UV niszczącym DNA; bierze udział w usuwaniu Hg z organizmu (jak u ptaków). TBT: Nagromadzenie przez ssaki związków butylocynny w wątrobie i nerkach może powodować obniżenie odporności zwierząt		

Podstawą do klasyfikacji typów biowskaźników mogą być następujące parametry:

1. sposobu działania:

- biowskaźniki/biomonitory procesu akumulacji zanieczyszczeń,
- biowskaźniki/biomonitory do oceny efektów lub oddziaływania zanieczyszczeń na środowisko,

2. pochodzenia organizmów:

- aktywne biowskaźniki/biomonitory,
- pasywne biowskaźniki/biomonitory.

Kryteria jakie powinien spełniać organizm (lub grupa organizmów) w przypadku wykorzystania jako biowskaźniki są następujące:

- względnie osiadły tryb życia wybranych organizmów,
- szeroki zasięg występowania,
- duża liczebność populacji,
- względnie duża tolerancja w stosunku do badanych zanieczyszczeń (metale ciężkie, związki organiczne),
- zajmowanie określonego poziomu troficznego,
- dostępność i łatwość pozyskania materiału do badań.

Ssaki morskie, a wśród nich foki szare z Bałtyku, stanowiące ostatnie ogniwo łańcucha pokarmowego są podatne na akumulowanie znacznych ilości zanieczyszczeń, przez co mogą być wykorzystywane jako wskaźniki poziomu skażenia danego obszaru. Oznaczenie zawartości zanieczyszczeń odkładanych w tkankach i narządach fok w ciągu długiego okresu ich życia, może dostarczyć cennych informacji o jakości środowiska, którego są częścią. Ze względu na możliwe różnice w dystrybucji zanieczyszczeń w różnych obszarach Morza Bałtyckiego, poziom zawartości ksenobiotyków w tkankach fok szarych może być różny. Porównanie stopnia intoksykacji fok szarych z różnych części Bałtyku być może pozwoli na ocenę stopnia zanieczyszczenia tych rejonów.

### **3. Informacje o focie szarej**

Foka szara (*halichoerus grypus*) (rysunek 4) jest jednym z czterech gatunków ssaków morskich występujących w Morzu Bałtyckim. Pozostałe dwa gatunki z rodziny fokowatych to foka pospolita (*Phoca vitulina*) i foka obrączkowana (*Pusa hispida*) oraz morświn (*Phocoena phocoena*) z rodziny waleni. Foka szara naturalnie występuje w strefie

umiarkowanie zimnej i w obszarach subarktycznych w rejonie Oceanu Atlantyckiego i Morza Bałtyckiego [79].

Samce foki szarej są znacznie większe od samic i masywniej od nich zbudowane. Długość ich ciała sięga 3 m, podczas gdy u samic jest to 1,7 -2,2 m. Waga samców to 200 -300 kg, samic 100 -200 kg. Wierzch ciała ma barwę ciemnoszarą z szarobrunatnymi lub czarnymi plamami i kleksami poniżej, spód jest żółtawobiały. Samice są jaśniej ubarwione, a plamy są mniej wyraźne. Głowa foki szarej ma kształt stożkowaty, a pysk jest bardziej wydłużony niż u innych fok. Noworodki pokryte są białawym puchem nazywanym lanugo.

Foka szara prowadzi przybrzeżny tryb życia, łączy się w niewielkie stada, jest aktywna w dzień. Preferuje skaliste wybrzeża. Pływając porusza całym ciałem, macha na boki ogonem i kończynami tylnymi, ale przednie trzyma blisko tułowia. Na lądzie przemieszcza się wyginając łukowato tułów. Przy wydostawaniu się z wody na ląd wykorzystuje płetwy.

Pożywienie foki szarej stanowią głównie ryby – dorsze, śledzie, halibuty, łososie, a także bezkręgowce [6]. Pokarm jest łowiony wyłącznie w wodzie, zarówno w strefach powierzchniowych, jak i na głębokości do 130 m.



Rysunek 4. Foki szare w fokarium znajdującym się przy Stacji Morskiej Uniwersytetu Gdańskiego w Helu.

W minionym stuleciu liczebność populacji foki szarej w Bałtyku ulegała wielokrotnym zmianom. Na początku wieku liczebność populacji sięgała prawdopodobnie ok. 90 tys. osobników, ale intensywne polowania sprawiły, że do końca lat czterdziestych dwudziestego wieku została zmniejszona do ok. 20 tys. [80]. Polowania ustały w trakcie II wojny światowej, ale liczebność populacji spadała nadal aż do lat siedemdziesiątych. Wówczas liczebność fok zamieszkujących Morze Bałtyckie nie przekraczała 4000

osobników, obecnie liczebność populacji bałtyckiej fok szarych szacuje się na ok. 22 500 osobników.

#### 4. Oznaczanie stałych izotopów węgla i azotu

Do oceny wpływu działalności antropogenicznej na stan zdrowotny ssaków morskich oraz żywotność populacji niezbędne jest uzyskanie informacji na temat możliwych dróg przemieszczania się zanieczyszczeń w ekosystemach morskich. Jedną z metod pozwalających na poznanie powiązań troficznych w środowisku, a co za tym idzie poznanie możliwego przepływu zanieczyszczeń jest analiza stałych izotopów węgla i azotu (SIA). Naturalnie występujące różnice w stosunkach poszczególnych izotopów węgla ( $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ) i azotu ( $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ ) mogą być stosowane do śledzenia zwyczajów żywieniowych i zależności troficznych występujących w ekosystemach [81]. Zasada tej metody opiera się na tym, że izotopy węgla i azotu podlegają procesowi frakcjonowania izotopowego pomiędzy poziomami troficznymi. Frakcjonowanie wynika z różnej szybkości przemian biochemicznych zachodzących w tkankach, gdyż lżejsze i bardziej mobilne izotopy reagują szybciej niż cięższe i są łatwiej usuwane. Zjawisko to powoduje, że cięższy izotop azotu ulega wzbogaceniu, dzięki czemu na podstawie stosunku  $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$  można ocenić pozycję organizmu w łańcuchu pokarmowym. Im wyżej w piramidzie troficznej, tym wartość liczbowa tego stosunku jest większa [82]. Natomiast w przypadku węgla, stosunek cięższego izotopu do lżejszego zmienia się nieznacznie wzdłuż łańcucha pokarmowego i jest raczej stosowany do badania preferencji żywieniowych badanych organizmów. W porównaniu do wyników badań treści żołądkowej, które dają informację tylko o ostatnio spożywanym pokarmie, przeprowadzenie badań w celu oznaczenia stałych izotopów pozwala na ocenę jaki rodzaj pokarmu był przyswajany przez dany organizm przez dłuższy okres czasu. Skład izotopowy w organizmach znajdujących się na początku łańcucha pokarmowego różni się pomiędzy ekosystemami [83]. W obszarach o wysokiej produktywności biologicznej (np. strefa przybrzeżna i strefa podnoszenia się zimnych wód morskich (*ang. upwelling*), zawierających substancje odżywcze, z większych głębokości na powierzchnię) wartość liczbowa stosunku  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  jest zazwyczaj wysoka, natomiast w strefie pelagicznej i wodach o silnej stratyfikacji, gdzie produktywność jest niższa, wartość tego stosunku jest niewielka. Ponadto duże różnice istnieją pomiędzy producentami ze względu na ich rozmiar i genetykę; duże rośliny, takie jak wodorosty czy trawa morska, posiadają większą wartość liczbową stosunku  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  niż organizmy wchodzące w skład fitoplanktonu. Mało intensywne

mieszanie wód i mała zawartość CO<sub>2</sub> rozpuszczonego w wodach bentosowych wzmacnia intensywność procesu gromadzenia cięższego izotopu węgla w organizmach należących do peryfitonu. Nieznaczne zmiany w wartości stosunku cięższego izotopu węgla do lżejszego na wyższych poziomach troficznych umożliwiają rozróżnienie preferencji żywieniowych danego osobnika (w organizmach ze strefy pelagicznej wartość liczbowa parametru  $\delta^{13}\text{C}$  jest niższa niż w przypadku organizmów ze strefy przydennej) [81, 82].

Średni wzrost wartości liczbowej parametru  $\delta^{13}\text{C}$  ze wzrostem poziomu troficznego został oszacowany na ok. 1 ‰, natomiast wzrost wartości liczbowej  $\delta^{15}\text{N}$  waha się w granicach 2-5 ‰ pomiędzy poziomami troficznymi [81].

## 5. Analiza specjacyjna

Katastrofy ekologiczne, jak te które miały miejsce w zatoce *Minamata* czy wymieranie populacji ostryg, w zatoce *Arcachon* na południu Francji, w wyniku zatrucia organicznymi związkami cyny zwróciły uwagę naukowców na zagrożenie płynące ze strony metali i ich związków. Stało się jasne, że toksyczność, mobilność, biodostępność i bioakumulacja metali zależy od form chemicznych oraz postaci fizycznych, w jakich dany pierwiastek występuje w środowisku. Na przykład, nieorganiczne związki arsenu są około sto razy bardziej toksyczne niż organiczne połączenia arsenu, a zwłaszcza arsen na trzecim stopniu utlenienia, który posiada właściwości rakotwórcze [84]. Podobnie jest w przypadku związków chromu: Cr<sup>6+</sup> jest uznawany za czynnik przyczyniający się do powstawania raka, podczas gdy Cr<sup>3+</sup> jest zazwyczaj nieszkodliwy [85]. Odwrotna sytuacja jest z rtęcią, której zarówno związki nieorganiczne jak i organiczne są toksyczne, jednak metylortęć powoduje silniejsze skutki toksyczne.

Oznaczenie poszczególnych form, w jakich mogą występować metale w środowisku stało się możliwe dzięki analizie specjacyjnej. Termin „specjacja” ma swoje początki w połowie lat sześćdziesiątych dwudziestego wieku, kiedy pojawiły się pierwsze publikacje na temat specjacji. W artykułach tych opisywano techniki chromatograficzne, takie jak GC i LC, stosowane do rozdzielania składników próbki oraz techniki spektroskopowe, takie jak AAS i AES, wykorzystywane do identyfikacji poszczególnych form metali [86, 87]. Jednak, zanim to nastąpiło analityka specjacyjna była kojarzona z biogeochemicznym cyklem metali w środowisku wodnym. Na początku lat pięćdziesiątych rozróżniano dwie formy metali – metale związane z materią zawieszoną i rozpuszczalne formy metali. W tej sytuacji do rozdzielania zawiesiny od fazy wodnej wystarczało przeprowadzenie procesu filtracji

próbki wody przy użyciu filtra o średnicy porów 0,45  $\mu\text{m}$ . Dalsze badania, związane z intensywnym rozwojem metod elektrochemicznych, umożliwiły identyfikację różnych form w środowisku wodnym – wolne jony metali i związki kompleksowe.

Wyniki badań prowadzonych nad możliwymi stanami równowagi pomiędzy organicznymi i nieorganicznymi jonami i ligandami, pokazały, że w środowisku wodnym istnieją zróżnicowane chemiczne formy metali [88]. Stąd też, analityka specjacyjna znalazła szerokie zastosowanie w obszarze badań toksykologicznych, biologicznych, środowiskowych i zdrowotnych.

Nowe rozwiązania w zakresie aparatury pomiarowej i rozwiązania metodyczne umożliwiły oznaczanie zawartości szerokiej gamy indywidualów chemicznych, nie tylko metali, ale również innych pierwiastków. Z powodu napływu ogromnej ilości publikacji z różnych dziedzin naukowych, obserwuje się przejawy nieładu i nieporozumień dotyczących właściwego znaczenia terminu „specjacja” i powiązanych z nim określeń.

Aby zapewnić jednolitą nomenklaturę, umożliwić interdyscyplinarną komunikację w zakresie specjacji, eksperci IUPAC opracowali i zaproponowali następujące definicje [89]:

- I. Indywiduum (*ang. chemical species*) – specyficzna forma występowania pierwiastka określona przez jego skład izotopowy, elektronowy, stopień utlenienia i/lub strukturę cząsteczkową lub kompleksową.
- II. Analiza specjacyjna (*ang. speciation analysis*) – działalność analityczna prowadząca do identyfikacji i/lub oznaczenia jednego lub więcej indywidualów chemicznych w badanej próbce.
- III. Specjacja (*ang. speciation*) – występowanie danego pierwiastka w różnych indywidualach chemicznych w danym układzie.

## **6. Informacje literaturowe o procedurach stosowanych do oznaczania metali ciężkich i związkach metaloorganicznych w próbkach biologicznych.**

Postęp w zakresie zdobywania informacji o składzie badanych obiektów materialnych można uzyskać poprzez:

- wprowadzanie do praktyki analitycznej nowych procedur umożliwiających wykrycie i oznaczenie w próbkach o złożonym składzie matrycy składników występujących na poziomie śladów i ultraśladów [90], a także
- rozwój technologii wytwarzania nowych generacji sprzętu kontrolno pomiarowego.

Należy jednak pamiętać, że w obu przypadkach kluczowym zagadnieniem jest właściwe przygotowanie próbek do analizy. Bardzo często jednak odpowiednie procedury są pracochłonne, a ponadto mogą być źródłem wielu błędów [91]. Konieczne jest więc zastosowanie, oprócz zasad dobrej praktyki laboratoryjnej, również odpowiednich narzędzi do kontroli i zapewnienia jakości wyników pomiarów analitycznych (QA/QC) tak, aby wyniki były źródłem miarodajnej informacji a nie dezinformacji [92].

### **6.1. Pobieranie próbek**

W celu uzyskania miarodajnych wyników oznaczeń niezwykle ważnym etapem procedury analitycznej jest pobranie próbki reprezentatywnej w stosunku do badanego obiektu materialnego. Specjalne środki ostrożności muszą być podjęte nie tylko podczas pobierania, ale również w czasie transportu i przechowywania próbek, gdyż przemiany chemiczne i fizyczne mogą prowadzić do strat analitów. Dodatkowo w przypadku materiału biologicznego straty analitów mogą nastąpić wskutek działania podwyższonej temperatury lub aktywności mikrobiologicznej.

Poza możliwością wystąpienia błędów przypadkowych, w analizie śladowej, istnieje zwiększone prawdopodobieństwo pojawienia się błędów systematycznych, których źródła najczęściej są związane z [93]:

- procesami adsorpcji i desorpcji składników próbki na ściankach naczyń (efekt pamięci ścianki),
- zmianami w składzie próbki wywołanymi przez dodawanie do próbki różnych odczynników na etapie jej przygotowania do analizy,
- oddziaływaniem składników próbek z powierzchnią aparatury czy naczyń laboratoryjnych,
- wpływem czynnika ludzkiego.

Sposoby zmniejszania wpływu tych czynników na wynik oznaczeń obejmują między innymi właściwe przygotowanie naczyń laboratoryjnych i urządzeń do pobierania próbek. W celu zminimalizowania zmian w składzie próbki niezbędne jest stosowanie dodatku środków stabilizujących lub utrzymywanie próbki w niskich temperaturach bezpośrednio po pobraniu [94].

## 6.2. Przygotowanie próbki

Etap przygotowania wraz z etapem pobierania próbek są najslabszymi i najbardziej czasochłonnymi ogniwami w procedurze analitycznej. Uważa się, że z tymi etapami może być związana większość błędów jakimi obarczony jest końcowy wynik analizy. Ocenia się, że mogą one stanowić znaczną część całkowitego błędu jakim obarczone są wyniki analizy (rzędu 60 %). Operacje te są również praco- i czasochłonne. Ocenia się, że czas poświęcony na właściwe przygotowanie próbek do analizy może stanowić nawet 70 % całkowitego czasu analizy [92, 95, 96]. Dlatego też właściwe przygotowanie próbki w znaczący sposób wpływa na miarodajność uzyskanych wyników [97].

### 6.2.1. Oznaczanie form specjacyjnych metali

W przypadku oznaczania całkowitej zawartości metali w próbkach biologicznych przygotowanie próbki obejmuje jedynie proces liofilizacji i ewentualnie mineralizacji. Mineralizacja prowadzi do rozkładu i utlenienia związków organicznych zawartych w próbce do związków prostych i przeprowadzenia próbki do roztworu. Proces ten zachodzi pod wpływem energii, np. cieplnej lub przez użycie odczynnika chemicznego, np. kwasu lub stosując oba te czynniki jednocześnie. Należy jednak pamiętać również o tym, że mineralizacja może być źródłem błędów systematycznych, ze względu na możliwość częściowego rozkładu oznaczanego składnika lub wprowadzenie zanieczyszczeń z kwasów lub naczyń reakcyjnych. Znane są dwie podstawowe grupy technik mineralizacji próbek:

- mineralizacja na sucho: spoielanie, mineralizacja niskotemperaturowa w plazmie tlenowej, mineralizacja w atmosferze tlenu, stapianie,
- mineralizacja na mokro: z zastosowaniem konwekcyjnego ogrzewania, z wykorzystaniem ultradźwięków, promieniami UV, rozkład z udziałem kwasów w fazie gazowej.

Etap przygotowania próbki w analizie specjacyjnej jest procesem bardziej złożonym niż to jest w przypadku całkowitego oznaczania metali i obejmuje różne etapy takie jak:

- mineralizacja (roztwarzanie próbki),
- usuwanie lub maskowanie substancji przeszkadzających,
- ekstrakcja analitów,
- oczyszczanie ekstraktu,
- derywatywacja analitów,
- wzbogacanie analitów.



Każdy z tych etapów może być prowadzony oddzielnie, ale coraz częściej dąży się do łączenia kilku z nich w jedną operację. Pozwala to na skrócenie czasu całej procedury analitycznej, zmniejsza ryzyko strat analitów, a także zmniejsza możliwość zanieczyszczenia próbki, co ma szczególne znaczenie w analityce śladów [98].

#### *Wstępne przygotowanie próbki do analizy specjacyjnej*

Wstępne przygotowanie próbek stałych do dalszych etapów analizy specjacyjnej obejmuje suszenie (najczęściej poprzez liofilizację) oraz homogenizację badanego materiału (z wykorzystaniem młynka, specjalnych młynków lub urządzeń rozdrabniających). W przypadku analizy specjacyjnej próbek biologicznych niezbędne jest również przeprowadzenie procesu uwalniania analitów [99], które najczęściej są związane z łańcuchami białek. Odpowiednia procedura wymywania analitów powinna zapewnić częściowy rozkład matrycy badanego materiału bez zmiany form chemicznych analitów w nim zawartych. Do tego celu najczęściej stosuje się:

1. rozcieńczone kwasy (HCl, CH<sub>3</sub>COOH) lub ich mieszaniny z alkoholami [100, 101],
2. alkoholowe roztwory wodorotlenków (NaOH, KOH lub TMAH) [102-107],
3. roztwory zawierające enzymy (lipazy i/lub proteazy) [108, 109].

Proces roztwarzania matrycy próbki przebiega w znacznie łagodniejszych warunkach niż mineralizacja, dzięki czemu anality są uwalniane w niezmienionej formie z zachowaniem informacji specjacyjnej.

#### *Ekstrakcja analitów*

Ekstrakcja jest niezwykle ważnym etapem procedury przygotowania próbki w analizie specjacyjnej i służy ona między innymi do oddzielenia analitów od matrycy i usuwania substancji przeszkadzających. Niski poziom zawartości związków metaloorganicznych w próbkach biologicznych sprawia, że w trakcie procesu ekstrakcji następuje również wzbogacenie próbki w analit. Innym zadaniem ekstrakcji może być zmiana matrycy przed kolejnymi etapami przygotowania próbki lub etapem oznaczeń końcowych [110]. Ekstrakcja powinna być przeprowadzona w taki sposób, aby oddzielić anality od matrycy lub substancji przeszkadzających, ale bez zmieniania formy chemicznej analitów.

Dobór odpowiedniego ekstrahenta zależy od kilku czynników. Jako najważniejsze należy wymienić:

- rodzaj analitów,

- charakter próbki.
- dostępny sprzęt analityczny.

W przypadku specjacji słabo polarnych organicznych związków cyny, takich jak TBT, powszechnie stosowane są następujące rozpuszczalniki: heksan [111, 112], benzen [113], toluen [114], pentan [115] czy dichlorometan [116]. Spadek ilości grup organicznych przy atomie cyny i zwiększanie charakteru jonowego cząsteczki analitu powoduje, że siła oddziaływań analit-matryca rośnie. Przekłada się to na trudności z ilościową ekstrakcją mono- i dibutylocyny. W celu zwiększenia wydajności ekstrakcji stosuje się bardziej polarne rozpuszczalniki oraz odczynniki kompleksujące, takie jak tropolon czy dietyloditiokarbaminian sodu [117-119]. Odczynniki te tworzą z analitami niepolarne kompleksy łatwo przechodzące do fazy organicznej, przez co zwiększa się odzysk analitów [98].

Do ekstrakcji organicznych związków rtęci bardzo często stosowana była metoda opracowana w latach 60 XX wieku przez Westö [120]. Polegała ona na konwersji związków rtęci do ich chlorowanych lub bromowanych pochodnych alkilowych  $RHgX$  ( $X=Cl$  lub  $Br$ ), a następnie ekstrakcji tych pochodnych analitów do fazy organicznej (benzenu). W celu wyeliminowania innych zanieczyszczeń organicznych rozpuszczalnych w benzenie konieczne było przeprowadzenie  $MeHg^+$  do fazy wodnej z jednoczesnym kompleksowaniem z cysteiną. Przed końcowym oznaczeniem z wykorzystaniem chromatografii gazowej należało przeprowadzić reekstrakcję analitów do fazy organicznej kompatybilnej z wybranym detektorem. W chwili obecnej stosowane są różne modyfikacje tej metody. Najczęściej używanymi rozpuszczalnikami organicznymi są toluen, di- i trichlorometan lub metanol [121-125]. W literaturze można znaleźć również informacje na temat stosowania wstecznej ekstrakcji analitów z fazy organicznej do fazy wodnej w celu wzbogacenia i/lub oczyszczenia próbki w obecności cysteiny lub tiosiarczanu sodowego [125, 126].

Na skuteczność procesu ekstrakcji analitów z próbek charakteryzujących się złożonym składem matrycy ma wpływ czas i temperatura trwania procesu, a także polarność i skład ekstrahenta oraz obecność substancji kompleksujących. Coraz częściej wykorzystuje się w praktyce analitycznej takie techniki ekstrakcji, w której zastosowanie znajdują dodatkowe czynniki (takie jak ultradźwięki, promieniowanie mikrofalowe lub podwyższone ciśnienie), które wpływają korzystnie na efektywność procesu ekstrakcji. Zwiększają one wydajność ekstrakcji, jednak w przypadku ich stosowania należy zwrócić uwagę na możliwość częściowego rozkładu analitów, a także na możliwość zwiększenia stężenia substancji

przeszkadzających w próbce. W tabeli 2 przedstawiono informacje o najważniejszych technikach ekstrakcji metylortęci i tributyllocyny z próbek biologicznych.

### *Derywatywacja*

Najczęściej stosowane procedury w analizie specjacyjnej związane są z chromatograficznym rozdzielaniem analitów i ich oznaczaniem za pomocą czułego i selektywnego detektora (spektrometr atomowy, emisyjny lub detektor mas). Tak jak wybór procedury przygotowania próbki zależy od rodzaju matrycy w jakiej występują anality, tak wybór techniki rozdzielania zależy od właściwości fizyko-chemicznych analitu (tj. lotności, ładunku, polarności).

Z tego względu chromatografia gazowa znalazła zastosowanie do rozdzielania związków lotnych (lub takich, które można przeprowadzić w lotne i stabilne), stabilnych termicznie i obojętnych (w postaci cząsteczkowej) [127]. Natomiast chromatografia cieczowa jest odpowiednią techniką do rozdzielania pozostałych związków [128].

Głównym zadaniem etapu derywatywacji analitów jest zapewnienie możliwości ich ilościowego rozdzielania w przypadku, gdy stosuje się technikę chromatografii gazowej na etapie rozdzielania i oznaczania analitów. Większość związków metaloorganicznych występuje w środowisku w formach jonowych, niestabilnych termicznie i o niskiej lotności, które wykazują właściwości polarne. Próba rozdzielania tych związków z wykorzystaniem układów chromatograficznych służących do rozdzielania substancji niepolarnych może doprowadzić do uszkodzenia kolumny ze względu na możliwość sorpcji polarnych substancji na miejscach aktywnych kolumny. Dodatkowo jonowa forma analitów przyczynia się do ogonowania pików, co może utrudniać ich interpretację [129]. Z drugiej jednak strony w trakcie derywatywacji może nastąpić niezamierzone zanieczyszczenie próbki, a także straty analitów na skutek niecałkowitego przebiegu reakcji.

W przypadku chromatografii cieczowej derywatywację przeprowadza się nie tylko w celu ułatwienia rozdzielania analitów, ale również po to, aby umożliwić wykrycie analitów i/lub zwiększyć czułość oznaczeń końcowych [130].

Wprowadzenie etapu derywatywacji analitów do odpowiedniej procedury analitycznej jest pomocne również w przypadku wzbogacania analitów w próbce czy też oczyszczania ekstraktu. W analizie specjacyjnej związków metaloorganicznych derywatywacja powinna być przeprowadzona w taki sposób, aby zapewnić utworzenie lotnej i stabilnej formy analitu przy zachowaniu oryginalnych wiązań metal-węgiel.

Tabela 2. Informacje literaturowe o najważniejszych technikach ekstrakcji, derywatywacji i wzbogacania pochodnych rtęcio- i cynoorganicznych z próbek biologicznych

Analit	Rodzaj próbki	Warunki ekstrakcji	Derywatywacja/oczyszczanie/wzbogacanie	Literatura
MeHg, EtHg	Ryby	Kwasowe roztwarzanie matrycy z wykorzystaniem mieszaniny KBrO/KBrO <sub>3</sub> /CuSO <sub>4</sub> , następnie ekstrakcja analitów z wykorzystaniem CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	Ekstrakcja wsteczna z wykorzystaniem odczynnika kompleksującego (Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> ), ekstrakcja analitów do fazy organicznej z wykorzystaniem CuCl <sub>2</sub> +CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	[131]
	DORM-2	Zasadowe roztwarzanie matrycy przy użyciu NaOH (18%), przeniesienie analitów do metanolu	Derywatywacja przy użyciu NaBPh <sub>4</sub> , wzbogacanie analitów z wykorzystaniem techniki wymywania i wylapywania (purge-and-trap)	[130]
MeHg	Ryby	Kwasowe roztwarzanie matrycy z wykorzystaniem mieszaniny KBrO/KBrO <sub>3</sub> /CuSO <sub>4</sub> , następnie ekstrakcja analitów z wykorzystaniem toluenu	Ekstrakcja wsteczna z l-cysteiną (1,5% w/v)	[132]
MeHg, EtHg, PhHg	Zoobentos	Kwasowe roztwarzanie matrycy z użyciem mieszaniny HCl/MeOH i dodatkiem kwasu cytrynowego (w celu maskowania jonów Fe <sup>3+</sup> ) wspomaganie energią mikrofalową.	Ekstrakcja analitów do fazy stałej (C18) z wykorzystaniem odczynnika kompleksującego (2-merkaptometanolu)	[133]
MeHg	Wątroba foki obrączkowanej	Kwasowe roztwarzanie matrycy z wykorzystaniem mieszaniny KBrO/KBrO <sub>3</sub> /CuSO <sub>4</sub> , ekstrakcja analitów do fazy organicznej (mieszanina dichlorometan-heksan)	Ekstrakcja wsteczna z wykorzystaniem odczynnika kompleksującego (Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> ), ekstrakcja analitów do fazy organicznej (toluen)	[134]
DBT, TBT, DPhT, TPhT	Ostryga	Ekstrakcja z octanem etylu i wodnym roztworem NaCl i HCl	Odparowanie ekstraktu do sucha w strumieniu azotu, ponowne rozpuszczenie w metanolu, ekstrakcja analitów do fazy stałej	[135]
MBT, DBT, TBT	CRM-477 (tkanka małży)	Ekstrakcja z mieszaniną kwasu octowego i metanolu wspomaganą promieniowaniem mikrofalowym	Derywatywacja z wykorzystaniem NaBEt <sub>4</sub>	[136, 137]
		Ekstrakcja z wodnym roztworem TMAH wspomaganą promieniowaniem mikrofalowym		
		Enzymatyczny rozkład próbki (mieszanina lipazy i proteazy) w łaźni termostatycznej wspomaganą wytrząsaniem		
		Ekstrakcja z mieszaniną kwasu octowego i metanolu w łaźni termostatycznej wspomaganą wytrząsaniem		
MBT, DBT, TBT, MPhT, DPhT, TPhT	Mięśnie ryb	Ekstrakcja z KOH w łaźni termostatycznej	Jednoczesna derywatywacja (z wykorzystaniem NaBEt <sub>4</sub> ) i ekstrakcja (z izooktanem)	[104]
MBT, DBT, TBT	Wątroba białuchy	Ekstrakcja z TMAH	Dodanie wody, kwasu octowego i chlorku sodu i ekstrakcja analitów z użyciem mieszaniny trolon-toluen, odparowanie ekstraktu w strumieniu azotu i rozpuszczenie pozostałości w heksanie, derywatywacja z odczynnikiem Grignarda (bromek etylomagnezu), oczyszczanie na kolumnie z wypełnieniem z żelu krzemionkowego	[138]

Do najczęściej stosowanych technik derywatywacji w przypadku specjacji rtęci i cyny należą [139]:

- derywatywacja za pomocą odczynników Grignarda,
- generowanie wodorków przy użyciu borowodorku sodu,
- tworzenie lotnych związków z użyciem alkiloboranów sodu.

W tabeli 3 zestawiono najważniejsze informacje o wadach i zaletach wymienionych technik derywatywacji stosowanych w analizie specjacyjnej związków metaloorganicznych.

#### *Wzbogacanie analitów i oczyszczanie ekstraktów*

Organiczne związki metali zazwyczaj występują w próbkach biologicznych na bardzo niskich poziomach stężeń, dlatego też konieczne jest stosowanie etapu wzbogacania analitów w próbce w celu obniżenia wartości granic oznaczalności. Proces ten polega na zwiększaniu stężenia analitów w próbce, tak aby detektor o określonej czułości mógł dostarczyć miarodajne informacje na temat ich zawartości. Niestety jednocześnie z analitami wzbogacaniu mogą ulegać również substancje mogące zakłócać proces rozdzielania i detekcji analizowanych związków. Bardzo często substancje te występują w próbce w dużo większych ilościach niż te, które chcemy oznaczyć. Stwarza to potrzebę oczyszczania ekstraktów, co zazwyczaj jest przeprowadzane równocześnie z etapem wzbogacania.

Wybór sposobu wzbogacania analitów uzależniony jest zarówno od początkowego ich stężenia w próbce oraz od rodzaju detekcji w danej procedurze analitycznej. Do tego celu najczęściej stosuje się jedną spośród wielu technik ekstrakcji. Największym powodzeniem cieszy się ekstrakcja ciecz-ciecz (LLE) ze względu na uniwersalność, łatwość wykonania, niski koszt i stosunkowo wysokie współczynniki wzbogacania. Jednak poważną wadą tego sposobu wzbogacania analitów jest używanie znacznych ilości rozpuszczalników, które mogą być szkodliwe dla zdrowia, a przy tym ich oczyszczanie lub utylizacja jest trudna i kosztowna.

Inną techniką wzbogacania analitów jest ekstrakcja do fazy stałej (SPE). Wykorzystuje się w niej różnego rodzaju złoże o silnie rozwiniętej powierzchni pokrytej związkami z polarnymi grupami funkcyjnymi. Do najczęściej stosowanych sorbentów należy tlenek glinu, żel krzemionkowy i *Florisil* [141]. Wykorzystanie różnic powinowactwa analitów i substancji przeszkadzających do powierzchni złoże pozwala na przeprowadzenie jednoczesnego oczyszczania i wzbogacania.

Tabela 3. Informacje o najczęściej stosowanych technikach derywatywacji w analizie specjacyjnej związków metaloorganicznych

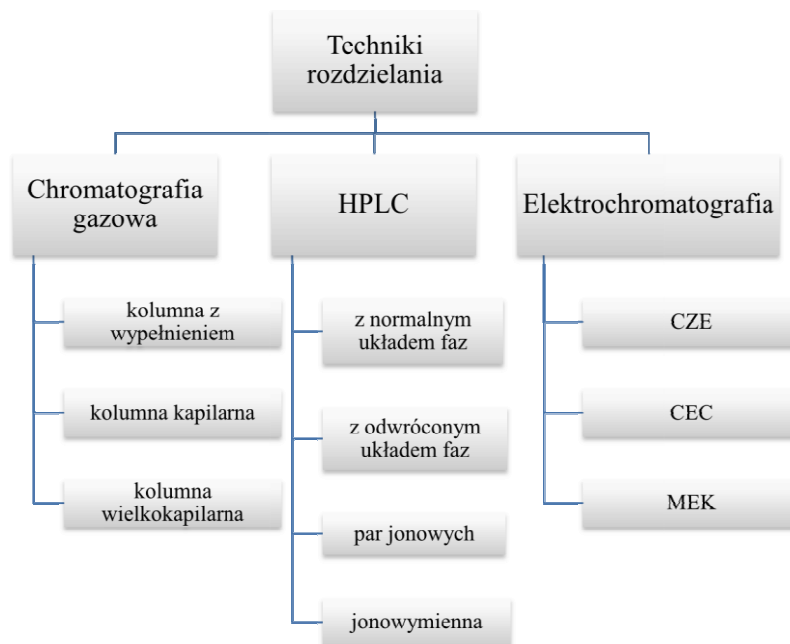
Derywatywacja	Stosowane odczynniki	Zalety	Wady	Literatura
Generowanie wodorków	$\text{NaBH}_4$ , $\text{KBH}_4$	<ul style="list-style-type: none"> <li>- łatwość i szybkość wykonania (reakcja przebiega w środowisku wodnym)</li> <li>- możliwość oznaczania związków tworzących lotne wodorki</li> <li>- możliwość jednoczesnego oznaczania związków cyanoorganicznych z grupami metylowymi i butylowymi</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- nietrwałość utworzonych pochodnych rtęciowych</li> <li>- możliwość zachodzenia reakcji dysproporcjonowania</li> <li>- w przypadku próbek o złożonym składzie matrycy (duża zawartość jonów innych metali, substancji humusowych i tłuszczów) mogą wystąpić problemy z wydajnością generowania wodorków i powtarzalnością wyników</li> </ul>	[138, 140, 141]
Alkilowanie (przy użyciu związków Grignarda)	$\text{R}'\text{MgX}$ , gdzie R' to grupa metylowa, etylowa, propylowa, butylowa, heksylowa lub fenylowa	<ul style="list-style-type: none"> <li>- tworzone są stabilne i lotne pochodne analitów</li> <li>- szeroki wybór odczynników do derywatywacji</li> <li>- uniwersalność</li> <li>- duża wydajność reakcji</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- praco- i czasochłonność ze względu na konieczność prowadzenia reakcji w środowisku bezwodnym (ekstrakty przed derywatywacją muszą zostać osuszone i/lub przeniesione do innego rozpuszczalnika)</li> <li>- po derywatywacji konieczne jest usunięcie nadmiaru odczynnika magnezoorganicznego</li> <li>- związki magnezoorganiczne chętnie reagują z siarką elementarną obecną w próbce, tworząc pochodne mogące zakłócać proces detekcji pochodnych cyanoorganicznych (przy użyciu takich detektorów jak FPD czy MS)</li> </ul>	[142]
Alkilowanie (przy użyciu alkiloboranów)	$\text{NaBEt}_4$ , $\text{NaBPr}_4$ , $\text{NaBPh}_4$	<ul style="list-style-type: none"> <li>- możliwość przeprowadzenia ekstrakcji i derywatywacji w tym samym czasie, co znacznie skraca etap przygotowania próbki</li> <li>- tworzone pochodne są trwałe chemicznie i umiarkowanie lotne, dzięki czemu możliwe jest ich rozdzielenie z wykorzystaniem chromatografii gazowej</li> <li>- mała wrażliwość na obecność jonów metali, białek, tłuszczów czy substancji humusowych, przez co może być stosowana przy analizie próbek różnego pochodzenia, w tym próbek biologicznych</li> <li>- możliwość jednoczesnego oznaczania organicznych związków cyny, rtęci i ołowiu</li> <li>- propylowanie umożliwia jednoczesną specjację pochodnych etylowych i butylowych związków metaloorganicznych bez utraty informacji o poszczególnych formach pierwotnie obecnych w próbce</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- mała liczba odczynników do derywatywacji dostępnych handlowo</li> <li>- w wyniku reakcji poszczególnych organicznych form ołowiu z <math>\text{NaBEt}_4</math> tracona jest informacja specjacyjna ponieważ powstaje ten sam produkt, czyli <math>\text{PbEt}_4</math>; podobnie jest w przypadku derywatywacji nieorganicznych związków rtęci i etylortęci, obie formy tworzą ten sam związek, <math>\text{HgEt}_2</math></li> <li>- <math>\text{NaBPh}_4</math> jest selektywny tylko w stosunku do związków rtęcioorganicznych</li> <li>- kosztowna i skomplikowana synteza <math>\text{NaBPr}_4</math> sprawia, że nie jest on związkiem dostępnym komercyjnie</li> </ul>	[98, 143-148]

Ekstrakt zawierający anality przenoszony jest na czoło kolumnienki ze złożem sorbenta, a następnie anality są wymywane z użyciem niepolarnego rozpuszczalnika (heksan, octan etylu, eter etylowy lub ich mieszaniny). Technika ta cechuje się wysokimi wartościami liczbowymi współczynników wzbogacenia i selektywnością, a także możliwością automatyzacji. Z drugiej jednak strony wymaga większych nakładów finansowych.

W ostatnich latach z uwagi na dbałość o środowisko można zaobserwować dążenie do stosowania tzw. zielonych technik przygotowania próbek. Stąd też nastąpił gwałtowny rozwój technik mikroekstrakcyjnych. Można tu zaliczyć: mikroekstrakcję do fazy stacjonarnej (SPME), mikroekstrakcję do fazy ciekłej (LPME), ekstrakcję z zastosowaniem wirującego elementu sorpcyjnego (SBSE), mikroekstrakcję do pojedynczej kropli (SDME). Charakteryzują się one znikomym użyciem rozpuszczalników lub całkowitym ich brakiem.

