

SSAKI JAKO BIOINDYKATORY ZANIECZYSZCZEŃ CHEMICZNYCH W EKOSYSTEMACH POŁUDNIOWEGO BAŁTYKU I JEZIORA BAJKAŁ – IMPLIKACJE ANALITYCZNE

Tomasz Ciesielski

Katedra i Zakład Bromatologii, Akademia Medyczna w Gdańsku

1 WSTĘP

Ssaki morskie odgrywają kluczową rolę w funkcjonowaniu ekosystemów morskich. Jako konsumenci, znajdujący się często na szczycie piramidy troficznej, są końcowymi odbiorcami energii i materii przepływającej w łańcuchu pokarmowym. Mogą też akumulować znaczące ilości toksycznych związków chemicznych. Od lat 80. notuje się epidemie wśród ssaków morskich wywołane zakażeniami wirusowymi. Wciąż otwartym pozostaje problem, czy antropopresja ma wpływ na stan zdrowotny mieszkańców wód: morświnów, delfinów i fok.

Jezioro Bajkał i w dużym stopniu Morze Bałtyckie to akweny odizolowane od całości systemu wodnego (oceanicznego) naszej planety. Stanowi to o ich szczególnej wrażliwości na zanieczyszczenia wieloma substancjami, w tym również pierwiastkami oraz ich nietrwałymi izotopami. Bałtyk to największy na świecie zbiornik wody słonawej. Jest płytkim morzem odizolowanym od wód Wszechocanu. Następstwem jego położenia geograficznego i hydrologicznych uwarunkowań jest ciągła presja antropogeniczna, jakiej podlega ten akwen. Wraz z ładunkiem zanieczyszczeń spływającym z wodami rzecznyymi, a także transportem atmosferycznym, do wód bałtyckich przedostają się duże ilości pierwiastków chemicznych, włączając te o udokumentowanym działaniu toksycznym. Wśród nich istotne znaczenie, ze względu na negatywne skutki wywoływane u żywych organizmów, mają izotopy radioaktywne. Kwestia zanieczyszczenia ekosystemu bałtyckiego radiopierwiastkami nabrała szczególnego znaczenia po tragicznej katastrofie czernobylskiej.

W obrębie południowego Bałtyku rozwinął się przemysł skoncentrowany wokół transportu morskiego: stoczniowy i portowy, szczególnie w Zatoce Gdańskiej i Pomorskiej. Ta aktywność człowieka przynosi wzrost ładunku toksycznych biocydów wchodzących w skład farb przeciwporostowych, m.in. tributyllocyny (TBT), zanieczyszczających środowisko morskie. Antropopresję w obrębie Zatoki Gdańskiej potęguje ograniczona wymiana wód z otwartym Bałtykiem.

Efektom wywołanym działalnością człowieka, m.in. zanieczyszczeń chemicznych, jest fakt, że ssaki morskie są rzadko spotykane w południowym Bałtyku. Stosunkowo najliczniej występuje morświn (*Phocoena phocoena*), niewielki ssak należący do waleni (*Cetacea*), pojawiający się w strefie umiarkowanej i arktycznej przybrzeżnych wód półkuli północnej. Innym gatunkiem spotykanym u polskich wybrzeży Bałtyku jest największa bałtycka foka: foka szara (*Halichoerus grypus*), migrująca głównie z kolonii u wybrzeży Estonii. Ssaki morskie, ze względu na końcową pozycję w sieci troficznej, długi czas życia, a także długi biologiczny okres półtrwania toksyn, akumulują znaczne ilości związków chloroorganicznych, jak również metali ciężkich [1]. W badaniach de Swarta i in. [2] u fok pospolitych (*Phoca vitulina*) karmionych bałtyckimi śledziami zaobserwowano upośledzenie systemu odpornościowego.

Metale ciężkie należą do toksycznych zanieczyszczeń chemicznych wprowadzanych przez człowieka do ekosystemów. Czynniki antropogeniczne okazały się mieć znaczący wpływ na zaburzenie obiegu geochemicznego metali, zarówno na skalę regionalną, jak i globalną [3].

Pierwiastki chemiczne podlegają nierównomiernej dystrybucji w poszczególnych komponentach środowiska. Ich stężenia zmieniają się lokalnie, a także wraz z upływem czasu.

Zastosowanie bioindykatorów stanowi użyteczne narzędzie w monitoringu zanieczyszczenia środowiska. Wyłowione martwe egzemplarze ssaków morskich stanowią cenny materiał do oceny stanu zanieczyszczenia wód morskich [4]. Pozwalają one ocenić oddziaływanie skomplikowanej mieszaniny substancji toksycznych znajdujących się w rybach na poszczególne elementy ekosystemów, które, podobnie jak człowiek, stoją na szczycie piramidy troficznej. Uzyskane dane dostarczają informacji o degradacji środowiska nie tylko na skalę lokalną, ale również umożliwiają zintegrowaną i kompleksową ocenę zanieczyszczenia ekosystemu wodnego.

Bajkał stanowi modelowy, a zarazem unikatowy przykład ekosystemu zamkniętego, charakteryzującego się prostotą zależności troficznych. Z punktu widzenia transportu i transformacji metali ciężkich w środowisku może być porównywany do Wszechocanu, a nawet stanowić jego miniaturowy model [5]. Bajkał jest najgłębszym i najstarszym jeziorem na świecie, które zawiera około 20% niezamarzniętych ogólnoswiatowych zasobów wody słodkiej. Nazywany „perłą Syberii”, jest unikalnym ekosystemem zasiedlonym przez liczne endemiczne gatunki fauny i flory. Podwaliny badań naukowych przyrody Bajkału położyli w drugiej połowie XIX w. polscy uczeni – Benedykt Dybowski, Wiktor Godlewski, Jan Czerski i Aleksander Czekanowski. Stosunkowo proste zależności troficzne, które występują w Bajkale, ułatwiają obserwację losu biogeochemicznego, jakiemu podlegają pierwiastki w biotopie tego jeziora.

Końcowe ogniwo łańcucha pokarmowego Bajkału stanowi foka bajkalska (*Phoca sibirica*); jedyny gatunek foki, który zasiedla tylko i wyłącznie wody słodkie. Głównym składnikiem pożywienia foki bajkalskiej są ryby z rodziny *Comephoridae*, której przedstawiciele zamieszkują wyłącznie wody jeziora Bajkał. Działalność przemysłowa w bezpośrednim sąsiedztwie jeziora spowodowała, że epidemię wśród fok, wywołaną przez wirusa nosówki foczej w latach 1987-1988 [6], wiązano z czynnikami antropogenicznymi oddziałującymi na stan ekologiczny jeziora.

