

**WYDZIAŁ MATEMATYCZNO-PRZYRODNICZY
KATOLICKIEGO UNIWERSYTETU LUBELSKIEGO
JANA PAWŁA II**

mgr Marek Florek

**Charakterystyka fizykochemiczna wybranych
biomateriałów oraz skamielin opartych na
węglanie wapnia**

Rozprawa doktorska

Promotor: dr hab. Andrzej Kuczumow, prof. KUL

Praca przedstawiona

**Radzie Wydziału Chemii
Politechniki Wrocławskiej**

Lublin 2009

Składam serdeczne podziękowania mojemu promotorowi Panu prof. dr hab. Andrzejowi Kuczumowowi za pomoc, oraz opiekę naukową w trakcie wykonywania niniejszej pracy.

Pracę dedykuję mojej mamie Cecylii

Spis treści

| | |
|--|-----------|
| Wstęp | 5 |
| 1. Wprowadzenie w tematykę badań | 7 |
| 1.1. Systematyka mięczaków wytwarzających badane szkielety | 8 |
| 1.2. Historia geologiczna mięczaków wytwarzających badane szkielety | 9 |
| 1.3. Wewnętrzny szkielet <i>Sepia Officinalis</i> | 10 |
| 1.4. Rostra <i>Belemnitida</i> . | 14 |
| 1.5. Muszle <i>Ammonitida</i> | 16 |
| 1.6. Budowa szkieletów mięczaków oraz ich mikrostruktura | 19 |
| 1.7. Skład chemiczny szkieletów mięczaków | 21 |
| 1.7.1. Węglan wapnia | 22 |
| 1.7.2. Pierwiastki występujące w szkieletach mięczaków | 24 |
| 1.7.3. Chityna | 25 |
| 1.7.4. Związki tworzące matrycę organiczną szkieletów mięczaków. | 27 |
| 1.8. Teoria tworzenia się szkieletów. Proces biomineralizacji. | 29 |
| 1.9. Wpływ temperatury otoczenia na stężenie niektórych pierwiastków obecnych w biominerałach i skamielinach. Rola jonów magnezowych w procesie powstawania aragonitu i kalcytu. | 33 |
| 1.10. Procesy fosylizacji zachodzące w próbkach. Diagenеза biomateriałów | 37 |
| 1.10.1. Pirytyzacja | 38 |
| 1.10.2. Kalcytyzacja | 39 |
| 1.10.3. Sylifikacja | 41 |
| 2. Cele pracy doktorskiej | 43 |
| 3. Część doświadczalna | 44 |
| 3.1. Opis próbek | 44 |
| 3.1.1. Pochodzenie badanych próbek | 44 |
| Próbki szkieletów mątwy zwyczajnej | 44 |
| Próbki skamieniałości. Rostra belemnitów i muszle amonitów | 44 |
| 3.1.2. Metodyka przygotowania próbek do analizy | 46 |
| Próbki szkieletów <i>Sepia Officinalis</i> . | 46 |
| Próbki skamielin belemnitów i amonitów | 47 |
| 3.2. Metody analityczne i aparatura pomiarowa | 49 |
| 3.2.1. Mikroskopia optyczna | 50 |

| | | |
|-----------|--|------------|
| 3.2.2. | Mikroskopia elektronowa | 50 |
| 3.2.3. | Metody oparte na wzbudzeniu i detekcji charakterystycznego promieniowania rentgenowskiego pierwiastków | 51 |
| 3.2.4. | Spektrometria Ramana | 59 |
| 3.2.5. | Spektrofotometria w podczerwieni | 61 |
| 3.2.6. | Dyfraktometria rentgenowska | 62 |
| 3.2.7. | Termiczna analiza wagowa | 63 |
| 3.2.8. | Analiza pierwiastków tworzących związki lotne | 63 |
| 3.2.9. | Analiza pierwiastków metalicznych | 63 |
| 3.3. | Wyniki i dyskusja | 64 |
| 3.3.1. | Szkielet wewnętrzny <i>Sepia Officinalis</i> | 64 |
| 3.3.2. | Rostra <i>Belemnitida</i> : <i>Hibolites sp.</i> , <i>Belemnella sp.</i> i <i>Belemnitella sp.</i> | 94 |
| 3.3.3. | Szkielet <i>Ammonitida Kosmoceras duncani</i> | 123 |
| 4. | Wnioski końcowe | 150 |
| | Perspektywy dalszych badań | 155 |
| | Informacje i podziękowania | 158 |
| | Bibliografia | 159 |

Wstęp

Natura jest najlepszym projektantem i może być źródłem inspiracji. Może podpowiadać nam ciekawe rozwiązania technologiczne i architektoniczne. Uważna i świadoma obserwacja natury i jej tworów doprowadziła do rozwoju nowego działu nauki - biomimiki.

Jednym z obszarów zainteresowań są biomateriały – materiały kompozytowe wytworzone przez organizmy żywe, posiadające bardzo korzystne właściwości fizyczne i mechaniczne. Odtworzenie ich w warunkach laboratoryjnych (opracowanie technologii wytwarzania) z myślą o ich późniejszej produkcji i wykorzystaniu wymaga wcześniejszego dokładnego poznania ich budowy, składu i struktury zarówno w skali makro jak i mikro.

Współczesne spojrzenie na technologie i produkcje materiałów powinno obejmować i obejmuje coraz częściej aspekty ochrony środowiska i już na etapie projektowania materiału rozważa się i analizuje, jakie będą losy materiału po tym jak zostanie wycofany z użytkowania i jakie obciążenie będzie stanowił dla środowiska. Pomimo, że wytworzone materiały będą ‘naturalne’ (niby-biologiczne) istotne jest poznanie, jakim procesom ulegają (będą ulegać) podczas np. składowania. Z tego względu pomocne może być poznanie budowy i struktury materiałów skamieniałych, które są pozostałościami biomateriałów uległymi procesowi fosylizacji, czyli przekształcenia z formy pierwotnej w skamielinę o zmienionym składzie.

Zgromadzone informacje o budowie, składzie, strukturze materiałów (bio- i geologicznych) mogą być również przydatne do wyjaśnienia procesów biomineralizacji i fosylizacji przebiegających w naturze. Zmiany zachodzące podczas tworzenia się tego typu struktur i ich przemiany w czasie dają również pewne informacje dotyczące zmian klimatycznych i środowiskowych zachodzących w otoczeniu próbek.

Spostrzeżenia i wnioski z badań nad strukturą i składem biomateriałów i skamielin mogą zostać wykorzystane przez naukowców z dziedzin zajmujących się biomimiką, biotechnologią, stratygrafią, paleontologią oraz klimatologią i paleoklimatologią, szczególnie do rekonstrukcji zmian temperatur i klimatu panującego współcześnie oraz w czasach prehistorycznych.

W niniejszej pracy badano szkielety mięczaków współczesnych i kopalnych charakteryzujących się budową kompozytową. Podjęto próbę dokładnej oceny składu chemicznego i mikrostruktury szkieletów spokrewnionych ze sobą mięczaków z gromady głowonogów: wewnętrznego szkieletu *Sepia Officinalis*, wewnętrznych szkieletów

belemnitów *Hibolites sp.*, *Belemnella sp.* i *Belemnitella sp.* zachowanych w postaci tzw. rostrów oraz muszli zewnętrznych amonitu z gatunku *Kosmoceras duncani*. W prezentowanej pracy podjęto się również oceny przydatności oraz ograniczeń technik stosowanych do badania biomateriałów i skamielin. W tym celu przeprowadzono szereg analiz mikro-strukturalnych badanych szkieletów.

W części pierwszej rozprawy doktorskiej dokonano przeglądu literatury poświęconej zagadnieniom budowy i powstawania szkieletów węglanowych. Opisano pokrótce systematykę i historię geologiczną mięczaków wytwarzających badane szkielety. Oddzielnie omówiono budowę szkieletów *Sepia Officinalis*, *Belemnitida* i *Ammonitida*. W kolejnych rozdziałach przedstawiono obecny stan wiedzy dotyczący składu chemicznego i mikrostruktury tychże szkieletów, omówiono skład chemiczny i morfologię większości szkieletów tworzonych przez mięczaki, opisano pokrótce teorie tworzenia się szkieletów i proces biomineralizacji. W kolejnym rozdziale zawarto treści dotyczące zagadnień termometrycznych i paleo-środowiskowych oraz wpływu warunków temperaturowych na zawartości pierwiastków (szczególnie magnezu) w badanych szkieletach oraz wpływu magnezu na tworzenie odpowiedniej formy polimorficznej węglanu wapnia przez organizmy morskie. W ostatnim rozdziale części pierwszej omówiono pokrótce te procesy fosylizacji, które wystąpiły w badanych okazach.

Na początku części doświadczalnej opisano pochodzenie badanych próbek, sposób przygotowania próbek do analizy oraz stosowane w pracy techniki analityczne. W części poświęconej wynikom i dyskusji przedstawiono wyniki analiz wykonanych za pomocą różnych metod zaczynając od analiz dyfrakcyjnych poprzez analizy mikro-rozmieszczenia pierwiastków wykonywane metodami EPMA, PIXE, SRIXE i XRF oraz analizy rozmieszczenia w badanych próbkach związków chemicznych wykonane za pomocą spektrometrii Ramana aż do analiz ilościowych z zastosowaniem metod absorpcyjnej spektrometrii atomowej ze wzbudzeniem w płomieniu oraz emisyjnej spektrometrii atomowej ze wzbudzeniem w plazmie. Uzyskane wyniki i ich dyskusję przedstawiono kolejno dla próbek szkieletu *Sepia Officinalis*, rostrów *Belemnitida* i muszli amonitu *Kosmoceras Duncani*. W ostatnich rozdziałach pracy przedstawiono wnioski, perspektywy dalszych badań oraz informacje o uczestnictwie w projektach naukowych i podziękowania.

1. Wprowadzenie w tematykę badań

Wiele organizmów występujących w przyrodzie wytwarza różne szkielety o unikatowych właściwościach fizycznych i mechanicznych, w których skład wchodzi zarówno związki nieorganiczne w formie skryształizowanej lub amorficznej jak i związki organiczne o charakterystycznej i uporządkowanej strukturze, często polimery organiczne. Związki organiczne w takich materiałach nazywanych często materiałami hybrydowymi lub kompozytami tworzą tzw. matrycę organiczną. Ponieważ są to materiały składające się głównie z minerałów i są tworzone przez żywe organizmy przyjęto nazywać je biominerałami a proces ich tworzenia biomineralizacją.

W pracach Manna (Mann 2001) i Baeuerleina (Baeuerlein 2000) znajduje się zestawienie poznanych do tej pory biominerałów. Dotychczas wykryto ich sześćdziesiąt a dwadzieścia pięć z nich według Athertona i Shepparda jest wytwarzanych przez zwierzęta (Atherton and Sheppard 1975).

Najczęściej występującym biominerałem oprócz różnych form fosforanów wapnia są węglany wapnia, z których 80% posiada formę krystaliczną a pozostałe 20% amorficzną (Lowenstam and Weiner 1989).

Spośród wszystkich, biokompozytów węglanowych najciekawszymi tworamami są szkielety mięczaków posiadające strukturę warstwową, bardzo różnorodne kształty i kolorystykę.

W przyrodzie mamy do czynienia ze szkieletami:

- zewnętrznymi – muszlami, które stanowią najczęściej ochronę zwierzęcia przed czynnikami zewnętrznymi głównie drapieżnikami a często pomagają przy poruszaniu się mięczaka,
- wewnętrznymi (pławnymi), które pomagają w utrzymaniu ciała w zwarciu oraz przeciwstawieniu się bardzo wysokiemu ciśnieniu hydrostatycznemu panującemu w głębinach oceanów i mórz.

Należy wspomnieć, że mamy do czynienia zarówno ze szkieletami współcześnie żyjących mięczaków jak i szkieletami mięczaków kopalnych. Badając skamieliny różnych stworzeń możemy rzucić trochę światła na procesy fizyczne i chemiczne zachodzące w biomateriałach po zgonie stworzenia a szczególnie podczas fosylizacji jego szczątków trwającej czasami przez miliony lat. Możemy również dowiedzieć się więcej o przynależności gatunkowej organizmów, ich budowie oraz zwyczajach życiowych.

Spośród biomateriałów i skamielin wybrałem do badań szkielety mięczaków morskich z gromady głowonogów żyjących współcześnie oraz w okresie mezozoiku:

- wewnętrzne mątwy zwyczajnej,
- zewnętrzne amonitów (muszle),
- wewnętrzne belemnitów (rostra).

1.1. Systematyka mięczaków wytwarzających badane szkielety

Niniejsza praca jest poświęcona głównie badaniom chemicznym i mikro-strukturalnym szkieletów. Dlatego wskazane jest podanie uproszczonej systematyki zwierząt wytwarzających badane muszle oraz ich okresów występowania.

Poniżej znajduje się podział systematyczny mięczaków, bazujący na pracach Dzika (Dzik 2003) i Parkera (Parker 1982a, 1982b). W podziale uwzględniłem tylko mięczaki, których muszle były badane w niniejszej pracy.

Systematyka mięczaków posiadających szkielety:

Królestwo: Animalia (zwierzęta) Linné 1758

Typ: Mollusca (mięczaki) Linné, 1758

Podtyp Conchifera (mięczaki muszlowe)

Gromada: Cephalopoda (głowonogi) Cuvier, 1795

Podgromada: Ammonoidea (amonity) Zittel, 1884

Rząd Ammonitida Hyatt, 1889 hettang - mastrycht

Gatunek: *Kosmoceras duncani*

Podgromada: Coleoidea (płaszczobrosłe) Bather, 1889

Rząd: Sepiida (mątwy, sepie) stefan – dziś

Gatunek: *Sepia Officinalis* Linné 1758

Rząd: Belemnitida (belemnity) hettang - mastrycht

Gatunek: *Belemnella*

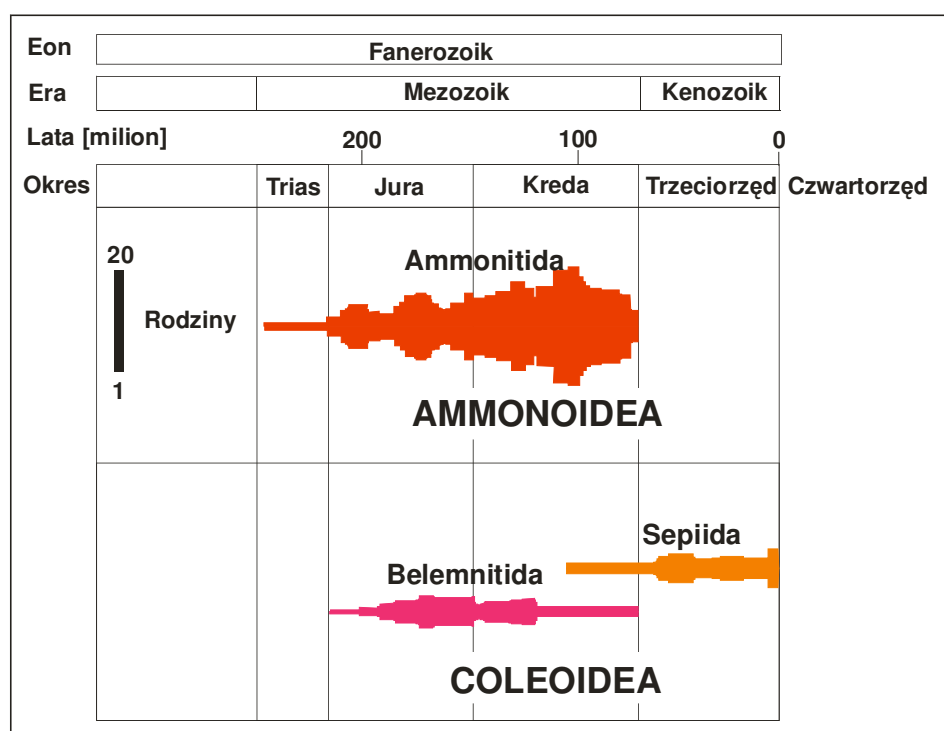
Gatunek: *Hibolites*

Gatunek: *Belemnitella*

Wymieniona podgromada głowonogów płaszczobrosłych (Coleoidea) posiada szkielety wewnętrzne. W trakcie ewolucji następowała u nich redukcja muszli aż do ich całkowitego zaniku. Szkielety *Sepii Officinalis* i belemnitów mają bardzo podobną budowę i należą do mięczaków z typu Coleoidea. Amonity posiadają spiralną zewnętrzną muszlę i tworzą bardzo liczną wymarłą podgromadę Ammonoidea.

1.2. Historia geologiczna mięczaków wytwarzających badane szkielety

Amonity występowały w paleozoiku i mezozoiku od dewonu do kredy (Miller and Furnish 1954; Donovan 1964), głównie w okresie jury (Arkell 1950), kredy (Wright 1952) i triasu (Kummel 1952). Amonity z paleozoiku są nazywane często Goniatytami. Belemnity zaś według Beurlen i Lichter (Beurlen and Lichter 1997) występowały od wczesnego karbonu, jednak z tego okresu znane są tylko z obszaru Ameryki Północnej. Aż do końca triasu w morzach wśród głowonogów dominowały łodzиковate oraz amonitowate. Belemnity wyginęły na przełomie kredy i trzeciorzędu. Mątwy pojawiły się na ziemi w okresie Kredy i występują na niej do dzisiaj. Rys. 1 przedstawia liczebność gatunków omawianych podgromad: *Ammonoidea* i *Coleoidea* obejmujących amonity oraz belemnity i mątwy wraz z okresami geologicznymi ich występowania.



Rys. 1 Mięczaki *Ammonoidea* (amonity) i *Coleoidea* (belemnity i mątwy). Ilość rodzin występująca w erze Mezozoiku i Kenozoiku. Fragment zaczerpnięty z pracy Nixona i Younga (Nixon and Young 2003).

Badane przeze mnie próbki skamieniałości pochodzą z okresu Jury i Kredy z wieków: Kampan (Późna Kreda), Oksford (Późna Jura) oraz Kelowej (Środkowa Jura). Żeby możliwa była łatwa ocena wieku poszczególnych próbek i ich porównanie w Tab. 1 zamieściłem fragment tablicy stratygraficznej obejmujący okresy Jury i Kredy.

Tab. 1 Tabela stratygraficzna (fragment dotyczący okresów pochodzenia badanych próbek: Jury i Kredy) według Międzynarodowej Komisji Stratygrafii (ICS). Wiek badanych próbek -pogrubiona czcionka.

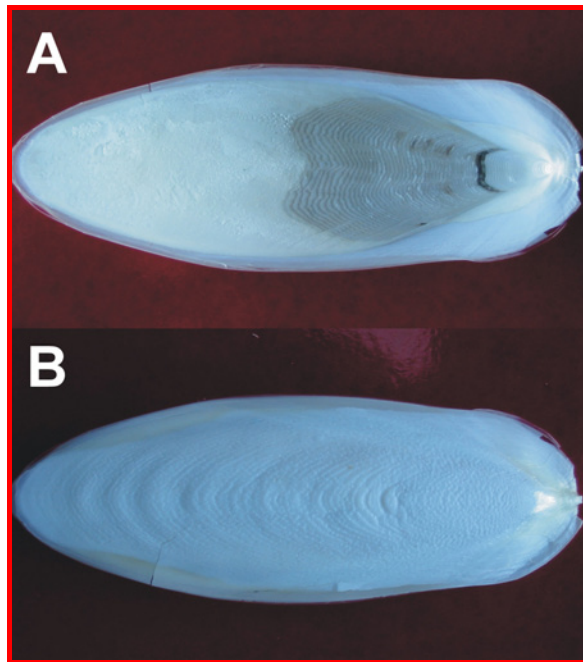
| Okres | Epoka | Wiek [lat temu] |
|-------|---------------|---|
| Kreda | Późna kreda | mastrycht - 70,6 (\pm 0,6) mln kampan - 83,5 (\pm 0,7) mln santon - 85,8 (\pm 0,7) mln koniak - 89,3 (\pm 1,0) mln turon - 93,5 (\pm 0,8) mln cenoman - 99,6 (\pm 0,9) ml |
| | Wczesna kreda | alb - 112 (\pm 1,0) mln apt - 125 (\pm 1,0) mln barrem - 130 (\pm 1,5) mln hoteryw - 136,4 (\pm 2,0) mln walanżyn - 140,2 (\pm 3,0) mln berrias - 145,5 (\pm 4,0) mln |
| Jura | Jura późna | tyton - 150,8 (\pm 4,0) mln kimeryd - 155,7 (\pm 4,0) mln oksford - 161,2 (\pm 4,0) mln |
| | Jura środkowa | kelowej - 164,7 (\pm 4,0) mln baton - 167,7 (\pm 3,5) mln bajos - 171,6 (\pm 2,0) mln aalen - 175,6 (\pm 2,0)ml |
| | Jura wczesna | toark - 183 (\pm 1,5) mln pliensbach - 189,6 (\pm 1,5) mln synemur - 196,5 (\pm 1,0) mln hettang - 199,6 (\pm 0,6) mln |

1.3. Wewnętrzny szkielet *Sepia Officinalis*

Szkielet sepia (ang. *cuttlebone*) jest biologicznie powstałym kompozytem, łączącym w sobie elementy organiczne z nieorganicznymi. Ostatnimi laty zostało opublikowanych wiele nowych informacji dotyczący tego biomateriału. Dotyczą one głównie analizy struktury przestrzennej naszego przedmiotu badań. Wciąż brakuje jednak chemicznych, ilościowych i jakościowych badań szkieletu.

Pierwsze badania szkieletu sepia zostały zapoczątkowane przez Appellőfa (Appellőf 1893). Względnie dokładny opis struktury tego szkieletu można znaleźć w pracy Naefa (Naef 1922) i Barskova (Barskov 1973).

Muszla mątwy posiada owalny, dyskowaty i mocno wydłużony kształt. Rys. 2 przedstawia zdjęcie całego szkieletu sepii wykonane od strony brzusznej Rys.2a i grzbietowej Rys.2b.



Rys. 2 Zdjęcie szkieletu mątwy. A - strona brzuszna, B - strona grzbietowa

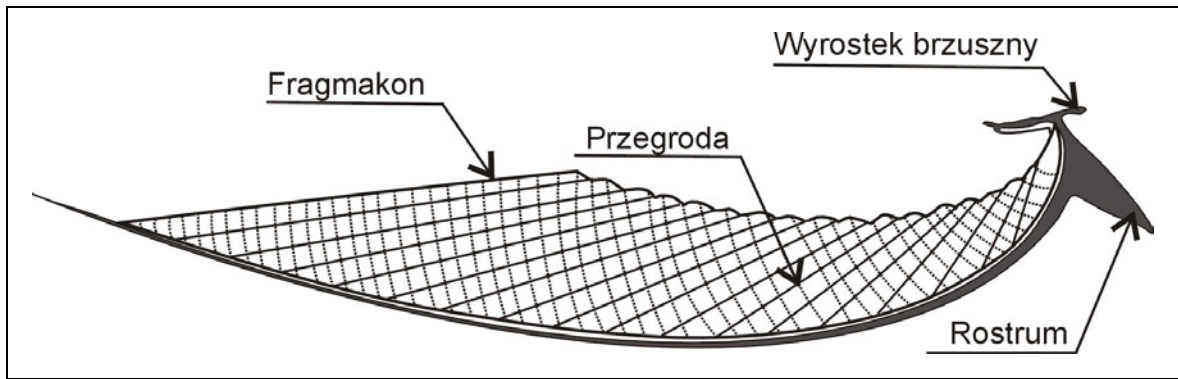
Ze względu na warunki środowiska, w którym żyje dany osobnik (temperatura, głębokość), jego aktywność oraz inne czynniki, nie można określić sztywnych wartości dla takich parametrów, jak: masa szkieletu, jego długość, szerokość czy grubość.

Muszla mątwy wykazuje pewne zróżnicowanie w budowie. Dauphin (Dauphin 1985) wyróżnia w niej:

- część grzbietową,
- część brzuszną,
- część tylną - tzw. rostrum.

Jest to bardzo ogólny podział. Każda część szkieletu składa się z kilku warstw i fragmentów.

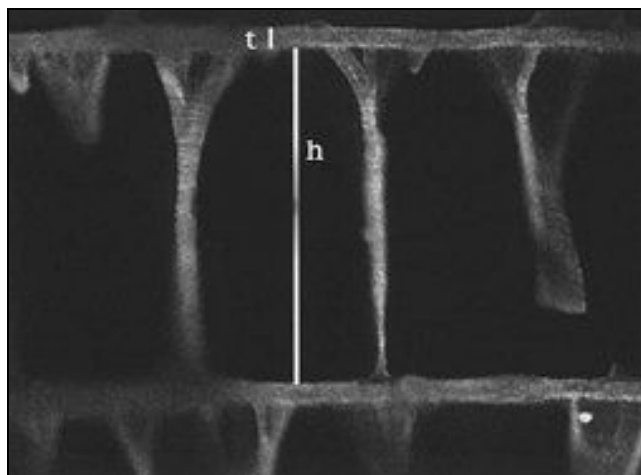
Naef (Naef 1922) ustalił że szkielet mątwy jest złożony z: proostrakum, rostrum, wyrostka brzuszego, fragmaconu, rurki syfonowej i przegród. Rys. 3 przedstawia nieco zmodyfikowany schemat budowy szkieletu sepii zaczerpnięty z Naefa.



Rys. 3 Przekrój poprzeczny sepii zaczerpnięty z Naefa (Naef 1922).

Każda część szkieletu posiada charakterystyczną budowę i strukturę. Barskov (Barskov 1973) wykazał, że przegroda (septum) jest złożone z następujących po sobie warstwy pryzmatycznej, perlowej i drugiej pryzmatycznej. Podobnie jest z częścią grzbietową sepii. Opis budowy i składu poszczególnych warstw znajduje się w rozdziale 1.6.

Birchall i Thomas (Birchall and Thomas 1983) oraz Sherrard (Sherrard 2000) badając szkielet wewnętrzny *Sepii Officinalis* (L) przyporządkowali mu wysoce uporządkowaną złożoną strukturę utworzoną z szeregu powtarzających się komór. I to właśnie strukturze komorowej przypisuje się bardzo dobre parametry mechaniczne szkieletu. Rys. 4 przedstawia fragment przekroju z części brzusznej po wytrawieniu części mineralnej zaczerpnięty z Sherrard (Sherrard 2000). Widzimy na rysunku wyraźnie chitynowe przegrody połączone z kolumnami tworzące razem kształt tzw. komory.



Rys. 4 Przekrój szkieletu sepii (po wytrawieniu) zaczerpnięty z pracy Sherrard (Sherrard 2000). Dwie sąsiednie przegrody chitynowe z łączącymi je kolumnami; h- wysokość kolumny lub szerokość komory, t grubość przegrody (Sherrard 2000).

Już wstępna obserwacja pozwala stwierdzić, że szkielet sepii posiada bardzo mocną konstrukcję pomimo faktu, że jest materiałem bardzo lekkim. Szczegółowe badania jego właściwości strukturalnych i mechanicznych przedstawione są w pracy Sherrard (Sherrard 2000).

Pewne badania mikrostruktury szkieletu mątwy już zostały wykonane. Bardzo ciekawa jest trójwymiarowa wizualizacja struktury wykonana za pomocą tomografu z użyciem promieniowania rentgenowskiego przez Tiseanu (Tiseanu et al. 2005). Oprócz tego ustalono już rozmiary wewnętrzne komór korzystając z mikroskopu optycznego, skaningowego mikroskopu elektronowego (Birchall and Thomas 1983) oraz mikroskopu konfokalnego (Sherrard 2000).

Szkielet mątwy tak jak i większość szkieletów mięczaków składa się z minerału i matrycy organicznej. Boggild zbadł, że wszystkie warstwy szkieletu mątwy składają się z aragonitu (Boggild 1930). Price i Hallam (Price and Hallam 1967) przeanalizowali zawartość Sr – głównej domieszki aragonitu w sepii.

Matryca organiczna oprócz chityny (Ogasawara et al. 2000) zawiera pewne ilości kwasowych białek, przy czym część nierozpuszczalna zawiera ich mniej od rozpuszczalnej (Dauphin 1996). Drozdova (Drozdova et al. 1971) badała zawartość aminokwasów szkieletu *sepia pharaonis*, mątwy spokrewnionej z *Sepia Officinalis*. Według niej matryca nierozpuszczalna zawiera ok. 6% kwasu asparaginowego i ok. 8% kwasu glutaminowego a rozpuszczalna odpowiednio 17% i 7%.

Biorąc pod uwagę matrycę organiczną szkieletu sepii niezwykle ważne jest znaczenie chityny podczas tworzenie konstrukcji szkieletu, które powinno być szczegółowo poznane. Trójwymiarowa sieć z chityny oplatająca kryształy aragonitu tworzy rusztowanie dla całej konstrukcji szkieletu i wydaje się, że zapewnia odpowiednie właściwości fizyczne, równowagę oraz elastyczność konstrukcji. Struktura szkieletu tworząca komory, kombinacja fragmentów nieorganicznych (warstwy aragonitu) w połączeniu z chitynową konstrukcją złożoną z kolumn i przegród wydaje się gwarantować mechaniczną stabilność i wypór hydrostatyczny, czyli pływalność szkieletu.

Trójwymiarowa sieć chitynowa uzyskana ze szkieletu sepii (po dekalcytacji) może służyć jako szkielet lub podstawa do nałożenia warstw różnych materiałów. Taki rodzaj częściowo sztucznych i wysoko porowatych kompozytów może znaleźć szerokie zastosowanie w różnych działach chemii, medycyny i ochrony środowiska np. w katalizie chemicznej, inżynierii kosztnej lub procesach sorpcji.

Proces odtworzenia w skali laboratoryjnej wiernej kopii struktury szkieletu mąty w wyniku reakcji jonów krzemianowych w roztworze zasadowym z użyciem uzyskanej ze szkieletu trójwymiarowej matrycy wykonał z powodzeniem Ogasawara (Ogasawara et al. 2000). W procesie uzyskano krzemionkę SiO_2 wbudowaną w strukturę szkieletu.

Dokładne poznanie i zrozumienie chemicznego składu i cech strukturalnych szkieletu sepii jest kluczem i pomostem do uzyskania tak zwanych biologicznie inspirowanych materiałów (ang. biomimetic materials).

Dotychczasowe badania strukturalne i mikro-strukturalne wykonane na podstawie zdjęć mikroskopowych i tomografu, pozwoliły ustalić mikrostrukturę próbki nie wnikając w jej dokładny skład chemiczny.

Rozmieszczenie pierwiastków w poszczególnych warstwach szkieletu sepii jest ciągle niezbyt dobrze poznane i należy wykonać analizy rozmieszczenia pierwiastków w celu dokładniejszego poznania budowy chemicznej poszczególnych jego części.

1.4. Rostra *Belemnitida*.

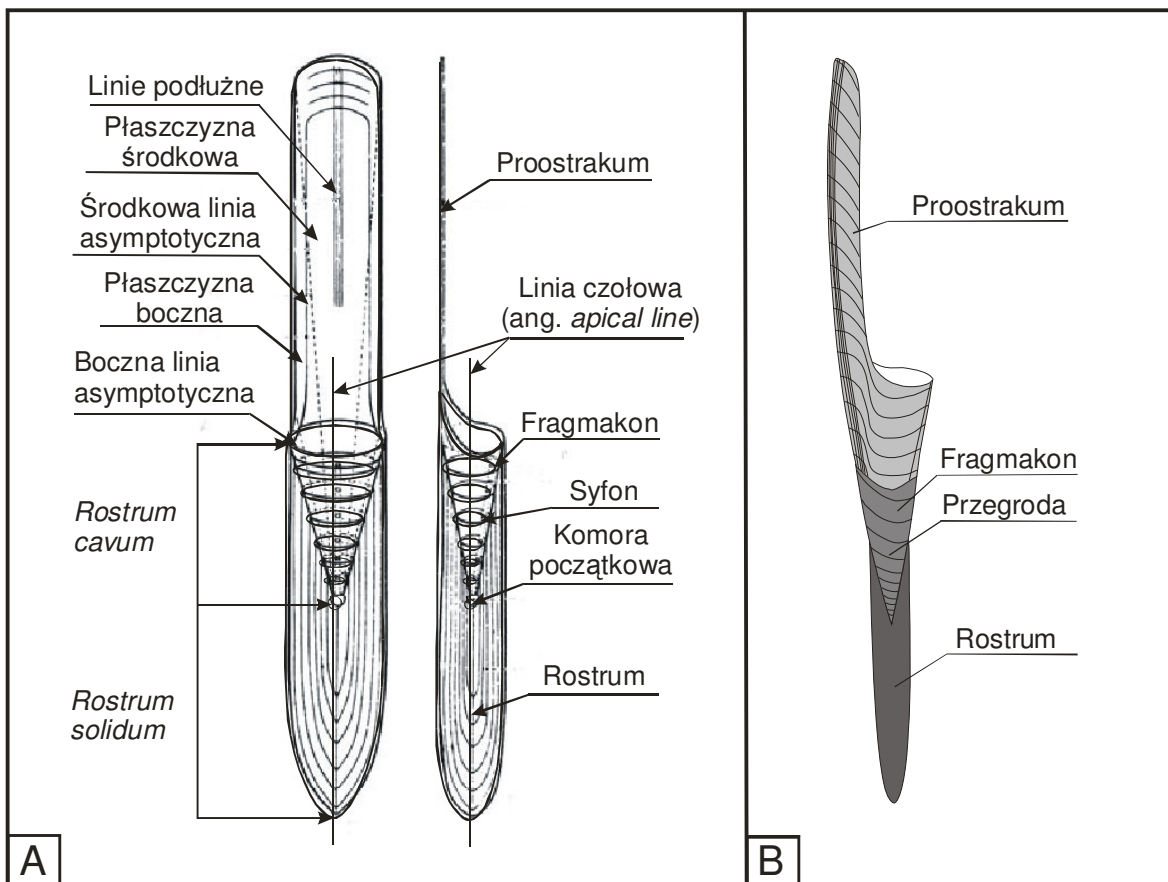
Rostra to bardzo specyficzne pozostałości szkieletów zwierząt znajdujących często w osadach skalnych i glebach (szczególnie w warstwach geologicznych jury i kredy). Badane w niniejszej pracy okazy są pozostałościami głowonogów płaszczooobrosłych, (Coleoidea), które pojawiły się na świecie w erze mezozoiku ok. 200 milionów lat temu, wyginęły zaś ok. 65 milionów lat temu pozostawiając liczne ślady swojej obecności.

Rostra zbudowane z węglanu wapnia są względnie odporne na zanieczyszczenia z diagenetyzacji skał wapiennych (Marshall 1992), dlatego ich próbki używane są często do badań izotopowych użytecznych w chemicznej stratygrafii równoległe z ustaleniem chronologii, temperatury i zasolenia morza pierwotnego w miejscu, w którym znajdowano okazy. Według Veizera zdarzają się jednak diagenetyczne zanieczyszczenia w pobliżu linii wierzchołkowej i mikrozlamań próbek oraz w porach pierwotnego materiału (Veizer 1974), co wpływa na zafałszowanie wyników badań.

Belemnitida (belemnity) mogą być uważane za markery (ang. biostratigraphic markers) dla warstw, w których zostały znalezione. Charakterystyczne koncentryczne linie przyrostów belemnitów są obiektem zainteresowania specjalistów od biomineralizacji i badań klimatycznych.

Rostra są wydłużonymi w kształcie kuli karabinowej fragmentami wewnętrznego szkieletu belemnitów, zbudowanymi z nisko-magnezowego kalcytu (Veizer 1974; Sælen 1989). Posiadają regularną strukturę z centrum osiowym zwanym linią osiową i z łatwo zauważalnym podstawowym phragmoconem.

Główne rostrum jest złożone z kryształów różnych rozmiarów, widocznych często gołym okiem. Ich kształt można dokładniej określić pod mikroskopem optycznym. **Rys. 5a** przedstawia schemat rostrum zaczerpnięty z Naefa (Naef 1922) a **Rys. 5b** zmodyfikowany schemat budowy szkieletu belemnitu: zaczerpnięty z pracy Lukenedera (Lukeneder 2005).



Rys. 5 Przekrój szkieletu belemnitu: A - zaczerpnięty od Naefa (Naef 1922); B -zaczerpnięty z Lukenedera (Lukeneder 2005).

Na przekroju poprzecznym próbek ciętych zarówno wzdłuż jak i w poprzek próbek można zaobserwować bardzo wyraźne strefy przyrostu. Szczególnie ciekawy jest przekrój wykonany prostopadle do linii osiowej próbki ukazujący coś na kształt pierścieni okrążających wąską strefę wierzchołkową pokrywającą się z osią próbki. Ta struktura w postaci charakterystycznych pierścieni uważanych za przyrosty roczne lub inne okresowe bardzo przypomina inne badane struktury takie jak: pierścienie przyrostu drzewa (Nowak et al. 2005; Kuczumow et al. 1999) i stalagmity (Kuczumow et al. 2005).

Występowanie na przekroju szkieletu belemnitu koncentrycznych pierścieni zachęca do analizy mikro-rozmieszczenia pierwiastków i związków chemicznych szczególnie, jeśli dostępne są odpowiednie sondy pozwalające uchwycić bardzo mały - mikrometrowy fragment próbki.

Istnieje sporo kontrowersji odnośnie składu mineralnego pierwotnego szkieletu belemnitu. Niektórzy autorzy twierdzą, że jest on zbudowany z czystego kalcytu (Urey et al. 1951) inni sugerują raczej pochodzenie aragonitowe (Spaeth 1971) a część badaczy uważa, że rostra zbudowane są z kalcytu, który podczas diagenety uległ przekształceniu (Veizer 1974).

Bandel i inni uważają, że rostrum było oryginalnie aragonitowe i uległo podczas diagenety przemianie w kalcyt (Bandel et al. 1984). Są również prace dotyczące belemnitów sugerujące, że pierwotne rostrum belemnitu składało się z obu form węglanu wapnia - kalcytu i aragonitu (Dauphin et al. 2007)

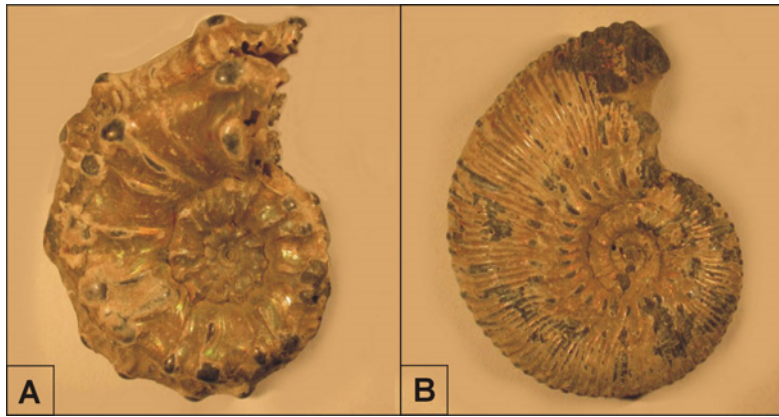
Sælen w swoich badaniach chemicznych pozostałości belemnitów twierdzi, że rostra zbudowane były pierwotnie z mało-magnezowego kalcytu a obecnie, jeśli się różnią od oryginału to w wyniku zaawansowanej diagenety (Sælen 1989).

Makowski (Makowski 1952) w skałach osadowych w Łukowie wykrył i przebadał rostra aragonitowe belemnitów. Dauphin (Dauphin 1987) badała rostra belemnitów *Aulacocerides* o strukturze aragonitowej. Bandel i Kulicki również badali aragonitowe belemnity pochodzące z Polski (Bandel and Kulicki 1988)

Razem z istotną informacją o składzie chemicznym matrycy zostały przeprowadzone analizy chemiczne pierwiastków obecnych w belemnitach za pomocą sondy elektronowej (Sælen and Karstang 1989; Ditchfield 1997) oraz analizy składu izotopowego próbek (Sælen et al. 1996; Veizer et al. 1997 ; Wierzbowski 2002; Podlaha et al. 1998). Szczegółowe analizy rozkładu pierwiastków w poszczególnych częściach rostrum są przedmiotem badań prezentowanych w niniejszej pracy.

1.5. Muszle *Ammonitida*

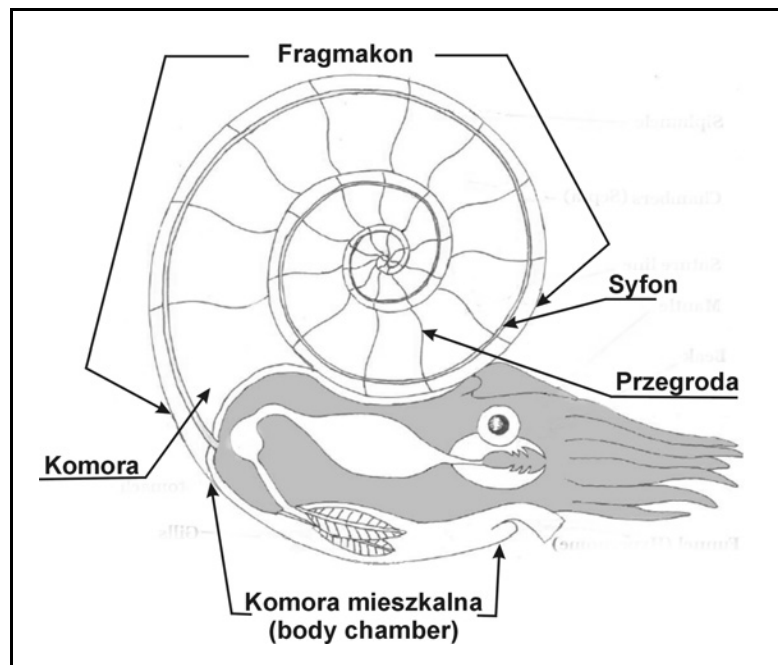
Pozostałości amonitów – muszle są skamieniałościami przewodnimi, przy pomocy, których możliwe jest określenie wieku podłoża, w jakim się znajdują. Dotychczas odkryto ok. 2000 rodzajów muszli amonitów, zróżnicowanych bogactwem form, kształtów i ornamentacji (Arkell 1957).



Rys. 6 Zdjęcie optyczne muszli amonitów: A) *Kosmoceras ex gr. Spinosum*; B) *Kosmoceras duncani*.

Szkielety większości amonitów mają postać stożka skręconego w płaszczyźnie (Rys. 6). Kształtem zewnętrznym przypominają musze współczesnych ślimaków, jednak różnią się od nich zasadniczo w środku, gdzie znajdują się liczne komory poprzedzielane przegrodami pozwalającymi na zwiększenie wytrzymałości mechanicznej muszli. Charakterystyczną cechą muszli Ammonoidea jest ząbkowata budowa ścian zewnętrznych, co zwiększa wytrzymałość muszli (Young 2002).

Rys. 7 przedstawia zmodyfikowany schemat szkieletu amonitu zaczerpnięty z Eydena (Eyden 2003). Muszla amonitu składa się z fragmakonu, komór, przegród, syfonu i strefy mieszkalnej stworzenia (ang. body chamber).



Rys. 7 Zmodyfikowany rysunek przekroju muszli amonitu (Eyden 2003).

Struktura oraz mikrostruktura amonitów była badana głównie za pomocą mikroskopu optycznego oraz skaningowego mikroskopu elektronowego przez kilku naukowców (Kulicki 1975; Birkelund 1967; Erben et al. 1964; Senior 1971; Tozer 1972; Birkelund and Hansen 1968). Ścianki zewnętrzne oraz przegrody w muszlach amonitów podobnie jak i innych mięczaków składają się z wielu warstw. Dauphin (Dauphin 2002) badając mikrostrukturę muszli za pomocą mikroskopu sił atomowych wykryła, że główna część ściany zewnętrznej muszli amonitu zbudowana jest z cienkiej warstwy perłowej sąsiadującej z wewnętrzną cienką warstwą pryzmatyczną. Gruba zewnętrzna warstwa pryzmatyczna charakterystyczna dla innych muszli nie występuje w szkielecie amonitu. Płytki warstwy perłowej są zbliżone kształtem do płytek pryzmatycznych charakterystycznych dla głowonogów (Dauphin and Denis 1990).

Pierwotnie muszle amonitów były zbudowane z aragonitu, co możemy zaobserwować badając dobrze zachowane próbki z Łukowa (Dauphin 2002; Kulicki et al. 2007). Zależnie od warunków zewnętrznych w wyniku fosylizacji tworzyły się czasami formy pirytowe, fosforanowe oraz kalcytowe (Kulicki et al. 2007). Jeśli chodzi o związki organiczne zawarte w muszlach amonitów to możemy się domyślać że zawierają one chitynę oraz pewne białka. Klug i in. (Klug et al. 2007) twierdzi, że muszle te pierwotnie zawierały konchiolinę i melaminę (składnik barwnika wydzielanego przez głowonoga), ale nie udaje się tego potwierdzić badaniami ze względu na niewielkie możliwości przetrwania tych związków. Dodatkowo konchiolina nie jest konkretnym związkiem a tylko zespołem związków, w których skład mogą wchodzić chityna i skleroproteiny wymienione przez Kluga (Klug et al. 2007). Mimo wszystko udało się przeanalizować dobrze zachowane próbki na zawartość niektórych związków organicznych.

Analiza zawartości aminokwasów wykonana przez Dauphin (Dauphin 2002) dla amonitów z Łukowa pokazała, że matryca rozpuszczalna muszli jest bogata w glicynę, alaninę i serynę a nierozpuszczalna w prolinę, glicynę i alaninę

Z przytoczonych powyżej rozważań wynika, że ciągle bardzo mało jest wiadomo o składzie chemicznym szkieletów amonitów, a szczególnie w ujęciu mikro-analitycznym ukazującym rozmieszczenie poszczególnych pierwiastków i związków w próbkach i ich poszczególnych warstwach.