### 6.3. Rozdzielanie związków metaloorganicznych

W analizie specjacyjnej, gdzie poziomy stężenie analitów w próbkach środowiskowych są bardzo niskie, w celu uzyskania miarodajnych wyników niezbędne jest zapewnienie odpowiedniej czułości i selektywności. W tym celu stosowane są techniki łączone, które łączą technikę rozdzielania (najczęściej GC lub LC) z czułym i selektywnym detektorem. Po raz pierwszy takie połączenie zostało wprowadzone na przełomie lat 70 i 80 ubiegłego wieku [149, 150]. Na rysunku 5 przedstawiono klasyfikację najczęściej stosowanych technik rozdzielania w analizie specjacyjnej.



Rysunek 5. Klasyfikacja najbardziej popularnych technik rozdzielania analitów w analizie specjacyjnej.

W tabeli 4 przedstawiono informacje o najważniejszych zaletach i wadach technik rozdzielania analitów stosowanych w analityce specjacyjnej związków metaloorganicznych.

Tabela 4. Zalety i wady technik rozdzielania stosowanych w analizie specjacyjnej związków metaloorganicznych

<b>Techniki rozdzielania</b>	<b>Zalety</b>	<b>Wady</b>	<b>Literatura</b>
Chromatografia gazowa	<ul style="list-style-type: none"> <li>- łatwość łączenia z różnymi detektorami,</li> <li>- wysokie własności rozdzielcze</li> <li>- możliwość osiągnięcia bardzo niskich granic wykrywalności</li> <li>- etap derywatywacji umożliwia stosowanie tej techniki do rozdzielania szerokiej gamy związków</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- konieczność stosowania derywatywacji analitów, co wydłuża etap przygotowania próbki i zwiększa ryzyko strat analitów</li> </ul>	[139, 151]
Chromatografia cieczowa	<ul style="list-style-type: none"> <li>- przydatna do rozdzielania związków, które charakteryzują się wysoką temperaturą wrzenia i nie mogą być przekształcone w lotne pochodne</li> <li>- szeroki wybór różnych rodzajów chromatografii cieczowej czyni ją techniką bardzo wszechstronną, która umożliwia rozdzielanie słabo lotnych związków o małej jak i dużej masie cząsteczkowej</li> <li>- osiągnięcie lepszej rozdzielczości pików można osiągnąć zarówno poprzez dobór odpowiedniej fazy stacjonarnej jak i modyfikacje fazy ruchomej</li> <li>- brak konieczności przeprowadzania derywatywacji przed etapem rozdzielania analitów</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- wysokie wartości granicy wykrywalności</li> <li>- wysokie koszty aparatury i problemy związane z łączeniem tej techniki z detektorami</li> </ul>	[98, 136, 139, 142, 152-156]
Elektrochromatografia	<ul style="list-style-type: none"> <li>- własności rozdzielcze zbliżone do chromatografii gazowej</li> <li>- szybkość przebiegu analizy</li> <li>- możliwość jednoczesnego oznaczania analitów występujących na różnych stopniach utlenienia</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- w celu osiągnięcia niskiej granicy oznaczalności konieczne jest użycie wysokoczułego detektora (np. ICP-MS lub MS-MS) ze względu na bardzo małą objętość próbki jaką można analizować</li> <li>- trudności w uzyskaniu dobrej powtarzalności</li> </ul>	[157, 158]

#### 6.4. Techniki oznaczeń końcowych

Wybór techniki detekcji analitów zależy od formy chemicznej w jakiej dany analit występuje oraz od zastosowanej techniki rozdzielania. Przez bardzo długi okres czasu najchętniej stosowanymi, ze względu na wysoką selektywność i czułość, były techniki



spektroskopii atomowej. Trzy rodzaje spektroskopii – absorpcji atomowej, emisyjnej i fluorescencyjnej – były z powodzeniem stosowane jako selektywne detektory w połączeniu z GC lub LC do specjacji związków metaloorganicznych [136].

Modyfikacje już znanych technik oraz nowe rozwiązania konstrukcyjne w zakresie technik spektroskopowych sprawiły ogromny wzrost zainteresowania w stosunku do spektrometrii mas z plazmą wzbudzaną indukcyjnie (ICP-MS) lub atomowej spektrometrii emisyjnej z indukcyjnie ogniskowaną plazmą (ICP-AES). Są to techniki uniwersalne, charakteryzujące się wysoką czułością i selektywnością, stosowane zarówno w analizie specjacyjnej organicznych związków metali oraz przy oznaczaniu całkowitej ich zawartości. Dodatkową zaletę stanowi możliwość jednoczesnego oznaczania wielu pierwiastków. Łatwo można dotrzeć do informacji literaturowych na temat ICP-MS ze względu na większą czułość niż ICP-AES [141]. Wśród literatury naukowej można znaleźć doniesienia na temat opracowania techniki łączenia tego sposobu detekcji z większością stosowanych technik rozdzielania (GC-ICP-MS, LC-ICP-MS, CE-ICP-MS) [159-161]. W połączeniu z chromatografią gazową swoje zastosowanie znalazł również detektor emisji atomowej z mikrofalowo wzbudzaną plazmą (MIP-AED) [162].

Oprócz wymienionych wyżej istnieje również wiele innych technik stosowanych do oznaczania różnych pochodnych metaloorganicznych. Zaliczyć tu można spektrometry mas z różnymi sposobami jonizacji: jonizacja strumieniem elektronów (ESI), MALDI, APCI i APPI. Najbardziej popularną techniką z tej grupy jest ESI, która należy do tzw. łagodnych technik jonizacji, generującej jony bez znaczącej fragmentacji. Jest źródłem dokładnej informacji na temat masy i struktury cząsteczek występujących w próbce na bardzo niskim poziomie stężeń, przez co jest techniką, która jest powszechnie stosowana w laboratoriach analitycznych.

Istnieją również specyficzne detektory o dużej czułości, które są stosowane do oznaczania konkretnych związków, jak na przykład detektor fluorescencji atomowej stosowany w specjacji związków rtęci czy też płomieniowo-fotometryczny używany do oznaczania pochodnych cynoorganicznych [163, 164].

W tabeli 5 przedstawiono informacje o technikach łączonych wykorzystywanych w analizie specjacyjnej metylortęci i tributyllocyny w próbkach biologicznych z uzyskanymi dla tych połączeń wartościami granic wykrywalności.

Tabela 5. Informacje o technikach łączonych stosowanych w analizie specjacyjnej pochodnych rtęcio- i cynoorganicznych w próbkach biologicznych

Rodzaj próbki	Technika rozdzielania	Technika detekcji	Granica wykrywalności	Literatura
Tkanka ryby	GC	ECD	7 ng/g (dla MeHg)	[128]
Zooplankton	GC	AFS	2,12 ng/g (dla MeHg)	[165]
Owoce morza	GC	ICP MS	0,5 pg (dla MeHg) 1,0 pg ( dla EtHg)	[166]
Tkanki ptaków	HPLC	CVAFS	0,2 ng/g (dla MeHg, 0,06 ng/g (dla PhHg) 0,12 ng/g (dla EtHg)	[163]
Tkanka ryby	HPLC	ICP-MS	0,025 µg/g (dla MeHg)	[167]
Tkanka ryby	GC	MS	0,037 µg/g (dla MeHg)	[168]
Skorupiaki	GC	ICP-MS	0,7 ng/g (dla MBT), 1,2 ng/g (dla DBT) 1,3 ng/g (dla TBT)	[169]
Tkanka ryby	GC	FPD	2 ng/g (dla TBT) 2 ng/g (dla DBT) 5 ng/g (dla MBT)	[104]
Małże	GC	ICP-MS	0,19 ng (Sn)/g (dla TBT) 0,1 ng (Sn)/g (dla DBT) 0,26 ng (Sn)/g (dla MBT)	[132]
Wątroba morswina	GC	FPD	6,2 ng (Sn)/g (dla TBT) 7 ng (Sn)/g (dla DBT) 10 ng (Sn)/g (dla MBT)	[164]

## II. CEL I ZAKRES PRACY

Stan środowiska morskiego w skali globalnej jak i stan poszczególnych ekosystemów morskich jest zagrożony przez emisję szerokiego spektrum substancji organicznych i metali. Pomimo podjętych szeregu przedsięwzięć zarówno organizacyjnych jak i technologicznych w celu ograniczenia ilości ksenobiotyków wprowadzanych do środowiska, problem ten jest nadal aktualny ze względu na dużą trwałość niektórych zanieczyszczeń lub produktów ich degradacji. W związku z dążeniem do coraz dokładniejszego poznania stanu poszczególnych elementów środowiska i ekosystemów niezbędne wydaje się prowadzenie prac badawczych ukierunkowanych m.in. na:

- opracowanie nowych procedur analitycznych stanowiących narzędzia do uzyskiwania miarodajnych informacji o stanie poszczególnych części środowiska i ekosystemów oraz procesów w nim zachodzących,

- poszukiwania organizmów biowskaźnikowych, które można by wykorzystać do oceny stopnia antropopresji danego ekosystemu poprzez analizę próbek tkanek i narządów tych organizmów pod kątem obecności różnych ksenobiotyków.

Foki szare jako ostatnie ogniwo łańcucha pokarmowego w Morzu Bałtyckim, a także ze względu na długi okres życia i długi biologiczny okres półtrwania zanieczyszczeń są podatne na akumulowanie w swoich tkankach znacznych ilości różnorodnych ksenobiotyków, przez co podjęto próbę określenia ich zdolności biowskaźnikowych do oceny stopnia zanieczyszczenia Morza Bałtyckiego. W tym celu badania zostały ukierunkowane na oznaczenie zawartości:

- metali ciężkich i innych pierwiastków w próbkach wątroby fok szarych pobranych od osobników, które zostały uśmiercone jako przyłów, martwe wyrzucone na brzeg lub odstrzelone,
- stałych izotopów węgla i azotu w celu oceny składu diety pokarmowej fok szarych.

Ze względu na dużą toksyczność organicznych związków rtęci i cyny istnieje potrzeba ich monitorowania w różnych składnikach ekosystemów morskich. Wymaga to opracowania nowej procedury, która umożliwi jednoczesne oznaczanie metylortęci i wybranych związków z grupy cynoorganicznych w próbkach o skomplikowanym składzie matrycy, jak np. tkanka wątroby. Głównym celem tej części badań była próba opracowania:

- optymalnych warunków przygotowania próbek wątroby,
- optymalnych warunków oznaczeń końcowych z wykorzystaniem techniki GC-MS oraz
- określenie podstawowych parametrów walidacyjnych procedur analitycznych.

Zastosowanie zaawansowanych technik chemometrycznych i sztucznej inteligencji do obróbki wieloparametrowych zbiorów danych pomiarowych umożliwi zbadanie potencjalnych zależności występujących między zmiennymi. Oceniony zostanie wpływ obszaru bytowania, składu diety czy też wieku danego osobnika na poziom zanieczyszczeń obecnych w badanym organizmie.

---

## III. CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

---

### 1. Aparatura i odczynniki

#### 1.1. Oznaczanie zawartości pierwiastków śladowych w próbkach wątroby foczej

##### 1.1.1. Odczynniki i wzorce

- kwas azotowy (Suprapur), 65 % – firma *Merck* (Niemcy)
- L-cysteina, 98 % – firma *NacalaiTesque, Inc.* (Japonia)
- dodatek B – firma *WakoPureChemicalIndustries, Ltd.* (Japonia)
- dodatek M – firma *POCH* (Polska)
- roztwór buforowy, pH = 7,00 ± 0,05 – firma *POCH* (Polska)
- wzorce:
  - MSHG o stężeniu 100 µg/g w HCl dla Hg – firma *InorganicVentures, Inc.* (USA)
  - roztwór wzorca wielopierwiastkowego do ICP-MS o stężeniu 1000 mg/cm<sup>3</sup> (w rozcieńczonym kwasie azotowym) – firma *Merck* (Niemcy)
- certyfikowane materiały odniesienia:
  - NIST 1577b: całkowita zawartość pierwiastków w wątrobie bydłej – firma *NIST* (Gaithersburg, MD, USA)
  - BCR-463: rtęć całkowita i metylortęć w tuńczyku – firma *IRMM*, (Geel, Belgia)
  - ERM-CE278: całkowita zawartość pierwiastków w tkankach małży – firma *IRMM*, (Geel, Belgia)
  - DORM-2: rtęć całkowita i metylortęć w tkance ryby – firma *NRCC* (Kanada)

##### 1.1.2. Sprzęt laboratoryjny i aparatura

- moździerz agatowy – firma *C. Giese KG.* (Niemcy)
- kolbki o obj. 25 cm<sup>3</sup> – firma *Brand* (Niemcy)
- pipety automatyczne (poj. 20-200 µL i 100-1000 µL) – firma *Brand* (Niemcy)

- łądeczki porcelanowe – firma *Nippon Instruments Corporation* (Japonia)
- waga elektroniczna – firma *Sartorius* (Niemcy)
- dejonizator wody Millipore – firma *Milli-Q Water Purification System* (USA)
- liofilizator, pojemność 6 L – firma *LABCONCO* (USA)
- mineralizator mikrofalowy – firma *Milestone Ultra Clave, EMLS* (Leutkirch, Niemcy)
- piec do wyprężania łądek ceramicznych – firma *Heraeus* (Niemcy)
- analizator rtęci MA – 2000 – firma *Nippon Instruments Corporation* (Japonia)
- spektrometr mas z jonizacją w plazmie indukcyjnie sprzężonej (ICP-MS), model Finnigan Element 2 – firma *ThermoScientific* (Bremen, Niemcy)

## **1.2. Oznaczanie stałych izotopów węgla i azotu w próbkach wątroby foczej**

### **1.2.1. Odczynniki i wzorce**

- chloroform (cz.d.a.) – firma *Merck* (Niemcy)
- metanol (cz.d.a.) – firma *Merck* (Niemcy)
- kwas solny (cz.d.a.) – firma *Merck* (Niemcy)
- nadchloran magnezu (do analizy elementarnej) – firma *Merck* (Niemcy)
- wzorce i materiały odniesienia:
  - laboratoryjny materiał odniesienia do wewnętrznej kontroli (pstrąg) – przygotowany w Institute of Energy Technology, Norwegia
  - USGS-24 (grafit) – firma *IAEA* (Austria)
  - V-PDB (pierwotny materiał odniesienia - wzorzec stały (węglan) dla węgla i tlenu) – firma *IAEA* (Austria)
  - IAEA-N-1 i IAEA-N-2 (siarczan amonu) – firma *IAEA* (Austria)

### **1.2.2. Sprzęt laboratoryjny i aparatura**

- młyn kulowy MM 400 - firma *Retsch* (Haan, Niemcy)
- wirówka 5702 – firma *Eppendorf* (Niemcy)
- kapsułki cynowe (8x5 mm) do wprowadzania próbki – firma *Eurovector* (Włochy)
- analizator elementarny – firma *Eurovector* (Włochy)

- spektrometr mas do określania składu izotopowego – firma *Nu Instruments Horizon* (Wielka Brytania)

### **1.3. Oznaczanie metylortęci i tributyllocyny w próbkach wątroby foczej**

#### **1.3.1. Odczynniki i wzorce**

- wodorotlenek potasu, tabletki (cz.d.a.) – firma *Merck* (Niemcy)
- wodorotlenek sodu, tabletki (cz.d.a.) – firma *Sigma-Aldrich* (Niemcy)
- kwas octowy (cz.d.a.) – firma *POCH* (Polska)
- bezwodny octan sodu – firma P.P.H. Stanlab (Polska)
- bezwodny siarczan sodu – firma Eurochem BGD (Polska)
- n-heksan LiChrosolv® – firma *Merck* (Niemcy)
- metanol LiChrosolv® – firma *Merck* (Niemcy)
- tetraetyloboran sodu (97 %) – firma *Sigma-Aldrich* (Niemcy)
- tetrafenyloboran sodu ( $\geq 99,5$  %) – firma *Sigma-Aldrich* (Niemcy)
- tlenek glinu (70-230 mesh ATM) – firma *Merck* (Niemcy)
- silanizowana wata szklana – firma *AlltechAssociates*(UK)
- wzorce:
  - chlorek metylortęci (II) – firma *Sigma-Aldrich* (Niemcy)
  - chlorek tributyllocyny – firma *Merck* (Niemcy)
  - dichlorekdibutyllocyny – firma *Merck* (Niemcy)
  - trichlorekmonobutyllocyny – firma *Sigma-Aldrich* (Niemcy)
  - chlorek tripropyllocyny – firma *Merck* (Niemcy)
- certyfikowane materiały odniesienia:
  - DORM-2: rtęć całkowita i metylortęć w tkance ryby – firma *NRCC* (Kanada)
  - BCR – 463: rtęć całkowita i metylortęć w tuńczyku – firma *IRMM*, (Geel, Belgia)
  - ERM – CE477: mono-, di-, tributyllocyna w tkance małży – firma *IRMM*, (Geel, Belgia)

#### **1.3.2. Sprzęt laboratoryjny i aparatura**

- próbówki szklane – firma *Cole – Parmer* (USA)
- szklane pipety Pasteura – firma *Brand* (Niemcy)

- kolby miarowe, poj. 25 cm<sup>3</sup>, 50 cm<sup>3</sup> – firma *Brand* (Niemcy)
- fiolki do automatycznego podajnika próbek, o objętości 1,5 cm<sup>3</sup>, z membranami uszczelniającymi wykonanymi z politetrafluoroetyleny (PTFE) oraz nakrętkami z tworzywa sztucznego – firma *Agilent* (USA)
- pipeta automatyczna (10, 100, 1000, 2500 µl) - firma *Eppendorf* (Niemcy)
- pipeta elektroniczna Handy Step - firma *Brand* (Niemcy)
- wytrząsarka laboratoryjna Promax 2020 – firma *Heidolph* (Niemcy)
- wirówka 5702 – firma *Eppendorf* (Niemcy)
- pH-metr CI-316– firma *Elmetron*(Polska)
- urządzenie z łaźnią wodną do odparowania próbek w strumieniu azotu TurboVap LV - firma *Caliper Life Sciences*(USA)
- łaźnia ultradźwiękowa – firma *BandelinSonorex*(Niemcy)
- waga analityczna XP50H – firma *Mettler Toledo* (Szwajcaria)
- chromatograf gazowy *Agilent Technologies 7890A* sprzężony ze spektrometrem mas *Agilent Technologies 5975C* pracujący w trybie SIM (monitorowanie wybranych jonów)

## 2. Charakterystyka analizowanych próbek

Jako materiał badawczy wykorzystano próbki tkanek (wątroby) pochodzących od fok szarych (*Halichoerus grypus*) należących do populacji tych gatunków zamieszkujących Morze Bałtyckie. Na rysunku 6 przedstawiono obszary stanowiące środowisko bytowania padłych fok, z których pobrano próbki do badań. Próbki wątroby fok zostały dostarczone ze Środowiskowego Banku Gatunków znajdującego się przy Muzeum Historii Naturalnej w Sztokholmie. W placówce tej znajduje się między innymi ogromny zbiór tkanek i narządów fok z obszaru Morza Bałtyckiego, które dostarczane są przez pracowników straży przybrzeżnej, rybaków, myśliwych i innych. Ponadto część próbek została przekazana przez Stację Morską Instytutu Oceanografii Uniwersytetu Gdańskiego w Helu. Próbki zostały pobrane w latach 2006-2010 od 76 fok uśmierconych w wyniku przyłowy (przypadkowe złowienie w sieci organizmu, który nie był zamierzonym celem połowu), martwych wyrzuconych na brzeg lub też fok odstrzelonych.



Rysunek 6. Obszary Morza Bałtyckiego w obrębie których znajdowano martwe osobniki fok szarych.

### 3. Procedury analityczne

#### 3.1. Oznaczanie zawartości pierwiastków śladowych w próbkach wątroby fok

W oparciu o informacje zawarte w dostępnych źródłach literaturowych dotyczących oznaczania pierwiastków w próbkach biologicznych do badań wybrano technikę spektrometrii mas z jonizacją w plazmie sprzężonej indukcyjnie (ICP-MS). Jest to nowoczesna technika analityczna, która umożliwia wielopierwiastkową analizę próbek roztworów i oznaczenie analitów występujących w tych próbkach na poziomie nawet subnanogramowych. Ta technika pomiarowa charakteryzuje się takimi zaletami jak:



- łatwym sposobem wprowadzania próbki do przyrządu kontrolno-pomiarowego,
- krótszym czasem analizy próbek (urządzenie ICP),
- dużą dokładnością pomiaru i niską wartością liczbową granicy wykrywalności [170].

W przypadku oznaczania zawartości rtęci całkowitej w próbkach biologicznych zastosowano technikę atomowej spektrometrii absorpcyjnej z generowaniem zimnych par, ponieważ charakteryzuje się ona:

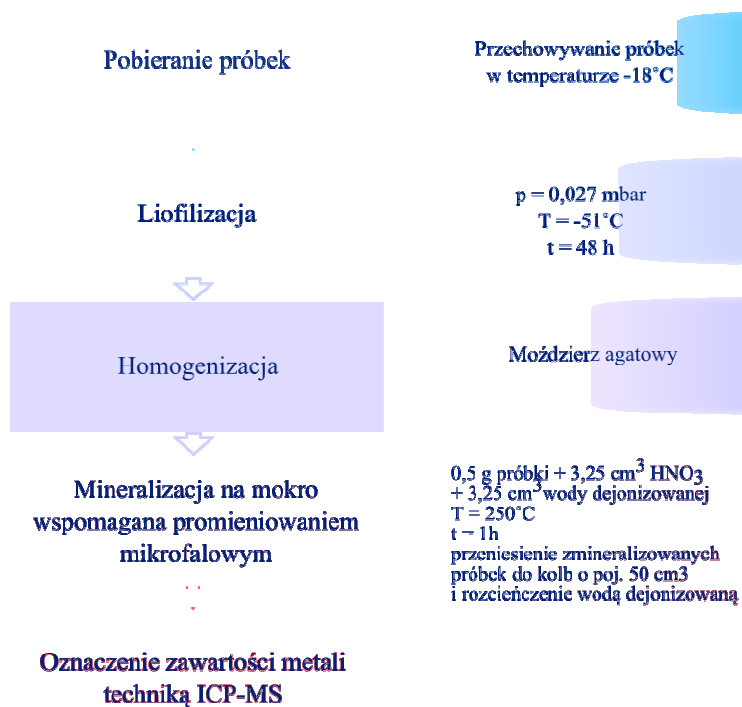
- wysoką selektywnością (pomiar prowadzony jest przy długości fali charakterystycznej dla rtęci – 253,7 nm; uwolniona z próbki rtęć ulega wzbogaceniu na złożu ze złotem – tworzy się amalgamat – reakcja selektywna dla rtęci),
- niskimi wartościami liczbowymi granicy wykrywalności (z wykorzystaniem techniki CV-AAS uzyskano niższą wartość LOD niż w przypadku techniki ICP-MS, odpowiednio 0,2 ng/g i 48 ng/g),
- dużą powtarzalnością i dokładnością pomiaru,
- możliwością automatyzacji.

### **3.1.1. Procedura oznaczania zawartości pozostałych pierwiastków śladowych w próbkach wątroby fok z wykorzystaniem techniki ICP-MS**

Oznaczenia pierwiastków w próbkach wątroby zostały przeprowadzone we współpracy z zespołem pracowników z Wydziału Biologii Norweskiego Uniwersytetu Nauki i Technologii w Trondheim w Norwegii.

Etap przygotowania próbek, przed przystąpieniem do oznaczeń końcowych z wykorzystaniem techniki ICP-MS, obejmował liofilizację, homogenizację i mineralizację tkanek. Schemat całej procedury zastosowanej do oznaczania metali w próbkach biologicznych został przedstawiony na rysunku 7.

Kalibrację przyrządu pomiarowego wykonano stosując metodę wzorca zewnętrznego z wykorzystaniem wielopierwiastkowych roztworów wzorcowych przygotowanych w roztworze wodnym  $\text{HNO}_3$  ( $0,6 \text{ mol/dm}^3$ ). Krzywą kalibracyjną sporządzono w oparciu o wyniki oznaczeń zawartości analitów w 5 próbkach roztworów wzorcowych. W celu sprawdzenia stabilności pracy układu, co dziesiątą analizowaną próbkę, dozowano jeden z wielopierwiastkowych roztworów wzorcowych.



Rysunek 7. Schemat procedury oznaczania metali w próbkach biologicznych.

W celu oceny poprawności stosowanej procedury przeprowadzono analizę próbek certyfikowanego materiału odniesienia (NIST 1577b - wątroba bydłęca). Próbki tego materiału poddano analizie z wykorzystaniem tej samej procedury jak w przypadku próbek rzeczywistych. W tabeli 6 zestawiono wartości certyfikowane jak i wyniki uzyskane w trakcie badań analitycznych.

Tabela 6. Wyniki oznaczeń zawartości pierwiastków w próbkach certyfikowanego materiału odniesienia

Pierwiastek	Wartość oznaczona	S	Wartość certyfikowana	Niepewność	Odzysk
$\mu\text{g/g}$					%
Glin	0,862	0,308	1 <sup>a</sup>	-	86
Antymon	0,002740	0,000307	0,003 <sup>a</sup>	-	91
Arsen	0,04350	0,00187	0,05 <sup>a</sup>	-	87
Kadm (111) <sup>b</sup>	0,483	0,00539	0,5	0,03	97
Kadm (114)	0,471	0,00328	0,5	0,03	94
Wapń	109	1,78	116	4	94
Kobalt	0,228	0,00716	0,25 <sup>a</sup>	-	91
Miedź	149	1,30	160	8	93
Żelazo	176	3,77	184	15	96
Ołów	0,112	0,00105	0,129	0,004	87
Magnez	605	17,5	601	28	101
Mangan	10	0,110	10,5	1,7	96
Rtęć	0,00316	0,00199	0,003 <sup>a</sup>	-	105

Tabela 6. – c.d.

Molibden	3,51	0,0623	3,5 <sup>a</sup>	-	100
Fosfor	9810	90,4	11000	300	89
Potas	7355	441	9940	20	74
Rubid	12,7	0,0636	13,7	1,1	93
Selen (78)	0,689	0,0445	0,73	0,06	94
Srebro	0,0423	0,00313	0,039	0,007	108
Sód	2340	67,7	2420	60	97
Stront	0,132	0,00214	0,136	0,001	97
Siarka	7700	117	7850	60	98
Wanad	0,104	0,00517	0,123 <sup>a</sup>	-	85
Cynk	123	0,483	127	16	97

<sup>a</sup> wartość niecertyfikowana

<sup>b</sup> wartość w nawiasie oznacza odmianę izotopową

Granica wykrywalności została oszacowana jako trzykrotna wartość odchylenia standardowego dla ślepej próby, natomiast granica oznaczalności została wyznaczona jako trzykrotność wartości granicy wykrywalności. W tabeli 7 przedstawiono wartości liczbowe granicy wykrywalności dla procedury obliczone na podstawie wyników pomiarów analitycznych.

### **3.1.2. Procedura oznaczania zawartości rtęci w próbkach wątroby fok z wykorzystaniem techniki CV-AAS**

Całkowita zawartość rtęci w badanych próbkach została oznaczona z wykorzystaniem atomowej spektrometrii absorpcyjnej w połączeniu z techniką zimnych par (CV-AAS). W pomiarach wykorzystano automatyczny analizator rtęci MA-2 firmy NIC (Japonia).

Pomiar absorpcji promieniowania odbywa się przy długości fali 253,7 nm. Analizator ten działa w oparciu o technikę zimnych par (wysoko selektywną w przypadku oznaczania rtęci). Niewątpliwą zaletą zastosowania tego typu analizatora jest brak konieczności wieloetapowego przygotowania próbki, co znacznie zmniejsza ryzyko strat analitów oraz skraca całkowity czas analizy. Przed przystąpieniem do pomiaru wymagana jest jedynie liofilizacja oraz homogenizacja próbki. Próbka ulega rozkładowi po wprowadzeniu do analizatora, a wydzielona rtęć elementarna (po ewentualnej redukcji kationów rtęci) po przejściu przez system płuczek zostaje wzbogacona na złożu adsorpcyjnym (pokrytym złotem), po czym w wyniku ogrzania złoża następuje jej uwolnienie i przeniesienie do kuwety pomiarowej, gdzie następuje pomiar absorbancji. Kalibrację analizatora rtęci, podobnie jak w przypadku układu ICP-MS, przeprowadzono stosując metodę krzywej kalibracyjnej. Spośród

dostępnych metod przygotowania roztworów wzorcowych producent urządzenia MA-2000 zaleca stosowanie L-cysteiny.

Tabela 7. Wartości liczbowe granicy wykrywalności dla poszczególnych pierwiastków dla procedury ich oznaczania w próbkach biologicznych

Pierwiastek	Granica wykrywalności	Pierwiastek	Granica wykrywalności
	µg/g		µg/g
<b>Ag</b>	0,0028	<b>Mo</b>	0,0028
<b>Al</b>	0,028	<b>Na</b>	1,5
<b>As</b>	0,0035	<b>Nb</b>	0,00030
<b>Au</b>	0,00010	<b>Nd</b>	0,0012
<b>B</b>	0,011	<b>Ni</b>	0,0070
<b>Ba</b>	0,0026	<b>Pb</b>	0,00055
<b>Be</b>	0,00070	<b>Pd</b>	0,0070
<b>Bi</b>	0,00015	<b>Pt</b>	0,00070
<b>Ca</b>	1,4	<b>Pr</b>	0,000042
<b>Cd</b>	0,00030	<b>Rb</b>	0,0018
<b>Ce</b>	0,000030	<b>Sb</b>	0,00043
<b>Co</b>	0,0010	<b>Sc</b>	0,00060
<b>Cr</b>	0,0016	<b>Se</b>	0,011
<b>Cs</b>	0,00028	<b>Si</b>	0,60
<b>Cu</b>	0,0091	<b>Sm</b>	0,000075
<b>Dy</b>	0,00030	<b>Sn</b>	0,00015
<b>Er</b>	0,000045	<b>Sr</b>	0,0038
<b>Eu</b>	0,00028	<b>Ta</b>	0,000040
<b>Fe</b>	1,9	<b>Tb</b>	0,000028
<b>Ga</b>	0,00098	<b>Th</b>	0,000075
<b>Ge</b>	0,0030	<b>Ti</b>	0,0081
<b>Hf</b>	0,00040	<b>Tl</b>	0,000060
<b>Hg</b>	0,048	<b>Tm</b>	0,000080
<b>Ho</b>	0,000020	<b>U</b>	0,000035
<b>K</b>	0,75	<b>V</b>	0,00045
<b>La</b>	0,00028	<b>W</b>	0,00015
<b>Li</b>	0,0045	<b>Y</b>	0,000056
<b>Lu</b>	0,000028	<b>Yb</b>	0,000056
<b>Mg</b>	0,053	<b>Zn</b>	0,0059
<b>Mn</b>	0,00090	<b>Zr</b>	0,0040

Przy takim przygotowaniu roztworów należy pamiętać o zachowaniu ich trwałości, która zmniejsza się z upływem czasu (roztwory o zawartości rtęci 100 µg/g powinny zostać przygotowane ponownie po upływie roku natomiast o zawartości rtęci 10 µg/g i mniejszej po sześciu miesiącach) oraz w przypadku przechowywania

w nieodpowiednich warunkach (należy przechowywać roztwory w chłodnym i ciemnym miejscu).

Roztwory wzorcowe o stężeniu 0,1 µg/g, 1,0 µg/g oraz 10 µg/g, zostały przygotowane przez na drodze kolejnych rozcieńczeń roztworu wzorcowego o stężeniu rtęci 100 µg/g w wodnym roztworze L-Cysteiny.

Poprawność stosowanej procedury została oceniona na podstawie wyników analizy próbek certyfikowanych materiałów odniesienia: BCR-463 (tuńczyk), ERM-CE278 (tkanka małży), DORM-2 (tkanka ryby). Informacje o stężeniach analitów obliczone na podstawie wyników pomiarów wraz z odpowiednimi wartościami certyfikowanymi zestawiono w tabeli 8.

Tabela 8. Wyniki oznaczeń zawartości pierwiastków w próbkach certyfikowanego materiału odniesienia

<b>Materiał odniesienia</b>	<b>Wartość oznaczona</b>	<b>Niepewność</b>	<b>Wartość certyfikowana</b>	<b>Niepewność</b>	<b>Odzysk</b>
µg/g					%
BCR-463	2,77	0,23	2,85	0,16	97,1
ERM-CE278	0,194	0,010	0,196	0,009	99
DORM-2	4,72	0,27	4,64	0,26	101,8

### 3.2. Oznaczanie zawartości stałych izotopów węgla i azotu w próbkach wątroby fok

Oznaczenie zawartości stałych izotopów węgla i azotu w próbkach wątroby zostało przeprowadzone we współpracy z zespołem z *Institute of Energy Technology (IFE)* w Kjeller w Norwegii.

Organizmy morskie posiadają zwykle znaczne ilości tłuszczów, których zawartość może się różnić w zależności od składu diety, sposobu życia, pory roku czy stopnia rozwoju danego osobnika. Ze względu na stosunkowo wysoki stopień przemian tłuszczowe charakteryzują się mniejszą zawartością izotopu <sup>13</sup>C w porównaniu do białek i węglowodanów. Tkanki biologiczne różnią się między sobą zawartością tłuszczów, co sprawia że tkanki bogate w tłuszcze (np. wątroba, mięśnie) są bardziej zubożone w izotop <sup>13</sup>C w porównaniu do tkanek charakteryzujących się niską ich zawartością (np. włosy lub paznokcie) [171]. W celu zminimalizowania różnic w zawartości stałych izotopów węgla wynikających z różnej zawartości tłuszczów w tkankach, przeprowadza się zwykle ekstrakcję tłuszczów przed przystąpieniem do oznaczenia zawartości stałych izotopów [172]. Do tego celu wykorzystano modyfikację metody zaproponowanej przez Folcha i współpracowników [173]. Zhomogenizowane próbki wątroby (ok. 100 – 300 mg)

ekstrahowano mieszaniną chloroform:metanol (w stosunku objętościowym 2:1) poprzez wytrząsanie przez 30 s, po czym całą mieszaninę odstawiono na 30 min. Po tym czasie próbkę odwirowywano (przy 1300 rpm) w celu umożliwienia rozdzielenia faz. Zebraną ciecz przenoszono do ściągów, a stałą pozostałość poddawano ponownej ekstrakcji aż do momentu, gdy ciecz powstała w wyniku wirowania była bezbarwna. Po wyekstrahowaniu tłuszczów próbka była suszona przez 24 h w temperaturze 60 °C.

Oczyszczoną z tłuszczów próbkę poddawano analizie na zawartość stałych izotopów węgla i azotu. W tym celu ok. 1 mg próbki odważano w cynowych kapsułkach i wprowadzano do zestawu do analizy elementarnej (Eurovector), gdzie następowało jej spalenie w obecności O<sub>2</sub> i Cr<sub>2</sub>O<sub>3</sub> w temperaturze 1700 °C. Redukcja NO<sub>x</sub> prowadzona była w piecu z katalizatorem z miedzi w temperaturze 650 °C. Przed rozdzieleniem N<sub>2</sub> i CO<sub>2</sub> w układzie GC (z wykorzystaniem kolumny z wypełnieniem typu Poraplot) z próbki została usunięta woda – adsorpcja na złożu Mg(ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>. Następnie, poprzez automatyczny system wprowadzania próbek w postaci gazowej, N<sub>2</sub> i CO<sub>2</sub> były wprowadzane do analizatora mas do określania składu izotopowego w celu oznaczenia δ<sup>13</sup>C i δ<sup>15</sup>N.

Skład izotopowy wyrażany w postaci wartości liczbowej parametru delta (δ) oblicza się korzystając z następującej zależności:

$$\delta X = \left[ \left( \frac{R_{\text{próbka}}}{R_{\text{wzorzec}}} \right) - 1 \right] \cdot 1000 \text{ [‰]} \quad (1)$$

gdzie:

- X - <sup>13</sup>C lub <sup>15</sup>N,
- R<sub>próbka</sub> - stosunek intensywności izotopów węgla (<sup>13</sup>C/<sup>12</sup>C) lub azotu (<sup>15</sup>N/<sup>14</sup>N) w próbce,
- R<sub>wzorzec</sub> - stosunek intensywności izotopów węgla (<sup>13</sup>C/<sup>12</sup>C) lub azotu (<sup>15</sup>N/<sup>14</sup>N) we wzorcu.

Wzorcami użytymi do wyznaczenia wartości liczbowej parametru R<sub>wzorzec</sub> były:

- USGS-24 dla <sup>13</sup>C, kalibrowany wobec Peedeebelemnite (PDB),
- IAEA-N-1 i IAEA-N-2 dla <sup>15</sup>N, kalibrowany wobec azotu atmosferycznego (N<sub>2</sub>).

Poprawność i precyzja stosowanej procedury zostały wyznaczone na podstawie analizy laboratoryjnego materiału odniesienia (tkanka pstrąga) przygotowanego w IFE. Bezwzględny błąd oznaczenia wynosił 0,06 ‰ dla węgla i 0,12 ‰ dla azotu.

#### **4. Wyznaczenie optymalnych parametrów procedury jednoczesnego oznaczania metylortęci i związków z grupy cynoorganicznych (mono-, di-, tributyllocyny) w próbkach wątroby focznej**

Jednym z zadań realizowanych w ramach rozprawy była próba opracowania procedury jednoczesnego oznaczania metylortęci i związków z grupy cynoorganicznych (mono-, di-, tributyllocyny) w próbkach biologicznych.

Zazwyczaj metylortęć i pochodne cynoorganiczne są oznaczane oddzielnie, pomimo faktu, że procedury przygotowania próbek są bardzo podobne. W wielu metodach stosowanych do oznaczania tributyllocyny i jej pochodnych wykorzystywana jest ekstrakcja ciec-z-ciecz oraz derywatywacja za pomocą tetraetyloboranu sodu. Ze względu na to, że stężenie związków cynoorganicznych w próbkach biologicznych jest zazwyczaj bardzo małe, istnieje konieczność wzbogacenia analitów w ekstrakcie (np. poprzez odparowanie próbki) w celu obniżenia wartości granicy wykrywalności. Procesy ekstrakcji i derywatywacji metylortęci mogą być prowadzone w tych samych warunkach, co związków cynoorganicznych, zatem uzasadnione jest opracowanie procedury analitycznej umożliwiającej jednoczesne oznaczenie tych związków. Jednak podczas etapu wzbogacania obserwowane są znaczne straty etylowanej pochodnej MeHg, spowodowane dużą lotnością tego związku. Rozwiązanie dla tego problemu może stanowić nowe podejście metodyczne polegające na zastosowaniu dwuetapowej operacji derywatywacji polegającej na:

- przekształceniu metylortęci w pochodną fenylową (z wykorzystaniem tetrafenyloboranu sodu – NaBPh<sub>4</sub>), a następnie
- przekształceniu związków z grupy cynoorganicznych w pochodne etylowe (z wykorzystaniem tetraetyloboranu sodu – NaBEt<sub>4</sub>).