2 CEL I ZAKRES PRACY

Celem badań była ocena przydatności ssaków morskich jako pasywnych bioindykatorów procesu akumulacji zanieczyszczeń. Aby osiągnąć zamierzony cel postanowiono:

- ocenić rozmieszczenie licznej grupy metali, metaloidów oraz niemetalu w ssakach zamieszkujących wody Bałtyku i jeziora Bajkał,
- oszacować współzależności pomiędzy pierwiastkami oraz ich bioakumulację u foki bajkalskiej, mając na uwadze możliwość zachodzenia w ekosystemie Bajkału specyficznych procesów biogeochemicznych, odmiennych od tych obserwowanych dla wód morskich, którym podlegać mogą niektóre pierwiastki,
- zbadać stopień biomagnifikacji pierwiastków chemicznych wzdłuż kolejnych pięter piramidy troficznej Bajkału,
- opracować nową, współczesną metodykę ekstrakcji związków cynoorganicznych z materiału biologicznego,
- określić specjację związków organicznych cyny z zastosowaniem opracowanej metodyki oraz oszacować aktywność promieniotwórczą radionuklidów ^{137}Cs , ^{40}K , ^{210}Po w ssakach bałtyckich,
- oszacować zanieczyszczenie akwenu południowego Bałtyku toksyczną tributylową i sztucznym radioizotopem ^{137}Cs .

Metody statystyczne wykorzystywane były w największym zakresie w części pracy dotyczącej badań pierwiastków chemicznych u fok bajkalskich, stąd w niniejszym opracowaniu skupiono się głównie na tym fragmencie rozprawy.

3 MATERIAŁY I METODY

3.1 Materiały i metody

Analizy zawartości szerokiej gamy pierwiastków (Al, As, B, Ba, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Ga, Fe, K, Li, Mg, Mn, Mo, Na, Ni, P, Pb, Se, Si, Sr, Tl, V, Zn,) wykonano przy użyciu atomowego spektrometru emisyjnego plazmy sprzężonej indukcyjnie ICP-AES (Thermo Jarrell-Ash ICP-AES 9000, Babington nebulizer) oraz spektrometru masowego czasu przelotu jonów plazmy sprzężonej indukcyjnie TOF-ICP-MS (LECO TOF-ICP-MS, Meinhard), po uprzedniej mineralizacji w zamkniętych bombach teflonowych (MILESTONE MLS 1200 MEGA). Radionuklidy ^{137}Cs

i ^{40}K , a także ^{210}Po oznaczono w mięśniach, wątrobach i nerkach badanych ssaków morskich przy zastosowaniu, odpowiednio γ - (Canberra oraz PGT) i α -spektrometrii (ORTEC 576 A). Do analiz związków organicznych cyny wykorzystano aparat do przyspieszonej ekstrakcji rozpuszczalnikiem (ASE 200, DIONEX), chromatograf gazowy (GC 8000 series Carlo Erba) wyposażony w kolumnę wielokapilarną oraz detektor płomieniowo-fotometryczny [7, 8, 9].

Wykonanie ww. analiz możliwe było dzięki współpracy Katedry i Zakładu Bromatologii AMG z Katedrą Chemii Analitycznej Wydziału Chemicznego Politechniki Gdańskiej, Laboratorium Radiochemicznym Zakładu Chemii i Biochemii Morza Instytutu Oceanologii Polskiej Akademii Nauk w Sopocie oraz Katedrą Chemii Stosowanej Uniwersytetu Szent Istvan (Budapeszt, Węgry).

3.2 Próbkki

Próbki tkanek i organów ssaków morskich, które wykorzystano w badaniach, pobrano z egzemplarzy pochodzących z przyłowu lub wyrzucanych na brzeg w rejonie polskiego wybrzeża Bałtyku w okresie 1996-2003 r. Probki pobrano z 14 egzemplarzy morświna (*Phocoena phocoena*), dwóch delfinów pręgobokich (*Stenella ceruleoalba*), dwóch fok szarych (*Halichoerus grypus*) oraz jednej foki obrączkowanej (*Phoca hispida*) [10, 11]. Probki wątroby ($n = 27$) fok bajkalskich (*Phoca sibirica*) pobrane zostały pomiędzy 7 a 22 kwietnia 2001 r. ze znalezionych martwych osobników ($n = 11$), bądź uzyskano je od myśliwych podczas oficjalnego odstrzału ($n = 16$). Wiek analizowanych dorosłych osobników określono na podstawie analiz przyrostu słoii zębiny i kostniwa kłów. Probki ryb (*Comephorus dybowskii*, *Comephorus baicalensis*, *Cottocomephorus inermis*, *Cottocomephorus grewinki*), planktonu i zoobentosu (*Acanthogammarus godlewskii*) pozyskano przy użyciu odpowiednich sieci. W skład próbki planktonu wchodziły następujące gatunki: *Epishura baicalensis* (50%), *Cyclops kolensis* (20%), *Daphnia galeata* (20%) i *Bosmina longirostris* (10%) [7]. Wszystkie badane próbki przechowywano zamrożone, w temp. $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, aż do czasu rozpoczęcia analiz.

Próbki do badań uzyskano dzięki współpracy ze Stacją Morską Uniwersytetu Gdańskiego

w Helu oraz Instytutem Geochemii Rosyjskiej Akademii Nauk w Irkucku.

3.3 Analizy statystyczne

Zastosowano techniki analizy korelacji liniowej (r Pearsona) oraz analizę czynnikową. Różnice między średnimi badano za pomocą nieparametrycznego testu U Manna-Whitney'a. W przypadku próbek fok bajkalskich wykorzystano układ dwuczynnikowej analizy wariancji po transformacji logarytmicznej wyników w celu normalizacji rozkładów poszczególnych zmiennych niezależnych. Jako predyktory jakościowe zastosowano czynnik „płeć” (samce i samice) oraz „wiek”, który działał na trzech poziomach odpowiadających następującym grupom wiekowym fok: 1-2 miesiące, 5-8 lat i 9-15 lat. W dalszych badaniach, w celu oceny istotności czynnika region (akwen południowy, środkowy i północny Bajkału), zastosowano predyktor jakościowy związany z etapem rozwojowym i płcią fok, a działający na trzech poziomach – szczenięta, dorosłe samce i dorosłe samice.

W uzyskanym zbiorze danych, ze względu na istniejące liczne współzależności pomiędzy pierwiastkami, należy liczyć się z istnieniem zjawiska redundancji (powielania) informacji. Dla umożliwienia poprawnej interpretacji uzyskanego zbioru danych zastosowano wielowymiarową analizę statystyczną – FA (analizę czynnikową). Dzięki zastosowaniu tej techniki uzyskano redukcję liczby zmiennych do trzech nowych, niezależnych – ortogonalnych (nieskorelowanych ze sobą) zmiennych, zwanych czynnikami. Do statystycznego opracowania wyników badań wykorzystano program *STATISTICA*.

4 WYNIKI I DYSKUSJA

4.1 Związki cynoorganiczne – analityka i ekotoksykologia

Optymalizacja nowej procedury oznaczania związków cynoorganicznych (OTC) w materiale biologicznym została szczegółowo omówiona w literaturze [9]. Opracowaną metodykę zastosowano do analiz OTC w próbkach wątroby ssaków morskich południowego Bałtyku. Analizie poddano zróżnicowanie międzygatunkowe, a także wpływ płci i wieku ssaków bałtyckich na

zawartość OTC, stosunek stężeń TBT i jej metabolitów, dibutylocyny (DBT) oraz monobutylocyny (MBT) w badanych próbkach, jak również oszacowano stopień zanieczyszczenia Morza Bałtyckiego tymi związkami [10].

4.2 Mikro i makropierwiastki

Szczegółowe dane dotyczące stężeń pierwiastków śladowych i makroelementów w analizowanych próbkach podano w literaturze [7, 11].