1.6. Budowa szkieletów mięczaków oraz ich mikrostruktura

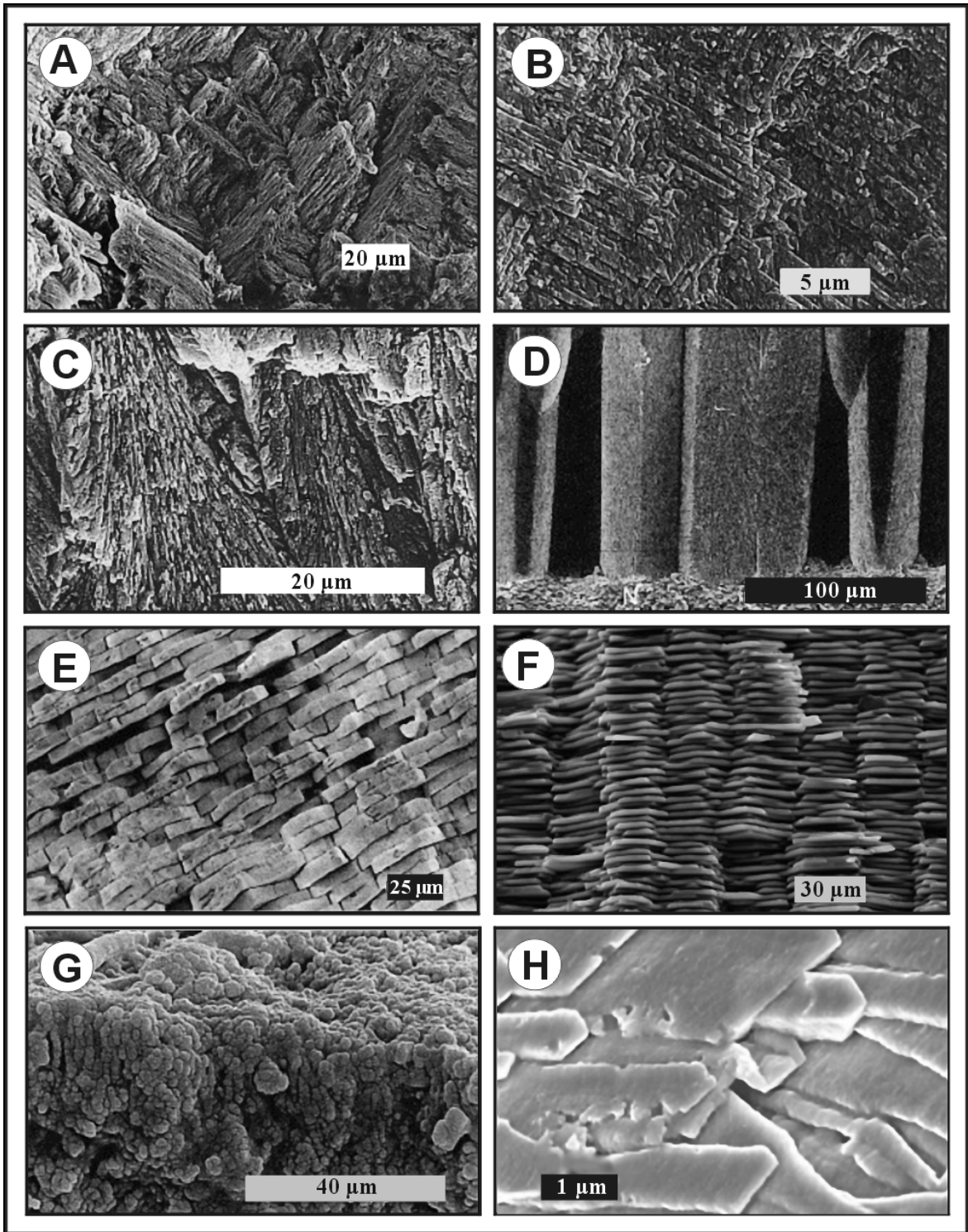
Budowa i struktura szkieletów mięczaków jest bardzo zróżnicowana. W zależności od środowiska życia stworzeń i funkcji, które miały spełniać ich szkielety stworzenia morskie wykształciły zdolność tworzenia szkieletów o bardzo zróżnicowanym kształcie.

Wspólną cechą wszystkich szkieletów jest ich budowa warstwowa. Skład mineralny warstw, ilość matrycy organicznej zawartej w poszczególnych warstwach i ich mikrostruktura wpływa na ich właściwości fizyczne: gęstość, twardość i wytrzymałość mechaniczną. Poszczególne warstwy różnią się ułożeniem kryształów węgla wapnia względem siebie, ich formą polimorficzną, ich kształtem oraz sposobem rozmieszczenia w nich warstw matrycy organicznej. Rozróżnia się następujące struktury warstw szkieletów: prosta i złożona struktura poprzeczno-łytkowa, prosta i złożona struktura pryzmatyczna struktura perłowa, homogeniczna oraz klinowa.

Prosta i złożona struktura poprzeczno-łytkowa (Taylor et al. 1969; Dauphin and Denis 2000; Wilmot et al. 1992; Uozumi et al. 1972) składa się z łytek uporządkowanych jak w sklejce z drewna. W strukturze prostej (Rys. 8a) łytki składające się z długich krysztalitów aragonitowych zorientowanych w tym samym kierunku sąsiadują z łytkami o odmiennej orientacji krysztalitów. W strukturze złożonej (Rys. 8b) łytki przenikają się wzajemnie w strukturę bardziej złożoną.

Prosta i złożona struktura pryzmatyczna (Cuif et al. 1983; Wainwright et al. 1982) składa się z wielokątnych kryształów w postaci graniastosłupa w postaci kolumnowej aragonitu bądź kalcytu (Rys. 8d). Znajduje się zwykle na powierzchni zewnętrznej muszli. Grubość warstwy zawiera się w granicach 10-200 μm (struktura prosta) i powyżej 200 μm (struktura złożona). Warstwa organiczna w tej strukturze otacza kolumny. W obu strukturach znajdują się substruktury o rząd wielkości mniejsze. Pewną odmianą struktury pryzmatycznej złożonej jest struktura pryzmatyczna sferolityczna (Rys. 8c).

Struktura perłowa – macica perłowa, (ang. mother of pearl) najczęściej badana i opisywana (Bevelander and Nakahara 1969; Gregoire 1962; Dauphin 2006) złożona z krysztalitów w postaci płaskich tabletek aragonitu o średnicy 15 μm i wysokości 0,5 μm uporządkowanych warstwami i tworzących strukturę przypominającą ścianę z cegieł (ang. sheet nacre) (Rys. 8e) albo kolumny (ang. columnar nacre) (Rys. 8f). W strukturze tej znajdują się cienkie warstwy materii organicznej nie grubszej niż 0,3 μm , łączącej bądź cementującej krysztalite aragonitu.



Rys. 8 Struktury występujące w szkieletach. A – Złożona struktura poprzeczno – płytkowa w *Fissurellidea aperta* (Chateigner et al. 2000), B – Struktura poprzeczno – płytkowa w *Liota granulosa* (Chateigner et al. 2000), C – Nieregularna struktura pryzmatyczna (sferolityczna) w *Tectus conus* (Chateigner et al. 2000), D – Struktura pryzmatyczna w *Cristalia plicata* (Kobayashi and Samata 2006), E – Struktura perłowa (sheet nacre) w *Lamprotula aff. Paihoensis* (Kobayashi and Samata 2006), F – Struktura perłowa kolumnowa (columnar nacre) (Chateigner et al. 2000) G – struktura homogeniczna (Kobayashi and Samata 2006), H – Struktura klinowa w *Chlamys vari* (Checa et al. 2007)

Homogeniczna struktura (Rys. 8g) jest zbudowana z bardzo małych granulek aragonitu o średnicy 0,5-3µm otoczonych matrycą organiczną (Wainwright et al. 1982).

Struktura klinowa składa się z długich kryształów kalcytu o kształcie łąt o szerokości 2-4 µm i szerokości 0,2-0,5 µm uporządkowanych w nakładające się na siebie warstwy jak dachówka na dachu (Rys. 8h). Każdy kryształ jest otoczony przez materię organiczną o grubości 0,01-0,02 µm. Pewną odmianą jest tu struktura klinowa skrzyżowana, gdzie tzw. łąty kalcytu są uporządkowane jak w poprzecznej strukturze płytkowej. Dokładny opis struktury klinowej znajduje się w pracach Taylora i in. (Taylor et al. 1969) oraz Cartera (Carter 1980).

Z dokładniejszym opisem poszczególnych warstw można zapoznać się w pracy Wainwrighta i in. (Wainwright et al. 1982), skąd podział został częściowo zaczerpnięty. Również w pracy Kobayashi i Samata (Kobayashi and Samata 2006) znajduje się dość jasny, chociaż pobieżny opis struktur występujących w szkieletach małż.

1.7. Skład chemiczny szkieletów mięczaków

Szkielety mięczaków w zdecydowanej większości zbudowane są z węglanu wapnia z małą zawartością związków organicznych tworzących tzw. matrycę organiczną.

Sama matryca organiczna składa się z frakcji, i możemy ją podzielić na:

- nierozpuszczalną matrycę organiczną,
- rozpuszczalną matrycę organiczną.

Na nierozpuszczalną matrycę organiczną składają się w głównej mierze chityna (Dauphin and Marin 1995) oraz różne białka i ich pochodne nierozpuszczalne w wodzie lub rozcieńczonych roztworach kwasów (Sudo et al. 1997).

W części rozpuszczalnej nie obserwujemy już chityny, ale mogą występować inne wielocukry bądź pochodne wielocukrów oraz białka i ich pochodne. Przez słabą znajomość składu matrycy organicznej niektórzy badacze nazywają ją ogólnie konchioliną (Mutvei 1969)

W szkieletach zewnętrznych, zawartość związków organicznych jest mała i wynosi zwykle mniej niż 5% (Zhang and Zhang 2006). Są to głównie białka z niewielką ilością chityny. W szkieletach wewnętrznych zawartość matrycy organicznej jest dużo większa i dochodzi nawet do ok. 9-10% w szkielecie mątwy, przy czym obserwuje się przewagę chityny nad białkami (obserwacje autora). Obecność związków organicznych w skamieniałych szkieletach jest zwykle śladowa, ale wykrywana dzięki bardzo czułym

metodom. Bierstedt i inni (Bierstedt et al. 1998) wykryli pozostałości chityny a także kilku aminokwasów w próbkach skamieniałych stawonogów korzystając z metody Py-GC-MS.

W skamielinach szkieletów mamy do czynienia głównie z dobrze skryształizowanym formami minerałów. Jest to głównie dobrze skryształizowany węglan wapnia zawierający domieszki różnych metali dwudodatnich wbudowujących się w jego strukturę. W próbkach znajduje się również dużo krzemu i glinu, które są składnikami związków wtórnie zanieczyszczających materiał.

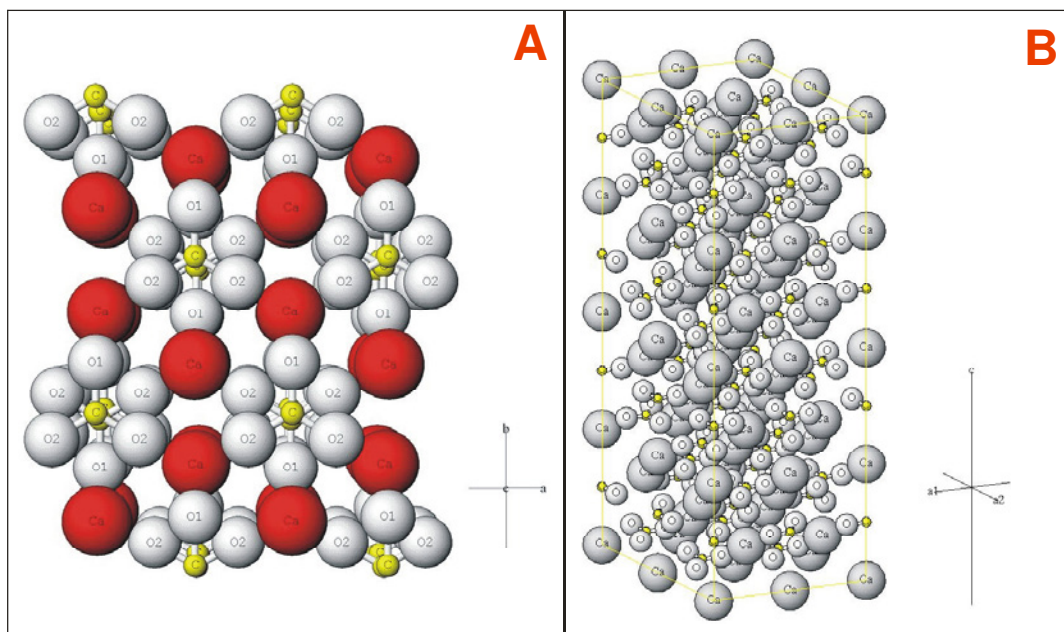
Spotyka się również formy spirytyzowane, czyli zawierające głównie disiarczek żelaza powstające w wyniku diagenety próbek. W wyniku diagenety dochodzi także w biomateriale do przemiany polimorficznej. Tak jest w przypadku węglanów wapnia gdzie może zachodzić przemiana aragonitu w kalcyt (Brand 1989).

Strefę nieorganiczna lub mineralną w strukturze szkieletów należy traktować umownie, gdyż tak naprawdę między kryształami znajdują się zawsze związki organiczne.

1.7.1. Węglan wapnia

Węglan wapnia występuje w następujących postaciach krystalograficznych:

- aragonit o układzie rombowym z grupą przestrzenną Pmcn (Wyckoff 1963; De Villiers 1971) (Rys 9a),



Rys. 9 Rysunki przedstawiające modele struktury kalcytu (A) i aragonitu (B) przekopiowane za pozwoleniem z galerii internetowej „Intermediate Temperature Solid Conductors” (Gallery).

- kalcyt o układzie romboedrycznym (trygonalnym) z grupą przestrzenną R3c (Wyckoff 1963; Effenberger et al. 1981) (Rys. 9b),
- wateryt o układzie heksagonalnym z grupą przestrzenną P6₃/mmc (Meyer 1969),
- ikait (Sześciowodny węglan wapnia) – CaCO₃ * 6H₂O o układzie jednoskośnym z grupą przestrzenną C2/c (Dickens and Brown 1970; Hesse et al. 1983),
- monohydrokalcyt – CaCO₃ * H₂O o układzie romboedrycznym (trygonalnym) z grupą przestrzenną P3₁21 (Effenberger 1981),
- amorficzny CaCO₃.

W naturze, a w szczególności w szkieletach bezkręgowców węglan wapnia występuje głównie w dwóch najbardziej stabilnych termodynamicznie formach krystalicznych: w postaci aragonitu i kalcytu, przy czym kalcyt jest formą bardziej stabilną (Jamieson 1953).

Amorficzny węglan wapnia może występować w szkieletach mięczaków (Simkiss 1993), ale ze względu na fakt, że jest bardzo nietrwały przechodzi szybko w którąś formę krystaliczną węglanu (Nancollas 1989; Brecevic and Nielsen 1989).

Niektórzy badacze uważają, że muszle tworzone przez mięczaki przechodzą przez formę amorficzną i dopiero dorosłe osobniki wykształcają szkielet w pełnej formie krystalicznej. Weiss i in. (Weiss et al. 2002) wykonali badania *in vivo* na młodych osobnikach małż z zastosowaniem mikroskopu ze spolaryzowanym światłem, spektrometru IR i Ramana oraz mikroskopu elektronowego, które potwierdziły tą tezę.

W pracy Manna (Mann 2001) wymienia się jeszcze wateryt jako składnik szkieletu niektórych ślimaków. Wateryt w ilości około 1,5% w szkielecie ślimaka słodkowodnego wykrył również Hasse i in. (Hasse et al. 2000). Ze względu na bardzo małą stabilność termodynamiczną wateryt jest wielką rzadkością wśród biominerałów (Lowenstam and Weiner 1989; Lowenstam 1981). Ikaitu i monohydrokalcytu nie spotyka się w biokompozytach (Fricke and Volcmer 2007).

Należy w tym miejscu dodać, że muszle mięczaków mogą zawierać jedną z form polimorficznych węglanu wapnia bądź kilka w różnych proporcjach.

Szkielety wewnętrzne głowonogów: małży zwyczajnej (Hewitt 1975) oraz muszle łodzika (Dauphin 2006) zawierają tylko aragonit jako główny składnik mineralny. Muszle konczy (Kamat et al. 2000; Kuhn-Spearing et al. 1996; Menig et al. 2001), niektórych ślimaków słodko- i słonowodnych z gromady brzuchonogów (Pokroy et al. 2006), omułków (Nyström et al. 1995) oraz niektórych małż (Zhu et al. 2006) są prawie całe

aragonitowe. Ostrygi (gromada: małże) zawierają obie formy węglanu wapnia w swoim składzie (Taylor et al. 1969; Choi and Kim 2000). Kalcyt jest obecny w zewnętrznej warstwie pryzmatycznej, a aragonit w wewnętrznej warstwie perłowej. Muszle słuchotek z gromady brzuchonogów są również zbudowane częściowo z kalcytu i aragonitu (Menig et al. 2000; Lin and Meyers 2005; Belcher et al. 1998). Stwierdzono również, że całe szkielety mięczaków z rodziny przegrzebkowatych (gromada: małże) są zbudowane z kalcytu (Owen et al. 2002).

Szkielety mięczaków kopalnych zależnie, od stopnia zachowania zbudowane są z materiału pierwotnego bądź uległy przekształceniu w wyniku diagenety. Szkielety amonitów były pierwotnie zbudowane z aragonitu, lecz obecnie znajdujemy formy kalcytowe i pirytowe. Rostra belemnitów były pierwotnie kalcytowe lub aragonitowe a teraz występują jako dobrze skryształizowany kalcyt.

1.7.2. Pierwiastki występujące w szkieletach mięczaków

Obecność różnych pierwiastków, szczególnie tworzących dwu-dodatnie jony w szkieletach mięczaków jest związana z występowaniem węglanu wapnia, zawierającego zanieczyszczenia w swojej sieci krystalicznej. Jony te podmieniają często wapń w strukturze kalcytu bądź aragonitu już podczas tworzenia się kryształów. Kalcyt zanieczyszczają najczęściej jony magnezu a aragonit jony strontu.

W skamieniałościach mamy do czynienia z dwoma typami pierwiastków:

- występującymi pierwotnie w próbkach,
- pojawiającymi się w wyniku przeobrażania szkieletu (diagenetyza, fosylizacja).

Pierwiastkami, które znajdują się pierwotnie w szkieletach są: Ca, C, O, S, N, P, Cl, Na. Są to pierwiastki wchodzące w skład związków chemicznych tworzących szkielet, czyli: chityny (C, O, H, N), białek i ich pochodnych (C, O, H, N, S, P) oraz kalcytu i aragonitu (Ca, C, O). W kalcycie i aragonicie już podczas tworzenia szkieletu mogą się pojawiać pierwiastki zanieczyszczające strukturę.

Zanieczyszczeniami w próbkach możemy nazwać pierwiastki takie jak: Si, Mn, Fe, Zn, K, Na, Cl, Al, S, I, Br, Sr, Mg, przy czym niektóre z nich już pierwotnie wbudowują się strukturę kalcytu/aragonitu m. in. Mg i Sr. Niektóre z tych pierwiastków np. Fe, Zn, Mg jako składniki enzymów oraz K, Na, Cl, S płynów ustrojowych stworzenia mogą również trafić do szkieletu jako zanieczyszczenie pierwotne.

Obecność glinu, krzemu występujących głównie w muszlach skamieniałych należy przypisać zanieczyszczeniu muszli przez zewnętrzne czynniki. Węglan wapnia, bardzo czuły na zakwaszenie środowiska może ulec wyflukaniu a jego miejsce może zająć inny minerał, np. krzemian, glinokrzemian lub krzemionka.

Siarka obecna czasami w próbkach jest pierwiastkiem występującym pierwotnie w białku zawierającym metioninę i cysteinę. Według Dauphin szkielety pierwotne bezkręgowców zawierają śladową prawie niewykrywalną ilość siarki (Dauphin 2001), dlatego większa jej obecność w próbkach przypisywana jest późniejszym zanieczyszczeniom szkieletu. Sugerowana przez Dauphin niska zawartość siarki w szkieletach jest czasami sprzeczna z wynikami badań innych naukowców. Masuda i Hirano (Masuda and Hirano 1980) wykrył w szkieletach małż ok. 4500 ppm siarki, co jest wartością bardzo dużą.

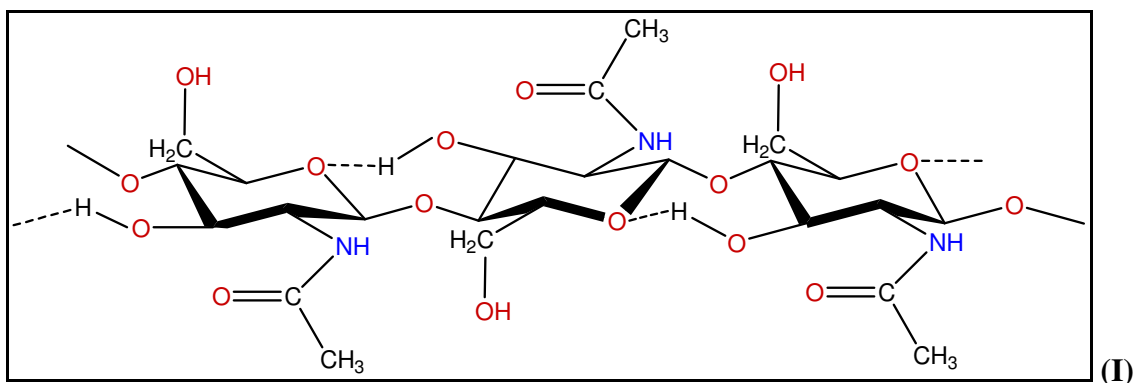
Obecność dużej ilości manganu w próbkach skamielin zawierających kalcyt służy według niektórych naukowców jako wskaźnik zanieczyszczenia w wyniku diagenety (Ditchfield 1997; Veizer and Fritz 1976). wysokie stężenie żelaza, którego również uważane jest za wskaźnik zanieczyszczenia szkieletów (Sunderlin 2002).

Przy badaniu szkieletów należy zwrócić szczególną uwagę również na pierwiastki, które mogą być wskaźnikami zasolenia morza oraz wskaźnikami temperaturowymi pozwalającymi na określenie temperatur podczas tworzenia lub przeobrażania się szkieletów. Magnez zależnie od temperatury otoczenia wbudowuje się w kryształy węglanów z różną szybkością (McArthur et al. 2007; Rosenthal et al. 1997). Zależności temperaturowe i paleotemperaturowe będą omówione w rozdziale 1.8.

1.7.3. Chityna

Poly(N-acetyl-1,4-β-D-glucopiranozoamina), ([wzór I](#)) nazywana chityną, jest polisacharydem złożonym z monomerów N-acetylo-D-glukozy-2-aminowych.

Budowa chemiczna chityny jest bardzo zbliżona do budowy celulozy. Wymiana części atomów tlenu na atomy azotu w strukturze chityny w stosunku do struktury celulozy powoduje, że w chitynie występują dużo silniejsze międzycząsteczkowe wiązania wodorowe. Powoduje to większą wytrzymałość mechaniczną chityny w stosunku do celulozy oraz tworzenie bardziej skryzalizowanych struktur.



Właściwości chityny i jej zastosowanie były przedmiotem badań wielu naukowców (Rinuando 2006; Revol and Marchessault 1993; Majeti and Kumar 2000; Mogilevskaya et al. 2006). Nas interesują przede wszystkim jej właściwości mechaniczne, chemiczne i struktura. Chityna tworzy białe twarde i mało elastyczne struktury.

Chityna obok celulozy i skrobi jest najczęściej występującym związkem organicznym w przyrodzie. Jest głównym lub przynajmniej bardzo ważnym składnikiem zewnętrznych szkieletów i pancerzy stanowiąc często ich materiał wzmacniający. Będąc głównym składnikiem nierozpuszczalnej części matrycy organicznej stanowi jednocześnie konstrukcję-rusztowanie, w które wbudowuje się cała struktura mineralna szkieletu.

Chityna może występować w trzech różnych formach krystalicznych jako: α - β - i γ -chityna (Rudall 1963). Różnice pomiędzy poszczególnymi formami chityny są bardzo subtelne jednak dzięki analizie dyfraktometrycznej (XRD) można je odróżnić. Według Rudalla poszczególne formy chityny różnią się tylko ułożeniem poszczególnych łańcuchów polimerowych w komórce sieciowej. Komórka sieciowa α -chityny zawiera dwa przeciwstawne łańcuchy, β -chityna jest złożona z łańcuchów rozmieszczonych równolegle, przez co komórka elementarna zawiera tylko jeden łańcuch. γ -Chityna posiada komórkę elementarną zawierającą 3 łańcuchy, z centralnym łańcuchem skierowanym przeciwstawnie do dwóch skrajnych.

Szczegółowe badania strukturalne α -chityny można znaleźć w pracy Carlströma (Carlström 1957) i Cardenas (Cardenas et al. 2004) oraz Minke (Minke and Blackwell 1978) a β -chityny u Cardenas (Cardenas et al. 2004) i Blackwella (Blackwell 1969).

Jang i in. (Jang et al. 2004) wykonali kompleksowe badania chityny stosując metody: FTIR, TGA, XRD oraz CP-MAS ^{13}C NMR, pozwalające ustalić masy molowe α - β - i γ -chityny kolejno na 701 kDa, 612 kDa i 524 kDa.

Przegląd dostępnej literatury pozwala stwierdzić że α -chityna jest składnikiem: pancerzy skorupiaków takich jak: kraby (Minke and Blackwell 1978) i krewetki (Minke

and Blackwell 1978; Goodrich and Winter 2007). W gąbce morskiej również wykryto α -chitynę (Ehrlich et al. 2007a; Ehrlich et al. 2007b).

Według Jeunieux (Jeunieux 1963) β -chityna jest najbardziej powszechną chityną w szkieletach mięczaków. β -chitynę można wykryć w szkielecie kalmara (Rząd: *Teuthida*) oraz mątwy (Ogasawara et al. 2000).

Pozostałości chityny wykrywa się nawet w szczątkach szkieletów stworzeń morskich mających wiele milionów lat. Bierstedt i in. (Bierstedt et al. 1998) wykryli ślady chityny w skorupie skamieniałego stawonoga korzystając z metody Py-GC-MS.

Flannery i in. opracowali specyficzną i czułą metodę ilościowego oznaczania zawartości chityny w skamielinach bazując na identyfikacji i kwantyfikacji D-glukozaminy, głównego składnika chityny (Flannery et al. 2001). Metoda polega na hydrolizie wyizolowanego materiału, specyficznego derywatywacji monomerów amino cukrowych i analizie GC-MS z użyciem detektora SIM (ang. - *Selected ion monitoring*).

1.7.4. Związki tworzące matrycę organiczną szkieletów mięczaków.

Studiując literaturę czytelnik może się natknąć na ogromną ilość publikacji dotyczących matrycy organicznej w szkieletach mięczaków. Ponieważ celem mojej pracy doktorskiej nie była pełna identyfikacja organicznych składników matrycy zagadnienie to zostanie przedstawione krótko.

Matryca organiczna biomateriałów węglanowych składa się w większości z białek (Albeck et al. 1993; Marin and Luquet 2004; Zhang and Zhang 2006) i polisacharydów (Weiner and Lowenstam 1977). Z polisacharydów zawartych w biomateriałach węglanowych głównym składnikiem jest chityna opisywana w rozdziale 1.7.3. W szkieletach mięczaków oprócz białek również często spotyka się glikoproteiny. Dauphin wykryła obecność glikoprotein we frakcji rozpuszczalnej ze szkieletów głowonogów takich jak: *Nautilus*, *Sepia*, *Spirula* i *Loligo* (Dauphin and Marin 1995).

Matrycę organiczną według wielu naukowców tworzy mieszanina białek, glikoprotein i polisacharydów (Wada 1964; Gregoire 1972; Krampitz et al. 1976; Weiner 1979; Samata 1990)

Białka wchodzące w skład matrycy można podzielić na dwie grupy: rozpuszczalne i nierozpuszczalne. Białka rozpuszczalne to według wielu autorów makromolekuły kwasowe (białka i/lub glikoproteiny) (Addadi and Weiner 1985; Crenshaw 1972; Weiner 1979; Weiner and Traub 1984; Nakahara et al. 1980; Hasse et al. 2000; Addadi and Weiner

1986) obecne w różnych warstwach szkieletów i mające niebagatelny wpływ na proces tworzenia się biominerałów.

Białka lub glikoproteiny kwasowe obecne w próbkach zawierają duże ilości kwasu asparaginowego (Asp) i glutaminowego (Glu) (Weiner and Hood 1975; Samata 1990; Weiner 1979). Oprócz nich w skład białek wykrywanych w szkieletach wchodzi najczęściej: seryna, glicyna, asparagina i alanina (Mann 2001).

Nierozpuszczalna zwykle hydrofobowa matryca organiczna jest dużo gorzej poznana, ponieważ następuje dużo trudności w wyizolowaniu i w analizie chemicznej. Mimo to udało się wykryć już kilka białek z matrycy nierozpuszczalnej. Sudo i in. (Sudo et al. 1997) zidentyfikowali białko MSI 60 bogate w glicynę i asparaginę w strukturze perłowej oraz MSI 31 bogate w glicynę i kwas asparaginowy i glutaminowy w strukturze pryzmatycznej ostrygi japońskiej.

Poszczególne warstwy szkieletów i szkielety należące do różnych gatunków różnią się zawartością poszczególnych aminokwasów w swoim składzie. W matrycy organicznej warstwy perłowej szkieletów mięczaków według Nakahary i Kakei (Nakahara and Kakei 1983) oraz Weiner i Traub (Weiner and Traub 1984) β -chityna znajduje się pomiędzy dwoma warstwami białek bogatych w glicynę i alaninę.

Możliwa, choć rzadko spotykana jest też obecność w szkieletach białek zawierających fosfor (Sikes and Wheeler 1983; Rusenko et al. 1991). Rusenko badając muszlę ostrygi wykrył, że jej matryca organiczna składa się w 90% z równo-molowych ilości kwasu asparaginowego, seryny, i glicyny. A seryna wchodzi w skład głównie O-fosfoseryny tworzącej fosfo-proteinę, której obecność jest bardzo rzadka dla szkieletów mięczaków.

Obecność siarki w próbkach może świadczyć o obecności białek zawierających cysteinę i metioninę. Według niektórych autorów zawartość tego rodzaju białek i siarki generalnie w szkieletach mięczaków jest znikoma (Dauphin 2001), a wysoka zawartość siarki wynika raczej z obecności kwasowych cukrów posiadających grupę sulfonową (Dauphin 2003, 2006; Crenshaw and Ristedt 1976) lub glikoprotein z tą samą grupą (Simkiss 1965; Crenshaw 1972)

Oprócz wymienionych grup związków w muszlach mogą się znajdować specyficzne związki, takie jak mukopolisacharydy posiadające grupę sulfonową (Simkiss 1965), inne mukopolisacharydy kwasowe (Crenshaw 1972; Machado et al. 1994), amino cukry (Degens et al. 1967) oraz lipidy (Beedham 1958).

Bardzo charakterystyczna jest obecność w muszlach białka podobnego składem i strukturą do fibroiny jedwabiu (ang. silk-fibroin protein). Odkrycie obecności tego białka za pomocą dyfrakcji rentgenowskiej i elektronowej (Weiner and Traub 1980; Weiner et al. 1983a) przyczyniło się do wyjaśnienia przebiegu procesu biomineralizacji. Białko to zawierające duże ilości kwasu glutaminowego i alaniny według wielu autorów znajduje się na granicy między chityną a roztworem, z którego wytrącają się kryształy. Według Levi i in. (Levi et al. 1998) białko to penetruje chitynę w szkielecie. Falini i in. (Falini et al. 2003) bazując na tym stwierdzeniu zbadali sposób oddziaływania chityny z tym białkiem i dzięki analizom FTIR i XRD doszli do wniosku, że białko to najpierw wchodzi w przestrzeń między płaszczyznami molekularnymi chityny w procesie tzw. interkalacji (eng. intercalation) a następnie obserwuje się oddziaływanie przez grupy acetylowe chityny.

Wykryto wiele różnych białek w biomateriałach węglanowych. W warstwie perłowej słuchotki (ślimak) wykryto lustrinę A (nierozpuszczalną i bogatą w cysteinę i prolinę) (Shen et al. 1997), pearlinę (Miyashita et al. 2000) i nakreinę (Miyamoto et al. 1996) w warstwie perłowej ostrygi *Pinctada fucata*, mukoperlinę w warstwie perłowej *Pinna nobilis* (omulek) (Marin et al. 2000), perlucinę i perlustrinę w *Haliotis laevigata* (ślimak) (Weiss et al. 2000).

Analiza związków organicznych zawartych w szkieletach głowonogów analizowanych przez mnie była już podejmowana (Dauphin 1996, 2006; Drozdova et al. 1971), ale uzyskano tylko przybliżony skład próbek.

1.8. Teoria tworzenia się szkieletów. Proces biomineralizacji.

Proces biomineralizacji, czyli proces tworzenia minerałów przez organizmy żywe jest procesem dość złożonym i nie do końca jeszcze poznany. Od początku lat 70-tych powstało wiele prac poruszających ten temat. Prawdziwy rozwój w dziedzinie biomineralizacji zapoczątkowały prace Lowenstama (Lowenstam 1981) i Weinerja i Hooda (Weiner and Hood 1975), którzy zajmowali się badaniami biominerałów. W 1989 roku powstały pierwsze głębsze opracowania Lowenstama i Weinerja (Lowenstam and Weiner 1989) oraz Simkissa i Wilbura (Simkiss and Wilbur 1989), które nie wyjaśniają jednak procesu w sposób niepodważalny.

Ciekawy jest fakt, że pewne organizmy wytwarzają jedną formę polimorficzną kryształu a inne drugą. Tworzenie kalcytu i aragonit to typowy przykład tego zjawiska. Należy się zastanowić, co powoduje, że organizm wytwarza konkretny minerał. Tworzenie

kryształów przez organizmy bez wątpienia odbywa się za pośrednictwem makromolekuł zewnętrzno-komórkowych (Lowenstam 1981) takich jak proteiny i polisacharydy. Właściwości i występowanie jednego z polisacharydów - chityny już częściowo omówiliśmy w rozdziale 1.6.3. Jest ona uważana za rusztowanie, które współdziałając z białkami tworzy miejsca aktywne do wbudowania kryształów węglanu wapnia (Wheeler and Sikes 1989; Simkiss and Wilbur 1989). Keith i in. podważają jednak rolę chityny w biomineralizacji (Keith et al. 1993)

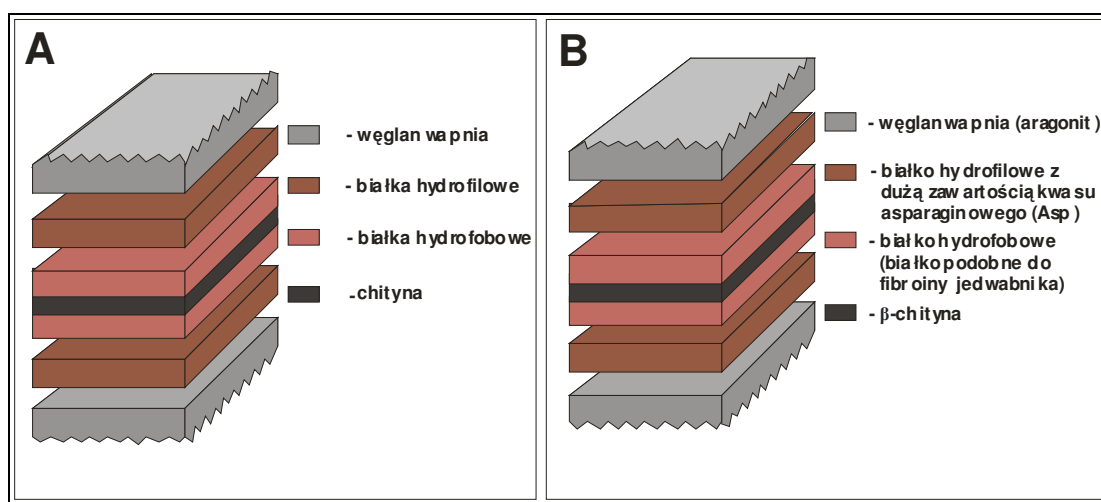
Sam proces biomineralizacji według wielu badaczy zależy w największym stopniu od poliamidów, glikoprotein, białek i ich pochodnych, które kontrolują i pomagają w nukleacji lub przeciwnie blokują procesy tworzenia się odpowiedniej formy krystalicznej minerału (Dauphin 2001; Belcher et al. 1996). Istnieją wskazówki, że inne od chityny polisacharydy mogą uczestniczyć aktywnie w nukleacji i przyroście kryształów.

Większość badań dowodzi, że proteiny lub glikoproteiny obecne w szkieletach mają charakter kwasowy (Weiner et al. 1983b; Crenshaw 1972; Weiner 1979; Weiner and Traub 1984) a polisacharydy zawierają głównie grupy sulfonowe i karboksylowe (Weiner 1986). Samo sprecyzowanie, które związki lub grupy związków indukują a które blokują nukleację i przyrost odpowiednich struktur wymaga bardzo dokładnych badań. W tym celu najpierw należałoby wykryć składniki chemiczne szkieletu (patrz rozdział 1.6) i ich rozmieszczenie a następnie można spróbować stworzyć model powstawania biominerału.

Uważa się, że sam proces tworzenia się minerałów w różnej formie jest serią procesów kontrolowanych chemicznie lub biochemicznie przez makromolekuły wymieniane w rozdziale 1.6.4 a znajdujące się w składzie tych minerałów. Chodzi tu głównie o proces strącania oraz krystalizacji, który przebiega w kilku etapach. Mann w swojej pracy (Mann 2001) przedstawia koncepcję krystalizacji biominerałów, która obejmuje rozpuszczanie się jonów tworzących minerał w rozpuszczalniku lub ich przechodzenie do rozpuszczalnika (w tym przypadku jakiś płyn ustrojowy organizmu żywego), przesylenie roztworu, nukleację kryształów (często nukleację zorientowaną – epitaksję) oraz przyrost kryształów. Dwa pierwsze procesy zależą głównie od iloczynu rozpuszczalności odpowiedniej soli tworzącej strukturę krystaliczną. Sama nukleacja i przyrost kryształów w odpowiednią formę polimorficzną są już bardziej skomplikowane w takim układzie jak żywy organizm.

Poruszając temat modeli biomineralizacji lub modeli ułożenia warstwowego w poszczególnych strukturach szkieletów trzeba wymienić te najbardziej popularne. **Rys. 10a**

przedstawia ułożenie warstw organicznych i nieorganicznych w strukturze perłowej słuchotki zaczerpnięte z pracy Kato (Kato 2000). Chityna według tego modelu pokryta jest warstwą hydrofobowego białka, do którego przyłącza się z kolei białko hydrofilowe tworząc kolejną warstwę. Ostatnia warstwa składa się ze skryształizowanego węgla wapnia. Dokładniejszą budowę tej samej warstwy w szkielecie słuchotki (Rys 10b) przedstawił Naka i Chujo (Naka and Chujo 2001). Podobny model dla struktury perłowej znajduje się w pracy Lowenstama i Weinera (Lowenstam and Weiner 1989) oraz Manna (Mann 2001).



Rys. 10 Ułożenie warstw w strukturze perłowej słuchotki. A- według Kato(Kato 2000), B- według Naka i Chujo (Naka and Chujo 2001).

Falini i in. (Falini et al. 1996) zaproponowali najbardziej wiarygodny model tworzenia się biominerałów. β -chityna posłużyła za szkielet konstrukcji, białko podobne do włókna jedwabnika (ang. silk-fibroin like protein) (Weiner and Traub 1980; Sudo et al. 1997) tworzyło warstwę pośrednią między hydrofobową chityną a roztworem zawierającym jony węglanowe i wapniowe oraz rozpuszczalne w wodzie makromolekuły kwasowe uzupełniające zestaw modelu (Crenshaw 1972; Weiner 1979; Weiner and Traub 1984; Nakahara et al. 1980). W doświadczeniu użyto makromolekuł wyekstrahowanych z części aragonitowej i kalcytowej szkieletów. Makromolekuły wyekstrahowane z kalcytowej warstwy indukowały w tym układzie powstawanie kalcytu a z aragonitowej aragonitu. Doświadczenie potwierdziło teorię, że makromolekuły kwasowe mają główny wpływ na powstawanie odpowiedniej formy polimorficznej kryształu.

Dotychczasowe badania pozwalają stwierdzić, że proteiny bogate w kwas asparaginowy powodują nukleację kryształów węglanu wapnia (Weiner 1979) a makromolekuły bogate w kwas glutaminowy pełnią rolę w stabilizacji amorficznego węglanu wapnia lub są raczej inhibitorami nukleacji jego formy krystalicznej (Aizenberg et al. 1996). Według Addadi i Weiner (Addadi and Weiner 1985, 1986) glikoproteiny kwasowe o strukturze β -kartki znajdujące się w szkieletach mięczaków są w stanie tak specyficznym współdziałać w roztworze z pewnymi warstwami zawierającymi np. dikarboksylany wapnia, że wywołuje to efekt steryczny powodujący tworzenie się specyficznej formy krystalicznej minerału.

Znane są badania pokazujące, że siarka głównie w formie siarczanów jest obecna w miejscu nukleacji kryształów (Wada 1980; Crenshaw and Ristedt 1975). Według Crenshawa i Reisteda (Crenshaw and Ristedt 1976) oraz Iwata (Iwata 1975) miejsca nukleacji zawierają materiał o dużej gęstości elektronowej, który wiąże wapń a matryca rozpuszczalna zawiera siarkę i mukopolisacharydy kwasowe. Crenshaw (Crenshaw 1982) uważa także, że to obecność polisacharydów posiadających grupę sulfonową przyłączoną do rdzenia białkowego posiada taką zdolność wiązania wapnia.

Sulfonowanym polisacharydom czasami przypisuje się bardziej efekt czynnika hamującego nukleację i przyrost kryształów niż katalizatora tego procesu (Chen and Boskey 1985). Addadi i in. (Addadi et al. 1987) zademonstrowali model, który potwierdza, że ligandy sulfonianowe i karboksylowe współdziałają przy kierunkowej nukleacji kalcytu.

Więcej szczegółów na temat biomineralizacji a szczególnie kontrolowanej nukleacji przedstawiono w pracy Nudelmana i in. (Nudelman et al. 2006). W swoich badaniach autorzy mapowali rozkład grup funkcyjnych na powierzchni pojedynczego kryształu (tabletki w strefie perłowej *Nautilusa*) za pomocą barwnego trawienia. Z ich pracy wynikało, że w samym środku tabletki znajduje się strefa bogata w grupy karboksylowe, która jest otoczona strefą bogatą w siarczany. Obie te strefy są również bogate w białka wywołujące nukleację aragonitu. Według autorów to właśnie połączone współdziałanie grup karboksylowych w pierwszym stadium i siarczanowych w drugim razem z odpowiednimi białkami przyczyniają się do nukleacji kryształów aragonitu w tym przypadku. W trzeciej strefie na całej długości przyrostu kryształu rozpoznano grupy karboksylowe w małym stężeniu a w strefie czwartej (ostatniej) na granicy między tabletkami grupy karboksylowe i siarczanowe zaangażowane w procesie kontrolowanej

krystalizacji Według autorów mogłoby to świadczyć, że po zbudowaniu kryształu związki te są po prostu wypierane na zewnątrz.

Rozpuszczalne w wodzie makromolekuły kwasowe (białka i/lub glikoproteiny) obecne w różnych warstwach szkieletów wymieniane przez wielu autorów (Crenshaw 1972; Weiner 1979; Weiner and Traub 1984; Nakahara et al. 1980; Hasse et al. 2000) mają bez wątpienia duży wpływ na proces tworzenia się biominerałów. Uważa się, że oddziałują one specyficznym z roztworem i na poziomie komórkowym przyczyniają się do nukleacji i wzrostu kryształów (Addadi et al. 1987) oraz są odpowiedzialne za tworzenie się konkretnej formy polimorficznej minerału (Hare 1963).

1.9. Wpływ temperatury otoczenia na stężenie niektórych pierwiastków obecnych w biominerałach i skamielinach. Rola jonów magnezowych w procesie powstawania aragonitu i kalcytu.

Badając wpływ środowiska na procesy biomineralizacji i fosylizacji należy uwzględnić zmieniający się w zależności od temperatury skład chemiczny szkieletów podczas ich tworzenia. Dotyczy to zawartości dwuwartościowych jonów metalicznych podstawiających wapń w strukturach aragonitu lub kalcytu. Bardzo ważne jest również rozstrzygnięcie, czy środowisko (np. temperatura wody) może wpływać na wielkość przyrostu warstw węglanowych szkieletu.

Próba oceny wpływu tych czynników powinna opierać się na precyzyjnym poznaniu składu pierwiastkowego szkieletów oraz ustaleniu stosunków zawartości tych pierwiastków do ilości wapnia - głównego składnika struktury. Użyteczność ustalonych stosunków będzie zależała od tego jak bardzo inne czynniki, takie jak zasolenie i zanieczyszczenie środowiska zewnętrznego oraz metabolizm organizmów wytwarzających dane szkielety wpływają na ich skład.

Stopień upakowania struktur kalcytowych i aragonitowych powoduje, że kationy o średnicy większej od wapnia wnikają chętniej w sieć aragonitową a o mniejszej w sieć kalcytową. W przypadku szkieletów aragonitowych należy oczekiwać w ich strukturze oprócz Ca domieszek Sr, Pb i Ba. Wszystkie te pierwiastki tworzą z węglanami minerały z tzw. grupy aragonitowej, charakteryzującej się strukturą krystaliczną o układzie rombowym, i tworzą odpowiednio aragonit, strontianit, cerusyt i wityryt (Frye 2002). Duże podobieństwo omawianych połączeń wpływa na większe prawdopodobieństwo zamiany w strukturach tych czterech pierwiastków. Wapń oraz pierwiastki o mniejszej średnicy, takie

jak Mg, Zn, Fe, Mn i Cd należą do grupy kalcytowej i tworzą kolejno kalcyt, magnezyt, smitsonit, syderyt, rodochrozyt i otavit (McCauley 2002) o układzie romboedrycznym (trygonalnym).

Wymienione minerały nie zawierające wapnia nie występują w szkieletach mięczaków, ale metale je tworzące łatwo wbudowują się w sieć krystaliczną aragonitu bądź kalcytu. W przypadku biominerałów tworzonych przez organizmy żywe należy brać pod uwagę tylko te pierwiastki, które z punktu widzenia biologii są najbardziej preferowane, dlatego w strukturach aragonitowych należy się spodziewać głównie domieszek Sr^{2+} a w kalcytowych - Mg^{2+} . Zmiany stężeń w szkieletach takich pierwiastków jak: Pb, Ba, i Cd należy przypisać poziomowi zanieczyszczeń w wodzie, a Mn i Fe poziomowi zmian diagenetycznych (Jiménez-Berrocso et al. 2004).