Lotność fenylovej pochodnej MeHg jest znacznie mniejsza niż etylowej, wobec czego przewiduje się zmniejszenie strat metylortęci w wyniku odparowywania ekstraktu. Zastosowanie tego rozwiązania jest możliwe dzięki temu, że związki cynoorganiczne nie reagują z tetrafenyloboranem sodu.

Analiza danych literaturowych oraz własne doświadczenia uzyskane w trakcie badań prowadzonych w ramach innych projektów stanowiły podstawę do wniosku, że najwłaściwsze będzie zastosowanie techniki chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią mas na etapie identyfikacji i ilościowego oznaczania metylortęci i wybranych związków z grupy cynoorganicznych w badanych próbkach.

Jak już wspomniano wcześniej związki takie jak metylortęć czy tributyllocyna mogą powodować różnego rodzaju zaburzenia zdrowotne, nie tylko u zwierząt ale również u ludzi. Z tego względu konieczne jest opracowywanie procedur analitycznych, dzięki którym będzie możliwe oznaczenie tych ksenobiotyków również w produktach spożywanych przez człowieka. Dlatego też przy wyborze techniki oznaczeń końcowych oraz poszczególnych etapów przygotowania próbki kierowano się możliwością zastosowania opracowanej procedury w rutynowych laboratoriach analitycznych. Szerokie możliwości analityczne jakie daje chromatografia gazowa sprawiły, że układy typu GC-MS są już praktycznie podstawowym wyposażeniem komercyjnych laboratoriów. Idąc tym tropem wybrano również prostą i nie wymagającą skomplikowanej aparatury technikę uwalniania analitów z matrycy, jaką jest ekstrakcja ciecz-ciało stałe wspomagana przez ciągłe wytrząsanie próbki. W przypadku konieczności przeprowadzenia dużej liczby oznaczeń daje ona możliwość jednoczesnego przygotowania większej liczby próbek jednocześnie.

Stosowanie chromatografii gazowej w tego typu badaniach pozwala na rozdzielenie i oznaczenie wielu grup analitów podczas pojedynczej analizy. Dodatkowym atutem jest łatwość łączenia tej techniki z różnymi detektorami, w tym ze spektrometrem mas. Przy wyborze techniki GC do specjacji związków metaloorganicznych należy pamiętać, że niezbędny tu jest etap derywatywacji, który może wydłużyć czas całej procedury i przyczynić się do powstawania straty analitów. Jednak obecnie najczęściej stosowanymi odczynnikami derywatyzującymi są związki z grupy alkiloboranów, przez co etap przekształcania analitów jest mniej pracochłonny, prostszy w wykonaniu, bardziej wydajny, a dzięki temu, że reakcja przebiega w środowisku wodnym istnieje możliwość połączenia procesu derywatywacji i ekstrakcji w jeden etap. Stąd też ważnym etapem opracowywania tego typu procedur jest dobór optymalnych warunków ekstrakcji (czas ekstrakcji, rodzaj ekstrahenta) analitów z matrycy oraz ich derywatywacji, tak aby było możliwe ich oznaczenie jakościowe i ilościowe.

#### **4.1. Przygotowanie roztworów wzorcowych**

Substancje wzorcowe zostały zakupione w następującej postaci: chlorek metylortęci (II) (ciało stałe), trichlorek monobutyllocyny (ciało stałe), dichlorek dibutyllocyny (ciało stałe), chlorek tributyllocyny (ciecz), chlorek tripropyllocyny (ciecz). Odpowiednią ilość wzorca (odmierzoną lub odważoną) umieszczono w kolbach miarowych i rozpuszczono w metanolu uzyskując roztwory podstawowe o stężeniu ok.  $1 \text{ mg/cm}^3$  (przechowywane w temp.  $-18 \text{ }^\circ\text{C}$ ).



Wszystkie stężenia podawane są w przeliczeniu na kation danego związku, który jest wyrażany odpowiednim skrótem (tabela 9).

Tabela 9. Stosowane w pracy skróty nazw i wzorów chemicznych oznaczanych związków

Nazwa związku	Metylortęć	Monobutylocyna	Dibutylocyna	Tributylocyna	Tripropylocyna
Kation	$\text{CH}_3\text{Hg}^+$	$\text{C}_4\text{H}_9\text{Sn}^+$	$(\text{C}_4\text{H}_9)_2\text{Sn}^+$	$(\text{C}_4\text{H}_9)_3\text{Sn}^+$	$(\text{C}_3\text{H}_7)_3\text{Sn}^+$
Skrót	MeHg	MBT	DBT	TBT	TPrT

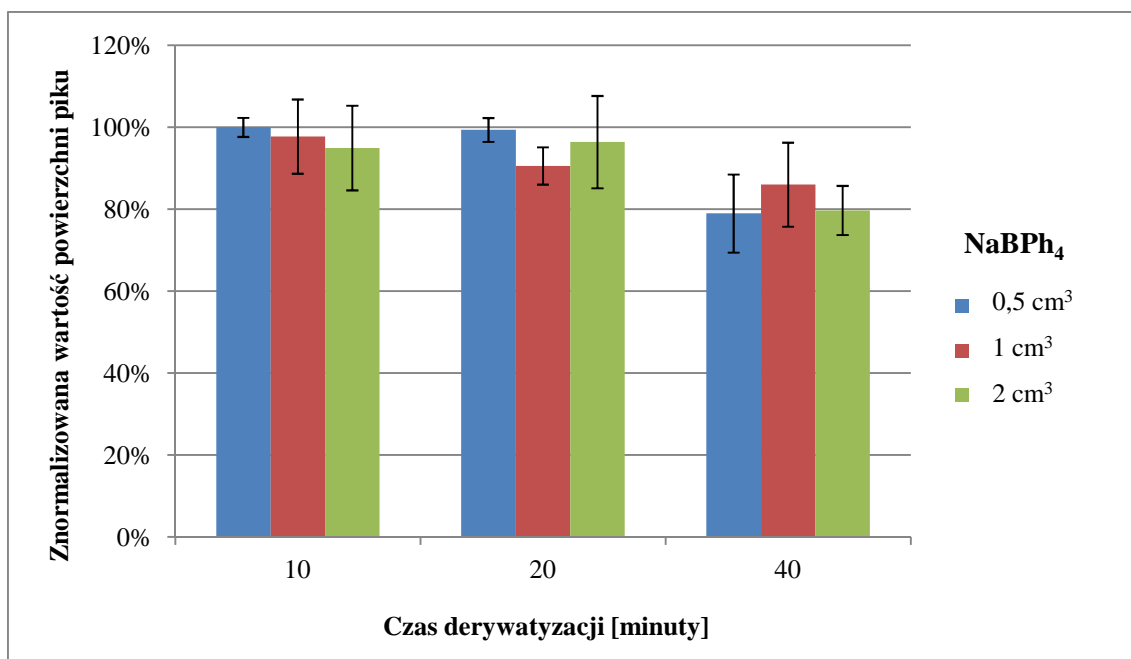
#### 4.2. Dobór optymalnych warunków procesu derywatywacji analitów (na podstawie roztworów wzorcowych)

Etap derywatywacji analitów jest czynnikiem determinującym możliwość oznaczenia badanej grupy związków za pomocą techniki GC-MS, dlatego też badania nad opracowaniem optymalnych warunków procedury analitycznej prowadzącej do jednoczesnego oznaczania metylortęci i związków cynoorganicznych rozpoczęto od sprawdzenia ilości odczynnika derywatyzującego i czasu derywatywacji potrzebnych do ilościowego oznaczenia badanych związków. W pierwszej kolejności sprawdzono warunki procesu derywatywacji metylortęci, a następnie związków cynoorganicznych. W tym celu przygotowano próbki roztworów wzorcowych MeHg i osobno roztworów wzorcowych zawierających mieszaninę MBT, DBT, TBT w buforze octanowym ( $\text{pH}=5$ ,  $c=1 \text{ mol/dm}^3$ ), do których dodawano  $2 \text{ cm}^3$  heksanu oraz odpowiednie ilości odczynników derywatyzujących.

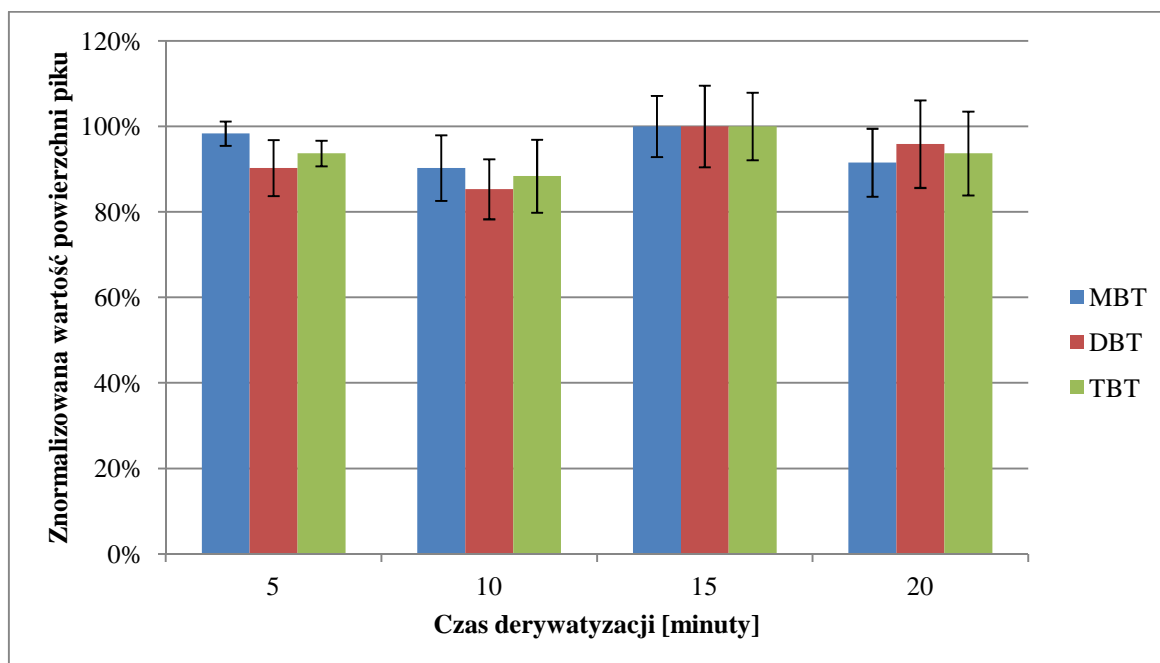
##### *Dobór warunków derywatywacji metylortęci*

Badano wpływ ilości  $\text{NaBPh}_4$  ( $0,5$ ;  $1$ ;  $2 \text{ cm}^3$ ) i czasu trwania procesu derywatywacji ( $10$ ,  $20$ ,  $40$  minut) na jej efektywność. Dla danego czasu reakcji fenylowania sprawdzono różne objętości dodanego odczynnika derywatyzującego (po 3 powtórzenia każdy). W doświadczeniu użyto 1 %-owego wodnego roztworu  $\text{NaBPh}_4$ . Dane dotyczące efektywności ekstrakcji i wpływu na nią innych czynników, podane zostały jako wartości znormalizowane, gdzie jako 100 % przyjęto największą uzyskaną wartość. Otrzymane wyniki przedstawiono w formie wykresu słupkowego na rysunku nr 8. Analizując uzyskane dane można stwierdzić, że najwyższą efektywność derywatywacji badanych analitów w próbkach wzorcowych uzyskano dla  $10$  i  $20$  minut prowadzenia reakcji przy użyciu  $0,5 \text{ cm}^3$   $\text{NaBPh}_4$ . Wydłużanie czasu derywatywacji i zwiększanie ilości dodawanego odczynnika

derywatyzującego nie poprawia jej efektywności. Jednak ze względu na dążenie do skracania etapu przygotowania próbki



Rysunek 8. Wpływ czasu prowadzenia procesu derywatywacji i ilości dodanego odczynnika derywatyzującego na powierzchnię pików chromatograficznych uzyskanych w wyniku analizy roztworów wzorcowych metylortęci z wykorzystaniem techniki GC-MS.



Rysunek 9. Wpływ czasu prowadzenia derywatywacji na powierzchnię pików chromatograficznych uzyskanych w wyniku analizy roztworów wzorcowych związków cynoorganicznych z wykorzystaniem techniki GC-MS.

do dalszych badań wybrano krótszy czas derywatywacji. Wybrane parametry prowadzenia procesu derywatywacji metylortęci zostały zestawione w tabeli 10.

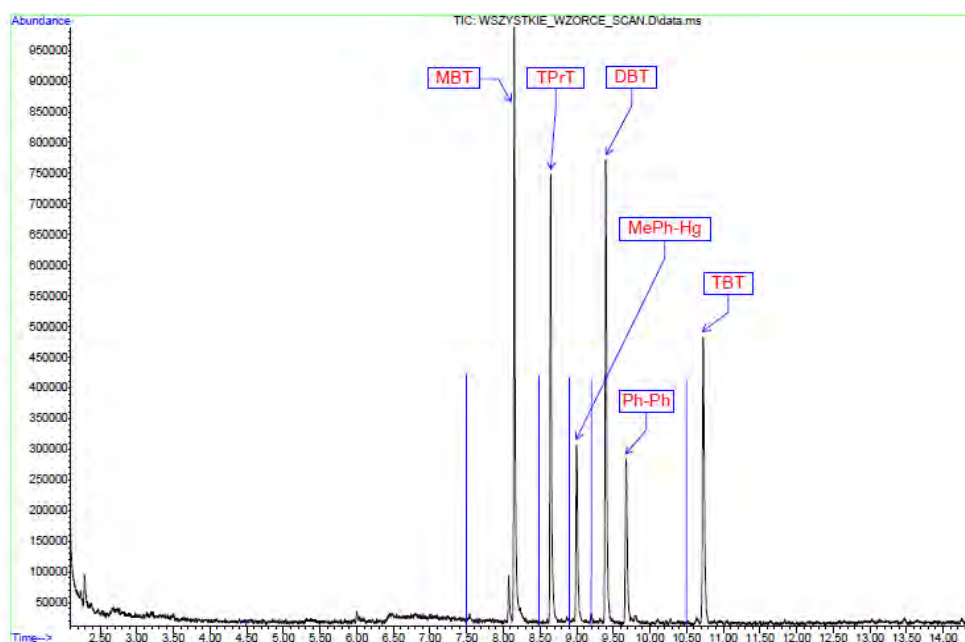
#### *Dobór warunków derywatywacji MBT, DBT i TBT*

W przypadku procedury do oznaczania cynoorganicznych sprawdzono wpływ czasu derywatywacji na jej efektywność przy użyciu 0,5 ml wodnego roztworu NaBEt<sub>4</sub> o stężeniu 1 % (po 3 powtórzenia dla każdej z próbek). Wybrane parametry prowadzenia procesu zestawiono w tabeli 10.

Tabela 10. Parametry prowadzenia procesu derywatywacji

Odczynnik derywatyżujący	Czas derywatywacji	Ilość	Stężenie
	min	cm <sup>3</sup>	%
NaBPh <sub>4</sub>	10	0,5	1
NaBEt <sub>4</sub>	15	0,5	1

W celu potwierdzenia, że derywatywacja metylortęci przebiega ilościowo, przygotowano trzy roztwory wzorcowe zawierające wszystkie anality w buforze octanowym i przeprowadzono dwuetapową derywatyzację według dobranych warunków prowadzenia reakcji. Na chromatogramie uzyskanym w wyniku analizy (rysunek 10) nie stwierdzono obecności pików pochodzących od etylowanej pochodnej MeHg (która mogłaby powstać w drugim etapie derywatywacji), co może świadczyć o całkowitej derywatywacji tego analitu za pomocą tetrafenylboranu sodu.



Rysunek 10. Chromatogram uzyskany w wyniku analizy próbki roztworu wzorcowego zawierającej MeHg i MBT, DBT, TBT, TPt z zastosowaniem dwuetapowej derywatywacji.

### 4.3. Warunki prowadzenia analizy chromatograficznej

Wyniki wcześniejszych badań prowadzonych w Katedrze Chemii Analitycznej Wydziału Chemicznego PG stanowiły podstawę do zaproponowania odpowiednich warunków prowadzenia analizy chromatograficznej. Informacje na temat podstawowych parametrów pracy układu GC-MS wykorzystywanego w badaniach zestawiono w tabeli 11.

Tabela 11. Podstawowe parametry pracy układu GC-MS

System dozowania próbki	<i>Split/Splitless</i> – bez podziału strumienia
Objętość dozowanej próbki	1 µl
Gaz nośny	Hel
Kolumna	<b>ZB – 5MS</b> (30 m; 0,25 mm; 0,25 µm, temp. max. 320/240°C)
Program temperaturowy	40°C przez 4 minuty 40°C do 130°C (20°C/min) 130°C do 210°C (10°C/min) 210°C do 260°C (5°C/min) 260°C do 300°C (10°C/min)
Temperatura złącza	280 °C
Detektor	Agilent5975C inert MSD z jonizacją elektronową pracujący w trybie SIM (monitorowania wybranych jonów)
Temperatura źródła jonizacji	230°C
Temperatura kwadrupola	150°C
Energia strumienia elektronów	70 eV
System integrujący	MSD ChemStation

### 4.4. Identyfikacja i oznaczanie analitów

Identyfikacja analitów została przeprowadzona w oparciu o czasy retencji jonów fragmentacyjnych charakterystycznych dla danego związku. W celu zwiększenia selektywności w trakcie analizy monitorowano po dwa jony fragmentacyjne wybrane z widma masowego uzyskanego dla danego analitu. Jeden z jonów służył do analizy ilościowej, natomiast drugi jon stanowił potwierdzenie, że na chromatogramie widoczny jest szukany związek. W tabeli 12 zestawiono informacje na temat czasów retencji analitów oraz mas jonów fragmentacyjnych powstających w trakcie jonizacji analitów w spektrometrze mas.

W celu przeprowadzenia analizy ilościowej wybrano metodę wzorca wewnętrznego która polega na dodawaniu do analizowanych próbek znanej ilości substancji, która nie występuje naturalnie w próbce, ale właściwościami przypomina anality, jest stabilna termicznie, a czas retencji i odpowiedź detektora również są zbliżone do substancji oznaczanych.

Tabela 12. Masy i czasy retencji monitorowanych jonów fragmentacyjnych analitów z grupy związków cynoorganicznych i metylortęci (jony oznaczone pogrubioną czcionką zostały wybrane do analizy ilościowej)

Analit	Monitorowane jony fragmentacyjne	Czas retencji [min]
MeHg	<b>294</b> , 279	10,39
MBT	<b>179</b> , 235	9,45
TPrT	<b>151</b> , 163	10,05
DBT	<b>179</b> , 263	10,99
TBT	<b>291</b> , 263	12,57

W przypadku związków cynoorganicznych zastosowano tripropylocynę (TPrT) – substancję powszechnie używaną jako wzorzec wewnętrzny w analizie specjacyjnej tych związków [169, 174]. Natomiast jeśli chodzi o oznaczanie metylortęci w próbkach pochodzenia biologicznego, brak komercyjnie dostępnych i przystępnych cenowo związków, które mogłyby pełnić rolę wzorca wewnętrznego stanowi poważne ograniczenie w zastosowaniu tej techniki kalibracji. W literaturze można znaleźć informacje na temat stosowania dipentylortęci jako wzorca wewnętrznego, co jednak wymaga samodzielnej syntezy tego związku [175]. Istnieje również możliwość zastosowania chlorku propylortęci [176], którego wysoka cena czyni tego typu analizę praktycznie nieopłacalną.

Z tego powodu zdecydowano, że do ilościowego oznaczenia metylortęci w próbce zostanie wykorzystana również TPrT. Głównym argumentem przemawiającym za tym podejściem były bardzo zbliżone czasy retencji pochodnych (po derywatywacji) metylortęci i tripropylocyny.

#### 4.5. Kalibracja układu GC-MS oraz wyznaczenie granicy wykrywalności i oznaczalności

Technika chromatografii gazowej jest jedną z technik opartych na pomiarze względnym, czyli takim, w którym porównuje się sygnał detektora uzyskany dla próbki wzorcowej (o znanym stężeniu) i próbki badanej. W tym celu niezbędne jest przeprowadzenie etapu kalibracji dla każdego analitu, z wykorzystaniem wyników analizy roztworów wzorcowych odpowiednich substancji. Najczęściej stosowana techniką kalibracyjną jest technika krzywej wzorcowej.

W przypadku stosowania spektrometrii mas jako techniki detekcji można spodziewać się zmian w czułości detektora w czasie, co może znacząco wpływać na powtarzalność analiz. W celu skompensowania tych zmian zaleca się stosowanie dodatku wzorca wewnętrznego do roztworów wzorcowych niezbędnych do przygotowania krzywych kalibracyjnych oraz

przygotowania próbek do analizy. Zastosowanie wzorca wewnętrznego pozwala nie tylko na przeprowadzenie analizy ilościowej, ale również na zniwelowanie błędów mogących powstać podczas ekstrakcji czy etapu wzbogacania analitów, ponieważ stosunek zawartości analitu do wzorca wewnętrznego powinien być stały. W ten sposób można zminimalizować wpływ składu matrycy próbki rzeczywistej na wynik pomiaru.

Badaniu poddano próbki roztworów wzorcowych w których anality występowały na poziomach stężeń w zakresie od (0,05÷5,0) µg dla MeHg do (0,004÷0,4) µg dla MBT, DBT i TBT. Do każdego roztworu dodano określoną ilość tripropylocyny jako wzorca wewnętrznego, tak aby jej zawartość w roztworze wzorcowym wynosiła 5 µg. Tak przygotowane próbki roztworów wzorcowych zostały poddane derywatywacji, a następnie oznaczeniu w układzie GC-MS. Uzyskane wyniki stanowiły podstawę do wyznaczenia krzywych kalibracyjnych przedstawiających zależność masy analitu w funkcji stosunku powierzchni piku analitu i powierzchni piku wzorca wewnętrznego. Wartości liczbowe parametrów regresyjnych krzywych kalibracyjnych stanowiły podstawę do oszacowania wartości granicy wykrywalności i oznaczalności układu GC-MS. Granica wykrywalności (LOD) definiowana jest jako najmniejsza zawartość analitu jaka może zostać wykryta (bez jej ilościowego oznaczenia) za pomocą danego układu kontrolno-pomiarowego. Natomiast granica oznaczalności (LOQ) oznacza najmniejszą ilość lub najmniejsze stężenie możliwe do ilościowego oznaczenia za pomocą danego układu z założoną dokładnością i precyzją.

Spośród wielu znanych metod szacowania granicy wykrywalności [177] wybrano metodę obliczania LOD na podstawie odchylenia standardowego zbioru sygnałów dla najmniejszej zawartości analitu oraz kąta nachylenia krzywej kalibracyjnej (równanie 2).

$$LOD = \frac{3,3 \cdot s}{a} \quad (2)$$

gdzie:

s – odchylenie standardowe współczynnika odpowiedzi spektrometru mas przy najmniejszym stężeniu danego analitu,

a – współczynnik kierunkowy krzywej kalibracyjnej.

Przy obliczaniu wartości liczbowej granicy oznaczalności (LOQ) wykorzystano zależność, opisywaną za pomocą równania:

$$LOQ = 3 \cdot LOD \quad (3)$$

W celu sprawdzenia poprawności wyznaczonej granicy wykrywalności należy spełnić następujące warunki:

$$LOD < c \quad (4)$$

$$i \cdot 10 \cdot LOD > c \quad (5)$$

gdzie  $c$  – najniższa wartość stężenia (lub zawartości) analitu w próbkach wzorcowych.

W tabeli 13 zestawiono obliczone wartości granicy wykrywalności oraz wyniki weryfikacji poprawności wyznaczenia tej granicy. Na podstawie tych danych można zauważyć, że nie został spełniony warunek (4), czyli zawartość analitów w przygotowanych wzorcach jest za mała. Po odrzuceniu najniższego punktu krzywej kalibracyjnej ponownie obliczono wartości granicy wykrywalności na podstawie krzywej składającej się z 5 punktów pomiarowych i sprawdzono poprawność wyznaczenia tej granicy (tabela 13). Uzyskane wyniki wskazują, że wartość liczbową granicy wykrywalności obliczona na podstawie 5-punktowej krzywej kalibracyjnej została wyznaczona poprawnie.

Tabela 13. Wartości liczbowe granicy wykrywalności oraz wyniki weryfikacji poprawności wyznaczenia tej granicy na podstawie sześć- i pięciopunktowej krzywej kalibracyjnej (*N* oznacza, że dany warunek nie został spełniony, *T* oznacza, że dany warunek został spełniony)

	MeHg	MBT	DBT	TBT
	μg			
<i>Krzywa kalibracyjna 6-punktowa</i>				
<i>LOD</i>	0,059	0,0091	0,014	0,015
<i>c</i>	0,05	0,004		
<i>LOD &lt; c</i>	N	N	N	N
<i>Krzywa kalibracyjna 5-punktowa</i>				
<i>LOD</i>	0,32	0,017	0,021	0,023
<i>c</i>	0,5	0,04		
<i>LOD &lt; c</i>	T	T	T	T
<i>10 LOD &gt; c</i>	T	T	T	T
<i>LOQ</i>	0,96	0,051	0,063	0,069

Wartości liczbowe parametrów krzywych kalibracyjnych uzyskane w wyniku analizy próbek 5 nowych roztworów wzorcowych zostały zestawione w tabeli 14. Analizując wartości liczbowe współczynnika regresji ( $r$ ), który określa stopień zależności między badanymi wielkościami (stosunkiem powierzchni piku analitu do powierzchni piku wzorca wewnętrznego i odpowiadającej mu zawartości analitu), można stwierdzić, że w badanym zakresie stężeń istnieje liniowa zależność pomiędzy tymi zmiennymi.

Tabela 14. Parametry krzywych kalibracyjnych uzyskanych w wyniku analizy próbek roztworów wzorcowych metylortęci i związków z grupy cynoorganicznych

Analit	Równanie krzywej kalibracyjnej	<i>r</i>
MeHg	$y = 0,228x - 0,041$	0,998
MBT	$y = 0,755x + 0,00060$	0,9995
DBT	$y = 0,335x - 0,0034$	0,9997
TBT	$y = 0,161x + 0,000024$	0,999

#### 4.6. Procedura jednoczesnego oznaczania metylortęci i związków z grupy cynoorganicznych (mono-, di-, tributylowy) w próbkach wątroby focznej.

W wyniku przeprowadzonych badań opracowano procedurę jednoczesnego oznaczania metylortęci i wybranych związków z grupy cynoorganicznych. Poniżej został przedstawiony schemat (rysunek 11) opracowanej procedury, a w kolejnych podrozdziałach opisano opracowanie poszczególnych etapów przygotowania próbki do analizy.

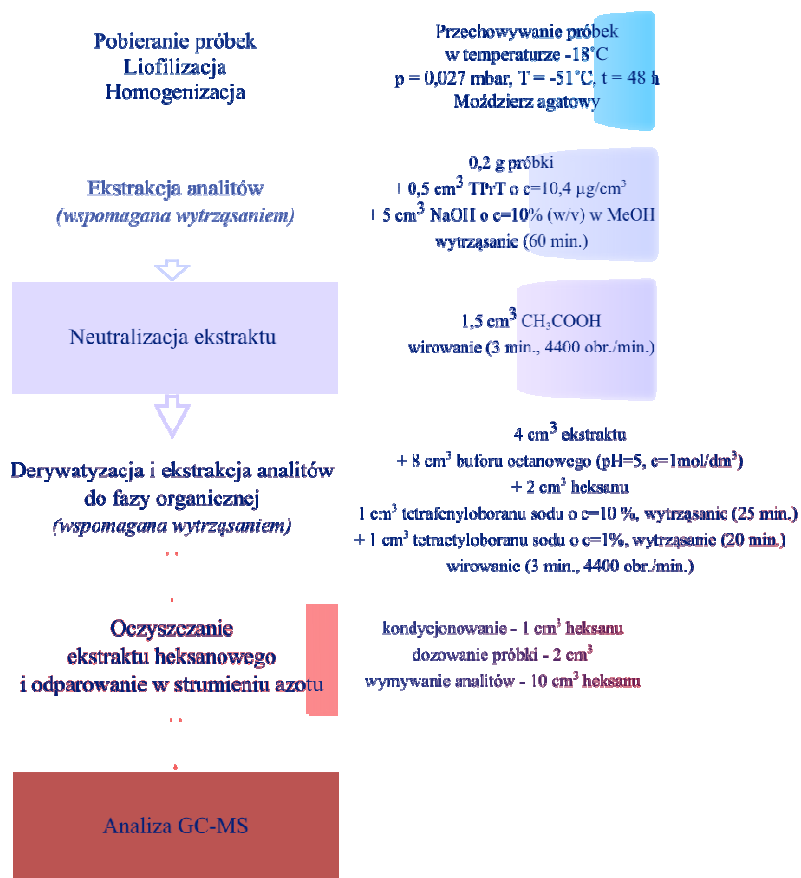
Uzyskany ekstrakt heksanowy poddawany był oczyszczaniu w celu usunięcia tłuszczów, w które bogata jest tkanka wątroby, a które uległy ekstrakcji razem z analitami. Oczyszczanie prowadzone było przy użyciu kolumniek ekstrakcyjnych przygotowanych we własnym zakresie przedstawionych na rysunku 12. W piecu *Pasteura*, zabezpieczonej na wylocie warstwą silanizowanej waty szklanej, umieszczono tlenek glinu (3 % wody), na który nanoszono ekstrakt heksanowy. Od góry złożę  $Al_2O_3$  było zabezpieczone warstwą bezwodnego siarczanu sodu o grubości ok. 1 cm w celu usunięcia wody, która mogła przypadkowo dostać się do ekstraktu podczas jego pobierania z fiołki.

#### 4.7. Dobór optymalnych warunków przygotowania próbki

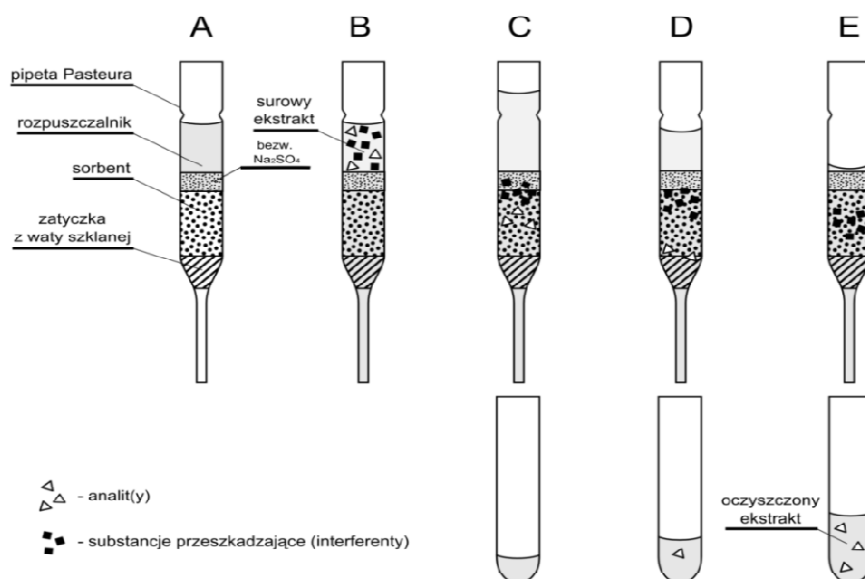
Przygotowanie próbki stanowi istotny etap każdej procedury analitycznej mającej na celu oznaczenie analitów na poziomie śladów czy ultraśladów w próbce o skomplikowanym składzie matrycy. W przypadku oznaczania związków metaloorganicznych należy tak dobrać warunki przygotowania próbki, aby nie utracić informacji specyficznej zawartej w próbce. Do najważniejszych etapów należy zaliczyć uwalnianie analitów z matrycy oraz ich derywatyzację, dzięki której możliwe będzie wykorzystanie techniki GC-MS na etapie oznaczeń końcowych. W pierwszej kolejności dokonano doboru optymalnych warunków prowadzenia procesu derywatywacji (mimo, że wykonuje się ją dopiero po etapie uwalniania analitów z próbki), a następnie dla ekstrakcji. Ten tok postępowania podyktowany był koniecznością poznania optymalnych warunków



derywatywacji analitów, aby możliwa była ocena efektywności ich ekstrakcji z próbek wątroby.



Rysunek 11. Schemat procedury jednoczesnego oznaczania metylortęci i związków z grupy cynoorganicznych w próbkach wątroby.



Rysunek 12. Schemat procesu oczyszczania ekstraktu.

Etapy: A – kondycjonowanie złoża za pomocą heksanu, B – nanoszenie porcji ekstraktu, C, D – elucja analitów za pomocą heksanu, E – koniec oczyszczania ekstraktu [98].

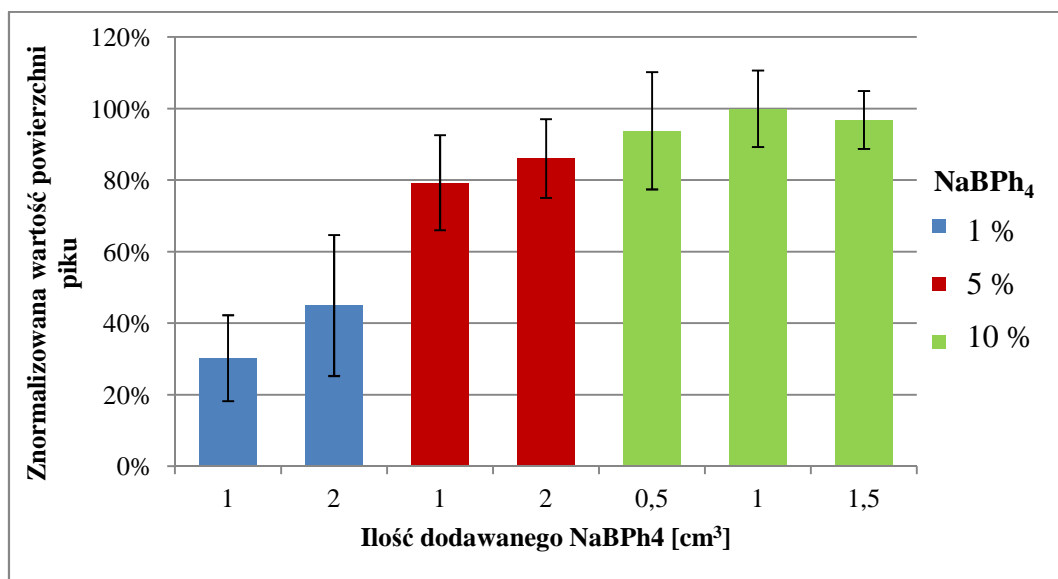
#### 4.7.1. Dobór optymalnych warunków derywatywacji analitów w ekstrakcie z próbki wątroby

Jak już wspomniano wcześniej ze względu na wybraną technikę rozdzielania analitów (chromatografia gazowa) muszą one zostać uprzednio poddane derywatywacji. Składniki matrycy, które ulegają ekstrakcji razem z analitami mogą ulegać reakcji z odczynnikiem derywatyżującym i przez to wpływać na efektywność derywatywacji badanych związków. Z tego względu konieczne było sprawdzenie warunków prowadzenia reakcji derywatywacji analitów nie tylko w roztworach wzorcowych, ale również w ekstrakcie z wątroby. W tym celu przeprowadzono ekstrakcję próbki świńskiej wątroby (sprawdzonej pod kątem braku obecności całkowitej zawartości rtęci i cyny) za pomocą 5 cm<sup>3</sup> roztworu wodorotlenku sodu o stężeniu 10 % w metanolu wspomaganą ultradźwiękami (60 minut). Uzyskany ekstrakt zneutralizowano za pomocą kwasu octowego, wirowano i zebrano z nad pozostałości do nowej fiolki. Do tak przygotowanego ekstraktu dodano mieszaninę substancji wzorcowych o stężeniu 2,5 µg/cm<sup>3</sup> każdego ze związków, a następnie buforu octanowego o pH=5 (c = 1 mol/dm<sup>3</sup>) i 2 cm<sup>3</sup> heksanu. W pierwszej kolejności sprawdzono czas trwania reakcji tworzenia fenylowej pochodnej metylortęci i ilość potrzebnego do tego celu odczynnika derywatyżującego, a następnie podobne doświadczenie wykonano dla wybranych związków z grupy cynoorganicznych.

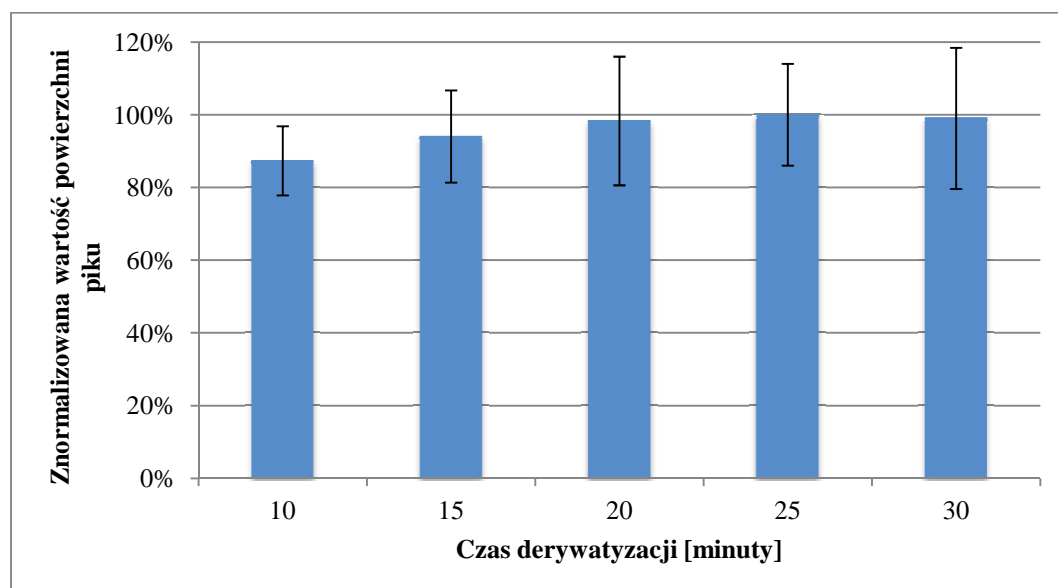
##### *Dobór warunków prowadzenia procesu derywatywacji metylortęci*

Spodziewano się, że w przypadku próbek z ekstraktem z matrycy potrzebne będzie użycie nadmiaru odczynnika derywatyżującego, ponieważ będzie on reagował nie tylko z analitami, ale również z innymi składnikami obecnymi w próbce po ekstrakcji. W tym celu do odpowiednio przygotowanych próbek ekstraktu zawierających metylortęć dodawano różne objętości NaBPh<sub>4</sub> o różnych stężeniach i poddawano derywatywacji przez 10 minut. Na podstawie uzyskanych wyników przedstawionych na rysunku 11 można zauważyć, że największą efektywność derywatywacji osiągnięto dopiero po dodaniu do ekstraktu próbki 1 cm<sup>3</sup> roztworu tetrafenyloboranu sodu o stężeniu 10 %. W kolejnym etapie sprawdzono wpływ czasu na efektywność procesu derywatywacji analitów dla wybranej ilości odczynnika derywatyżującego. Analiza danych przedstawionych na rysunku 13 może prowadzić do wniosku, że optymalny czas prowadzenia reakcji fenylowania to 25 minut. Ponadto

uzyskane wyniki stanowią dobrą podstawę do stwierdzenia, że występuje duży wpływ matrycy próbki na efektywność przebiegu derywatywacji analitów.