4.2.1 Jezioro Bajkał

Na zawartość pierwiastków u ssaków wpływ może mieć wiele czynników fizjologicznych, wewnętrznych i zewnętrznych, środowiskowych. Należą do nich: wiek i rozwój osobniczy, płeć, rozmiar i masa, sposób odżywiania, uwarunkowania genetyczne, rodzaj tkanki/organu, szybkość metabolizmu oraz zróżnicowanie geograficzne.

Czynniki wewnętrzne

Statystycznie istotną dodatnią korelację pomiędzy wiekiem fok a stężeniem pierwiastków w wątrobie, zaobserwowano dla Cd ($p < 0,01$) oraz Al, Ca, Si i Sr ($p < 0,05$), a zależność ujemną dla Mo ($p < 0,01$), a także K, Mn i Zn ($p < 0,05$). Na podstawie dwuczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) z uwzględnieniem zmiennej wiek i płeć stwierdzono silną, statystycznie istotną zależność stężeń Cd, Cu, Mo i P od płci bada-

nych egzemplarzy ($p < 0,01$), a słabszą dla K, Mg, Na i Zn ($p < 0,05$) (tabela 1). Wyniki wskazują również na silny wpływ zmiennej wiek na stężenia Al, Cd, Mn, Mo, Si i Zn. Natomiast wzajemne interakcje obu badanych zmiennych okazały się być statystycznie istotne dla Cd i Cu. Dodatkowo, jak wynika z rys. 1, zarysowuje się tendencja do zwiększonej akumulacji pierwiastków u fok w grupie wiekowej pomiędzy 6-10 rokiem życia. Należy podkreślić, że analiza wariancji nie wykazała istotnych różnic dla stężeń badanych pierwiastków pomiędzy grupą fok, które znaleziono martwe, a grupą pochodzącą z odstrzału. Jak wynika z rys. 1, zaobserwowane współzależności między zawartością pierwiastków a wiekiem fok mają charakter pozorny, gdyż wynikają z różnic pomiędzy poziomami pierwiastków u osobników młodocianych (szczenięta) a ich zawartością u dojrzałych samic i samców. To spostrzeżenie potwierdza analiza wariancji ANOVA, która, po odrzuceniu przypadków (obiektów) identyfikowanych jako szczenięta, wykazała brak jakiegokolwiek istotności statystycznej czynnika wiek ($p > 0,05$). Stąd zmienną wiek w rzeczywistości możemy zinterpretować jako czynnik związany ze stadium rozwojowym fok. Dane literaturowe, które dotyczą ssaków morskich z różnych regionów geograficznych, wskazują na ogół na brak lub zmienne zróżnicowanie w tkankowych poziomach stężeń metali u obu płci [12, 13].

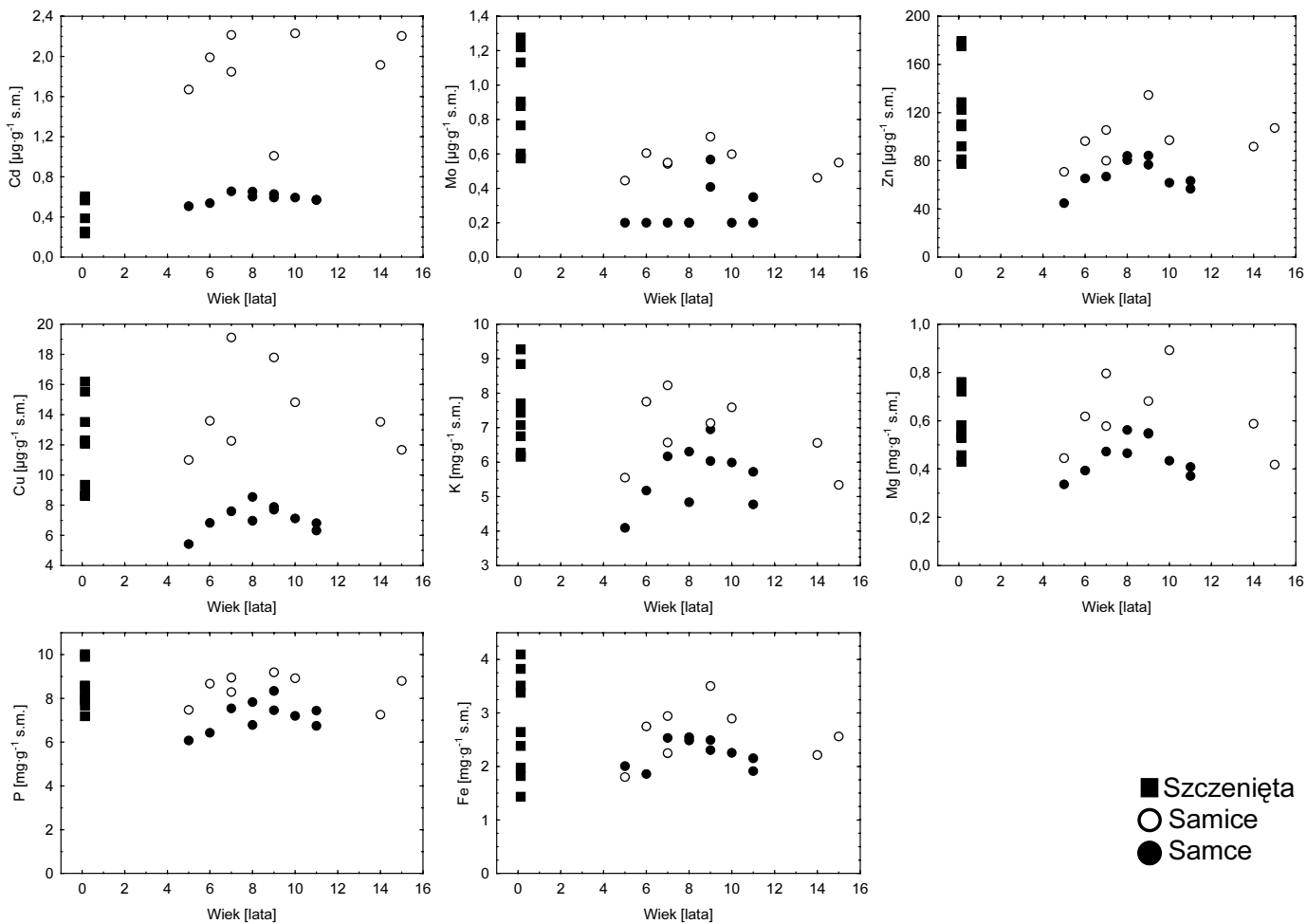
Tabela 1. Wpływ wieku i płci na zawartość pierwiastków u fok bajkalskich w świetle dwuczynnikowej analizy wariancji (ANOVA). Wyniki analizy podano jako wartości statystyki F.

Efekt	df	Al	Cd	Cu	K	Mg	Mn	Mo	Na	P	Si	Zn
Wiek	2	5,52 ^b	31,7 ^e	-	-	-	5,72 ^b	24,5 ^d	-	-	7,35 ^b	6,68 ^b
Płeć	1	-	39,4 ^d	37,2 ^d	5,52 ^a	6,05 ^a	-	18,2 ^c	4,53 ^a	8,27 ^b	-	7,03 ^a
Interakcje	2	-	10,3 ^c	7,12 ^b	-	-	-	-	-	-	-	-

^a $p < 0,05$; ^b $p < 0,01$; ^c $p < 0,001$; ^d $p < 0,00001$; ^e $p < 0,000001$.

