

2D MAPPING OF OTOLITHS BY LA-ICP-MS

2D MAPOVÁNÍ OTOLITŮ METODOU LA-ICP-MS

Grulichová E.¹, Kanický V.^{1, 2}, Holá M.², Vaculovič T.^{1, 2}, Kalvoda J.³, Brzobohatý R.³

¹Laboratory of Atomic Spectrochemistry, Department of Chemistry, Faculty of Science, Masaryk University, Kotlářská 2, 611 37 Brno, Czech Republic

² Central European Institute of Technology, Kamenice 5, 625 00 Brno, Czech Republic

³Department of Geological Sciences, Faculty of Science, Masaryk University, Kotlářská 2, 611 37 Brno, Czech Republic

E-mail: grulichova.eva@gmail.com

ABSTRACT

Laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry (LA-ICP-MS) was applied to the study of otoliths. Otoliths are small earstones of fish. The otolith is one of the most important tools for understanding the life of fish and fish population. Samples were taken from marine fish *Sebastes pinniger* (tribe Scorpaenidae) and *Trisopterus luscus* (tribe Gadidae). The goal of this work was to find out representation of individual elements in otoliths and their concentration. 2D maps concentrations of individual elements and their ratios were created.

Matrix elements (Ca, Mg, P, K) and trace elements (Na, Mn, Fe, Sr, Ba, Zn) were monitored. Maps of ratios Ba/Ca and Sr/Ca make us possible to follow distribution of these elements which indicated to change of different salinity conditions. Manganese is regarded for element which determined core of otolith. Manganese has increased concentration in core of otolith compared to strontium. Based on created maps we can obtain informations about life of the fish and also age of fish.

Key words: otolith, LA-ICP-MS, trace element, Ba/Ca, Sr/Ca, Mg

Acknowledgments: The authors acknowledge support from the European Regional Development Fund project CEITEC (CZ.1.05/1.1.00/02.0068).

ÚVOD

Otolity nazývané také ušní kamínky jsou komplexy polykrystalického složení, které se vyvinuly ve středním uchu u kostnatých ryb. Struktury vnitřního ucha jsou různé, záleží na druhu ryb. Obvykle se v něm vyskytují tři páry váčků (saculus, utriculus, lagena), z nichž každý obsahuje otolit - sagitta, lapillus, asteriscus a tekutinu endolymfu. Otolity se navzájem liší funkcí, velikostí, tvarem i strukturou. V průběhu života dochází k narůstání otolitů tak, že se tvoří prstence podobné letokruhům na pařezech stromů. Otolity se skládají ze soustředných prstenců. Tyto prstence jsou tvořeny organickými a anorganickými materiály, střídají se průsvitné a neprůsvitné zóny. Otolit obsahuje převážně uhličitán vápenatý, zbytek tvoří organická hmota (fibrózní protein - otolin) a stopové prvky. Otolity patří mezi nebuněčné útvary a jsou metabolicky inertní. To znamená, že prvky, které jsou začleněny do jejich povrchu během růstu, jsou v nich natrvalo zachované.

Otolity jsou zodpovědné za rovnováhu a přijímání zvukových impulsů. Patří mezi nejdůležitější prostředky, které nám umožňují porozumět rybímu životu a jejich populacím. Představují záznam vnějších vlivů během celého individuálního života ryby, který můžeme chemickými a elementárními zkouškami zjišťovat a ověřovat např. migrace, rozlišení populací žijících v poněkud odlišných prostředích, teplotu vody, znečištění vody, určení fyziologických indikátorů nebo určení zastoupení prvků. Z otolitů rovněž můžeme získat informace o stáří ryb.

MATERIÁL A METODIKA

Pro měření bylo využito vzorků získaných z mořských ryb *Trisopterus luscus* (Linnaeus, 1758), které se pohybovaly v Severním moři při ústí řeky Temže, s odchylem přibližně před 20 lety. Český název pro *Trisopterus luscus* je treska přičnopruhá, patří do čeledi treskovitých ryb. Treska přičnopruhá žije v mořích a oceánech, obývá především brakické vody, což jsou vody vznikající mísením mořské a sladké vody u ústí řek vlévajících se do moře nebo oceánu. Vzorky byly zataveny do epoxidových pryskyřicových tablet, které byly následně upraveny broušením, a to přibližně na střed otolitu tak, aby byly odkryty viditelné přírůstkové zóny i jádro otolitu.

