



Stanisław Robak<sup>1</sup>, Grzegorz Zieliński<sup>2</sup>, Magdalena Pańczyk<sup>2</sup>, Piotr Chmieleński<sup>1</sup>,  
Tomasz Nermer<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Instytut Rybactwa Śródlądowego w Olsztynie

<sup>2</sup>Państwowy Instytut Geologiczny – Państwowy Instytut Badawczy w Warszawie

<sup>3</sup>Morski Instytut Rybacki – Państwowy Instytut Badawczy w Gdyni

## Skład i udział badanych pierwiastków chemicznych w otolicie węgorza europejskiego *Anguilla anguilla* (L.) pochodzącego z Zalewu Szczecińskiego

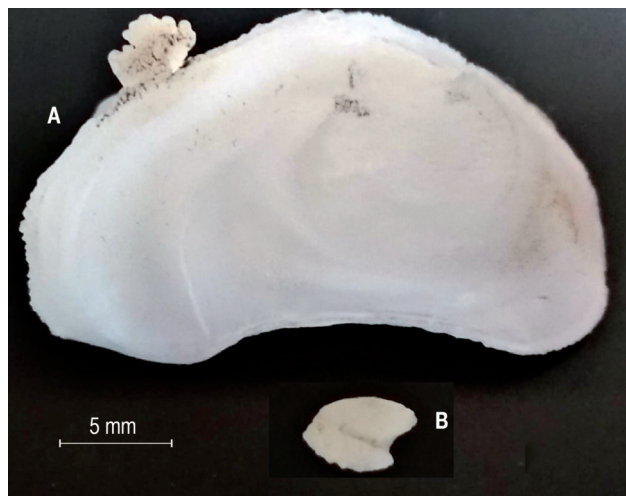
Kamyczek błędnikowy, zwany u ryb otolitem, jest strukturalnie biominerałem utworzonym z wapiennej matrycy z wbudowanymi elementami organicznymi (ami-

nokwasami, węglowodanami) i mineralnymi (pierwiastki i związki chemiczne). Wchodzi w skład narządów zmysłu słuchu i równowagi. Poprzez ucisk na włoski czuciowe orientuje organizm w przestrzeni, wysyłając informacje o jego położeniu do ośrodkowego układu nerwowego. Po obu stronach mózgowcaszki występują po trzy otolity o zróżnicowanym kształcie i wielkości. Biorąc pod uwagę morfologiczne ukształtowanie zostały nazwane kamyczkiem (*lapillus*), gwiazdką (*asteriscus*) i strzałką (*sagitta*), która zważywszy na największe rozmiary jest najczęściej wykorzystywana do badań (fot. 1).

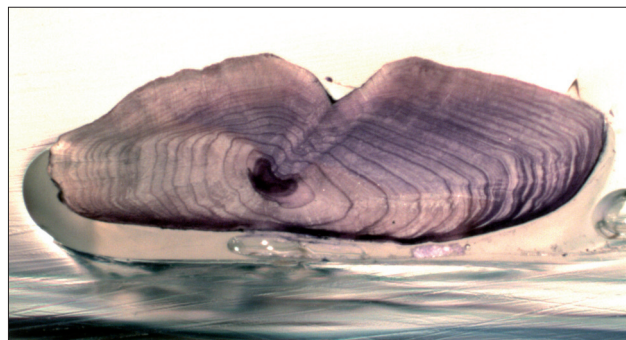
Jako element wbudowany w jeden z narządów zmysłu towarzyszy rozwojowi osobniczemu, dlatego może spełniać także funkcję informacyjną o przebiegu życia organizmu, np. wieku i tempie wzrostu (fot. 2).

Badania dotyczące wykorzystania otolitu do oceny wieku ryb zapoczątkował w 1899 roku Reibisch. Zwrócenie uwagi na otolit, w którym zawarty jest zapis „historii życia” ryb, spowodowało duże zainteresowanie nim wielu badaczy z różnych dziedzin nauki. Szybki rozwój technologiczny oraz opracowanie i wdrażanie nowych metod badań otolitu gruntownie zmieniło i wzbogaciło wiedzę z zakresu biologii wielu gatunków ryb. W szybkim czasie stał się także elementem badań z zakresu paleontologii i taksonomii.