Rysunek 13. Wpływ ilości dodanego odczynnika derywatyzującego na powierzchnię pików chromatograficznych uzyskanych w wyniku analizy próbek ekstraktów z wątroby z dodatkiem roztworu wzorcowego metylortęci za pomocą GC-MS.

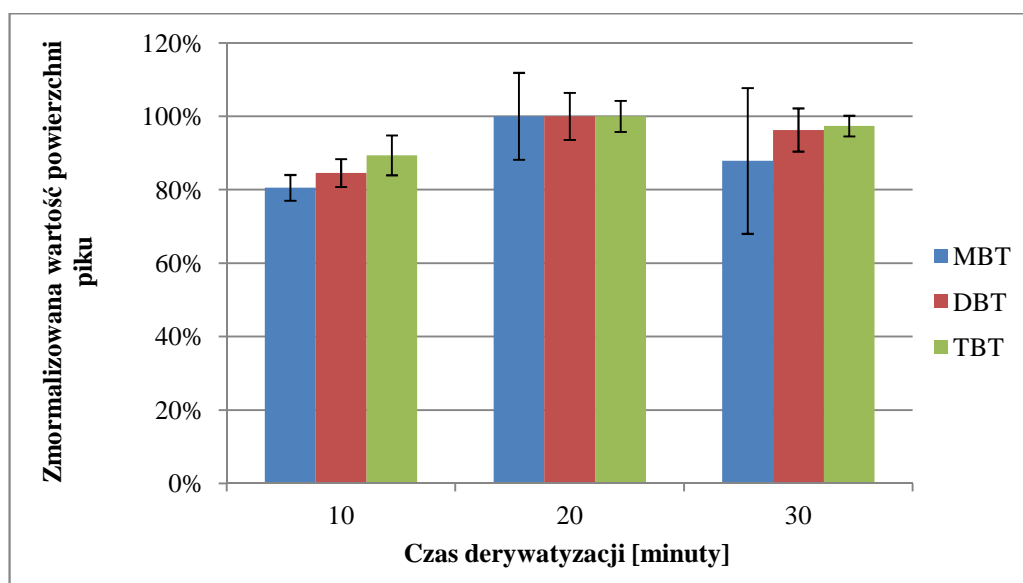


Rysunek 14. Wpływu czasu prowadzenia derywatywacji na powierzchnię pików chromatograficznych uzyskanych w wyniku analizy próbek roztworu wzorcowego metylortęci z odwzorowaniem matrycy za pomocą GC-MS.

#### *Dobór warunków procesu derywatywacji MBT, DBT i TBT*

Podobnie jak w przypadku metylortęci sprawdzeniu poddano wpływ różnych objętości dodanego odczynnika derywatyzującego. W próbkach ekstraktów wątroby, zawierających

dodatek oznaczanych związków cynoorganicznych oraz metylortęci, przeprowadzano najpierw derywatyzację metylortęci z użyciem NaBPh<sub>4</sub>, a następnie do każdej serii próbek dodawano inną ilość (1; 1,5; 2; 2,5 i 3 cm<sup>3</sup>) roztworu tetraetyloboranu sodu o stężeniu 1 % i energicznie wytrząsano przez 15 minut. Uzyskane wyniki były podstawą do stwierdzenia, że użycie 1 cm<sup>3</sup> roztworu tetraetyloboranu sodu jest wystarczające do przeprowadzenia derywatywacji wybranych analitów. Zwiększanie ilości dodawanego odczynnika derywatyżującego nie powodowało wzrostu efektywności reakcji. W następnym kroku sprawdzono wpływ czasu trwania derywatywacji na jej efektywność. Odpowiednio przygotowanie próbki ekstraktów wątroby z dodatkiem substancji wzorcowych poddano procesowi derywatywacji których czas wynosił odpowiednio: 10, 20 i 30 minut, a następnie poddano analizie w układzie GC-MS. Uzyskane wyniki przedstawione na rysunku 15 mogą być podstawą do stwierdzenia, że optymalny czas procesu derywatywacji związków cynoorganicznych wynosi 20 minut, czyli nieco dłużej niż w przypadku próbek wzorcowych bez odwzorowania matrycy.



Rysunek 15. Wpływ czasu prowadzenia derywatywacji na powierzchnię pików chromatograficznych uzyskanych w wyniku analizy roztworów wzorcowych z odwzorowaniem matrycy związków cynoorganicznych z wykorzystaniem techniki GC-MS.

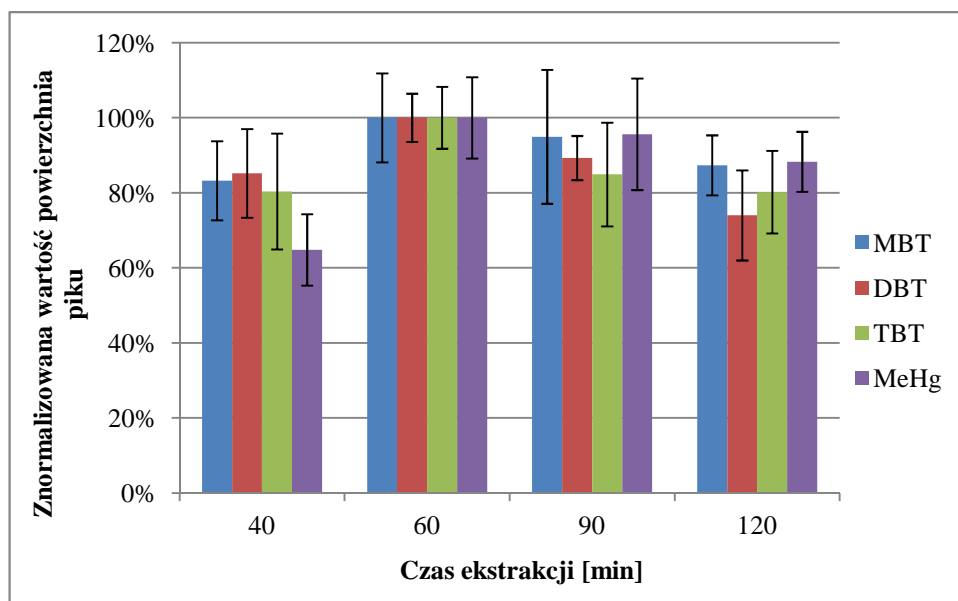
#### 4.7.2. Dobór optymalnych warunków ekstrakcji analitów z badanych próbek

W analizie specyjacyjnej związków cyno- i rtęcioorganicznych do roztwarzania matrycy w celu uwolnienia analitów powszechnie stosuje się rozcieńczone kwasy lub roztwory wodorotlenków. Sprawdzono skuteczność obu tych podejść stosując do ekstrakcji roztwór kwasu bromowodorowego w metanolu, roztwór wodorotlenku potasu

lub wodorotlenku sodu w metanolu. Dodatkowo w sprawdzono wpływ czasu oraz rodzaj czynnika wspomagającego (wytrząsanie i ultradźwięki) na efektywność procesu ekstrakcji.

W badaniach wykorzystano próbki rzeczywiste (wątroba focza) o nieznanym stężeniu metylortęci i związków z grupy cynoorganicznych, do której przed ekstrakcją dodawano znaną ilość substancji traktowanej jako wzorzec wewnętrzny (TPrT). Z tego względu dane dotyczące efektywności ekstrakcji i wpływu na nią innych czynników, podawane były jako wartości względne (znormalizowane wobec wzorca wewnętrznego), jako 100 % przyjmując największą uzyskaną wartość.

W pierwszej kolejności sprawdzono możliwość wykorzystania roztworu kwasu bromowodorowego w metanolu (1:1 v/v) do roztwarzania matrycy i uwalniania analitów. Derywatyzację analitów prowadzono w warunkach które obrano w oparciu o wyniki przeprowadzonych doświadczeń opisanych powyżej. Jednak otrzymane wyniki nie były zadowalające ze względu na duży rozrzut wyników w danej serii pomiarowej ( $CV > 30\%$  dla trzech powtórzeń). Następnie zdecydowano się zastosować roztwór wodorotlenku potasu w metanolu do ekstrakcji analitów z próbki. W trakcie wykonywania doświadczenia okazało się, że tetrafenyloboranu sodu reaguje w pierwszej kolejności z jonami potasu obecnymi w roztworze, tworząc biały osad tetrafenyloboranu potasu. Z tego względu postanowiono zastąpić wodorotlenek potasu wodorotlenkiem sodu. Do ekstrakcji analitów użyto 5 ml roztworu NaOH o stężeniu 10 % w metanolu (w/v). Uzyskane wyniki przedstawiono na rysunku 16. Na ich podstawie można stwierdzić, że proces ekstrakcji powinien być prowadzony przez 60 minut.



Rysunek 16. Wpływ czasu na efektywność procesu ekstrakcji analitów z próbek wątroby foczej.

### **4.7.3. Oczyszczanie ekstraktów i wzbogacanie analitów**

W wyniku ekstrakcji próbek o skomplikowanym składzie matrycy do roztworu, oprócz analitów, przechodzą również substancje przeszkadzające (interferenty). Substancje te mogą skracać żywotność aparatury analitycznej poprzez osadzanie się na powierzchni różnych elementów, np. mogą powodować zanieczyszczenia dozownika, kolumny, detektora (źródła jonów), a także mogą powodować niestabilność czasów retencji oraz być źródłem zwiększonego poziomu szumów. Aby uniknąć niekorzystnego wpływu tłuszczów, w które bogata jest tkanka wątroby, wprowadzono etap oczyszczania ekstraktu, którego przebieg przedstawiono schematycznie na rysunku 12. Na tym etapie wykorzystano kolumnienki przygotowane we własnym zakresie. Oczyszczanie ekstraktu odbywa się na złożu z tlenku glinu (zawierającego 3 % wody) posiadającym polarne grupy funkcyjne, na którym zatrzymywane są związki polarne i/lub te o dużej masie cząsteczkowej. Natomiast pochodne cynoorganiczne i metylortęci charakteryzują się stosunkowo niewielką masą cząsteczkową oraz niską polarnością (w wyniku derywatywacji), co sprawia że są wmywane z kolumnienki jako pierwsze. Jednak w wyniku oczyszczania następuje znaczne rozcieńczenie ekstraktu, a zatem zmniejszenie stężenia analitu w objętości próbki, przez co czułość stosowanego detektora może okazać się niewystarczająca do zapewnienia miarodajnych wyników. Dlatego też powszechnie stosuje się etap wzbogacania analitów w ekstrakcie. W ramach prowadzonych badań po etapie oczyszczania wprowadzono etap odparowania rozpuszczalnika w atmosferze gazu obojętnego (azotu). Ekstraktu odparowywano do objętości ok. 0,3 cm<sup>3</sup> i następnie poddawano analizie końcowej z wykorzystaniem układu GC-MS.

### **4.8. Walidacja procedury jednoczesnego oznaczania metylortęci i wybranych związków z grupy cynoorganicznych (MBT, DBT, TBT)**

Każda nowo opracowana procedura analityczna powinna zostać oceniona pod kątem jej przydatności do uzyskiwania miarodajnych wyników oznaczeń. W tym celu wyznacza się podstawowe parametry walidacyjne, takie jak:

- liniowość i zakres pomiarowy,
- granica wykrywalności i oznaczalności,
- powtarzalność,
- precyzję pośrednią.

Kalibracja procedury powinna w jak najlepszym stopniu odwzorowywać zależności między stężeniem analitu w próbce a sygnałem analitycznym, dlatego też należy uwzględnić możliwy wpływ składników próbki na wielkość tego sygnału ze względu na możliwość występowania efektów matrycowych. W tym celu krzywe kalibracyjne sporządzono w oparciu o roztwory z odwzorowaniem matrycy. Do próbek wątroby świńskiej dodano odpowiednie ilości roztworów wzorcowych, co odpowiada zawartości MeHg od 0,5 do 5 µg i zawartości OTC od 0,04 do 0,4 µg, a następnie przygotowano je zgodnie z opracowaną procedurą. Równolegle przygotowano próbki roztworów wzorcowych, poprzez dodanie tej samej ilości analitów bezpośrednio do odczynnika ekstrakcyjnego i poddano je badaniom z wykorzystaniem tej samej procedury analitycznej, co próbki z odwzorowaną matrycą. Na podstawie wyników uzyskanych w trakcie analizy próbek wzorcowych (matrycowych i bezmatrycowych) wykreślono krzywe kalibracyjne i zbadano wielkość wpływu efektu matrycowego na intensywność sygnału analitycznego. Wpływ ten został oszacowany na podstawie stosunku liczbowego współczynników kierunkowych liniowych równań regresji krzywych kalibracyjnych. Wartości liczbowe tego stosunku oraz równania krzywych kalibracyjnych dla odpowiednich analitów przedstawiono w tabeli 15.

Tabela 15. Parametry krzywych kalibracyjnych uzyskanych w wyniku analizy próbek roztworów wzorcowych metylortęci i związków z grupy cynoorganicznych przygotowanych z i bez odwzorowania matrycy

Analit	Równanie krzywej kalibracyjnej bez odwzorowania matrycy	<i>r</i>	Równanie krzywej kalibracyjnej z odwzorowaniem matrycy	<i>r</i>	Stosunek współczynników kierunkowych z odwzorowaniem matrycy/bez odwzorowania matrycy	Wzmocnienie (+)/osłabienie (-) sygnału
MeHg	$y = 0,217x - 0,026$	0,998	$y = 0,191x + 0,033$	0,997	0,82	-18%
MBT	$y = 0,738x - 0,0011$	1,000	$y = 0,504x + 0,0045$	0,999	0,68	-32%
DBT	$y = 0,372x - 0,0036$	1,000	$y = 0,147x - 0,0027$	0,995	0,40	-60%
TBT	$y = 0,210x - 0,0029$	1,000	$y = 0,133x - 0,00033$	0,998	0,63	-37%

Na podstawie danych przedstawionych w tabeli można stwierdzić znaczny wpływ składników matrycy na osłabienie intensywności sygnału analitycznego badanych związków. Dlatego też podczas procesu walidacji wartości liczbowe granicy wykrywalności, liniowość i zakres pomiarowy, a także poprawność procedury wyznaczano w oparciu o krzywe kalibracyjne z matrycą.

Krzywe kalibracyjne uzyskane w wyniku analizy roztworów wzorcowych z dodatkiem matrycy charakteryzowały się liniowością w badanym zakresie stężeń. Korzystając z wzorów

podanych w rozdziale 4.5. obliczono wartości LOD i LOQ oraz sprawdzono poprawność ich wyznaczenia. Dane te zostały przedstawione w tabeli 16.

W kolejnym etapie sprawdzono poprawność opracowanej procedury na podstawie analizy próbek certyfikowanych materiałów odniesienia, BCR-463, DORM-2 oraz CE-477.

Tabela 16. Wartości liczbowe granicy wykrywalności oraz wyniki weryfikacji poprawności wyznaczenia tej granicy na podstawie pięciopunktowej krzywej kalibracyjnej (*N* oznacza, że dany warunek nie został spełniony, *T* oznacza, że dany warunek został spełniony)

	MeHg	MBT	DBT	TBT
	<b>µg</b>			
<i>LOD</i>	0,35	0,0090	0,011	0,0075
<i>c</i>	0,5	0,04		
<i>LOD &lt; c</i>	T	T	T	T
<i>10 LOD &gt; c</i>	T	T	T	T
<i>LOQ</i>	1,0	0,027	0,033	0,023

W tym celu przygotowano po 6 próbek każdego z materiałów zgodnie z opracowaną procedurą i poddano analizie w układzie GC-MS. Wyniki analiz próbek ekstraktów rozpuszczalnikowych badanych próbek wątroby przedstawiono w tabeli 17.

Tabela 17. Odzysk analitów z próbek certyfikowanego materiału odniesienia

Certyfikowany materiał odniesienia	n	MeHg	MBT	DBT	TBT
		Odzysk ± U (k=2) [%]			
<b>BCR463</b>	6	25 ± 5,8	-	-	-
<b>DORM-2</b>	6	61 ± 11	-	-	-
<b>CE477</b>	6	-	71 ± 6,8	171 ± 17	67 ± 10

Na ich podstawie można zauważyć, że odzysk procedury analitycznej nie jest na zadowalającym poziomie. Akceptowalny odzysk dla tego typu analiz powinien zawierać się w przedziale od 80 do 120 %. Dla trzech analitów (MeHg, MBT i TBT) odzysk nie przekracza 71 %, natomiast dla DBT obliczona zawartość znacznie przewyższa wartość certyfikowaną, co ma swoje odzwierciedlenie w wysokim odzysku dla tego związku. Ponieważ proces ekstrakcji analitów z próbki i ich derywatywacja są najbardziej krytycznymi w całej procedurze, w tych dwóch etapach należy doszukiwać się przyczyn niezadowalających odzysków. Podczas etapu ekstrakcji analitów próbka nie zostaje całkowicie rozłożona; po zakończeniu ekstrakcji oprócz ekstraktu w fiolce obecna jest również stała pozostałość. Ze względu na to, że związki metaloorganiczne występujące



w środowisku mogą silnie wiązać się z tkankami biologicznymi, próbka powinna ulec całkowitemu rozpuszczeniu, tak aby uwolnieniu uległy wszystkie anality. Natomiast substancje wzorcowe dodawane do próbki nie oddziałują w taki sam sposób jak związki pierwotnie związane w tkance. Są one słabiej związane z matrycą próbki, przez co są efektywniej i szybciej ekstrahowane. Dlatego też prawdopodobnie warunki ekstrakcji dobrane w sposób opisany w pracy, czyli w oparciu o analizę próbek wątroby z dodatkiem substancji wzorcowych, są niewystarczające do ilościowego przeniesienia badanych związków do roztworu. Ponadto próbki tkanek zwierzęcych charakteryzują się bardzo złożonym składem matrycy, przez co w ekstrakcie, oprócz analitów, obecnych jest wiele innych metali, związków organicznych, tłuszczów i białek, które mogą zakłócać przebieg procesu derywatywacji. Świadczyć o tym może duża różnica w wartościach odzysku dla MeHg dla dwóch CRM różniących się składem matrycy. Mimo, że oba materiały zostały przygotowane z tego samego rodzaju tkanki – mięśni (BCR-463 z tuńczyka, a DORM-2 z kolonia pospolitego), to jednak różnią się one znacznie zawartością tłuszczów. Tuńczyk zawiera dużo więcej tłuszczów (ok. 16 %) niż kolen (ok. 5 %), które mogą zakłócać przebieg procesu derywatywacji. Być może, podobnie jak w przypadku procesu ekstrakcji, warunki derywatywacji, czyli ilość odczynnika derywatywującego i długość trwania reakcji, są niewystarczające do zniwelowania wpływu matrycy i ilościowego przekształcenia analitów w pochodne. Możliwe rozwiązanie tego problemu znaleziono w literaturze naukowej. Lepszy odzysk procesu etylowania metylortęci uzyskano stosując dwie porcje tetraetyloboranu sodu (jedna po drugiej) [178], więc być może to samo podejście należałoby sprawdzić w procesie tworzenia fenylowej pochodnej metylortęci oraz etylowych pochodnych związków cynoorganicznych.

Zaskakującym okazało się uzyskanie wysokiej wartości odzysku dla dibutylocyny. Może to być związane z degradacją tributyllocyny do dibutylocyny, do której mogłoby dochodzić pod wpływem światła w trakcie procesu ekstrakcji lub derywatywacji. Inną możliwość stanowi rozkład tributyllocyny podczas przechowywania certyfikowanego materiału odniesienia.

Niewątpliwie uzyskane wyniki nie są zadowalające i uniemożliwiają zastosowanie opracowanej procedury do oznaczania badanych związków w próbkach rzeczywistych. Niezbędne jest przeprowadzenie dodatkowych doświadczeń, które pozwolą na znalezienie występowania źródła błędów i ich wyeliminowanie.

## **5. Wykorzystanie technik chemometrycznych na etapie opracowania wieloparametrowych zbiorów danych pomiarowych uzyskanych w wyniku badań próbek wątroby**

W wyniku przeprowadzonych badań uzyskano ogromny zbiór danych pomiarowych, których interpretacja jest niezwykle trudna i skomplikowana. Z tego powodu niezbędne staje się zastosowanie technik chemometrycznych w celu wydobycia użytecznych informacji z wieloparametrowych danych pomiarowych. Nowoczesne wielowymiarowe techniki chemometryczne umożliwiają jednoczesne opracowanie praktycznie nieograniczonej liczby zmiennych dzięki wykorzystaniu matematyki, rachunku prawdopodobieństwa, statystyki i informatyki. Chemometria stanowi odrębną dziedzinę nauki, która może być wykorzystana, między innymi, w monitoringu środowiska:

- do analizy zmian poziomów stężeń analitów w czasie,
- identyfikacji źródeł zanieczyszczeń, a także
- do wyjaśnienia zależności pomiędzy grupami analitów [179].

Analiza statystyczna i chemometryczna uzyskanych wieloparametrowych zbiorów danych pomiarowych została przeprowadzona we współpracy z dr Tomaszem Ciesielskim, pracownikiem Norweskiego Uniwersytetu Nauki i Technologii w Trondheim w Norwegii oraz z Frankiem F. Riget, pracownikiem Uniwersytetu w Aarhus w Danii.

Analizie chemometrycznej poddano wieloparametrowy zbiór danych pomiarowych uzyskanych w wyniku oznaczenia pierwiastków w próbkach wątrób pobranych od fok szarych. Próbkę te zostały podzielone na 6 grup zależnie od tego w jakim obszarze zostały znalezione dane osobniki (załącznik 1, rysunek 5). Do badań wybrano osobniki wchodzące w skład następujących grup wiekowych: szczenięta (do 1 roku życia), młodociane (1-3 lata) oraz dorosłe ( $\geq 4$ lat). Przed przystąpieniem do analizy chemometrycznej zmienne zostały sprawdzone pod kątem rozkładu normalnego. Jest to spowodowane tym, że stosowane testy statystyczne przy porównywaniu zbiorów pomiarowych oraz metody regresyjne stosowane przy tworzeniu modeli zależności pomiędzy zmiennymi zakładają, że rozkład zmiennej ma charakter rozkładu normalnego lub jest do niego zbliżony. Zastosowanie tych technik do zmiennych nie posiadających rozkładu normalnego może prowadzić do błędnych wniosków bądź nieprawdziwych zależności. W wyniku przeprowadzonych testów stwierdzono, że zmienne w badanych zbiorze danych nie spełniają warunków rozkładu normalnego, dlatego też poddano je transformacji logarytmicznej tak, aby uzyskać rozkład maksymalnie zbliżony do normalnego.

W pracy techniki chemometryczne zostały wykorzystane do zbadania:

- występowania statystycznie istotnych różnic w średnich wartościach stężeń pierwiastków między różnymi grupami wiekowymi oraz między różnymi obszarami geograficznymi (ANOVA, ANCOVA),
- między którymi grupami występują statystycznie istotne różnice (test Tukeya, tzw. test *post-hoc* (po fakcie)),
- czy pomiędzy zawartością pierwiastków, stosunkiem molowym Se:Hg, wartościami  $\delta^{13}\text{C}$  i  $\delta^{15}\text{N}$  i danymi biometrycznymi (wiek, długość i masa ciała) istnieje korelacja liniowa (korelacja Pearsona),
- wewnętrznej struktury danych pomiarowych i opisania jej za pomocą „utajonych” parametrów (głównych składowych), które z tej struktury wynikają (PCA) [179].

Zastosowanie techniki analizy wariancji umożliwia monitorowanie zmian zawartości pierwiastków w próbkach organizmów w zależności od ich przynależności gatunkowej, wielkości (wieku), regionu występowania i innych parametrów środowiskowych [180]. Analiza wariancji służy do porównania różnic pomiędzy wartościami średnimi w wydzielonych grupach, innymi słowy jest narzędziem do badania wpływu czynników (zmiennych niezależnych, np. obszaru występowania, grupy wiekowej, płci) na zmienną zależną (np. zawartość danego pierwiastka w próbce). Zastosowanie techniki analizy wariancji służy do sprawdzenia, czy wartości badanej cechy odzwierciedlają wpływ danego czynnika, czy też kształtują się niezależnie od niego. Analizę wariancji stosuje się do porównania średnich w 3 lub większej ilości grup. Natomiast w celu porównania wartości średnich w dwóch grupach stosuje się znacznie prostszy test *t-Studenta*. Idea analizy wariancji opiera się na weryfikacji hipotezy zerowej,  $H_0$ , która głosi, że średnie w porównywanych grupach (populacjach) są równe, co jest równoważne twierdzeniu o braku wpływu zmiennej niezależnej na zmienną zależną. W analizie wariancji wykorzystuje się test *F Snedecora*. Ma on postać ilorazu dwóch niezależnie oszacowanych wariancji, gdzie w liczniku podaje się tzw. wariancję międzygrupową, a w mianowniku tzw. wariancję wewnątrzgrupową. Uznaje się, że analizowany czynnik ma wpływ na zmienną zależną (czyli hipoteza zerowa zostaje odrzucona) wtedy, gdy obliczona wartość *F* jest większa (lub równa) niż wartość krytyczna dla przyjętego poziomu istotności (*p*) i określonej liczby stopni swobody.

W przypadku, kiedy na zmienną zależną, wpływa inna zmienna niezależna niebędąca przedmiotem analizy, pomocne staje się zastosowanie analizy kowariancji (ANCOVA). Jest

to technika, która łączy w sobie elementy analizy wariancji, korelacji i regresji, dzięki czemu istnieje możliwość wyeliminowania wpływu innej cechy (tzw. zmiennej towarzyszącej) mającej wpływ na badaną zmienną zależną.

W wyniku przeprowadzenia analizy wariancji/kowariancji otrzymuje się informację, czy średnie w grupach różnią się w sposób statystycznie istotny. Jednak brak jest informacji na temat, które z analizowanych średnich są odpowiedzialne za odrzucenie hipotezy zerowej. Aby dowiedzieć się, które wartości średnie różnią się między sobą w sposób statystycznie istotny, a które są równe, niezbędne jest zastosowanie tzw. testów *post hoc*. Jednym z takich testów jest test Tukeya, za pomocą którego poszukuje się różnic pomiędzy wszystkimi parami średnich.

W celu zbadania występowania zależności pomiędzy badanymi zmiennymi wykorzystano jedną z najczęściej stosowanych technik statystycznych – analizę korelacji. W pracy wykorzystano współczynnik korelacji Pearsona ( $r$ ), który służy do określenia siły związku prostoliniowego między dwiema cechami mierzalnymi oraz kierunku tej korelacji. Współczynnik ten przyjmuje wartości liczbowe z przedziału  $[-1;1]$ . Im wartość  $r$  jest bliższa zera tym związek jest słabszy, natomiast im bliżej 1 (lub -1), tym związek jest silniejszy. Dodatnia wartość liczbowego współczynnika korelacji informuje o dodatniej liniowej zależności pomiędzy zmiennymi (ze wzrostem wartości parametru  $x$  wzrasta wartość parametru  $y$ ), natomiast wartość ujemna wskazuje, że zmienne są ujemnie skorelowane (ze wzrostem wartości jednego parametru maleje wartość drugiego). Przyjmuje się następujące oceny siły związku (pamiętając o odpowiedniej liczbie próby):

Tabela 18. Ocena stopnia korelacji pomiędzy dwiema zmiennymi na podstawie wartości współczynnika korelacji

$r$	siła związku korelacyjnego
0,0 - 0,2	brak
0,2 - 0,4	słaba
0,4 - 0,7	średnia
0,7 - 0,9	silna
0,9 - 1,0	bardzo silna

Ze względu na możliwość istnienia licznych współzależności pomiędzy zmiennymi istnieje możliwość występowania zjawiska redundancji, czyli powielania informacji. W celu umożliwienia wizualizacji istniejących zależności oraz poprawnej interpretacji uzyskanego zbioru danych wykorzystuje się analizę głównych składowych, dzięki której uzyskuje się redukcję liczby badanych zmiennych do znacznie mniejszej liczby wzajemnie niezależnych

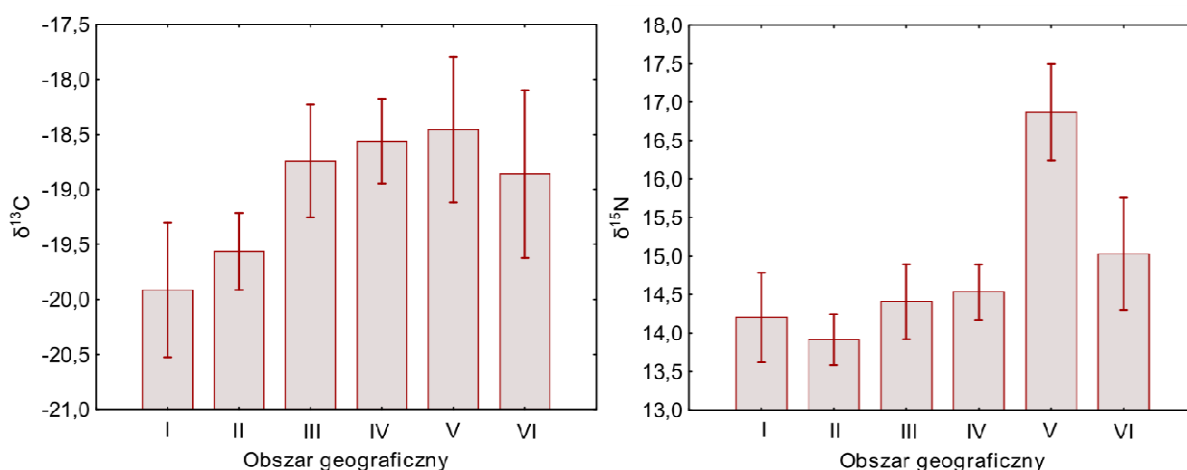
(nieskorelowanych) czynników, tzw. głównych składowych. Składowe główne otrzymuje się w wyniku obliczenia tzw. wartości własnych (ang. *eigenvalue*) korelacji lub macierzy kowariancji próbek [181]. Składowe te są sortowane w kolejności malejącego zasobu zmienności (informacji), którą dany składnik wyjaśnia. Pierwsza składowa wnosi największą ilość informacji, a każda kolejna składowa zawiera jej mniej. Dla danego zestawu danych istnieje tyle głównych składowych, ile było zmiennych objaśniających, dlatego konieczne jest ustalenie ile składowych głównych należy wziąć pod uwagę [182].

## 6. Wyniki oznaczeń zawartości pierwiastków i stałych izotopów w próbkach wątroby

### 6.1. Poziomy zawartości stałych izotopów węgla i azotu

Analizę stałych izotopów węgla i azotu przeprowadzono we wszystkich próbkach wątroby i organizmów, którymi żywią się foki. Wartość  $\delta^{15}\text{N}$  obliczona dla próbek wątroby mieściła się w zakresie od 13 ‰ u osobnika z Zatoki Botnickiej do 19 ‰ u osobnika z Bałtyku właściwego. Średnia wartość dla wszystkich badanych próbek wynosiła 14 ‰. W przypadku  $\delta^{13}\text{C}$  zarówno najniższą (-22 ‰), jak i najwyższą wartość (-16 ‰) obliczono dla osobników z Bałtyku właściwego, a wartość średnia dla wszystkich badanych próbek wynosiła -19 ‰. Uzyskane wyniki badań zostały przedstawione w załączniku 2.

Podobnie jak w przypadku zawartości pierwiastków przeprowadzono analizę kowariancji w celu sprawdzenia, czy obszar geograficzny wpływa na średnią wartość  $\delta^{15}\text{N}$  i  $\delta^{13}\text{C}$ . Uzyskane wyniki zaprezentowano w formie wykresu na rysunku 17.



Rysunek 17. Średnie wartości liczbowe parametrów  $\delta^{15}\text{N}$  i  $\delta^{13}\text{C}$  uzyskane w wyniku analizy próbek wątroby fok szarych z różnych obszarów geograficznych.

W przypadku obu badanych zmiennych obszar w sposób statystycznie istotny wpływał na ich wartość średnią; dla  $\delta^{15}\text{N}$  wartość parametru  $F_{5,68}$  wynosiła 14,75,  $p < 0,0001$ , natomiast dla  $\delta^{13}\text{C}$  wartość tego parametru wynosiła 4,16,  $p = 0,002$ . Próbki wątroby pobrane od fok szarych znalezionych w obrębie polskiego wybrzeża charakteryzowały się znacząco wyższymi wartościami zmiennej  $\delta^{15}\text{N}$  w porównaniu do próbek pobranych od fok szarych z obszaru Morza Alandzkiego i Zatoki Botnickiej (Tukey HSD;  $p < 0,0002$ ) oraz z obszaru Basenu Bornholmskiego (Tukey HSD;  $p < 0,02$ ). Wyższe wartości zmiennej  $\delta^{13}\text{C}$  w porównaniu do Zatoki Botnickiej oznaczono w próbkach pobranych od fok z takich obszarów jak Morze Alandzkie, Niecka Zachodniogotlandzka i wybrzeże polskie (Tukey HSD;  $p < 0,05$ ).

Zbadano również czy wiek fok wpływa w istotnym stopniu na wartości liczbowe ocenianych zmiennych. Stwierdzono, że zarówno wartości  $\delta^{15}\text{N}$  jak i  $\delta^{13}\text{C}$  różnią się w sposób statystycznie istotny pomiędzy grupami wiekowymi; wartości parametru  $F$  wynosiły odpowiednio  $F_{2,70} = 4,23$ ,  $p < 0,02$  i  $F_{2,70} = 3,18$ ,  $p < 0,05$ . Osobniki dorosłe charakteryzowały się wyższymi wartościami  $\delta^{15}\text{N}$  w porównaniu do grupy szczeniąt (Tukey HSD;  $p < 0,02$ ).

W przypadku zmiennej  $\delta^{13}\text{C}$  nie zaobserwowano statystycznie istotnych różnic pomiędzy grupami wiekowymi (Tukey HSD;  $p > 0,05$ ).

## **6.2. Poziomy zawartości metali w próbkach wątroby fok szarych**

W badanych próbkach oznaczono stężenia 58 pierwiastków. Pierwiastki, których stężenia oznaczono na poziomie niższym niż wartość granicy wykrywalności w więcej niż 50 % badanych próbek, zostały wykluczone z dalszej analizy statystycznej i chemometrycznej. Były to: glin (Al), beryl (Be), chrom (Cr), hafn (Hf), niob (Nb), skand (Sc), tantal (Ta), tytan (Ti), tul (Tm), uran (U) i cyrkon (Zr). Średnie wartości stężeń makropierwiastków, pierwiastków ziem rzadkich i pierwiastków śladowych oznaczone w próbkach zamieszczone w załączniku 2. Wszystkie stężenia podane są w  $\mu\text{g/g}$  suchej masy.

Spośród pierwiastków uznanych przez ekspertów HELCOM za potencjalnie najbardziej niebezpieczne, tj. Hg, Cd, Pb, Cu i Zn, najwyższe stężenia oznaczono dla rtęci, które zawierały się w przedziale 0,69 – 917  $\mu\text{g/g}$ , a wartość średnia oraz odchylenie standardowe dla tego zakresu wynoszą  $78 \pm 149 \mu\text{g/g}$ . Najwyższe stężenie rtęci oznaczono w próbkach pobranych od dorosłej samicy, foka nr 75, i od samca (najstarszego ze wszystkich badanych osobników – 26 lat), foka nr 51, i wynoszą one odpowiednio 917 i 823  $\mu\text{g/g}$ . Próbki pobrane od czterech innych osobników (nr 50, 53, 70 i 71) również zawierają znaczne ilości

rtęci, powyżej 200 µg/g. Średnie stężenia takich metali ciężkich jak Cd, Pb i Sn wynoszą odpowiednio  $1,4 \pm 5,1$ ;  $0,055 \pm 0,036$  i  $0,8 \pm 1,7$  µg/g. Oprócz rtęci, na wysokich poziomach stężeń oznaczono również takie pierwiastki śladowe jak: Cu ( $63 \pm 40$  µg/g), Se ( $30 \pm 54$  µg/g), Mn ( $11 \pm 4,5$  µg/g) i Rb ( $7,1 \pm 2,5$  µg/g). W przypadku selenu najwyższe stężenia oznaczono w próbkach pobranych od dorosłych osobników ( $51 \pm 75$  µg/g), następnie w grupie młodocianych ( $17 \pm 19$  µg/g), a najniższe w grupie szczeniąt ( $2,3 \pm 0,2$  µg/g). Foki, w których oznaczono najwyższą zawartość rtęci (nr 51 i 75) zawierają również wyższe poziomy selenu niż pozostałe badane osobniki, 340 i 284 µg/g odpowiednio. Średnia zawartość cynku oznaczona w badanych próbkach wynosiła  $175 \pm 52$  µg/g. Spośród pierwiastków ziem rzadkich najwyższe średnie stężenia oznaczono w przypadku Ce, Dy i Er i wynoszą one odpowiednio  $68 \pm 82$ ;  $40 \pm 49$  i  $27 \pm 33$  ng/g.

W próbkach pobranych od osobników oznaczonych nr 65 i 69 stwierdzono bardzo wysokie zawartości Al, Si, Cd i kilku pierwiastków ziem rzadkich, co może wskazywać na to, że próbki te zostały przypadkowo zanieczyszczone. Zostały one wykluczone z analizy statystycznej.