Pro měření otolitů byl použit laserový ablační systém UP 213 (New Wave, USA) s Nd:YAG laserem a ICP-MS spektrometr Agilent 7500ce (Agilent, Japonsko). Spektrometr s kvadrupólovým analyzátozem je vybaven kolizně-reakční celou pro minimalizaci spektrálních polyatomických interferencí. Pracovní podmínky LA-ICP-MS jsou shrnuty v Tab. 1. Dále byla pro měření otolitů použita elektronová mikrosonda SX-100 (CAMECA, Francie), která sloužila jako srovnávací metoda a porovnávacím prvkem byl zvolen vápník, pro své relativně homogenní zastoupení v otolitech.

Mapování vzorků proběhlo za podmínek uvedených v Tab. 2. Za stejných podmínek proběhlo měření i standardního referenčního materiálu NIST 1486 - kostní moučka, který pomohl naměřené

intenzity vzorků přepočítat na obsahy. Metodou LA-ICP-MS byla získána závislost intenzity signálu na čase. Změřené intenzity byly dále zpracovány tak, že nejprve bylo odečteno od každé linie pozadí. Dále hodnoty intenzit jednotlivých izotopů byly poděleny hodnotou intenzity ^{43}Ca . Tyto hodnoty se vynásobily obsahem vápníku získaným při měření na elektronové mikrosondě ($398\ 000\ \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$). Tímto krokem byla získána korigovaná intenzita příslušného izotopu (I_{corr}). Obsah izotopů byl vypočítán podle vzorce:

$$C_{\text{vz}} = \frac{I_{\text{corr}} \times C_{\text{NIST1486}}}{I_{\text{NIST1486}}},$$

kde C_{NIST1486} je obsah izotopu deklarovaný výrobcem a I_{NIST1486} intenzita referenčního materiálu.

Tab. 1: Používané podmínky LA-ICP-MS

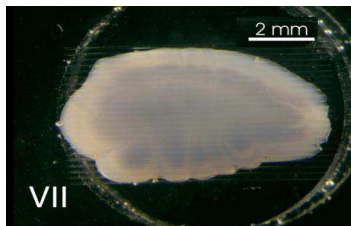
výkon generátoru	1500 W
vnější plazmový plyn (Ar)	15 l·min ⁻¹
střední plazmový plyn (Ar)	1 l·min ⁻¹
nosný plyn (He)	1 l·min ⁻¹
pomocný plyn (Ar)	0,6 l·min ⁻¹
vzdálenost cívký od vstupu do MS	8 mm

Tab. 2: Parametry měření LA-ICP-MS

režim	sken
frekvence pulsu	10 Hz
rychlost posunu	15 $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$
průměr laser. paprsku	80 μm
vzdálenost linií	0,2 mm
hustota energie	6 J·cm ⁻²

VÝSLEDKY A DISKUZE

Mapy obsahů jednotlivých prvků i jejich poměrů byly vytvořeny v programu GRAMS. Z těchto map můžeme získat potřebné informace o rozložení prvků v otolitech. U všech map je v levé části zobrazena barevná stupnice obsahu v jednotkách $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$. K mapování bylo vybráno osm vzorků otolitů. Bohužel ne všechny vzorky se podařilo zbrousit přesně na jádro otolitu, proto u některých map jsou zřetelné pouze náznaky přírůstků. Vzorek číslo VII. představuje nejlépe zbroušený otolitu, proto výsledky budou prezentovány právě na tomto otolitu.



Ve všech otolitech byl obsah železa stejně jako vápníku rovnoměrný, obr. 2. Na obr. 3 je viditelný nižší obsah stroncia ve střední části stejně je tomu tak i v jedné z přírůstkových zón. Mangan je považován za prvek, který určuje jádro otolitu. Na mapě manganu (obr. 4) je zobrazen střed otolitu i přírůstková zóna, které jsou totožné s nízkou koncentrací u stroncia.

Z vypočítaných obsahů prvků můžeme dále vytvořit poměry mezi libovolnými prvky, důležité jsou zejména Ba/Ca a Sr/Ca, které jsou považovány za indikátory pohybu. Z mapy poměru Ba/Ca (obr. 5) lze vyčíst, že v určitém období je možné zaznamenat zvýšenou hodnotu poměru Ba/Ca. Jeden tmavý prstenec, který je vidět na obr. 1, odpovídá červené až žluté barvě znázorněné na obr. 5. Předpokládáme tedy, že se ryba v určitém časovém období pohybovala ve sladkovodním prostředí, tj. ve vodách kolem ústí řeky Temže. Tuto teorii nám potvrzuje i další mapa Sr/Ca (obr. 6), kde je ve stejném období ukládání obsah Sr/Ca naopak nižší – růžová až zelená barva. I to podle dosavadních studií znamená, že se ryba pohybovala ve sladkých vodách.