Rezultaty uzyskane w niniejszej pracy wskazują na wyższe poziomy pierwiastka toksycznego – Cd, jak i niektórych pierwiastków nieodzownych fizjologicznie u samic fok bajkalskiej. Zaobserwowane różnice w zawartości pierwiastków należy interpretować w kontekście cyklu rozrodczego tego gatunku. Z rys. 1 wy-

ka, że w odróżnieniu od samic, u badanych szczeniąt fok bajkalskich zaobserwować można niskie stężenia Cd. Widoczne są także znaczące różnice w akumulacji tego toksycznego pierwiastka pomiędzy dorosłymi samcami i samicami fok.



Rys. 1. Zróźnicowanie w stężeniach pierwiastków w wątrobie fok bajkalskich w zależności od płci oraz wieku.

Jak można zauważyć, stężenia pierwiastków fizjologicznie nieodzownych, takich jak Cu, Zn, Fe, Mo, Mg, K oraz P, są wyższe zarówno w wątrobach 1-2 miesięcznych szczeniąt, jak i samic. Z danych literaturowych wynika, że podwyższone stężenia Cu czy Zn są charakterystyczne dla potomstwa ssaków zarówno morskich [1, 14], jak i lądowych [15]. Jak wiadomo, tkanki, które podlegają szybkiemu rozwojowi, charakteryzują się wysokimi poziomami Cu i Zn. Przyczynę tego zjawiska w przypadku szczeniąt można upatrywać bądź w wysokim zapotrzebowaniu na ww. pierwiastki, jako niezbędne w różnorodnych procesach biochemicznych, albo też w ograniczonej zdolności noworodków i szczeniąt do ich wydalania [1]. Rozwijający się organizm ssaka otrzymuje niezbędne składniki odżywcze, w tym makro- i mikroelementy, najpierw poprzez barierę łożyskową, a później wraz z mlekiem matki. Samice w okre-

sie ciąży i karmienia wymagają wysokiej podaży takich pierwiastków, jak np. Zn, Cu czy Fe. Mikroelementy te są następnie transportowane przez barierę łożyskową, przy czym łożysko matki odpowiedzialne jest za regulację zapotrzebowania płodu w prawidłowe ich ilości [16]. Na zawartość Zn i Cu w organizmie samic mają wpływ dwa procesy: akumulacja, a następnie przekazanie wybiórcze do płodu. Możliwe jest również nagromadzenie u samic toksycznych pierwiastków o podobnej strukturze elektronowej, takich jak Cd, które dzięki mechanizmom ochronnym u tych zwierząt nie są przekazywane do płodu. Być może z tym zjawiskiem związany jest brak statystycznie istotnych korelacji między Zn-Cd-Cu w wątrobie samic, w przeciwieństwie do szczeniąt i samców, dla których zaobserwowano jednak taką współzależność (tabela 2).

Tabela 2. Współzależności statystyczne między Cd, Cu i Zn w wątrobie samców, samic i szceniąt fok bajkalskich. Wyniki analizy podano jako współczynniki korelacji Pearsona.

		Cd	Cu	Zn
Wszystkie	Cd	-	0,52 ^b	0,03
	Cu	0,52 ^b	-	0,78 ^c
	Zn	0,03	0,78 ^c	-
Samce	Cd	-	0,88 ^c	0,74 ^a
	Cu	0,88 ^c	-	0,84 ^b
	Zn	0,74 ^a	0,84 ^b	-
Samice	Cd	-	-0,18	-0,38
	Cu	-0,18	-	0,70
	Zn	-0,38	0,70	-
Szczenięcia	Cd	-	0,83 ^b	0,74 ^a
	Cu	0,83 ^b	-	0,96 ^c
	Zn	0,74 ^a	0,96 ^c	-

^ap<0,05; ^bp<0,01; ^cp<0,001

Ważną rolę w regulacji stężeń Cd, Zn i Cu pełni niskocząsteczkowe białko, metalotioneina. Białka te wykazują silne, kompetencyjne powinowactwo do Cu i Zn, stanowiąc rezerwuar dla tych pierwiastków [1]. Równocześnie wiązanie Cd powoduje zmniejszenie toksycznych właściwości tego pierwiastka, co ma niebagatelne znaczenie zwłaszcza w przypadku ssaków morskich narażonych na podwyższone ilości Cd. Zapobiega to także przenikaniu Cd przez łożysko, gdyż jest on wiązany przez metaloproteiny łożyska, osiągając w nim wysokie stężenie [17]. Stąd wynikać mogą wysokie stężenia Cd wyłącznie u samic fok bajkalskich oraz znacznie niższe poziomy tego pierwiastka u szceniąt. Pomimo tego, że bariera łożyskowa chroni płód przed toksycznym działaniem Cd, przenika on przez nabłonek gruczołów sutkowych do mleka samic ssaków morskich [18] i, jak można założyć, także do mleka fok bajkalskich. Stosunkowo wysoka zawartość Cd w wątrobie 1-2 miesięcznych szceniąt fok bajkalskich, zbliżona do zaobserwowanej u dorosłych samców tegoż gatunku, wydaje się potwierdzać tę hipotezę. Podwyższone poziomy toksycznego Cd w wątrobach samic oraz jego brak u szceniąt mogą zatem świadczyć o ochronnym mechanizmie ograniczającym bioakumulację Cd w najmłodszej grupie wiekowej.

Podwyższone, w porównaniu do samców, stężenia Hg i Cd zaobserwowano dla zbadanych w 1992 r. samic fok bajkalskich [19], co tu-

maczono zwiększonym stopniem pobierania ww. pierwiastków w stosunku do ich wydalania, co jest spowodowane intensywniejszym żerowaniem samic niż samców. Samice foki bajkalskiej, w przeciwieństwie do większości innych fok, żerują podczas karmienia potomstwa (w okresie wiosennym [20]), jednak w porównaniu do sezonu zimowego nie obserwuje się w tym czasie znaczących zmian w odżywianiu [5, 21, 22].

U szceniąt fok bajkalskich zaobserwowano duże zróżnicowanie w zawartości niektórych pierwiastków. Podobnie jak u ssaków lądowych, u szceniąt różnych gatunków fok obserwuje się szybki spadek zawartości Cu po urodzeniu. Zjawisko to odnotowano także w wątrobie fok grenlandzkich [23]. Stąd różnice w wieku badanych szceniąt (1-2 miesiące) fok bajkalskich mogą być przyczyną odnotowanych wyższych względnych rozrzutów stężeń dla prawie wszystkich analizowanych pierwiastków (z wyjątkiem Mg i Mo).

Czynniki zewnętrzne

1 Miejsce zbioru – region

W celu zbadania zróżnicowania w zawartości pierwiastków pomiędzy fokami pochodzącymi z trzech odrębnych morfologicznie akwenów Bajkału, tj. południowego, środkowego i północnego, zastosowano dwuczynnikową analizę wariancji – ANOVA. Ze względu na istotny wpływ płci, a także różnice w zawartości pierwiastków pomiędzy szczeniętami a osobnikami starszymi, w analizie zastosowano czynnik działający na trzech poziomach odpowiadających samcom, samicom i szczeniętom, a mianowicie zmienną biologiczną obejmującą płć i rozwój osobniczy. Analiza wariancji nie wykazała istotności efektu głównego związanego ze zmienną „region”, natomiast zaobserwowano współdziałanie zmiennej „region” i zmiennej biologicznej dla pierwiastków takich jak Cu, Fe, K i Mo (tabela 3). Na podstawie analizy w poszczególnych grupach można stwierdzić, że za interakcje te odpowiedzialny jest spadek zawartości ww. pierwiastków u szceniąt z południowego akwenu, w porównaniu ze środkowym, przy jednoczesnym wzroście stężeń u samic.