Wiele wskazuje na to, że badania chemiczne szkieletów złożonych z węglanów wapnia stworzonych przez organizmy żywe takie jak: korale, głowonogi i małże mogą być użyteczne w interpretacji zmian klimatycznych zachodzących w czasach współczesnych i prehistorycznych. Z naszego punktu widzenia najważniejszy jest poziom magnezu i strontu w próbkach i na tych dwóch pierwiastkach należy się skupić.

Wymiana jonów takich jak: Mg^{2+} , Sr^{2+} i Ca^{2+} między wodą morską i aragonitem w funkcji temperatury dla nieożywionych próbek została dokładnie przebadana i szczegółowo opisana przez Gaetaniego i Cohena (Gaetani and Cohen 2006). Informacje dotyczące wymiany tych jonów podczas formowania się aragonitu i kalcytu w biologicznych strukturach są jednak niepełne a często sprzeczne. Carre i in. (Carre et al. 2006) uważają, że parametry środowiskowe mają mały lub wręcz pomijalny wpływ na stężenie Sr i Mg w aragonitowych muszlach małż.

Niemniej jednak wielu autorów uważa, że pozostałości szkieletów mięczaków są dobrym materiałem do wiarygodnych badań środowiskowych i paleo-środowiskowych oraz dowodzi, że istnieje zależność między temperaturą, w której organizm rośnie i pierwiastkowym składem ich muszli (Freitas et al. 2006; Schifano 1982; Klein et al. 1996b; Wansard 1996). Jeszcze więcej badań jest poświęcono koralowcom i zależnościom ich składu pierwiastkowego od temperatury tworzenia (Beck et al. 1992; de Villiers et al. 1994; Linn et al. 1990; Mitsuguchi et al. 1996).

Biorąc pod uwagę wyniki analiz zawartości takich pierwiastków jak: Mg, Sr, Mn, U, B, Cd oraz izotopu tlenu ^{18}O w szkieletach węglanowych, takich jak korale (Sinclair et al. 1998; Mitsuguchi et al. 1996; de Villiers et al. 1995), szkielety belemnitów (Urey et al.

1951; McArthur et al. 2007; McArthur et al. 2000; Rexfort and Mutterlose 2006) i szkielety innych mięczaków (Rosenthal et al. 1997; Dwyer et al. 1995; Lear et al. 2000) ustalono zależności wiążące temperaturę powstawania szkieletów ze składem chemicznym próbek. Skład jest przy tym wyrażany jako stosunek molowy wymienionych pierwiastków do wapnia lub stosunek izotopów $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$. Omawiane zależności stają się wskaźnikami chemicznymi określającymi temperaturę powierzchniową morza (ang. *sea surface temperature* SST) oraz temperaturę głębin morskich (ang. *deep-water temperature*). Jeśli badaniu poddamy szkielety stworzeń kopalnych, to dodatkowo możemy spróbować ocenić zmieniające się warunki klimatyczne w czasach prehistorycznych, w których żyły wymienione stworzenia.

Do obliczeń temperaturowych w przypadku szkieletów kalcytowych zastosowano już wcześniej sugerowaną zależność molową Mg/Ca a aragonitowych - Sr/Ca (Klein et al. 1996a, 1996b; Klein et al. 1997).

Wiarygodne wydają się być rozważania dotyczące koralu. Mitsuguchi (Mitsuguchi et al. 1996) i Wei (Wei et al. 2000) wyprowadzili wzory liniowe do obliczenia temperatury wody (wzór II i III) na podstawie zmian zawartości magnezu w koralach

$$10^3 \text{ Mg/Ca} = 1,15 + 0,129 \cdot t(^{\circ}\text{C}) \quad (\text{II})$$

$$t(^{\circ}\text{C}) = (-14,13 \pm 0,31) + (8,846 \pm 0,068) \cdot 10^3 \text{ Mg/Ca} \quad (\text{III})$$

Analiza szkieletów różnych gatunków planktonu, doprowadziła do wyprowadzenia zależności temperaturowej wiążącej stosunek molowy Mg/Ca z temperaturą. Lear i in. (Lear et al. 2002) wyprowadzili wzór dla rodziny *Cibicidoides* – wzór IV a Rosenthal i in. (Rosenthal et al. 1997) dla gatunku *C. floridanus* – wzór V. Ogólnie są to wzory eksponentyjalne.

$$\text{Mg/Ca} = 0,867 \pm 0,049 \exp(0,109 \pm 0,007 \cdot t(^{\circ}\text{C})) \quad (\text{IV})$$

$$t(^{\circ}\text{C}) = 22,7 \log(\text{Mg/Ca}) - 3,05 \quad (\text{V})$$

Wansard w swojej pracy (Wansard 1996) wyprowadził zależność służącą do obliczania temperatury na podstawie zmian stosunku molowego Mg/Ca u ostrygi słodkowodnej *Cyprideis tornosa* (wzór VI).

$$t(^{\circ}\text{C}) = 3,3 + 1971 * (\text{Mg}/\text{Ca})_{\text{Cyprideis tornosa}} \quad (\text{VI})$$

a Dwyer (Dwyer et al. 1995), dla ostrygi z Pliocenu (ok. 47 tys. lat) (wzór VII).

$$t(^{\circ}\text{C}) = (0,854 * \text{Mg}/\text{Ca}) - 5,75 \quad (\text{VII})$$

Wszystkie przytoczone wzory dotyczą stosunku molowego Mg/Ca. Charakterystyczne jest, że mimo użycia tych samych parametrów, wzory te są rozbieżne. Jedne przedstawiają funkcje liniowe, inne eksponentjalne, a wyprowadzone stałe są zawsze różne. Problem wymaga prawdopodobnie szerszego zestawienia takich skal geochemicznych, porównania krzywych w pewnym zakresie parametrów i ustalenia, czy nie byłoby możliwe wprowadzenie krzywych uniwersalnych.

W badaniach szkieletów pojawiają się również takie zależności, jak $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ - zależne w głównym stopniu od procesów metabolicznych stworzenia (Rexfort and Mutterlose 2006), a także Ba/Ca i F/Ca które nie są jednak powiązane ze zmianami temperaturowymi podczas tworzenia się szkieletów (Rosenthal et al. 1997). Zależność zmian stosunku U/Ca w funkcji temperatury jest wątpliwa (Wei et al. 2000) a zależność Na/Ca uznawana jest za wskaźnik zasolenia wody (McArthur et al. 2007; Jiménez-Berrocoso et al. 2004; Rosales et al. 2004)

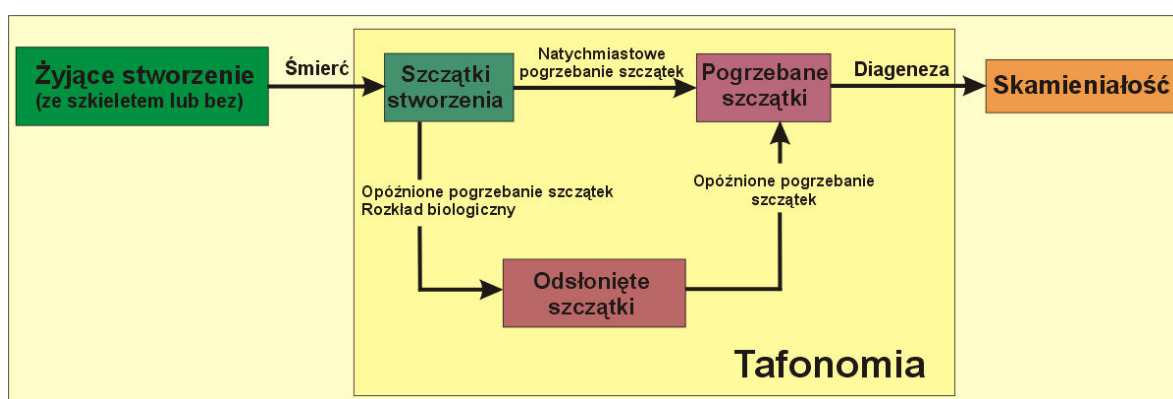
Kolejne zagadnienie, które należy poruszyć to wpływ stężenia dwuwartościowych kationów, takich jak Mg^{2+} i Sr^{2+} , w środowisku krystalizacji na zawartość tych pierwiastków w muszli.

Jednym z mechanizmów wybiórczego powstawania aragonitu, najczęściej sugerowanych przez autorów jest obecność w środowisku krystalizacji inhibitorów powstawania kalcytu (Levi et al. 1998) takich jak magnez. Obecność magnezu sprawia, że jony węglanowe i wapniowe budują sieć aragonitową (Weiss et al. 1976; Wilbur and Bernhardt 1984; Giles et al. 1995). Regulacja polimorfizmu kalcyt/aragonit zależy głównie od stężenia jonów magnezu w środowisku strącania i nukleacji (Weiss et al. 1976; Wilbur and Bernhardt 1984; Giles et al. 1995). Stosunek molowy Mg/Ca według wielu

naukowców (Falini et al. 1994; Davis et al. 2000; Wang et al. 1999) wpływa na nukleację i wzrost kryształu węglanu wapnia i decyduje, która forma polimorficzna węglanu powstanie. W wodzie morskiej, środowisku życia i miejscu tworzenia wapiennych szkieletów przez organizmy, stosunek molowy Mg/Ca większy niż 2 mmol/mol prowadzi do powstawania aragonitu a mniejszy niż 2 kalcytu (Stanley and Hardie 1998; Stolarski et al. 2007). Kitano i in. uważają, że graniczny stosunek molowy Mg/Ca wynosi 4 (Kitano and Hood 1962; Kitano et al. 1969). W geologii występują pojęcia „morze aragonitowe” i „morze kalcytowe”, które są związane z możliwością tworzenia przez organizmy morskie w takich morzach szkieletów wyłącznie aragonitowych lub wyłącznie kalcytowych.

1.10. Procesy fosylizacji zachodzące w próbkach. Diagenеза biomateriałów

Mówiąc o diagenезе lub procesie skamieniania należy najpierw wspomnieć o tafonomii, czyli nauce zajmującej się badaniem losu szczątków organicznych organizmów od chwili ich śmierci aż do powstawania pośmiertnych zespołów, które możemy obserwować w wykopaliskach w postaci różnych skamielin. Pojęcie tafonomii wprowadził do światowej nauki rosyjski naukowiec Efremov (Efremov 1940). Tafonomia bada wpływ czynników biologicznych (rozkład ciała, bioerozja, bioturbacja), fizycznych (transport, erozja mechaniczna) oraz chemicznych (diagenеза) na zachowanie się szczątków organicznych i ich fosylizację oraz powstawanie pośmiertnych zespołów – nekrocenoz (Raup and Stanley 1984). Na Rys. 11 możemy zobaczyć schemat blokowy zaczerpnięty z McRobertsa (McRoberts 1998) pokazujący etapy przemiany szczątków organizmów w skamielinę.



Rys. 11 Schemat blokowy przemiany szczątków stworzenia w skamielinę zaczerpnięty z McRoberts (McRoberts 1998).

W niniejszej pracy zwrócimy szczególną uwagę na proces fosylizacji, czyli jeden z ostatnich etapów występujących podczas przeobrażania się szczątków organizmów.

Proces skamienienia – fosylizacja jest sumą procesów chemicznych i fizycznych, którym ulegały martwe organizmy lub ich szczątki do przemiany w formę skamieniałą.

Fosylizacja zachodzi w wyniku procesów substytucji, czyli podstawienia materiału pierwotnie występującego w szczątkach przez składniki z otoczenia (środowiska występowania) próbki. Mamy do czynienia najczęściej z procesami:

- pirytyzacji,
- kalcytyzacji,
- sylifikacji,
- karbonizacji,
- dolomityzacji,
- fosforytyzacji.

Procesami, którym uległy próbki przez nas badane są: pirytyzacja, sylifikacja i kalcytyzacja, dlatego tylko one zostaną tutaj pobieżnie omówione.

W przypadku, gdy mamy do czynienia ze szczątkami, które już pierwotnie były mineralne lub częściowo mineralne proces skamienienia może dotyczyć podstawienia tylko części organicznej próbki przez otaczający składnik. Procesy fizyczne i chemiczne zachodzące na granicy próbka-środowisko mogą spowodować również, że mineralny składnik próbki pierwotnej ulegnie wymianie na inny. Możliwa jest tutaj również przemiana polimorficzna jednej odmiany minerału w drugi, bez zmiany składu chemicznego.

1.10.1. Pirytyzacja

Pirytyzacja, jedna z bardziej pospolitych form mineralizacji szczątków zwierzęcych (Hudson 1982; Strümer and Bergström 1973; Briggs et al. 1991) jest procesem zastępowania pierwotnej substancji chemicznej, budującej części twarde lub miękkie organizmu, przez piryt (FeS_2) w czasie fosylizacji (Ryka and Maliszewska 1982).

Piryt zwykle tworzy powłoki okrywające pierwotny materiał stworzeń bądź częściowo lub całkowicie podmienia ich pierwotnie twarde części. Tak jest w przypadku szkarłupni i trylobitów (Conway Morris 1986) oraz amonitów.

Pirytyzacja może zachodzić podczas rozkładu materii organicznej w beztlenowym i redukującym środowisku wodnym (Grimes et al. 2001). Według Rickarda powstawanie

pirytu może zachodzić poprzez reakcje siarczku żelaza z siarkowodorem (reakcja 1) wytwarzanym przez organizmy redukujące siarczany lub rozkładające związki organiczne zawierające siarkę, takie jak białka zawierające cysteinę i metioninę oraz polisacharydy zawierające grupę sulfonową (Rickard 1997).

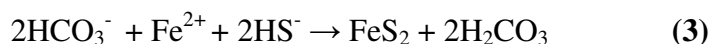


Według Goldhabera i in. (Goldhaber et al. 1977) oraz Raiswella i in. (Raiswell et al. 1993) pirytyzacja w szczątkach zwierzęcych zachodzi w dwóch etapach. Pierwszy polega na utlenieniu materii organicznej przez bakterie redukujące siarczany(VI) (występujące powszechnie w środowisku umarłego stworzenia) z wydzieleniem jonu HS^- (reakcja 2).



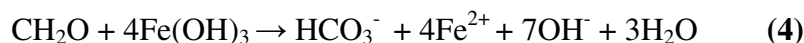
CH_2O – symboliczny wzór materii organicznej

a drugi na wytrąceniu disiarczku żelaza z powstałego jonu HS^- oraz jonów żelaza Fe^{2+} obecnych w środowisku (reakcja 3).



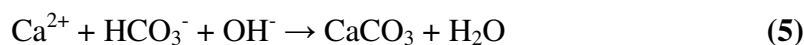
Zakłada się, że piryt podczas krystalizacji wytrąca się najpierw w postaci mikrokryształicznej a następnie przechodzi w postać framboidalną lub polikryształiczną (Sawłowicz 2000; Garcia-Guinea and Martinez-Frias 1998)

Jony żelaza Fe^{2+} powstają w wyniku sprzężonej reakcji redukcji Fe(III) i utlenienia węgla organicznego (reakcja 4) lub wodoru wydzielającego się w warunkach beztlenowych podczas rozkładu materii organicznej (Nealson and Saffarini 1994) przez bakterie (Lovley 1991).



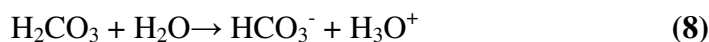
1.10.2. Kalcytyzacja

Proces kalcytyzacji polega na mineralizacji szczątków z utworzeniem krystalicznego węglanu wapnia w postaci aragonitu, kalcytu lub wysoko-magnezowego kalcytu (reakcje 5 i 6).

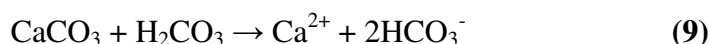


Głównymi czynnikami determinującymi proces kalcytyzacji jest stężenie jonów wapnia, ciśnienie cząstkowe tlenku węgla (IV), pH oraz temperatura otaczającego środowiska. Wszystkie wymienione warunki są ze sobą powiązane. Generalnie cały proces kalcytyzacji wiąże się z obiegiem dwutlenku węgla (system kwasu węglowego (Frisia 2000)) i wapnia w przyrodzie.

Obecność jonów HCO_3^- w środowisku krystalizacji węglanów wapnia i magnezu jest związana z rozpuszczaniem tlenku węgla (IV) w wodzie i dysocjacja kwasu węglowego (reakcje 7 i 8).

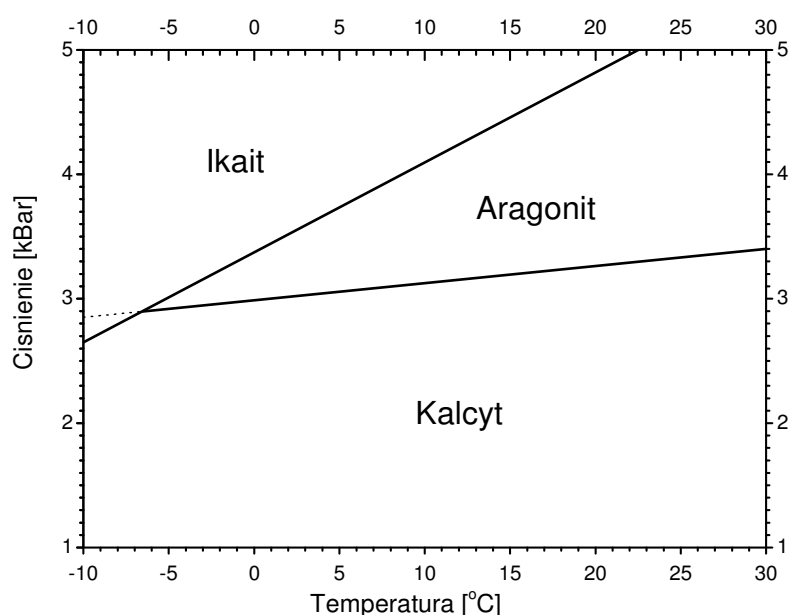


Słaby kwas węglowy jest bardzo ważnym czynnikiem kontrolującym rozpuszczalność minerałów węglanowych w środowisku naturalnym. Rozkład materii organicznej powoduje zwiększenie produkcji dwutlenku węgla, który dobrze rozpuszcza się w wodzie z utworzeniem kwasu węglowego. Zwiększenie aktywności kwasu węglowego powoduje z kolei zwiększenie rozpuszczalności utworzonego węglanu wapnia (reakcja 9)



Jony wapnia i magnezu biorące udział w krystalizacji pochodzą zwykle z rozkładu twardych części stworzeń takich jak szkielety oraz kości. Duże ilości wapnia i magnezu znajdują się również w częściach miękkich organizmów i podczas ich rozkładu przechodzą do środowiska reakcji.

W tym miejscu należałoby omówić jeszcze przemiany polimorficzne, jakie mogą zachodzić w węglanach wapnia podczas kalcytyzacji. Szkielety morskie najczęściej zbudowane z aragonitu lub wysoko-magnezowego kalcytu w warunkach panujących naturalnie w litosferze szybko ulegają przemianom w kalcyt. Rys. 12 przedstawia diagram fazowy węglanu wapnia zaczerpnięty z Dzika (Dzik 2003). Należy dodać, że przemianie tej sprzyja również obecność słodkiej wody o małej zawartości magnezu.



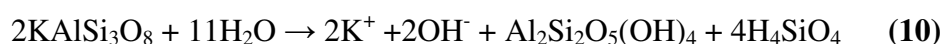
Rys. 12 Wykres faz krystalicznych węglanu wapnia zaczerpnięty z Dzika (Dzik 2003).

1.10.3. Sylifikacja

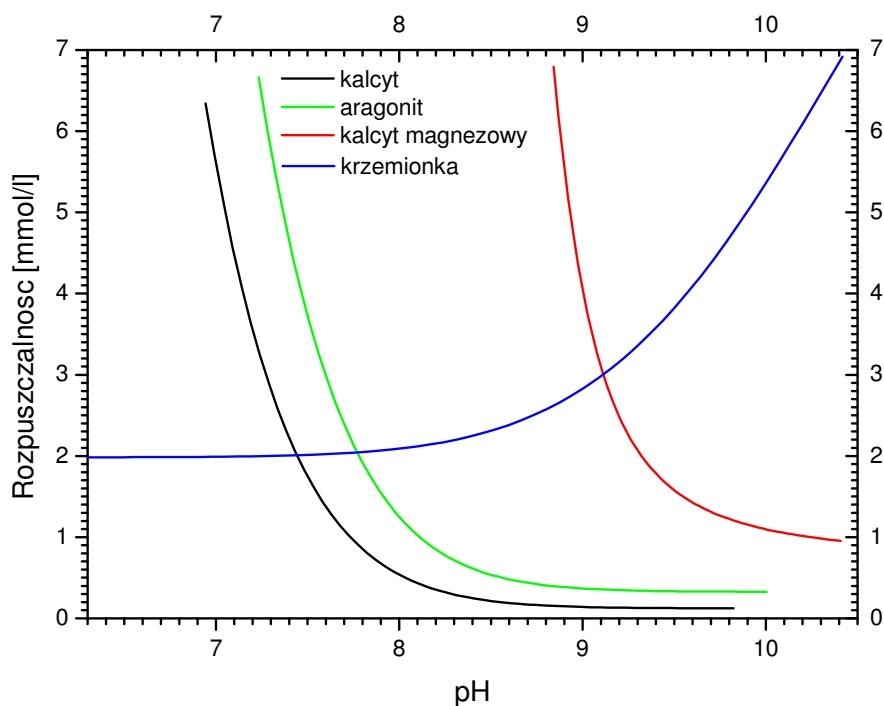
Sylifikacja, czyli skrzemionkowanie lub skrzemienie w przypadku skał osadowych jest to proces polegający na przenikaniu roztworu krzemionki do wolnych przestrzeni w skale drobnoziarnistej, np. wapieniach lub do szczątków organicznych, np. drewna, szkieletów mięczaków itp. Sylifikacja może się odbywać albo przez strącanie się krzemionki w porach skały lub jakiś pozostałości paleontologicznych, np. szkieletów, lub dzięki całkowitemu wyparciu pierwotnego materiału i zastąpieniu go krzemionką. Sylifikacja jest najczęstszą formą skamieniania ze względu na powszechne występowanie Si w środowisku (Kolditz 1994). Duża odporność mechaniczna i chemiczna struktur krzemionkowych również sprzyja zachowaniu się krzemionek w strukturze skamielin (Liber-Madziarz and Teisseyre 2000).

Obecność grup hydroksylowych w strukturze zhydrolizowanej krzemionki również ułatwia tworzenie wiązań z hydrofilowymi polimerami występującymi w naturalnych materiałach (Legrand 1999). Wysyceniu materiału krzemionką sprzyja wysoka temperatura, duża wilgotność, osady bogate w krzemionkę i wodę oraz niskie pH otoczenia. Źródłem krzemionki uczestniczącej w procesie sylifikacji mogą być: zwietrzały materiał wulkaniczny (Siever 1957), woda morską, wietrzejące skalenie i biotyt (Krauskopf and Bird 1999).

Uwalniane w wyniku różnych procesów chemicznych kwasy humusowe i dwutlenek węgla powodowały lokalne obniżenie się pH poniżej 7 i warunkowały wytracanie się koloidalnej krzemionki z bogatych w nią roztworów. W wyjątkowych przypadkach kwasy i gazy organiczne mogły powodować wietrzenie skaleni i biotyty oraz ich przekształcenie w materiały ilaste. Skutkiem tego było uwolnienie krzemionki lub kwasów krzemowych jonów potasu i nieuwzględnionych w uproszczonym równaniu (reakcja 10) węglanów, tlenków i wodorotlenków żelaza i manganu (Krauskopf and Bird 1999). Glin oraz inne kationy trójwartościowe ograniczają stopień rozpuszczania krzemionki poprzez zwiększenie jej koagulacji. Koloidalna krzemionka strąca się, przy śladowych ilościach jonów glinu (Okamoto et al. 1957)



Omawiając procesy kalcytyzacji i sylikfikacji należy również zwrócić uwagę na wzajemne przenikanie się krzemionki i węglanów wapnia w próbkach skamielin. Zjawisko jest to spowodowane zmieniającym się odczynem środowiska.



Rys. 13 Zmiany rozpuszczalności kalcytu, aragonitu, wysoko-magnezowego kalcytu i krzemionki w zależności od pH środowiska. Wykres zaczerpnięty z Dzika (Dzik 2003).

Rys. 13 zaczerpnięty z Dzika (Dzik 2003) przedstawia zmiany rozpuszczalności aragonitu, kalcytu, wysoko-magnezowego kalcytu i krzemionki w zależności od pH otoczenia. Widać, że zmiana pH w kierunku zasadowym powoduje zwiększenie rozpuszczalności krzemionki a kwasowym rozpuszczalności węglanów.

Konsekwencją tego jest duże zanieczyszczenie węglanami próbek pierwotnie krzemionkowych i odwrotnie duże zanieczyszczenie krzemem próbek węglanowych.

2. Cele pracy doktorskiej

Głównym celem niniejszej pracy jest określenie składu chemicznego oraz struktury w skali mikro i makro biomateriału - wewnętrznego szkieletu *Sepia Officinalis* (L) oraz skamielin węglanowych - rostrów belemnitów: *Hibolites sp.*, *Belemnella sp.* i *Belemnitella sp.* Oraz muszli amonitu *Kosmoceras duncani*. Pełna identyfikacja składu oraz ustalenie rozmieszczenia w badanych materiałach związków nieorganicznych i organicznych pozwoli w przyszłości na syntezę podobnych kompozytowych struktur zachowujących jednocześnie chemiczne i fizyczne cechy oryginału albo struktur zmodyfikowanych o ulepszonych i z góry zdefiniowanych właściwościach. Ponadto informacje o rozkładzie chemicznym pierwiastków w skamielinach mogą być wykorzystywane do odtwarzania warunków paleośrodowiska i tworzenia oraz weryfikowania skal paleo-temperaturowych.

Celem niniejszej pracy jest również optymalizacja warunków analizy badanych próbek, wypracowanie metodologii oraz ocena możliwości i ograniczeń poszczególnych metod mikro-analitycznych przy analizie materiałów kompozytowych pochodzenia naturalnego. Jest to problem bynajmniej nie trywialny, ponieważ ze względu na ograniczenia aparaturowe wiele podobnych materiałów jest słabo poznanych.

3. Część doświadczalna

3.1. Opis próbek

3.1.1. Pochodzenie badanych próbek

Próbki szkieletów mątwy zwyczajnej

Mątwą zwyczajną (*Sepia Officinalis*) zasiedla obszary wód morskich u wybrzeży europejskich i afrykańskich (Rys. 14a) (www.fao.org). Próbki szkieletów mątw badane w niniejszej pracy zostały pozyskane z okazów złowionych na Morzu Śródziemnym u wybrzeży Półwyspu Iberyjskiego na południe od Barcelony (Hiszpania) (Rys. 14b)

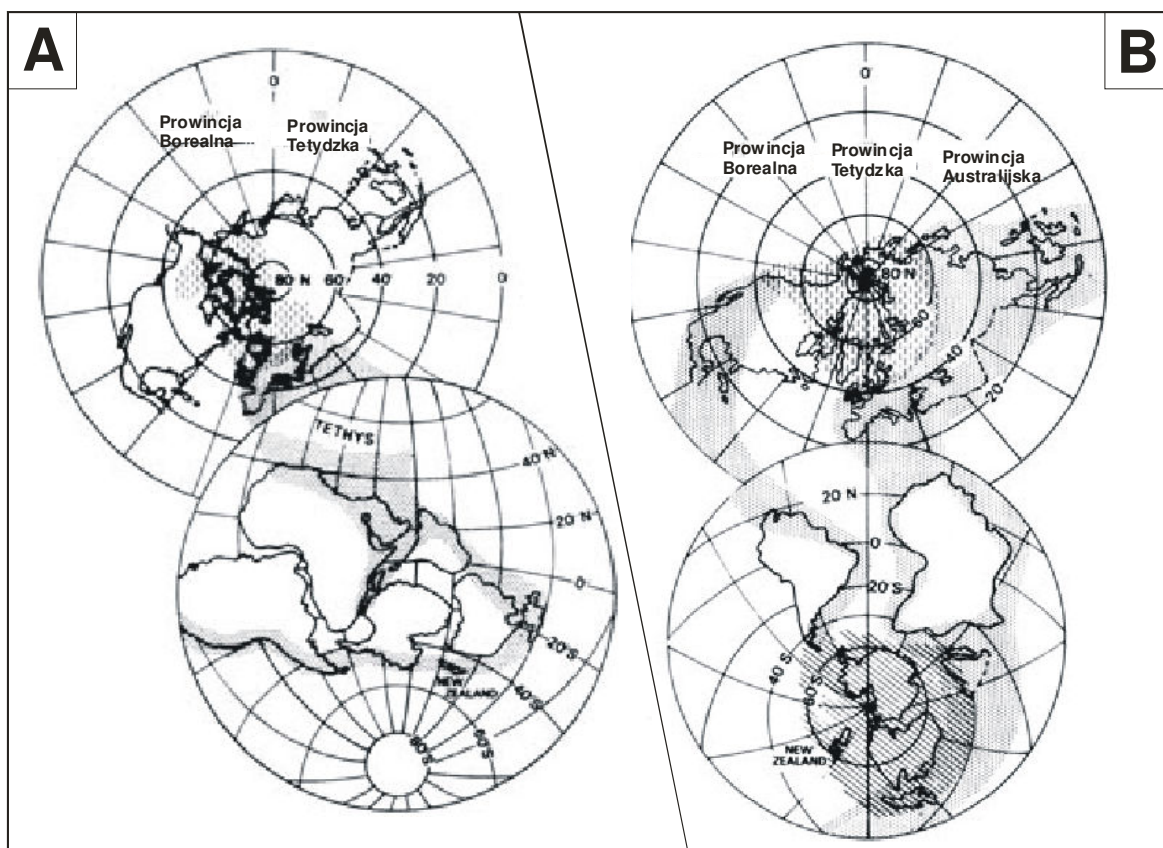


Rys. 14 Obszary występowania mątwy zwyczajnej (*Sepia Officinalis*) w wodach europejskich zaznaczone kolorem czerwonym (www.fao.org) (a) oraz miejsce, z którego pochodzą próbki badane w niniejszej pracy (b).

Próbki skamieniałości. Rostra belemnitów i muszle amonitów

Największe populacje belemnitów przypadają na okres Jury i Kredy (Tab. 1). W tych czasach ląd był podzielony na dwa obszary Gondwany i Laurazji. Przesuwanie się kontynentów powodowało stopniową migrację żyjących przybrzeżnie mięczaków. Skutkiem tego jest występowanie skamielin - pozostałości m. in. belemnitów i amonitów na różnych szerokościach geograficznych. Rys. 15 przedstawia mapy obszarów występowania belemnitów w okresie Jury (Rys. 15a) oraz Kredy (Rys. 15b). Występującą w Jurze faunę podzielono na zimnolubną Prowincję Borealną (ang. *Boreal Realm*)

obejmującą północne regiony półkuli północnej oraz ciepłolubną Prowincję Tetydzką (ang. *Tethyan Realm*) obejmującą resztę świata. W kredzie pojawiła się kolejna prowincja (ang. *Austral Realm*).



Rys. 15 Relacje pomiędzy prowincjami belemnitów: A) kimerydyjskich (Jura Późna – ok. 155,7 (± 4,0) mil. lat; B) aptyjsko-albijskich (wczesna Kreda – ok. 125 – 112 mil. lat) zgrupowanymi na obszarach Gondwany i Laurazji według Stevensa (Stevens 1971, 1973).

Występowanie amonitów było analogiczne do belemnitów w Okresie Jury i Kredy. Próbkę występującą w Polsce i w Europie Środkowo-wschodniej ciężko sklasyfikować do konkretnej prowincji, ponieważ obszary te znajdują się na pograniczu strefy borealnej i tetydzkiej.

Próbki badane przeze mnie w niniejszej pracy pochodzą z trzech regionów. Z Jury Krakowsko-Częstochowskiej, z Pogórza Roztoczańskiego i z Kasimowa (okolice Riazania, Rosja). Do analizy wybrano rostra pochodzące z 3-ch gatunków belemnitów:

- *Hibolites*,
- *Belemnitella*,
- *Belemnella*,

oraz muszle amonitów z gatunku:

- *Kosmoceras duncan*.

Próbka rostrum belemnitu *Hibolites sp.* została uzyskana z osadu z wieku Oxfordu (154–157 mil lat temu) z diagenetycznie zanieczyszczonych skał wapiennych z Jury Krakowsko – Częstochowskiej. Część rostrum z tej lokalizacji uległo częściowej sylifikacji. Próbka rostrum belemnitu *Belemnitella sp.* również pochodzi z Jury Krakowsko-Częstochowskiej, ale z osadu pochodzącego z wieku Kelowej (ok. 164 ± 4 mil. lat temu). Próbka rostrum belemnitu *Belemnella sp.* pochodzi z Pogórza Roztoczańskiego (okolice Zwierzyńca) z okresu Późnej Kredy, wieku Kampan (ok. $83,5 \pm 0,7$ mil lat temu) z osadów kredowych. Próbka muszli amonitu *Kosmoceras duncani* pochodzi z Kasimova. Jej wiek jest datowany na ok. 161-164 mil lat i pochodzi z wieku Kelowej (Jura Środkowa).

3.1.2. Metodyka przygotowania próbek do analizy

Próbki szkieletów *Sepia Officinalis*.

Szkielety wewnętrzne mątw zostały wycięte z ciała stworzenia i bardzo intensywnie wymyte najpierw w wodzie destylowanej, potem wypłukane kolejno w 2% roztworze chloranu (I) sodu i po raz drugi w wodzie destylowanej. Całe próbki szkieletów zostały następnie wysuszone na powietrzu i pocięte prostopadle do linii osi szkieletów w cienkie plastry o grubości ok. 2mm, z których wycinano graniastosłupy o różnych rozmiarach do pomiarów mikro-analitycznych oraz obserwacji mikroskopowej.

Próbki do termicznej analizy grawimetrycznej i proszkowej analizy dyfrakcyjnej (XRD) zostały przygotowane poprzez sproszkowanie wysuszonych fragmentów szkieletów w moździerzu. Bezpośrednio przed analizą termiczną w celu pozbycia się wilgoci sproszkowane próbki zostały jeszcze raz wysuszone tym razem w suszarce w temperaturze 40°C przez 2 h. Do analizy dyfrakcyjnej, której celem była ocena orientacji krystalitów w płaszczyźnie prostopadłej i równoległej do płaszczyzny przegród (ang. Septum) przygotowano próbki ze strefy brzusznej o rozmiarach ok. $10 \times 10 \times 5 \text{ mm}^3$, odsłaniające poszczególne płaszczyzny.

Przed analizą elementarną FAAS i ICP-AES sproszkowane próbki szkieletu mątwy zostały poddane mineralizacji. Mineralizacje wykonano roztwarzając 1 g próbki najpierw w 5 cm^3 stężonego kwasu azotowego. Następnie odparowano tlenki azotu i rozpuszczono próbki w 2M kwasie solnym. Tak zmineralizowane próbki przeniesiono ilościowo do kolb miarowych o pojemności 100 cm^3 i rozcieńczono wodą dejonizowaną. W każdym przypadku wykonano ślełą próbę.

Próbki do spektrofotometrycznej analizy w podczerwieni (FTIR) metodą transmisyjną zostały przygotowane w postaci przezroczystych pastylek o średnicy 16mm. Sproszkowaną próbkę o masie 5mg wymieszano dokładnie z 250g bromku potasu i całość sprasowano w specjalnej prasie.

Analizy mikroanalityczne z zastosowaniem sondy elektronowej, sondy protonowej i sondy ramanowskiej wykonano dla próbek o rozmiarach 2x5x5 mm wyciętych skalpelem ze strefy brzusznej szkieletu.

W przypadku analiz EPMA i PIXE próbki zostały przed pomiarem przyklejone do stolika pomiarowego. Do pomiaru mikro-ramanowskiego i pomiaru pod mikroskopem IR wystarczyło położenie próbki na szkiełku mikroskopowym. Ponieważ próbki szkieletu wycinano tuż przed pomiarem nie wykonywano żadnych dodatkowych operacji w celu oczyszczania przygotowanych płaszczyzn. Próbki mątwy nie były szlifowane przed pomiarem, ponieważ są porowate i bardzo kruche po przecięciu.

Zdjęcia za pomocą elektronów wstecznie rozproszonych od próbek przekroju szkieletu sepii zostały wykonane na dwa różne sposoby. Próbkę nie poddawaną analizie elementarnej pokryto grafitem. Próbka, która była analizowana na zawartość węgla nie była powlekana żadną warstwą przewodzącą.

Próbki skamielin belemnitów i amonitów

Próbki skamielin belemnitów i amonitów do mikroanaliz przy pomocy sond i obserwacji mikroskopowych przygotowano w postaci uniwersalnych preparatów polerowanych wzorując się na preparatyce opracowanej dla nieprzezroczystych minerałów i skał (Bolewski and Żabiński 1979). Próbki rostrów belemnitów zostały uzyskane poprzez wycięcie wąskich plastrów o grubości ok. 2mm z części *rostrum solidum* kilka milimetrów za stożkowym wgłębieniem (ang. *alveolus*) zawierającym części komorowe szkieletu (fragmakon). Próbki cięto prostopadłe do linii czołowej (ang. *apical line*) szkieletów. Zależnie od egzemplarza do pomiarów mikroanalitycznych trafiły próbki o średnicy od 6÷16mm. Do obserwacji mikroskopowej i analiz pobierano także fragmenty *rostrum cavum* belemnitu również przecięte poprzecznie do swojej osi. Dla próbek amonitów przygotowano zgłady w podobny sposób. Uzyskano w ten sposób cienkie plasterki o grubości ok. 2 mm równoległe oraz prostopadłe do płaszczyzny symetrii muszli amonitu. Próbka wycięta równoległe do płaszczyzny symetrii pozwoliła na analizę przegród i ścianki zewnętrznej muszli, a prostopadłe tylko na analizę ścianki zewnętrznej muszli.

Niektóre próbki belemnitów oraz amonitów po przecięciu poddano również szlifowaniu z zastosowaniem tlenku cyrkonu lub tlenku krzemu.

Próbki belemnitów i amonitów przeznaczone do proszkowej analizy dyfrakcyjnej (XRD) oraz analizy termo-grawimetrycznej i dalszej obróbki zostały zmielone w młynku automatycznym MM200 z komora cyrkonową firmy Retsch. Po każdej operacji mielenia komorę młynku czyszczono dwutlenkiem krzemu cz.d.a.

Próbki skamieniałości do analizy spektrofotometrycznej w podczerwieni przygotowano analogicznie jak próbki sepii, w postaci przezroczystych pastylek.

Mineralizacje próbek belemnitów poddanych analizie AAS wykonano stosując recepturę Pinty (Pinta 1977) z zastosowaniem stężonych kwasów siarkowego, azotowego i solnego. Metoda ta pozwoliła na wydzielenie i separację nierozpuszczalnej krzemionki z próbek. Do mineralizacji pobierano próbki o masie 1g.

3.2. Metody analityczne i aparatura pomiarowa

W moich badaniach skupiłem się głównie na dokładnym poznaniu składu i mikrostruktury szkieletów. W tym celu przeprowadziłem szereg obserwacji mikroskopowych oraz analiz chemicznych oraz fizykochemicznych. Były to:

1. Obserwacje za pomocą stereoskopowych mikroskopów optycznych oraz mikroskopów elektronowych.
2. Analizy ilościowe pierwiastków przeprowadzone za pomocą absorpcyjnego spektrometru atomowego z atomizacją pierwiastków przy pomocy palnika acetylenowo-tlenowego (FAAS) oraz spektrometru emisyjnego ze wzbudzeniem plazmowym (ICP-AES).
3. Analizy mikro-rozmoszczenia pierwiastków (tzw. skany liniowe i mapy rozkładu) w próbkach a równocześnie analizy półilościowe pierwiastków przeprowadzone za pomocą skaningowego mikroskopu elektronowego metodą EPMA.
4. Analizy rozmieszczenia pierwiastków za pomocą metod, w których zastosowano różne wiązki do wzbudzenia promieniowania charakterystycznego pierwiastków. Zastosowano metody z użyciem promieniowania synchrotronowego (SRIXE), promieniowania rentgenowskiego z lampy molibdenowej (XRF), oraz wiązki protonów (PIXE).
5. Analizy jakościowe, których celem było wykrycie i identyfikacja związków organicznych obecnych w badanych próbkach z wykorzystaniem spektrofotometrii w podczerwieni z zastosowaniem transformacji Fouriera (FTIR) oraz spektrometrii Ramana.
6. Analizy mikro-rozmoszczenia związków chemicznych z zastosowaniem spektrometrii Ramana. Mapy rozkładu wykonano na podstawie pików charakterystycznych dla grup funkcyjnych obecnych w związkach znajdujących się w próbkach. Analizy ilościowe z zastosowaniem termowagi.
7. Analizy ilościowe z zastosowaniem analizatora pierwiastków tworzących związki lotne (CHN).
8. Analizy strukturalne próbek za pomocą dyfraktometrii rentgenowskiej (XRD) oraz spektrometrii Ramana i spektrofotometrii w podczerwieni.

3.2.1. Mikroskopia optyczna

Obserwacja optyczna próbek prowadzona przy pomocy mikroskopów optycznych była zwykle pierwszym etapem analizy biomateriałów i skamielin. Dzięki zastosowaniu dużych powiększeń mogłem dokładnie wybrać interesujące i reprezentatywne fragmenty próbek przed wykonaniem analizy chemicznej. Dla badanych fragmentów próbek obserwowanych przez mikroskop często stosowałem zestawienia wyników chemicznych z morfologią, czyli wyglądem zewnętrznym próbek. Wstępna obserwację badanych próbek oraz wykonanie zdjęć w powiększeniu było możliwe dzięki zastosowaniu:

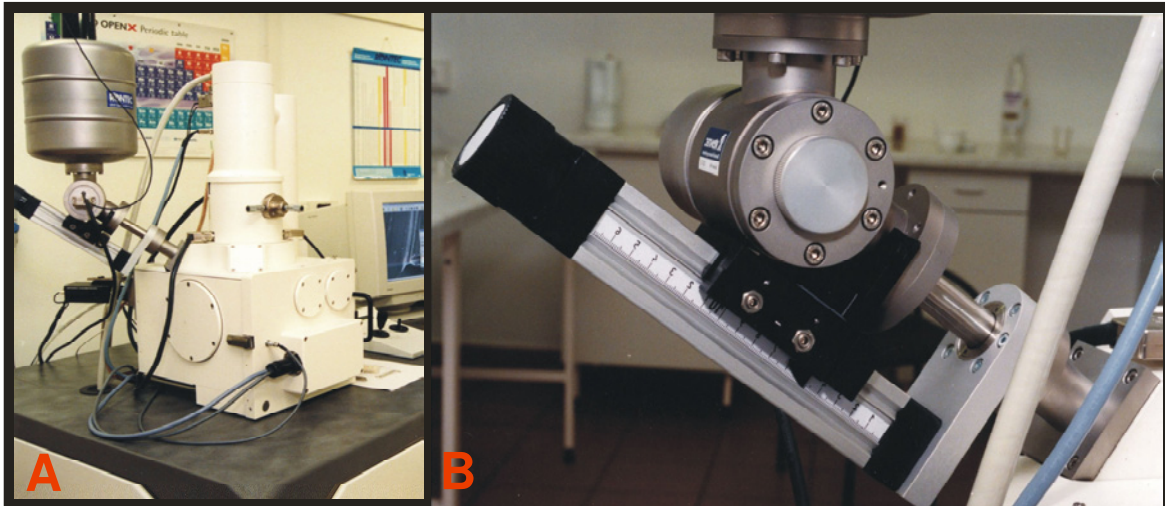
- stereoskopowego mikroskopu optycznego MSZ2000T z dołączonym aparatem cyfrowym Nikon Coolpix 4500, mikroskop był wyposażony w oświetlacz światłowodowy dwuramienny,
- stereoskopowego mikroskopu optycznego marki Leica sprzężonego ze spektrometrem ramanowskim inVia (Renishaw),
- stereoskopowego mikroskopu optycznego Eclipse 50i marki Nikon sprzężonego z kamerą CCD DS-2MBWc.

Do analizy zdjęć wykorzystano program analizy obrazu Micro Image 4.0 (Media Cybernetics). Do obróbki i nakładania warstw wykorzystano program Paint Shop Pro 7.0 (Jasc Software Inc.).

Żeby ocenić stopień zanieczyszczenia próbek przez materię organiczną w niektórych przypadkach stosowano do obserwacji mikroskopowej światło UV, wywołujące luminescencję próbek bądź filtry usuwające ze światła białego niektóre zakresy długości fal, między innymi światło czerwone i niebieskie.

3.2.2. Mikroskopia elektronowa

Obserwacja próbek za pomocą mikroskopu elektronowego również należała do standardowo przez mnie stosowanych metod wstępnej oceny próbek. Zdjęcia mikroskopowe uzyskane w wyniku rejestracji elektronów wstecznie rozproszonych od próbek zostały wykonane przy pomocy skaningowego mikroskopu elektronowego (SEM) LEO 1430 VP (Leo, Austria) z detektorem wstecznie rozproszonych elektronów – QBSD (Leo) w pracowni mikroskopii skaningowej Katolickiego Uniwersytetu Lubelskiego Jana Pawła II. Na zdjęciu (Rys. 16) jest zaprezentowany widok zewnętrzny tego mikroskopu.



Rys. 16 Skaningowy mikroskop elektronowy Leo 1430 VP. A) Komora pomiarowa wraz z oprzyrządowaniem. B) Detektor EDS Röntec Si(Li) dołączony do urządzenia.

Zdjęcia próbek amonitów wykonano za pomocą skaningowego mikroskopu elektronowego HITACHI S-4000 w pracowni Instytutu Nauk Geologicznych, Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie.