### **6.2.1. Przestrzenne zróżnicowanie w zawartości pierwiastków w próbkach wątroby fok szarych**

Korzystając z analizy kowariancji sprawdzono czy obszar, w obrębie którego znaleziono foki szare, wpływa na poziom zawartości danego pierwiastka w analizowanej próbce. Ponieważ na poziom zawartości pierwiastków w próbkach wątroby może wpływać nie tylko obszar bytowania foki, ale również jej wiek, należało wyeliminować wpływ tej zmiennej (nazywanej zmienną towarzyszącą). Niestety dla niektórych osobników fok wiek nie został określony, więc zamiast wieku jako zmienną towarzyszącą wykorzystano długość ciała foki. Na podstawie uzyskanych wyników zestawionych w tabeli 18 można zauważyć, że tylko w przypadku kilku pierwiastków istnieją statystycznie istotne różnice pomiędzy zawartością danego pierwiastka a obszarem geograficznym (zaznaczone pogrubioną czcionką).

Najmniejszy wpływ obszaru geograficznego na średnią zawartość pierwiastka oszacowano dla Yb ( $F_{5,67} = 2,45$ ,  $p = 0,04$ ), a największy w przypadku Ni ( $F_{5,67} = 13,1$ ,  $p < 0,001$ ). W wyniku zastosowania testu *post hoc* określono, że średnie stężenia takich pierwiastków jak B, Ni i Sr (Tukey HSD;  $p < 0,01$ ) oznaczone w próbkach wątroby focy z grupy V (znalezionych w obrębie polskiego wybrzeża) są statystycznie wyższe

Tabela 18. Ocena wpływu obszaru geograficznego na średnie stężenia pierwiastków w próbkach wątroby (wartości zaznaczone pogrubioną czcionką wskazują statystycznie istotne różnice) oraz występowanie statystycznie istotnych różnic pomiędzy poszczególnymi obszarami (cyfry rzymskie przy średniej wartości stężenia wskazują pomiędzy, którymi obszarami istnieją statystycznie istotne różnice, test Tukeya)

	Obszar geograficzny						F <sub>5,71</sub>	p
	I Zatoka Botnicka	II Morze Botnickie	III Morze Alandzkie	IV Niecka Zachodniogotlandzka	V Wybrzeże polskie	VI Basen Bornholmski		
	Średnie stężenia [µg/g]							
<b>Pierwiastki śladowe</b>								
Ag	0,41	0,34	0,34	0,48	0,83	0,62	1,11	0,37
As	0,28 <sup>II,III,VI</sup>	0,56 <sup>I</sup>	0,45 <sup>I</sup>	0,51	0,42	0,63 <sup>I</sup>	<b>4,66</b>	0,001
B	0,0060 <sup>IV,V,VI</sup>	0,019 <sup>V</sup>	0,013 <sup>V</sup>	0,047 <sup>V</sup>	0,13 <sup>I,II,III,IV</sup>	0,072 <sup>I</sup>	<b>10,99</b>	< 0,0001
Ba	0,017 <sup>V</sup>	0,017 <sup>V</sup>	0,010 <sup>V</sup>	0,019 <sup>V</sup>	0,045 <sup>I,II,III,IV</sup>	0,014	<b>3,39</b>	0,009
Bi	0,13	0,33	0,18	0,58	0,48	0,30	0,52	0,76
Cd	0,62	1,04	0,79	2,7	0,56	0,81	2,17	0,07
Co	0,054	0,065	0,066	0,061	0,057	0,047	1,34	0,26
Cs	0,047	0,051	0,048	0,058	0,057	0,067	1,45	0,22
Cu	82 <sup>II,V</sup>	45 <sup>I,III,IV</sup>	75 <sup>II,V</sup>	77 <sup>II,V</sup>	34 <sup>I,III,IV</sup>	57	<b>5,12</b>	0,0005
Ga	0,0012 <sup>V</sup>	0,0017	0,0014	0,0020 <sup>V</sup>	0,0038 <sup>I,IV,VI</sup>	0,0083 <sup>V</sup>	<b>4,12</b>	0,003
Ge	0,012	0,011	0,013	0,0058	0,0077	0,0060	1,54	0,19
Hg	45	47	28	118	167	72	1,29	0,28
Li	0,0044	0,0055	0,0035	0,0057	0,010	0,0061	<b>3,23</b>	0,01
Mn	11,9	11,7	11,6	10,5	12,6	6,8	1,7	0,15
Mo	2,3	1,9	2,0	2,0	2,0	1,7	1,79	0,13
Ni	0,015 <sup>V</sup>	0,010 <sup>V</sup>	0,0085 <sup>V</sup>	0,0072 <sup>V</sup>	0,11 <sup>I,II,III,IV,VI</sup>	0,010 <sup>V</sup>	<b>13,1</b>	< 0,0001
Pb	0,034	0,048	0,046	0,067	0,082	0,049	1,71	0,14
Rb	8,8 <sup>VI</sup>	6,4	7,6	7,8	5,8	4,7 <sup>I</sup>	<b>3,44</b>	0,008
Sb	0,0028	0,0038	0,0021	0,0041	0,0052	0,0070	<b>2,92</b>	0,02
Se	19	17	12	44	63	30	1,65	0,16
Si	3,6	4,4	4,8	4,8	8,6	1,7	2,3	0,06



Tabela 18. – c.d.

Sn	0,26	0,74	0,44	1,4	0,18	0,31	0,74	0,6
Sr	0,27 <sup>V,VI</sup>	0,14 <sup>V,VI</sup>	0,075 <sup>V,VI</sup>	0,17 <sup>V,VI</sup>	0,38 <sup>I,II,III,IV</sup>	0,76 <sup>I,II,III,IV</sup>	<b>10</b>	< 0,0001
Th	0,00036	0,00028 <sup>V</sup>	0,00018 <sup>V</sup>	0,00019 <sup>V</sup>	0,00065 <sup>II,III,IV,VI</sup>	0,00011 <sup>V</sup>	<b>3,83</b>	0,004
Tl	0,0096	0,010 <sup>IV,V</sup>	0,0056	0,0066 <sup>II</sup>	0,0051 <sup>II</sup>	0,0042	<b>4,68</b>	0,001
V	0,090	0,28	0,17	0,22	0,39	0,20	2,11	0,08
W	0,0011	0,0035	0,0022	0,0021	0,0029	0,0012	1,97	0,09
Zn	196	166	162	182	210	129	<b>2,53</b>	0,04
<b>Makropierwiastki</b>								
Ca	246	177	167 <sup>V</sup>	178 <sup>V</sup>	252 <sup>III,IV</sup>	325	<b>3,26</b>	0,01
Fe	1030	858 <sup>V</sup>	942	1010	1414 <sup>II</sup>	1158	<b>2,83</b>	0,02
K	24600	24013	24525	23582	23428	21372	0,65	0,67
Mg	603	611	621	602	610	526	1,3	0,27
Na	4014 <sup>V</sup>	3979 <sup>V</sup>	4237 <sup>V</sup>	4549	5437 <sup>I,II,III</sup>	4530	<b>4,43</b>	0,002
P	8976 <sup>VI</sup>	8817 <sup>VI</sup>	9133 <sup>VI</sup>	8688	8309	7048 <sup>I,II,III</sup>	<b>4,41</b>	0,002
S	10026	10217	10390 <sup>IV,VI</sup>	10099 <sup>III</sup>	9758	9124 <sup>III</sup>	<b>3,02</b>	0,02
<b>Pierwiastki ziem rzadkich</b>								
Ce	0,034	0,075	0,053	0,077	0,10	0,031	1,16	0,34
Dy	0,00037	0,00067	0,00053	0,0010	0,00080	0,00031	2,19	0,07
Er	0,00035	0,00060	0,00046	0,0010	0,00074	0,00026	1,65	0,16
Ho	0,00012	0,00020	0,00015	0,00033	0,00024	0,00010	0,94	0,46
La	0,019	0,045	0,031	0,045	0,060	0,017	0,97	0,44
Lu	0,000035	0,000048	0,000036	0,00011	0,000056	0,000021	<b>2,35</b>	0,05
Nd	0,015	0,029	0,022	0,031	0,038	0,013	1,09	0,37
Pr	0,0038	0,0077	0,0056	0,0080	0,010	0,0034	1,04	0,4
Sm	0,0022	0,0038	0,0030	0,0043	0,0051	0,0019	1,21	0,31
Tb	0,00019	0,00031	0,00027	0,00039	0,00039	0,00015	1,59	0,18
Y	0,0033	0,0051	0,0041	0,0082	0,0059	0,0023	1,68	0,15
Yb	0,00022	0,00037	0,00023	0,00079	0,00042	0,00015	<b>2,45</b>	0,04

w porównaniu do średnich stężeń tych pierwiastków oznaczonych w próbkach z pozostałych obszarów. Natomiast średnie stężenia takich pierwiastków jak Ba, Fe, Ga, Li, Na i Th (Tukey HSD;  $p < 0,05$ ) w grupie V okazały się statystycznie najniższe w porównaniu do pozostałych obszarów. W przypadku stężeń takich pierwiastków jak Cu, P, Rb, S i Tl statystycznie najwyższe okazały się te wartości, które obliczono dla grup I-III. Analiza wariancji przeprowadzona dla Cd nie wykazała statystycznie istotnych różnic dla stężenia tego pierwiastka pomiędzy analizowanymi obszarami geograficznymi. Jednak przeprowadzony test *post hoc* ujawnił, że w obrębie grupy V występuje statystycznie niższe stężenie tego pierwiastka w porównaniu do grupy II i III (Tukey HSD;  $p < 0,007$ ).

### 6.2.2. Wpływ wieku fok szarych na zawartość pierwiastków w próbkach wątroby

Korzystając z jednoczynnikowej analizy wariancji zbadano wpływ trzech grup wiekowych (szczenięta, młodociane i dorosłe) na średnią zawartość pierwiastków w próbkach wątroby. W wyniku analizy ujawniono silny wpływ zmiennej wiek na zawartość niektórych pierwiastków (tabela 19).

Tabela 19. Ocena wpływu grupy wiekowej na średnie stężenia pierwiastków w próbkach wątroby (wartości zaznaczone pogrubioną czcionką wskazują statystycznie istotne różnice) oraz występowanie statystycznie istotnych różnic pomiędzy poszczególnymi grupami (litery przy średniej wartości stężenia wskazują pomiędzy, którymi grupami wiekowymi istnieją statystycznie istotne różnice, test Tukeya)

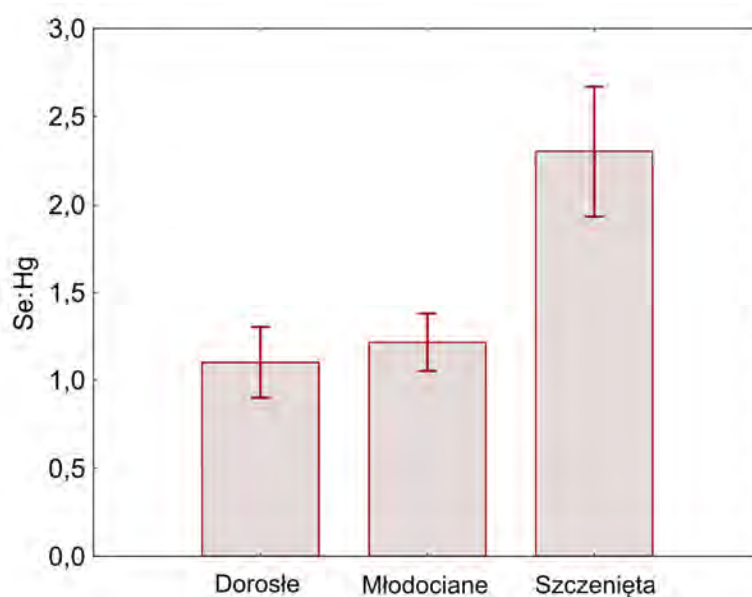
	grupa wiekowa			F <sub>2,71</sub>	p
	Szczenięta (a)	Młodociane (b)	Dorosłe (c)		
	Średnie stężenia [ $\mu\text{g/g}$ ]				
<b>Pierwiastki śladowe</b>					
Ag	0,13 <sup>c,b</sup>	0,36 <sup>a</sup>	0,64 <sup>a</sup>	<b>9,52</b>	0,0002
As	0,57	0,44	0,51	0,85	0,43
B	0,019 <sup>c</sup>	0,023 <sup>c</sup>	0,059 <sup>a,b</sup>	<b>5,7</b>	0,005
Ba	0,015	0,019	0,021	0,43	0,65
Bi	0,033 <sup>b,c</sup>	0,18 <sup>a,c</sup>	0,67 <sup>a,b</sup>	<b>24,92</b>	< 0,0001
Cd	0,15 <sup>b,c</sup>	2,0 <sup>a,c</sup>	1,3 <sup>a,b</sup>	<b>22,01</b>	< 0,0001
Co	0,051	0,053	0,071	<b>8,27</b>	0,0006
Cs	0,050	0,052	0,058	0,84	0,43
Cu	38 <sup>b</sup>	80 <sup>a,c</sup>	53 <sup>b</sup>	<b>10,59</b>	0,0002
Ga	0,00091 <sup>c</sup>	0,0029 <sup>c</sup>	0,0023 <sup>a,b</sup>	<b>11</b>	< 0,0001
Ge	0,011	0,0083	0,0093	0,35	0,7
Hg	3,5 <sup>b,c</sup>	38 <sup>a,c</sup>	141 <sup>a,b</sup>	<b>31,9</b>	< 0,0001

Tabela 19. – c.d.

Li	0,0054	0,0045 <sup>c</sup>	0,0068 <sup>b</sup>	<b>4,05</b>	0,02
Mn	12	10	12	0,53	0,59
Mo	1,5 <sup>b,c</sup>	1,9 <sup>a</sup>	2,2 <sup>a</sup>	<b>14,38</b>	< 0,0001
Ni	0,011	0,014	0,026	0,27	0,76
Pb	0,047	0,051	0,061	1,29	0,28
Rb	6,3	7,0	7,4	0,07	0,93
Sb	0,0014 <sup>b,c</sup>	0,0030 <sup>a,c</sup>	0,0057 <sup>a,b</sup>	<b>22,73</b>	< 0,0001
Se	2,6 <sup>b,c</sup>	16 <sup>a,c</sup>	52 <sup>a,b</sup>	<b>22,84</b>	< 0,0001
Si	5,9	4,5	4,4	0,7	0,5
Sn	0,049 <sup>b,c</sup>	0,38 <sup>a,c</sup>	1,4 <sup>a,b</sup>	<b>13,75</b>	< 0,0001
Sr	0,14	0,26	0,21	2,69	0,07
Th	0,00035	0,00030	0,00022	0,73	0,48
Tl	0,0080	0,0068	0,0083	1,1	0,34
V	0,047 <sup>c</sup>	0,10 <sup>c</sup>	0,41 <sup>a,b</sup>	<b>56,23</b>	< 0,0001
W	0,0020	0,0018	0,0032	1,23	0,29
Zn	140 <sup>c</sup>	169	193 <sup>a</sup>	<b>5,03</b>	0,009
<b>Makropierwiastki</b>					
Ca	178	230	182	0,14	0,87
Fe	778	1020	1063	1,16	0,32
K	22410	24388	23665	0,5	0,59
Mg	620	600	600	0,5	0,62
Na	4147	4377	4399	0,81	0,45
P	8900	8730	8534	0,9	0,39
S	9586 <sup>c</sup>	9928	10339 <sup>a</sup>	<b>4</b>	0,02
<b>Pierwiastki ziem rzadkich</b>					
Ce	0,015 <sup>b,c</sup>	0,037 <sup>a,c</sup>	0,11 <sup>a,b</sup>	<b>32,23</b>	< 0,0001
Dy	0,00018 <sup>c</sup>	0,00062 <sup>c</sup>	0,00097 <sup>a,b</sup>	<b>30,55</b>	< 0,0001
Er	0,00014 <sup>b,c</sup>	0,00065 <sup>a,c</sup>	0,00085 <sup>a,b</sup>	<b>29,86</b>	< 0,0001
Ho	0,000059 <sup>c</sup>	0,00021 <sup>c</sup>	0,00028 <sup>a,b</sup>	<b>25,56</b>	< 0,0001
La	0,0084 <sup>b,c</sup>	0,022 <sup>a,c</sup>	0,067 <sup>a,b</sup>	<b>33,7</b>	< 0,0001
Lu	0,000021 <sup>c</sup>	0,000077 <sup>c</sup>	0,000060 <sup>a,b</sup>	<b>15,23</b>	< 0,0001
Nd	0,0062 <sup>b,c</sup>	0,015 <sup>a,c</sup>	0,044 <sup>a,b</sup>	<b>30,85</b>	< 0,0001
Pr	0,0015 <sup>b,c</sup>	0,0040 <sup>a,c</sup>	0,012 <sup>a,b</sup>	<b>32,21</b>	< 0,0001
Sm	0,00088 <sup>b,c</sup>	0,0023 <sup>a,c</sup>	0,0058 <sup>a,b</sup>	<b>31,18</b>	< 0,0001
Tb	0,000071 <sup>b,c</sup>	0,00024 <sup>a,c</sup>	0,00046 <sup>a,b</sup>	<b>30,66</b>	< 0,0001
Y	0,0014 <sup>b,c</sup>	0,0053 <sup>a,c</sup>	0,0073 <sup>a,b</sup>	<b>29,37</b>	< 0,0001
Yb	0,000097 <sup>c</sup>	0,00055 <sup>c</sup>	0,00048 <sup>a,b</sup>	<b>27,73</b>	< 0,0001

Ogólnie foki z grupy dorosłych osobników charakteryzowały się wyższymi średnimi stężeniami pierwiastków niż foki z grupy młodocianych i szczeniąt, co może świadczyć o występowaniu zjawiska bioakumulacji wśród badanych osobników. Odwrotną zależność stwierdzono w przypadku Cu, gdzie próbki pochodzące od grupy młodocianych osobników zawierały najwyższe stężenia w porównaniu do szczeniąt i dorosłych (Tukey HSD;  $p < 0,0005$ ). Silny wpływ zmiennej wiek ( $F_{2,71} > 20$ ) zaobserwowano dla takich pierwiastków jak Bi, Cd, Hg, Sb, Se, V. Stężenia pierwiastków z grupy pierwiastków ziem rzadkich (REEs) również były wyższe w przypadku osobników najstarszych w porównaniu do pozostałych ( $p < 0,0001$ ). Spośród pierwiastków zaliczanych do grupy makroelementów jedynie stężenia siarki różniły się w sposób statystycznie istotny pomiędzy grupami wiekowymi.

Sprawdzono również czy grupa wiekowa wpływa w sposób statystycznie istotny na wartość stosunku molowego Se:Hg. Obliczone wartości liczbowe tego stosunku zawierały się w przedziale 0,84 – 3,9. Nie zaobserwowano statystycznie istotnego wpływu zmiennej obszar geograficzny na wartość tego stosunku ( $F_{5,68} = 0,23$ ,  $p = 0,95$ ), natomiast stwierdzono silny wpływ wieku na tę wartość ( $F_{2,71}=18$ ,  $p < 0,0001$ ). Na rysunku 18 przedstawiono średnią wartość liczbową stosunku molowego Se:Hg w poszczególnych grupach wiekowych. Wartość tego stosunku była statystycznie istotnie wyższa w przypadku szczeniąt ( $2,5 \pm 0,86$ ) w porównaniu do młodocianych ( $1,3 \pm 0,51$ ) i dorosłych ( $0,97 \pm 0,11$ ) (Tukey HSD;  $p < 0,001$ ). Różnice w średnich wartościach liczbowych stosunku Se:Hg pomiędzy grupą dorosłych i młodocianych również okazały się być statystycznie istotne (Tukey HSD;  $p < 0,0004$ ).



Rysunek 18. Średnie wartości liczbowe stosunku Se:Hg w obrębie różnych grup wiekowych.

### 6.2.3. Korelacje pomiędzy pierwiastkami, stałymi izotopami węgla i azotu oraz danymi biometrycznymi (wiek, długość i masa ciała)

Wyznaczenie wartości liczbowych współczynników korelacji Pearsona umożliwiło wskazanie pomiędzy, którymi stężeniami pierwiastków w tkance wątroby istnieje liniowa zależność. Najsilniejsze (takie, dla których wartość współczynnika korelacji była większa lub równa 0,7) wykryte korelacje zestawiono w tabeli 20.

Tabela 20. Statystycznie istotne współzależności między pierwiastkami ( $r \geq 0,7$ ) w próbkach wątroby fok szarych (wszystkie podane zależności mają charakter dodatni i zostały określone dla  $p < 0,01$ )

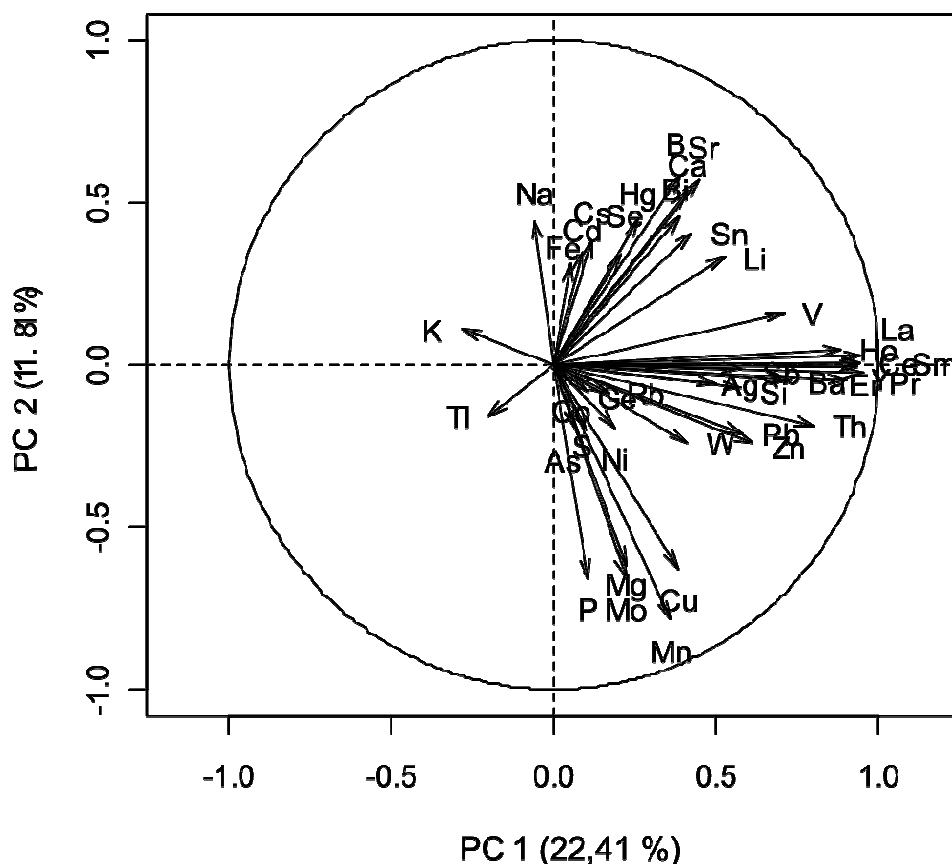
<b>Ag</b>	Bi, Se, Hg	<b>Mo</b>	Zn
<b>Bi</b>	Ag, Hg, Se	<b>Nd</b>	Ce, Dy, Er, Ga, Ho, La, Lu, Pr, Sm, Tb, V, Y, Yb
<b>Ca</b>	Sr	<b>P</b>	Mg
<b>Cd</b>	Ce, La, Nd, Pr, Sm, Tb, Y	<b>Pr</b>	Ce, Dy, Er, Ga, Ho, La, Lu, Nd, Sm, Tb, V, Y, Yb
<b>Ce</b>	Cd, Dy, Er, Ga, Ho, La, Lu, Nd, Pr, Sm, Tb, V, Y, Yb	<b>Se</b>	Ag, Bi, Hg
<b>Dy</b>	Ce, Er, Ga, Ho, La, Lu, Nd, Pr, Sm, Tb, V, Y, Yb	<b>Sm</b>	Ce, Dy, Er, Ga, Ho, La, Lu, Nd, Pr, Tb, V, Y, Yb
<b>Er</b>	Ce, Dy, Ga, Ho, La, Lu, Nd, Pr, Sm, Tb, V, Y, Yb	<b>Sr</b>	Ca
<b>Ga</b>	Ce, Dy, Er, Ho, La, Lu, Nd, Pr, Sm, Tb, V, Y, Yb	<b>Tb</b>	Ce, Dy, Er, Ga, Ho, La, Lu, Nd, Pr, Sm, V, Y, Yb
<b>Hg</b>	Ag, Bi, Se	<b>V</b>	Ce, Dy, Er, Ga, Ho, La, Lu, Nd, Pr, Sm, Tb, Y, Yb
<b>Ho</b>	Ce, Dy, Er, Ga, La, Lu, Nd, Pr, Sm, Tb, V, Y, Yb	<b>Y</b>	Ce, Dy, Er, Ga, Ho, La, Lu, Nd, Pr, Sm, Tb, V, Yb
<b>La</b>	Ce, Dy, Er, Ga, Ho, Lu, Nd, Pr, Sm, Tb, V, Y, Yb	<b>Yb</b>	Ce, Dy, Er, Ga, Ho, La, Lu, Nd, Pr, Sm, Tb, V, Y
<b>Lu</b>	Ce, Dy, Er, Ga, Ho, La, Nd, Pr, Sm, Tb, V, Y, Yb	<b>Zn</b>	Mo
<b>Mg</b>	P		

W przypadku badania korelacji pomiędzy wartością stałych izotopów i stężeń pierwiastków najsilniejsze związki pomiędzy zmiennymi określono dla  $\delta^{15}\text{N-Ag}$ ,  $\delta^{15}\text{N-Ni}$ ,  $\delta^{15}\text{N-Sn}$ ,  $\delta^{13}\text{C-Hg}$  i  $\delta^{13}\text{C-Se}$  ( $p < 0,001$ ). Natomiast najsłabiej skorelowane były  $\delta^{15}\text{N}$  z takimi pierwiastkami jak B, Cs, Ga, Sb, Sr, V i Zn ( $p < 0,01$ ). Silne korelacje zaobserwowano pomiędzy pierwiastkami ziem rzadkich ( $r > 0,84$ ,  $p < 0,001$ ) oraz długością ciała ( $p < 0,005$ ).

### 6.3. Analiza głównych składowych (PCA)

W wyniku przeprowadzonej analizy PCA wyznaczono cztery główne składowe (których wartości własne były większe od jedności) wyjaśniających ponad 57 % całkowitej zmienności danych. Na rysunku 19 przedstawiono wykres zmiennych uwidaczniający ich wpływ na dwie pierwsze główne składowe (w tabeli 21 przedstawiono wszystkie zmienne opisujące daną główną składową, ładunki znaczące wyróżniono pogrubioną czcionką). Każda z tych zmiennych jest reprezentowana na rysunku w postaci wektora, którego długość i kierunek określa, w jakim stopniu każda ze zmiennych wpływa na poszczególne składowe główne. Ponadto z wykresu można odczytać zależności występujące między zmiennymi:

- gdy dwie zmienne leżą na wykresie blisko siebie, oznacza to, że są ze sobą silnie dodatnio skorelowane;
- gdy są do siebie prostopadłe, oznacza to, że nie występuje między nimi korelacja;
- gdy znajdują się po przeciwnych stronach, oznacza to, że są silnie ujemnie skorelowane.



Rysunek 19. Położenie wektorów ładunków względem dwóch pierwszych głównych składowych.

Pierwsza składowa główna (PC1) jest skonstruowana głównie z pierwiastków należących do grupy metali ziem rzadkich (Ce, Er, Ho, La, Pr, Sm, Y), które wnoszą podobny wkład w główną składową i są ze sobą dodatnio skorelowane oraz takie pierwiastki jak Ba, Th, V i Zn, których udział jest nieco mniejszy. Można ją zatem zinterpretować jako zawartość pierwiastków pochodzenia antropogenicznego, które odzwierciedlają wpływ różnych przejawów antropopresji na foki szare. Wśród zmiennych opisujących drugą główną składową (PC2) wyraźnie zaznaczyły się dwie grupy pierwiastków; w skład pierwszej wchodzi takie pierwiastki jak B, Ca, Sr, natomiast do drugiej grupy można zaliczyć: Cu, Mg, Mn, Mo i P. Pierwiastki jednej grupy są ujemnie skorelowane z pierwiastkami z drugiej grupy i wszystkie są zaliczane do grupy biopierwiastków. W skład trzeciej składowej (PC3) wchodzi pierwiastki zaliczane do grupy metali ciężkich (Hg, Ni i Sn) oraz Se, który poprzez interakcje z rtęcią zmniejsza jej toksyczność. Ostatnia główna składowa (PC4) jest opisywana w głównej mierze przez takie pierwiastki jak Co i S. Siarka w organizmie występuje jako jeden z głównych składników budulcowych białek i witamin, ale również jako czynnik wspomagający usuwanie toksyn z wątroby, stąd też prawdopodobnie wynika największy udział siarki i kobaltu (jako metalu ciężkiego, który może podlegać akumulacji) w obrębie czwartej składowej.

Tabela 21. Wartości ładunków czynnikowych wyznaczonych dla stężeń pierwiastków w próbkach wątroby pobranych od fok szarych

Pierwiastek	Ładunki składowych			
	PC1	PC2	PC3	PC4
Ag	0,50	-0,06	0,35	-0,46
As	0,06	-0,20	-0,30	0,28
B	0,39	<b>0,58</b>	-0,16	-0,06
Ba	<b>0,73</b>	-0,05	-0,12	0,10
Bi	0,39	0,46	0,45	0,06
Ca	0,41	<b>0,53</b>	-0,02	-0,03
Cd	0,09	0,34	0,34	0,45
Ce	<b>0,94</b>	0,01	-0,01	-0,15
Co	0,04	-0,05	-0,22	<b>0,69</b>
Cs	0,12	0,38	0,08	0,40
Cu	0,38	<b>-0,63</b>	0,44	-0,28
Er	<b>0,90</b>	-0,05	-0,13	-0,12
Fe	0,05	0,31	-0,30	-0,40
Ge	0,10	-0,08	0,03	0,08
Hg	0,26	0,45	<b>0,77</b>	0,13
Ho	<b>0,88</b>	0,05	-0,19	-0,12
K	-0,28	0,11	0,15	-0,16
La	<b>0,95</b>	0,03	0,04	-0,14

Tabela 31. – c.d.

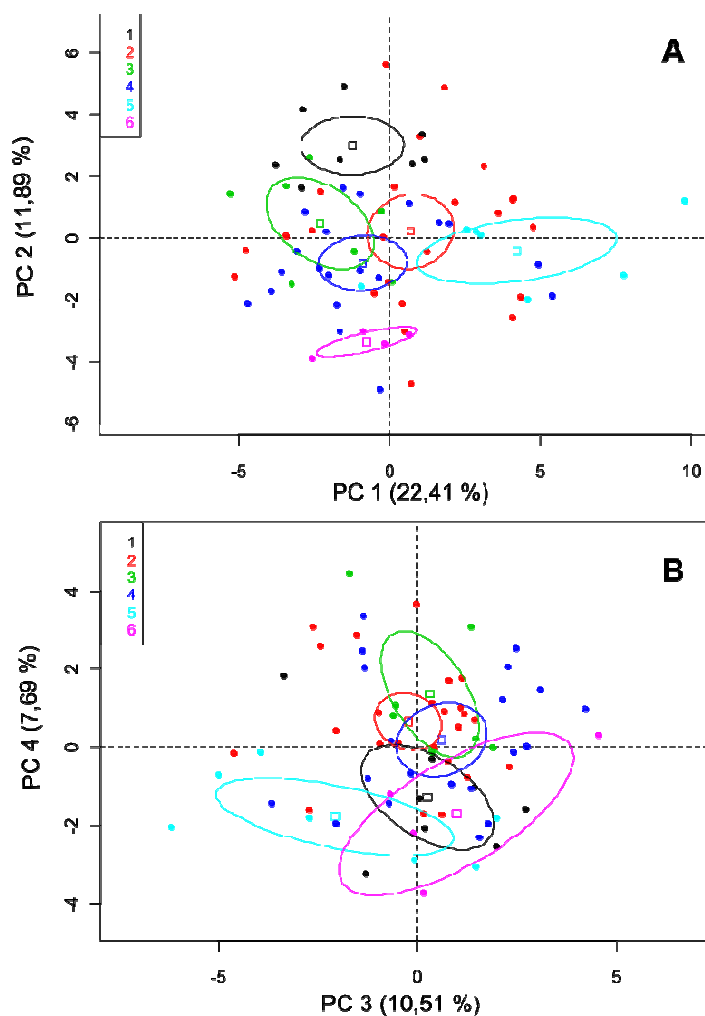
Li	0,53	0,33	-0,23	0,37
Mg	0,22	<b>-0,62</b>	0,18	0,25
Mn	0,36	<b>-0,78</b>	0,22	0,09
Mo	0,22	<b>-0,66</b>	0,38	-0,16
Na	-0,06	0,44	-0,25	0,49
Ni	0,19	-0,19	<b>-0,67</b>	0,16
P	0,10	<b>-0,66</b>	0,17	0,31
Pb	<b>0,58</b>	-0,21	-0,11	0,33
Pr	<b>0,95</b>	-0,03	0,01	-0,10
Rb	0,17	-0,09	0,52	0,29
S	0,10	-0,20	0,27	<b>0,67</b>
Sb	<b>0,57</b>	-0,01	0,23	0,00
Se	0,20	0,34	<b>0,60</b>	0,21
Si	0,58	-0,07	-0,36	0,02
Sm	<b>0,94</b>	0,00	-0,02	-0,05
Sn	0,42	0,41	<b>0,62</b>	0,04
Sr	0,44	<b>0,57</b>	0,01	-0,18
Th	<b>0,80</b>	-0,19	-0,41	-0,15
Tl	-0,20	-0,16	0,00	0,51
V	<b>0,71</b>	0,16	-0,16	0,23
W	0,41	-0,24	-0,22	0,10
Y	<b>0,93</b>	0,00	-0,13	-0,03
Zn	<b>0,61</b>	-0,24	0,40	0,02
Zmienność całkowita [%]	22,41	11,9	10,1	7,8

Przedstawienie wyników dla poszczególnych osobników fok w układzie dwóch pierwszych głównych składowych zostało umieszczone na rysunku 20 A. Różnymi kolorami zaznaczono obiekty (foki) przyporządkowane do poszczególnych obszarów geograficznych Morza Bałtyckiego, w obrębie których były znajdowane ich zwłoki. Wstępna wizualna ocena otrzymanego wykresu pozwala zauważyć odrębne grupowanie się obiektów przyporządkowanych do obszaru 1 (Zatoka Botnicka), obszaru 5 (wybrzeże polskie) i obszaru 6 (Basen Bornholmski) oraz wspólne grupowanie się obiektów przyporządkowanych do obszaru 2 (Morze Botnickie), 3 (Morze Alandzkie) i 4 (Niecka Zachodniogotlandzka). Nakładanie się obiektów z obszarów 2, 3 i 4 prawdopodobnie w głównej mierze wynika z bliskiego geograficznego położenia tych obszarów względem siebie i możliwej migracji fok pomiędzy nimi. Trudno również ocenić czy wyodrębnianie się grup 1, 5 i 6 wynika z różnych zawartości pierwiastków w próbkach wątroby fok z danego obszaru czy jest może efektem małej liczebności tych grup w porównaniu do grup z centralnej części Bałtyku.

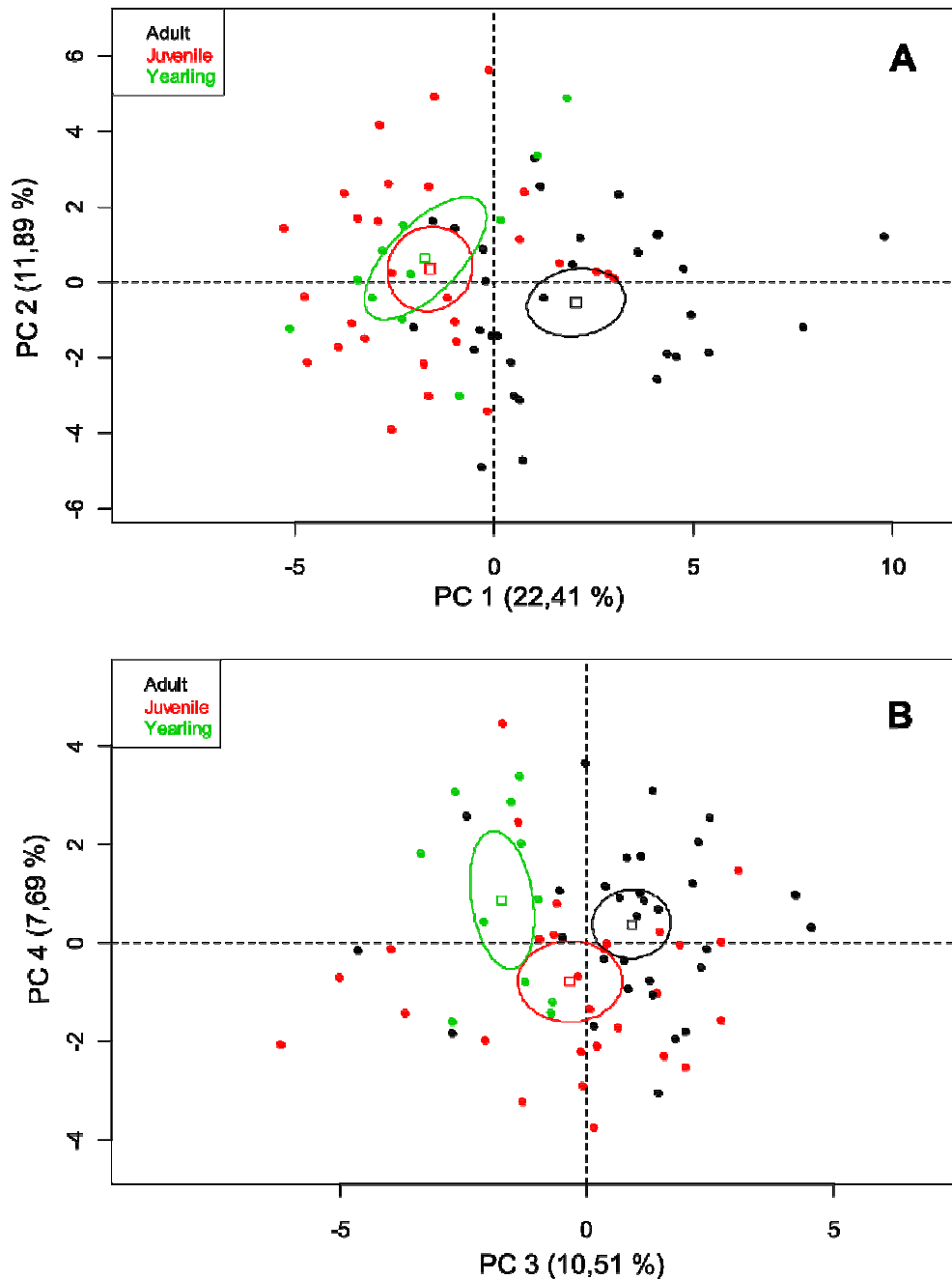


Wykonanie wykresu przedstawiającego rozrzut obiektów w płaszczyźnie kolejnych głównych składowych (rysunek 20 B) również nie pozwala na jednoznaczne wyodrębnienie poszczególnych grup geograficznych. Tym samym niemożliwe staje się stwierdzenie, że na podstawie zawartości określonych pierwiastków można rozpoznać z jakiego obszaru Bałtyku pochodziły foki, od których pobrano próbki.