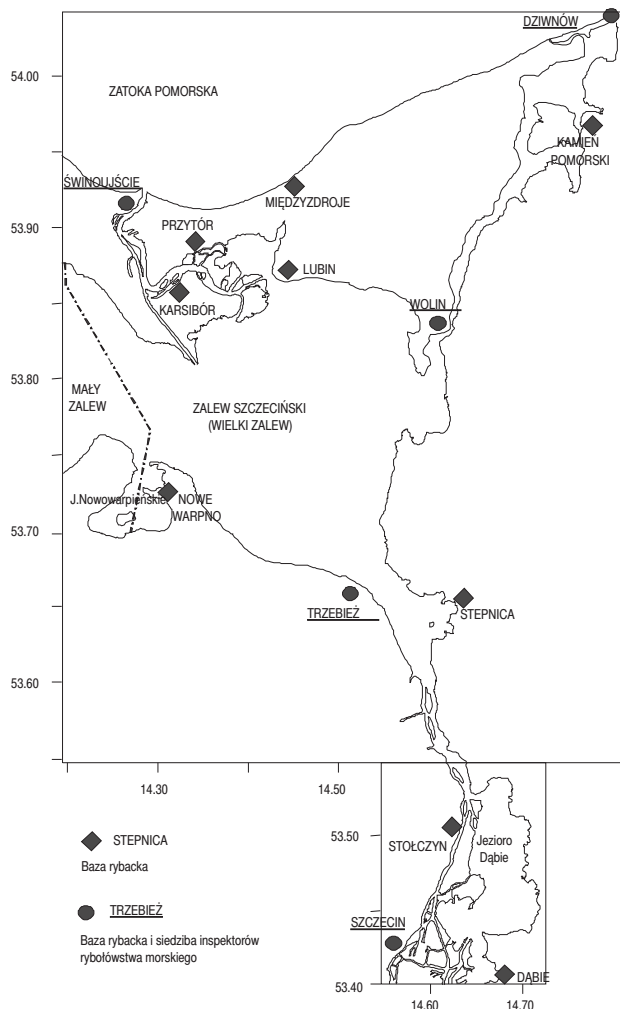
Skład chemiczny otolitu jest stosunkowo bogaty w porównaniu do innych struktur biomineralnych. Campana (1999) wyróżnił w otolicie 31 pierwiastków, z których dominującą rolę odgrywają wapń (Ca), węgiel (C) i tlen (O) skupione w węglanie wapnia ( $\text{CaCO}_3$ ), który wraz z innymi składnikami tworzy biomineralną matrycę. Większość ze stwierdzonych pierwiastków występuje w ilościach śladowych.



Fot. 1. Otolity wypreparowane z mózgowcaszki (A) ryby z rodzaju *Pseudotolithus* (z kolekcji M. Teodorowicza) oraz (B) węgorza *Anguilla anguilla* (L.).



Fot. 2. Otolit węgorza (Lt = 59,0 cm; W = 414 g) spreparowany do oceny wieku i tempa wzrostu.



Rys. 1. Polska część Zalewu Szczecińskiego i wód przyległych.

wych i wbudowywana jest w strukturę otolitu na zasadzie zamiany lub wymiany Ca z innymi licznie rozpowszechnionymi w przyrodzie pierwiastkami. Ich występowanie i udział jest zmienny i zależy od obszaru występowania oraz warunków bytowania organizmu. Obecność niektórych pierwiastków w organizmach żywych spełnia ważną funkcję informacyjną.

## Teren badań

Zalew Szczeciński jest rozległym, stosunkowo płytkim zbiornikiem przepływowym typu estuarium, w skład którego wchodzi liczne płoza leżące na terenie Polski i Niemiec. Powierzchnia zbiornika wynosi 686,9 km<sup>2</sup>, przy czym po stronie polskiej 410,0 km<sup>2</sup>, a po stronie niemieckiej 176,9 km<sup>2</sup> (rys. 1). Średnia głębokość zalewu to 3,8 m, natomiast maksymalna 8,4 m. W wyniku pogłębiania utrzymywany jest tor wodny o głębokości 10,5 m.