Tabela 3. Wpływ płci i miejsca poboru próbek na zróżnicowanie zawartości pierwiastków u fok bajkalskich w świetle dwuczynnikowej analizy wariancji (ANOVA). Wyniki analizy podano jako wartości statystyki F.

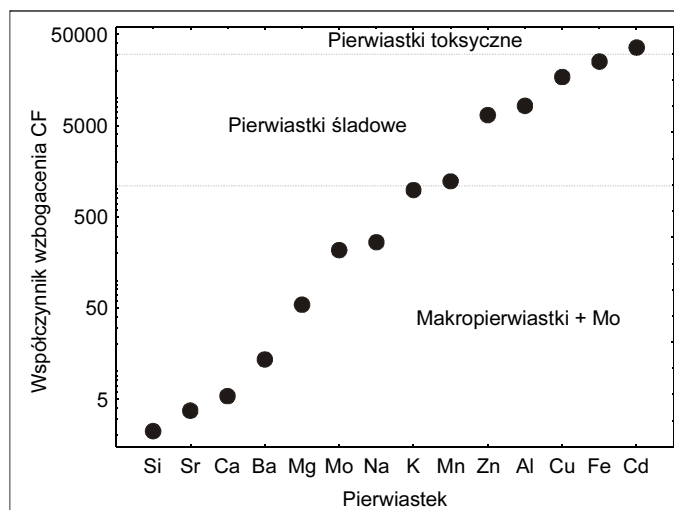
Efekt	df	Al	Ba	Cd	Cu	Fe	K	Mg	Mn	Mo	Na	P	Si	Zn
Region	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,30
Płeć	2	4,79 ^a	4,63 ^a	46,3 ^d	43,7 ^d	-	10,9 ^c	4,91 ^a	9,23 ^b	43,3 ^d	4,07 ^a	8,76 ^b	4,00 ^a	12,0 ^c
Interakcje	4	-	-	-	4,46 ^b	4,00 ^a	2,98 ^a	-	3,68 ^a	4,18 ^a	-	-	-	2,53

^ap<0,05; ^bp<0,01; ^cp<0,001; ^dp<0,000001.

2 Bioakumulacja – współczynnik koncentracji i biomagnifikacji

Bioakumulacją nazywamy proces pobierania i odkładania biodostępnych form chemicznych pierwiastków w danym organizmie, dostarczanych z pojedynczego bądź też wszystkich dostępnych źródeł (woda, pożywienie, powietrze). Abyśmy mogli mówić o zachodzącym zjawisku bioakumulacji, tempo przyswajania pierwiastków musi przewyższać tempo ich eliminacji z organizmu [24]. Na podstawie wartości CF uzyskanych dla wątroby foki bajkalskiej wykazano (rys. 2), że pierwiastki dzielą się na 3 grupy; tj. pierwiastki o charakterze elektrolitów z najmniejszymi wartościami CF (<10³), pierwiastki niezbędne fizjologicznie (10³-3,5•10⁴) oraz toksyczne, jak Cd o najwyższych wartościach CF (>3,5•10⁴). Na podstawie tych wartości można mówić o bioakumulacji Cd w wątrobie fok bajkalskich. Należy podkreślić, że stężenia pierwiastków fizjologicznie niezbędnych podlegają regulacji w wyniku homeostazy i utrzymują się w organizmie w wąskim przedziale stężeń pomimo dużych wahań ich poziomów w otaczającym środowisku [25].

Bioakumulacja pierwiastków z pożywienia prowadzi do ich przemieszczania z niższych do wyższych poziomów piramidy troficznej. Kiedy pierwiastki transportowane wzdłuż kolejnych ogniw łańcucha pokarmowego osiągają wyższe stężenia na wyższych poziomach troficznych, zachodzi zjawisko nazywane biomagnifikacją. Obliczone współczynniki biomagnifikacji BMF zamieszczono w tabeli 4. Wyniki wskazują na mniejszy stopień biomagnifikacji Fe, Zn, Cu i Cd na niższej relacji troficznej (plankton-ryby, BMF<0.5), w przeciwieństwie do najwyższej relacji troficznej: ryby-foki, dla której wartości BMF wynosiły 5,39 dla Fe i 2,50 dla Zn. Oznacza to, że ww. pierwiastki ulegają biomagnifikacji w fokach, w stosunku do ich zawartości w pokarmie fok stanowiącym niższy poziom troficzny.



Rys. 2. Współczynniki wzbogacenia – CF (w przeliczeniu na moką masę) obliczone dla pierwiastków w wątrobie foki bajkalskiej.

Analiza regresji i analiza czynnikowa

W tabeli 5. zestawiono statystycznie istotne współzależności pomiędzy stężeniami pierwiastków w wątrobach fok bajkalskich. Część z zaobserwowanych korelacji można interpretować jako wypadkowy efekt ich interakcji z wieloma czynnikami, zarówno biotycznym, jak i abiotycznymi [25]. Niektóre interakcje wynikają np. z powinowactwa Cu, Zn i Cd do metalotioneiny.

Tabela 4. Współczynniki biomagnifikacji dla całkowitej zawartości metali śladowych w organizmach obliczone dla dwóch poziomów troficznych ekosystemu jeziora Bajkał.

Pierwiastek	Poziom troficzny	
	plankton-ryby	ryby-foki
Mn	0,49	0,16
Fe	0,12	5,39
Zn	0,43	2,50
Cu	0,09	1,35
Cd	0,11	0,42

Do interpretacji wyników badań wykorzystano analizę czynnikową. Trzy pierwsze czynniki opisują 82.9% całkowitej zmienności zawartej w pierwotnym zestawie danych. Wartości

własne tych czynników wynoszą odpowiednio 6.88 (F1), 4.62 (F2) i 1.76 (F3).

Tabela 5. Statystycznie istotne współzależności między pierwiastkami oraz wiekiem (W) w wątrobie fok bajkałskich.