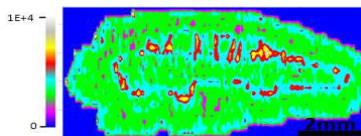
Soustředné prstence u otolitů narůstají v různých ročních obdobích. Střídají se tmavé neprůsvitné zóny se světlejšími průsvitnými zónami. Průsvitné prstence se obvykle tvoří v teplejších měsících a neprůsvitné v chladnějších měsících. Z toho můžeme usoudit, že tato ryba v chladnějších měsících žila ve vodách s nižší salinitou a v teplejších měsících ve vodách s vyšší salinitou.

Ryba v době v odchytu byla stará 2 roky, což dokazuje počet zelených prstenců na obr. 5.

Obr. 2: Mapa obsahu železa



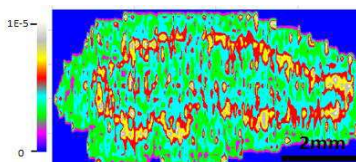
Obr. 3: Mapa obsahu stroncia



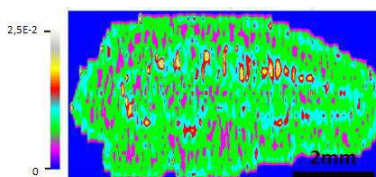
Obr. 4: Mapa obsahu manganu



Obr. 5: Mapa poměru Ba/C



Obr. 6: Mapa poměru Sr/Ca



ZÁVĚR

Z výsledků vyplývá, že metoda LA-ICP-MS je vhodná pro měření majoritních prvků tak i stopových prvků v otolitech. Ve všech zkoumaných otolitech byl prokázán homogenní obsah vápníku a železa. Podařilo se určit jádro otolitů pomocí manganu, který je považován za prvek určující střed otolitu. Poměry Ba/Ca a Sr/Ca umožňují sledovat rozložení těchto prvků indikující střídání různých salinitních podmínek. Tyto salinitní změny u otolitů jsou ovlivněny několika faktory a to fyziologickými procesy, teplotou vody, potravou, rychlostí růstu, ontogenezí, migrací nebo procesy, které souvisí s krystalizací otolitů. Včleňování studovaných prvků z prostředí vody nebo potravy do otolitů neprobíhá stejně rychle, což způsobuje ovlivnění poměrů Ba/Ca a Sr/Ca. Frekvence migrace ryb mezi prostředími s různou salinitou ovlivňuje ukládání těchto prvků v otolitech. A také rozdíly v obsahu zkoumaných prvků mizí, pokud dochází k častější migraci. Stejně tak potrava ryb ovlivňuje přítomnost uváděných prvků. Pokud je v potravě zaznamenána přítomnost bentózních organismů žijících v blízkosti řeky Temže, je zřejmé, že v pobřežních vodách se vyskytují vyšší obsahy těžkých kovů. Na základě zpracovaných map potom můžeme vyčíst další informace o průběhu života ryby, například stáří, v jakých vodách žila nebo ve kterých obdobích se v nich pohybovala.

LITERATURA

- Bath G.E., Thorrold S.R., Jones C.M., Campana S.E., McLaren J.W., Lam J.W.H.(2000): Strontium and barium uptake in aragonitic otoliths of marine fish. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 64: 1705 –1714.
- Brophy D, Jeffries T.E., Danilowicz B.S.(2004): Elevated manganese concentrations at the cores of clupeid otoliths: possible environmental, physiological, or structural origins. *Mar Biol.*, 144:779–786.
- Campana S.E., Neilson J.D. (1985): Microstructure of fish otoliths. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 42:1014-1032.
- Campana S.E.(1999): Chemistry and composition of fish otoliths: Pathways, mechanisms and applications. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 188:263-297.
- Campana S.E.(2004): Photographic atlas of fish otoliths of the Northwest Atlantic Ocean.

Farrell J., Campana S.E.(1996): Regulation of calcium and strontium deposition on the otoliths of juvenile Tilapia, *Oreochromis Niloticus*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 115A:103-109.