3.2.3. Metody oparte na wzbudzeniu i detekcji charakterystycznego promieniowania rentgenowskiego pierwiastków

Metody analityczne oparte na wywołaniu i detekcji charakterystycznego promieniowania rentgenowskiego pierwiastków mogą nam dostarczyć informacji zarówno ilościowych, jaki i jakościowych. Efekt w postaci emisji wtórnego promieniowania rentgenowskiego może być wywołany poprzez bombardowanie próbek naładowanymi cząstkami elementarnymi (elektrony, protony), jonami lub wysokoenergetycznymi fotonami (promieniowanie X i γ). Zależnie od stosowanej wiązki możemy metody stosowane w niniejszej pracy podzielić na:

- analizę z zastosowaniem wiązki elektronów (EPMA - ang. Electron Probe Microanalysis),
- analizę z zastosowaniem wiązki rentgenowskiej wygenerowanej w synchrotronie (SRIXE – Synchrotron Radiation Induced X-ray Emission),
- analizę z zastosowaniem wiązki rentgenowskiej emitowanej przez lampę rentgenowską (XRF – ang. X-Ray Fluorescence),
- analizę z zastosowaniem wiązki protonów (PIXE – ang. Proton Induced X-ray Emission).

Dzięki zaawansowanym technikom skupiania wiązek wzbudzających mamy możliwość uzyskania wiązek nawet o średnicy poniżej 1 μ m. W takich przypadkach pomiary przeprowadza się dla mikrometrycznych fragmentów próbek. Dodatkowo zastosowanie stolika mikrometrycznego sprzężonego z urządzeniem pozwala zmieniać w trakcie pomiarów położenie próbki przynajmniej w dwóch kierunkach xy. W ten sposób stwarza się możliwość analizy rozmieszczenia pierwiastków w próbce. Urządzenia w ten sposób wykonane możemy zastosować jako tzw. sondy pomiarowe a wymienione metody opisywać z przedrostkiem mikro jako μ -SRIFE, μ -XRF, μ -PIXE. Należy podkreślić istotne różnice w dynamicznych analizach z użyciem wymienionych wiązek wzbudzających. O ile dla wiązek elektronów i protonów można stosować układy odchylające oparte na optyce elektromagnetycznej (a opcjonalnie stosować ruchomy stolik przy wiązce nieruchomej), to dla wiązek mikro-rentgenowskich nie ma wyboru i musimy korzystać wyłącznie z ruchomego stolika.

Zastosowanie sond w niniejszej pracy podyktowane było ich bardzo dużą skutecznością przy badaniu wszelkich materiałów biologicznych (Török et al. 1998; Müller et al. 2002; Hryniewicz and Rokita 1999) i skamielin (Nowak et al. 2005). Zależnie od próbek, a konkretnie od lokalizacji pierwiastków w próbkach, wybieramy do pomiarów analizę punktową, gdy próbka jest jednorodna, skan liniowy w przypadku, gdy widoczne są zmiany w jednym kierunku próbki, np. radialne zmiany w postaci pierścieni na przekroju poprzecznym w belemnitach oraz ścianki i przegrody obecne w muszli amonitów. Opcja mapowanie była wybierana, gdy mieliśmy do czynienia z próbkami o dwuwymiarowym rozkładzie pierwiastków lub, gdy chcieliśmy szczególnie uwypuklić różnice w budowie materiału. W przypadku analizy szkieletu mątwy wykonano również analizę trójwymiarowego rozkładu pierwiastków wykrytych w próbkach.

Mikroanaliza z zastosowaniem sondy elektronowej (EPMA)

Analiza pierwiastków i ich rozmieszczenia w próbce została wykonana z użyciem mikrosondy elektronowej (ang. EPMA – Electron Probe Microanalysis) LEO 1430 VP, (pracownia KUL) wyposażonej w detektor EDS Röntec Si(Li), z rozdzielczością energii 180 eV, mierzonej dla linii MnK α . Aparat umożliwia uzyskanie energii wiązki od 15 do 25 keV. Rozdzielczość: względem osi x, y maksymalna 3 nm, średnica wiązki elektronów 1 μ m. Maksymalne powiększenie próbki 600000 X. Analizy przeprowadzono w próżni. Do lepszego odprowadzenia ładunku z powierzchni próbek, zalecanego szczególnie do badania próbek nieprzewodzących (Watt 1985) zastosowano folię przewodzącą firmy Agar

Scientific. Przy pomiarach napięcie przyspieszające zostało ustawione na 20 keV a natężenie 0,7 nA. Parametry pracy mikrosondy optymalizowaliśmy w ten sposób, aby możliwa była detekcja możliwie największej ilości pierwiastków w próbkach a szczególnie pierwiastków lekkich - węgla i tlenu - niemożliwych do wykrycia za pomocą innych sond powodujących emisję charakterystycznego promieniowania X. Głównym parametrem, który zmieniano podczas analizy był czas pomiaru przypadający na analizowany punkt.

Do pomiaru próbek szkieletu sepii (przekrój poprzeczny) wybrano opcję mapowania dla wszystkich wcześniej wykrytych w analizie wstępnej pierwiastków, czyli dla Br, Na, C, Ca, Fe, Sr, P, S, Al, Cl, K i Mg. Pomiarów wykonano dla kilku reprezentatywnych fragmentów próbki. W celach porównawczych rejestrowano obraz próbki uzyskany za pomocą elektronów wstecznie rozproszonych tych miejsc, dla których przeprowadzono analizę rozkładu pierwiastków. Do graficznej obróbki wyników wykorzystano program Micro Image 4.0.

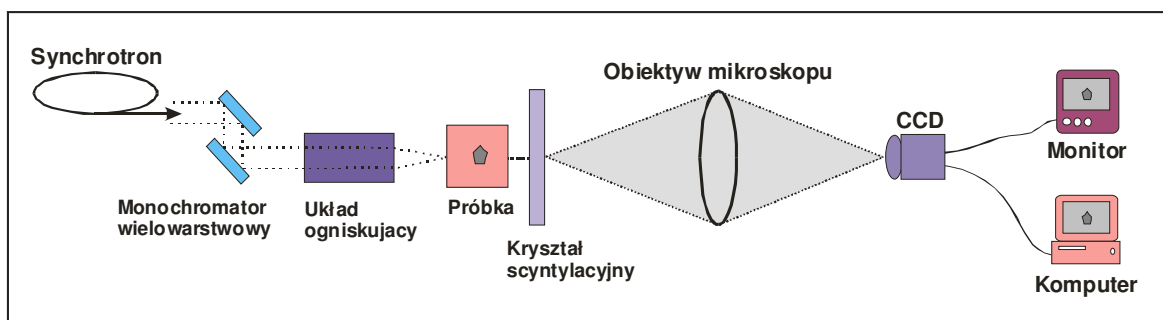
W przypadku próbek belemnitów parametry pomiaru zoptymalizowano tak, aby uzyskać możliwie największą ilość pierwiastków ze szczególnym uwzględnieniem pierwiastków lekkich, których nie można wykrywać za pomocą innych sond. Natężenie prądu wiązki ustawiono na 0,7 nA. Do analizy belemnitu została wybrana opcja skanu liniowego, ze względu na symetrię kołową próbek. Ponieważ badany belemnit posiadał średnicę rzędu 6–7 mm, długość kroku została ustawiona na 50 μm , aby pozwolić na rejestrację wszystkich ważnych szczegółów na powierzchni próbki w rozsądnym czasie. Wykonano również zdjęcia wykorzystując zjawisko wstecznego rozproszenia elektronów od próbki, aby możliwe było porównanie wyników chemicznych z morfologią próbek. Ze zdjęcia SEM wzdłuż drogi skanu EPMA wytyczono profil optyczny dzięki programowi Micro Image 4.0.

Analizę rozkładu pierwiastków na przekrojach szkieletu amonitu wykonano w pracowni Instytutu Nauk Geologicznych, Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie za pomocą skaningowego mikroskopu elektronowego HITACHI S-4000 wyposażonego w detektor EDS Noran Vantage (ING). Do pomiarów wybrano najpierw charakterystyczne punkty znajdujące się na przegrodzie i ścianie zewnętrznej muszli. Po uzyskaniu wyniku przeprowadzono mapę rozkładu pierwiastków wykrytych za pomocą sondy. Równolegle zrobiono zdjęcia z zastosowaniem zjawiska wstecznego rozproszenia elektronów od próbki dla badanych obszarów.

Mikroanaliza z zastosowaniem sondy rentgenowskiej ze źródłem synchrotronowym (μ -SRIXE)

Analiza zawartości pierwiastków w próbce belemnitu *Hibolites sp.* została wykonana na linii XRF 1B2 White w Pohang Light Source, Południowa Korea. Wykonano obrazowanie radiograficzne próbek (ang. radiographic imaging) oraz skany liniowe μ -XRF. Przechodząc z jednej formy eksperymentu do kolejnego dokonano zmiany wiązki i układu do jej ogniskowania. Zdjęcia z kontrastem fazowym zostały wykonane metodą rozproszenia (ang. refraction enhanced), obrazowanie z wiązką ciągłą. Wiązka padała na próbkę a promienie X rozproszone od próbki zarejestrowano na kryształach scyntylacyjnych grubości 0,25 mm, wykonanym z CdWO_4 . Obraz uzyskany w ten sposób został z kolei przekonwertowany do zdjęcia optycznego i zarejestrowany na kamerze CCD za pomocą układu optycznego o powiększeniu 10-krotnym. Otrzymano w ten sposób zdjęcie dwuwymiarowe z rozdzielczością 0,5 μm

Uproszczony schemat do tego pomiaru znajduje się na Rys. 17. Pomimo tego, że średnica badanego belemnitu wynosiła tylko ok. 6 mm, próbka była za duża żeby dokonać analizy w jednym cyklu pomiarowym. Próbkę przesuwano stopniowo do nowej pozycji przed mikrowiązkę przez przy pomocy układu przesuwu sterowanego za pomocą komputera.



Rys. 17 Schemat linii synchrotronowej do pomiarów XRF w Pohang. Linia XRF 1B2 White.

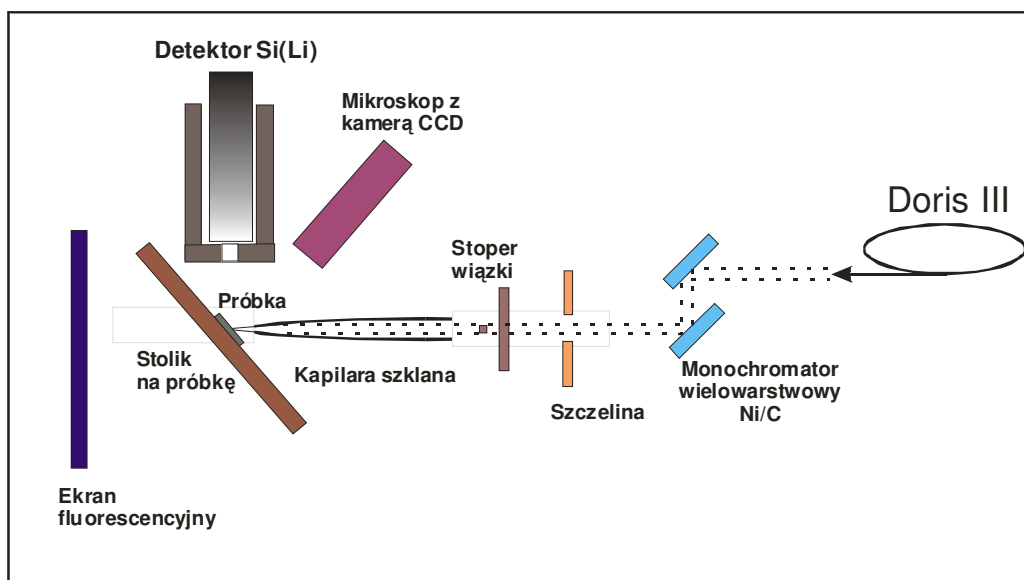
Zdjęcia zarejestrowano oddzielnie dla kolejnych fragmentów próbki i za pomocą programu graficznego (Paint Shop Pro) złączono je w całość oraz przekonwertowane do skali szarości.

W pomiarach fluorescencji rentgenowskiej zastosowano wiązkę zmonochromatyzowaną za pomocą podwójnego monochromatora wielowarstwowego W/B4C firmy Osmic. Wiązkę synchrotronową skupiono do rozmiaru $2.0 \times 0.7 \mu\text{m}^2$ za pomocą systemu optycznego Kirkpatrick-Baez. Próbkę przy pomiarze przesuwano za

pomocą wcześniej opisanego systemu przesuwu. Do pomiaru wybrano opcję skanu liniowego z przesuwem wzdłuż linii średnicy przekroju belemnitu. Opcja skanu została wybrana z powodu dużej symetrii próbek. Skan wzdłuż promienia próbki belemnitu pozwalał na uzyskanie maksymalnej ilości informacji w minimalnym czasie. Wybrano długość kroku pomiaru wynoszącą 50 μm , co umożliwiło ukończenie pomiarów w rozsądnym czasie bez utraty ważnych informacji o rozkładzie pierwiastków na powierzchni próbki.

Do analiz mikrofluorescencyjnych i mikrodyfrakcyjnych próbki *Belemnella sp.* pochodzącej z Roztocza zastosowano sondę rentgenowską z synchrotronowym źródłem promieniowania rentgenowskiego w ośrodku laboratoryjnym LURE (Laboratoire pour l'Utilisation du Rayonnement Électromagnétique) w Orsay – Paryż. Mikroanalizę fluorescencyjną wykonano na linii XRF D15 odchodzącej z pierścienia DCI. Szczegóły techniczne oraz parametry pracy tego urządzenia przedstawione są w pracach Chevalliera i in. (Chevallier et al. 1996) oraz Dillmana i in. (Dillman et al. 1997). W analizie liniowej przekroju belemnitu zastosowano czas pomiaru 100 s na punkt. Krok analizy wynosił odpowiednio 10 μm dla strefy środkowej oraz 100 μm dla strefy zewnętrznej rostrum.

Analizy SRIXE szkieletu sepii wykonano w instytucie Hasylab w Hamburgu przy użyciu linii synchrotronowej L, odchodzącej z pierścienia DORIS III. Schemat całej linii wraz z oprzyrządowaniem przedstawia Rys 18.



Rys. 18 Schemat układu fluorescencji rentgenowskiej (ang. *micro-XRF - Fluorescence*) na synchrotronowej linii L (DORIS III) w Hamburgu

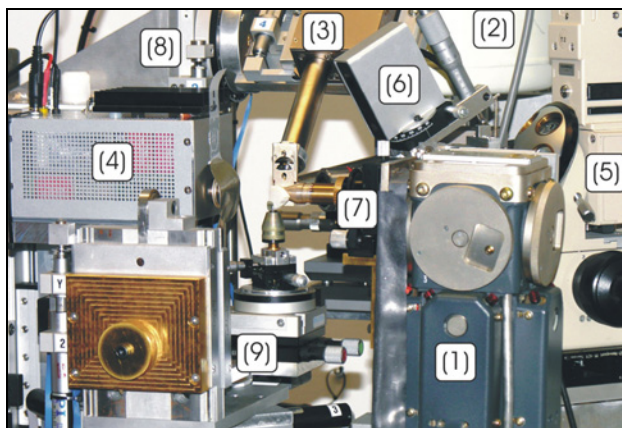
Wiązka promieniowania rentgenowskiego, opuszczająca pierścień synchrotronowy DORIS III jest monochromatyzowana przy pomocy kryształu z naniesioną wielowarstwą

Ni/C. Po przejściu przez regulowaną szczelinę wiązka jest następnie kierowana do kapilary szklanej skupiającej wiązkę do średnicy ok. 15 μ m.

Do analizy tą metodą wybrano fragment szkieletu sepii zawierający dwie sąsiednie przegrody połączone kolumnami. W tym przypadku wykonano mapę rozkładu pierwiastków wykrytych podczas analizy na obszarze 1000 x 180 μ m. Przesuw stolika ustalono na 15 μ m, jednakowy wzdłuż osi x oraz y. Do pomiaru wykorzystano wiązkę o energii E=17keV. Dla każdego punktu widma były zbierane w czasie 15s. Ponieważ intensywność promieniowania pochodzącego z pierścienia synchrotronowego zmienia się w czasie, wyniki dla każdego pomiaru zostały znormalizowane. W tym celu wyliczone intensywności dla każdego pierwiastka zostały podzielone przez chwilową intensywność wiązki.

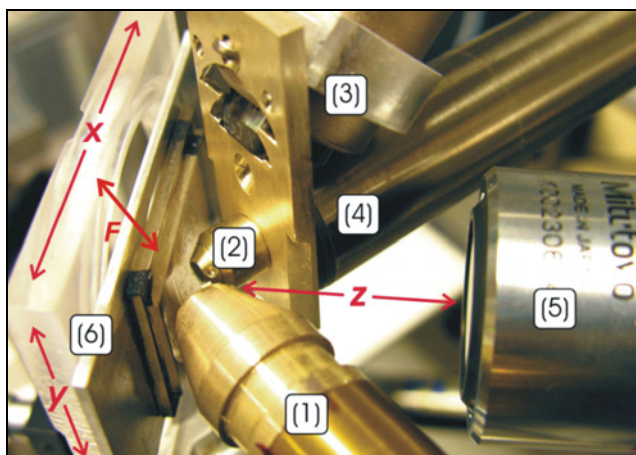
Mikroanaliza z zastosowaniem sondy rentgenowskiej (μ -XRF)

Mikroanalizę szkieletu *Sepia Officinalis* przeprowadzono również przy użyciu konwencjonalnego spektrometru fluorescencji promieniowania rentgenowskiego, zaprojektowanego i wykonanego w laboratorium IAEA (Międzynarodowa Agencja Energii Atomowej) w Seibersdorf, Austria. Fotografie urządzenia przedstawia Rys. 19. Spektrometr zbudowany jest z generatora promieniowania rentgenowskiego - lampy rentgenowskiej (anoda Mo) o mocy do 3 kW, Umaks. 60 kV, detektora Si(Li) (powierzchnia okienka 80 mm², grubość 3 mm, okienko berylowe 12 μ m (grubość), rozdzielczość energetyczna 160 eV dla 5.9 keV), krzemowego detektora dryfującego SDD1 (10 mm², grubość 450 μ m, okienko berylowe Be 8 μ m, rozdzielczość energetyczna 135 eV przy 5.9 keV), krzemowego detektora dryfującego SDD2 (10 mm², grubość 300 μ m, rozdzielczość energetyczna 170 eV przy 5.9 keV), mikroskopu optycznego z kamerą CCD, laserowego czujnika odległości, ręcznie regulowanego uchwyty na polikapilarę szklaną (przesunięcie xy i i odchylenie $y\phi$ $x\phi$), sterowanego stolika na próbki (translacja xyz i rotacja θ) z komputerowym systemem sterującym i rejestrującym dane. Pomiary przeprowadzono przy mocy 2 kW i napięciu 45 kV. Natężenie prądu lampy rentgenowskiej przy pomiarach wynosiło 40 mA. Wszystkie pomiary przeprowadzono w powietrzu.



Rys. 19 Fotografia spektrometru μ -XRF zaczerpnięta za pozwoleniem z pracy Węgrzynka i in. (Węgrzynek et al. 2008): (1) lampa rentgenowska, (2) detektor Si(Li), (3) krzemowy detektor dryftowy 1 (SDD1), (4) SDD2, (5) mikroskop optyczny, (6) laserowy czujnik odległości, (7) uchwyt dla ogniskującej polikapilary szklanej zamontowany do lampy rentgenowskiej, (8) uchwyt pozycjonujący dla detektora SDD1 i polikapilary PCCC, (9) uchwyt pozycjonujący do próbki.

Aby uzyskać przestrzenny obraz rozkładu pierwiastków próbkę szkieletu *Sepia Officinalis* umieszczoną w spektrometrze przesuwano w trzech kierunkach. Próbkę zamocowano na drucie przy pomocy kleju i ustawiono w ten sposób do pomiaru, aby przegroda (septum) po pomiarze próbki znalazła się w środku rozkładu trójwymiarowego. Próbkę przesuwano wzdłuż osi X z krokiem $20,85 \mu\text{m}$, osi Y z krokiem $22,47 \mu\text{m}$ oraz wzdłuż osi Z z krokiem $20 \mu\text{m}$. Czas pomiaru wynosił 20 s na punkt.



Rys. 20 Zdjęcie geometrii elementów do pomiaru konfokalnego zaczerpnięte za pozwoleniem z pracy Węgrzynka i in. (Węgrzynek et al. 2008): (1) – uchwyt PC, (2) polikapilara PCCC z zamontowanym uchwytem do detektora SDD1 (3) ustawiona przed okienkiem detektora Si(Li) (4), mikroskop optyczny (5), ramka z zamontowaną próbką (6). Kierunki skanowania: x- poziomy (przy użyciu zamontowanego pionowo druta), y- pionowy (przy użyciu druta zamontowanego poziomo), F- wzdłuż ogniskowanej wiązki, z – wzdłużny (przy użyciu folii Cu).

Rys. 20 przedstawia szczegóły geometrii konfokalnej zastosowanej podczas omawianego pomiaru. Na rysunku zaznaczono kierunki skanowania: x – poziomy, y – pionowy i z - wzdłużny w kierunku mikroskopu, F – wzdłuż kierunku wiązki ogniskowanej przez polikapilare.

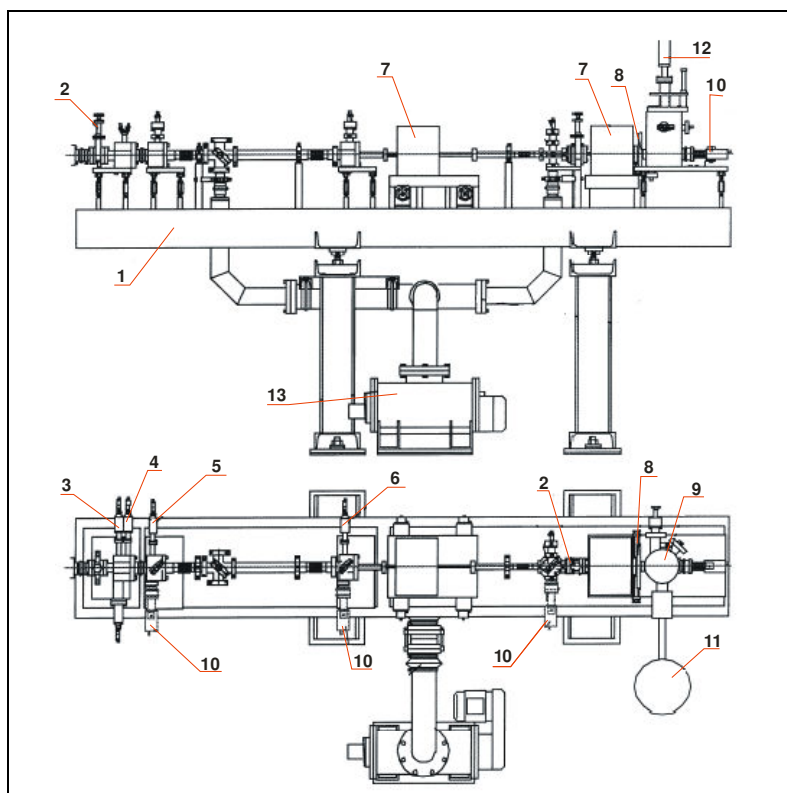
Próbka amonitu poddano również analizie przy pomocy μ -XRF, ale ponieważ wchodzący w skład próbki piryt charakteryzuje się dużą gęstością, zrezygnowano z pomiaru trójwymiarowego, a wykonano analizę powierzchniową fragmentu muszli, na którym widoczna była dobrze zachowana przegroda muszli. Pomiar został przeprowadzony na obszarze $2100 \times 450 \mu\text{m}$ z krokiem $15 \mu\text{m}$ wzdłuż osi x i $50 \mu\text{m}$ wzdłuż osi y. Czas pomiaru dla punktu wynosił 20 s.

Wybrane linie spektralne z w widm zostały scałkowane za pomocą programu: Spector (Data Acquisition Software, Mladen Bogovac). Wyniki dla analizowanych pierwiastków zostały następnie wyeksportowane w postaci plików tekstowych, które przekonwertowano do postaci trójwymiarowej za pomocą programu Avizo 5.0 (Mercury Computer Systems). Za pomocą tego programu przygotowałem również wizualną prezentację wyników w postaci materiału filmowego.

Mikroanaliza z zastosowaniem sondy protonowej (μ -PIXE)

Do pomiarów μ -PIXE (ang. Micro-Particle Induced - X-Ray Emission) została zastosowana sonda protonowa zainstalowana w Instytucie Fizyki Jądrowej im. H. Niewodniczańskiego w Krakowie, bazująca na akceleratorze typu Van der Graafa. Optyka do ogniskowania wiązki protonów jest wyposażona w parę magnetycznych soczewek kwadrupolowych (nazywanych z ang. "Divided Russian Quadruplet"). Szczegóły dotyczące budowy aparatury i jej parametrów pracy są omówione w pracach Lebed i in. (Lebed et al. 1999; Kwiatek et al. 2001). [Rys. 21](#) przedstawia schemat sondy PIXE (Lebed et al. 1999).

W omawianej metodzie próbka jest mocowana nieruchomo do uchwytu pomiarowego a śruby mikrometryczne w dwóch wymiarach xy służą do przesuwu próbek przed pomiarem. Uginana dzięki zmianie napięcia na magnesach wiązka protonów o średnicy minimalnie $8 \mu\text{m}$ i energii $2\div 2,5 \text{ MeV}$ pozwalała przemiatać obszar próbki o powierzchni $250\mu\text{m} \times 250\mu\text{m}$. Za pomocą sondy PIXE przeanalizowano próbki amonitu, mątwy oraz belemnitu gatunku *Belemnitella sp.* pochodzącego z Jury Krakowsko-Częstochowskiej.



Rys. 21 Schemat sondy PIXE (bez akceleratora Van der Graffa) według Lebeda (Lebed et al. 1999): (1) - stół, (2) –zawór zasuwowy, (3) – szczeliny, (4) – otwór, (5) – szczelina, (6) – kolimator kątowy, (7) – soczewki kwadropolowe, (8) – dwuwymiarowy system skanowania, (9) – komora pomiarowa, (10) – kamera CCD, (11) – detektor, (12) – mikro-manipulator połączony z uchwytem próbek, (13) – pompa próżniowa .

Podczas pomiaru powierzchni przekroju poprzecznego szkieletu sepia poddano analizie obszar o maksymalnej powierzchni $250 \mu\text{m} \times 250 \mu\text{m}$, średnica wiązki protonów wynosiła $8 \mu\text{m}$ a krok pomiaru ustawiono na $2 \mu\text{m}$ dla obu osi (xy). Energia protonów wiązki wynosiła 2 MeV a czas pojedynczego pomiaru 20 ms .

Do analizy szkieletu amonitu ustalono wiązkę o średnicy $12 \mu\text{m}$ a krok pomiaru $2 \mu\text{m}$. Czas pomiaru na punkt w tym przypadku ustalono na 50 ms . Energia wiązki podczas pomiaru wynosiła $2,15 \text{ MeV}$. Dla próbki rostrum belemnitu zastosowano identyczne warunki.

Wyniki analiz uzyskane za pomocą sondy przetworzono korzystając z programu CMB (Cracow Micro Beam) i przekonwertowano do zdjęć dwuwymiarowych obrazujących rozkłady powierzchniowe wykrytych pierwiastków na powierzchni próbek.

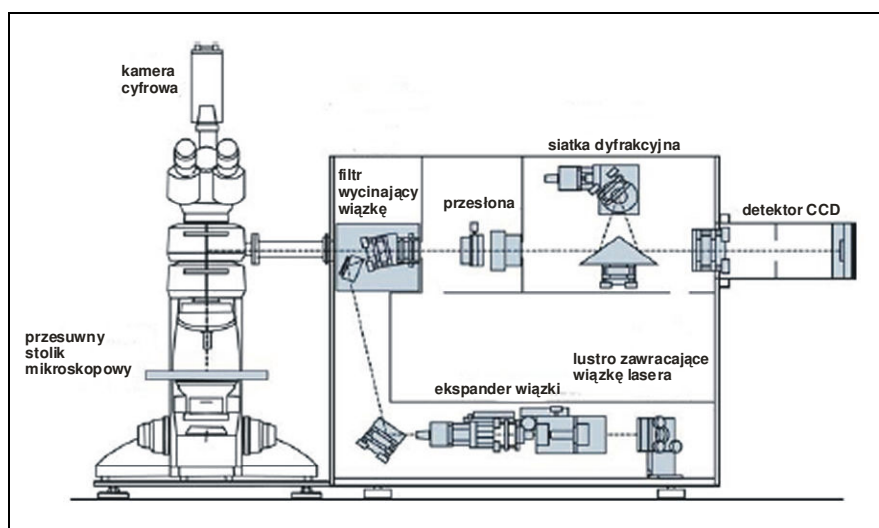
3.2.4. Spektrometria Ramana

Metoda z zastosowaniem mikro-spektrometru ramanowskiego jest metodą niedestrukcyjną, czułą i posiadającą bardzo dużą rozdzielczość przestrzenną determinowaną średnicą wiązki lasera (minimalnie $1 \mu\text{m}$) oraz skokiem przesuwu śruby

mikrometrycznej xy stolika. Metoda posiada szerokie zastosowanie w analizie tkanek zwierzęcych i roślinnych, żywności oraz dzieł sztuki (Schrader et al. 2000). Jej zalety ujawniają się szczególnie przy analizie farb i lakierów obrazów (Vandenabeele et al. 2000) oraz w archeologii (Smith and Clark 2004). Zdolność do skupiania wiązek przez układ soczewek mikroskopu oraz zastosowanie przesuwnego stolika znalazły szczególne zastosowanie przy pomiarach powierzchni próbek, pozwalając na uzyskanie pomiaru w punkcie, wzdłuż wyznaczonej linii (tzw. skan liniowy) oraz w postaci tzw. map rozkładu związków chemicznych pokazujących mikrostrukturę próbki (Schlücker et al. 2003).

Pomiary mikroramanowskie próbki belemnitu *Belemnella sp.* zostały wykonane z zastosowaniem spektrometru Jobin-Yvon T-64000 z podłączonym mikroskopem stereoskopowym. Instrument był wyposażony w detektor CCD chłodzony ciekłym azotem. Próbkę wzbudzano za pomocą lasera argonowego emitującego fotony o długości fali 514,5 nm. Moc lasera została ustawiona na 8 mW. Średnicę wiązki lasera ustawiono za pomocą soczewki mikroskopu na ok. 1 μm .

Drugim urządzeniem użytym do analiz był spektrometr InVia Renishaw, będący na wyposażeniu laboratorium analitycznego Wydziału Chemii, Uniwersytetu Marii Curie Skłodowskiej w Lublinie. Schemat analogicznego instrumentu zaczerpnięto z pracy Smitha i Clarka (Smith and Clark 2004) (Rys. 22).



Rys. 22 Spektrometr ramanowski inVia Renishaw zaczerpnięty z pracy Smitha i Clarka (Smith and Clark 2004).

Za pomocą urządzenia Renishaw przeprowadzono analizy szkieletu mątwy oraz muszli amonitów. Zależnie od sytuacji wykonywano analizę punktową, skan liniowy lub mapę rozkładu. Parametry pomiarowe dobierano w ten sposób, aby uzyskać możliwie wysoki

sygnał widma w strefie występowania wiązań peptydowych (I, II, A), wiązań od wielocukrów CH, OH oraz wiązań S-C i S-H.

Czas pomiaru w punkcie w przypadku analizowania fragmentów przegrody szkieletu sepia wynosił 1 min. Pomiar był powtarzany trzykrotnie. Mapę wykonano dla powierzchni przekroju o rozmiarze $50\mu\text{m} \times 160\mu\text{m}$. Zebrano w tym przypadku widmo w zakresie ($150\text{ cm}^{-1} - 3200\text{ cm}^{-1}$) dla wszystkich punktów pomiarowych. Mapa rozkładu aragonitu na powierzchni kolumny została wykonana na obszarze $25\mu\text{m} \times 30\mu\text{m}$ w zakresie ($150\text{ cm}^{-1} - 1200\text{ cm}^{-1}$) z czasem pomiaru 20 s na punkt. W obu przypadkach do pomiaru zastosowano laser o długości fali 514,5 nm o przyłożonej energii 0,8 mW.

W przypadku analizy próbek amonitów stosowano opcje mapy rozkładu oraz skanu liniowego. Mapy wykonano dla ścianki zewnętrznej muszli ($170\mu\text{m} \times 22\mu\text{m}$) i przegrody muszli ($10\mu\text{m} \times 35\mu\text{m}$). Dla dobrze zachowanego fragmentu przegrody wykonano również skan liniowy o długości $90\mu\text{m}$. W przypadku analizy szkieletu amonitu do pomiarów zastosowano wiązki laserów o długości fali 514 i 785 nm. Moc lasera stosowanego do analiz amonitów została ustawiona odpowiednio na 0,8 mW i 3 mW w przypadku ustalania map rozkładu i 1,6 mW, przy pomiarze liniowym (laser - $\lambda=512\text{nm}$).

Analizy próbek belemnitów przeprowadzono, ale ze względu na bardzo duży poziom szumów pochodzący od fluorescencji nie uzyskano zadowalających wyników. Wszystkie spektra ramanowskie zostały zarejestrowane w geometrii rozproszenia wstecznego. Zdjęcia optyczne - porównawcze dla obszaru badanego zastały również wykonane za pomocą kamery cyfrowej dołączonej do mikroskopu.

3.2.5. Spektrofotometria w podczerwieni

Analizę spektrometryczną w podczerwieni wcześniej sproszkowanych próbek: belemnitów, amonitów i mątwy wykonano za pomocą spektrometru FTIR Perkin Elmer Spectrum One (ICMAB-Barcelona) metodą transmisyjną.

Najpierw wykonano serie pomiarów dla próbek sepia:

- sproszkowana próbka pierwotna nieogrzewana i nieprażona,
- sproszkowana próbka ogrzewana w temperaturze 450°C przez 3 godziny w piecu rurowym,
- sproszkowana próbka ogrzewana w temperaturze 550°C przez 3 godziny,
- sproszkowana pozostałość po analizie termalnej grawimetrycznej z temperatura końcową prażenia 900°C wykonywanej przez 3 godziny,

- sproszkowana pozostałość po dekalcytacji próbki kwasem solnym.

Pomiary wykonano z rozdzielczością 4 cm^{-1} w zakresie $450 \div 4000 \text{ cm}^{-1}$. Dla każdego pomiaru stosowano 4 powtórzenia. Do pomiaru wykonano pastylki o średnicy 16 mm zawierające 5mg badanej próbki w 250mg KBr. Pastylki przygotowano na specjalnej prasie. Pomiar próbek skamielin wykonano również z próbek sproszkowanych w pastylkach wykonanych identycznie jak dla próbek mątwy. Analizy próbek belemnitów i amonitów wykonano stosując identyczne ustawienia jak dla próbek sepii.

3.2.6. Dyfraktometria rentgenowska

Metody dyfrakcyjne i wykorzystujące zasadę wielokrotnego odbicia promieni rentgenowskich opracowaną przez Bragga należą obecnie do klasycznych metod analiz strukturalnych stosowanych w mineralogii i petrografii. Pozwalają one określić strukturę i wzajemne ułożenie atomów w materiale krystalicznym.

Pomiary dyfrakcyjne dla sproszkowanych próbek belemnitów i mątw zostały wykonane dla zakresu $5^\circ - 60^\circ$ kątów 2θ , z rozdzielczością $0,020^\circ$ i czasem pomiaru 1s dla każdego kąta z zastosowaniem dyfraktometru Siemens D5000 wyposażonego w lampę miedziową będącego na wyposażeniu instytutu ICMAB (Institut de Ciencia de Materials de Barcelona) w Barcelonie.

Pomiary dyfrakcyjne dla sproszkowanej przegrody wyizolowanej mechanicznie ze strefy brzusznej szkieletu mątwy oraz amonitów zostały wykonane przy pomocy proszkowego dyfraktometru rentgenowskiego HZG-4 firmy Carl Zeiss Jena (ze źródłem promieniowania rentgenowskiego pochodzącym z lampy miedziowej) będącym na wyposażeniu Wydziału Chemii Uniwersytetu Marii Curie Skłodowskiej w Lublinie. Do pomiaru zastosowano tą samą rozdzielczość, co dla innych analiz proszkowych próbki mątwy, a czas ekspozycji zwiększono dwukrotnie.

Pomiary dla fragmentów szkieletu sepii wyciętych w kształcie graniastosłupów odsłaniających płaszczyzny prostopadłe i równoległe do przegród w strefie brzusznej, a więc do płaszczyzny przyrostu szkieletu, zostały wykonane na zmodyfikowanym dyfraktometrze Philips X'Pert Pro MPD Alpha1 w Instytucie Fizyki PAN w Warszawie. Dyfraktometr został wyposażony w układ Johanssona i nieruchomy półprzewodnikowy licznik do rejestrowania wiązki ugiętej promieniowania. Źródłem promieniowania rentgenowskiego w tym aparacie jest lampa rentgenowska z anodą miedziową. Do badań

zastosowano wiązkę o średnicy 5mm. Podczas pomiaru próbkę obracano. Dokładny opis tego urządzenia można znaleźć w pracy Paszkowicz i in. (Paszkowicz 2005).

3.2.7. Termiczna analiza wagowa

Prażenie kalcynujące próbek amonitów, belemnitów i mątwy zostało przeprowadzone na analizatorze termograwimetrycznym Perkin Elmer TGA 7.

Do prażenia wybrano program ze stałym wzrostem temperatury od 35-900°C co 3°C/min. Kalcynowanie wykonano przy przepływie powietrza.

3.2.8. Analiza pierwiastków tworzących związki lotne

Analiza wodoru, azotu, węgla i siarki, pierwiastków istotnych do oszacowania zawartości związków organicznych w próbkach została wykonana za pomocą analizatora do oznaczania pierwiastków tworzących związki lotne Carlo Erba Instruments EA1108 wyposażonego w autosampler.

3.2.9. Analiza pierwiastków metalicznych

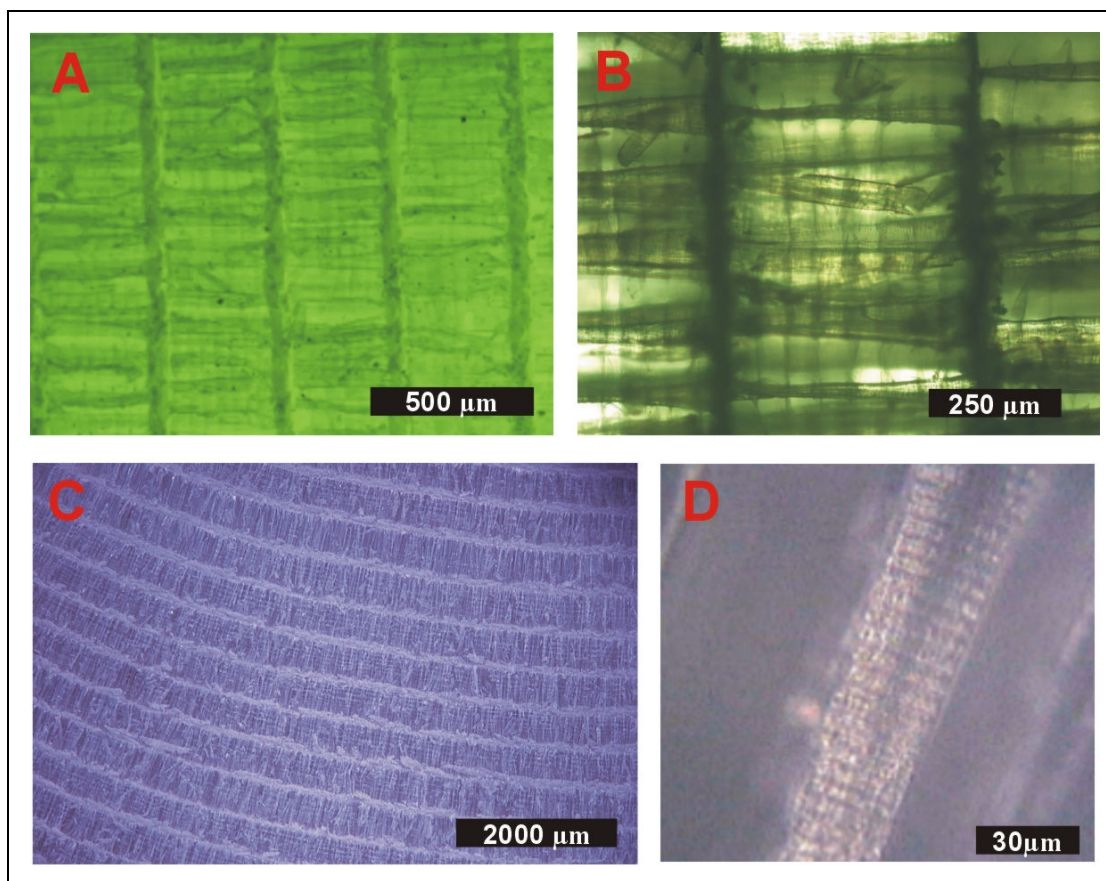
Oznaczenie Na, Sr, K, Mg i Fe dla próbek szkieletów belemnitów i *Sepia Officinalis* zostało wykonane z zastosowaniem spektrometru emisyjnego ze wzbudzeniem plazmowym (ICP-AES) firmy Perkin Elmer, Optima 4300DV. Kalibracja została przeprowadzona metodą krzywej wzorcowej. Przed oznaczeniem ICP-AES została wykonana mineralizacja próbek z bardzo małej ilości ok. 0,05 g próbki. Sproszkowane próbki zostały rozpuszczone w stężonym gorącym roztworze kwasu azotowego a następnie rozcieńczone wodą dejonizowaną w ilości równej objętości kwasu potrzebnego do rozpuszczenia próbki.

Oznaczenie zawartości Mg, Mn, Fe, Na, Sr i K w próbkach belemnitów zostało również przeprowadzone na absorpcyjnym spektrometrze atomowym Hitachi Z-8200 z polaryzacją Zeemana znajdującym się na wyposażeniu Katolickiego Uniwersytetu Lubelskiego. Do pomiarów wybrano opcję pomiaru absorpcyjnego. Wzbudzenie pierwiastków przeprowadzono z zastosowaniem palnika acetylenowo-tlenowego. Ze względu na duże zasolenie próbki, kalibrację wykonano metodą dodatku wzorca.

3.3. Wyniki i dyskusja

3.3.1. Szkielet wewnętrzny *Sepia Officinalis*

W celu określenia i scharakteryzowania chemicznego składu oraz uzyskania informacji o strukturze i przestrzennym rozmieszczeniu składników w szkielecie wewnętrznym mątwy zwyczajnej (*Sepia Officinalis*) wykonano serię wzajemnie uzupełniających się oznaczeń z wykorzystaniem nowoczesnych technik mikroanalitycznych. Część uzyskanych wyników i wnioski płynące z ich oceny przedstawiono w pracy opublikowanej w *Materials Science and Engineering* (Florek et al. 2008). Badanie struktury szkieletu wewnętrznego mątwy rozpoczęto od obserwacji próbek za pomocą mikroskopu optycznego i elektronowego w różnym powiększeniu.



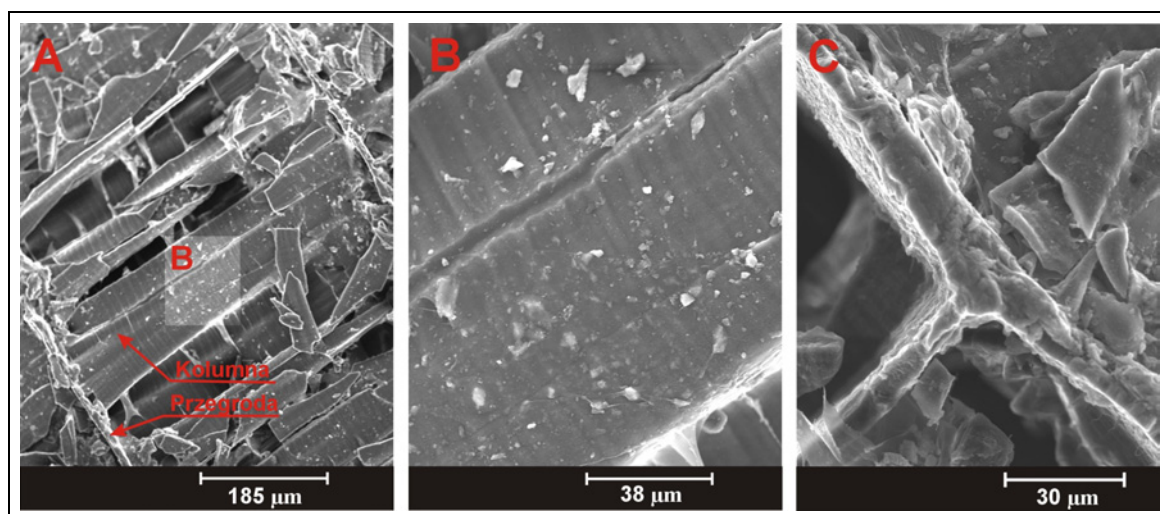
Rys. 23 Zdjęcia optyczne przekroju poprzecznego części brzusznej *Sepia Officinalis*.

Miało to na celu zobrazowanie budowy i mikrostruktury szkieletu. Zdjęcie dla pomiarów z wykorzystaniem mikroskopu elektronowego zarejestrowano na detektorze QBSD dla elektronów wstecznie rozproszonych. Zdjęcia optyczne wykonano zarówno dla próbek

oświetlanych światłem przechodzącym, jak i odbitym. Zarejestrowane zdjęcia w świetle przechodzącym wykonano również z zastosowaniem filtra światła czerwonego.

Na zdjęciach optycznych (Rys. 23) wyraźnie zarysowuje się budowa warstwowa szkieletu. Widać wyraźnie, że główne przegrody szkieletu są rozmieszczone periodycznie w odległości ok. $450 \div 500 \mu\text{m}$ od siebie (Rys. 23a). Na Rys. 23b widać dodatkowo, że między przegrodami głównym znajdują się przegrody o mniejszej grubości, rozmieszczone, co $40 \div 50 \mu\text{m}$. Rys. 23c przedstawia strukturę części brzusznej szkieletu w nieco mniejszym powiększeniu a Rys. 23d fragment kolumny z wyraźnymi fragmentami jasnych i ciemnych prążków, wskazujących na różnice we właściwościach optycznych materiałów, co wynika prawdopodobnie z różnic w składzie chemicznym.