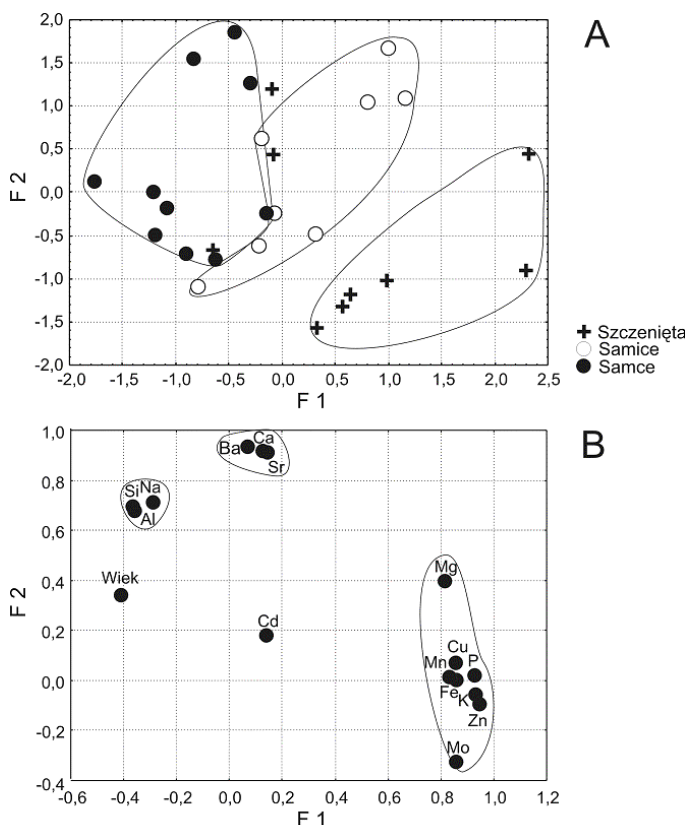
Al	(+)W ^b , (+)Ba ^a , (+)Ca ^b , (-)Mo ^a , (+)Na ^b , (+)Si ^a , (+)Sr ^b
Ba	(+)Al ^a , (+)Ca ^a , (+)Mg ^b , (+)Na ^a , (+)Si ^a , (+)Sr ^a
Ca	(+)W ^b , (+)Al ^b , (+)Ba ^a , (+)Mg ^b , (+)Na ^a , (+)Si ^a , (+)Sr ^a
Cd	(+)W ^a , (+)Cu ^a , (+)Mg ^b , (+)Sr ^b
Cu	(+)Cd ^a , (+)Fe ^a , (+)K ^a , (+)Mg ^a , (+)Mn ^a , (+)Mo ^a , (+)P ^a , (+)Zn ^a
Fe	(+)Cu ^a , (+)K ^a , (+)Mg ^a , (+)Mn ^a , (+)Mo ^a , (+)P ^a , (+)Zn ^a
K	(-)W ^b , (+)Cu ^a , (+)Fe ^a , (+)Mg ^a , (+)Mn ^a , (+)Mo ^a , (+)P ^a , (-)Si ^b , (+)Zn ^a
Mg	(+)Ba ^b , (+)Ca ^b , (+)Cd ^b , (+)Cu ^a , (+)Fe ^a , (+)K ^a , (+)Mn ^a , (+)Mo ^a , (+)P ^a , (+)Sr ^a , (+)Zn ^a
Mn	(-)W ^b , (+)Cu ^a , (+)Fe ^a , (+)K ^a , (+)Mg ^a , (+)Mo ^a , (+)P ^a , (+)Zn ^a
Mo	(-)W ^a , (-)Al ^a , (+)Cu ^a , (+)Fe ^a , (+)K ^a , (+)Mg ^a , (+)Mn ^a , (-)Na ^b , (+)P ^a , (-)Si ^a , (+)Zn ^a
Na	(+)Al ^b , (+)Ba ^a , (+)Ca ^b , (-)Mo ^b , (+)Si ^b , (+)Sr ^b
P	(+)Cu ^a , (+)Fe ^a , (+)K ^a , (+)Mg ^a , (+)Mn ^a , (+)Mo ^a , (+)Zn ^a
Si	(+)W ^b , (+)Al ^a , (+)Ba ^a , (+)Ca ^a , (-)K ^b , (-)Mo ^a , (+)Na ^b , (+)Sr ^a , (-)Zn ^b
Sr	(+)W ^b , (+)Al ^b , (+)Ba ^a , (+)Ca ^a , (+)Cd ^b , (+)Mg ^a , (+)Na ^b , (+)Si ^a
Zn	(-)W ^b , (+)Cu ^a , (+)Fe ^a , (+)K ^a , (+)Mg ^a , (+)Mn ^a , (+)Mo ^a , (+)P ^a , (-)Si ^b

^ap<0,01; ^bp<0,05; (+) = korelacje dodatnie; (-) = korelacje ujemne

W celu wyjaśnienia przyczyn zróżnicowania w zawartości pierwiastków w wątrobach fok, dla próbek (obiektów), którym odpowiadają poszczególne badane egzemplarze, sporządzono wykresy w układzie współrzędnych czynnikowych przypadków F1-F2 i F1-F3 (rys. 3A i 4A). Jak widać na rys. 3A, wątroby fok starszych – dojrzałych samców i samic charakteryzują się niższymi wartościami czynnika F1, w przeciwieństwie do szczeniąt, opisanych wyższymi wartościami F1. W grupie fok dojrzałych można zaobserwować wyraźne zróżnicowanie pomiędzy samcami o najniższych wartościach F1 i samicami, które tworzą odrębny zbiór punktów o pośrednich wartościach F1. Pozwala to zinterpretować czynnik F1 jako czynnik biotyczny, związany ze stadium rozwojowym fok bajkałskich, a także z cechami płciowymi badanych egzemplarzy.

Aby stwierdzić, który pierwiastek jest odpowiedzialny za grupowanie się obiektów (foki), sporządzono odpowiadające im wykresy w układzie współrzędnych prostokątnych F1-F2 i F1-F3 (wykresy ładunków czynnikowych) (rys. 3B i 4B). Z rozmieszczenia punktów odpowia-

dających poszczególnym pierwiastkom wynika, że najniższe wartości ładunków dla Cd, Ba, Sr, Ca, Al, Si i Na osiąga czynnik F1 (rys. 3B).



Rys. 3. Wykres w układzie współrzędnych czynnikowych F1-F2 przypadków, którym odpowiadają poszczególne próbki wątroby fok bajkałskich (A) i odpowiadających im ładunków czynnikowych (B) dla poszczególnych pierwiastków.

Punkty te sąsiadują z wiekiem, a więc zmienną odpowiadającą dojrzałym osobnikom, oddzielającą się zdecydowanie od grupy związanej z takimi pierwiastkami jak Mg, Mn, Cu, P, Fe, K, Zn i Mo (rys. 3B). Ta ostatnia grupa pierwiastków jest przypisana punktom odpowiadającym szczeniętom (rys. 3A), tj. o wyższych wartościach F1. Można domniemywać, że znacząca pula ww. nieodzownych fizjologicznie pierwiastków została przekazana z ciała samic do noworodków.

Czynnik F2 grupuje obiekty prawdopodobnie ze względu na zróżnicowany charakter bioakumulacji analizowanych pierwiastków w wątrobie fok bajkałskich, związany raczej z czynnikami abiotycznymi. Odmienne własności biogeochemiczne pierwiastków są przyczyną utworzenia klastra związanego z glinokrzemianami (Si, Na, Al, Mg) i węglanami (Ca, Ba, Sr), opisanego wyższymi wartościami czynnika F2. W przeciwieństwie do nich, pierwiastki śladowe takie

jak: Cu, Fe, Mn, Zn, Mo i P (pierwiastki niezbędne fizjologicznie), łącznie z toksycznym Cd, wyróżniają się niższymi wartościami ładunków F2. Czynniki F3 (rys. 4A) jest odpowiedzialny za wyodrębnienie grupy samic, co może być związane z procesami fizjologicznymi związanymi głównie z rozrodem fok. Wysokie wartości F3 cechują Cd (rys. 4B), który, w przeciwieństwie do pierwiastków biofilnych (pierwiastki niezbędne fizjologicznie), nie jest przekazywany płodowi fok (prawdopodobnie związany przez metalotioneinę) i wykazuje wyraźną tendencję do wybiórczej akumulacji u samic fok bajkalskich.