Warunki hydrologiczne i hydrochemiczne kształtowane są głównie oddziaływaniem rzeki Odry i okresowo tak zwanej cofki słonawych wód Zatoki Pomorskiej. Są efektem działania wielu czynników, między innymi wybudowanego

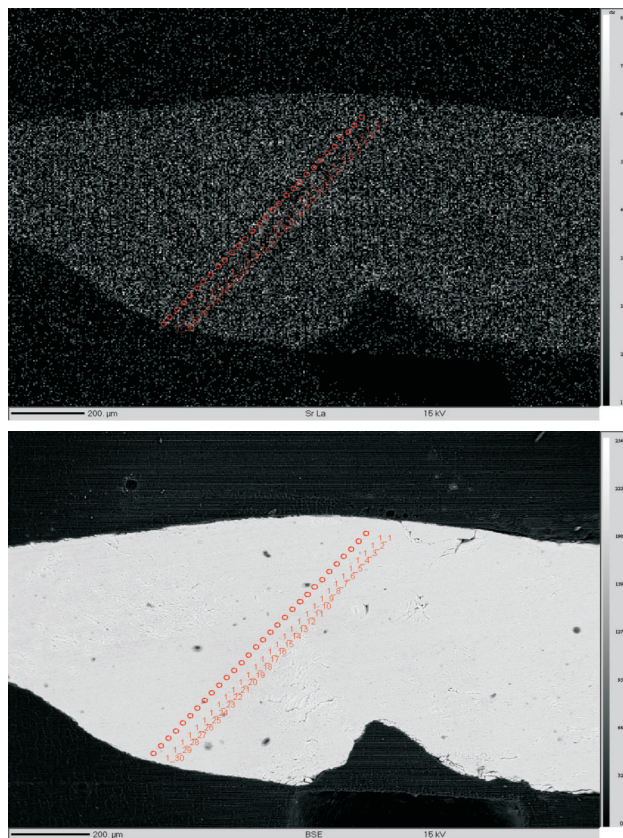
na początku XX wieku Kanału Piastowskiego, który ułatwił komunikację pomiędzy Zatoką Pomorską i Zalewem. Masy wody przepływające przez kanał charakteryzują się wysoką dynamiką i zmiennością przepływu, szczególnie w obrębie połączenia z Zatoką Pomorską. Zasolenie wód jest zróżnicowane i osiąga wartości od 0,5 do 2‰. Zalew jest zbiornikiem politroficznym, w którym od początku lat 60. rejestrowano zwiększające się zanieczyszczenie ściekami, głównie komunalnymi i przemysłowymi, co spowodowało znaczne zmiany w biocenozie (Wiktor 1976). Ciągłe mieszanie się wód, pomimo silnych zakwitów glonów latem, przeciwdziała deficytom tlenowym w warstwach przydennych. W efekcie muliste dno charakteryzuje się dużą produkcją biomasy (Wolnomiejski i Grygiel 1994).

Estuarijny charakter wód południowej części Zatoki Pomorskiej oraz Zalewu Szczecińskiego wpływa na różnorodność taksonomiczną ichtiofauny, a także jej wyjątkową obfitość. Użyźniający wpływ wód rzecznych, bardzo duża zdolność Zalewu do samooczyszczania się oraz wpływ cofek wody morskiej skutkuje wyjątkową żyznością tego zbiornika. Zjawiska te tworzą nadzwyczaj dogodne warunki żerowiskowe zarówno dla ryb planktonożernych, jak i bentosożernych. Pomiędzy Zatoką a Zalewem Szczecińskim stale odbywają się migracje wielu gatunków ryb słodkowodnych i słonowodnych – zarówno tarłowe, jak i żerowiskowe. W wyniku wieloletnich badań naukowych ichtiofauny Zalewu Szczecińskiego i Zatoki Pomorskiej ustalono, że w wodach tych bytują stale bądź okresowo 62 gatunki ryb, w tym 29 gatunków ryb słodkowodnych, 8 gatunków ryb dwuśrodowiskowych i 25 gatunków ryb morskich.