Obrazy SEM przekroju poprzecznego części brzusznej szkieletu *Sepii Officinalis* w różnej skali znajdują się na Rys. 24. Zdjęcia wykazują, że wybrany fragment szkieletu składa się z przegród i kolumn. Można to wyraźnie zauważyć zwłaszcza na Rys. 24a. Średnia odległość między przegrodami dla badanych próbek, połowa odległości między kolumnami i grubość przegród wynosiła odpowiednio: 420 ± 16 , 35 ± 6 i $13 \pm 3 \mu\text{m}$.

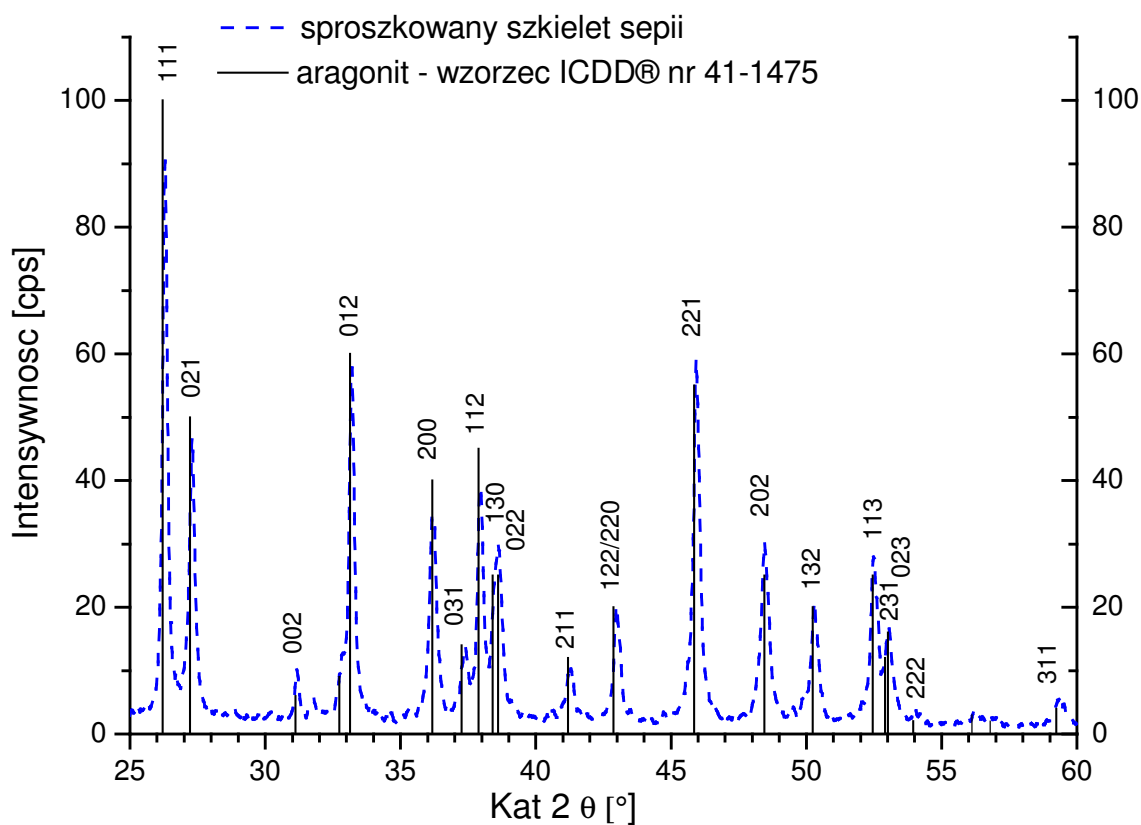


Rys. 24 Zdjęcia SEM przekroju poprzecznego części brzusznej szkieletu sepii. A) Strefa obrazująca dwie sąsiednie przegrody wraz z łączącymi je kolumnami. B) kolumna w dużym powiększeniu. C) przegroda w dużym powiększeniu z przystającą do niej kolumną.

Rozstaw kolumn zgadza się z określonymi i opublikowanymi przez Sherrard (Sherrard 2000) oraz mieści się w zakresie wyników uzyskanych przez Ogasawara (Ogasawara et al. 2000). Rozmiary wysokości komórek i grubości przegród wyznaczone przeze mnie są jednak wyższe i zbliżone do wyników opublikowanych przez Tiseanu (Tiseanu et al. 2005). Różnice pomiędzy wynikami można wyjaśnić badaniem różnych fragmentów różnych próbek, które różniły się też miejscem pochodzenia i wiekiem. Dalsza obserwacja zdjęć

(Rys. 24a i 24b) pozwala rozpoznać subtelne podstruktury kolumn. Powierzchnia kolumn biominerału wydaje się być podzielona na mniejsze łatwo dostrzegalne warstwy tworzące wysoko-uporządkowaną podstrukturę. Sąsiadujące ze sobą fragmenty posiadają rozmiary 12x40 μm a warstwa je rozdzielająca ma grubość ok. 4-5 μm (pomiar wykonany dla środka długości kolumn).

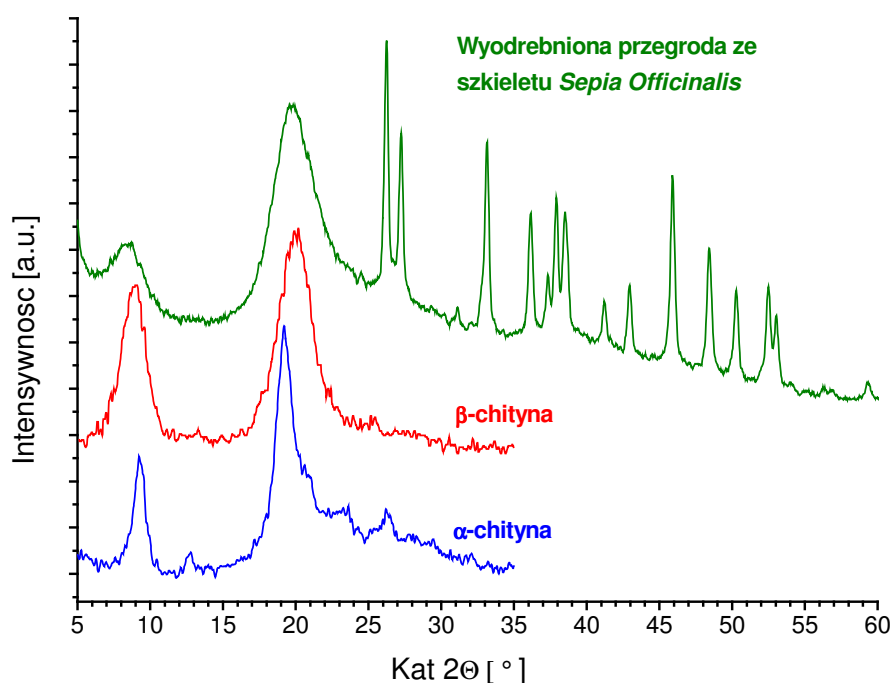
Po analizie zdjęć wykonano serię analiz za pomocą dyfraktometru rentgenowskiego w celu oceny faz krystalicznych obecnych w próbkach oraz dla określenia kierunku przyrostu kryształów w strefie wysoko-skrystalizowanej (kolumnowej) szkieletu. Analiza dyfrakcyjna wykonana metodą proszkową wykazała, że jedynym materiałem krystalicznym obecnym w próbkach jest aragonit. Refleksy i intensywności refleksów dobrze pokrywają się z wzorcem ICDD® 41-1475 dla aragonitu (Rys. 25).



Rys. 25 Dyfraktogram uzyskany metodą proszkową dla próbki szkieletu małży wraz ze wzorcem aragonitu ICDD® nr 41-1475

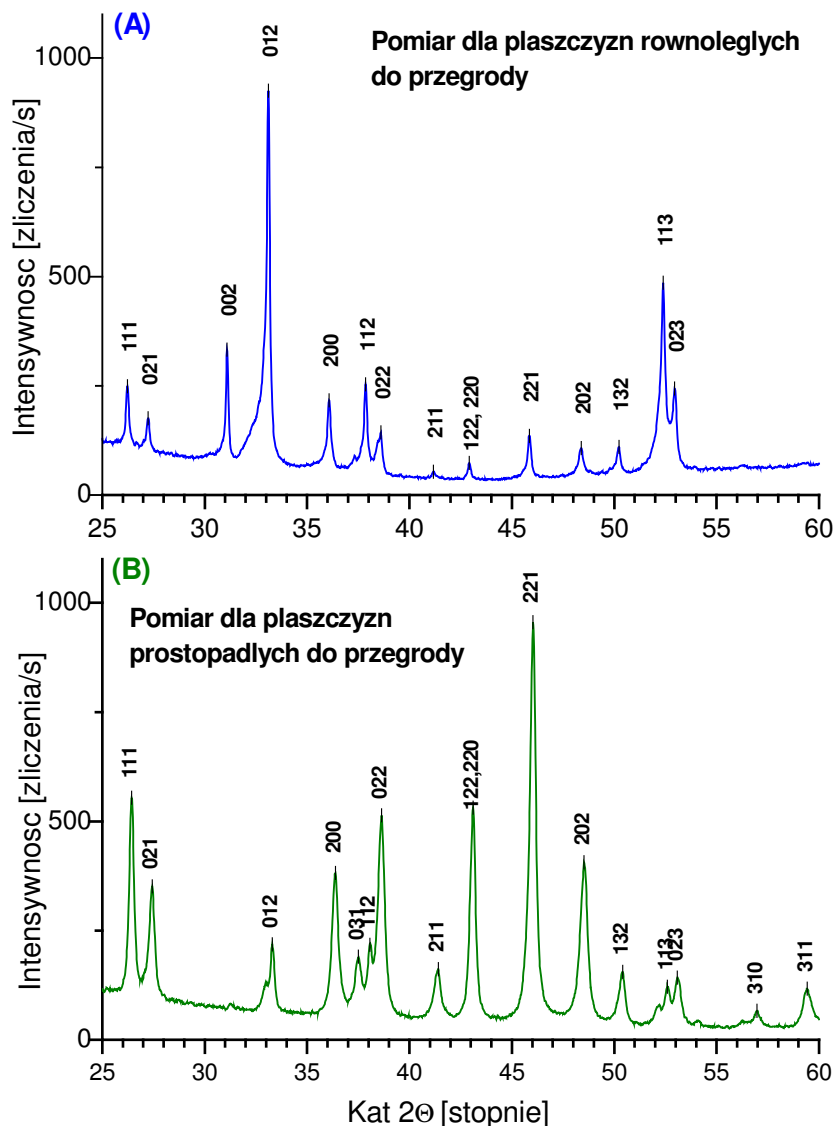
Spektrum próbki szkieletu małży jest identyczne z dyfraktogramem aragonitu w zakresie kątów 2θ 25÷60°. Najbardziej intensywnymi refleksami okazały się trzy refleksy przyporządkowane dla płaszczyzn (012), (111) i (221).

Na dyfraktogramie uzyskanym dla sproszkowanej próbki szkieletu sepii w zakresie małokątowym 2θ $5\div 25^\circ$ charakterystycznym dla związków organicznych, zaobserwowano słabe refleksy, które sugerowały obecność składnika organicznego, lecz nie pozwoliły na jego identyfikację. Po mechanicznym wyizolowaniu przegród ze szkieletu i ich sproszkowaniu wykonałem analizę ponownie na dyfraktometrze rentgenowskim. Rys. 26 przedstawia wynik analizy XRD uzyskany dla próbki, dyfraktogram wzorca α -chityny uzyskany podczas analizy próbki pancerza kraba oraz wzorca β -chityny zaczerpnięty z pracy Janga (Jang et al. 2004). Na dyfraktogramie otrzymanym dla próbki wyizolowanej przegrody można już wyraźnie zauważyć refleksy charakterystyczne dla składników zarówno nieorganicznych (aragonit) jak i organicznych w postaci szerokich pików.



Rys. 26 Dyfraktogram uzyskany z próbki przegrody szkieletu mątwy, wyodrębnionej mechanicznie i sproszkowanej, zestawiony z wzorcowymi dyfraktogramami: α -chityny (wzorzec uzyskany na podstawie analizy α -chityny zakupionej w Sigma-Aldrich) oraz β -chityny zaczerpnięty z pracy Janga (Jang et al. 2004)

Dwa piki obserwowane w zakresie kątów 2θ od 5 do 25° na dyfraktogramie sproszkowanej przegrody szkieletu sepii można zidentyfikować jako pochodzące od β -chityny, która jest głównym składnikiem organicznym szkieletu mątwy.



Rys. 27 Dyfraktogramy uzyskane dla płaszczyzn: a) równoległych, b) prostopadłych do przegród występujących w szkielecie sepii.

Żeby określić orientację kryształów aragonitu w części kolumnowej szkieletu wykonałem analizę bardzo małych fragmentów szkieletu o kształcie graniastosłupów. Próbkę zostały wycięte w ten sposób, aby ich ściany były odpowiednio prostopadłe i równoległe do przegród szkieletu a więc i do powierzchni muszli. Dyfraktogramy uzyskane dla płaszczyzn równoległych i prostopadłych (przekrój poprzeczny strefy brzusznej szkieletu) do przegród znajdują się na [Rys. 27a](#) i [27b](#). Oba dyfraktogramy uwidaczniają preferowany kierunek orientacji kryształów aragonitu w badanych płaszczyznach. Duże intensywności refleksu 002 uzyskane dla płaszczyzny przecięcia równoległej do przegrody a więc i do powierzchni muszli oraz duże wzmocnienie

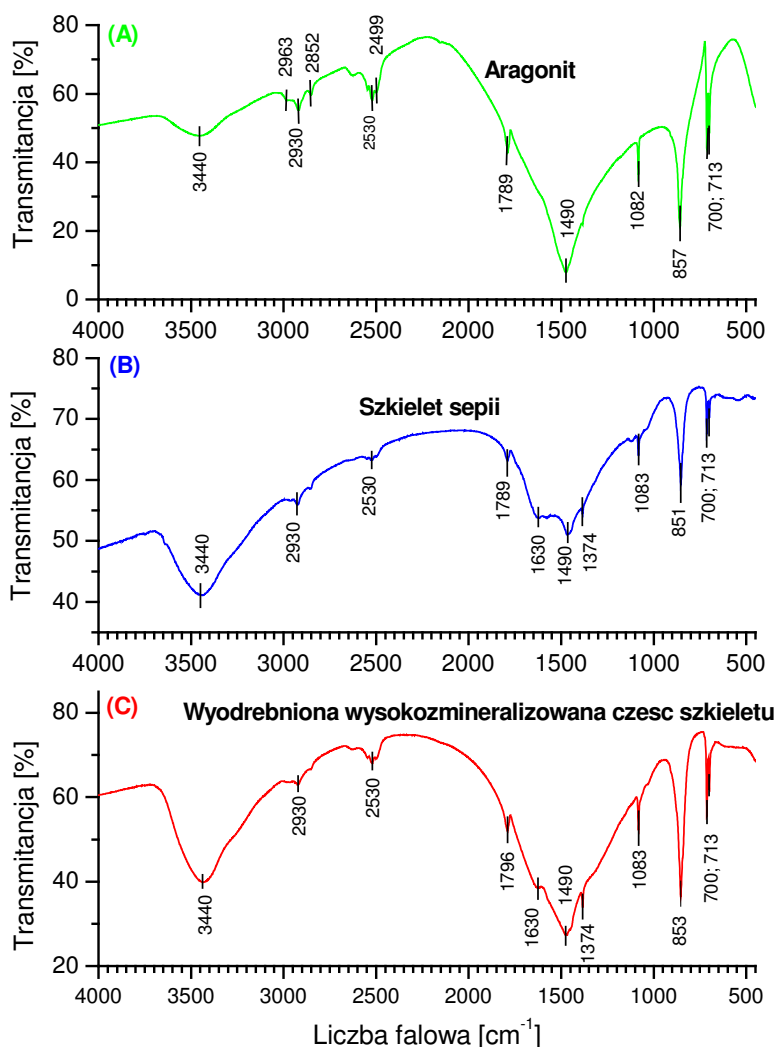
refleksów 200 and 220 dla płaszczyzny prostopadłej do przegród (płaszczyzna przekroju poprzecznego) pozwoliły mi określić preferowaną orientację jako <001>. Wzmocnione refleksy 012, 023 i 113 dla płaszczyzny równoległej do przegrody oraz 021, 211 i 221 dla płaszczyzny prostopadłej wskazuje, że rozmieszczenie kątowe krystalitów jest raczej szerokie. Płaszczyzny, które dały refleksy podczas omawianej powyżej analizy dyfrakcyjnej wraz z odpowiadającymi im kątami 2θ są zestawione w Tab. 2.

Tab. 2 Płaszczyzny, których piki zostały zidentyfikowane na dyfraktogramach (Rys. 27a i 27b) przy określonych wartościach kąta 2θ .

| Kąt 2θ [°] | Płaszczyzna krystalitu | Kąt 2θ [°] | Płaszczyzna krystalitu | Kąt 2θ [°] | Płaszczyzna krystalitu |
|-------------------|------------------------|-------------------|------------------------|-------------------|------------------------|
| 26,4 | (111) | 38,0 | (112) | 50,4 | (132) |
| 27,5 | (021) | 38,6 | (011) | 52,1 | (141) |
| 31,2 | (001) | 41,4 | (211) | 52,6 | (113) |
| 33,3 | (012) | 43,2 | (122), (110) | 53,2 | (023) |
| 36,3 | (100) | 46,0 | (221) | 57,0 | (310) |
| 37,5 | (031) | 48,5 | (101) | 59,5 | (311) |

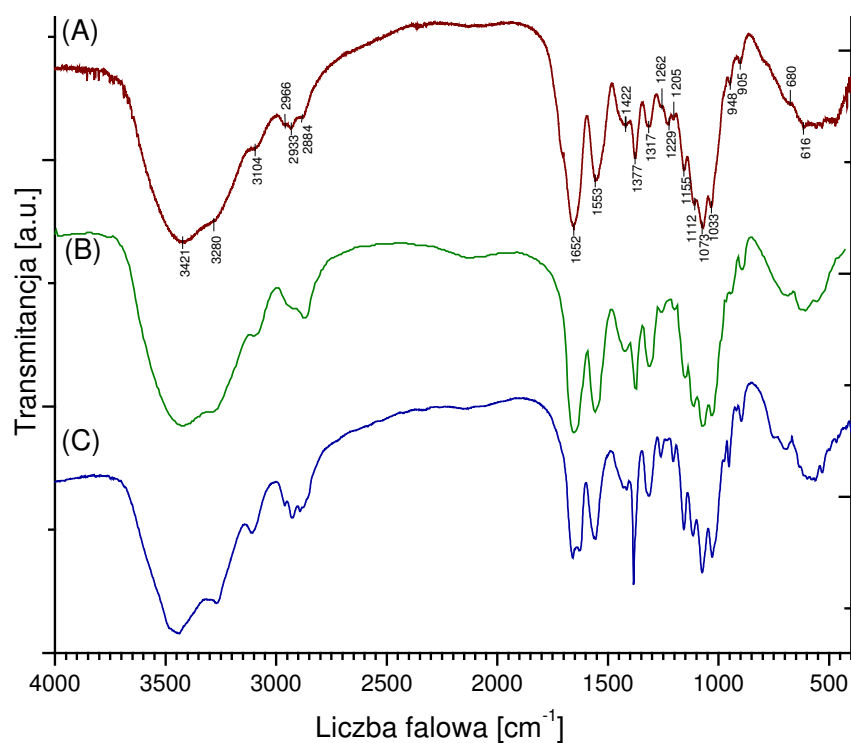
W następnym etapie badań próbkę szkieletu mątwy zwyczajnej poddano analizie w podczerwieni. Analizy FTIR potwierdziły, że aragonit i chityna są głównymi składnikami szkieletu mątwy (Rys. 28 i 29). Na Rys. 28 przedstawiono widmo: a - wzorca aragonitu; b - uzyskane po analizie sproszkowanej w całości próbki szkieletu sepii i c – uzyskane podczas pomiaru wyodrębnionych i sproszkowanych kolumn szkieletu. Poza pasmami charakterystycznymi dla aragonitu: ν_1 (1083 cm^{-1}), dublet ν_4 ($713, 700\text{ cm}^{-1}$ – dla oscylacji wiązania C-O w płaszczyźnie) i ν_2 (853 cm^{-1}) znajdują się pasma pochodzące z oscylacji wewnętrznych jonów CO_3^{2-} np. ν_3 (1490 cm^{-1}) (Tan et al. 2004). Pasma 1796 cm^{-1} i 2530 cm^{-1} mogą być również przyporządkowane do oscylacji jonów węglanowych. W widmie szkieletu można zauważyć niewielki udział pasm pochodzących od chityny. Są to oscylacje w zakresie $1030\text{-}1110\text{ cm}^{-1}$ (rozciągające C-O) oraz 1630 (amidowe I) i 1374 cm^{-1} (amidowe III). Widmo wzorca aragonitowego (Rys. 28a) jest bardzo podobne, ale nie identyczne z widmem uzyskanym po analizie silniej zmineralizowanej części szkieletu (próbka przygotowana po mechanicznym wyodrębnieniu kolumn ze strefy między przegradami) (Rys. 28c) a mniej podobna do widma uzyskanego po pomiarze całej

sproszkowanej próbki (Rys. 28b). Wyniki te wskazują, że przegrody i miejsca pomiędzy przegrodami różnią się zawartością aragonitu.



Rys. 28 Widma FTIR: A) wzorec aragonitu, B) sproszkowana próbka szkieletu mątwy, C) sproszkowana próbka szkieletu mątwy uzyskana ze strefy kolumnowej pomiędzy przegrodami.

Aby dokonać jednoznacznej identyfikacji związków obecnych w nierozpuszczalnej części matrycy organicznej zawartej w szkielecie sepii wytrawiono próbki za pomocą rozcieńzonego kwasu solnego o stężeniu 0.1M. Nierozpuszczalną pozostałość pochodzącą z próbki oddzielono na sączku od roztworu, intensywnie przepłukano wodą destylowaną i po wysuszeniu w temperaturze pokojowej i poddano analizie za pomocą spektrofotometru w podczerwieni.



Rys. 29 Widma FTIR szkieletu mąwy: a) pozostałość po odwapnieniu szkieletu; b) wzorec β -chityny wyodrębniony ze szkieletu kalmarów – zaadoptowany z pracy Cardenas (Cardenas et al. 2004); c) wzorec α -chityny uzyskany po analizie chityny zakupionej w Sigma-Aldrich (numer produktu: C7170-100G, nazwa produktu: Chityna ze szkieletów krabów).

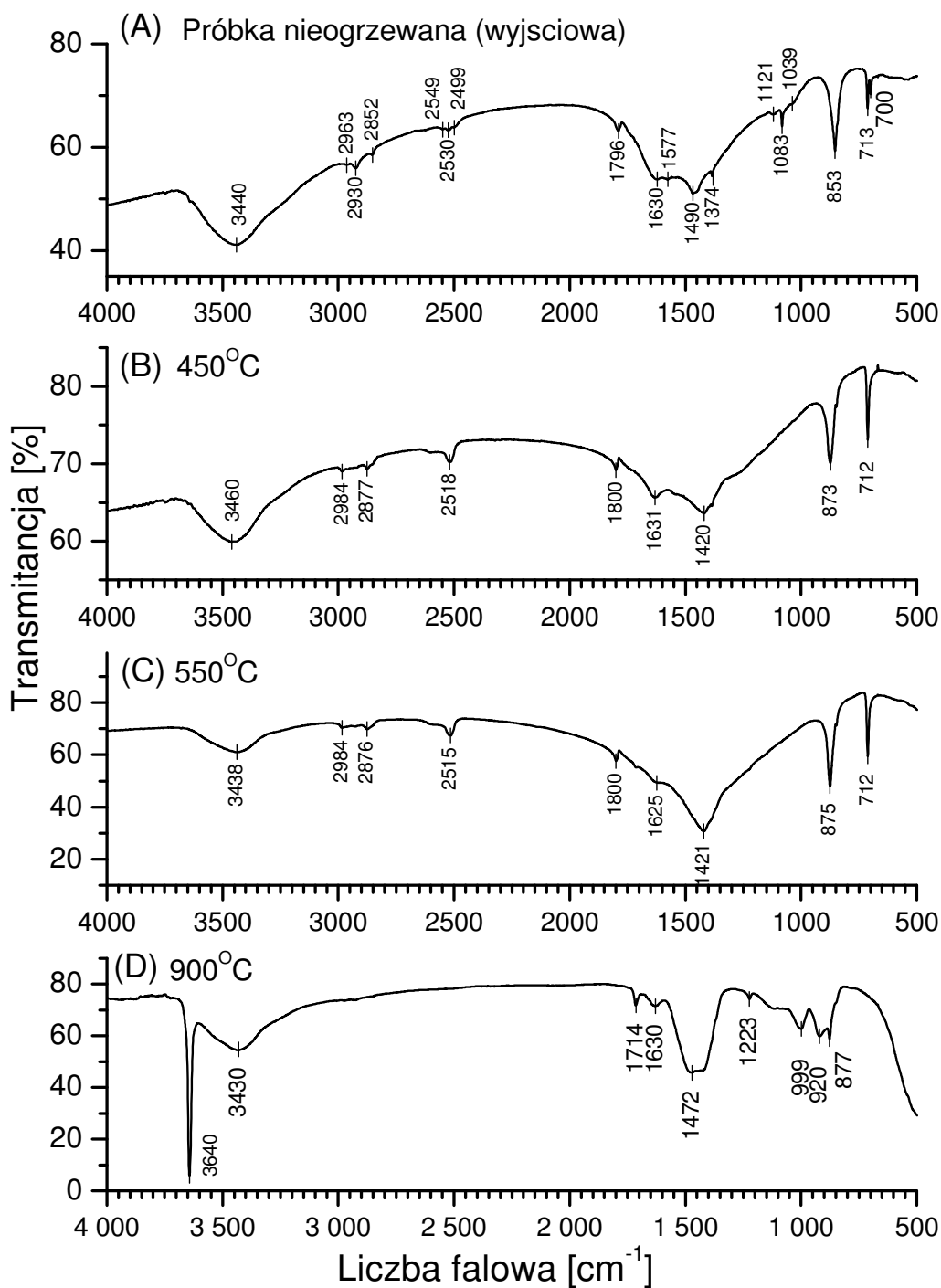
Na widmie IR uzyskanym z tak zdeminalizowanej próbki (Rys. 29a) można rozpoznać pasma charakterystyczne dla chityny (Tab. 3). Uzyskane widmo jest bardzo podobne do spektrum β -chityny występującej w szkielecie kalmara (Rys. 29b):

- a) w zakresie wibracji wiązań amidowych I obserwuje się tylko jedno pasmo 1652 cm^{-1} ,
- b) region wiązań OH i NH ($3600\text{-}3300\text{ cm}^{-1}$) jest bardzo słabo zaznaczony,
- c) pasmo pochodzące od wewnątrz-cząsteczkowego wiązania wodorowego pomiędzy OH(3) i O(5) z pierścienia pojawia się przy liczbie falowej niższej niż w α -chitynie - 3421 cm^{-1} .

Tab. 3 Pasma FTIR obserwowane dla β -chityny wyodrębnionej jako nierozpuszczalna pozostałość ze szkieletu mąty zwyczajnej.

| Absorpcja (cm^{-1}) | Przyporządkowane pasmo | Absorpcja (cm^{-1}) | Przyporządkowane pasmo |
|--------------------------------|---|--------------------------------|---|
| 3421 | $\nu(\text{OH})$ | 1377 | $\delta(\text{CH})$ i $\delta(\text{C}-\text{CH}_3)$ |
| 3280 | $\nu_{\text{as}}(\text{NH})$ | 1317 | $\nu(\text{C}-\text{N})$ i $\delta(\text{NH}, \text{Amid III})$ |
| 3104 | $\nu_{\text{s}}(\text{NH})$ | 1262 | (Amid III) |
| 2966 | $\nu_{\text{as}}(\text{CH}_3)$ | 1229 | (Amid III) |
| 2933 | $\nu_{\text{s}}(\text{CH}_2)$ | 1205 | (Amid III) |
| 2884 | $\nu_{\text{as}}(\text{CH}_3)$ | 1155 | $\nu_{\text{as}}(\text{C}-\text{O}-\text{C}, \text{pierścień})$ |
| 1652 | $\nu(\text{C}=\text{O}, \text{Amid I})$ | 1112 | $\nu(\text{C}-\text{O})$ |
| 1553 | $\nu(\text{C}-\text{N}, \text{C}-\text{N}-\text{H})$ i $\delta(\text{N}-\text{H}, \text{Amid II})$ | 1073 | $\nu(\text{C}-\text{O})$ |
| | | 1033 | $\nu(\text{C}-\text{O})$ |
| 1422 | $\delta(\text{CH}_2)$ | 948 | $\gamma\text{HX}_{(3)}$ |

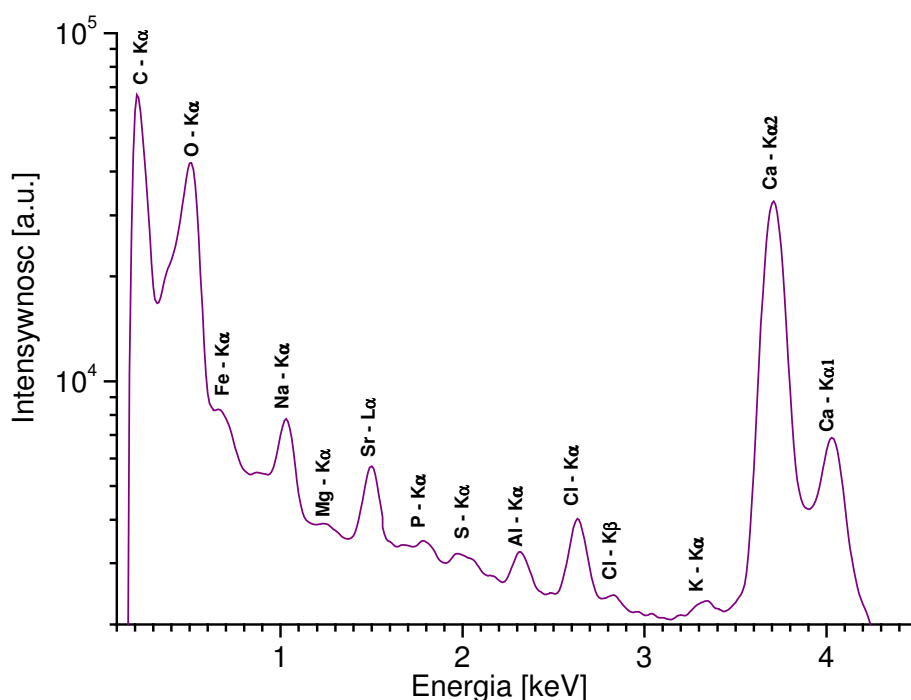
W celu dokonania analizy zmian struktury zachodzących w szkielecie sepii pod wpływem temperatury zarejestrowałem spektra FTIR dla sproszkowanych próbek materiału wyjściowego (wysuszonego na powietrzu) oraz dla próbek wygrzewanych w temperaturze 450°C, 550°C i 900°C. Wyniki pomiarów przedstawiono na Rys. 30. Widmo na Rys. 30a zarejestrowane dla próbki niepoddanej działaniu temperatury ujawnia pasma ν_1 (1083 cm^{-1}), ν_2 (853 cm^{-1}) i zdegenerowane ν_4 (713, 700 cm^{-1}) charakterystyczne dla aragonitu. Po prażeniu próbki w temperaturze 450°C (Rys. 30b) pasma 1083 i 853 cm^{-1} prawie znikły a zamiast dubletu ν_4 , pojawił się singlet przy liczbie falowej 712 cm^{-1} oraz zaobserwowano pasmo przy 875 cm^{-1} . Pasma 712 oraz 875 cm^{-1} są charakterystyczne dla kalcytu. Można na tej podstawie stwierdzić, że nastąpiła przemiana fazowa aragonitu w kalcyt. Wygrzewanie próbki w temperaturze 450°C nie prowadzi do pełnego rozkładu materii organicznej, na spektrum można nadal dostrzec pasma charakterystyczne dla materii organicznej np. 1630 cm^{-1} , amidowe I. Przy temperaturze 550°C (Rys. 30c) pasma te praktycznie znikają. Organiczne składniki szkieletu mąty wykazują względnie dużą stabilność termiczną. Widmo uzyskane dla próbki wygrzewanej w temperaturze 900°C (Rys. 30d) pozwala na identyfikację pozostałości jako tlenek wapnia. Poniżej 900°C następuje chemiczny rozkład zarówno kalcytu jak i materii organicznej.



Rys. 30 Widma FTIR szkieletu sepii: a) materiał wyjściowy (sproszkowana próbka); b) po prażeniu w 450°C przez 3 godz.; c) po prażeniu w 550°C przez 3 godz.; d) pozostałość z termalnej analizy wagowej (TGA) zakończonej w temp. 900°C.

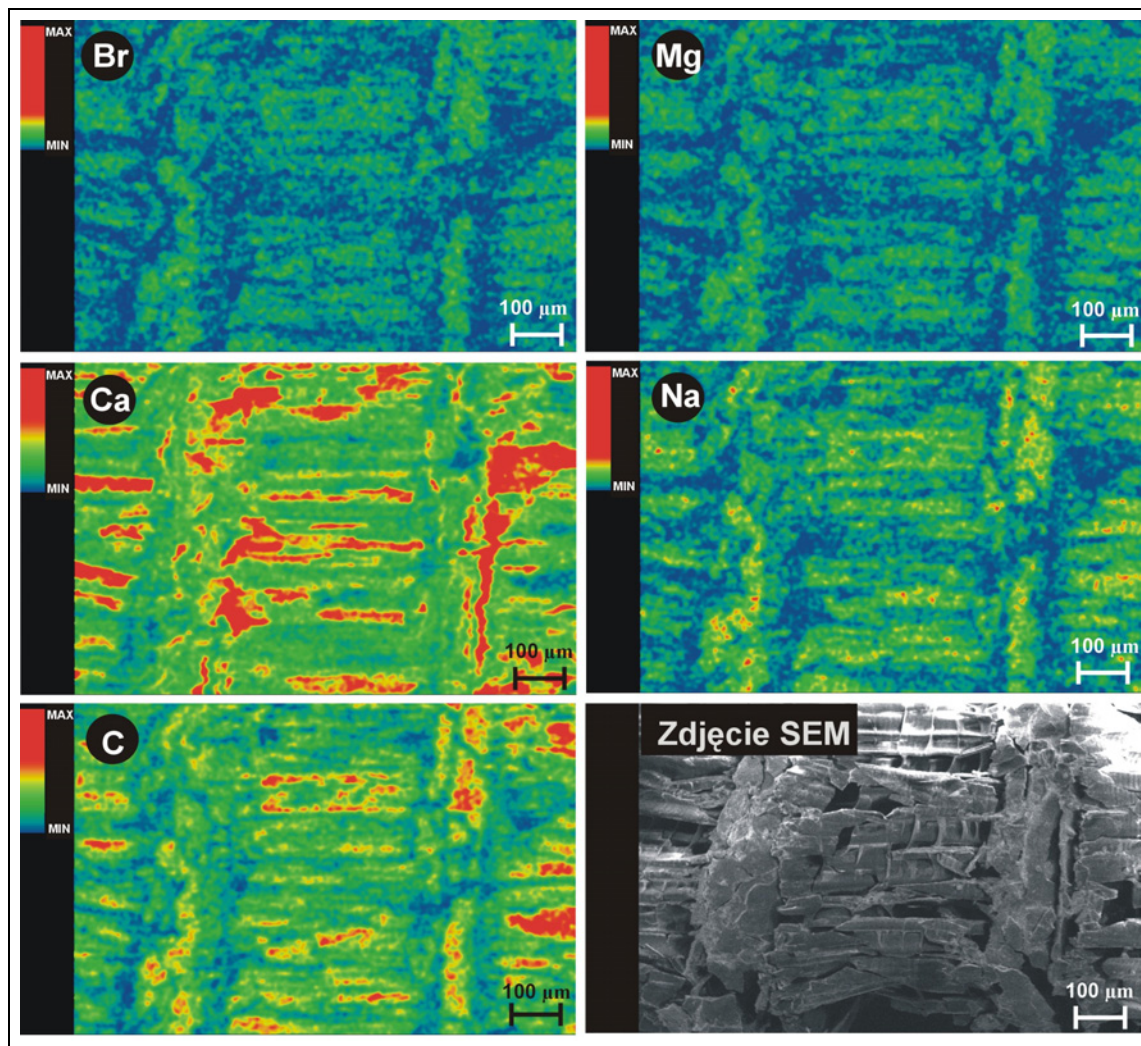
Analiza składu pierwiastkowego oraz rozmieszczenia pierwiastków dla badanej próbki wykonano przy pomocy mikrosondy elektronowej (EPMA) będącej na wyposażeniu Instytutu Ochrony Środowiska KUL. Najpierw wykonałem kilka pomiarów wybranych fragmentów strefy brzusznej (przegród i kolumn) oraz strefy grzbietowej szkieletu w celu wykrycia pierwiastków obecnych w próbkach korzystając z wiązki

elektronów o energii 20 keV. W próbce wykryto obecność następujących pierwiastków: C, O, Fe, Na, Mg, Sr, P, S, Al, Cl, K, Ca.



Rys. 31 Widmo kumulacyjne (wygładzone) uzyskane z pomiaru EPMA dla próbki szkieletu *Sepia Officinalis*.

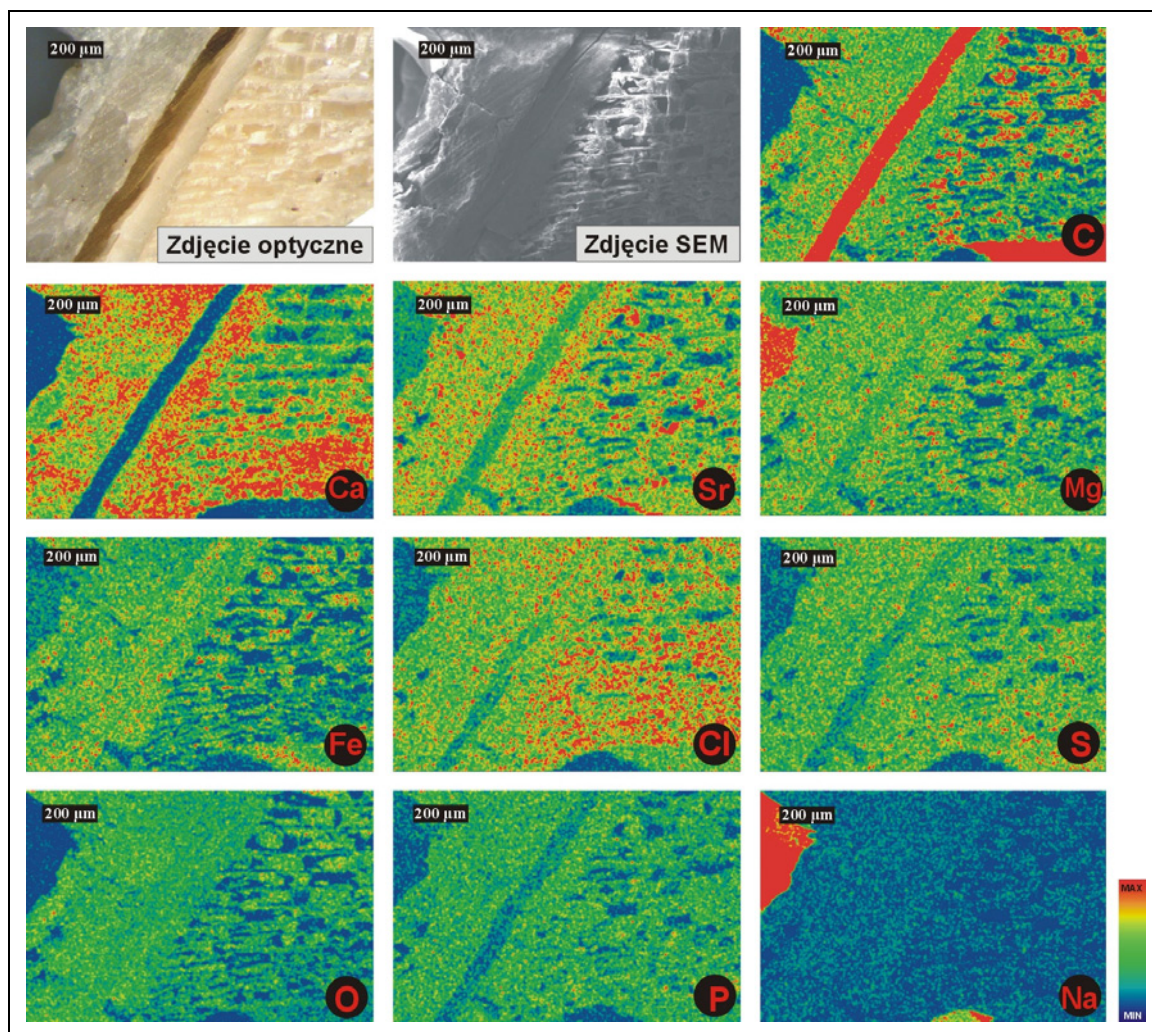
Wymienione pierwiastki były obecne w wybranych fragmentach w różnej ilości, o czym świadczyły różnice intensywności sygnałów mierzonych dla poszczególnych miejsc. Uzyskane wyniki wykazały konieczność przeprowadzenia analizy powierzchniowego rozmieszczenia tych pierwiastków. Tzw. mapy rozkładu pierwiastków wykonano na przekroju poprzecznym próbki. Na [Rys. 31](#) znajduje się widmo kumulacyjne uzyskane podczas zbierania wyników do mapy rozkładu pierwiastków. Do mapowania wybrano dwie strefy w szkielecie. W pierwszym przypadku przeprowadzono analizę fragmentu zawierającego dwie przegrody wraz ze strefą wysoko-skrystalizowaną (kolumnową) w strefie brzusznej ([Rys. 32](#)) a w drugim fragmencie granicznego łączącego warstwę grzbietową z warstwą brzuszną szkieletu sepii wraz z tymi warstwami ([Rys. 33](#)). Powierzchniową dystrybucję Br, Na, Mg, Ca, i C dla przekroju poprzecznego ze strefy brzusznej szkieletu sepii oraz obraz próbki uzyskany w wyniku rejestracji elektronów wstecznie rozproszonych od próbki przedstawiono na [Rys. 32](#).



Rys. 32 Mapy rozkładu stężeń Br, Mg, Ca, Na i C dla przekroju poprzecznego strefy brzusznej mątwy uzyskane za pomocą sondy elektronicznej zestawione z obrazem elektronów wstecznie rozproszonych od badanego fragmentu próbki.

Widać, że miejsca bogate w wapń charakteryzują się niską zawartością Mg, Na, i Br. Wapń jest obecny w miejscach występowania aragonitu. Węgiel jest składnikiem zarówno związków nieorganicznych, jaki organicznych a brom, sód oraz magnez występują przeważnie w miejscach występowania matrycy organicznej.

W przypadku map rozkładu sygnału pierwiastków wykonanych dla sąsiadujących stref grzbietowej i brzusznej (Rys. 33) można zauważyć, że więcej wapnia znajduje się w strefie grzbietowej próbki.

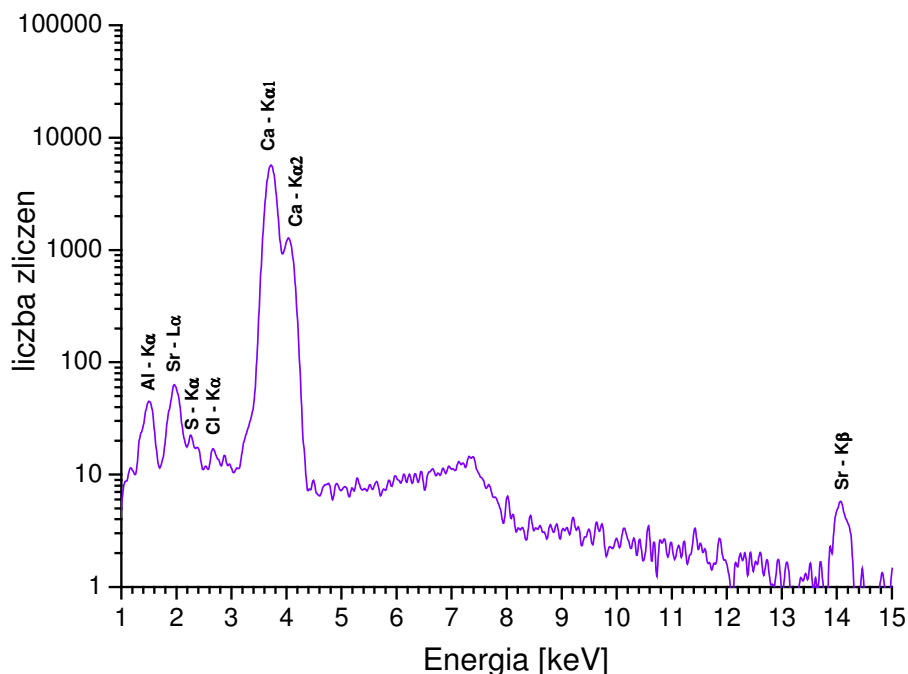


Rys. 33 Mapy rozkładu stężeń pierwiastków wykrytych za pomocą sondy elektronowej (Fe, Ca, C, Mg, Sr, Na, P, O, S, Cl) dla fragmentu szkieletu mątwy zawierającego warstwę brzuszную i grzbietową zestawione z obrazem elektronów wstecznie rozproszonych i zdjęciem optycznym. (G - strefa grzbietowa; B – strefa brzuszna).

Podobną sytuację obserwuje się również w przypadku strontu i żelaza. W strefie brzusznej natomiast znajduje się więcej węgla, siarki i chloru. Rozkład magnezu, tlenu, fosforu i sodu jest jednakowy w obu strefach, jeśli nie liczyć fragmentów w strefie brzusznej, które na wszystkich mapach rozkładu wykazują wartości minimalne, co można przypisać obecności porów lub stref uszkodzonych podczas przygotowywania próbki.