Na rysunku 21 przedstawiono wykres przedstawiający rozrzut obiektów w płaszczyźnie dwóch pierwszych głównych składowych (część A) oraz trzeciej i czwartej składowej (część B), na którym, zamiast geograficznej przynależności fok, zaznaczono przynależność do danej grupy wiekowej. Wizualna ocena pozwala zauważyć wyraźne grupowanie się obiektów w grupy wiekowe, co może potwierdzać zjawisko występowania bioakumulacji pierwiastków wraz z wiekiem osobnika.



Rysunek 20. Wykres przedstawiający rozrzut obiektów w płaszczyźnie: A – dwóch pierwszych głównych składowych, B – trzeciej i czwartej głównej składowej. Numery 1-6 oznaczone odpowiednimi kolorami oznaczają obszar geograficzny Morza Bałtyckiego.



Rysunek 21. Wykres przedstawiający rozrzut obiektów w płaszczyźnie: A – dwóch pierwszych głównych składowych, B – trzeciej i czwartej głównej składowej. Odpowiednimi kolorami oznaczono grupy wiekowe fok.

## 7. Omówienie uzyskanych wyników

### 7.1. Zawartość stałych izotopów węgla i azotu

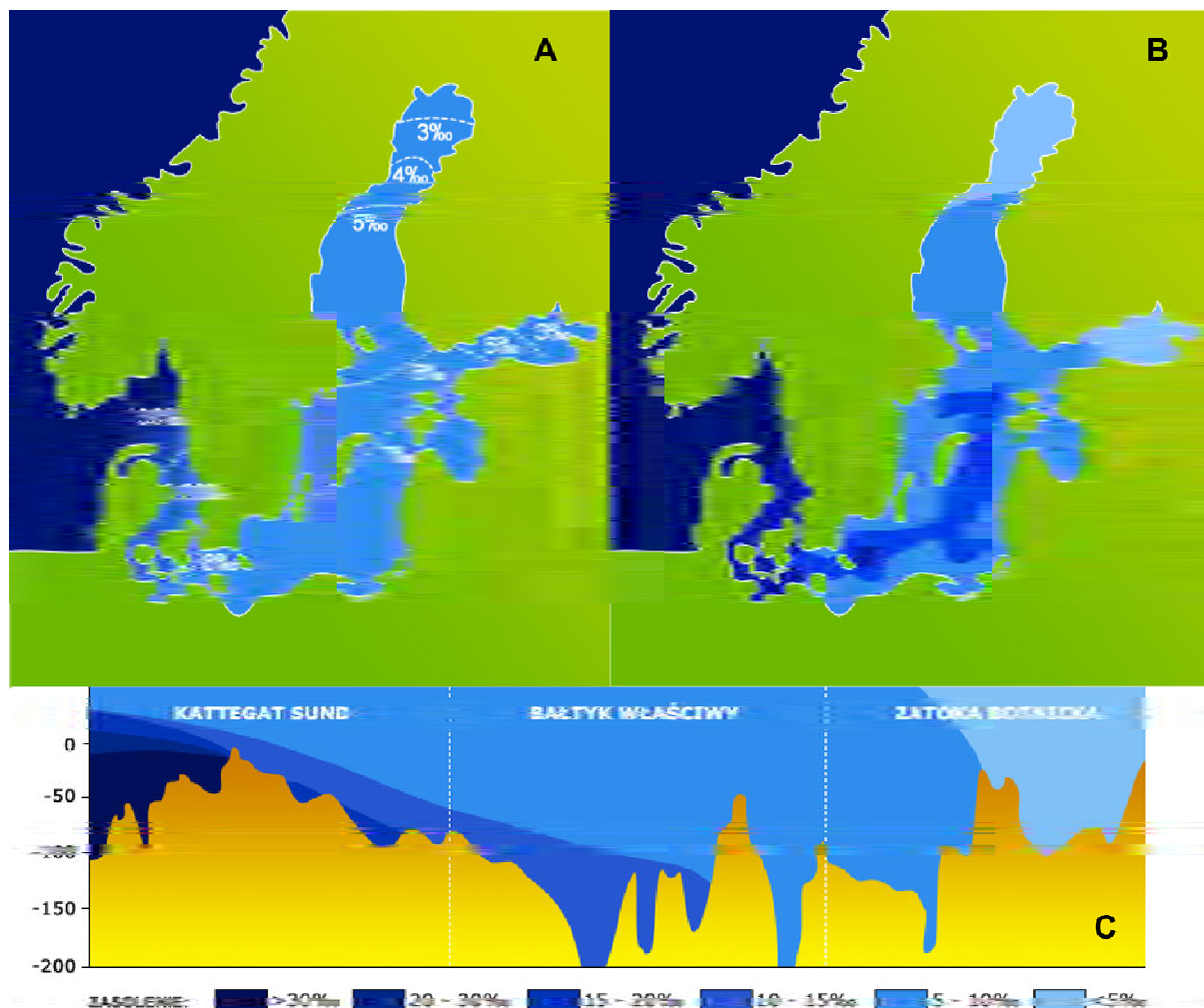
Powszechnie wiadomo, że zanieczyszczenia mogą podlegać procesowi bioakumulacji wzdłuż łańcucha pokarmowego. Z tego względu coraz częściej obok oznaczania samych zanieczyszczeń przeprowadza się oznaczenia stałych izotopów węgla i azotu w celu oceny

pozycji troficznej badanego organizmu i zbadania preferencji żywieniowych, co pomaga w identyfikacji możliwych źródeł pochodzenia ksenobiotyków w badanym osobniku.

Wartości liczbowe  $\delta^{15}\text{N}$  i  $\delta^{13}\text{C}$  oznaczone w trakcie badań przeprowadzonych w ramach tej pracy są na podobnym poziomie jak te uzyskane w trakcie badań prowadzonych wśród fok szarych z Bałtyku przez innych autorów [183] i mieszczą się one w zakresie od - 8 do -21 ‰ dla  $\delta^{15}\text{N}$  oraz od 12 do 19 ‰ dla  $\delta^{13}\text{C}$ . Natomiast w przypadku fok szarych zamieszkujących inne obszary (np. Północnowschodni Atlantyk) oznaczono wyższe wartości tych parametrów, co wskazuje, że prawdopodobnie osobniki z tego obszaru żywią się organizmami znajdującymi się wyżej w piramidzie troficznej [184, 185]. Różnice w wartościach liczbowych  $\delta^{15}\text{N}$  uwiadcniają się również w przypadku badanych osobników z obszarów wewnątrz Bałtyku, wskazując na możliwe różnice w preferencjach żywieniowych fok szarych pomiędzy różnymi populacjami. Znacząco wyższe wartości liczbowe stosunku izotopów azotu oznaczono w przypadku fok przyporządkowanych do obszaru obejmującego polskie wybrzeże, co mogłoby wskazywać, że osobniki z tego rejonu znajdują się na wyższych szczeblach piramidy troficznej niż foki z pozostałych obszarów Bałtyku. Foki z grupy IV i VI również odzwierciedlają wyższe wartości  $\delta^{15}\text{N}$  w porównaniu do grup I-III. Jest to związane z występowaniem w Morzu Bałtyckim gradientu zasolenia (rysunek 22), a co za tym idzie częstotliwością występowania określonych gatunków ryb (np. dorsza, który rozmnaża się tylko w obszarach o zasoleniu  $\geq 10$  ‰ i znajduje się na wyższym poziomie troficznym niż śledź [183]). Im mniejsze zasolenie, tym mniejsza bioróżnorodność.

Oznaczone wyższe wartości liczbowe  $\delta^{13}\text{C}$  wśród osobników z południowych obszarów Bałtyku w porównaniu do obszarów północnych (Zatoka i Morze Botnickie) mogą wskazywać, że foki bytujące w tym obszarze chętniej żywią się gatunkami organizmów bentosowych [186], do których zaliczany jest dorsz i flądra. Gatunki tych ryb obok śledzia i siei pospolitej stanowią podstawę diety fok szarych. Natomiast w przypadku północnych obszarów Bałtyku do głównych składników diety fok zalicza się śledzia, łososia i flądre, czyli gatunki pelagiczne [6].

Na podstawie uzyskanych wartości liczbowe stosunku izotopów węgla można zauważyć zarysowującą się granicę pomiędzy dwoma obszarami Bałtyku obrazującą różne preferencje żywieniowe. Można tu wyróżnić część północną obejmującą grupę I i II oraz część południową obejmującą grupy IV, V i VI. Ze względu na to, że poziom zawartości różnych zanieczyszczeń w organizmach fok związany jest ze składem diety można spodziewać się występowania różnic w ich zawartości pomiędzy tymi dwoma obszarami.



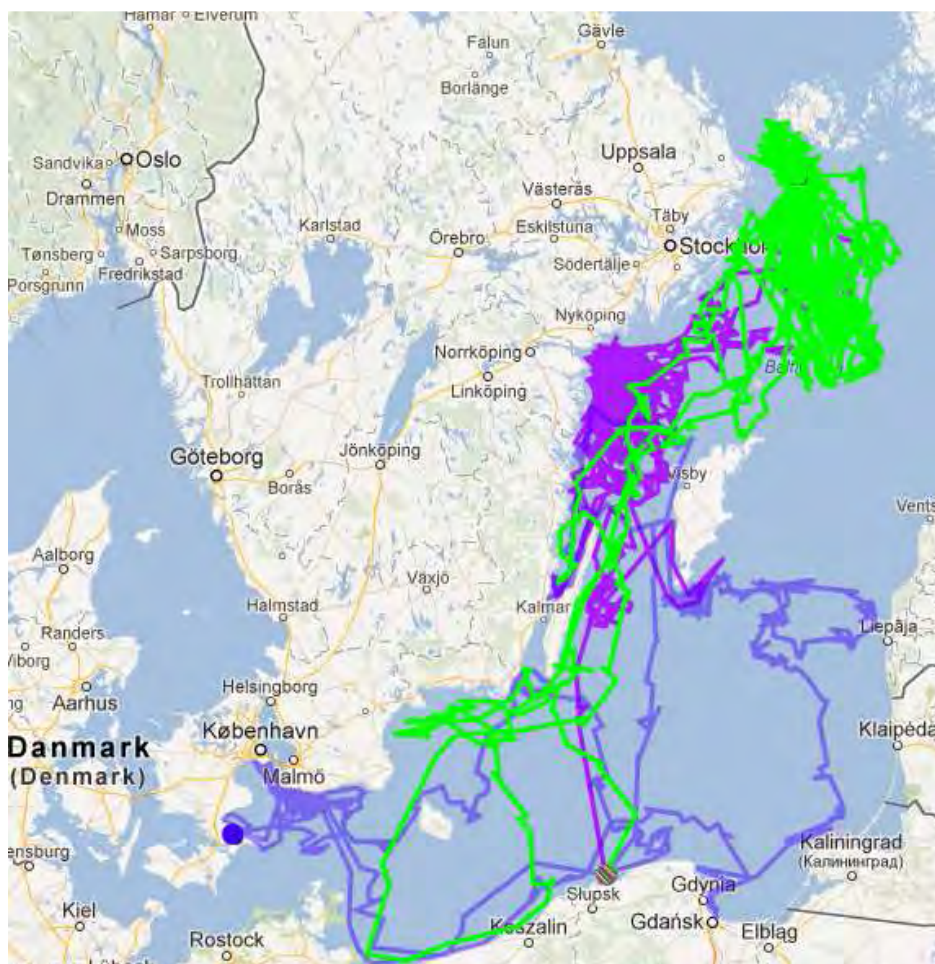
Rysunek 22. Zasolenie Morza Bałtyckiego: A – wody powierzchniowe, B – wody przydenne, C – na przekroju Kattegat – Zatoka Botnicka [187].

Uzyskane wyniki oznaczeń wskazują również znaczące różnice pomiędzy grupami wiekowymi. W próbkach pobranych od osobników dorosłych oznaczono wyższe wartości  $\delta^{15}\text{N}$  i  $\delta^{13}\text{C}$  mogące wskazywać na ich wyższą pozycję w łańcuchu troficznym w porównaniu do osobników młodocianych i szceniąt oraz preferencje żywieniowe ukierunkowane na gatunki bentosowe. Jest to związane z tym, że osobniki do pierwszego roku życia wykazują mniejsze zdolności do długiego nurkowania na duże głębokości, co sprawia, że odżywiają się one mniejszymi gatunkami pelagicznymi.

## 7.2. Przestrzenne zróżnicowanie zawartości pierwiastków w próbkach wątroby foczej

Uzyskane wyniki analiz chemicznych i statystycznych (tabela 18) wskazują, że obszar geograficzny, w obrębie którego znajdowano foki, wpływa na poziom zawartości w przypadku

tylko kilku pierwiastków (As, Cu, Zn, Rb, Tl, B, Ni i Sr). Jednak interpretując otrzymane wyniki należy pamiętać, że gromadzenie się pierwiastków w tkankach i organach ssaków morskich zależy nie tylko od stężeń tych substancji w środowisku i pożywieniu, ale również od procesów homeostatycznych zachodzących w organizmie, które odpowiadają za pobieranie, rozprowadzenie i wydalanie pierwiastków. Ponadto foki szare charakteryzują się dość dużymi sezonowymi migracjami pomiędzy różnymi obszarami Bałtyku [188]. Młode foki odbywają dalekodystansowe wędrówki do czasu znalezienia odpowiedniej dla siebie kolonii fok, z której w późniejszym czasie regularnie udają się na polowania. Na rysunku 23 przedstawiono migracje dwóch młodych fok wypuszczonych na wolność w 2010. Przedstawione dane obrazują informacje o trasach wędrówek tych fok przez pierwsze 9-10 miesięcy po wypuszczeniu na wolność.



Rysunek 23. Trasy wędrówek fok szarych wypuszczonych w 2010 roku [189].

Oszacowana powierzchnia charakteryzująca areal osobniczy indywidualnego osobnika foki szarej w Morzu Bałtyckim mieści się w zakresie od 1088 - 6400 km<sup>2</sup> [190], dlatego też

przyporządkowanie fok do określonych grup może okazać się kłopotliwe ze względu na możliwe migracje pomiędzy obszarami.

Dostępnych jest stosunkowo niewielka ilość źródeł informacji naukowych na temat aktualnych poziomów zawartości pierwiastków w tkankach fok szarych z obszaru Morza Bałtyckiego. Ostatnie doniesienia literaturowe na ten temat obejmujące dużą grupę badanych osobników pochodzą sprzed 10 lat [191]. W tabeli 21 zestawiono informacje na temat poziomów zawartości pierwiastków w wątrobie fok szarych z różnych obszarów geograficznych w skali światowej oraz innych ssaków morskich.

W przypadku arsenu najniższą zawartość oznaczono w próbkach wątroby pobranych od fok z obszaru Zatoki Botnickiej, podczas gdy najwyższą w próbkach wątroby pobranych od fok z obszaru Basenu Bornholmskiego. Różnice te można wytłumaczyć preferencjami żywieniowymi fok z tych obszarów. Jak już wspomniano, na podstawie wartości stosunku izotopów węgla można przypuszczać, że fok z południowego Bałtyku preferują gatunki organizmów przydennych. Ze względu na wysokie skażenie osadów dennych z obszaru południowego Bałtyku arsenem [5] organizmy żyjące w strefie przydennej mogą wykazywać kumulowanie tego pierwiastka w organizmie. Również osady z rejonu Zatoki Botnickiej zawierają znaczne ilości arsenu [192], ale ze względu na to, że foki bytujące w tym obszarze żerują raczej na osobnikach żyjących w strefie pelagicznej są w mniejszym stopniu narażone na akumulowanie arsenu. W tabeli przedstawiono wartości stężeń arsenu oznaczone przez inne zespoły badawcze i w przypadku próbek wątroby znajdują się na tym samym poziomie, jak uzyskane w tej pracy.

Zawartość takich składników jak Cu czy Zn związana jest ze stanem fizjologicznym danego osobnika. Wyższe zapotrzebowanie na te pierwiastki, które są niezbędne do prawidłowego funkcjonowania organizmu, wykazują osobniki młodociane będące w stanie intensywnego rozwoju [193, 194]. Fakt ten może stanowić wytłumaczenie wyższych poziomów stężeń w próbkach wątroby fok z grupy I, gdzie większość stanowią osobniki do 4 roku życia.

W przypadku pierwiastków takich jak Rb i Tl zaobserwowano, że ich zawartość w próbkach wątroby wzrasta w kierunku północnym. Rubid jest pierwiastkiem wykazującym podobne właściwości jak K i Cs, przez co jest podejrzewa się, że wchłaniany jest do organizmu tymi samymi drogami co K [195].

Tabela 21. Zestawienie informacji literaturowych na temat poziomów zawartości pierwiastków w próbkach wątroby ssaków morskich z różnych rejonów geograficznych podane jako wartości średnie (wyjątek stanowią niektóre wartości arsenu oznaczone w tkance tłuszczowej)

Gatunek	Obszar	Rok pobierania próbek	As	B	Ca	Cd	Co	Cr	Cu	Fe	Hg	K	Mg	Mn	Mo	Na	Ni	Pb	Se	Si	Sr	Tl	V	Zn	Lit.	
			µg/g s.m.																							
Foka szara	Bałtyk Właściwy	1980-1990	12*		79	0,059	0,050	0,35	46	1478	86		515	7,9			0,030	0,59	46				0,17	152	[42]	
	Bałtyk Południowy	1996-2003	<0,95	<0,65	270	0,16			20	1010	113	4140	360	5,9	1,3	2890				3,4	0,5			74,7	[196]	
	Zatoka Botnicka	1996-1998				1,3					257								66						[197]	
	Zatoka Liverpoolska	1989-1991				2			53		590													218	[198]	
	Francuskie wybrzeże	1998-2001				1,5			51		368													204	[199]	
	Wyspa Sable	1996-1998				5,9					360									92,4						[194]
	Wyspy owcze	1993-1995				5,1			39		60									23					57	[200]
Foka pospolita	Cieśnina Kalmarska	1983-1987	2,7*		211	0,066	0,026	0,46	13	1155	1,5		574	12			0,020	0,33	3,4				0,079	92	[42]	
Foka obrączkowa	Zatoka Botnicka	1980-1986	14*		168	2,1	0,059	0,15	15	3465	145		663	7,3			0,063	0,53	63				0,20	106	[42]	
Foka kaspijska	Azerbejdżan, Kazachstan, Turkmenistan	2000	0,52			2,8	0,061	0,33	17	3333	18			19	1,5			0,058	16			0,024	0,30	275	[201]	
Foka bajkalska	Jezioro Bajkał	2001			0,29	0,91	<0,07	<0,7	10,9	2540		6,53	0,54	6,16	0,56	3,2		<0,8	<1,7	6,26	0,66	<1,0		94,2	[202]	
Delfin pręboboki	Wybrzeże Japonii	1979-1982				17	0,041	0,52	34	670	430			8,7	4,6			0,079	140		2,1	0,011	0,26	129	[203]	

\* wartości oznaczone w tkance tłuszczowej

Wyniki badań przeprowadzone przez innych autorów mogą sugerować, że Rb jest pierwiastkiem niezbędnym do prawidłowego funkcjonowania organizmu [204]. Brak jest danych na temat zawartości rubidu w innych ssakach morskich z obszaru Bałtyku. Uzyskane wartości Rb są nieco wyższe w porównaniu do poziomów zawartości oznaczonych w tkankach grindwala ze wschodniego wybrzeża Stanów Zjednoczonych [205]. Większe stężenia Rb w próbkach wątroby pobranych od fok z grupy I mogą być związane z wysoką zawartością tego pierwiastka w pożywieniu fok. Badania przeprowadzone w latach 80-tych nad zawartością Rb w różnych gatunkach ryb ujawniły, że gatunki słodkowodne (np. pstrąg tęczowy lub sieja pospolita) zawierają wyższe stężenia tego pierwiastka w porównaniu do gatunków słonowodnych (np. śledzia lub dorsza) [206].

Z kolei Tl jest uważany za pierwiastek potencjalnie toksyczny, nawet bardziej niż rtęć czy kadm. Mimo to, badania dotyczące zawartości tego pierwiastka w różnych elementach biotycznych ekosystemów morskich należą do rzadkości. Jest to poniekąd związane z niską czułością wobec tego pierwiastka większości instrumentów analitycznych wykorzystywanych do oznaczeń pierwiastków [207]. Nie znaleziono żadnych informacji literaturowych na temat zawartości tego pierwiastka w organizmach bałtyckich, ale oznaczone w ramach tej pracy wartości znajdują się na podobnym poziomie jak te dla delfina pręgobokiego z wód w rejonie Japonii [203] i foki kaspijskiej [201].

Na podstawie uzyskanych danych dotyczących zawartości B i Ni można zauważyć wzrost ich zawartości w grupach od I do V, a wyjątek stanowią jedynie wartości uzyskane dla próbek pobranych od fok z grupy VI. Tendencja ta ma swoje odzwierciedlenie w wartościach  $\delta^{15}\text{N}$  i  $\delta^{13}\text{C}$ , co potwierdza, że nawyki żywieniowe fok wpływają na zawartość pierwiastków w ich organizmie. Ogólnie zawartość niklu w wątrobie fok szarych uważana jest za dość niską, w wielu pracach naukowych oznaczane zawartości tego pierwiastka znajdowały się poniżej wartości granicy wykrywalności [42, 196].

Również w przypadku strontu można zauważyć, że jego zawartość jest wyższa w próbkach wątroby pobranych od fok z obszaru V i VI w porównaniu do obszarów północnych. Próbki wątroby z obszaru Basenu Bornholmskiego zawierały wyższe stężenia w porównaniu do obszaru wybrzeża polskiego. Możliwe wyjaśnienie tej różnicy związane jest z wpływem zasolenia wody morskiej na zawartość strontu [208]. Organizmy bytujące w obszarze o wyższym zasoleniu (Basen Bornholmski) wykazywały większą zawartość strontu w porównaniu do obszarów o niskim zasoleniu (Zatka Botnicka). Korelacje występujące pomiędzy strontem, wapniem i barem potwierdzają podobieństwo



we właściwościach biogeochemicznych tych pierwiastków. Stront w wyniku podobnego do wapnia zachowania się w organizmie może zastępować go w niektórych procesach fizjologicznych [209].

Wpływ obszaru geograficznego na zawartość takich pierwiastków jak Ba, Li, Sb i Th był niewielki lub ich stężenia znajdowały się na poziomie lub poniżej poziomu wartości granicy wykrywalności. Z tego względu jakiegokolwiek zależności czy tendencje w zawartości tych pierwiastków były trudne do zaobserwowania.

### **7.3. Wpływ wieku na zawartość wybranych pierwiastków**

Uzyskane wyniki analiz chemicznych i statystycznych (tabela 19) wskazują na silny wpływ wieku fok szarych na zawartość niektórych pierwiastków, m.in. Bi, Cd, Hg, Sb, Se, Sn, V i pierwiastków ziem rzadkich. Średnie stężenia tych analitów okazały się najwyższe w grupie osobników dorosłych.

Wzrost zawartości rtęci w zależności od wieku organizmów ssaków morskich był wielokrotnie badany i dokumentowany przez inne grupy badawcze [41, 42, 49, 199]. Organizmy te przyswajają rtęć z pożywienia głównie w formie metylortęci, która jest bardziej toksyczna od formy nieorganicznej. Dlatego też zamiast oznaczania wyłącznie całkowitej zawartości tego pierwiastka coraz częściej zastępuje się oznaczaniem poszczególnych form specyficznych rtęci, a także innych pierwiastków toksycznych, w tym organicznych pochodnych cyny. Ze względu na nieudaną próbę opracowania procedury oznaczania metylortęci i związków cynoorganicznych w ramach rozprawy doktorskiej analiza próbek pod kątem tych ksenobiotyków nie została przeprowadzona.

Uważa się, że zawartość metylortęci w wątrobie ssaków morskich stanowi ok. 3-12 % całkowitej zawartości Hg [210]. Jednak zauważono spadek zawartości MeHg wraz z wiekiem, co spowodowane jest procesem demetylacji zachodzącym w wątrobie oraz potencjalnym udziałem selenu w tym procesie. Obecna w wątrobie rtęć łączy się z selenem, w wyniku czego powstaje kompleks tych dwóch pierwiastków, o czym może świadczyć wysoki współczynnik korelacji pomiędzy tymi pierwiastkami ( $r = 0,99$ ,  $p < 0,0001$ ). Zaobserwowano również, że stosunek Se:Hg zmniejsza się wraz z wiekiem. Wyższa zawartość selenu u osobników młodych może być związana z różnicami w sposobie odżywiania lub znacznie większym przenoszeniem Se od matki do dziecka w okresie karmienia w porównaniu do ilości przenoszonej rtęci. Potwierdzają to badania przeprowadzone na grupie matek i szczeniąt słoni morskich (*Mirounga angustirostris*), które wskazują, że największy transfer Se

od matki do dziecka następuje w okresie karmienia, podczas gry rtęć jest najintensywniej przekazywana w czasie ciąży, czyli do płodu [211].

Stężenia Hg i Se wykazywały silną pozytywną korelację z wartością liczbową  $\delta^{13}\text{C}$ , co wskazuje, że przyswajanie tych pierwiastków zależy w dużej mierze od preferencji żywieniowych. Ponadto wyższe stężenia oznaczono w przypadku osobników znalezionych w południowej części Bałtyku, gdzie prawdopodobnie fok preferują gatunki organizmów bentosowych.

Przeprowadzone badania ujawniły również akumulację kadmu wraz z wiekiem fok. Oznaczone stężenia są niższe w porównaniu do stężeń oznaczonych w próbkach organizmów morskich pochodzących z obszaru Arktyki i wód atlantyckich. Jest to związane z tym, że w obszarach tych wysokie zawartości kadmu występujące w środowisku są zjawiskiem naturalnym, przez co organizmy tam żyjące zdołały się do nich przystosować i nie wykazują w wyniku tego zaburzeń w funkcjonowaniu narządów (np. nerek) [18, 40]. W Morzu Bałtyckim stężenia Cd są stosunkowo małe, zatem bałtyckie organizmy morskie nie są przystosowane do jego podwyższonych zawartości i nawet małe zmiany w zawartości tego pierwiastka mogą objawiać się zaburzeniami w prawidłowym funkcjonowaniu.

Innym pierwiastkiem silnie skorelowanym z wiekiem fok jest wanad, co zostało również opisane w pracach naukowych innych autorów we wcześniejszych latach [42, 205]. Dostępne dane literaturowe na temat poziomów zawartości V w próbkach narządów ssaków morskich są raczej ograniczone. Sugeruje się, że V może być pierwiastkiem niezbędnym dla tej grupy organizmów ze względu na m.in. potencjalne działanie przeciwnowotworowe. Obecność tego pierwiastka w wątrobie badanych osobników może wynikać z jego obecności w środowisku jako efekt emisji, w wyniku spalania paliw.

Silną korelację pomiędzy zawartością a wiekiem fok określono również w przypadku cyny. Obecność tego pierwiastka i jego związków organicznych w wątrobie ssaków morskich była wielokrotnie badana, ze względu na dużą toksyczność zwłaszcza tych drugich. Obecność cyny w środowisku jest w głównej mierze spowodowana szerokim zastosowaniem związków cynoorganicznych, m.in. jako dodatek do farb przeciwporostowych stosowanych we wcześniejszych latach do pokrywania kadłubów statków, jako środek grzybobójczy i inne. Nagromadzenie przez ssaki związków cynoorganicznych w wątrobie i nerkach może prowadzić do obniżenia odporności zwierząt, co w konsekwencji może przyczynić się do rozwoju wielu chorób, np. zaniku grasicy, niedokrwistości, limfocytopenii oraz podatności na choroby zakaźne.

Związki cynoorganiczne mogą podlegać bioakumulacji w wątrobie organizmów morskich [73], gdzie prawdopodobnie są one metabolizowane i przechowywane w postaci cyny nieorganicznej. Wysokie zawartości cyny oznaczone w futrze organizmów z rodziny pletwonogich mogą wskazywać na możliwy mechanizm usuwania tego pierwiastka z organizmu właśnie poprzez sierść [212].

Znaczny wzrost zastosowania pierwiastków ziem rzadkich w przemyśle w ostatnich latach przyczynił się prawdopodobnie do zwiększenia ich obecności w organizmach morskich. Na podstawie uzyskanych wyników zaobserwowano silną korelację pomiędzy REE i wiekiem, co wskazuje na ich bioakumulację. Jednak jak dotąd istnieje niewiele publikacji naukowych dotyczących zawartości tych pierwiastków w różnych częściach ekosystemu morskiego i ich wpływu na nie.

#### **7.4. Możliwość wykorzystania fok szarych jako organizmów biowskaźnikowych**

W rozdziale drugim części teoretycznej tego opracowania podano kryteria jakie powinien spełniać organizm (lub grupa organizmów) w przypadku wykorzystania jako biowskaźników. Foka szara po części spełnia te warunki będąc potencjalnym kandydatem na organizm biowskaźnikowy do oceny stopnia zanieczyszczenia różnych części ekosystemu Morza Bałtyckiego, a mianowicie charakteryzuje się:

- szerokim zasięgiem występowania – poza strefą przybrzeżną Szwecji, Finlandii i Estonii coraz częściej można zaobserwować przedstawicieli tego gatunku w południowych obszarach Bałtyku,
- dużą liczebność populacji (wzrastającą w ostatnich latach), co sprawia, że wzrasta dostępność pozyskania próbek do badań,
- względnie dużą tolerancją w stosunku do badanych zanieczyszczeń (metale ciężkie),
- zajmowanie określonego poziomu troficznego.

Jednak dość spora mobilność fok pomiędzy różnymi obszarami Bałtyku wyklucza możliwość zastosowania tych organizmów do oceny stopnia zanieczyszczenia wybranych w tej pracy obszarów geograficznych. Bardzo bliskie położenie niektórych z wybranych obszarów stwarza duże prawdopodobieństwo, że miejsce znalezienia zwłok foki nie odzwierciedla jej faktycznego arealu osobniczego.

Na podstawie uzyskanych wartości stosunków stałych izotopów węgla i azotu można zauważyć zarysowującą się granicę pomiędzy dwoma obszarami Bałtyku obrazującą różne

preferencje żywieniowe. Z kolei różne preferencje żywieniowe w obrębie tych dwóch obszarów mogą przekładać się na określoną zawartość zanieczyszczeń w organizmach umożliwiając ich wykorzystanie jako biowskaźników. Zatem sugeruje się, aby w przyszłości rozpatrywać zdolności biowskaźnikowe fok szarych pod kątem oceny stopnia zanieczyszczenia jedynie dwóch głównych obszarów Bałtyku, z których pierwszy obejmowałby Zatokę Botnicką i Morze Botnickie, natomiast drugi obszar obejmowałby Nieckę Zachodniogotlandzką, Basen Bornholmski i wybrzeże polskie.

## 8. Podsumowanie

Wyniki badań prowadzonych w ramach rozprawy doktorskiej mogą być podstawą do wyciągnięcia następujących wniosków:

- W efekcie badań analitycznych ukierunkowanych na oznaczenie zawartości pierwiastków śladowych, makropierwiastków i metali ziem rzadkich w próbkach wątroby pobranych od fok szarych z obszaru Morza Bałtyckiego uzyskano zbiór informacji na temat poziomów zawartości tych analitów w organizmach z obszaru Morza Bałtyckiego. Istnieje bardzo nieliczna liczba publikacji przedstawiająca poziomy zawartości tych analitów w organizmach fok szarych. Ostatnie doniesienia literaturowe na ten temat pochodzą sprzed 10 lat [197]. Przedstawiony zbiór danych pomiarowych może stanowić istotne uzupełnienie stanu wiedzy na temat stopnia intoksykacji bałtyckich fok szarych przez metale ciężkie oraz inne pierwiastki.
- Oznaczono zawartość stałych izotopów węgla i azotu w celu lepszego poznania i zobrazowania preferencji żywieniowych fok szarych, a także w celu identyfikacji możliwych źródeł pochodzenia ksenobiotyków w badanym osobniku.
- Na podstawie uzyskanych wyników analiz statystycznych można stwierdzić zachodzenie procesu bioakumulacji niektórych pierwiastków (m.in. REE, Bi, Cd, Hg, Sb, Se, Sn, V) wraz z wiekiem fok.
- Wykluczono możliwość zastosowania fok szarych jako wskaźników do porównywania stopnia zanieczyszczenia w sześciu wybranych częściach ekosystemu Morza Bałtyckiego, co prawdopodobnie w głównej mierze spowodowane jest licznymi migracjami osobników pomiędzy różnymi akwenami Bałtyku, ale także zbyt małą liczbą osobników reprezentujących niektóre obszary (np. obszar Zatoki Botnickiej i wybrzeża polskiego). Sugeruje się możliwość wykorzystania fok szarych do oceny stopnia zanieczyszczenia

dwóch głównych obszarów Morza Bałtyckiego, z których pierwszy obejmowałby Zatokę Botnicką i Morze Botnickie, natomiast drugi obszar obejmowałby Nieckę Zachodniogotlandzką, Basen Bornholmski i wybrzeże polskie.

– Podjęto próbę opracowania procedury jednoczesnego oznaczania metylortęci i związków z grupy cynoorganicznych w próbkach wątroby fok szarych. Ze względu na skomplikowany skład, jakim charakteryzują się próbki tkanek zwierzęcych nie udało się uzyskać zadowalającego odzysku, co wyklucza możliwość zastosowania tej procedury w badaniach nad próbkami rzeczywistymi. Niezbędne jest przeprowadzenie szerszych badań nad doborem odpowiednich warunków ekstrakcji i derywatywacji analitów.

### **Streszczenie**

Stan środowiska morskiego w skali globalnej jak i stan poszczególnych ekosystemów morskich jest zagrożony przez emisję szerokiego spektrum substancji organicznych i metali. Występowanie stosunkowo dużego stężenia tych zanieczyszczeń w wodach Morza Bałtyckiego jest spowodowane ich stałym dopływem głównie z wodami rzecznyymi. Śródlądowe położenie i ustrój hydrologiczny Bałtyku utrudniają wymianę wód z oceanem, dlatego organizmy morskie są nieustannie narażone na szkodliwe skutki antropopresji. Pomimo podjętych szeregu przedsięwzięć zarówno organizacyjnych jak i technologicznych w celu ograniczenia ilości ksenobiotyków wprowadzanych do środowiska, problem ten jest nadal aktualny ze względu na dużą trwałość niektórych zanieczyszczeń lub produktów ich degradacji.

Foki szare jako ostatnie ogniwo łańcucha pokarmowego w Morzu Bałtyckim, a także ze względu na długi okres życia i długi biologiczny okres półtrwania zanieczyszczeń są podatne na akumulowanie w swoich tkankach znacznych ilości różnorodnych ksenobiotyków, przez co podjęto próbę określenia ich zdolności biowskaźnikowych do oceny stopnia zanieczyszczenia Morza Bałtyckiego. W trakcie przeprowadzonych badań oznaczano poziomy zawartości pierwiastków w próbkach wątroby foki szarej (*Halichoerus grypus*). Badane próbki otrzymano ze Środowiskowego Banku Tkanek znajdującego się w Muzeum Historii Naturalnej w Sztokholmie (Szwecja) oraz ze Stacji Morskiej Instytutu Oceanografii Uniwersytetu Gdańskiego w Helu. W próbkach wątroby oznaczono zawartość 58 pierwiastków z wykorzystaniem spektrometrii mas sprzężonej z plazmą wzbudzoną indukcyjnie (ICP-MS). Ponadto, ze względu na dużą toksyczność organicznych związków rtęci i cyny, podjęto próbę opracowania nowej procedury jednoczesnego oznaczania

metylortęci i związków cynoorganicznych. Ze względu na skomplikowany skład, jakim charakteryzują się próbki tkanek zwierzęcych nie udało się uzyskać zadowalającego odzysku, co wyklucza możliwość zastosowania tej procedury w badaniach nad próbkami rzeczywistymi.

Zaawansowane techniki chemometryczne i sztuczna inteligencja do obróbki wieloparametrowych zbiorów danych pomiarowych zostały zastosowane w celu zbadania potencjalnych zależności występujących między zmiennymi. Oceniony został wpływ obszaru bytowania, składu diety czy też wieku danego osobnika na poziom zanieczyszczeń obecnych w badanym organizmie.

### **Abstract**

The state of the marine environment on a global scale as well as the status of each marine ecosystem is threatened by the emission of a wide range of organic compounds and metals. The occurrence of relatively high concentrations of these pollutants in the Baltic Sea is mainly caused by the constant inflow of river water. Inland location and the Baltic hydrological regime impede the exchange of water from the ocean, which is why marine organisms are constantly exposed to the harmful effects of human impact on the environment. Despite a number of projects undertaken, both organizational and technological, to reduce the amount of xenobiotics into the environment, the problem is still present due to the high stability of certain pollutants or their degradation products.

Grey seals as the final link in the food chain in the Baltic Sea, as well as due to the long life and a long biological half-life of toxin elimination are likely to accumulate in their tissues significant amounts of a variety of xenobiotics. These aspects attempt to assess their ability as a bioindicators of contamination degree in the Baltic Sea. The objective of the studies was to measure the levels of elements in the liver samples of grey seal (*Halichoerus grypus*). The samples were obtained from the Environmental Specimen Bank located at the Museum of Natural History in Stockholm (Sweden) and the Marine Station of the Institute of Oceanography at the University of Gdansk in Hel. The liver samples were analyzed for 58 elements with the use of mass spectrometry coupled with an inductively coupled plasma (ICP-MS). In addition, due to the high toxicity of mercury and organic tin compounds, it was attempted to develop a new procedure for the simultaneous determination of methylmercury and organotin compounds.