## Materiały i metody

Próbę otolitów do badań pozyskano z węgorzy odłowionych przez profesjonalnych rybaków sprzętem stawnym. Otolity (strzałki) pobierano z mózgowcaszki martwych węgorzy przez rozcięcie głowy w poprzek linii oczu. Po oczyszczeniu otolit był mierzony i zalewany żywicą. Tak przygotowany preparat szlifowano do uzyskania obrazu centrum w przekroju poprzecznym otolitu. Z preparatu odcinano plaster o grubości około 0,5 mm, który przyklejano do szkiełka podstawowego odciętą stroną oszlifowanego powierzchniowo otolitu (bez wybarwienia).

Analizy składu chemicznego otolitów w mikroobszarze wykonano z wykorzystaniem mikrosondy elektronowej Cameca SX 100, wyposażonej w spektrometry dyspersji długości fali wtórnego promieniowania X (WDS) w Laboratorium Analiz w Mikroobszarze Państwowego Instytutu Geologicznego – Państwowego Instytutu Badawczego w Warszawie. Preparaty z otolitami zostały napylone węglem. Badania przeprowadzono dwuetapowo. W pierwszym etapie wykonano mapy WDS rozkładu koncentracji strontu. Do badań wykorzystano kryształ dyfrakcyjny o podwyższonej czułości LTAP (spektrometr WDS nisko-



Fot. 3. Obraz przekroju poprzecznego oszlifowanego otolitu z zaznaczonym transektem analizy chemicznej.

ciśnieniowy), przy zastosowaniu następujących parametrów pracy mikrosondy: napięcie przyspieszające 15 kV, prąd wiązki – 20 nA, wiązka lekko rozproszona (2 µm średnicy na powierzchni próbki).

W drugim etapie, w oparciu o mapę rozkładu Sr wyznaczano profil analiz chemicznych ilościowych, obejmujących

średnio 35-40 punktów w linii (dla mniejszych otolitów mniej punktów), przy kroku pomiarowym 15-20 µm (fot. 3).

Analizy ilościowe wykonano z zastosowaniem klasycznej procedury dla węglanów. Mierzono koncentracje następującego zestawu pierwiastków: Ca (osobno), Mg, Fe, Mn, Na, F, Sr, Si, Al, K, Cl, S, P, Ba. Koncentracja C została założona na podstawie zawartości C w typowym kalcycie/aragonicie (przyjęto 12% wag.), natomiast koncentracje O zostały wyliczone na podstawie walencyjności i zawartości poszczególnych składników (pierwiastków) w analizowanej próbce.

Zastosowano następujące parametry pracy mikrosondy dla punktowej analizy chemicznej w mikroobszarze: napięcie przyspieszające – 15 kV, średnica wiązki – 5 µm (wiązka rozproszona), prąd wiązki: dla Ca – 10 nA, dla pozostałych mierzonych składników – 20 nA (analiza dwustopniowa).

Odczyty pomiarowe były przeliczane na koncentracje (% wagi) na podstawie kalibracji na standardach (minerały o referencyjnym składzie chemicznym) dla danego pierwiastka:

- Ca, Mg – diopsyd  $\text{CaMgSi}_2\text{O}_6$
- Fe – hematyt  $\text{Fe}_2\text{O}_3$
- Mn – rodonit  $\text{Mn}_2\text{Si}_2\text{O}_6$
- Sr, S – celestyn  $\text{SrSO}_4$
- Si – wollastonit  $\text{Ca}_3\text{Si}_3\text{O}_9$
- K, Al – ortoklaz  $\text{KAlSi}_3\text{O}_8$
- P, F – apatyt  $\text{Ca}_5[(\text{F}, \text{Cl}, \text{OH})(\text{PO}_4)_3]$
- Na – jadeit  $\text{NaAlSi}_2\text{O}_6$
- Ba – baryt  $\text{BaSO}_4$