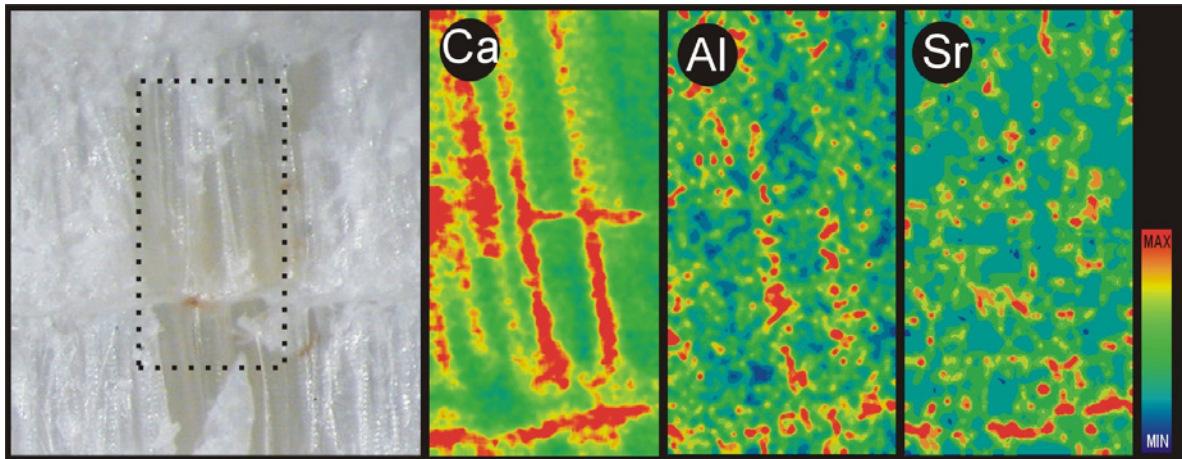
W celu dalszego uzupełnienia informacji o powierzchniowym rozkładzie pierwiastków na przekroju szkieletu mątwy zastosowałem do analizy mikrosondę protonową (μ -PIXE) udostępnioną przez Instytut Fizyki Jądrowej PAN w Krakowie. Chciałem sprawdzić, czy uda się wykryć w badanych próbkach pierwiastki śladowe niewykrywalne za pomocą sondy elektronowej. Sygnały, które otrzymałem z sondy pochodziły od: glinu, strontu, siarki, chloru i wapnia, a więc nie wykryto obecności

żadnego nowego pierwiastka. Rys. 34 przedstawia widmo kumulacyjne zebrane z całego obszaru poddanego analizie uzyskane dla przekroju poprzecznego badanej próbki z zastosowaniem filtru glinowego umieszczonego na drodze optycznej próbka - detektor.



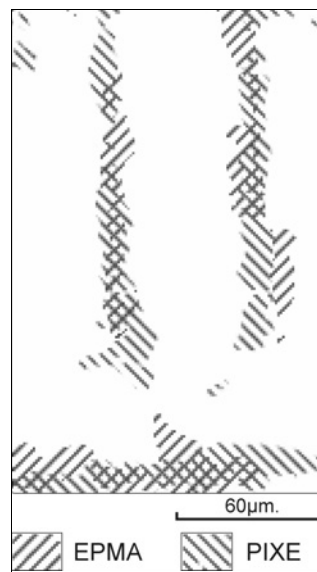
Rys. 34 Widmo kumulacyjne szkieletu mątwy uzyskane z pomiaru PIXE z zastosowaniem filtru Al.

Podczas analizy okazało się, że badana próbka ulega deformacjom pod wpływem działania protonów. Niemniej jednak warto zwrócić uwagę na uzyskane mapy rozkładu dla wapnia, glinu i strontu, które bardzo dokładnie odzwierciedlają strukturę kolumnową pomiędzy przegrodami szkieletu. Rys. 35 przedstawia zdjęcie optyczne badanego fragmentu próbki wraz z mapami rozkładu Ca, Al, Sr. Widać, że próbka uległa uszkodzeniu mimo to można wyraźnie zauważyć kolumny szkieletu na mapach rozkładu przedstawionych pierwiastków. Mapy rozkładu siarki i chloru nie zostały przedstawione ze względu na bardzo niski poziom sygnałów pochodzących od tych pierwiastków.



Rys. 35 Zdjęcie optyczne z zaznaczonym fragmentem analizy oraz mapy rozkładu stężeń wapnia, glinu i strontu na powierzchni przekroju poprzecznego szkieletu *Sepia Officinalis* uzyskane przy pomocy sondy protonowej.

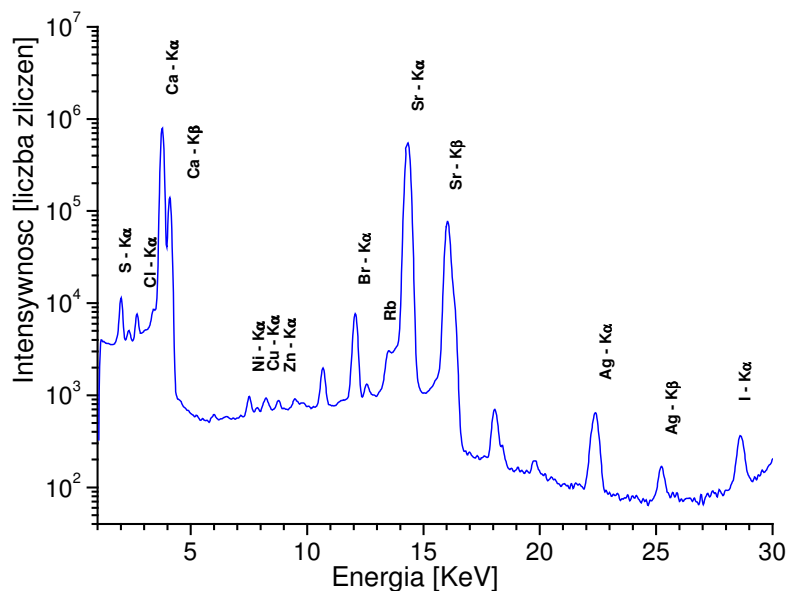
Rozmieszczenie wapnia w szkielecie mątwy uzyskane dzięki analizie PIXE jest bardzo zbliżone do tego uzyskanego za pomocą sondy elektronowej. Nałożone na siebie mapy rozkładu wapnia uzyskane przez te dwie metody są przedstawione na [Rys. 36](#). Pomiary zostały wykonane dla różnych komór a mapy rozkładu nałożono na siebie zachowując ich oryginalne proporcje. Można stwierdzić, że komory są bardzo podobne.



Rys. 36 Nałożone mapy rozkładu wapnia na powierzchni przekroju poprzecznego próbki szkieletu mątwy uzyskane za pomocą sondy protonowej (PIXE) i elektronowej (EPMA).

Dla badanej próbki przeprowadzono również analizę za pomocą rentgenowskiej mikro-fluorescencyjnej sondy ze wzbudzeniem synchrotronowym w Instytucie HASYLAB w Hamburgu.

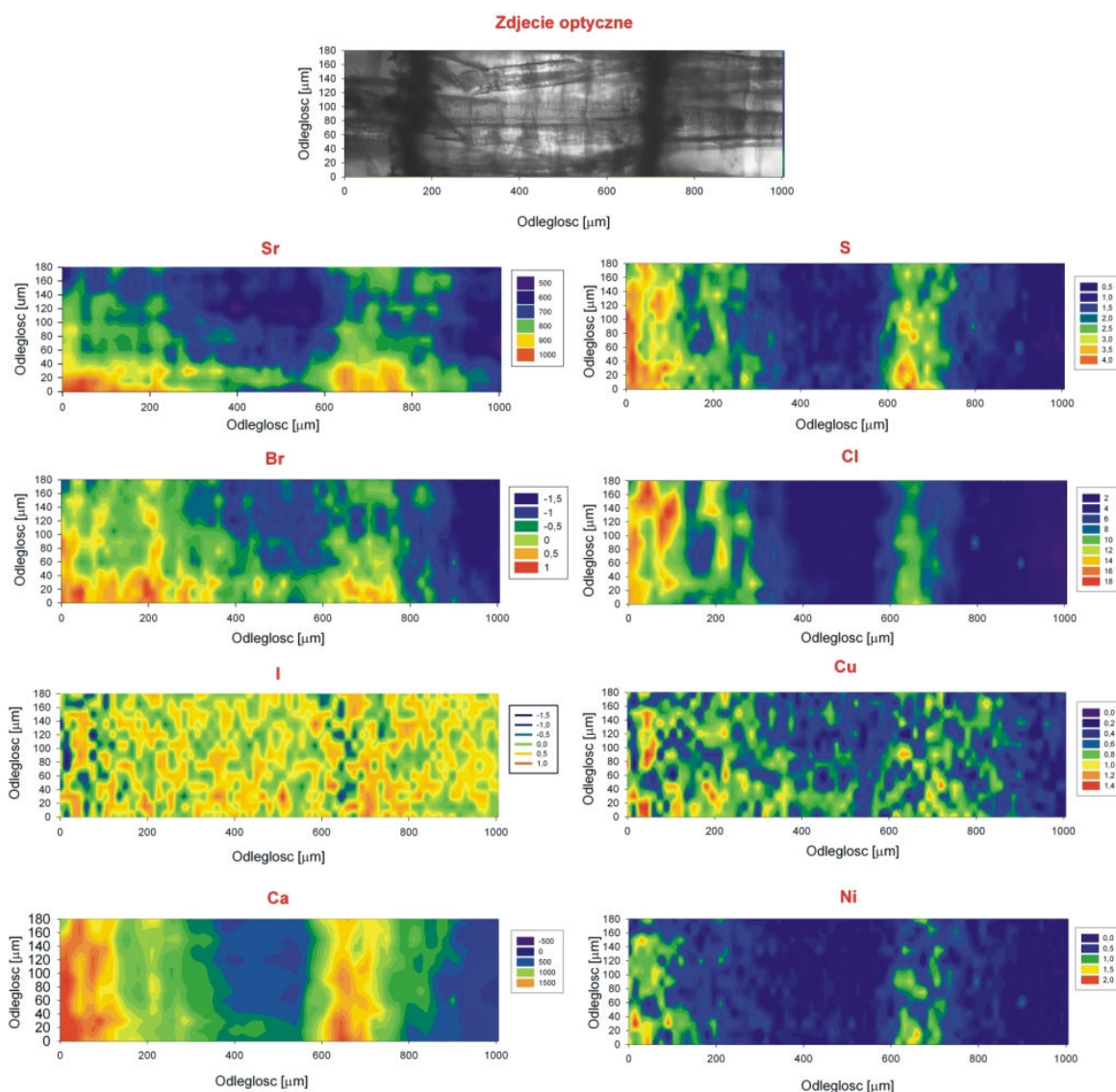
Dzięki tej metodzie oprócz potwierdzenia występowania w próbce: S, Cl, Ca, Zn, Br i Sr udało się zidentyfikować dodatkowo obecność srebra i jodu oraz miedzi i niklu. Rys. 37 przedstawia widmo kumulacyjne uzyskane z pomiaru SRIXE próbki szkieletu *Sepia Officinalis*. Do analizy zastosowano wiązkę promieniowania hamowania o energii 17keV.



Rys. 37 Widmo kumulacyjne uzyskane za pomocą rentgenowskiej mikro-fluorescencyjnej sondy ze wzbudzeniem synchrotronowym próbki szkieletu mątwy.

Ponieważ w trakcie analizy zmieniała się intensywność wiązki promieniowania synchrotronowego, wszystkie wyniki uzyskane dla poszczególnych pierwiastków zostały znormalizowane (wartość sygnału dla każdego pierwiastka w każdym punkcie podzielono przez chwilową wartość intensywności wiązki).

Na Rys. 38 znajdują się mapy rozkładu sygnałów uzyskanych dla: Sr, S, Br Cl, I, Ca Cu i Ni wraz ze zdjęciem optycznym przedstawiającym badany fragment próbki. Mapy te nie uwidaczniają zbyt dobrze kolumn występujących pomiędzy przegrodami. Widoczne są za to dość dobrze przegrody. Może to świadczyć o większej gęstości próbki w strefie przegród. Duży sygnał wapnia w przegrodach świadczy o tym, że na granicy przegrody chitynowej i kolumn znajduje się strefa bogata w wapń. Prawdopodobnie są to warstwy dość dobrze przylegające do warstwy chitynowej. Potwierdza to zdjęcie optyczne próbki, na którym widać, że warstwa przegrody jest jednolita.

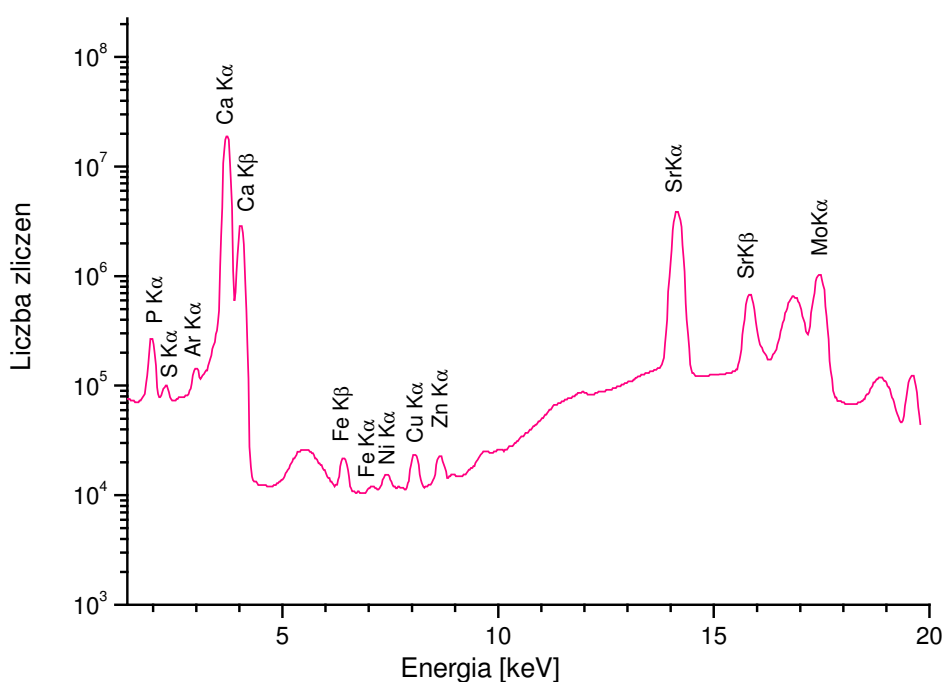


Rys. 38 Mapy rozkładu sygnałów pierwiastków: Sr, S, Br, Cl, I, Cu, Ca i Ni na powierzchni przekroju poprzecznego *Sepia Officinalis* uzyskane za pomocą rentgenowskiej mikro-fluorescencyjnej sondy ze wzbudzeniem synchrotronowym w Instytucie Hasylab w Hamburgu.

Wykonane analizy wykazują, że sygnał strontu w przegrodzie posiada rozkład zbliżony najbardziej do sygnału bromu, szczególnie, jeśli chodzi o poziome natężenia. Rozkłady sygnałów uzyskanych dla siarki i chloru są również skorelowane. Sygnał niklu różni się nieznacznie od wyżej wymienionych. Sygnały Sr, Br, S, Cl, Ca i Ni mają podobny rozkład. Najbardziej zaskakujący jest rozkład sygnałów jodu – pierwiastka często spotykanego w biomateriałach morskich. Nie odzwierciedla on w żaden sposób morfologii próbki i posiada rozkład raczej regularny. Podobnie jest z miedzią, chociaż w tym przypadku można się dopatrzeć korelacji z innymi pierwiastkami.

Dzięki analizie XRF z zastosowaniem detektora konfokalnego możliwe było uzyskanie obrazu trójwymiarowego rozkładu pierwiastków w próbce szkieletu mątwy.

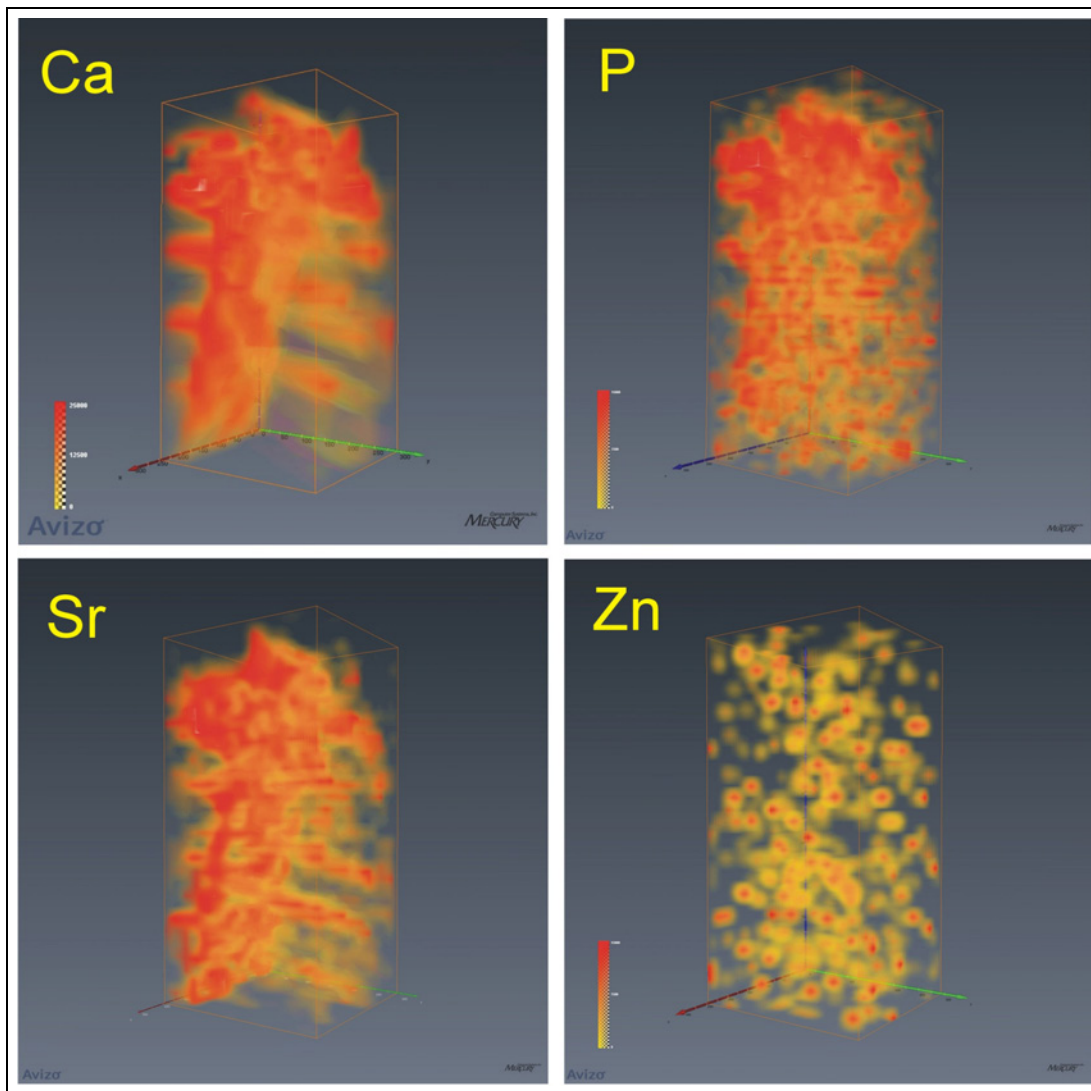
Analizę wykonano w laboratorium Międzynarodowej Agencji Atomowej w Seibersdorf (Austria). Do pomiaru zastosowano tradycyjne źródło promieni rentgenowskich (lampa molibdenowa). Z tego powodu natężenie wiązki nie było zbyt wysokie i wynosiło 40 mA. Przeprowadzenie skanu wglębnego próbki wymagało bardzo długiej ekspozycji próbki w kolejnych punktach pomiaru. Za pomocą tej metody możliwa była detekcja w rozsądnym czasie takich pierwiastków jak: Ca, Sr, P, S, Ar, Fe, Ni, Cu oraz Zn. Rys. 39 przedstawia widmo kumulacyjne uzyskane podczas całego pomiaru wynoszącego ok. 8 godzin. Sygnał molibdenu pochodzi od zastosowanej jako źródło lampy rentgenowskiej i został użyty wyłącznie do kalibracji widma.



Rys. 39 Widmo kumulacyjne uzyskane podczas analizy próbki szkieletu mątwy za pomocą konfokalnej sondy XRF.

Korzystając z programu Spector dokonano obróbki widm uzyskanych w kolejnych punktach pomiarowych i za pomocą programu Avizo wykonano trójwymiarową wizualizację wykrytych pierwiastków, którą przedstawiono w postaci zrzutów wykresów trójwymiarowych (Rys. 40) oraz filmów, które znajdują się na załączonym do pracy CD. Kolejne filmy przedstawiają widoczne na zdjęciach obracające się rozkłady 3D wykrytych pierwiastków dla badanego fragmentu próbki. Film_1a(Ca) oraz Film_1b(Ca) zawiera rozkład przestrzenny wapnia uzyskany z sumy sygnałów Ca-K α i Ca-K β oraz tylko Ca-K α . Film_2(Sr) zawiera rozkład strontu uzyskany z pikiny dla sygnału Sr-K α . Film_3(Zn)

przedstawia rozkład cynku dla sygnału Zn-K α a Film_4(P) dla P-K α . Film_5(Ca_Sr) przedstawia zestawione ze sobą rozkłady 3d najintensywniejszych sygnałów Sr i Ca. W analizie wykryto również takie pierwiastki jak Cu, Fe, S, Ar i Ni, które miały rozkład przestrzenny bardzo zbliżony do rozkładu cynku.

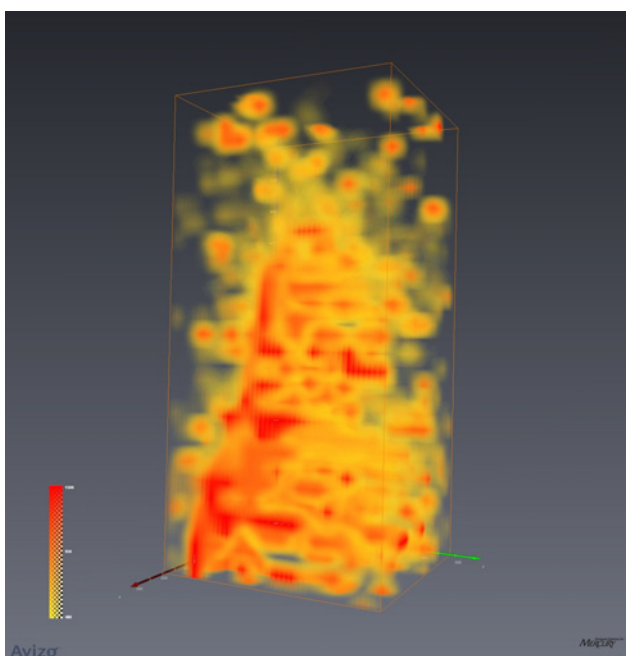


Rys. 40 Trójwymiarowe przestrzenne rozmieszczenie pierwiastków: Ca, P, Sr oraz Zn w próbce *Sepia Officinalis* wykrytych metodą XRF.

Uzyskane wyniki rozkładu 3D są dobrym uzupełnieniem wyników z sondy: synchrotronowej, elektronowej i protonowej. Za pomocą XRF (synchrotronowe wzbudzenie) nie udało mi się zarejestrować kolumn. Za pomocą sondy elektronowej ze względu na nierówność powierzchni (szczególnie kolumn) wyniki nie obrazowały kształtu i wyglądu kolumn. Na uzyskanych rozkładach przestrzennych pierwiastków widoczne są: zarówno przegroda jak i kolumny, chociaż dość słabo. Ta słabo widoczna strefa kolumnowa próbki ze względu na jej mniejszą gęstość mogła być dobrze penetrowana

przez promienie X, dzięki czemu udało się odtworzyć trójwymiarową morfologię próbki. Wysokie stężenie Ca i Sr w strefie przegrody można wyjaśnić większą gęstością przegród składających się po części z warstw aragonitowych.

Rys. 40 przedstawia trójwymiarowe obrazy rozmieszczenia wapnia, strontu, cynku oraz fosforu. Najbardziej rzuca się w oczy dobre odwzorowanie struktury szkieletu. Na rozkładach Sr i Ca widoczna jest przegroda oraz przystające do niej kolumny. Dokładnie można to obejrzeć na załączonym materiale filmowym. Sr i Ca są najbardziej skorelowane ze sobą. Rozkład 3D fosforu uzyskany z piksu P-K α wykazuje, że więcej fosforu znajduje się w przegrodzie niż w kolumnach. Rozkład cynku jest raczej jednorodny w całej próbce, bez rozróżniania kolumn i przegród. Rozkład miedzi jest identyczny z rozkładem cynku.



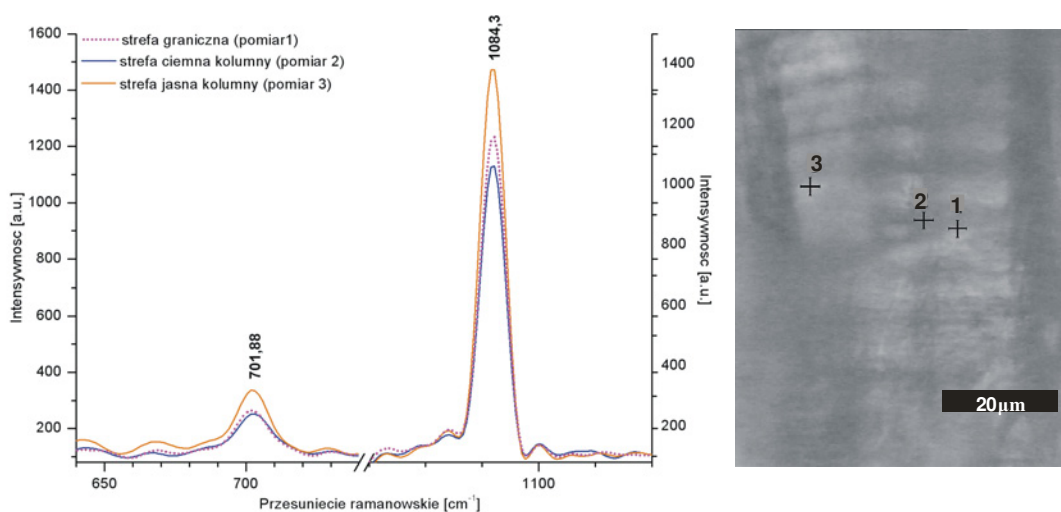
Rys. 41 Trójwymiarowy rozkład parametru termometrycznego Sr/Ca w badanej próbce szkieletu mątwy zwyczajnej.

Dla badanej próbki wykonano również obliczenie stosunku termometrycznego Sr/Ca, żeby zaobserwować, czy nie zarysuje się jakaś różnica w zmianach temperatur tworzenia w poszczególnych strefach próbki. Wynik obliczeń przedstawiono w postaci obrazu trójwymiarowej dystrybucji parametru Sr/Ca (Rys. 41) oraz filmu Film_6(Sr_przez_Ca).

Obserwując wykres i materiał filmowy można stwierdzić, że w strefie przegrody stosunek Sr/Ca osiąga wyższe wartości. W strefie, gdzie występują kolumny nie widać już ścisłego związku Sr/Ca z kształtem kolumny. Wydaje się jednak, że w miejscach gdzie występują

kolumny omawiany stosunek zmienia się periodycznie tzn. występują segmenty odzwierciedlające podstrukturę kolumn w postaci naprzemiennych cienkich warstw chitynowych i grubszych aragonitowych.

W celu określenia rozkładu przestrzennego głównych składników mineralnych i organicznych w szkielecie mątwy próbki poddano analizie ramanowskiej. Wielką zaletą tej metody jest możliwość skupiania wiązki lasera do średnicy ok. $1\mu\text{m}$, dzięki czemu możliwe są analizy bardzo małych punktów oraz możliwość prowadzenia analiz liniowych i powierzchniowych.



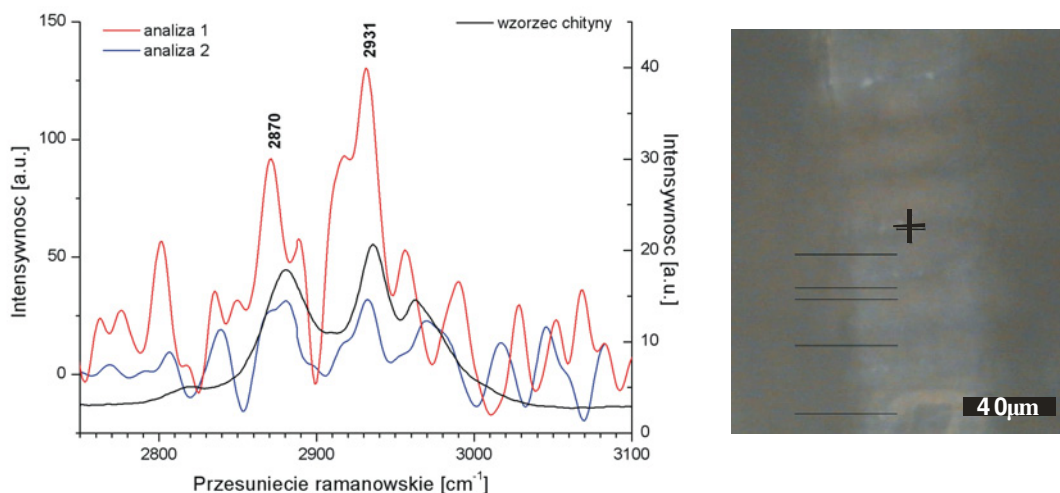
Rys. 42 Analiza za pomocą spektrometru ramanowskiego (obszar kolumny). Uzyskane widma (z lewej) oraz zdjęcie z miejscami, gdzie przeprowadzono pomiary punktowe (z prawej).

Na początku przeprowadziłem dla badanej próbki w strefie kolumny analizy punktowe. Pomiary były wykonane przy zastosowaniu soczewek o powiększeniu 100X, w trzech różnych miejscach (Rys. 42), ale przy tym samym czasie ekspozycji próbki (w 3 seriach po 15 sekund). Miejsce nr 1 jest z pogranicza dwóch stref, widocznym na zdjęciu jako ciemniejsza i jaśniejsza. Miejsce nr 2 leży w strefie ciemnej, natomiast miejsce nr 3 w jasnej.

Piki o najwyższej intensywności $701,88\text{ cm}^{-1}$ oraz $1084,3\text{ cm}^{-1}$ (charakterystyczne dla aragonitu) zostały zanotowane podczas pomiaru 3 w strefie jasnej na kolumnie a najniższej intensywności dla pomiaru 1 i 2 czyli w strefie ciemnej i granicznej. Może to wskazywać, że więcej aragonitu znajduje się w jaśniejszych fragmentach, a fragmenty

ciemne zawierają oprócz aragonitu jeszcze inny związek chemiczny zmieniający właściwości optyczne próbki.

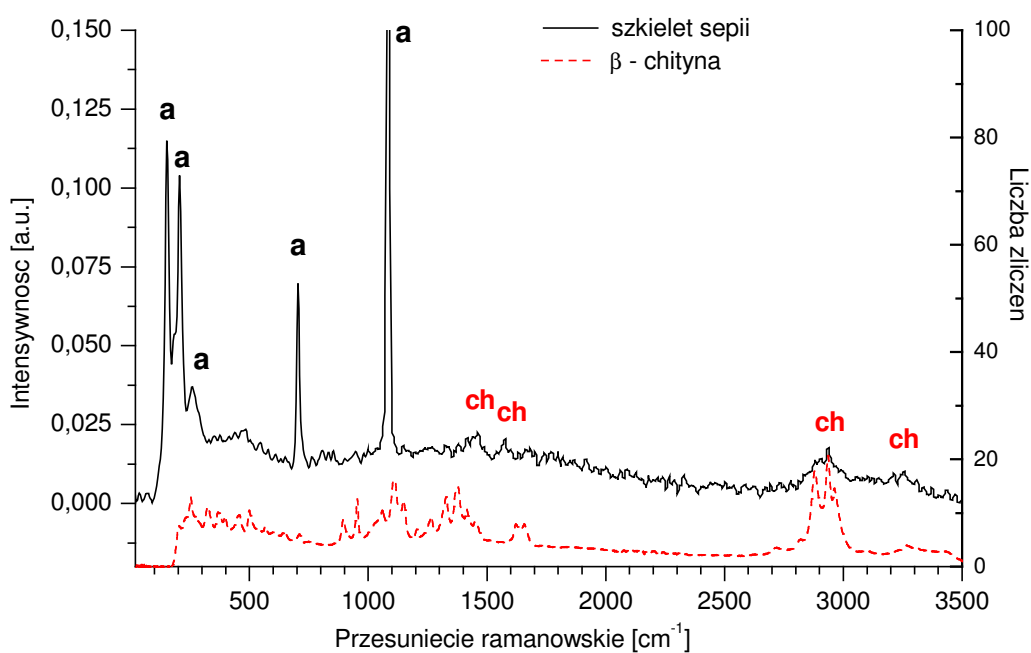
Ponieważ w strefie ciemnej kolumny podejrzewałem obecność związków organicznych przeprowadziłem w tym miejscu (zaznaczony na zdjęciu punkt – Rys. 43) jeszcze dwa pomiary z różnym czasem ekspozycji. Pierwszą analizę wykonano w 4 seriach po 40 sekund, natomiast drugą analizę wykonano w 3 seriach po 15 sekund.



Rys. 43 Analiza za pomocą spektrometru ramanowskiego (obszar kolumny – strefa ciemna). Uzyskane widma (z lewej) wraz ze wzorcem chityny oraz zdjęcie z zaznaczonym punktem pomiaru (z prawej).

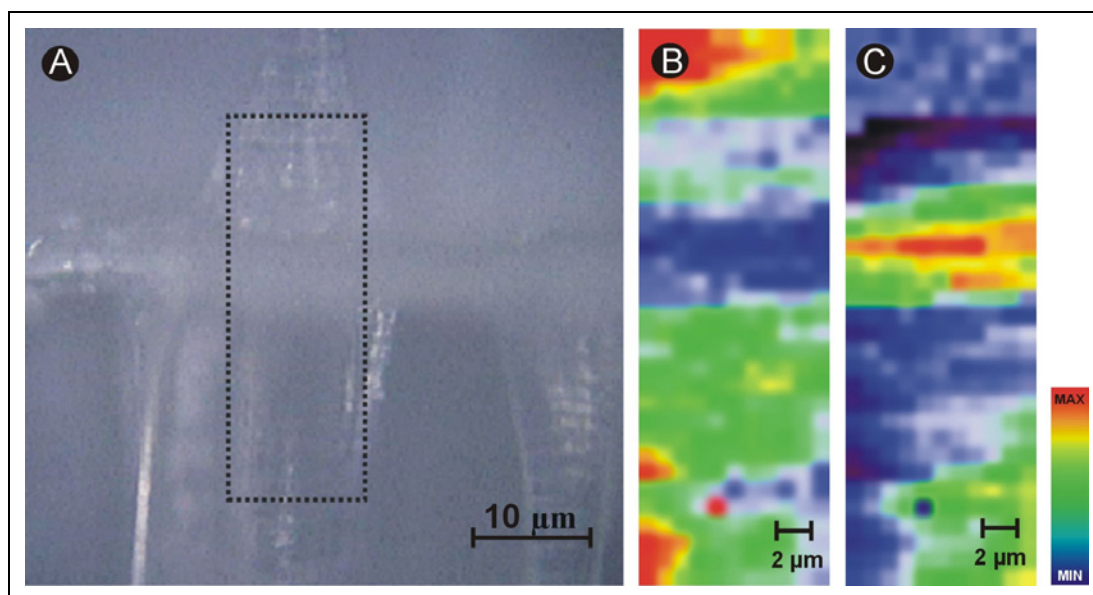
Dłuższy czas ekspozycji próbki na promieniowanie wpłynął korzystnie na uzyskane wyniki. W analizie pierwszej piki dla chityny (pasma OH - 2870 cm⁻¹ oraz CH₂ - 2931cm⁻¹ od cukrów) są wyraźnie wyeksponowane. W analizie drugiej korelacja ze wzorcem też jest widoczna, jednak piki są nieostre a ich intensywność jest nieduża.

Kolejnym etapem było uzyskanie map rozkładu wykrytych związków (aragonitu i chityny) w szkielecie mątwy. Uzyskane spektrum zebrane dla zakresu od 0 – 3500 cm⁻¹ (Rys. 44) uwidacznia pasma charakterystyczne dla aragonitu 1090, 704, 212 i 160 cm⁻¹ z kolei pasma 1360, 1660 i 2870 cm⁻¹ mogą być przypisane chitynie.



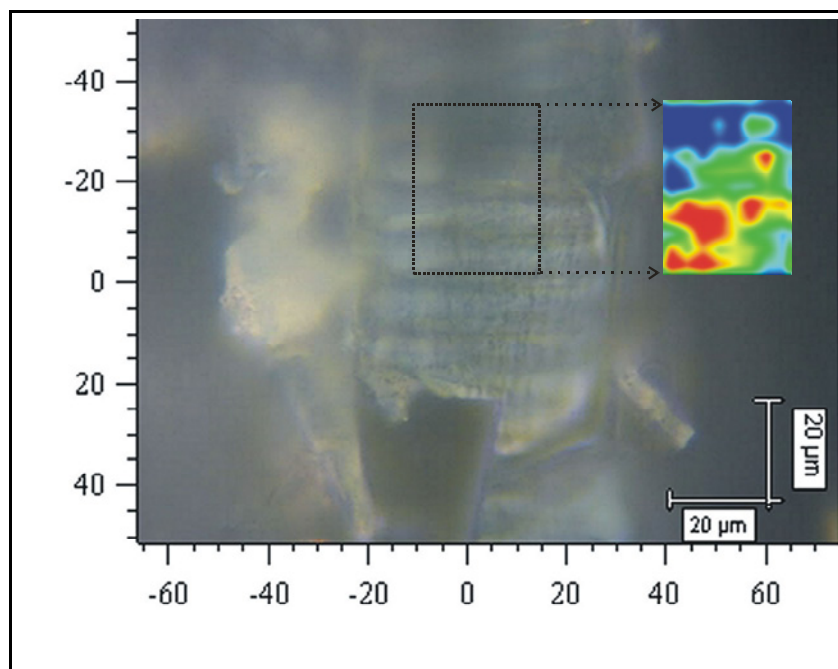
Rys. 44 Widmo ramanowskie uzyskane dla szkieletu sepii; a- piki od aragonitu, ch - piki od chityny) wraz ze wzorcem chityny (<http://www.models.kvl.dk/users/engelsen/specarb/specarb.html>).

Ramanowskie mapy rozkładu wykonane dla częstotliwości 1100 i 1660 cm^{-1} są przedstawione razem ze zdjęciem optycznym pokazującym miejsce przeprowadzania analizy powierzchniowej (Rys. 45).



Rys. 45 Mapy rozkładu aragonitu i chityny w szkielecie sepii. Zdjęcie optyczne przekroju poprzecznego z zaznaczonym obszarem analizy (a), mapa rozkładu aragonitu (b) i mapa rozkładu chityny (c).

Warstwy aragonitowe i chitynowe można łatwo dostrzec. Najbogatsze w aragonit okazały się miejsca wzdłuż kolumny, podczas gdy najuboższe wzdłuż przegród.

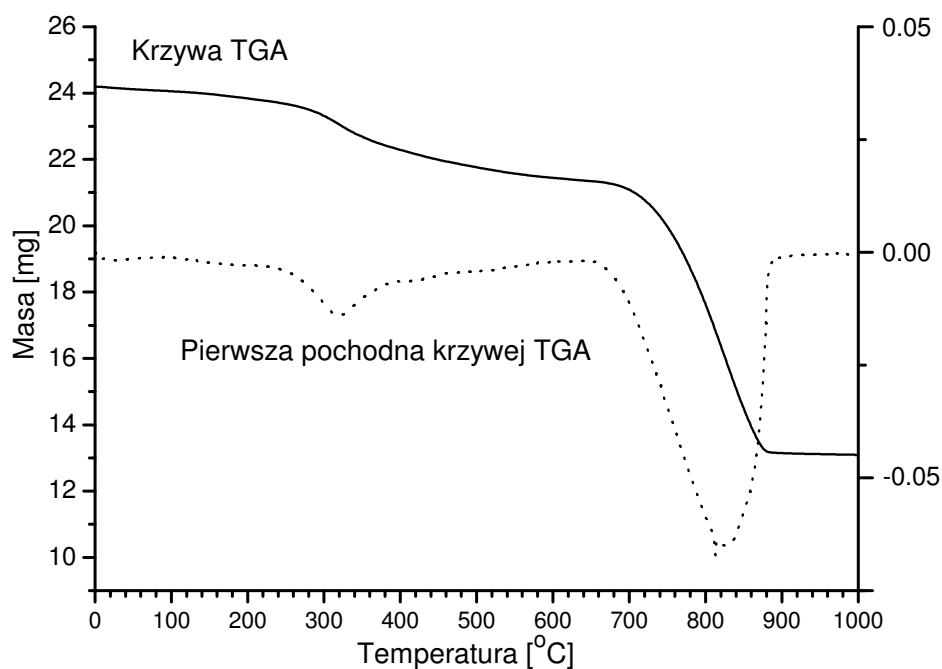


Rys. 46 Mapa rozkładu aragonitu w kolumnie nałożona na zdjęcie optyczne uzyskane dla badanego fragmentu.

Mapa rozkładu aragonitu dla piku 1090 cm^{-1} wykonana dla fragmentu kolumny (Rys. 46) pokazuje wyraźnie, że jaśniejsze fragmenty kolumny zawierają większe ilości aragonitu, co wcześniej sugerowała analiza punktowa.

Żeby oznaczyć ilość składników organicznych w próbce oraz zbadać termiczną stabilność biomateriału i zmiany zachodzące w szkielecie, wywołane przez wzrost temperatury zastosowałem termiczną analizę wagową. Krzywa TGA oraz krzywa pierwszej pochodnej przedstawione na Rys. 47 pokazują, że próbka traci wagę w sposób ciągły do temperatury ok. 225°C . Powyżej 225°C spadek masy jest skokowy, co jest spowodowane rozkładem materii organicznej. Próbka traci ok. 9.8 % masy podczas tej przemiany. Rozkład matrycy organicznej kończy się w temperaturze ok. 575°C a zaczyna się rozkład węglanu wapnia w temperaturze ponad 600°C . Temperatura maksymalna rozkładu matrycy organicznej przy zastosowanym tempie wzrostu temperatury wielkości gradientu temperatury $3^{\circ}\text{C min}^{-1}$ wynosiła 319°C i jest mniejsza niż ta ustalona dla β -chityny przez Janga (Jang et al. 2004) (338°C), która została wyznaczona w wyniku analizy TGA prowadzonej w przepływie azotu. Dodatkowo przesunięcie piku temperatury maksymalnej rozkładu w kierunku niższych temperatur może być spowodowane przez

obecność w badanym materiale składników organicznych mniej stabilnych niż chityna. Wartość T_m rozkładu węglanów wynosiła 827°C .



Rys. 47 Krzywa TGA uzyskana dla próbki szkieletu *Sepia Officinalis*.

Procentowe oznaczenie średniej zawartości pierwiastków w próbkach zostały wykonane w Instytucie Materiałów w Barcelonie metodą emisyjnej spektrometrii atomowej ze wzbudzeniem w plazmie - ICP-AES. Wykonano analizy na zawartość: Na, Mg, K, Fe, Sr. Stężenia przeanalizowanych pierwiastków w próbce sepia znajdują się w Tab. 4.

Tab. 4 Stężenia pierwiastków w szkielecie mątwy oznaczone metodą ICP-AES.

| Pierwiastek | Stężenie [%] σ |
|-------------|-----------------------|
| Na | $1.0 \pm 0,042$ |
| Mg | $0.133 \pm 0,005$ |
| K | $0.26 \pm 0,009$ |
| Fe | $0.03 \pm 0,002$ |
| Sr | $0.28 \pm 0,007$ |

Całkowita zawartość azotu, węgla i wodoru została oznaczona w próbkach szkieletu za pomocą analizatora CHN. Tab.5 zawiera wyniki tych analiz.

Tab. 5 Stężenia węgla, azotu i wodoru w próbce szkieletu *Sepia Officinalis* oznaczone za pomocą analizatora pierwiastków tworzących związki lotne.

| Pierwiastek | Stężenie [%] $\pm\sigma$ |
|-------------|--------------------------|
| Azot | 1.42 \pm 0,07 |
| Węgiel | 15.36 \pm 0,97 |
| Wodór | 0.68 \pm 0,05 |

Porównując oznaczoną zawartość C w próbkach wynoszącą 15.36 % z teoretyczną zawartością C w węglanie wapnia 12.00 % i 47.29 % w chitynie, maksymalne zawartości CaCO₃ i chityny w szkielecie mogą być ustalone na odpowiednio na poziomie 90.5 % i 9.5 %. Jednak zawartość azotu pochodzącego z chityny powinna wynosić ok. 0.65 %, podczas gdy jest go 1.48 %. Ta podwyższona ilość może być spowodowana obecnością niektórych białek trudno wykrywalnych z zastosowaniem technik stosowanych w tej pracy, ale wykrytych i opisanych w pracy Dauphin (Dauphin and Marin 1995). Muszą być one zbudowane z bardzo lekkich aminokwasów, żeby zawierać tę brakującą ilość azotu, oznaczoną na analizatorze CHN. Prawdopodobnie niektóre pasma obserwowane w zakresie małych katów na dyfraktogramach i nienależące do chityny mogą być związane z obecnością tych protein.

Podsumowanie

Szkielet wewnętrzny *Sepia Officinalis* poddano badaniu i za pomocą różnych uzupełniających się technik mikroskopowych i analitycznych w celu określenia jego struktury i składu chemicznego. Na początku dla badanych próbek przeprowadzono obserwację mikroskopową, która wykazała, że warstwa brzuszna szkieletu mątwy składa się z ze specyficznych warstw tworzących tzw. przegrody i kolumny. Dodatkowo dało się zauważyć na kolumnach warstwy tworzące bardzo uporządkowaną podstrukturę.