Advanced chemometric techniques and artificial intelligence for processing multi-parameter measurement data sets were used to investigate potential relationships existing between variables and to facilitate the visualization of the results.

## LITERATURA

---

1. J. O. Nriagu, J. M. Pacyna, Quantitative assessment of worldwide contamination of air, water and soils by trace metals, *Nature* **333**, 1988, 134-139.
2. HELCOM. The Baltic Marine Environment 1999–2002, Baltic Sea Environment Proceedings No. 87, 2003.
3. UNEP. Lääne, A., Kraav, E. and G. Titova. Baltic Sea, GIWA Regional assessment 17. University of Kalmar, Kalmar, Sweden, 2005.
4. P. A. Fair, P. R. Becker, Review of stress in marine mammals, *J. Aquat. Ecosyst. Stress Recovery* **7**, 2000, 335-354.
5. P. Szefer, Metals, metalloids and radionuclides in the Baltic Sea ecosystem, Elsevier Science, B. V. Amsterdam, 2002.
6. K. Lundström, O. Hjerne, A. Alexandersson, O. Karlsson, Estimation of grey seal (*Halichoerus grypus*) diet composition in the Baltic Sea. *NAMMCO Sci. Publ.* **6**, 2007, 177-196.
7. M.L. Fant, M. Nyman, E. Helle, E. Rudbäck, Mercury, cadmium, lead and selenium in ringed seals (*Phocahispida*) from the Baltic Sea and from Svalbard, *Environ. Pollut.*, **111**, 2001, 493-501.
8. Z. E. Sikorski, Ryby i bezkręgowce morskie. Pozyskiwanie, właściwości i przetwarzanie, Wydawnictwa Naukowo-Techniczne, Warszawa, 2004.
9. R. Żbikowski, P. Szefer, A. Latała, Distribution and relationships between selected chemical elements in green alga *Enteromorpha sp.* from the southern Baltic, *Environ. Pollut.*, **143**, 2006, 435-448.
10. E. Hendożko, P. Szefer, J. Warzocha, Heavy metals in *Macomabalthica* and extractable metals in sediments from the southern Baltic Sea, *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, **73**, 2010, 152-163.
11. HELCOM. Heavy Metal Pollution to the Baltic Sea in 2004, *HELCOM Balt. Sea Environ.*, **108**, 2007.
12. UNEP. S. A. Pedersen, J. Madsen, M. Dyhr-Nielsen, Arctic Greenland, East Greenland Shelf, West Greenland Shelf, GIWA Regional assessment 1b, 15, 16. University of Kalmar, Kalmar, Sweden, 2004. 9-AMAP, 2004. AMAP Assessment 2002: Radioactivity in the Arctic. Arctic Monitoring and Assessment Programme (AMAP), Oslo, Norway, xi + 100.
13. R.W., Macdonald, T. Harner, J. Fyfe, H. Loeng, T. Weingartner, 2003. AMAP Assessment 2002: The Influence of Global Change on Contaminant Pathways to, within, and from the Arctic. Arctic Monitoring and Assessment Programme (AMAP), Oslo, Norway. xii+65 pp.
14. G. P. Zauke, B. Clason, V.M. Savinov, T. Savinova, Heavy metals of inshore benthic invertebrates from the Barents Sea, *Sci. Total Environ.*, **306**, 2003, 99-110.
15. L. Aastrup Zimmer, G. Asmund, P. Johansen, J. Mortensen, B. Winding Hansen, Pollution from mining in South Greenland: uptake and release of Pb by blue mussels (*Mytilus edulis L.*) documented by transplantation experiments, *Polar Biol.*, **34**, 2011, 431-439.
16. R.W. MacDonald, L.A. Barrie, T.F. Bidleman, M.L. Diamond, D.J. Gregor, R.G. Semkin, W.M.J. Strachan, Y.F. Li, F. Wania, M. Alaee, L.B. Alexeeva, S.M. Backus, R. Bailey, J.M. Bewers, C. Gobeil, C.J. Halsall, T. Harner, J.T. Hoff, L.M.M. Jantunen, W.L. Lockhart, D. Mackay, D.C. G. Muir, J. Pudykiewicz, K.J. Reimer, J.N. Smith, G.A. Stern, W.H. Schroeder, R. Wagemann, M.B. Yunker, Contaminants in the Canadian Arctic: 5 years of progress in understanding sources, occurrence and pathways, *Sci. Total Environ.*, **254**, 2000, 93-234.
17. T.S. Larsen, J.A. Kristensen, G. Asmund, P. Bjerregaard, Lead and zinc in sediments and biota from Maarmorilik, West Greenland: an assessment of the environmental impact of mining wastes on an Arctic fjord system, *Environ. Pollut.*, **114**, 2001, 275-283.
18. R. Dietz, F. Riget, P. Johansen, Lead, cadmium, mercury and selenium in Greenland marine animals, *Sci. Total Environ.*, **186**, 1996, 67-93.
19. C. H. Walker, Podstawy ekotoksykologii, PWN, Warszawa, 2002.
20. R. von Burg, M.R. Greenwood, Mercury, w: Metals and their compounds in the environment: occurrence, analysis, and biological relevance, E. Merian, Verlag Chemie, Weinheim, 1991.
21. G. Rand, Fundamentals of aquatic toxicology, Taylor & Francis, Washington, 1995.
22. J. Beldowski, J. Pempkowiak, Horizontal and vertical variability's of mercury concentration and speciation in sediments of the Gdansk Basin, Southern Baltic Sea, *Chemosphere*, **52**, 2003, 645-654.

23. Ochrona Środowiska, GUS, 2009.
24. G. M. Rodriguez-Figueroa, E. Shumilin, I. Sanchez-Rodriguez, Heavy metal pollution monitoring using the brown seaweed *Padina durvillaei* in the coastal zone of the Santa Rosalía mining region, Baja California Peninsula, Mexico, *J. Appl. Phycol.*, **21**, 2009, 19-26.
25. K. K. I. U. Arunakumara, X. Zhang, Heavy metal bioaccumulation and toxicity with special reference to microalgae *J. Ocean Univ. Chin.*, **7**, 2008, 60-64.
26. T. Ikemoto, N. P. C. Tu, N. Okuda, A. Iwata, K. Omori, S. Tanabe, Biomagnification of trace elements in the aquatic food web in the Mekong Delta, South Vietnam using stable carbon and nitrogen isotope analysis *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, **54**, 2008, 504-515.
27. V. Ya. Kavun, V. M. Shul'kin, Changes in the microelement composition in organs and tissues of the Bivalve *Crenomytilus grayanus* acclimatized in a biotope with long-term heavy metal contamination, *Rus. J. Mar. Biol.*, **31**, 2005, 109-114.
28. L. Aduna de Paz, A. Alegria, R. Barbera, R. Farrie, M. J. Lagarda, Determination of mercury in dry-fish samples by microwave digestion and flow injection analysis system cold vapor atomic absorption spectrometry *Food Chem.*, **58**, 1997, 169-
29. A. Komosa, I. Kitkowski, K. Ślepecka, Research on radioisotope and heavy metal level in bones and eggshells of selected wetland birds from Lublin region (South-eastern Poland), *Ecol. Chem. Eng.*, **14**, 2007, 805-818.
30. T. A. Haines, T. W. May, R. T. Finlayson, S. E. Mierzykowski, Factors Affecting Food Chain Transfer of Mercury in the Vicinity of the Nyanza Site, Sudbury River, Massachusetts, *Environ. Monit. Assess.*, **86**, 2003, 211-232.
31. G. Esslemont, Heavy metals in seawater, marine sediments and corals from the Townsville section, Great Barrier Reef Marine Park, Queensland, *Mar. Chem.*, **71**, 2000, 215-231.
32. A. M. H. Shabani, S. Dadfarnia, N. Nasirizadeh, Speciation analysis of mercury in water samples by cold vapor atomic absorption spectrometry after preconcentration with dithizone immobilized on microcrystalline naphthalene, *Anal. Bioanal. Chem.*, **378**, 2004, 1388-1391.
33. M. Maanan, B. Zourarah, C. Carruesco, A. Aajjane, J. Naud, The distribution of heavy metals in the Sidi Moussa lagoon sediments (Atlantic Moroccan Coast), *J. Afr. Earth Sci.*, **39**, 2004, 473-483.
34. G. P. Glasby, P. Szefer, J. Geldon, J. Warzocha, Heavy-metal pollution of sediments from Szczecin Lagoon and the Gdansk Basin, Poland, *Sci. Total Environ.*, **330**, 2004, 249-269.
35. G. Garetano, A.H. Stern, M. Robson, M. Gochfeld, Mercury vapor in residential building common areas in communities where mercury is used for cultural purposes versus a reference community, *Sci. Total Environ.*, **397**, 2008, 131-139.
36. R. J. C. Brown, A. S. Brown, R. E. Yardley, W. T. Corns, P. B. Stockwell, A practical uncertainty budget for ambient mercury vapour measurement, *Atmos. Environ.*, **42**, 2008, 2504-2517.
37. P. R. Becker, Concentration of Chlorinated Hydrocarbons and Heavy Metals in Alaska Arctic Marine Mammals, *Mar. Pollut. Bull.*, **40**, 2000, 819-829.
38. M. M. Brzóska, J. Moniuszko-Jakoniuk, Interactions between cadmium and zinc in the organism, *Food Chem. Toxicol.* **39**, 2001, 967-980.
39. H. Czczot, M. Skrzycki, Cadmium – element completely unnecessary for the organism, *Postępy Hig. Med. Dośw.* **64**, 2010, 38-49.
40. R. Dietz, J. Nørgaard, J. C. Hansen, Have arctic marine mammals adapted to high cadmium levels?, *Mar. Pollut. Bull.* **36**, 1998, 490-492.
41. K. Das, U. Siebert, M. Fontaine, T. Jauniaux, L. Holsbeek, J.-M. Bouqueneau, Ecological and pathological factors related to trace metal concentrations in harbour porpoises *Phocoena phocoena* from the North Sea and adjacent areas, *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **281**, 2004, 283-295.
42. A. Frank, V. Galgan, A. Roos, M. Olsson, L. R. Petersson, A. Bignert, Metal Concentrations in Seals from Swedish Waters, *Ambio* **21**, 1992, 529-538.
43. U. Siebert, C. Joiris, L. Holsbeek, H. Benke, K. Failing, K. Frese, E. Petzinger, Potential Relation Between Mercury Concentrations and Necropsy Findings in Cetaceans from German Waters of the North and Baltic Seas, *Mar. Pollut. Bull.* **38**, 1999, 285-295.
44. P. M. Bennett, P. D. Jepson, R. J. Law, B. R. Jones, T. Kuiken, J. R. Baker, E. Rogan, J. K. Kirkwood, Exposure to heavy metals and infectious disease mortality in harbour porpoises from England and Wales, *Environ. Pollut.* **112**, 2001, 33-40
45. A. Kakuschke, A. Prange, The influence of metal pollution on the immune system a potential stressor for marine mammals in the North Sea, *Int. J. Comp. Psychol.* **20**, 2007, 179-193.
46. A. Kakuschke, E. Valentine-Thon, S. Griesel, S. Fonfara, U. Siebert, A. Prange, Immunological impact in harbor seals (*Phocavitulina*) of the North Sea, *Environ. Sci. Technol.* **39**, 2005, 7568-7575.



47. A. Frank, V. Galgan, A. Roos, M. Olson, L. R. Petersson, A. Bignert, Metal concentrations in seals from Swedish waters, *Ambio* **21**, 1992, 529-538.
48. N. Nesto, S. Romano, V. Moschino, M. Mauri, L. Da Ros, Bioaccumulation and biomarker responses of trace metals and micro-organic pollutants in mussels and fish from the Lagoon of Venice, Italy, *Mar. Poll. Bull.*, **55**, 2007, 469-484.
49. P. Bustamante, S. Grigioni, R. Boucher-Rodoni, F. Caurant, P. Miramand, Bioaccumulation of 12 trace elements in the tissues of the nautilus *Nautilus macromphalus* from New Caledonia, *Mar. Poll. Bull.*, **40**, 2000, 688-696.
50. J. Kahle, G. P. Zauke, Trace metals in Antarctic copepods from the Weddell sea (Antarctica), *Chemosphere*, **51**, 2003, 409-417
51. L. Mendez, S. T. Alvarez-Castaneda, B. Acosta, A. P. Sierra-Beltran, Trace metals in tissues of gray whale (*Eschrichtius robustus*) carcasses from the Northern Pacific Mexican Coast, *Mar. Poll. Bull.*, **44**, 2002, 217-221.
52. F. Prowe, M. Kirf, G. P. Zauke, Heavy metals in crustaceans from the Iberian deep sea plain, *Sci. Mar.*, **70**, 2006, 271-279.
53. G. Petri, G. P. Zauke, Trace metals in crustaceans in the Antarctic Ocean, *Ambio*, **22**, 1993, 529-536.
54. W. H. Jeckel, R. R. Roth, L. Ricci, Patterns of trace-metal distribution in tissues of *Pleoticus muelleri* (Crustacea: Decapoda: Solenoceridea), *Mar. Biol.*, **125**, 1996, 297-306.
55. A. Temara, M. Warnau, M. Jangoux, Ph. Dubois, Factors influencing the concentrations of heavy metals in the asteroid *Asterias rubens* L (Echinodermata), *Sci. Total. Environ.*, **203**, 1997, 51-63.
56. T. Kunito, I. Watanabe, G. Yasunaga, Y. Fujise, S. Tanabe, Using trace elements in skin to discriminate the populations of minke whales in southern hemisphere, *Mar. Environ. Res.*, **53**, 2002, 175-197.
57. G. P. Zauke, M. Krause, A. Weber, Trace metals in mezozooplankton of the North Sea: Concentrations in different taxa and preliminary results on bioaccumulation in copepod collectives (*Calanus finmarchicus*/C. helgolandicus), *Int. Revue Ges. Hydrobiol.*, **81**, 1996, 141-160.
58. S. Y. Al-Mohanna, M. N. V. Subrahmanyam, Flux of heavy metal accumulation in various organs of the intertidal marine blue crab, *Portunus pelagicus* (L.) from the Kuwait coast after the Gulf War, *Environ. Internat.*, **27**, 2001, 321-326.
59. W. Huang, L. Cao, Z. Ye, X. Yin, Sh. Dou, Antioxidative responses and bioaccumulation in Japanese flounder larvae and juveniles under chronic mercury exposure, *Comp. Biochem. Phys. A.*, **152**, 2010, 99-105.
60. R. Doi, P. Chowdhury, M. Nishikawa, P. L. Rayford, Tissue distribution of cadmium-109 after tracheal and gastric administration in rats, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **51**, 1993, 619-624.
61. M. T. Rie, K. A. Lendas, I. P. Callard, Cadmium: tissue distribution and binding protein induction in the painted turtle, *Chrysemys picta*, *Comparat. Biochem. Physiol Part C*, **130**, 2001, 41-51.
62. D. N. Weber, W. M. Dingel, Alterations in neurobehavioral responses in fishes exposed to lead and lead-chelating agents, *Am. Zool.*, **37**, 1997, 354-362.
63. J. Burger, M. Gochfeld, Effects of lead on birds (Laridae): a review of laboratory and field studies, *J. Toxicol. Environ. Health*, **3**, 2000, 59-78.
64. J. Burger, M. Gochfeld, Marine birds as sentinels of environmental pollution, *Ecohealth*, **1**, 2004, 263-274.
65. J. P. Coelho, H. Santos, A. T. Reis, J. Falcao, E. T. Rodrigues, M. E. Pereira, A. C. Duarte, M. A. Pardal, Mercury bioaccumulation in the spotted dogfish (*Scyliorhinus canicula*) from the Atlantic Ocean, *Mar. Poll. Bull.*, **60**, 2010, 1372-1375.
66. A. R. Ribeiro, C. Eira, J. Torres, P. Mendes, J. Miquel, A. M. V. M. Soares, J. Vingada, Toxic element concentrations in the razorbill Alcatorda (Charadriiformes, Alcidae) in Portugal, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, **56**, 2009, 588-595.
67. T. Arai, T. Ikemoto, A. Hokura, Y. Terada, T. Kunito, S. Tanabe, I. Nakai, Chemical forms of mercury and cadmium accumulated in marine mammals and seabirds as determined by XAFS analysis, *Environ. Sci. Technol.*, **38**, 2004, 6468-6474.
68. C. A. Krone, P. A. Robisch, K. L. Tilbury, J. E. Stein, Elements in liver tissues of bowhead whales (*Balaenamysticetus*), *Mar. Mam. Sci.*, **15**, 1999, 123-142.
69. W. J. Langston, B. S. Chesman, G. R. Burt, N. D. Pope, J. McEnvoy, Metallothionein in liver of eels *Anguilla anguilla* from the Thames Estuary: an indicator of environmental quality?, *Mar. Environ. Res.*, **53**, 2002, 263-293.
70. M. Niecke, M. Heid, A. Kruger, Correlations between melanin pigmentation and element concentration in feathers of whitetailed eagles (*Haliaeetus albicilla*), *J. Ornithol.*, **140**, 1999, 355-362.
71. J. Burger, I. C. T. Nisbet, M. Gochfeld, Heavy metal and selenium levels in feathers of known-aged common terns (*Sterna hirundo*), *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, **26**, 1994, 351-355.

72. T. Agusa, T. Matsumoto, T. Ikemoto, Y. Anan, R. Kubota, G. Yasunaga, T. Kunito, S. Tanabe, H. Ogi, Y. Shibata, Body distribution of trace elements in black-tailed gulls from Rishiri Island, Japan: age-dependant accumulation and transfer to feathers and eggs, *Environ. Toxicol. Chem.*, **24**, 2005, 2107-2120.
73. K. S. Guruge, H. Iwata, H. Tanaka, S. Tanabe, Butyltin Accumulation in the Liver and Kidney of Seabirds, *Mar. Environ. Res.*, **44**, 1997, 191-199.
74. E. Barbieri, Concentration of heavy metals in tissues of green turtles (*Cheloniemydas*) sampled in the Cananeia estuary, Brazil, *Brazil. Journ. Oceanogr.*, **57**, 2009, 243-248.
75. B. C. Han, W. L. Jeng, R. Y. Chen, G. T. Fang, T. C. Hung, R. J. Tseng, Estimation of target hazard quotients and potential health risks for metals by consumption of seafood in Taiwan, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, **35**, 1998, 711-720.
76. P. Harlow, E. Watkins, R. D. Thornton, M. Nemer, Structure of an ectodermally expressed sea urchin metallothionein gene and characterization of its metal-responsive region, *Mol. Cell. Biol.*, **9**, 1989, 5445-5455.
77. H. Y. Chiou, W. I. Hung, C. L. Su, S. F. Chang, Y. H. Hsu, C. J. Chen, Dose-response relationship between prevalence of cerebrovascular disease and ingested inorganic arsenic, *Stroke*, **28**, 1997, 1717-1723.
78. K. Saeki, H. Sakaibara, H. Sakai, T. Kunito, S. Tanabe, Arsenic accumulation in three species of sea turtles, *Biomaterials*, **13**, 2000, 241-250.
79. A. J. Hall, D. Thompson, Grey Seal *Halichoerus grypus*. W: Encyclopedia of Marine Mammals. W. F. Perrin, J. Wursig, J. G. M. Thewissen. San Diego, California, USA, Academic Press: 500-503, 2009.
80. K. C. Harding, T. Härkönen, B. Helander, O. Karlsson, Status of the Baltic grey seals: population assessment and extinction risk, *NAMMCO Sci. Publ.* **6**, 2007, 33-56.
81. S. D. Newsome, M. T. Clementz, P. L. Koch, Using stable isotope biogeochemistry to study marine mammal ecology, *Mar. Mammal Sci.*, **26**, 2010, 509-572.
82. D. M. Post, Using stable isotopes to estimate trophic position: models, methods, and assumptions, *Ecology*, **83**, 2002, 703-718.
83. J. F. Kelly, Stable isotopes of carbon and nitrogen in the study of avian and mammalian trophic ecology, *Can. J. Zool.-Rev. Can. Zool.*, **78**, 2000, 1-27.
84. Z. M. Migaszewski, A. Gałuszka, Podstawy Geochemii Środowiska, Wydawnictwa Naukowo-Techniczne, Warszawa, 2007.
85. V. Gomez, M. P. Callao, Chromium determination and speciation since 2000, *Trends Anal. Chem.*, **25**, 2006, 1006-1015.
86. Z. Gong, X. Lu, M. Ma, C. Watt, X. C. Le, Arsenic speciation analysis, *Talanta*, **58**, 2002, 77-96.
87. A. Gonzalez, M. L. Cervera, S. Armenta, M. de la Guardia, A review of non-chromatographic methods for speciation analysis, *Anal. Chim. Acta*, **636**, 2009, 129-157.
88. A. Kot, J. Namieśnik, The role of speciation in analytical chemistry, *Trends Anal. Chem.*, **19**, 2000, 69-79.
89. D. M. Templeton, Guidelines for terms related to chemical speciation and fractionation of elements. Definitions, structural aspects, and methodological approaches, *Pure Appl. Chem.*, **72**, 2000, 1453-1470.
90. C. Camara, Sample preparation for speciation, *Anal. Bioanal. Chem.*, **381**, 2005, 277-278.
91. R. Łobiński, I. R. Pereiro, H. Chassaigne, A. Wasik, J. Szpunar, Elemental speciation and coupled techniques – towards faster and reliable analyses, *J. Anal. At. Spectr.*, **13**, 1998, 859-867.
92. J. Namieśnik, P. Szefer, Preparing samples for analysis-the key to analytical success, *Ecol. Chem. Eng.*, **15**, 2008, 167-249.
93. L. -P. Yu, X.-P. Yan, Factors affecting the stability of inorganic and methylmercury during sample storage, *Trends Anal. Chem.*, **22**, 2003, 245-253.
94. B. Kratochvil, Sampling and Sample Preservation for Trace Element Analysis, in: Sample Preparation for Trace Element Analysis, Elsevier Science Publishers, 2004
95. J. Namieśnik, J. Łukasiak, Z. Jamrógiewicz, Pobieranie próbek środowiskowych do analizy, Wydawnictwa Naukowe PWN, Warszawa, 1995
96. J. Namieśnik, Z. Jamrógiewicz, M. Pilarczyk, L. Torres, Przygotowanie próbek środowiskowych do analizy, Wydawnictwa Naukowo-Techniczne, Warszawa, 2000
97. J. Namieśnik, T. Górecki, Preparation of Environmental Samples for the Determination of trace Constituents, *Pol. J. Environ. Stud.*, **10**, 2001, 77-84.
98. A. Wasik, Analityka specyjacyjna związków cynoorganicznych w próbkach środowiskowych. Zeszyty Naukowe Politechniki Gdańskiej, Chemia 71, Gdańsk 2012.
99. R. Łobiński, Elemental speciation and coupled techniques, *Appl. Spectrosc.*, **51**, 1997, 260A-278A.
100. H. Hintelmann, H. T. Nguyen, Extraction of methylmercury from tissue and plant samples by acid leaching, *Anal. Bioanal. Chem.*, **381**, 2005, 360-365.
101. M. Le Gac, G. Lespes, M. Potin-Gautier, Rapid determination of organotin compounds by headspace solid-phase microextraction, *J. Chromatogr. A*, **999**, 2003, 123-134.

102. L. Liang, M. Horvat, E. Cernichiaro, B. Gelein, S. Balogh, Simple solvent extraction technique for elimination of matrix interferences in the determination of methylmercury in environmental and biological samples by ethylation-gas chromatography-cold vapor atomic fluorescence spectroscopy, *Talanta*, **43**, 1996, 1883-1888.
103. S. Mishra, R. M. Tripathi, S. Bhalke, V. K. Shukla, V. D. Puranik, Determination of methylmercury and mercury (II) in a marine ecosystem using solid-phase microextraction gas chromatography-mass spectrometry, *Anal. Chim. Acta*, **551**, 2005, 192-198
104. C. -H. Tang, W. -H. Wang, Optimization of an analytical method for determining organotin compounds in fish tissue by base-hydrolysis pretreatment and simultaneous ethylation-extraction procedures, *Anal. Chim. Acta*, **581**, 2007, 370-376.
105. J. A. Stüb, U. A. Th. Brinkman, W. P. Cofino, Validation of the analysis of organotin compounds in biological tissues using alkylation and gas chromatography, *Appl. Organomet. Chem.*, **8**, 2004, 577-585.
106. M. Ceulemans, C. Witte, R. Łobiński, F. C. Adams, Simplified sample preparation for GC speciation analysis of organotin in marine biomaterials, *Appl. Organomet. Chem.*, **8**, 2004, 451-461.
107. Y. K. Chau, P. T. S. Wong, G. A. Bengert, J. L. Dunn, Determination of dialkyllead, trialkyllead, tetraalkyllead and lead (II) compounds in sediment and biological samples, *Anal. Chem.*, **56**, 1984, 271-274.
108. L. H. Reyes, J. L. Guzman Mar, G. M. Mizanur Rahman, B. Seybert, T. Fahrenholz, H. M. Skip Kingston, Simultaneous determination of arsenic and selenium species in fish tissues using microwave-assisted enzymatic extraction and ion chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry, *Talanta*, **78**, 2009, 983-990.
109. D. S. Forsyth, C. Cleroux, Determination of butyltin, methyltin and tetraalkyltin in marine food products with gas chromatography-atomic absorption spectrometry, *Talanta*, **38**, 1991, 951-957.
110. R. Morabito, Extraction techniques in speciation analysis of environmental samples, *Fresenius J. Anal. Chem.*, **351**, 1995, 378-385.
111. J. M. Hungerford, K. D. Walker, J. D. Torkelson, K. Steinbrecher, M. M. Wekell, Determination of tri-n-butyltin in oysters by reaction—gas chromatography of hydride derivatives, *Talanta*, **37**, 1990, 975-979.
112. A. D. Uhler, G. S. Durell, W. G. Steinhauer, A. M. Spellacy, Tributyltin levels in bivalve mollusks from the east and west coasts of the United States: results from the 1988-1990 National Status and Trends Mussel Watch project, *Environ. Toxicol. Chem.*, **12**, 1993, 139-153.
113. H. Harino, M. Fukushima, M. Tanaka, Simultaneous determination of butyltin and phenyltin compounds in the aquatic environment by gas chromatography, *Anal. Chim. Acta*, **264**, 1992, 91-96.
114. J. L. Martínez Vidal, A. Belmonte Vega, F. J. Arrebola, M. J. González-Rodríguez, M. C. Morales Sánchez, A. Garrido Frenich, Trace determination of organotin compounds in water, sediment and mussel samples by low-pressure gas chromatography coupled to tandem mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **17**, 2009-2106.
115. S. L. Tong, F. Y. Pang, S. M. Phang, H. C. Lai, Tributyltin distribution in the coastal environment of Peninsular Malaysia, *Environ. Pollut.*, **91**, 1996, 209-216.
116. W. R. Cullen, G. K. Eigendorf, B.U. Nwata, A. Takatsu, The quantitation of butyltin and cyclohexyltin compounds in the marine environment of British Columbia, *Appl. Organomet. Chem.*, **4**, 1990, 581-590.
117. I. Takeuchi, S. Takahashi, S. Tanabe, N. Miyazaki, Butyltin concentrations along the Japanese coast from 1997 to 1999 monitored by *Caprella* spp. (*Crustacea: Amphipoda*), *Mar. Environ. Res.*, **57**, 2004, 397-414.
118. R. Yang, D. Cao, Q. Zhou, Y. Wang, G. Jiang, Distribution and temporal trends of butyltins monitored by molluscs along the Chinese Bohai coast from 2002 to 2005, *Environ. Int.*, **34**, 2008, 804-810.
119. H. -K. Hong, S. Takahashi, B. -Y. Min, S. Tanabe, Butyltin residues in blue mussels (*Mytilus edulis*) and ark shells (*Scapharca broughtonii*) collected from Korean coastal waters, *Environ. Pollut.*, **117**, 2002, 475-486.
120. G. Westöö, Determination of methylmercury compounds in foodstuffs. I. Methylmercury compounds in fish; identification and determination, *Acta Chem. Scand.*, **20**, 1966, 2131-2137.
121. G. Carbonell, J. C. Bravo, C. Fernandez, J. V. Tarazona, A new method for total mercury and methyl mercury analysis in muscle of seawater fish, *Bull. Environ. Cont. Toxicol.*, **83**, 2009, 210-213.
122. S. Fragueiro, I. Lavilla, C. Bendicho, Direct coupling of solid phase microextraction and quartz tube-atomic absorption spectrometry for selective and sensitive determination of methylmercury in seafood: an assessment of chloride and hydride generation, *J. Anal. At. Spectrom.*, **19**, 2004, 250-254.
123. P. Krystek, R. Ritsema, Determination of methylmercury and inorganic mercury in shark fillets, *Appl. Organomet. Chem.*, **18**, 2004, 640-645.
124. A. M. Caricchia, G. Minervini, P. Soldati, S. Chiavarini, C. Ubaldo, R. Morabito, GC-ECD determination of methylmercury in sediment samples using a SPB-608 capillary column after alkaline digestion, *J. Microchem.*, **55**, 1997, 44-55.

125. M. Logar, M. Horvat, I. Falnoga, V. Stibilj, A methodological study of mercury speciation using dogfish liver CRM (DOLT-2), *Fresenius J. Anal. Chem.*, **366**, 2000, 453-460.
126. Y. Mao, G. Liu, G. Meichel, Y. Cai, G. Jiang, Simultaneous speciation of monomethylmercury and monoethylmercury by aqueous phenylation and pure-and-trap preconcentration followed by atomic spectrometry detection, *Anal. Chem.*, **80**, 2008, 7163-7168.
127. R. D. Jones, M. E. Jacobson, R. Jaffe, J. West-Thomas, C. Arfstrom, A. Alii, Method development and sample processing of water, soil and tissue for the analysis of total and organic mercury by cold vapor atomic fluorescence spectrometry, *Water Air and Soil Pollut.*, **80**, 1995, 1285-1294.
128. P. Hajeb, S. Jinap, I. Ahmad, Biomagnifications of mercury and methylmercury in tuna and mackerel, *Environ. Monit. Assess.*, **171**, 2010, 205-217.
129. J. Margetínová, P. Houserová -Pelcová, V. Kubáň, Speciation analysis of mercury in sediments, zoobenthos and river water samples by high-performance liquid chromatography hyphenated to atomic fluorescence spectrometry following preconcentration by solid phase extraction, *Anal. Chim. Acta*, **615**, 2008, 115-123.
130. R. Wagemann, E. Trebacz, G. Boila, W. L. Lockhart, Mercury species in the liver of ringed seals, *Sci. Total Environ.*, **261**, 2000, 21-32.
131. E. Gonzalez-Toledo, M. Benzi, R. Compano, M. Granados, M. Dolors Prat, Speciation of organotin compounds in shellfish by liquid chromatography – fluorimetric detection, *Anal. Bioanal. Chem.*, **443**, 2001, 183-190.
132. P. Rodriguez-Gonzalez, J.I.G. Alonso, A. Sanz-Medel, Development of a triple spike methodology for validation of butyltin compounds speciation analysis by isotope dilution mass spectrometry. Part1., *J. Anal. At. Spectrom.* **19**, 2004, 685-691.
133. P. Rodriguez-Gonzalez, J.I.G. Alonso, A. Sanz-Medel, Development of a triple spike methodology for validation of butyltin compounds speciation analysis by isotope dilution mass spectrometry. Part2., *J. Anal. At. Spectrom.* **19**, 2004, 767-772
134. F. Yang, Y.K. Chau, R.J. Maguire, Occurrence of butyltin compounds in beluga whales (*Delphinapterus leucas*), *Appl. Organomet. Chem.*, **12**, 1998, 651-656.
135. L. Ruzik, K. Pawlak, M. Jarosz, Techniki sprzężone w analizie specjacyjnej, In: Specjacja chemiczna: Problemy i możliwości, Malamut, Warszawa, 2009.
136. K. L. Ackley, J. A. Caruso, Separation techniques-liquid chromatography, in: Handbook of elemental speciation: Techniques and methodology, Wiley, 2003.
137. J. Drozd, Chemical derivatization in gas chromatography, *J. Chrom. Libr.* **19**, Elsevier, 1981.
138. J. F. Lawrence, R. W. Frei, Chemical derivatization in liquid chromatography, *J. Chrom. Libr.* **7**, Elsevier, 1976.
139. J. I. Garcia Alonso, J. R. Encinar, Gas chromatography and other gas based methods, in: Handbook of elemental speciation: Techniques and methodology, Wiley, 2003.
140. S. Rapsomanikis, Derivatization by ethylation with sodium tetraethylborate for the speciation of metals and organometallics in environmental samples, *Analyst*, **119**, 1994, 1429-1439.
141. M. Abalos, J. -M. Bayona, R. Compano, M. Granados, C. Leal, M. -D. Prat, Analytical procedures for the determination of organotin compounds in sediment and biota: a critical review, *J. Chromatogr. A*, **788**, 1997, 1-49.
142. M. G. Ikonou, M. P. Fernandez, T. He, D. Cullon, Gas chromatography-high-resolution mass spectrometry based method for the simultaneous determination of nine organotin compounds in water, sediment and tissue, *J. Chromatogr. A*, **975**, 2002, 319-333.
143. R. Munoz Olivas, C. Camara, Sample Preparation, in: Handbook of elemental speciation: Techniques and methodology, Wiley, 2003.
144. L. Moens, T. De Smaele, R. Dams, sensitive, simultaneous determination of organomercury, -lead, and -tin compounds with headspace solid phase microextraction capillary gas chromatography combined with inductively coupled plasma mass spectrometry, *Anal. Chem.*, **69**, 1997, 1604-1611.
145. V. Minganti, R. Capelli, R. De Pellegrini, Evaluation of different derivatization methods for the multi-element detection of Hg, Pb and Sn compounds by gas chromatography-microwave induced plasma-atomic emission spectrometry in environmental samples, *Anal. Chem.*, **351**, 1995, 471-477.
146. Y. Cai, S. Monsalud, K. G. Furton, Determination of methyl-and ethylmercury compounds using gas chromatography atomic fluorescence spectrometry following aqueous derivatization with sodium tetraphenylborate, *Chromatographia.*, **52**, 2000, 82-86.
147. P. Grinberg, R. C. Campos, Z. Mester, R. E. Sturgeon, A comparison of alkyl derivatization methods for speciation of mercury based on solid phase microextraction gas chromatography with furnace atomization plasma emission spectrometry detection, *J. Anal. At. Spectrom.*, **18**, 2003, 902-909.

148. D. Gibičar, M. Logar, Simultaneous determination of trace levels of ethylmercury and methylmercury in biological samples and vaccines using sodium tetra(n-propyl)borate as derivatizing agent, *Anal. Bioanal. Chem.*, **388**, 2007, 329-340.
149. J. C. Van Loon, Metal speciation by chromatographic/atomic spectrometry, *Anal. Chem.*, **51**, 1979, 1139A-1150A.
150. K. T. Suzuki, Direct connection of high-speed liquid chromatography (equipped with gel permeation column) to atomic absorption spectrometer for metalloprotein analysis: metallothionein, *Anal. Biochem.*, **102**, 1980, 31-34.
151. Y. K. Chau, Chromatographic techniques in metal speciation, *Analyst*, **117**, 1992, 571-575.
152. M. Maldonado Santoyo, J. A. Landero Figueroa, K. Wrobel, Analytical speciation of mercury in fish tissues by reversed phase liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry with Bi3+ as internal standard, *Talanta*, **79**, 2009, 706-711.
153. J. Margetínová, P. Houserová-Pelcová, V. Kubáň, Speciation analysis of mercury in sediments, zoobenthos and river water samples by high-performance liquid chromatography hyphenated to atomic fluorescence spectrometry following preconcentration by solid phase extraction, *Anal. Chim. Acta*, **615**, 2008, 115-123.
154. L. -F. Chang, S. -J. Jiang, A. C. Sahayam, Speciation analysis of mercury and lead in fish samples using liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry, *J. Chromatogr. A*, **1176**, 2007, 143-148.
155. J. Szpunar, Bio-inorganic speciation analysis by hyphenated techniques, *Analyst*, **125**, 2000, 963-988.
156. S. McSheehy, J. Szpunar, Speciation of arsenic in edible algae by bi-dimensional size-exclusion anion exchange HPLC with dual ICP-MS and electrospray MS/MS detection, *J. Anal. At. Spectrom.*, **15**, 2000, 79-87.
157. V. Majidi, Capillary electrophoresis inductively coupled plasma mass spectrometry, *Microchem. J.*, **66**, 2000, 3-16.
158. K. Sutton, R. M. C. Sutton, J. A. Caruso, Inductively coupled plasma mass spectrometric detection for chromatography and capillary electrophoresis, *J. Chromatogr. A*, **789**, 1997, 85-126.
159. J. Feldmann, What can the different current – detection methods offer for element speciation?, *Trends Anal. Chem.*, **24**, 2005, 228-242.
160. B. Michalke, The coupling of LC to ICP-MS in element speciation: I. General aspects, *Trends Anal. Chem.*, **21**, 2002, 142-153.
161. B. Michalke, Element speciation definitions, analytical methodology, and some examples, *Ecotoxicol. Environ.*, **56**, 2003, 122-139.
162. H. E. L. Palmieri, L. V. Leonel, Determination of methylmercury in fish tissue by gas chromatography with microwave-induced plasma atomic emission spectrometry after derivatization with sodium tetraphenylborate, *fresenius' J. Anal. Chem.*, **366**, 2000, 466-469.
163. P. Houserova, V. Kuban, S. Kracmar, J. Sitko, Total mercury and mercury species in birds and fish in an aquatic ecosystem in the Czech Republic, *Environ. Pollut.* **145**, 2007, 185-194.
164. A. Wasik, T. Ciesielski, Determination of organotin compounds in biological samples using accelerated solvent extraction, sodium tetraethylborate ethylation, and multicapillary gas chromatography-flame photometric detection, *Anal. Bioanal. Chem.*, **378**, 2004, 1357-1363.
165. A. Tremblay, M. Lucotte, R. Schetagne, Total mercury and methylmercury accumulation in zooplankton of hydroelectric reservoirs in northern Quebec, Canada, *Sci. Total Environ.* **213**, 1998, 307-315.
166. Y. Li, S.-J. Liu, D.-Q. Jiang, Y. Jiang, X.-P. Yan, Gas chromatography-inductively coupled plasma-mass spectrometry for mercury speciation in seafood, *Chin. J. Anal. Chem.* **36**, 2008, 793-798.
167. R. Rai, W. Maher, F. Kirkowa, Measurement of inorganic and methylmercury in fish tissues by enzymatic hydrolysis and HPLC-ICP-MS, *J. Anal. At. Spectrom.* **12**, 2002, 1560-1563.
168. A. Castillo, P. Rodriguez-Gonzalez, G. Centineo, A. F. Roig-Navarro, J. I. Garcia Alonso, Multiple spiking species-specific isotope dilution analysis by molecular mass spectrometry: Simultaneous determination of inorganic mercury and methylmercury in fish tissues, *Anal. Chem.* **82**, 2010, 2773-2783.
169. Q. Xiao, B. Hu, M. He, Speciation of butyltin compounds in environmental and biological samples using headspace single drop microextraction coupled with gas chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry, *J. Chrom. A* **1211**, 2008, 135-141.
170. W. Maher, F. Krikowa, J. Kirby, A. T. Townsend, P. Snitch, Measurement of trace elements in marine environmental samples, using solution ICP-MS. Current and future applications, *Aust. J. Chem.*, **56**, 2003, 103-116.
171. M. A. Sotiropoulos, W. M. Tonn, L. I. Wassenaar, Effects of lipid extraction on stable carbon and nitrogen isotope analyses of fish tissues: potential consequences for food web studies, *Ecol. Freshw. Fish*, **13**, 2004, 155-160.