## Wyniki badań

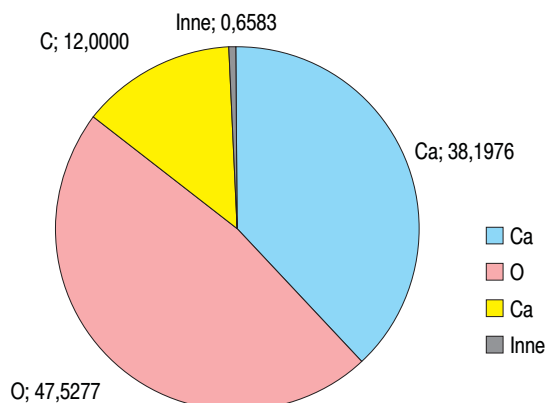
W otolithach węgorzy pochodzących z Zalewu Szczecińskiego wykryto 16 badanych pierwiastków chemicz-

TABELA 1

Parametry składu chemicznego otolitu węgorzy z Zalewu Szczecińskiego

Parametr	Liczba oznaczeń (n)	Maks. (% masy)	Min. (% masy)	Średnia (% masy)	Odchylenie standardowe	Współczynnik zmienności (%)
Ca	30	39,066	36,437	38,1976	0,5435	1,42
Fe	30	0,051	0,000	0,0087	0,0122	139,46
Mn	30	0,016	0,000	0,0026	0,0045	174,83
Na	30	0,375	0,080	0,2440	0,0720	29,52
F	30	0,006	0,003	0,0003		
Mg	30	0,054	0,000	0,0047	0,0096	202,94
Sr	30	0,834	0,000	0,1760	0,2848	161,78
Si	30	0,241	0,026	0,0830	0,0554	66,81
Al	30	0,012	0,000	0,0057	0,0034	60,13
K	30	0,052	0,006	0,0250	0,0134	53,70
Cl	30	0,073	0,010	0,0343	0,0177	51,71
S	30	0,051	0,017	0,0294	0,0096	32,78
P	30	0,048	0,006	0,0267	0,0089	33,49
Ba	30	0,103	0,000	0,0179	0,0276	154,68
O	30	47,892	46,785	47,5277	0,2244	0,47
C	30	12,000	12,000	12,0000	0,0000	0,00



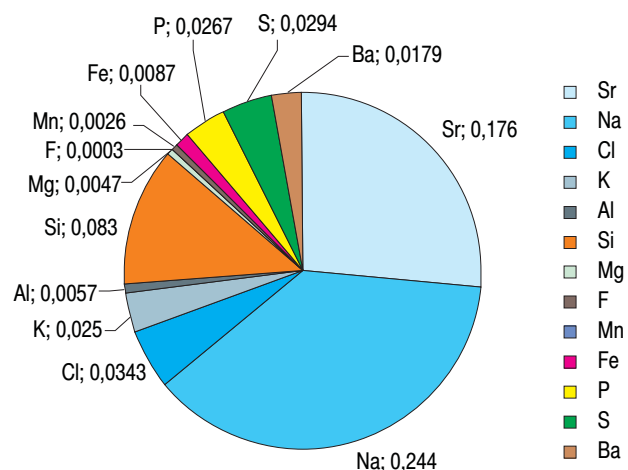


Rys. 2. Udział % podstawowych i śladowych pierwiastków w otolicie węgorzy pochodzących z Zalewu Szczecińskiego.