Hieftje G.M., Norman L.A.(1992): Plasma source mass spectrometry. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes*, 519:118 – 119.

Jacquet S. H. Dehairs M.F., Cardinal D., Navez J., Delille B.(2005): Barium distribution across the Southern Ocean frontal system in the Crozet–Kerguelen Basin. *Marine Chemistry*, 95: 149-162.

Kalish J.M.(1989): Otolith microchemistry: validation of the effects of physiology, age and environment on otolith composition. *J.Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 132:151-178.

Kalish J.M.(1991): Determinant of otolith chemistry:seasonal variation in the composition of blood plasma, endolymph and otoliths of bearded rock cod *Pseudophycis barbatus*. *Mar Ecol Prog Ser*, 74:137-159.

Kennedy B.P.,Blum J.D., Folt C.L., Nislow K.H.(2000): Using natural strontium isotopic signatures as fish markers: methodology and application. *Can J Fish Aquat Sci*, 57:2280-2292.

Leakey C.D.B., Attrill M.J., Fitzsimons M.F.(2009): Multi-element otolith chemistry of juvenile sole (*Solea solea*), whiting (*Merlangius merlangus*) and European seabass (*Dicentrarchus labrax*) in the Thames Estuary and adjacent coastal regions. *J Sea Res*, 61: 268-274.

Lenaz D., Miletic M., Pizzul E., Vanzo S., Adami G. (2006): Mineralogy and geochemistry of otoliths in freshwater fish from Northern Italy. *European Journal of Mineralogy*, 18: 143-148.

Limburg K.E., Landergren P., Westin L., Elfman M., Kristiansson P.(2001): Flexible modes of anadromy in Baltic sea trout: making the most of marginal spawning streams. *J. Fish Biol.*, 59: 682–695.

Macdonald J.L., Crook D.A.(2010): Variability in Sr:Ca and Ba:Ca ratios in water and fish otoliths across an estuarine salinity gradient. *Mar Ecol Prog Ser*, 413: 147-161.

Martin G.B. Thorrold S.R.(2005): Temperature and salinity effects on magnesium, manganese and barium incorporation in otoliths of larval and early juvenile spot *Leiostomus xanthurus*. *Mar Ecol Prog Ser*, 293:223-232.

Melancon S., Fryer B.J., Gagnon J.E., Ludsins S.A.(2008): Mineralogical approaches to the study of biomineralization in fish otoliths. *Mineralogical Magazine*, 72(2): 627-637.

Murayama E., Takagi Y., Nagasawa H.(2004): Immunohistochemical localization of two otolith matrix proteins in the otolith and inner ear of the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*: comparative aspects between the adult inner ear and embryonic otocysts. *Histochem Cell Biol.*, 121:155–166.

Nolf D. (1985): *Otolithi piscium*, Handbook of Paleichthyology, Volume 10.

de Pontual H., Largadere F., Amara R., Bohn M., Ogor A.(2003): Influence of ontogenetic and environmental changes in the otolith microchemistry of juvenile sole (*Solea solea*). *J Sea Res*, 50:199-210.

Radtke R.L., Svenning M., Malone D., Klements A., Ruzicka, J., Fey D.(1996): Migrations in an extreme northern population of Arctic charr *Salvelinus alpinus*: insights from otolith microchemistry. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 136: 13–23.

Ruttenberg B.I., Hamilton S.L., Hickford M.J.H., Paradis G.L.P., Sheehy M.S., Standish J.D., Ben-Tzvi O., Warner R.R.(2005): Elevated levels of trace elements in cores of otoliths and their potential for use as natural tags. *Marine Ecology Progress Series.*, 297:273-281.

Sadovy Y., Severin K.(1994): Elemental patterns in red hind (*epinephalus guttatus*) otoliths from Bermuda and Puerto Rico reflect growth rate not temperature. *Can J Fish Aquat Sci*, 51:133-141.

Surge D., Lohmann K.C.(2002): Temporal and spatial differences in salinity and water chemistry in SW Florida estuaries: effects of human-impacted watersheds. *Estuaries*, 25: 393-408.

Zhang Z., Runham N.W.(1992): Initial development of *Oreochromis niloticus* (Teleostei, Cichlidae) otoliths. *J Zool (Lond)*, 227:465–478.

Zimmerman C.E., Stonecypher R.W., Hayes M.C.(2003): Migration of precocious male hatchery chinook salmon in the Umatilla River, Oregon. *N. Am. J. Fish. Manag.*, 23: 1007–1015.