Analizy chemiczne i fizykochemiczne pozwoliły na ustalenie struktury, składu i rozmieszczenia poszczególnych składników chemicznych (pierwiastków lub związków) znajdujących się w szkielecie. Dla próbki szkieletu przeprowadzono analizy jakościowe na obecność pierwiastków metodami EPMA, XRF, SRIXE i PIXE, poprzez wzbudzenie charakterystycznego promieniowania X pierwiastków. Metody te pozwoliły również na ocenę rozkładu pierwiastków w reprezentatywnych miejscach na przekrojach poprzecznych strefy brzusznej bądź grzbietowej szkieletu. Analizy metodą spektrometrii Ramana miały na celu identyfikację i określenie powierzchniowego rozkładu związków tworzących szkielet na jego przekroju poprzecznym. W technice tej rejestruje się sygnały

pochodzące od drgań wiązań (ich energia jest charakterystyczna i zależna od otoczenia atomowego) i na tej podstawie dokonuje się identyfikacji związków. W sytuacji, gdy możliwa była identyfikacja na podstawie wzorca, było to wykonywane. Dyfraktometrię rentgenowską – XRD, spektrofotometrię w podczerwieni - FTIR oraz częściowo spektrometrię Ramana wykorzystano do analiz strukturalnych. Dla próbek wykonano również analizy ilościowe CHN, AAS oraz ICP-AES oraz TGA.

Obecność głównego nieorganicznego składnika szkieletu, jakim jest aragonit – polimorficzna odmiana węgla wapnia oraz β -chityny tworzącej rusztowanie konstrukcji szkieletu wykryto metodą dyfrakcji rentgenowskiej i spektrofotometrii w podczerwieni. Duża intensywność refleksu 002 uzyskanego za pomocą dyfraktometru rentgenowskiego dla analizowanej płaszczyzny, zorientowanej równoległe do przegrody a prostopadłej do kolumn badanej próbki pozwoliła na ustalenie preferowanej orientacji kryształitów aragonitu w kolumnach jako $\langle 001 \rangle$.

Podczas analiz EPMA w próbkach szkieletu wykryto: C, O, Fe, Na, Mg, Sr, P, S, Al, Cl, K, Br i Ca. Dla wybranych pierwiastków wykonano mapy rozkładu. Na fragmencie przekroju strefy brzusznej (fragmakonu) zawierającym dwie przegrody z łączącymi je kolumnami rozkłady bromu, sodu, magnezu, wapnia i węgla wykazują, że miejsca bogate w wapń mają niską zawartość magnezu, sodu i bromu. W przypadku map rozkładu sygnału pierwiastków, wykonanych dla sąsiadujących stref grzbietowej i brzusznej można zauważyć natomiast, że więcej wapnia znajduje się w strefie grzbietowej próbki. Podobną sytuację obserwuje się również w przypadku strontu i żelaza. W strefie brzusznej natomiast znajduje się więcej węgla, siarki i chloru.

Uzupełniająca analiza przeprowadzona za pomocą sondy protonowej wykazała obecność glinu, strontu, siarki, chloru i wapnia. Rozmieszczenie wapnia ustalone na przekroju poprzecznym szkieletu dzięki tej analizie okazało się być bardzo zbliżone do tego uzyskanego za pomocą sondy elektronowej. Nałożone na siebie mapy rozkładu wapnia uzyskane tymi metodami uwidaczniają szereg powtarzających się fragmentów tworzących komory szkieletu.

Dzięki zastosowaniu metody SRIXE ze wzbudzeniem pierwiastków promieniowaniem rentgenowskim pochodzącym ze źródła synchrotronowego, udało się zidentyfikować dodatkowo w próbkach obecność srebra i jodu oraz miedzi i niklu. Mapy wykonane dla pierwiastków wykrytych tą metodą nie odwzorowują zbyt dobrze kolumn występujących pomiędzy przegrodami w badanej próbce. Widoczne są za to dobrze

przegrody, co świadczy o dużej gęstości próbki w strefie przegród. Duży sygnał wapnia w przegrodach świadczy o tym, że na granicy warstwy chitynowej i kolumn znajduje się bardzo cienka warstwa bogata w węglan wapnia, który dobrze przylega do chityny tworząc razem z chityną przegrodę. Potwierdza to zdjęcie optyczne próbki, na którym widać, że warstwa przegrody jest jednolita.

Metoda XRF pozwoliła na wykrycie w próbce sepii: Ca, Sr, P, S, Ar, Fe, Ni, Cu oraz Zn. Dzięki zastosowaniu detektora konfokalnego możliwe było uzyskanie obrazu trójwymiarowego rozkładu pierwiastków w próbce, który stanowi bardzo dobre uzupełnienie wyników uzyskanych metodami: EPMA, PIXE i SRIXE. Na uzyskanych rozkładach przestrzennych pierwiastków widoczne są: zarówno przegroda jak i kolumny, chociaż dość słabo. Ta słabo widoczna strefa kolumnowa próbki, ze względu na jej mniejszą gęstość mogła być dobrze penetrowana przez promienie X, dzięki czemu udało się odtworzyć trójwymiarowy rozkład pierwiastków występujących w przegrodzie i w kolumnach, a szczególnie wapnia i strontu. Wysokie stężenie tych pierwiastków w strefie przegrody można wyjaśnić większą gęstością przegród składających się po części z warstw wapiennych. Na podstawie uzyskanych wyników możliwe było również ustalenie stosunku Sr/Ca uważanego za chemiczny wskaźnik temperaturowy i przedstawienie wyniku w formie trójwymiarowej. Na uzyskanym filmie widać, że kolumny składają się z segmentów.

Analizy za pomocą spektrometru Ramana pozwoliły na ustalenie rozkładu przestrzennego głównych składników mineralnych i organicznych w badanym szkielecie. Mapy rozkładu wykrytych związków na przekroju zawierającym przegrodę z przylegającą do niej kolumną wykazały, że kolumny są bogatsze w aragonit niż przegrody. Odwrotnie jest dla β -chityny, co świadczy o tym, że rusztowanie, które stanowi chityna jest otoczone warstwami aragonitowymi a warstwy chityny oraz aragonitu przeplatają się nawzajem. Mapa rozkładu aragonitu wykonana natomiast dla fragmentu kolumny wykazuje wyraźnie, że jaśniejsze fragmenty kolumny widoczne na zdjęciach optycznych zawierają większe ilości aragonitu niż ciemniejsze.

Termalna analiza wagowa (TGA) wykazała, że materiał szkieletu rozkłada się w dwóch etapach. Pierwszy spadek masy ($T_m = 319^\circ\text{C}$) był spowodowany przez spalenie materii organicznej obecnej w próbce a drugi rozkładem aragonitu ($T_m = 827^\circ\text{C}$). Dzięki tej metodzie udało się ustalić zawartość matrycy organicznej w próbkach na poziomie

9.8% z czego większość stanowi β -chityna. Jest to wynik bardzo dobrze uzupełniający się z wynikami analiz C:H:N (Tab. 5).

Warto wspomnieć, że wyniki uzyskane podczas analiz technikami: PIXE, EPMA, SRIXE i XRF pokrywają się tylko częściowo. Bardzo często natomiast uzyskujemy wyniki, które się uzupełniają. W przypadku analizy szkieletu sepii zależało mi na detekcji wszystkich składników próbki, co nie byłoby możliwe przy zastosowaniu wyłącznie jednej z omawianych metod. Analiza za pomocą sondy elektronowej jest jedyną, na której można uzyskać sygnał węgla, tlenu i magnezu. Metody SRIXE i PIXE są bardziej odpowiednie do detekcji cięższych pierwiastków. Metoda PIXE ponadto ze względu na pracę w próżni i mniejszą drogę optyczną próbka-detektor pozwala na detekcję nawet śladowej ilości pierwiastków w próbkach. Niestety w przypadku przeprowadzonych analiz za pomocą sondy protonowej problemem była zbyt niska rozdzielczość spektralna detektora w zastosowanym urządzeniu. Za najciekawsze i wnoszące najwięcej informacji można uznać jednak pomiary za pomocą sondy XRF z zastosowaniem lampy rentgenowskiej. Pomimo zastosowania wiązki o dużej średnicy wynoszącej 15 μ m i niskiej intensywności dzięki zastosowaniu detektora konfokalnego udało się przeprowadzić analizę wglębną próbki pozwalającą na zobrazowanie trójwymiarowego rozkładu pierwiastków. Niestety prowadzenie analizy w powietrzu oraz sama natura próbki powodują, że nie jest możliwa detekcja lżejszych pierwiastków takich jak magnez, potas i sód, których sygnały są absorbowane w powietrzu na drodze do detektora.

Omawiając powyższe techniki warto też wspomnieć, że sama morfologia próbki ma duży wpływ na skuteczność analizy tymi metodami. Próbka szkieletu mątwy jest porowata, krucha i nierówna na powierzchni, przez co niemożliwe jest przygotowanie zglądu polerskiego do analiz za pomocą sond, co szczególnie odbija się na jakości pomiarów za pomocą skaningowego mikroskopu elektronowego. Dodatkowo, zastosowanie próżni powoduje, że kolumny skruszone podczas cięcia przy powierzchni próbki są wrywane a badana powierzchnia ulega destrukcji i następuje zafałszowanie wyników, szczególnie podczas mapowania i skanów liniowych. W przypadku analizy za pomocą sondy protonowej również duża energia (2MeV) protonów z wiązki przyczynia się do wypalenia badanej powierzchni przekroju szkieletu mątwy do tego stopnia, że niemożliwy był drugi pomiar w tym samym punkcie. Analizy SRIXE i XRF nie pozwalają na detekcję lekkich pierwiastków, ale ze względu na dużą zdolność penetracji promieniowania X, stosowanego jako źródło wzbudzenia nie wymagają stosowania próżni

i mogą być przeprowadzane w powietrzu. Jest to wielka zaleta tych metod w przypadku, gdy analizie chcemy poddać próbki ulegające uszkodzeniu w próżni. Badania za pomocą sondy XRF z konfokalnym detektorem, pozwalającym na analizę trójwymiarową biomateriałów podobnych do szkieletu *Sepia Officinalis* powinny podobnie jak w przypadku teŹe dostarczyć wielu cennych informacji o przestrzennym rozmieszczeniu pierwiastków w badanej strukturze.

3.3.2. **Rostra *Belemnitida*: *Hibolites sp.*, *Belemnella sp.* i *Belemnitella sp.***

W celu określenia budowy i mikrostruktury rostrów belemnitów próbki *Hibolites sp.*, *Belemnella sp.* i *Belemnitella sp.* poddano szeregowi analiz chemicznych i strukturalnych takich jak: dyfraktometria rentgenowska (XRD); spektrometria fluorescencji rentgenowskiej XRF z zastosowaniem promieniowania rentgenowskiego ze źródła synchrotronowego (SRIXE), protonów (PIXE) i elektronów (EPMA) jako wiązki wzbudzającej; spektrometria ramanowska, spektrofotometria w podczerwieni (FTIR), absorpcyjna spektrometria atomowa (AAS), emisyjna spektrometria atomowa ze wzbudzeniem plazmowym (ICP-AES) oraz termiczna analiza grawimetryczna (TGA). Część wyników zgromadzonych dla próbki *Hibolites sp.* i wnioski płynące z badań przedstawiono w pracy opublikowanej w Journal of Alloys and Compounds (Florek et al. 2004). W ramach niniejszego rozdziału omówię kolejno wyniki uzyskane dla badanych okazów.

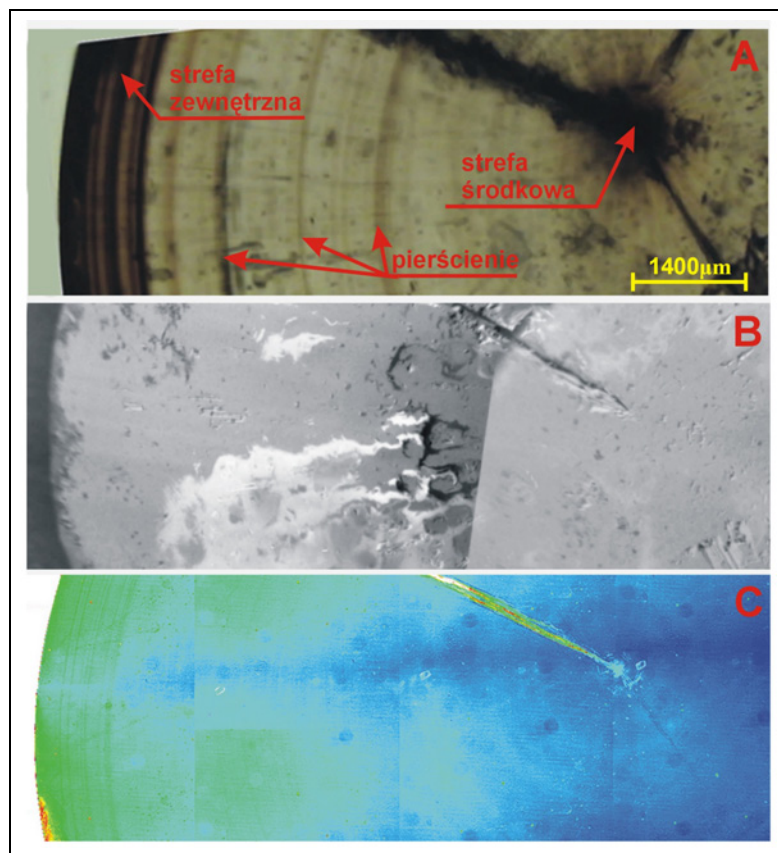
Rostrum *Hibolites sp.*

Jako pierwsza została przebadana próbka *Hibolites sp.* z wieku Oxford (Późna Jura) pochodząca z Jury Krakowsko – Częstochowskiej. Do analiz pobrano fragment przekroju poprzecznego części *rostrum solidum* (Rys. 5), przygotowanego w formie zgładu. Rys. 48a przedstawia zdjęcie przekroju próbki wykonane w powiększeniu za pomocą mikroskopu optycznego. Widać wyraźne i regularne pierścienie znajdujące się pomiędzy częścią środkową znajdującą się w okolicy linii wierzchołkowej (ang. *apical line*- Rys. 5) a zewnętrzną krawędzią próbki.

Przed pomiarami fluorescencyjnymi przeprowadzono dla danej próbki badania luminescencyjne, które miały na celu ocenę jej stopnia zanieczyszczenia. Badanie przeprowadzono z zastosowaniem detektora katodo-luminescencyjnego (CL). Próba dała rezultat negatywny, z nieznaczną tylko luminescencją części środkowej, w strefie pęknięcia nieistotnej dla pomiarów oraz w strefie zewnętrznej próbki (Rys. 48c), co może wskazywać na niewielkie diagenetyczne zanieczyszczenie próbki.

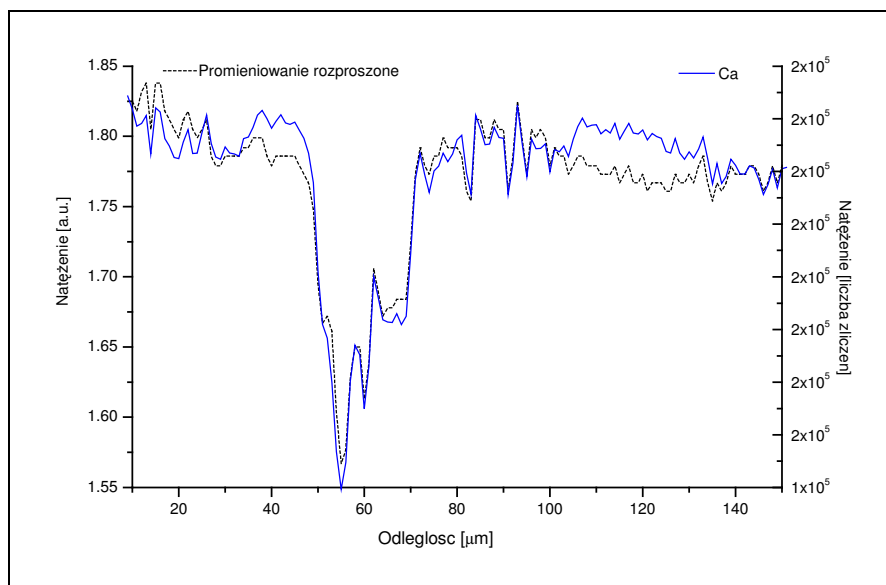
Używając sondy synchrotronowej wykonano pomiary intensywności rozproszenia promieniowania X przez próbkę, którą zarejestrowano w postaci zdjęcia (Rys. 48b). Uzyskane tą drogą sygnały pochodzą ze zmian gęstości oraz rozkładu centrów rozpraszania próbek. Zmiany gęstości wynikają ze zmian topograficznych na granicach

ziaren, zaś centra rozpraszania są związane z potencjalną obecnością domieszek tlenków metali w matrycy rostrum.

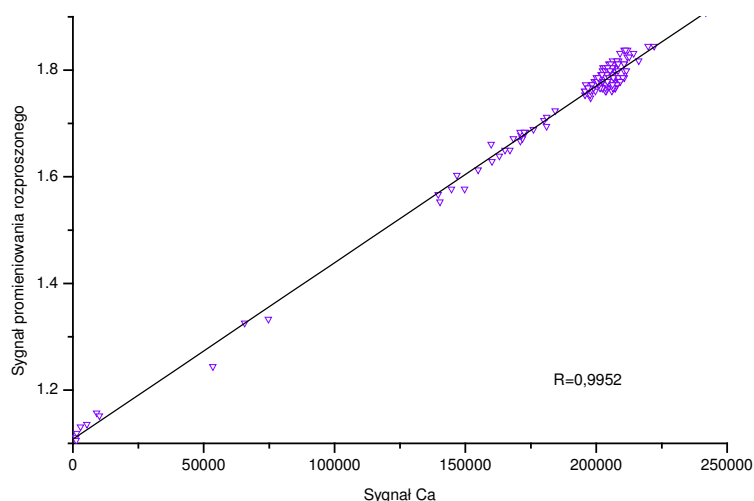


Rys. 48 Przekrój poprzeczny *rostrum cavum Hibolites sp.*. A) Zdjęcie optyczne wraz z zaznaczonymi strefami zewnętrzną i wewnętrzną oraz pierścieniami. B) Obraz z SEM, użycie elektronów wstecznie rozproszonych. C) Zdjęcie z katodo-luminescencji.

Pierwsze analizy fluorescencyjne za pomocą metody SRIXE pozwoliły na wykrycie pierwiastków o średniej liczbie masowej. W próbce stwierdzono obecność: P, Ti, Fe, Zn oraz Ca. Pomiary wykonano w taki sposób, aby uzyskać dobre odwzorowanie składu jakościowego próbki wzdłuż linii pomiaru przeprowadzonej przez kolejne pierścienie widoczne na zdjęciu optycznym próbki (Rys 48a). Liniowy rozkład natężenia promieniowania rozproszonego nałożonego na liniowy profil wapnia, który jest głównym składnikiem próbki znajduje się na Rys. 49. Krzywa profilu rozproszonego promieniowania X pokrywa się z krzywą skanu chemicznego dla wapnia. Oba skany są bardzo podobne. Stopień korelacji między sygnałem wapnia i natężeniem promieniowania rozproszonego jest wyrażony na Rys. 50.



Rys. 49 Porównanie profilu sygnału wapnia (pomiar SRIXE) z rozkładem natężenia promieniowania rozproszonego wzdłuż linii pomiaru próbki belemnitu *Hibolites* sp.

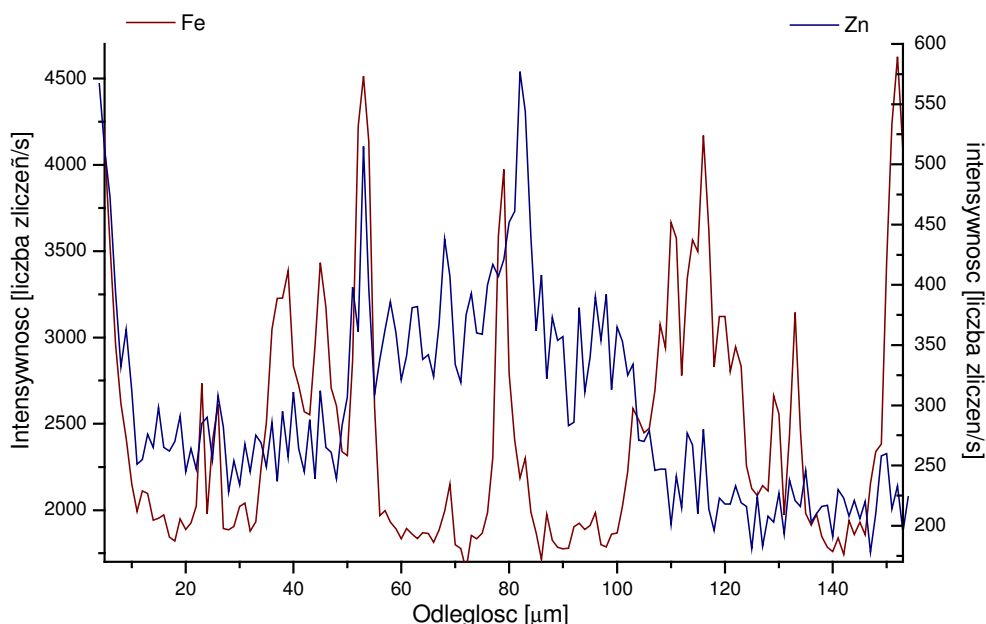


Rys. 50 Korelacja pomiędzy sygnałem promieniowania rozproszonego a sygnałem wapnia, dane jak z Rys. 49; $R^2=0,99$

Duża zbieżność sygnału wapnia z sygnałem promieniowania rozproszonego może wskazywać, że porowatość jest głównym czynnikiem wpływającym na zmienność sygnału wapnia w tego rodzaju próbkach. Minimalną wartość sygnału wapnia i intensywności rozproszenia stwierdzono dla wewnętrznej strefy przekroju poprzecznego belemnitu, otaczającej linię wierzchołkową rostrum.

Ti, Fe i Zn wykryte w badanej próbce należą do typowych składników pojawiających się w wyniku diagenety. Mogą one pojawiać się w rostrach po kontakcie z roztworami zawierającymi jony Ti^{3+} , Fe^{3+} i Zn^{2+} , bądź ich związkami kompleksowymi

przesączać się przez warstwy sedymentacyjne. Część żelaza i cynku została prawdopodobnie osadzona już w trakcie tworzenia się rostrum. Wykres przedstawiający podobieństwo pomiędzy rozmieszczeniem przestrzennym sygnału żelaza i cynku znajduje się na Rys. 51.

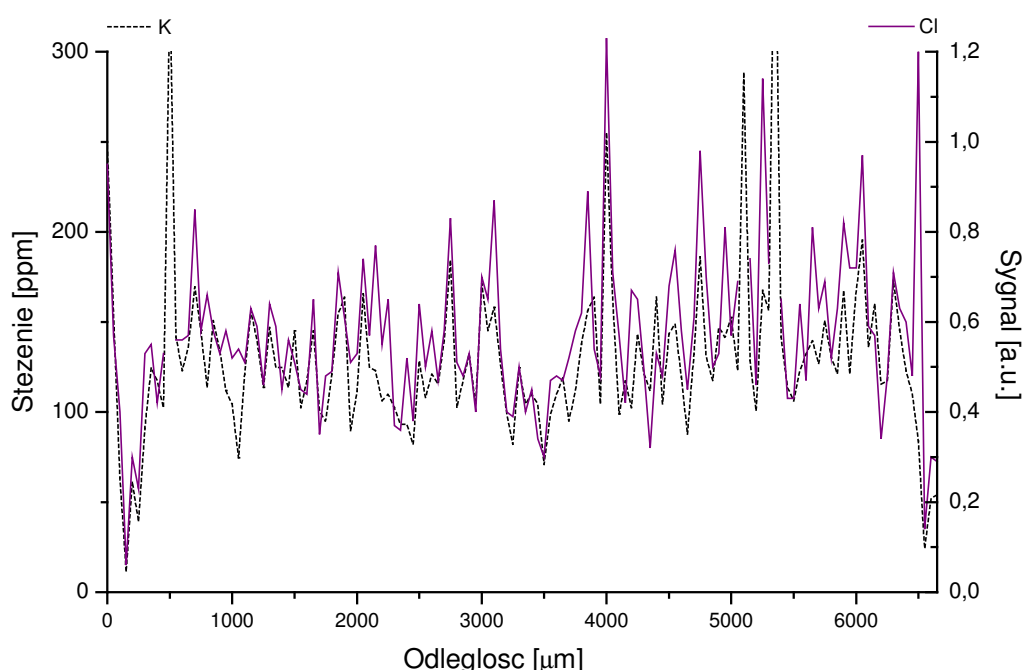


Rys. 51 Sygnały Fe i Zn na przekroju poprzecznym belemnitu *Hibolites sp.*; zobacz ograniczone podobieństwo.

Rozmieszczenie liniowe żelaza jest bardzo symetryczne i przypomina symetrię szczegółów widocznych na optycznym przekroju poprzecznym rostrum. Sygnał cynku jest podobny do sygnału żelaza bliżej linii wierzchołkowej próbki (lewa część wykresu) a zupełnie różni się w części pozostałej. Podobieństwo w rozkładzie związków cynku i żelaza jak również ich duża zawartość wewnątrz drobnokrystalicznej i porowatej strefy kalcytowej linii wierzchołkowej może sugerować głównie diagenetyczne pochodzenie tych kationów. Podobna sytuacja zachodzi dla tytanu. Z drugiej strony małe i zbliżone sygnały pierwiastków metalicznych w dobrze skryształizowanej strefie kalcytu sugeruje, że mogą to być również składniki pierwotnie, występujące w szkielecie węglanowym.

Informacje o dystrybucji pierwiastków w próbce belemnitu *Hibolites sp.* uzyskane za pomocą sondy synchrotronowej uzupełniono wynikami z sondy elektronowej. Pomiar przeprowadzono dla tego samego fragmentu próbki. Wykonano skan liniowy obejmujący całą strefę środkową aż do brzegu próbki. Różnice warunków analiz takie jak rodzaj wiązki wzbudzającej, długość drogi optycznej podczas pomiaru (różnice w odległości

próbki od detektora) oraz zastosowana próżnia w przypadku analiz EPMA sprawiają, że metody różnią się czułością. Konsekwencją tego były różnice intensywności sygnałów w obu analizach. Przy zastosowaniu sondy elektronicznej przeważały sygnały pochodzące od pierwiastków o małej liczbie atomowej. Dzięki zastosowaniu tej metody wykryto w próbce takie pierwiastki jak: P, Ca, C, S, K, Na, O, Cl, Si, Mg i Al, z których rozkład kilku wart jest szczegółowego omówienia. Na Rys. 52 zestawiono skany liniowe potasu i chloru. Wprost proporcjonalna zależność występująca pomiędzy potasem i chlorem ($R^2=0,5687$) sugeruje, że pierwiastki te mogą tworzyć jeden związek. Podobna sytuacja zachodzi dla sodu i chloru, które mogą występować w próbce jako NaCl.

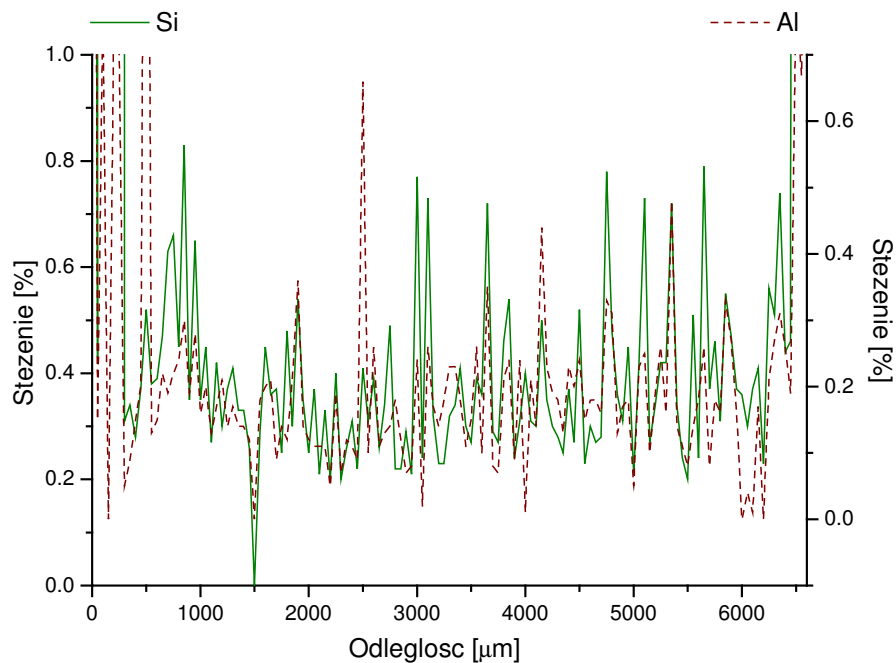


Rys. 52 Profil EPMA potasu i chloru, próbka rostrum *Hibolites sp.*; $R^2=0,5687$.

Analiza za pomocą sondy elektronicznej jest właściwie analizą pół-ilościową, dlatego stężenie potasu ustalone dzięki pomiarowi za pomocą sondy elektronicznej zweryfikowano wykonując analizę metodą atomowej spektrometrii absorpcyjnej ze wzbudzeniem w płomieniu acetylenowo-tlenowym (FAAS). Uzyskany wynik średniej zawartości potasu w próbce (160 ± 14 ppm) posłużył do korekty stężenia obliczonego na podstawie widma EDS. Średnie stężenie potasu na profilu umieszczonym na Rys. 52 uwzględnia tą poprawkę. Stężenie Sr w badanej próbce wyznaczone również metodą absorpcyjnej spektrometrii atomowej wynosiło 1000 ± 75 ppm i było zbliżone do wyników opublikowanych w pracy Sælena i Karstanga (Sælen and Karstang 1989). Metodę AAS wykorzystano również do weryfikacji obecności i stężenia Mn, jednego z głównych

wskaźników diagenety w próbkach. Próba dała wynik negatywny przy limicie detekcji LD= 0,02ppm. Obecności manganu nie wykryto również w pomiarach metodą EPMA.

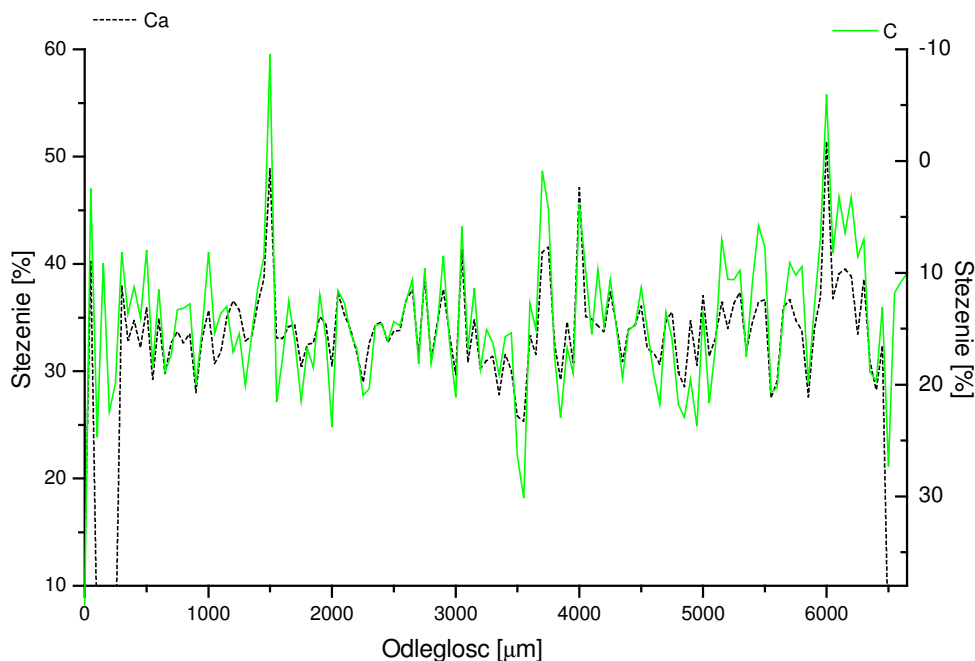
Stężenia glinu i krzemu (Rys. 53) oznaczone za pomocą sondy elektronowej są ze sobą dość dobrze skorelowane.



Rys. 53 Profil EPMA krzemu i glinu, próbka *Hibolites* sp. z wieku oksfordzkiego ($R^2 = 0.3822$).

Stosunek molowy Al/Si w próbce *Hibolites* sp. jest bardzo zbliżony do wartości 2:1. Prawdopodobnie oba pierwiastki pojawiły się w próbce w wyniku procesu diagenety. Ich proporcje można wyjaśnić jako rezultat tworzenia się zasadowych glinokrzemianów z roztworów $\text{Si}(\text{OH})_4$ i $\text{Al}(\text{OH})_3$, sugerowanego przez niektórych autorów (Exley and Birchall 1993; Doucet et al. 2001). W niezależnych badaniach próbek z Jury Krakowsko-Częstochowskiej stwierdzono, że kontakt z autogenicznym Si (składnik skały) nie zmienia pierwotnej mikrostruktury kalcytu (Daley and Boyd 1996).

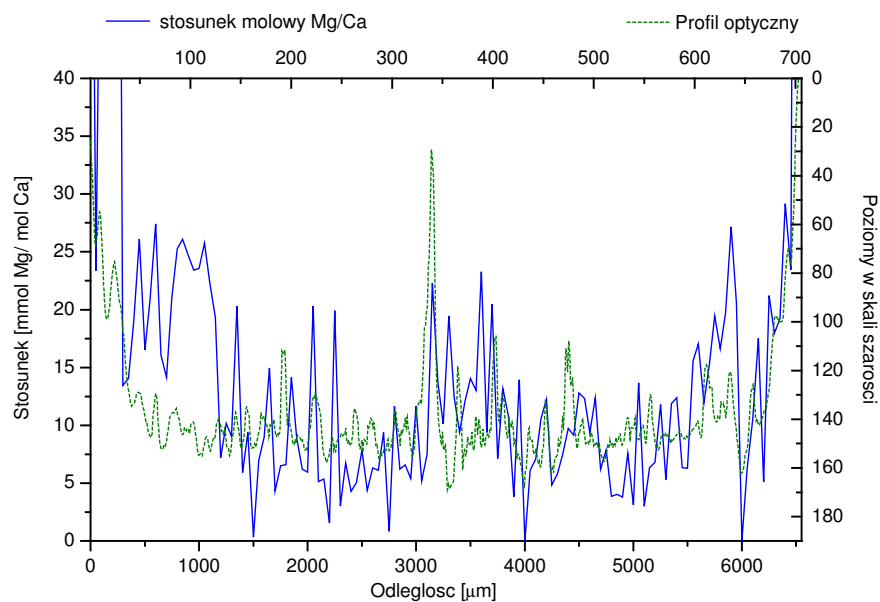
Z wyników uzyskanych metodą EPMA można wywnioskować, że w próbce występuje nadmiar węgla w stosunku do wapnia i tlenu (odpowiadającym zawartości węglanu wapnia w próbce), ponieważ średnia zawartość wapnia oznaczona tą metodą wynosi 14,4% a wapnia 31,9% a ich stosunek masowy wynoszący 0,4543 jest większy od stechiometrycznej proporcji węgla i wapnia w kalcytcie, który wynosi 0,3. Co ciekawe, stężenie węgla okazało się odwrotnie proporcjonalne do stężenia wapnia ($R^2=0,7947$). Zależność tą przedstawiono na Rys. 54.



Rys. 54 Profil Ca w stosunku do odwróconego nadmiarowego (organicznego) sygnału C; $R^2=0,7947$.

Taki nadmiar węgla w matrycy nieorganicznej był już wcześniej zaobserwowany dla szkieletów mięczaków (Weiner et al. 1979), a jego obecność w szkieletach skamielin może świadczyć o zachowaniu się części materii organicznej występującej pierwotnie w próbkach lub wtórnym zanieczyszczeniu próbki przez związki organiczne.

Dokonując analizy liniowej rozkładu pierwiastków w próbce nie można pominąć tzw. wskaźników geo-temperaturowych lub paleo-temperaturowych opisywanych w części literaturowej pracy. Wiadomo, że warstwy przyrostu mogą odznaczać się we współczesnych i skamieniałych próbkach zmiennymi wartościami stosunków Mg/Ca i Sr/Ca (Steuber 1999; Van der Putten et al. 2000). Ponieważ uważa się, że zmiany tych sygnałów można powiązać ze zmianami temperaturowymi, w których tworzył się szkielet, wyniki zestawiono z profilem optycznym próbki (Rys. 55), który odzwierciedla zmiany okresowe w postaci widocznych pierścieni (patrz Rys. 48a). Dla mierzonej próbki możliwe było tylko ustalenie lokalnego stosunku Mg/Ca za pomocą pomiarów Mg przy użyciu sondy elektronowej. Zmiany sygnału Mg/Ca w próbce porównane z profilem optycznym uzyskanym wzdłuż linii pomiaru wykazały zauważalną korelację pomiędzy szczegółami próbki obserwowanymi optycznie i zmianami stosunku Mg/Ca (Rys. 55). Niska wartość stosunku molowego Mg/Ca koresponduje z jasnymi miejscami przekroju poprzecznego, co przy założeniu prawidłowości hipotezy dotyczącej termometrycznego znaczenia stosunku Mg/Ca oznacza, że jaśniejsze regiony (większa intensywność wyrażona w skali szarości) formowały się w niższych temperaturach

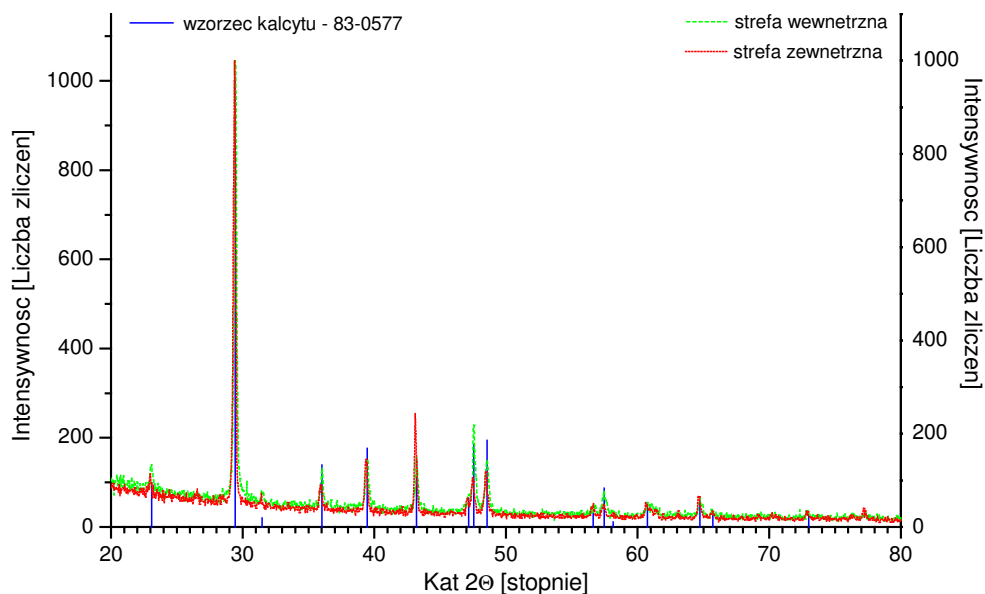


Rys. 55 Porównanie sygnału Mg/Ca i odwróconego profilu optycznego.

W omawianym eksperymencie ustalono, że dla badanej próbki stosunek molowy Mg/Ca mieści się w granicach 9–12 [mmolMg/molCa] a uzyskane wyniki bardzo przypominają wartości stosunku Mg/Ca uzyskane dla kalcytu w mikroskopijnych szkieletach planktonu foraminifera (Lea et al. 1999). Korzystając ze skali temperaturowej zastosowanej przez Lea i in. i wyprowadzonej przez Rosenthal i in. (Rosenthal et al. 1997) (wzór V) oraz średniego stosunku Mg/Ca obliczonego dla rostrum *Hibolites sp.* (11,14 mmolMg/molCa) ustalono, że temperatura oceanu mogła wynosić +25 °C. Z niezależnych badań bazujących na izotopie tlenu ^{18}O dla tego rodzaju próbek i tego samego okresu geologicznego, ustalono średnią wartość temperatury oceanu na +12°C (Wierzbowski 2002), co stanowi różnicę 13°C. Wyniki uzyskane dla rostrum *Hibolites sp.* przypominają rzędem wielkości zmiany stosunku Mg/Ca otrzymane przez Dwyera dla ostryg (Dwyer et al. 2000). Z pomiarów Saelena i Karstanga (Sælen and Karstang 1989) wynika, że przybliżony stosunek Mg/Ca dla wielu różnych próbek belemnitów wynosi 9.5. Wartość ta jest zgodna w (rozsądnym przedziale) z moimi wynikami. Dowodzi to, że kalcyt w belemnitach miał własny specyficzny stopień wbudowywania magnezu. Prawdopodobnie stosunek Mg/Ca może być przeliczony do skali termometrycznej w specyficzny sposób tylko dla próbek belemnitów i zweryfikowany analizą izotopową ^{18}O , po przebadaniu statystycznie odpowiedniej ilości próbek. Uważam, że podobnie jak w przypadku koralu (Mitsuguchi et al. 1996; Stanley and Hardie 1998) zmiany stosunku Mg/Ca w rostrum belemnitu mogą być zbieżne ze zmianami stref przyrostów rocznych. Zmiany okresowe Mg/Ca zgadzają się z granicami pierścieni widocznymi na profilu optycznym wyrażonym

w skali szarości wzdłuż linii promienia rostrum belemnitu, a pierścienie widoczne na profilu optycznym mogą być zakwalifikowane jako roczny przyrost rostrum.

W celu określenia składu mineralogicznego dla badanej próbki *Hibolites sp.* wykonano analizy dyfrakcyjne metodą proszkową dla strefy zewnętrznej i środkowej (blisko linii wierzchołkowej) próbki.



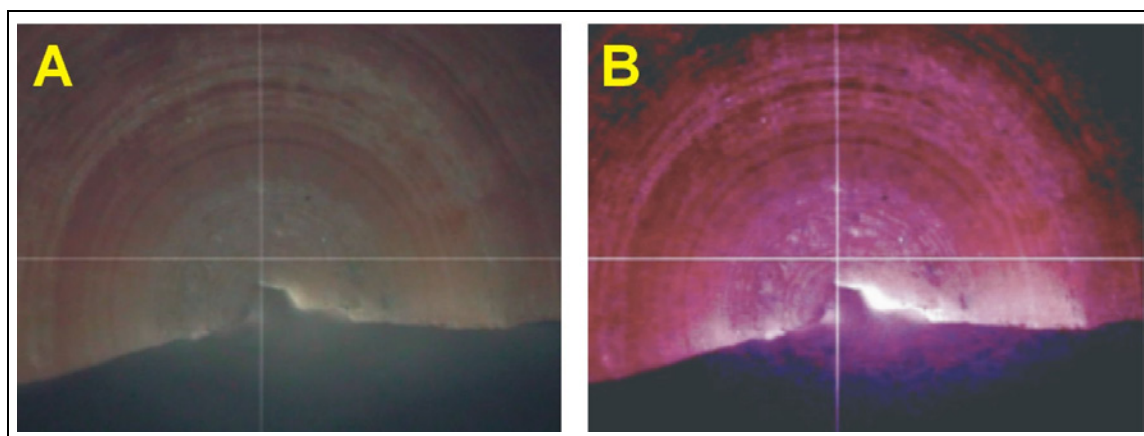
Rys. 56 Dyfraktogramy uzyskane metodą proszkową dla strefy wewnętrznej i zewnętrznej belemnitu *Hibolites sp.*

Rys. 56 przedstawia uzyskane dyfraktogramy, z których można wnioskować, że we wszystkich próbkach jedyną fazą krystaliczną obecną w próbkach jest kalcyt a stałe sieciowe wynoszą: $a=5,0177$, $c=17,0978$ dla warstwy zewnętrznej oraz $a=4,9899$, $c=17,0526$ dla warstwy wewnętrznej. Obserwujemy nieznaczne zwiększenie stałych sieciowych kalcytu tworzącego warstwę zewnętrzną. Prawdopodobnie w tej strefie wbudowało się w strukturę więcej obcych pierwiastków, których średnica jest większa od atomów wapnia. Tymi pierwiastkami, zmieniającymi rozmiary sieci krystalicznej kalcytu mogą być Fe i Zn, które wykryto w próbkach za pomocą analizy XRF.

Wykonując analizy metodą absorpcyjnej spektrometrii atomowej (AAS) wykryto również w próbce obecność strontu, ale ponieważ pomiar był przeprowadzony z fragmentu zawierającego obie strefy trudno jest przypisywać obecność strontu do strefy zewnętrznej muszli.

Rostrum *Belemnella* sp.

Kolejną badaną próbką było rostrum belemnitu gatunku *Belemnella* sp. pochodzącego z okolic Zwierzyńca z Pogórza Roztoczańskiego z okresu Późnej Kredy (wiek - Kampan).



Rys. 57 Zdjęcie optyczne (A) i luminescencyjne (B) przekroju poprzecznego rostrum belemnitu *Belemnella* sp. pochodzącego z Roztocza.