nych: wapń (Ca), żelazo (Fe), mangan (Mn), sód (Na), fluor (F), magnez (Mg), stront (Sr), krzem (Si), glin (Al), potas (K), chlor (Cl), siarkę (S), fosfor (P), bar (Ba), węgiel (C) i tlen (O). Dominującym pierwiastkiem w składzie chemicznym otolitu okazał się tlen (O) 47,5277% (tab. 1). Nieco mniejszy udział stanowił wapń (Ca) 38,1976%. Koncentracja węgla (C) została założona na podstawie zawartości C w typowym kalcycie/aragonicie (przyjęto 12% wag.). Udział pozostałych pierwiastków był śladowy i wyniósł w sumie 0,6583%. Wśród pierwiastków śladowych udział na poziomie wartości dziesiętnych mają sód (Na) 0,24% i stront (Sr) 0,17%. Dla sześciu pierwiastków udział kształtował się na poziomie setnych wartości procenta: krzem (Si) 0,083%, chlor (Cl) 0,034%, siarka (S) 0,029%, fosfor (P) 0,026%, potas (K) 0,025% i bar (Ba) 0,018%. O rząd niższe wartości, aczkolwiek należy zaznaczyć, iż wartości te są poniżej limitu detekcji mikrosondy elektronowej dla tych pierwiastków, tj. tysięcznych procenta były udziałem czterech pierwiastków: żelaza (Fe) 0,0087%, glinu (Al) 0,0056% magnezu (Mg) 0,0047% i manganu (Mn) 0,0026%. Udział fluoru wyniósł 0,0003% i był najniższy ze stwierdzonych w otolicie pierwiastków. Wszystkie podane wartości udziału poszczególnych pierwiastków są wartościami średnimi, wyliczonymi na podstawie wartości oznaczeń w każdym punkcie transektu (rys. 2 i 3).

## Dyskusja

Otolity u węgorza, podobnie jak u innych ryb, pojawiają się we wczesnej fazie rozwoju larwalnego i powiększają swoje rozmiary wraz postępującym wzrostem osobniczym (Umezawa i Tsukamoto 1991). Użycie otolitu jako swistego chronometru historii życia ryb zawdzięczamy Reibschowi, który już w 1899 roku zaobserwował na nim odkładanie pierścieni rocznych i wykorzystał ten fakt do oznaczenia wieku ryb. Metoda ta opierała się na założeniu, że przyrost otolitu następuje poprzez stałe odkładanie pierwiastków chemicznych występujących w organizmie w postaci jonów na jego powierzchni. Stwierdzono, że jony



Rys. 3. Udział % pierwiastków śladowych w otolicie węgorzy pochodzących z Zalewu Szczecińskiego.

transportowane w osoczu krwi po przeniknięciu do śródchłonki są wbudowywane w uchu wewnętrznym w strukturę otolitu. Badania Lin i in. (2007) udowodniły, że nie ma związku pomiędzy dietą ryb a składem chemicznym otolitu. Decyduje o nim wyłącznie środowisko wodne. Typowe koncentracje Sr w wodzie morskiej wynoszą ok. 7 ppm, natomiast w wodach słodkich na poziomie kilku ppb (np. Goldstein i Jacobsen 1987, Veizer 1989), co uzasadnia wybór tego pierwiastka do mapowania. W przypadku węgorza zmieniane środowisko wodne pozostawia w warstwach przyrostu ślad bytowania lub migracji w postaci charakterystycznych dla habitatu pierwiastków chemicznych, np. strontu (Sr). Poziom zawartości tego pierwiastka wskazuje na przebywanie ryby w wodzie słodkiej i słonej lub słonawej (Tzeng i in. 2002). W badaniach odkładania jonów na powierzchni otolitu stwierdzono duże przesunięcie czasowe pomiędzy zmianą środowiska a zaznaczeniem tego faktu na otolicie. Yokouchi i in. (2011) badając stosunek Sr/Ca stwierdzili, że zmiana wartości tego wskaźnika ujawnia się od 10 do 60 dni po zmianie środowiska. Okres ten zależy głównie od metabolizmu ryby, na który istotny wpływ ma temperatura otoczenia (Gaetani i Cohen 2006, Neat i in. 2008, Fukuda i in. 2009).