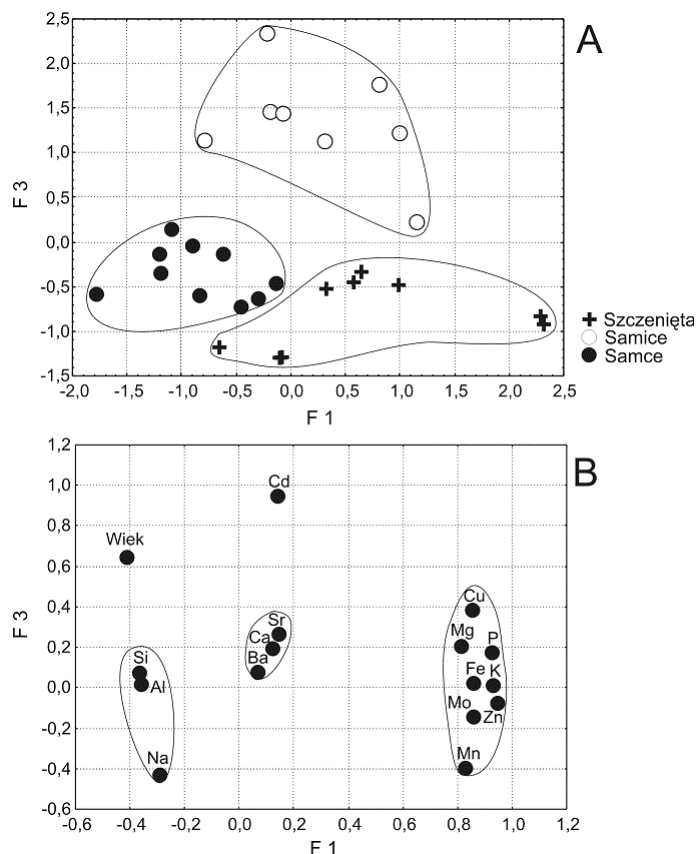
Podsumowując, analiza czynnikowa uzyskanych danych pozwala na wyróżnienie istotnych czynników, które są odpowiedzialne za akumulację pierwiastków w wątrobach fok bajkalskich. Związane są one z czynnikami zarówno abiotycznymi, tj. odmiennym losem hydrogeochemicznym pierwiastków w środowisku oraz ich zróżnicowaną skłonnością do akumulacji, jak i biotycznymi (płeć i stadium rozwojowe).

4.2.2 Morze Bałtyckie

W oparciu o dane uzyskane na podstawie analiz próbek wątroby ssaków bałtyckich zaobserwowano wyraźne zróżnicowanie międzygatunkowe stężeń pierwiastków wśród analizowanych egzemplarzy. Przyczynę wyższych, w porównaniu do ssaków bałtyckich, stężeń Cd u delfinów pręgobokich należy upatrywać w odmiennym diecie tych ssaków żerujących w morzach pełnosłonych. Na podstawie analizy porównawczej zawartości metali, analizowanych w niniejszej pracy, z danymi dla morświnów z wód grenlandzkich i duńskich, wykazano znacznie wyższe poziomy Cd u morświnów grenlandzkich [11].

4.3 Radionuklidy

Analizie poddano zawartość wybranych radionuklidów w wątrobie, nerkach i mięśniach ssaków morskich z akwenu południowego Bałtyku [8]. Najwyższą aktywność izotopu ^{40}K i ^{210}Po oznaczono w nerkach, a radiocezu – w mięśniach badanych ssaków. Na podstawie równania regresji, wiążącego aktywność ^{137}Cs w wodzie morskiej ze stężeniem w tkance mięśniowej, oszacowano aktywność ^{137}Cs w wodzie bałtyckiej z wykorzystaniem ssaków morskich jako organizmów biomonitorowych.



Rys. 4. Wykres w układzie współrzędnych czynnikowych F1-F3 przypadków, którym odpowiadają poszczególne próbki wątroby fok bajkalskich (A) i odpowiadających im ładunków czynnikowych (B) dla poszczególnych pierwiastków.

Wyniki porównano z danymi literaturowymi. Rezultaty potwierdzają przydatność tych zwierząt jako organizmów biomonitorowych. Porównano także aktywność badanych radioizotopów w morświnach z Bałtyku z danymi literaturowymi dotyczącymi sąsiednich mórz. W przeciwieństwie do naturalnie występującego izotopu ^{40}K , morświny z polskiego wybrzeża Bałtyku i Morza Irlandzkiego charakteryzują się podwyższonym poziomem izotopu ^{137}Cs . W zestawieniu ze światowymi danymi literaturowymi uzyskane rezultaty wskazują na to, że Morze Bałtyckie charakteryzuje najwyższy poziom zanieczyszczenia radiocezem. Śsaki morskie narażone są na promieniowanie wewnętrzne i zewnętrzne pochodzące z rozpadu promieniotwórczego badanych radionuklidów. Na podstawie odpowiednich równań obliczono moc dawek promieniowania pochłoniętego przez badane śsaki. Oszacowano, że naturalnie występujący ^{210}Po jest głównym źródłem dawki radiacyjnej [8].

5 WNIOSKI

- ◆ Rezultaty analiz składu pierwiastkowego próbek fok bajkalskich oraz wyniki kompleksowych analiz statystycznych (CF, BMF, ANOVA, FA) wskazują, że bioakumulacja pierwiastków chemicznych w analizowanych fokach jest w zasadzie związana z procesami naturalnymi zachodzącymi w ekosystemie jeziora Bajkał. Akwen ten można zaliczyć do regionów niezanieczyszczonych pod kątem analizowanych w niniejszej pracy pierwiastków śladowych.
- ◆ Analiza czynnikowa uzyskanych danych pomiarowych pozwala na wyróżnienie istotnych czynników odpowiedzialnych za biokumulację pierwiastków w wątrobach fok bajkalskich. Związane są one z czynnikami zarówno abiotycznymi (odmienny los hydrogeochemiczny pierwiastków w danym środowisku oraz ich zróżnicowana skłonność do bioakumulacji), jak i biotycznymi (płeć i stadium rozwojowe).
- ◆ Opracowano nową procedurę ekstrakcji związków organicznych cyny z materiału biologicznego, z użyciem przyspieszonej ekstrakcji rozpuszczalnikiem (ASE).
- ◆ Na podstawie wyników badań własnych oraz danych literaturowych stwierdzono, że przybrzeżne wody Polskiej Strefy Ekonomicznej Bałtyku charakteryzują się wysokim stopniem zanieczyszczenia tributyllocyną, porównywalnym z najbardziej uprzemysłowionymi obszarami świata – Japonią czy Hongkongiem.
- ◆ Zaobserwowano zróżnicowanie międzygatunkowe w zawartości analizowanych pierwiastków wśród przedstawicieli waleni i płetwonogich z wód bałtyckich.
- ◆ Zróżnicowanie w zawartości Cd w wątrobach badanych ssaków można przypisać odmiennej zawartości tego pierwiastka w ich pożywieniu.
- ◆ Stwierdzono przydatność ssaków morskich jako organizmów biomonitorowych zanieczyszczenia ^{137}Cs wód południowego Bałtyku.
- ◆ Uzyskane wyniki wskazują na to, że Morze Bałtyckie charakteryzuje się najwyższym na świecie poziomem zanieczyszczenia ^{137}Cs .
- ◆ Na podstawie obliczonych dawek promieniowania stwierdzono, że radioaktywny ^{137}Cs

nie stanowi prawdopodobnie zagrożenia dla ssaków morskich z wód polskich.