172. J. E. Søreide, T. Tammelander, H. Hop, K. A. Hobson, I. Johansen, Sample preparation effects on stable C and N isotope values: a comparison of methods in Arctic marine food web studies, *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **328**, 2006, 17–28.
173. J. Folch, M. Lees, G. H. S. Stanley, A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues, *J. Biol. Chem.*, **226**, 1957, 497-509.
174. C. Liscio, M. Di Carro, E. Magi, Comparison of two analytical methods for the determination of organotin compounds in marine organisms, *C.R. Chim.*, **12**, 2009, 831–840.
175. P. Montuori, E. Jover, R. Alzaga, S. Diez, J. M. Bayona, Improvements in the methylmercury extraction from human hair by headspace solid-phase microextraction followed by gas-chromatography cold-vapour atomic fluorescence spectrometry, *J. Chrom. A*, **1025**, 2004, 71–75.
176. P. Jitaru, H. GoenagaInfante, F. C. Adams, Multicapillary gas chromatography coupled to inductively coupled plasma–time-of-flight mass spectrometry for rapid mercury speciation analysis, *Anal. Chim. Acta*, **489**, 2003, 45–57.
177. P. Konieczka, J. Namieśnik, Walidacja procedur analitycznych. W: Ocena i kontrola jakości wyników pomiarów analitycznych, P. Konieczka i J. Namieśnik (red.), WNT, Warszawa, 2007.
178. M. Zabaljauregui, A. Delgado, A. Usobiaga, O. Zuloaga, A. de Diego, J. M. Madariaga, Fast method for routine simultaneous analysis of methylmercury and butyltins in seafood, *J. Chrom. A*, **1148**, 2007, 78–85.
179. A. Astel, J. Mazerski, J. Namieśnik, Wykorzystanie technik chemometrycznych w badaniach analitycznych środowiska, w: Nowe horyzonty i wyzwania w analityce i monitoringu środowiskowym, red. J. Namieśnik, CEEAM, Gdańsk, 2003.
180. P. Szefer, Zastosowanie technik chemometrycznych w analitycznej ocenie próbek biologicznych i środowiskowych, w: Nowe horyzonty i wyzwania w analityce i monitoringu środowiskowym, red. J. Namieśnik, CEEAM, Gdańsk, 2003.
181. H. Abdi, L. J. Williams, Principal component analysis, *Wiley Interdiscip. Rev.-Comput. Stat.* **2**, 2010, 433-459.
182. J. Mazerski, Podstawy chemometrii, Wydawnictwo Politechniki Gdańskiej, Gdańsk, 2000.
183. K. Svensson, A. Angerbjörn, A. Roos, Has the grey seal (*Halichoerus grypus*) in the Baltic Sea changed trophic position as an effect of commercial fishery?, Wydział Zoologii Uniwersytetu w Sztokholmie, praca magisterska, 2007.
184. V. Lesage, M. O. Hammill, The status of the Grey Seal, *Halichoerus grypus*, in the Northwest Atlantic, *Can. Field-Nat.* **115**, 2001, 653-662.
185. K. I. Van De Vijver, P. T. Hoff, K. Das, W. Van Dongen, E. L. Esmans, T. Jauniaux, J. M. Bouquegneau, R. Blust, W. De Coen, Perfluorinated chemicals infiltrate ocean waters: Link between exposure levels and stable Isotope ratios in marine mammals, *Environ. Sci. Technol.* **37**, 2003, 5545-5550.
186. R. L. France, Carbon-13 enrichment in benthic compared to planktonic algae: foodweb implications, *Mar. Ecol.-Prog. Ser.* **124**, 1995, 307-312.
187. <http://www.naszbaltyk.pl/>
188. M. Sjöberg, M. A. Fedak, B. J. McConnell, Movements and diurnal behaviour patterns in a Baltic grey seal (*Halichoerus grypus*), *Pol. Biol.* **15**, 1995, 593-595.
189. <http://www.fokarium.pl/>
190. M. Sjöberg, J. P. Ball, Grey seal, *Halichoerus grypus*, habitat selection around haulout sites in the Baltic Sea: bathymetry or central-place foraging?, *Can. J. Zool.-Rev. Can. Zool.* **78**, 2000, 1661-1667.
191. M. Nyman, J. Koistinen, M. L. Fant, T. Vartiainen, E. Helle, Current levels of DDT, PCB and trace elements in the Baltic ringed seals (*Phoca hispida baltica*) and grey seals (*Halichoerus grypus*), *Environ. Pollut.* **119**, 2002, 399–412.
192. M. Leivuori, L. Niemistö, Sedimentation of trace metals in the Gulf of Bothnia, *Chemosphere* **31**, 1995, 3839-3856.
193. R. Wagemann, R. E. A. Stewart, W. L. Lockhart, B. E. Stewart, M. Povoledo, Trace metals and methyl mercury: Associations and transfer in harp seal (*Phoca groenlandica*) Mothers and their pups, *Mar. Mamm. Sci.* **4**, 1988, 339-355.
194. F. Caurant, J. C. Amiard, C. Amiard Triquet, P. G. Sauriau, Ecological and biological factors controlling the concentrations of trace elements (As, Cd, Cn, Hg, Se, Zn) in delphinids (*Globicephala melas*) from the North Atlantic Ocean, *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **103**, 1994, 207-220.
195. D. V. Gallacher, Y. Maruyama, O. H. Petersen, Patch-clamp study of rubidium and potassium conductances in single cation channels from mammalian exocrine acini, *Pflug. Arch. Eur. J. Phy.* **401**, 1984, 361-367.
196. T. Ciesielski, P. Szefer, Z. Bertenyi, I. Kuklik, K. Skóra, J. Namiesnik, P. Fodor, Interspecific distribution and co-associations of chemical elements in the liver tissue of marine mammals from the Polish Economical Exclusive Zone, Baltic Sea, *Environ. Int.* **32**, 2006, 524-532.

197. M. Nyman, J. Koistinen, M. L. Fant, T. Vartiainen, E. Helle, Current levels of DDT, PCB and trace elements in the Baltic ringed seals (*Phoca hispida baltica*) and grey seals (*Halichoerus grypus*), *Environ. Pollut.* **119**, 2002, 399-412.
198. R. J. Law, C. F. Fileman, A. D. Hopkins, J. R. Baker, J. Harwood, D. B. Jackson, S. Kennedy, A. R. Martin, R. J. Morris, Concentrations of trace metals in the livers of marine mammals (seals, porpoises and dolphins) from waters around the British Isles, *Mar. Pollut. Bull.* **22**, 1991, 183-191.
199. K. Das, C. Beans, L. Holsbeek, G. Mauger, S. D. Berrow, E. Rogan, J. M. Bouquegneau, Marine mammals from northeast atlantic: relationship between their trophic status as determined by delta13C and delta15N measurements and their trace metal concentrations, *Mar. Environ. Res.* **56**, 2003, 349-365.
200. P. Bustamante, C. F. Morales, B. Mikkelsen, M. Dam, F. Caurant, Trace element bioaccumulation in grey seals (*Halichoerus grypus*) from the Faroe Islands, *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **267**, 2004, 291-301.
201. Y. Anan, T. Kunito, T. Ikemoto, R. Kubota, I. Watanabe, S. Tanabe, N. Miyazaki, E. A. Petrov, Elevated Concentrations of Trace Elements in Caspian Seals (*Phoca caspica*) Found Stranded During the Mass Mortality Events in 2000, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **42**, 2002, 354-362.
202. T. Ciesielski, M. V. Pastukhov, P. Fodor, Z. Bertenyi, J. Namieśnik, P. Szefer, Relationships and bioaccumulation of chemical elements in the Baikal seal (*Phoca sibirica*), *Environ. Pollut.* **139**, 2006, 372-384
203. T. Agusa, K. Nomura, T. Kunito, Y. Anan, H. Iwata, N. Miyazaki, R. Tatsukawa, S. Tanabe, Interelement relationships and age-related variation of trace element concentrations in liver of striped dolphins (*Stenella coeruleoalba*) from Japanese coastal waters, *Mar. Pollut. Bull.* **57**, 2008, 807-815.
204. F. H. Nielsen, Ultratrace elements in nutrition: Current knowledge and speculation, *J. Trace Elem. Exp. Med.* **11**, 1998, 251-274.
205. E. A. Mackey, R. Demiralp, P. R. Becker, R. R. Greenberg, B. J. Koster, S. A. Wise, Trace element concentrations in cetacean liver tissues archived in the national marine mammal tissue bank, *Sci. Total Environ.* **175**, 1995, 25-41.
206. M. Nuortamo, P. Varo, E. Saari, P. Koivistoinen, Mineral Element Composition of Finnish Foods: N, K, Ca, Mg, P, S, Fe, Cu, Mn, Zn, Mo, Co, Ni, Cr, F, Se, Si, Rb, Al, B, Br, Hg, As, Cd, Pb and Ash. P. Koivistoinen. Stockholm, *Acta Agric. Scand. Sect.-Suppl.* **22**, 1980, 57-76.
207. A. L. John Peter, T. Viraraghavan, Thallium: a review of public health and environmental concerns, *Environ. Int.* **31**, 2005, 493-501.
208. A. Kabata-Pendias, H. Pendias, Biogeochemia pierwiastków śladowych, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, 1999.
209. S. Pors Nielsen, The biological role of strontium, *Bone* **35**, 2004, 583-588.
210. R. Wagemann, E. Trębacz, G. Boila, W. L. Lockhart, Methylmercury and total mercury in tissues of arctic marine mammals, *Sci. Total Environ.* **218**, 1998, 19-31.
211. S. Habran, C. Debier, D. E. Crocker, D. S. Houser, K. Das, Blood dynamics of mercury and selenium in northern elephant seals during the lactation period, *Environ. Pollut.* **159**, 2011, 2523-2529.
212. S. Tanabe, Butyltin Contamination in Marine Mammals – A Review, *Mar. Pollut. Bull.* **39**, 1999, 62-72.

## DOROBEK NAUKOWY

---

### **Publikacje:**

Współautor publikacji w czasopiśmie z listy filadelfijskiej:

1. **Gabriela Bajger**, Piotr Konieczka, Jacek Namieśnik, Speciation of heavy metal compounds in samples of biota from marine ecosystems, *Chem. Spec. Bioav.* **23**, 2011, 130 (IF=0,397).
2. Kinga Dubalska, Małgorzata Rutkowska, **Gabriela Bajger-Nowak**, Piotr Konieczka, Jacek Namieśnik, Organotin compounds. Environmental fate and analysis, *Crit. Rev. Anal. Chem.*, DOI:10.1080/10408347.2012.743846 (IF=3.902).

3. Małgorzata Chmiel, Kinga Dubalska, **Gabriela Bajger-Nowak**, Piotr Konieczka, Jacek Namieśnik, Organomercury compounds in environment al Samales: emission sources, toxicity, environmental fate and determination, *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.*, (przyjęty do druku) (IF= 4.841).

Współautor publikacji w czasopiśmie spoza listy filadelfijskiej:

1. **Gabriela Bajger**, Piotr Konieczka, Jacek Namieśnik, Bioakumulacja rtęci w łańcuchu troficznym organizmów morskich, *Analityka* **2**, 2010, 59.

2. **Gabriela Bajger**, Piotr Konieczka, Jacek Namieśnik, Analiza specjacyjna metali ciężkich w łańcuchu troficznym organizmów morskich, *Analityka* **3**, 2010, 35.

3. Małgorzata Chmiel, **Gabriela Bajger-Nowak**, Piotr Konieczka, Jacek Namieśnik, Oznaczanie zawartości rtęci w paliwach, *Analityka* **4**, 2012, 39.

*Wystąpienia konferencyjne opublikowane w postaci streszczenia w odpowiednich materiałach :*

1. **Gabriela Bajger**, Piotr Konieczka, Jacek Namieśnik, Research on bioaccumulation processes of mercury and persistent organic pollutants in marine ecosystems, Baltic Seal Health Workshop, Hel Marine Station, 8-10.09.2009, Hel (*komunikat*).

2. **Gabriela Bajger**, Piotr Konieczka, Jacek Namieśnik, Oznaczanie zawartości rtęci w łańcuchu troficznym zwierząt morskich, Materiały Sesji Sprawozdawczej Studium Doktoranckiego przy Wydziale Chemicznym Politechniki Gdańskiej, 22-23.09.2009, Gdańsk 2009, s. 32 (*komunikat*).

3. **Gabriela Bajger**, Piotr Konieczka, Jacek Namieśnik, Oznaczanie poziomów zawartości rtęci całkowitej w wybranych tkankach i narządach foki szarej z obszaru Morza Bałtyckiego z wykorzystaniem techniki CV-AAS, Materiały VIII Polskiej Konferencji Chemii Analitycznej: *Analityka dla Społeczeństwa XXI wieku*, Kraków 4-9.07.2010, s. 297 (*plakat*).

2. **Gabriela Bajger**, Diana Kowalewska, Piotr Konieczka, Jacek Namieśnik, Porównanie poziomów zawartości rtęci całkowitej w wybranych tkankach i organach dwóch gatunków ptaków morskich (*Alca torda* i *Gavia arctica*) z obszaru południowego Bałtyku, Materiały VIII Polskiej Konferencji Chemii Analitycznej: *Analityka dla Społeczeństwa XXI wieku*, Kraków 4-9.07.2010, s.281 (*komunikat*).

3. **Gabriela Bajger**, Anna Roos, Piotr Konieczka, Iwona Pawliczka, Frank Rigét, Jacek Namieśnik, Mercury concentrations in marine biota with special focus on grey and ringed



seals, Proceedings of the 15th International Conference on Heavy Metals in the Environment, 19-23 September 2010, Gdansk, Poland, s. 591 (*komunikat*).

4. **Gabriela Bajger**, Anna Dziurzyńska, Natalia Wnuk, Iwona Pawliczka, Krzysztof E. Skóra, Piotr Konieczka, Jacek Namieśnik, Heavy metal concentrations in soft tissues of grey seals from southern Baltic, Proceedings of the 15th International Conference on Heavy Metals in the Environment, 19-23 September 2010, Gdansk, Poland, s. 647 (*plakat*).

5. **Gabriela Bajger**, Piotr Konieczka, Jacek Namieśnik, Oznaczanie metali ciężkich w próbkach tkanek i narządów drapieżników z obszaru Morza Bałtyckiego, Materiały Sesji Sprawozdawczej Studium Doktoranckiego przy Wydziale Chemicznym Politechniki Gdańskiej, 27-28.09.2010, Gdańsk, s. 36 (*komunikat*).

6. Piotr Konieczka, **Gabriela Bajger**, Jacek Namieśnik, Oznaczanie śladowych ilości rtęci całkowitej w paliwach z wykorzystaniem techniki CV-AAS: opracowanie procedury analitycznej, w: Nauka i przemysł : metody spektroskopowe w praktyce nowe wyzwania i możliwości, red. Z. Hubicki, Uniwersytet Marii Skłodowskiej-Curie, Wydział Chemii, Lublin, 2011. s. 37.

7. **Gabriela Bajger**, Piotr Konieczka, Jacek Namieśnik, Determination of total mercury in raw petrol using cold vapour atomic absorption spectrometry, Proceedings of the 14th International Symposium of Students and Young Mechanical Engineers :Advances in Chemical and Mechanical Engineering, 05-07.2011, Gdańsk, s. 18 (*komunikat*).

8. **Gabriela Bajger**, Anna Roos, Tomasz Ciesielski, Piotr Konieczka, Iwona Pawliczka, Frank Riget, Jacek Namieśnik, Trace element concentrations in marine biota with special focus on grey and ringed seal, Proceedings of the 16th European Conference on Analytical Chemistry, 11-15.09.2011, Belgrade, Serbia (*plakat*).

#### *Skrypty dla studentów:*

1. **Gabriela Bajger**, Małgorzata Chmiel, Analiza wagowa, w: Obliczenia w chemii analitycznej, red.: Piotr Konieczka , skrypt dla studentów wydawany ze środków Unii Europejskiej w ramach Europejskiego Funduszu Społecznego (UDA-OPKL 04.01.02.-00-137/11-00) Gdańsk 2012.

2. Monika Janicka, **Gabriela Bajger-Nowak**, Agata Kot-Wasik, „Rozwiązywanie problemów w chromatografii cieczowej” skrypt dla studentów wydawany ze środków Unii Europejskiej w ramach Europejskiego Funduszu Społecznego (UDA-OPKL 04.01.02.-00-033/09-00), Gdańsk 2012.

***Granty i nagrody:***

1. Grant promotorski finansowany przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego, "Bioakumulacja metali ciężkich w łańcuchu troficznym organizmów morskich z ekosystemu Bałtyku", decyzja nr 7556/B/T02/2011/40.
2. Grant badawczy własny finansowany przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego, „Ocena analityczna i chemometryczna zdolności biowskaźnikowych fok do porównania stopnia zanieczyszczenia w różnych częściach ekosystemu Morza Bałtyckiego”, decyzja nr 3098/B/P01/2011/40.
3. Praca jest wspierana finansowo przez Fundację na rzecz Nauki Polskiej (program "Mistrz").
4. Zwiększenie stypendium doktoranckiego za osiągnięcia badawcze z dotacji podmiotowej na dofinansowanie zadań projakościowych w roku akademickim 2010/2011.

## ZAŁĄCZNIKI

**Załącznik 1.** Dane dotyczące osobników fok szarych, od których pobrano do badań próbki wątroby i nerek.

Nr foki	Lokalizacja	Data znalezienia	Płeć <sup>a</sup>	Wiek [lata]	Masa ciała [kg]	Długość ciała [cm]
<b>Grupa I</b>						
2	Luleå	02.08.2009	M	6	125	200
18	Luleå	03.07.2008	M	0	40	92
21	Haparanda	13.07.2008	M	1	52	146
24	Haparanda	11.07.2008	M	2	68	175
28	Haparanda	13.07.2008	M	2	54	165
29	Luleå	14.05.2009	F	2	70	130
30	Luleå	10.09.2009	M	2	70	170
31	Luleå	22.05.2009	F	bd <sup>b</sup>	70	145
32	Luleå	22.05.2009	F	bd	60	130
<b>Grupa II</b>						
1	Hudiksvall	09.11.2009	M	6	135	180
3	Hudiksvall	25.05.2009	M	bd	180	200
4	Björkö	11.07.2009	M	12	123	198
6	Brämön	23.04.2009	M	17	117	186
7	Brämön	22.04.2009	M	bd	129	194
8	Bottenhavet	19.04.2009	M	16	115	188
9	Gävle	28.01.2009	M	12	174	193
10	Stocka	19.12.2008	M	bd	117	181
11	Ljusne	14.01.2009	M	15	137	199
12	Ljusne	14.01.2009	M	13	169	194
13	Bottenhavet	06.08.2008	M	20	154	192
14	Korvgrund	10.05.2008	M	14	141	195
15	Stocka	13.11.2008	M	20	138	192
16	Söderhamn	06.02.2008	M	16	228	203
17	Funngrunden	11.06.2009	M		39	109
19	Norrsundet	09.06.2009	M		34	116
20	Hudiksvall	17.06.2008	M		42	121
22	Söderhamn	01.05.2008	M	9	120	190
23	Norrsundet	09.06.2009	F	bd	26	107
25	Korvgrund	24.04.2008	F	2	55	132
26	VingÅland	13.02.2008	M	1	63	134
27	Söderhamn	12.04.2008	M	1	67	147
35	Eggegrund	16.12.2008	M	11	158	192
37	Furuvik, Gävle	17.06.2009	M	9	159	192
44	Korsholmen	14.08.2009	F	bd	40	129

## Załącznik 1. - c.d.

70	–	18.04.2009	M	bd	92	158
<b>Grupa III</b>						
33	Östhammar	07.11.2009	M	8	180	165
34	Östhammar	02.05.2009	M	bd	260	232
38	Missing	31.08.2009	M	bd	61	145
39	Väddö	02.10.2009	M	2	bd	151
40	–	07.09.2009	M	bd	82	160
41	Horssten	02.05.2009	–	1	50	130
42	Själkobbarna	16.04.2009	M	1	60	140
43	Grönskär	16.04.2009	F	1	50	142
<b>Grupa IV</b>						
5	Grönö	11.09.2009	F	3	84	161
36	Flatlogen	28.06.2009	M	6	150	195
45	Figeholm	01.08.2009	M	bd	123	181
46	Figeholm	09.10.2009	M	1	60	145
48	–	21.11.2008	M	5	160	215
49	–	06.10.2008	M	10	200	230
50	Bråviken	25.01.2009	M	14	217	215
51	Oskarshamn	09.11.2008	M	26	250	198
52	Flatlogen	04.05.2008	M	3	110	165
53	Fårö, Gotland	11.04.2009	M	bd	180	218
54	Stora Askö	05.09.2008	M	3	77	162
55	Stora Askö	06.09.2008	M	3	88	177
56	Stora Örskär	06.10.2008	M	4	72	156
57	Mönsterås	16.10.2008	F	3	72	158
58	Söreskaret	24.09.2008	M	1	61	137
59	Loftahammar	17.08.2008	M	0	42	124
62	Furillen	08.06.2009	M	bd	40	121
63	Herrvik	10.12.2007	F	bd	47	134
64	Stora Askö	24.07.2008	M	3	72	157
68	–	16.09.2009	F	bd	52	126
69	–	16.04.2010	F	bd	50	150
71	–	16.05.2010	F	bd	120	170
72	–	16.04.2010	M	bd	140	205
<b>Grupa V</b>						
73	Westerplatte	14.04.2006	M	bd	89	203
74	Władysławowo	02.02.2007	F	bd	67	107
75	Hel	27.03.2007	F	bd	106	188
76	Czołpino	08.07.2008	F	bd	46,	130
77	Hel	27.11.2008	M	bd	89	181
78	Kołobrzeg	24.04.2009	M	bd	79	162
79	Dziwnów	29.06.2009	M	bd	41	134

Załącznik 1. - c.d.

<b>Grupa VI</b>						
47	Lomma	27.09.2008	M	bd	110	197
60	–	13.01.2010	M	bd	85	166
61	Karlskrona	03.12.2009	M	bd	49	135
65	Smygehuk	01.01.2009	F	1	51	139
66	Beddingstrand	10.01.2008	M	3	84	160

<sup>a</sup> M – samiec, F – samica

<sup>b</sup> bd – brak danych

**Załącznik 2.** Wartości średnie, minimalne i maksymalne oraz odchylenie standardowe stężeń pierwiastków (podane w µg/g suchej masy) i stałych izotopów węgla i azotu oznaczone w próbkach wątroby pobranych od fok z poszczególnych obszarów geograficznych Bałtyku

Grupa	I n=9				II n=24				III n=8			
	średnia	min	max	S	średnia	min	max	S	średnia	min	max	S
$d^{13}C_{VPDB}$	-20	-22	-19	1,0	-19	-21	-18	0,48	-19	-19	-18	0,46
$d^{15}N_{AIR}$	14	13	16	0,76	14	13	15	0,54	14	14	15	0,41
<b>Pierwiastki śladowe</b>												
<b>Ag</b>	0,41	0,1075	0,77	0,22	0,34	0,090	0,90	0,22	0,34	0,17	0,56	0,14
<b>As</b>	0,28	0,17	0,51	0,10	0,56	0,27	1,2	0,23	0,45	0,32	0,57	0,11
<b>B</b>	0,0060	0,0060	0,0060	0,00000	0,019	0,0060	0,090	0,018	0,013	0,0060	0,026	0,0083
<b>Ba</b>	0,017	0,003	0,055	0,018	0,017	0,0024	0,14	0,028	0,0099	0,0020	0,033	0,012
<b>Bi</b>	0,13	0,0083	0,29	0,092	0,33	0,0089	1,3	0,35	0,18	0,033	0,45	0,13
<b>Cd</b>	0,62	0,18	1,0357	0,30	1,0	0,052	2,2	0,70	0,79	0,26	1,5	0,47
<b>Co</b>	0,054	0,033	0,067	0,011	0,065	0,032	0,13	0,023	0,066	0,039	0,12	0,032
<b>Cs</b>	0,047	0,026	0,097	0,026	0,051	0,034	0,11	0,017	0,048	0,020	0,078	0,018
<b>Cu</b>	82	26	136	34	45	9,9561	175	38	75	15	158	44
<b>Ga</b>	0,0012	0,00055	0,0024	0,00065	0,0017	0,00055	0,0040	0,0010	0,0014	0,00055	0,0030	0,00091
<b>Ge</b>	0,012	0,0041	0,058	0,017	0,011	0,0039	0,058	0,014	0,013	0,0041	0,055	0,017
<b>Hg</b>	45	1,5	102	38	47	2	282	61	28	4,2	55	18
<b>Li</b>	0,0044	0,0023	0,018	0,0053	0,0055	0,0023	0,018	0,0039	0,0035	0,0023	0,0059	0,0017
<b>Mn</b>	12	4,9	15	3,3	12	6,0	40	6,7	12	8,7	15	2,3
<b>Mo</b>	2,3	1,2	3,1	0,67	1,9	1,1	2,7	0,44	2,0	1,7	2,5	0,28
<b>Ni</b>	0,015	0,0035	0,052	0,016	0,010	0,0035	0,071	0,014	0,0085	0,0035	0,021	0,0067
<b>Pb</b>	0,034	0,022	0,055	0,0091	0,048	0,016	0,13	0,024	0,046	0,022	0,091	0,029

## Załącznik 2.- c.d.

<b>Rb</b>	8,77	5,39	18	4,13	6,4	3,6	13	1,9	7,6	3,5	11	2,1
<b>Sb</b>	0,0028	0,0011	0,0081	0,0023	0,0038	0,0005	0,019	0,0037	0,0021	0,0012	0,0033	0,00090
<b>Se</b>	19	2,3	42	15	17	2,1	96	21	12	3,2	24	7,1
<b>Si</b>	3,6	0,43	13	3,8	4,4	0,4010	29	6,0	4,8	0,67	13	4,4
<b>Sn</b>	0,26	0,039	0,56	0,21	0,74	0,025	4,2	0,89	0,44	0,0060	1,3	0,48
<b>Sr</b>	0,27	0,052	1,9	0,61	0,14	0,037	0,56	0,12	0,075	0,055	0,11	0,024
<b>Th</b>	0,00036	0,0000	0,0016	0,00050	0,00028	0,000040	0,0016	0,00038	0,00018	0,00004	0,00045	0,00012
<b>TI</b>	0,0096	0,0046	0,020	0,0049	0,010	0,0027	0,027	0,01	0,0056	0,0024	0,011	0,0034
<b>V</b>	0,090	0,037	0,17	0,059	0,28	0,034	0,93	0,24	0,17	0,032	0,34	0,12
<b>W</b>	0,0011	0,00073	0,0016	0,00036	0,0035	0,00063	0,031	0,0062	0,0022	0,0011	0,0037	0,0010
<b>Zn</b>	196	144	260	37	166	97	305	45	162	133	195	21
<b>Grupa</b>	<b>IV n=23</b>				<b>V n=7</b>				<b>VI n=5</b>			
	<b>średnia</b>	<b>min</b>	<b>max</b>	<b>S</b>	<b>średnia</b>	<b>min</b>	<b>max</b>	<b>S</b>	<b>średnia</b>	<b>min</b>	<b>max</b>	<b>S</b>
<b>d<sup>13</sup>C<sub>VPDB</sub></b>	-18	-22	-16	1,2	-19	-20	-17	1,1	-19	-19	-19	0,22
<b>d<sup>15</sup>N<sub>AIR</sub></b>	15	13	19	1,2	17	15	18	1,0	15	14	16	0,52
<b>Ag</b>	0,48	0,0044	1,5	0,42	0,83	0,037	3,3	1,2	0,62	0,11	1,4	0,55
<b>As</b>	0,51	0,10	1,1	0,23	0,42	0,20	0,65	0,19	0,63	0,41	0,93	0,23
<b>B</b>	0,047	0,0060	0,52	0,10	0,13	0,052	0,29	0,097	0,072	0,0060	0,13	0,048
<b>Ba</b>	0,019	0,0022	0,084	0,021	0,045	0,022	0,073	0,016	0,014	0,01	0,024	0,0068
<b>Bi</b>	0,58	0,0088	4,9	1,1	0,48	0,015	2,4	0,87	0,30	0,029	0,68	0,26
<b>Cd</b>	2,7	0,060	45	9,3	0,56	0,0064	1,7	0,68	0,81	0,16	3,0	1,2
<b>Co</b>	0,061	0,031	0,16	0,033	0,057	0,020	0,13	0,039	0,047	0,034	0,067	0,016
<b>Cs</b>	0,058	0,035	0,094	0,014	0,057	0,033	0,077	0,015	0,067	0,055	0,079	0,010

## Załącznik 2.- c.d.

<b>Cu</b>	77	19	167	39	34	10	59	20	57	32	127	40
<b>Ga</b>	0,0020	0,00055	0,0084	0,0018	0,0038	0,00055	0,0076	0,0023	0,0083	0,00055	0,037	0,016
<b>Ge</b>	0,0058	0,0015	0,013	0,0024	0,0077	0,0036	0,011	0,0030	0,0060	0,0035	0,0095	0,0023
<b>Hg</b>	118	2,8	823	182	167	0,69	917	338	72	5,5	193	71
<b>Li</b>	0,0057	0,0023	0,024	0,0056	0,010	0,0046	0,016	0,0047	0,0061	0,0023	0,0099	0,0029
<b>Mn</b>	10	3,9	21	3,2	13	7,5	17	3,0	6,8	3,9	9,8	2,5
<b>Mo</b>	2,0	0,41	3,7	0,64	2,0	1,2	2,6	0,53	1,7	1,5	2,1	0,22
<b>Ni</b>	0,0072	0,0035	0,022	0,0053	0,11	0,018	0,29	0,11	0,0097	0,0035	0,019	0,0060
<b>Pb</b>	0,067	0,022	0,21	0,043	0,082	0,028	0,17	0,052	0,049	0,024	0,10	0,030
<b>Rb</b>	7,83	4,53	13,20	2,42	5,8	4,9	6,9	0,57	4,7	3,9	5,9	0,7
<b>Sb</b>	0,0041	0,00045	0,013	0,0035	0,0052	0,0023	0,013	0,0040	0,0070	0,0027	0,013	0,0042
<b>Se</b>	44	2,2	285	63	63	2,8	340	124	30	3,6	74	26
<b>Si</b>	4,8	0,56	29	6,0	8,6	4,5	14	3,8	1,7	0,80	3,0	0,87
<b>Sn</b>	1,4	0,021	14	2,9	0,18	0,026	0,42	0,16	0,31	0,045	1,2	0,49
<b>Sr</b>	0,17	0,042	0,55	0,13	0,38	0,14	0,71	0,21	0,76	0,31	1,3	0,38
<b>Th</b>	0,00019	0,000040	0,00072	0,00018	0,00065	0,00024	0,0012	0,00036	0,00011	0,000040	0,00015	0,000045
<b>Tl</b>	0,0066	0,0027	0,015	0,0034	0,0051	0,0017	0,014	0,0040	0,0042	0,0025	0,0065	0,0016
<b>V</b>	0,22	0,029	0,97	0,23	0,39	0,020	1,5	0,54	0,20	0,062	0,69	0,27
<b>W</b>	0,0021	0,00071	0,0041	0,0010	0,0029	0,0012	0,0050	0,0015	0,0012	0,00043	0,0018	0,00051
<b>Zn</b>	182	114	362	54	210	111	343	91	129	104	162	27



## Załącznik 2. - c.d.

Makropierwiastki												
Grupa	I n=9				II n=24				III n=8			
	średnia	min	max	S	średnia	min	max	S	średnia	min	max	S
Ca	246	124	893	245	177	128	287	34	167	130	278	48
Fe	1030	557	1444	315	858	275	1710	329	942	453	1336	355
K	24600	22126	27624	1873	24013	17494	29651	3116	24525	17260	32196	4671
Mg	603	423	692	77	611	476	753	71	621	508	746	81
Na	4014	2340	6519	1327	3979	2547	4996	504	4237	2638	8150	1808
P	8976	6524	10803	1129	8817	7259	10572	890	9133	7414	11041	1409
S	10026	8845	10542	598	10217	8085	11636	773	10390	9445	11648	622
Grupa	IV n=23				V n=7				VI n=5			
	średnia	min	max	S	średnia	min	max	S	średnia	min	max	S
Ca	178	135	411	54	252	193	310	49	325	149	558	197
Fe	1010	290	2005	451	1414	830	1967	457	1158	898	1336	204
K	23582	18169	28464	2639	23428	21535	26759	1697	21372	18188	23316	1901
Mg	602	463	724	68	610	545	739	64	526	448	592	58
Na	4549	2786	8171	1034	5437	4572	7453	1044	4530	3938	5556	737
P	8688	6771	10459	961	8309	7363	9439	722	7048	6189	7826	713
S	10099	8505	12599	1050	9758	8687	10336	604	9124	8387	10285	733
Metale ziem rzadkich												
Grupa	I n=9				II n=24				III n=8			
	średnia	min	max	S	średnia	min	max	S	średnia	min	max	S
Ce	0,034	0,0049	0,074	0,024	0,075	0,0050	0,28	0,075	0,05	0,016	0,14	0,039
Dy	0,00037	0,00015	0,00085	0,00028	0,00067	0,00015	0,0023	0,00057	0,00053	0,00015	0,0013	0,00040

<b>Er</b>	0,00035	0,000025	0,00079	0,00027	0,00060	0,000025	0,0023	0,00057	0,00046	0,00012	0,0010	0,00033
-----------	---------	----------	---------	---------	---------	----------	--------	---------	---------	---------	--------	---------

**Załącznik 2. - c.d.**

<b>Ho</b>	0,00012	0,000010	0,00024	0,00008	0,00020	0,000029	0,00073	0,00017	0,00015	0,000051	0,00034	0,00011
<b>La</b>	0,019	0,0042	0,041	0,013	0,045	0,0032	0,17	0,046	0,031	0,0091667	0,084	0,024
<b>Lu</b>	0,000035	0,000015	0,000093	0	0,000048	0,000015	0,0002	0,000038	0,000036	0,000015	0,000077	0,000023
<b>Nd</b>	0,015	0,0021	0,033	0,011	0,029	0,0020	0,094	0,027	0,022	0,0064	0,052	0,015
<b>Pr</b>	0,0038	0,00056	0,0083	0,0027	0,0077	0,00049	0,027	0,0075	0,0056	0,0016	0,014	0,0041
<b>Sm</b>	0,0022	0,00037	0,0052	0,0016	0,0038	0,0003	0,012	0,0034	0,0030	0,00086	0,0069	0,0020
<b>Tb</b>	0,00019	0,000033	0,00044	0,00013	0,00031	0,000015	0,0010	0,00027	0,00027	0,000085	0,00058	0,0002
<b>Y</b>	0,0033	0,0010	0,0066	0,0022	0,0051	0,00052	0,019	0,0045	0,0041	0,0011	0,0088	0,0028
<b>Yb</b>	0,00022	0,000030	0,00053	0,00017	0,00037	0	0,0013	0,00031	0,00023	0,000030	0,00059	0,00019
<b>Grupa</b>	<b>IV n=23</b>				<b>V n=7</b>				<b>VI n=5</b>			
	<b>średnia</b>	<b>min</b>	<b>max</b>	<b>S</b>	<b>średnia</b>	<b>min</b>	<b>max</b>	<b>S</b>	<b>średnia</b>	<b>min</b>	<b>max</b>	<b>S</b>
<b>Ce</b>	0,077	0,0064	0,55	0,11	0,10	0,0043	0,25	0,11	0,031	0,016	0,063	0,019
<b>Dy</b>	0,0010	0,00015	0,0085	0,0018	0,00080	0,00015	0,0022	0,00075	0,00031	0,00015	0,00079	0,00028
<b>Er</b>	0,0010	0,000059	0,011	0,0022	0,00074	0,000074	0,0020	0,00071	0,00026	0,00014	0,00055	0,00017
<b>Ho</b>	0,00033	0,000010	0,0033	0,00069	0,00024	0,000010	0,00067	0,00024	0,00010	0,000047	0,00023	0,000076
<b>La</b>	0,045	0,0037	0,32	0,065	0,060	0,0014	0,15	0,066	0,017	0,0087	0,036	0,011
<b>Lu</b>	0,00011	0,000015	0,0015	0,00030	0,000056	0,000015	0,00013	0,000038	0,000021	0,000015	0,000046	0,000014
<b>Nd</b>	0,031	0,0028	0,22	0,044	0,038	0,0012	0,097	0,040	0,013	0,0071	0,028	0,0082
<b>Pr</b>	0,0080	0,00068	0,057	0,011	0,010	0,00032	0,026	0,011	0,0034	0,0018	0,0070	0,0021
<b>Sm</b>	0,0043	0,00049	0,029	0,0057	0,0051	0,00031	0,013	0,0053	0,0019	0,0010	0,0041	0,0013
<b>Tb</b>	0,00039	0,000031	0,0021	0,00053	0,00039	0,000037	0,0010	0,00038	0,00015	0,00009	0,00033	0,00010
<b>Y</b>	0,0082	0,00059	0,079	0,016	0,0059	0,00052	0,016	0,0057	0,0023	0,0012	0,0053	0,0017
<b>Yb</b>	0,00079	0,000030	0,011	0,0023	0,00042	0,000075	0,0011	0,00036	0,00015	0,000062	0,00039	0,00013