Wysoki udział węgla (C), tlenu (O) i wapnia (Ca) związany jest z tworzącym matrycę otolitu węglanem wapnia ( $\text{CaCO}_3$ ). U różnorodnych organizmów występuje on w postaci aragonitu lub kalcytu. Tworzący statolity węgorza aragonit jest polimorficzną odmianą węglanu wapnia o strukturze romboidalnej, tworzącej różnego rodzaju kryształki (tabliczkowe, słupkowe, igiełkowe). Występujące w strukturze otolitu inne pierwiastki, w tym w postaci dwudodatnich jonów są postrzegane jako zanieczyszczenia sieci krystalicznej węglanu wapnia. Jest to efekt wbudowywania w trakcie krystalizacji struktury matrycy jonów innych pierwiastków niż wapń. O ile w kalcytach są to najczęściej jony magnezu, to w aragonicie zamiennikiem wapnia jest zwykle stront, który stanowi ważny element badań biologii

węgorza. Koncentracja strontu w wodzie słodkiej jest niewielka. Wysoki udział strontu w otolicie wskazuje na bytowanie węgorza w środowisku morskim lub przejściowym. Na podstawie koncentracji i rozkładu strontu w otolicie węgorza możemy określić jego sposób rekrutacji (Tzeng i in. 2002) Duża koncentracja w środkowej części otolitu oraz powolny spadek udziału strontu w pewnym oddaleniu od centrum, świadczy o naturalnym pochodzeniu ryb, poprzez migracje narybku szklatego w wodach morskich, przejściowych i słodkich (Shiao i in. 2006).

Większość stwierdzanych w strukturze aragonitu pierwiastków traktowanych jest jako zanieczyszczenia pierwotne o charakterze śladowym. Pomimo tego mogą one spełniać ważną rolę przy tworzeniu struktury matrycy w trakcie krystalizacji. Do najczęściej spotykanych pierwiastków w strukturze otolitu zaliczamy Si, Mn, Fe, Zn, K, Na, Cl, Al, S, Na, I, Br, Sr, Mg. Występowanie tych pierwiastków może mieć różne źródła, np. Mg, Fe, Zn to najczęściej składniki enzymów, natomiast Na, K, Cl, S pochodzą z płynów ustrojowych. Siarka stwierdzana niekiedy w próbkach jest pierwiastkiem występującym w białkach, które zawierają metioninę i cysteinę.

Obecność niektórych pierwiastków świadczy o zasoleniu oraz panujących w trakcie tworzenia biominerałów temperaturach. Przykładem może być magnez (Mg), który w zależności od temperatury wbudowuje się w struktury węglanów z różną szybkością. Ma on także kluczowe znaczenie w budowie aragonitu jako inhibitor wiązań wapniowo-węglanowych (Neat i in. 2008). W obecności magnezu jony węglanowe i wapniowe tworzą aragonitową strukturę matrycy. Dzieje się tak dzięki wysokiemu stosunkowi magnezu do wapnia w środowisku w trakcie procesu strącania i nukleacji. W przypadku niskiej zawartości magnezu powstaje struktura kalcytowa. Ocenia się, że wartością graniczną zawartości molowej magnezu do wapnia Mg/Ca mmol/mol jest wartość większa niż 2.

Innym czynnikiem wpływającym na skład chemiczny otolitu jest rodzaj matrycy. W romboidalnej strukturze ara-

gonitu częściej występuje stront ( $\text{Sr}^{2+}$ ) oraz dwuwartościowe pierwiastki, których średnica jonów jest większa od średnicy jonów wapnia ( $\text{Ca}^{2+}$ ). Do najczęściej spotykanych zaliczyć możemy bar ( $\text{Ba}^{2+}$ ) oraz ołów ( $\text{Pb}^{2+}$ ) pochodzące z zanieczyszczeń środowiska.