- ◆ Stwierdzono bardzo silne nagromadzenie ^{210}Po u badanych ssaków morskich, który jest odpowiedzialny za wysokie wartości dawek pochodzących z rozpadu promieniotwórczego α , na które narażone są ssaki morskie.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Das, K., Debacker, V., Pillet, S., Bouquegneau, J.-M. (2003). Heavy metals in marine mammals. W: Vos, J. G., Bossart, G. D., Fournier, M., O'Shea, (red.), Toxicology of Marine Mammals. Taylor & Francis, London and New York, 135-167.
- 2) de Swart, R.L., Ross, P.S., Vos, J.G., Osterhaus, A.D.M.E. (1996). Impaired immunity harbour seals (*Phoca vitulina*) exposed to bioaccumulated environmental contaminants: review of long-term feeding study. Environmental Health Perspectives, 104, 823-828.
- 3) Nriagu, J.O., Pacyna, J.M. (1988). Quantitative assessment of world contamination of air, water and soils by trace metals. Nature, 333, 134-139.
- 4) Ross, P.S. (2000). Marine mammals as sentinels in ecological risk assessment. Human and Ecological Risk Assessment, 6, 29-46.
- 5) Gurova, L.A., Pastuchov, V.D. (1974). Pitanie i piščevyje vzaimootnošenija pelagičeskich ryb i nerpy Bajkala. Nauka, Sibirskoje Otdelenie. Novosibirsk.
- 6) Grachev, M.A., Kumarev, V.P., Mamaev, L.V., Zorin, V.L., Baranova, L.V., Denikina, N.N., Belikov, S.I., Petrov, E.A., Kolesnik, V.S., Kolesnik, R.S., Dorofeev, V.M., Beim, A.M., Kudelin, V.N., Nagieva, F.G., Sidorov, V.N. (1989). Distemper virus in Baikal seals. Nature, 338, 209.
- 7) Ciesielski, T., Pastukhov, M.V., Fodor, P., Bertenyi, Zs., Namieśnik, J., Szefer, P. (2005). Relationships and bioaccumulation of chemical elements in the Baikal seal (*Phoca sibirica*). Environmental Pollution, available online at www.sciencedirect.com
- 8) Ciesielski, T., Góral, M., Bojanowski, R., Szefer, P. Levels of ^{137}Cs , ^{40}K and ^{210}Po in marine mammals from the southern part of the Baltic Sea. W przygotowaniu.
- 9) Wasik, A., Ciesielski, T. (2004). Determination of organotin compounds in biological samples using accelerated solvent extraction, sodium tetraethylborate ethylation, and multicapillary gas chromatography-flame photometric detection. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 378, 1357-1363.
- 10) Ciesielski, T., Wasik, A., Kuklik, I., Skóra, K., Namieśnik, J., Szefer, P. (2004). Organotin compounds in the liver tissue of marine mammals from the Polish coast of the Baltic Sea. Environmental Science and Technology, 38, 1415-1420.
- 11) Ciesielski, T., Waszczuk-Jankowska, M., Fodor, P., Bertenyi, Zs., Kuklik, I., Skóra, K., Namieśnik, J., Szefer, P. Interspecific distribution and co-associations of chemical elements in the liver tissue of marine mammals from the Polish Economical Exclusive Zone, Baltic Sea. Environment International, 2006, 32, 524-532.
- 12) O'Shea, T.J. (1999). Environmental contaminants in marine mammals. W: Reynolds III J.E., Rommel S.A., (red.),

- Biology of Marine Mammals. Smithsonian Institution Press, Washington, 485-563.
- 13) Ikemoto T., Kunito T., Watanabe I., Yasunaga G., Baba N., Miyazaki N., Petrov E.A., Tanabe S. (2004). Comparison of trace element accumulation in Baikal seals (*Pusa sibirica*), Caspian seals (*Pusa caspica*) and northern fur seals (*Callorhinus ursinus*). *Environmental Pollution*, 127, 83-97.
 - 14) Watanabe I., Ichihashi H., Tanabe S., Amano M., Miyazaki N., Petrov E.A., Tatsukawa R. (1996). Trace element accumulation in Baikal seal (*Phoca sibirica*) from the lake Baikal. *Environmental Pollution*, 94, 169-179.
 - 15) Chmielnicka, J., Sowa, B. (2000). Variations in metallo-thionein, zinc, copper, and iron concentrations and ceruloplasmin activity in pregnant rat dams and their fetuses. *Ecotoxicology and Environment Safety*, 46, 130-136.
 - 16) Gambling, L., Danzeisen, R., Fosset, C., Andersen, H.S., Dunford, S., Kaila, S., Srai, S., McArdle, H.J. (2003). Iron and copper interactions in development and the effect on pregnancy outcome. *The Journal of Nutrition*, 133, 1554-1556.
 - 17) Eisenmann, C.J., Miller, R.K. (1996). Placental transport, metabolism, and toxicity of metals. W: Chang, L.W., (red.), *Toxicology of Metals*, CRC Press, Boca Raton, 1003-1026.
 - 18) Frodello, J.P., Viale, D., Marchand, B. (2002). Metal concentrations in the milk and tissues of a nursing *Tursiops truncatus* female. *Marine Pollution Bulletin*, 44, 551-576.
 - 19) Watanabe I., Tanabe S., Amano M., Miyazaki N., Petrov E.A., Tatsukawa R. (1998). Age-dependent accumulation of heavy metals in Baikal seal (*Phoca sibirica*) from the Lake Baikal Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 35, 518-526.
 - 20) Costa, D.P., Williams, T.M. (1999). Marine mammal energetics. W: Reynolds III J.E., Rommel S.A., (red), *Biology of Marine Mammals*. Smithsonian Institution Press, Washington, 485-563.
 - 21) Pastuchov, V.D. Nerpa Bajkala. (1993). VO Nauka. Novosibirsk.
 - 22) Petrov, E.A., Egorova, L.I. (1998). Sovremennoe sostojanie populjacji bajkal'skoj nerpy (*Pusa sibirica*, *Pinnipedia*, *Phocidae*) pitanie i upitannost'. *Zoologicheskij zhurnal*, 77, 593-600.
 - 23) Wagemann, R., Stewart, R.E.A., Lockhart, W.L., Stewart, B.L. (1988). Trace metals and methyl mercury: associations and transfer in harp seal (*Phoca groenlandica*) mothers and their pups. *Marine Mammal Science*, 4, 339-355.
 - 24) Neff, J.M. Bioaccumulation in Marine Organisms. (2002). Elsevier, Amsterdam.
 - 25) Beyersmann, D. (1991). The Significance of Interactions in Metal Essentiality and Toxicity. W: Merian, E., (red.), *Metals and Their Compounds in the Environment*. VCH, Weinheim, 1991, 491-509.