## Literatura

- Campana S.E. 1999 – Chemistry and composition of fish otoliths: pathways, mechanisms and applications – Mar. Ecol. Prog. Ser. 188: 263-297.
- Gaetani G., Cohen A. 2006 – Element partitioning during precipitation of aragonite from seawater: A framework for understanding paleoproxies – Geochimica et Cosmochimica Acta 70: 4617-4634.
- Goldstein S.J., Jacobsen S.B. 1987 – Nd and Sr isotope systematics of river water dissolved material: Implications for the sources of Nd and Sr in seawater – Chemical Geology, 66: 245-272.
- Fukuda N., Kuroki M., Shinoda A., Yamada Y., Okamura A., Aoyama J., Tsukamoto K. 2009 – Influence of water temperature and feeding regime on otolith growth in *Anguilla japonica* glass eels and elvers: does otolith growth cease at low temperatures? – J. Fish Biol. 74: 1915-1933. [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Abstract&list\\_uids=20735680](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Abstract&list_uids=20735680)
- Lin S.H., Chang C.W., Iizuka Y., Tzeng W.N. 2007 – Salinities, not diets, affect strontium/calcium ratios in otoliths of *Anguilla japonica* – J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 341: 254-263.
- Neat F.C., Wright P.J., Fryer R.J. 2008 – Temperature effects on otolith pattern formation in Atlantic cod *Gadus morhua*. – J. Fish Biol. 73: 2527-2541.
- Shiao J.C., Lo Y.S., Iizuka Y., Tzeng W.N. 2006 – Migratory patterns and contribution of stocking to the population of European eel in Lithuanian waters as indicated by otolith Sr:Ca ratios – J. Fish Biol. 69: 749-769.
- Tzeng W.N., Shiao J.C., Iizuka Y. 2002 – Use of otolith Sr:Ca ratios to study the riverine migratory behaviors of Japanese eel *Anguilla japonica* – Mar. Ecol. Prog. Ser. 245: 213-221. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1991.tb04357.x>
- Umezawa A., Tsukamoto K. 1991 – Factors influencing otolith increment formation in Japanese eel, *Anguilla japonica*, elvers – J. Fish Biol. 39: 211-223.
- Wiktor K. 1976 – Changes in biocoenoses of the Balic coastal areas as a result of increasing pollution – Stud. Mater. Oceanol. Kom. Badań Morza PAN, Ser. Biol. Morza 3: 143-168.
- Wolnomiejski N., Grygiel L. 1994 – Badania bentosu i pokarmu ryb Zalewu Szczecińskiego – Studia i Materiały MIR Gdynia Ser. B nr 67.
- Veizer J. 1989 – Strontium isotopes in seawater through time – Annu. Rev. Earth Planet. Sci., 17: 141-167.
- Yokouchi K., Fukuda N., Shirai K., Aoyama J., Davenport F., Tsukamoto K. 2011 – Time lag of the response on the otolith strontium/calcium ratios of the Japanese eel, *Anguilla japonica* to changes in strontium/calcium ratios of ambient water – Environ. Biol. Fish. 92(4): 469-478.

Przyjęto po recenzji 8.10.2018 r.

## COMPOSITION AND SHARE OF CHEMICAL ELEMENTS IN OTOLITHS OF THE EUROPEAN EEL, *ANGUILLA ANGUILLA* (L.), FROM THE SZCZECIN LAGOON

Stanisław Robak, Grzegorz Zieliński, Magdalena Pańczyk, Piotr Chmieliński, Tomasz Nermer

**ABSTRACT.** The chemical analysis of otoliths of eels from the Szczecin Lagoon confirmed the presence of 16 chemical elements, including three dominant ones – calcium (Ca), oxygen (O), and carbon (C) – in an aragonite matrix of calcium carbonate ( $\text{CaCO}_3$ ). They constituted a total of 99.33% of the otolith mass. Other elements, i.e., iron (Fe), manganese (Mn), sodium (Na), fluorine (F), magnesium (Mg), strontium (Sr), silicon (Si), aluminum (Al), Potassium (K), chlorine (Cl), sulfur (S), phosphorus (P), and barium (Ba), were present in trace amounts and their share of the total was 0.65%. Despite their small share, trace elements provide important information on the life histories of individuals, and they participate in the construction of the biomineral matrix, *inter alia*, as inhibitors or catalysts of chemical processes.

**Key words:** eel, otolith, chemical composition