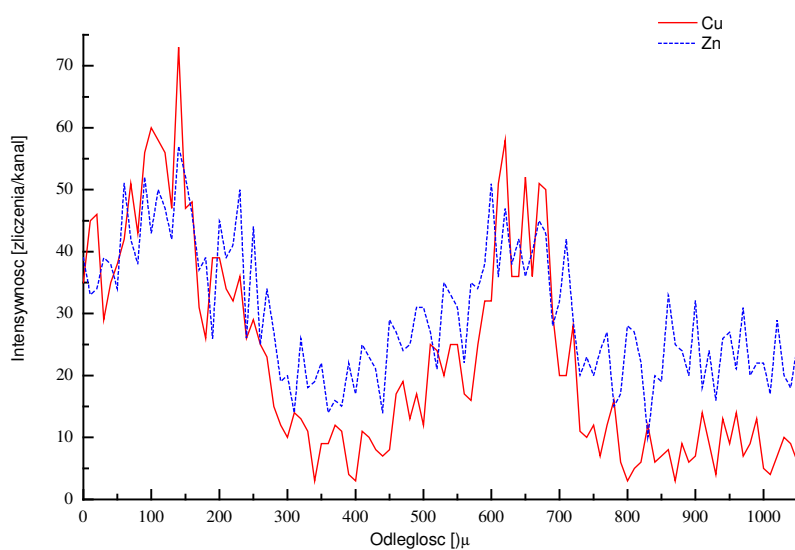
Podobnie jak dla poprzedniej próbki, najpierw przeprowadzono obserwację optyczną zglądu a następnie sprawdzono, czy próbka ulega luminescencji pod wpływem promieniowania UV. Wystąpienie zjawiska luminescencji wskazuje na diagenезę próbki a jego brak świadczy, że próbka nie uległa procesowi diagenезy. Rys. 57 przedstawia zdjęcie optyczne oraz luminescencyjne próbki rostrum *Belemnella* sp. wykonane przy pomocy mikroskopu optycznego. Zdjęcia mikroskopowe próbek pokazują regularną pierścieniową strukturę przekroju poprzecznego rostrum (Rys. 57a). Zdjęcia optyczne uzyskane z zastosowaniem promieniowania UV (Rys. 57b) wskazuje, że próbka nie wykazuje zbyt dużej luminescencji a więc jest dość dobrze zachowana. Chociaż strukturę warstwową belemnitów można zaliczyć do najbardziej symetrycznych struktur obiektów występujących w naturze symetria ta nie jest idealna. Na Rys. 57a widać, że odległość pomiędzy pierścieniami nie jest jednakowa a wielkości kryształitów i ich rozłożenie jest różne, szczególnie w zewnętrznej warstwie próbki. Zewnętrzne części belemnitów są zwykle zbudowane z bardziej wykształconych kryształów, są kolorowe i przezroczyste a ich warstwy są wyraźniej zaznaczone. Wewnętrzne części belemnitów odpowiadające strefie blisko linii wierzchołkowej (centrum próbki) wyglądają na zbudowane z bardziej zagęszczonych drobnych kryształów i są często nieprzezroczyste. Taką prawidłowość zaobserwowano również dla badanego okazu *Belemnella* sp., dlatego zdecydowano się na wykonanie dalszych pomiarów oddzielnie dla wewnętrznej i zewnętrznej części tego rostrum.

Analizy chemiczne (SRIXE) dla przygotowanego przekroju wzdłuż linii przecinającej kolejne pierścienie występujące w rostrum zostały przeprowadzone z użyciem mikrosondy rentgenowskiej ze wzbudzeniem synchrotronowym w LURE (Francja).

Przez przekrój poprzeczny rostrum *Belemnella sp.* poprowadzono skan liniowy wykonany w dwóch etapach, oddzielnie dla części wewnętrznej i zewnętrznej rostrum. Do analizy wewnętrznej części, blisko linii wierzchołkowej (część środkowa próbki) zastosowano krok przesuwu 10 μm , podczas gdy do analizy strefy zewnętrznej krok 100 μm . W próbce zostały wykryte: Ca, Cu, Zn, Si, Fe i Mn.

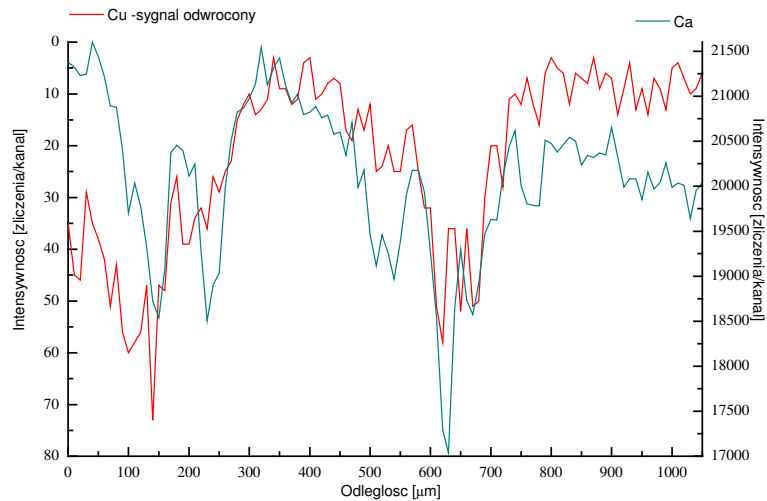
W pierwszej kolejności przedstawione zostaną wyniki uzyskane dla strefy wewnętrznej a następnie dla strefy zewnętrznej.

Podobnie jak dla próbki rostrum *Hibolites sp.* zmiany sygnału wapnia wzdłuż promienia przekroju poprzecznego w strefie wewnętrznej próbki pokrywają się dość dobrze z profilem optycznym próbki. Rozkłady Cu i Zn natomiast wzdłuż promienia tej strefy są praktycznie identyczne. Również poziom ich stężeń wydaje się być zbliżony (Rys. 58).



Rys. 58 Porównanie profili liniowego rozkładu Cu (linia czerwona) i Zn (niebieska) w strefie wewnętrznej rostrum *Belemnella sp.*; $R^2=0,6765$.

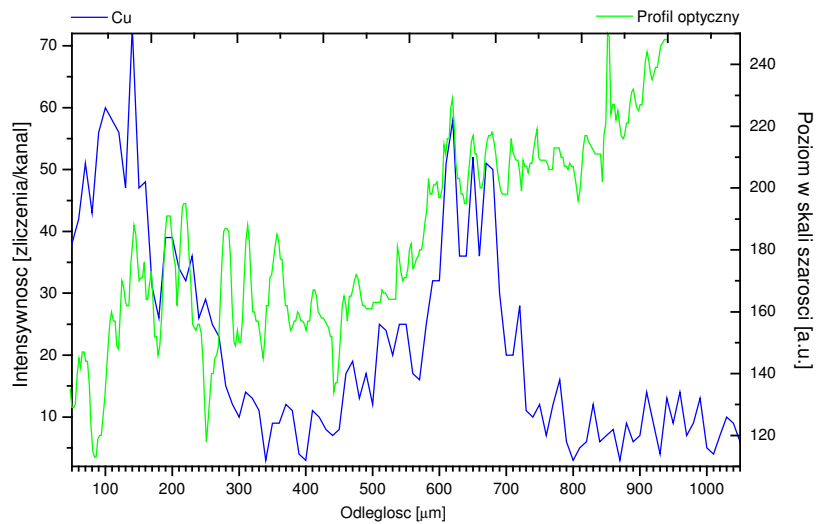
Może to świadczyć o tym, że pierwiastki te występują wspólnie w jednej strukturze bądź zanieczyszczają matrycę kalcytową w tym samym stopniu. Po odwróceniu sygnału tych pierwiastków widoczna jest dobra korelacja z sygnałem wapnia. Na Rys. 59 znajdują się sygnały wapnia i miedzi.



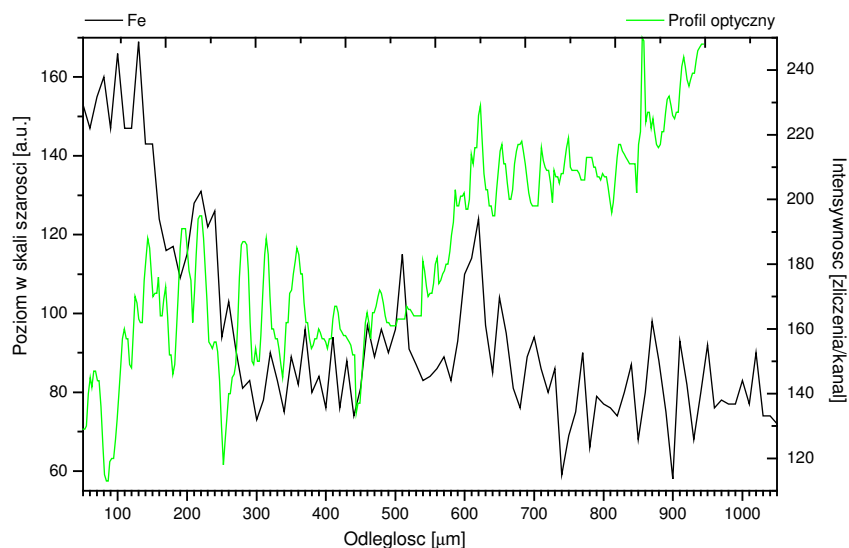
Rys. 59 Odwrócony profil Cu zestawiony z profilem Ca, odzwierciedlającym morfologię próbki w strefie wewnętrznej rostrum *Belemnella sp.*; $R^2=0,1622$.

Może to świadczyć o tym, że miedź i cynk nie wchodzi do miejsc o dużej koncentracji wapnia albo, że zajmują miejsca w próbce o większej porowatości, odpowiadające mniejszemu zagęszczeniu wapnia.

Sygnaly miedzi i żelaza w wielu punktach pokrywają się z profilem optycznym próbki (Rys. 60 i 61), co sugerowałoby, że może istnieć pewien związek barwy próbki z obecnością miedzi i żelaza.



Rys. 60 Profil optyczny (linia czarna) zestawiony z sygnałem Cu (czerwona) w strefie wewnętrznej próbki, *Belemnella sp.*.

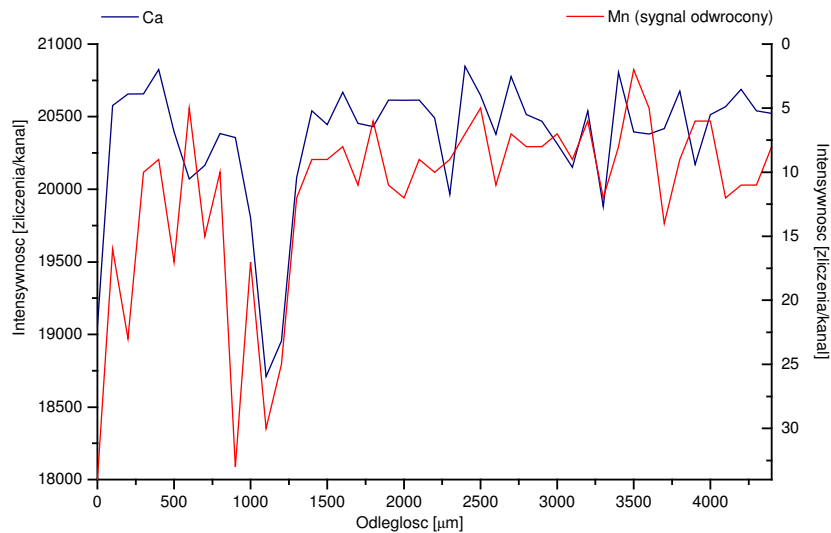


Rys. 61 Porównanie sygnału Fe z profilem optycznym próbki dla strefy wewnętrznej rostrum *Belemnella sp.*

Jednakże miejsca o podwyższonej zawartości miedzi i żelaza są jaśniejsze (większy poziom intensywności w skali szarości) niż reszta regionu strefy środkowej próbki, dlatego kationy te nie mogą być mimo wszystko odpowiedzialne za zabarwienie próbek.

Dwa kolejne pierwiastki wykryte w strefie wewnętrznej próbki Mn i K, nie wykazywały widocznych korelacji rozmieszczenia z innymi pierwiastkami i sygnałem optycznym. W strefie wewnętrznej próbki rostrum *Belemnella sp.* oprócz wymienionych pierwiastków wykryto jeszcze obecność I ale jego stężenie było śladowe.

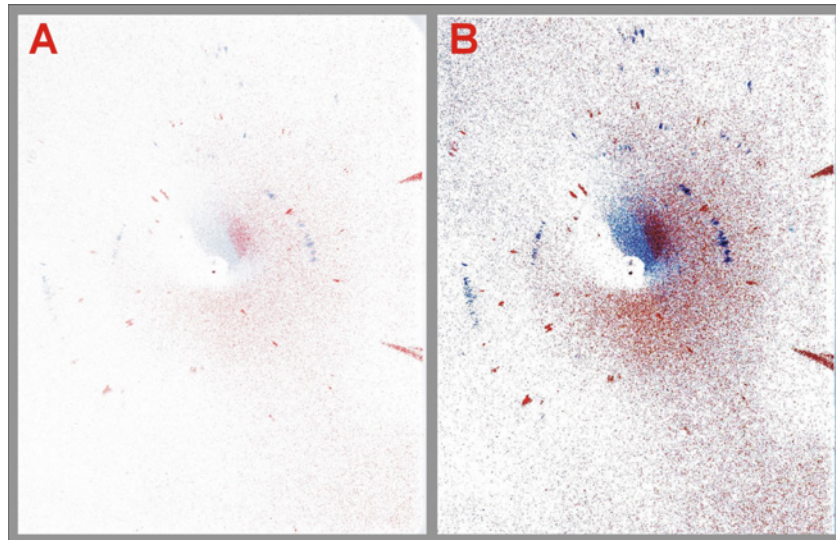
Analizę SRIXE drugiej część belemnitu *Belemnella sp.* (strefa zewnętrzna) przeprowadzono z krokiem przesuwu wynoszącym 100 µm. W strefie tej podobnie jak w strefie środkowej (wewnętrznej) oprócz wapnia wykryto: Mn, Fe, Si, I, Cu, K i Zn oraz wystąpiły te same zależności (z kilkoma wyjątkami) pomiędzy pierwiastkami i sygnałem optycznym. Dla strefy zewnętrznej stwierdzono, że sygnał manganu jest odwrotnie proporcjonalny do sygnału wapnia (Rys. 62), co świadczy o tym, że część zewnętrzna uległa większej diagenecie niż wewnętrzna.



Rys. 62 Profile Ca (główny składnik, linia czarna) i odwrócony sygnał Mn (czerwona) dla warstwy zewnętrznej rostrum *Belemnella sp.*; $R^2=0,053$.

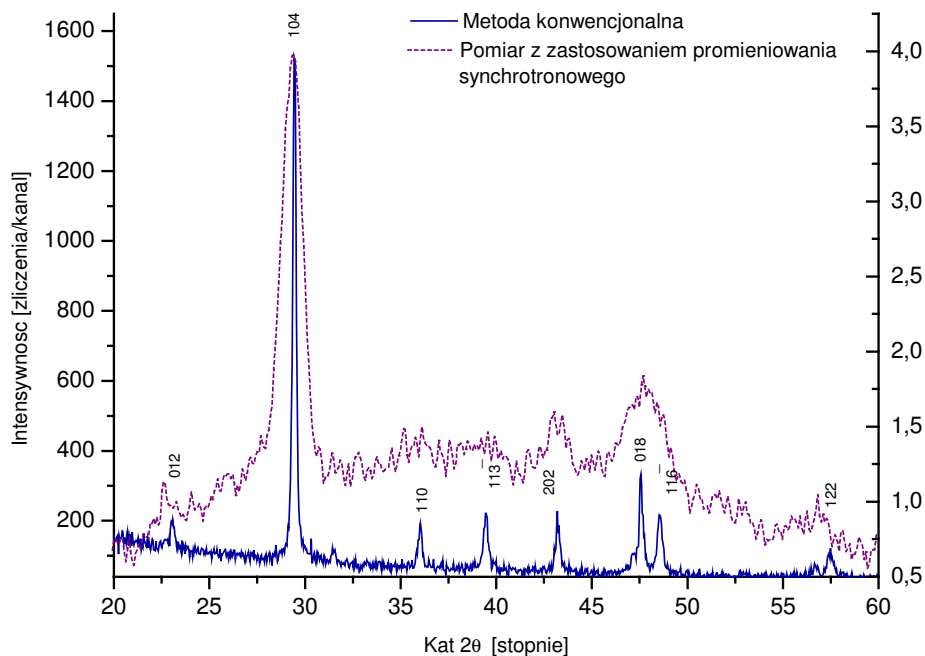
Profil krzemu okazał się zgodny z przebiegiem sygnału manganu i innych ciężkich pierwiastków (Fe, Cu i Zn), w przeciwieństwie do wewnętrznej części rostrum, gdzie takiej zależności nie obserwowano. Potas miał podobny rozkład jak krzem. Nie znaleziono żadnych korelacji pomiędzy sygnałem promieniowania X rozproszonego na próbce z rozkładem pierwiastków wykrytych metodą SRIXE w tej strefie.

W kolejnym etapie badań, w celu oceny składu mineralicznego próbki przeprowadzono analizę mikro-dyfrakcyjną za pomocą sondy dyfrakcyjnej z wiązką rentgenowską pochodzącą ze źródła synchrotronowego. Analizę wykonano oddzielnie dla części środkowej (wewnętrznej) i zewnętrznej próbki. [Rys. 63](#) przedstawia transmisyjne obrazy dyfrakcyjne uzyskane dla obu stref belemnitu. Na obrazie dyfrakcyjnym dla strefy środkowej próbki ([Rys. 63b](#)) widoczne są pierścienie charakterystyczne dla drobnych kryształitów. Dla kryształów ze strefy zewnętrznej natomiast uzyskano obraz dyfrakcyjny w postaci zbioru punktów ([Rys. 63a](#)) charakterystyczny dla monokryształów.



Rys. 63 Obrazy dyfrakcyjne uzyskane metodą mikrodyfrakcyjną z zastosowaniem wiązki synchrotronowej dla próbki rostrum *Belemnella sp.* A) Strefa zewnętrzna belemnitu; B) Strefa wewnętrzna.

Pomiar dla strefy wewnętrznej powtórzono również z zastosowaniem tradycyjnego dyfraktometru ze źródłem promieniowania X pochodzącym z lampy miedzianej - metodą proszkową. Uzyskano znacznie intensywniejsze refleksy kalcytu. Porównanie wyników z analiz dyfrakcyjnych wykonanych przy pomocy sondy rentgenowskiej i tradycyjnego dyfraktometru (metoda proszkowa) znajdują się na Rys 64.



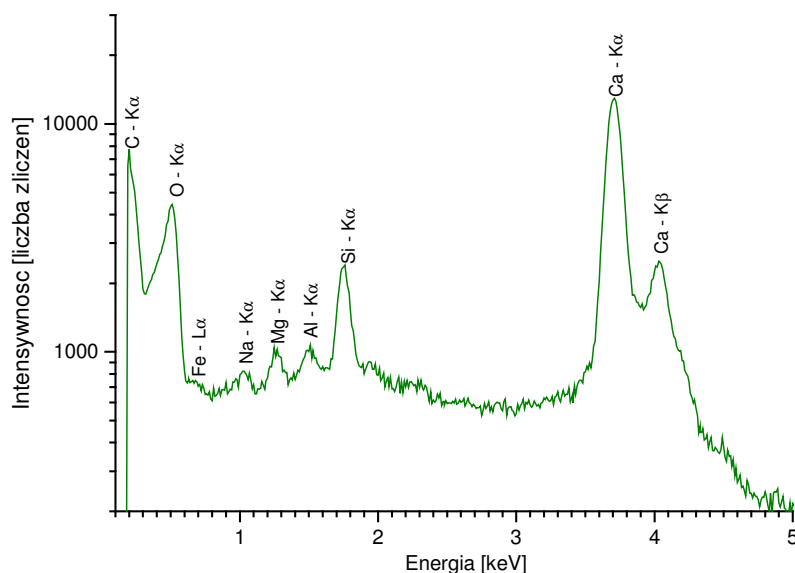
Rys. 64 Dyfraktogramy dla strefy wewnętrznej rostrum *Belemnella sp.*, uzyskane za pomocą sondy synchrotronowej i metodą konwencjonalną (proszkową, lampa z anodą miedzianą).

Analiza dyfrakcyjna w obu przypadkach dała podobne rezultaty i pozwoliła wykluczyć obecność innych niż kalcyt skryształizowanych minerałów w próbce.

W celu ustalenia średniej zawartości wykrytych za pomocą sondy synchrotronowej pierwiastków wykonano analizy metodą absorpcyjnej spektrometrii atomowej dla roztworu roztworzonej próbki. Stężenie żelaza wynosi 13 ± 2 ppm. Poziom manganu nie przekroczył granicy detekcji ($LD=0,02$ ppm) a stężenie miedzi i cynku uznano za nieistotne dla procesów diagenety. Brak obecności manganu a równocześnie dość niski poziom stężenia żelaza, który w średnio zachowanych próbkach przekracza często 100 ppm (Sælen and Karstang 1989) może wskazywać na dobre zachowanie próbki.

Rostrum *Belemnitella* sp.

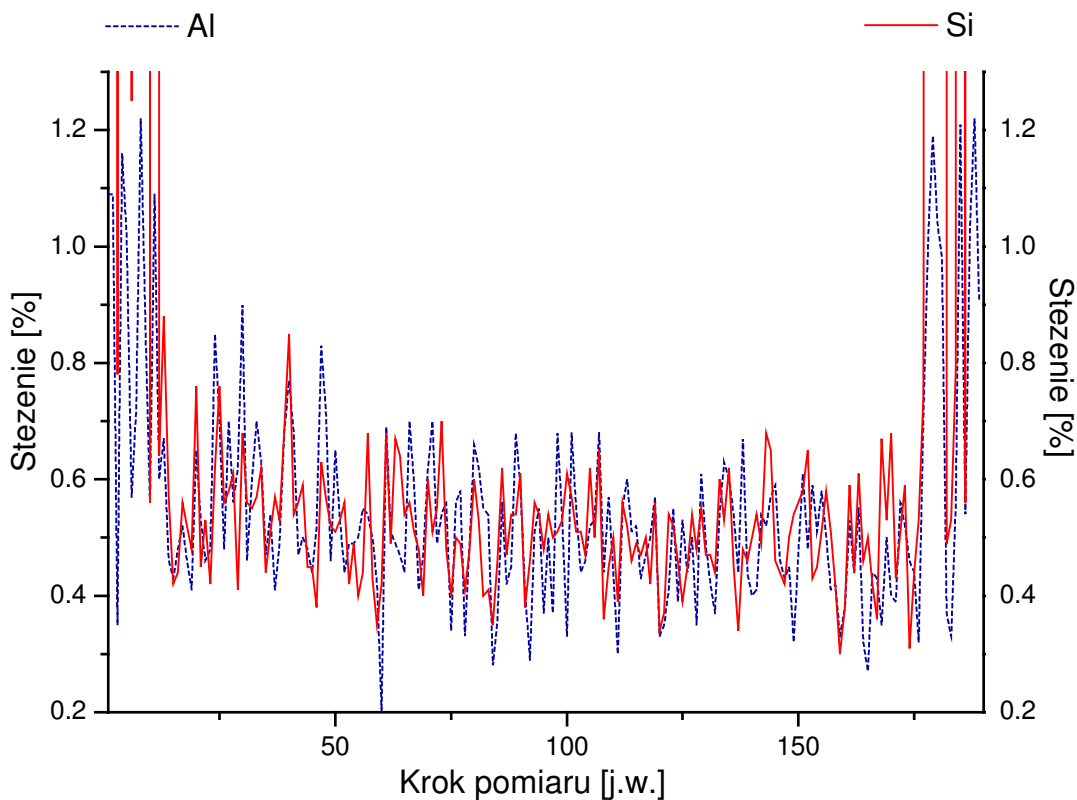
Ostatnią badaną próbką było rostrum *Belemnitella* sp. z wieku Kelowej (Średnia Jura) pochodzącego z Jury Krakowsko –Częstochowskiej. Analogicznie jak w przypadku wcześniej badanych rostrum *Hibolites* sp. oraz rostrum *Belemnella* sp. najpierw wykonano zdjęcie optyczne zglądu. Na podstawie zdjęcia wybrano najbardziej reprezentatywne miejsce do przeprowadzenia analizy liniowego rozkładu pierwiastków za pomocą sondy elektronowej. Wykorzystując sondę elektronową, w próbce wykryto: Ca, Si, Al, Mg, Na, O i C.



Rys. 65 Widmo kumulacyjne EPMA uzyskane dla próbki rostrum *Belemnitella* sp.

Rys. 65 przedstawia widmo kumulacyjne EPMA uzyskane dla próbki rostrum *Belemnitella* sp. Spośród wykrytych pierwiastków szczególną uwagę zwraca wprost proporcjonalna zależność glinu od krzemu. Może to świadczyć o penetracji rostrum przez

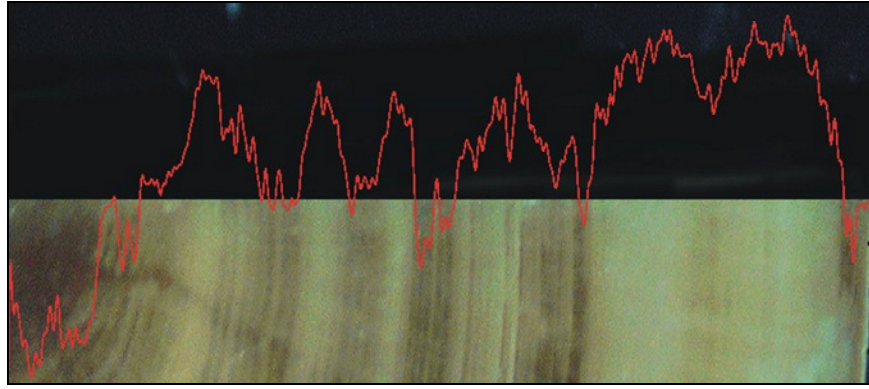
śladowe ilości rozpuszczalnych glinokrzemianów. Korelację tych dwóch pierwiastków możemy zaobserwować na Rys. 66.



Rys. 66 Profile liniowego rozkładu glinu i krzemu w próbce belemnitu *Belemnitella sp.* wzdłuż linii łączącej środek z brzegiem próbki $R^2=0,2$.

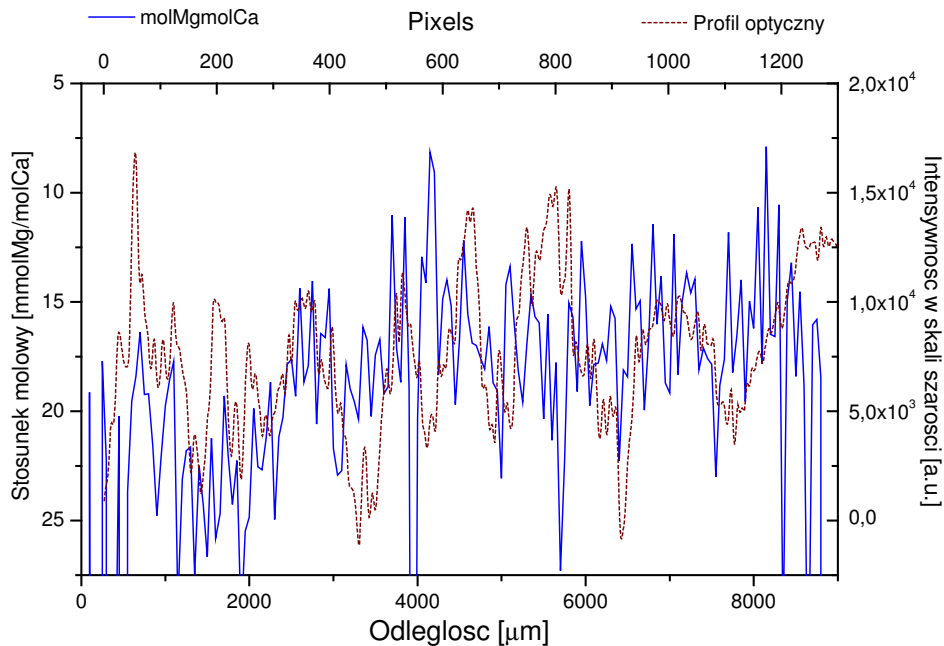
W przypadku *Belemnitella sp.* stosunek molowy stężeń Al:Si wynosi 1:1 w odróżnieniu od próbki *Hibolites sp.*, dla której wartość ta wynosiła 2:1. Uzyskany wynik świadczy o tym, że badana próbka zanieczyszczona jest większą ilością krzemianów (kwarcu) niż glinokrzemianów.

Rys. 67 przedstawia zdjęcie optyczne fragmentu badanej próbki z nałożonym na nie profilem optycznym uzyskanym za pomocą programu Micro Image 4.0. Widać wyraźnie, że minima sygnału optycznego pokrywają się z ciemnymi prążkami przedstawiającymi omawiane już wcześniej pierścienie



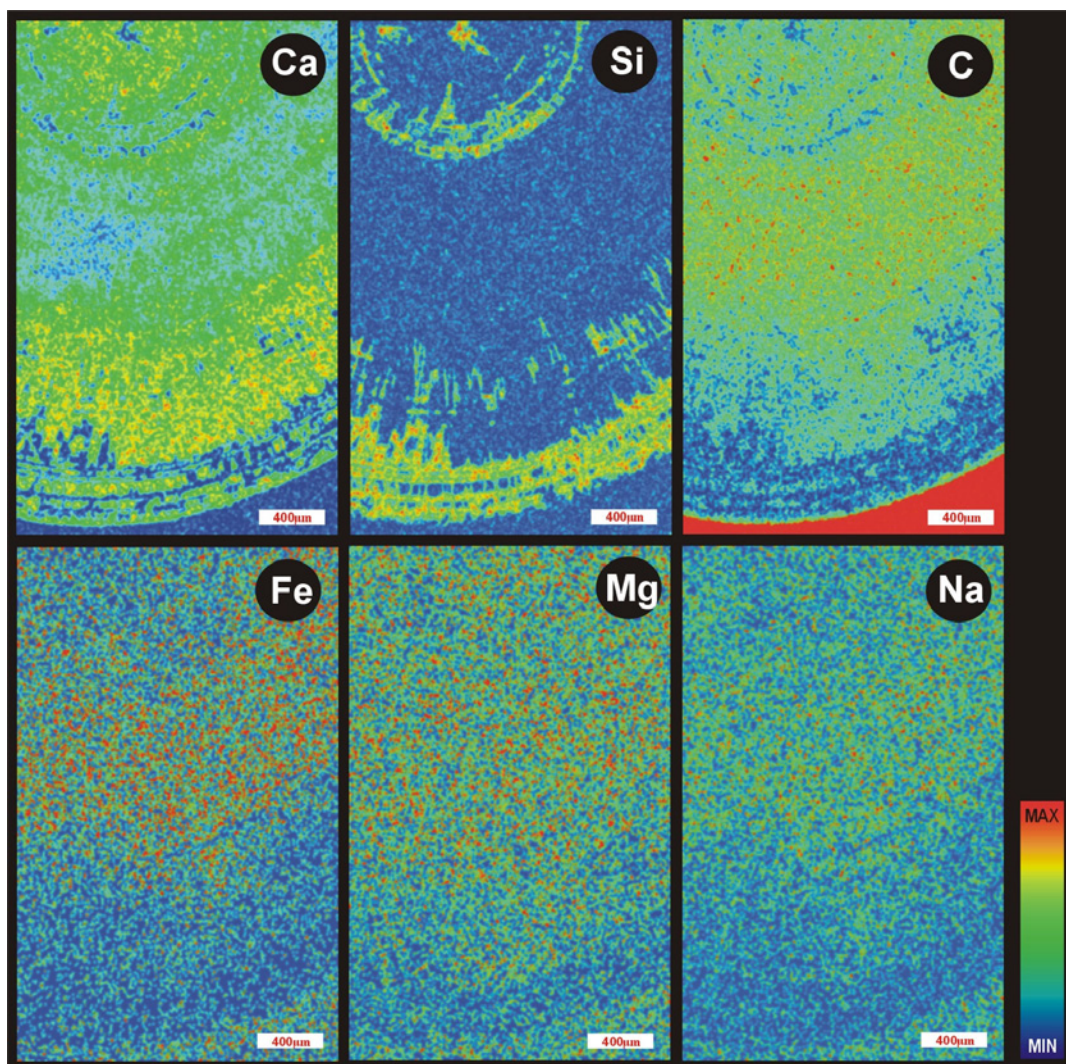
Rys. 67 Zdjęcie optyczne badanego fragmentu próbki *Belemnitella sp.* z nałożonym profilem optycznym pobranym do zestawień z wynikami EPMA.

Zmiana stosunku molowego Mg/Ca wzdłuż linii pomiaru, obliczonego na podstawie wyników pomiaru EPMA dla magnezu i wapnia, podobnie jak w przypadku rostrum *Hibolites sp.* okazała się być zbieżna z sygnałem optycznym próbki. Rys. 68 przedstawia tę zależność. Uzyskany wynik potwierdza, że stosunek Mg/Ca może być brany pod uwagę jako chemiczny wskaźnik temperaturowy, zależny od czynników klimatycznych określający zmianę temperatury podczas tworzenia się szkieletów belemnitów. W przypadku badanego okazu rostrum *Belemnitella sp.* należy wykluczyć z rozważań skraje strefy zewnętrznej i wewnętrznej próbki (znajdujące się blisko linii wierzchołkowej), które uległy znacznemu zanieczyszczeniu kwarcem i glinokrzemianami.



Rys. 68 Porównanie odwróconego sygnału Mg/Ca z profilem optycznym próbki.

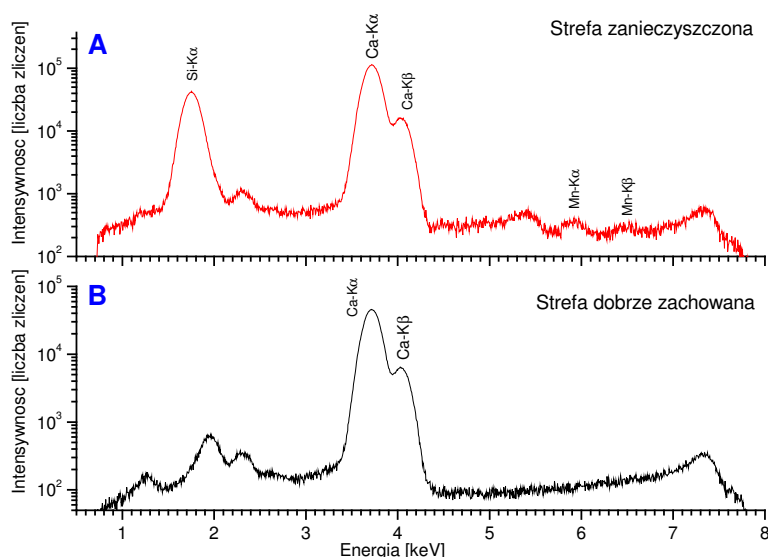
W kolejnym etapie badań rozkładu pierwiastków w rostrum *Belemnitella sp.* przeprowadzono pomiar EPMA dla wybranego obszaru próbki i otrzymano mapy rozkładu pierwiastków. Badana próbka została uznana na etapie badań EPMA liniowego rozkładu pierwiastków za bardzo zanieczyszczoną, ze względu na dużą ilość krzemu obecną w skrajnych strefach zewnętrznych i wewnętrznych (blisko linii wierzchołkowej) rostrum. Mapa rozkładu pierwiastków wykonana metodą EPMA miała pozwolić na dokładne ustalenie rozmieszczenia zanieczyszczeń. Rys. 69 obrazuje powierzchniowe sygnałów powstających od: Ca, Si, C, Fe, Mg i Na na przekroju poprzecznym. Widać wyraźnie, że wapń jest w próbce zastępowany przez krzem, szczególnie w strefach najbardziej podatnych na diagenезę, czyli w strefie wewnętrznej (blisko linii wierzchołkowej) i zewnętrznej próbki.



Rys. 69 Mapy rozkładu pierwiastków: Ca, Si, C, Fe, Mg i Na na przekroju poprzecznym rostrum belemnitu *Belemnitella sp.* z Jury Krakowsko-Częstochowskiej.

Zastanawiające jest to, że rozkład wapnia nie pokrywa się idealnie z rozkładem węgla. Wynik ten zdaje się wskazywać istnienie nadmiaru węgla w stosunku do wapnia (węgiel nie pochodzi najprawdopodobniej jedynie z kalcytu). Wcześniej taką korelację odwrotnego sygnału Ca z sygnałem C obserwowano dla próbki *Hibolites sp.*, co świadczyło o nadmiarze węgla. Najwyraźniej węgiel jest obecny w lepiej zachowanym fragmencie próbki *Belemnitella sp.* również w postaci związków organicznych lub innych niż kalcyt nieorganicznych. Bardzo dobra korelacja C z sygnałem Mg mogłaby wskazywać na obecność węglanu magnezu w tej strefie lub sugerować, że próbkę tworzy wysoko-magnezowy kalcyt, co należałoby potwierdzić analizą XRD. Rozkłady Fe i Na (Rys. 69) dobrze korelują ze sobą. Dodatkowo można stwierdzić, że rozkłady C, Fe, Mg i Na są zbliżone do siebie a sygnały Ca i Si są odwrotnie proporcjonalne, natomiast sygnały C i Ca są odwrotnie proporcjonalne w strefie dobrze zachowanej. W strefie zanieczyszczonej, ze względu na nieobecność węglanu wapnia i zastąpienie go krzemionką porównywanie rozkładu C i Ca nie miałyby sensu.

W celu weryfikacji wyników uzyskanych metoda EPMA, dla badanej próbki wykonano również analizy punktowe za pomocą mikrosondy protonowej w Instytucie Fizyki Jądrowej PAN w Krakowie.



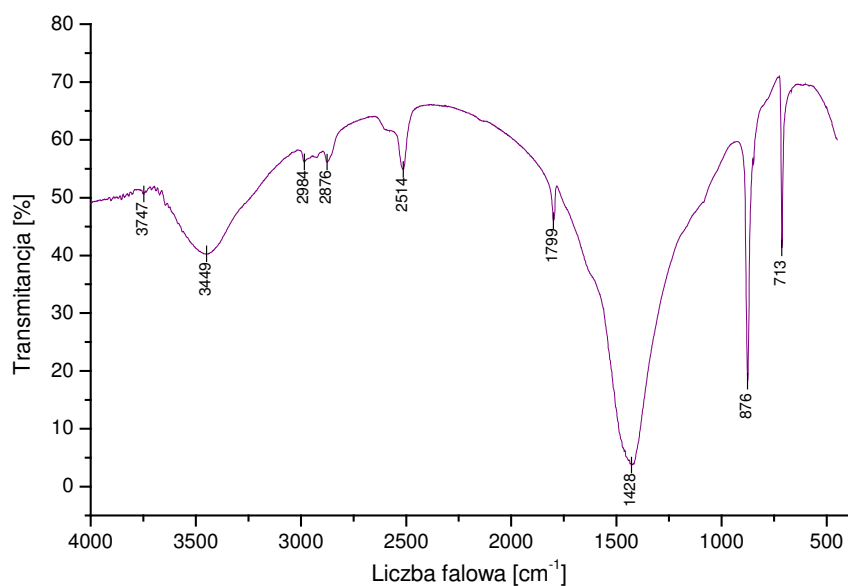
Rys. 70 Widmo PIXE. Strefa ze znacznymi zmianami diagenetycznymi (A) i strefa dobrze zachowana (B)

Pomiar przeprowadzono dla wybranych punktów w strefie zewnętrznej (na krawędzi próbki) oraz w strefie dobrze zachowanej pomiędzy środkiem a krawędzią próbki. Wyniki analiz w postaci widm przedstawiono na Rys. 70. Sygnały krzemu i wapnia okazały się zbliżone do tych uzyskanych metodą EPMA. W strefie zewnętrznej

dominowały oprócz wapnia pierwiastki będące najczęściej zanieczyszczeniami diagenetycznymi: krzem i mangan, którego nie wykryto za pomocą sondy elektronowej (Rys. 70a). Obecność manganu potwierdza duży stopień zanieczyszczenia próbki. W strefie najlepiej zachowanej głównym pierwiastkiem struktury rostrum jest wapń (Rys. 70b).

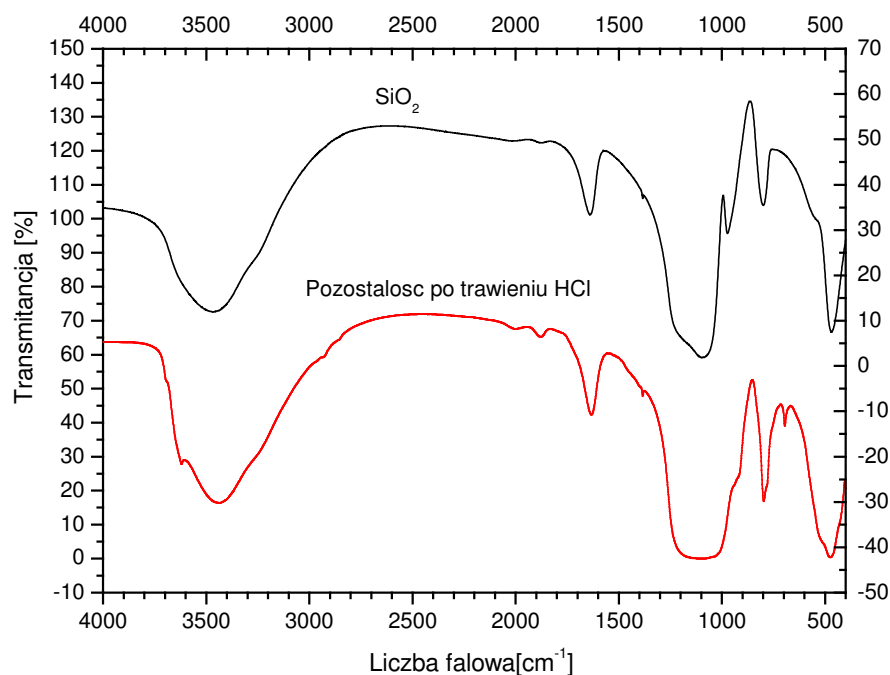
Stwierdzona nadmiarowa ilość węgla w stosunku do wapnia (większa niż wynikająca z obecności w strukturze rostrum *Belemnitella* sp. jedynie kalcytu) sugeruje, że węgiel ten może pochodzić z innych nieorganicznych minerałów lub związków organicznych.

W celu potwierdzenia lub wykluczenia obecności związków organicznych w próbce belemnitu *Belemnitella* sp. wykonano analizy metoda spektrofotometrii w podczerwieni oraz spektrometrii ramanowskiej. Analizy spektrofotometryczne (FTIR) wykonano przygotowując pastylki z rozdrobnionej próbki belemnitu (5mg) wymieszanej z bromkiem potasu (250mg). Analiza nie wykazała obecności związków organicznych. Uzyskano widmo praktycznie czystego kalcytu (Rys. 71). Wszystkie obserwowane piki można przyporządkować do węglanu wapnia. Ponadto można z całą pewnością wykluczyć obecność nawet niewielkiej ilości aragonitu, który mogłaby się znajdować w próbce. Na widmie widoczny jest jedynie pojedynczy pik $\nu=713\text{cm}^{-1}$, charakterystyczny dla kalcytu a nie ma charakterystycznego dla aragonitu podwójnie zdegenerowanego piku w zakresie ν 700÷720 cm^{-1} .



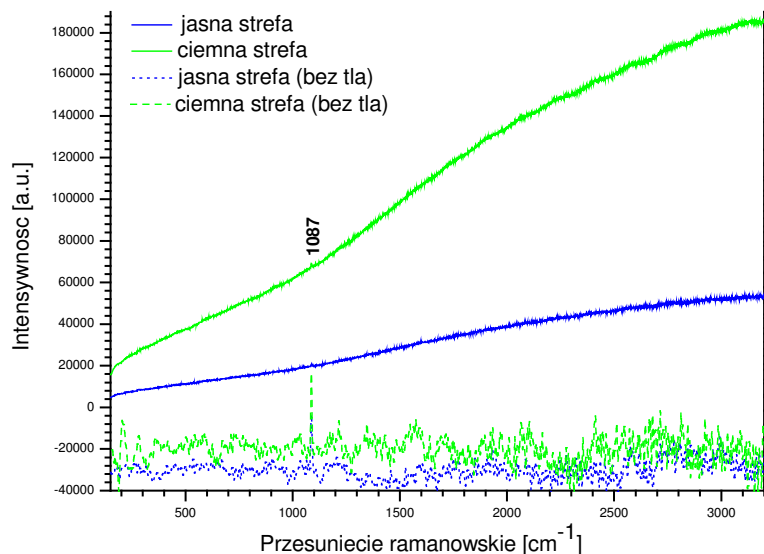
Rys. 71 Widmo FTIR uzyskane dla sproszkowanej próbki rostrum *Belemnitella* sp..

Analizie FTIR poddano również nierozpuszczalną pozostałość po wytrawieniu próbki 1M kwasem solnym w celu sprawdzenia obecności w próbce nierozpuszczalnej pozostałości związków nieorganicznych lub organicznych. Ponieważ nierozpuszczalną matrycą organiczną występującą praktycznie zawsze w szkieletach mięczaków morskich może być Chityna, zwrócono tutaj szczególną uwagę na ten związek. Analiza wykazała, że pozostałość składa się głównie z dwutlenku krzemu. Rys. 72 przedstawia wynik tej analizy, zestawiony z widmem krzemionki uzyskanym podczas pomiarów dla żelu krzemionkowego. Pasma dla $\nu=695\text{ cm}^{-1}$ można przyporządkować nierozpuszczonej pozostałości węglanu wapnia. Pasma $\nu=3620\text{ cm}^{-1}$ pochodzi najprawdopodobniej od zanieczyszczeń, zawierających wiązanie O-H, powstałych podczas przygotowywania próbki lub od pozostałości wody. Nie stwierdzono pasm charakterystycznych dla chityny i innych związków organicznych.



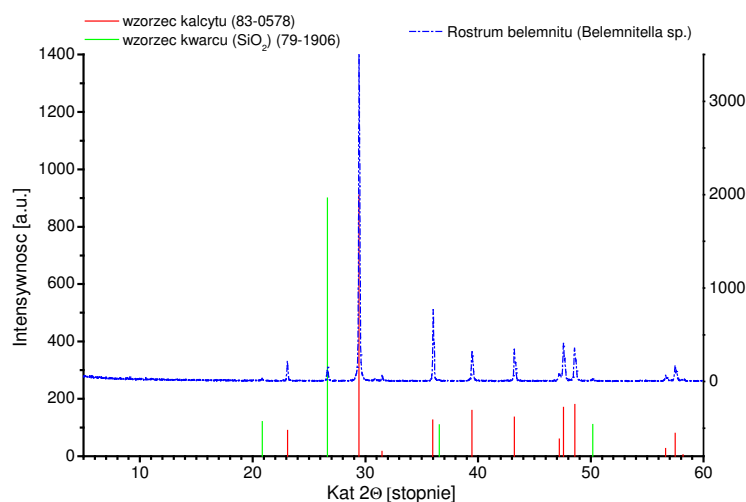
Rys. 72 Widmo FTIR pozostałości szkieletu po wytrawieniu próbki rostrum *Belemnitella sp.* w 1M kwasie solnym.

W kolejnym etapie badań próbkę rostrum poddano analizie za pomocą spektrometru Ramana wykorzystując laser zielony o długości fali $\lambda = 514\text{ nm}$. Czas analizy wynosił 20s na punkt a do analizy zastosowano wiązkę o średnicy $1\mu\text{m}$ i mocy 1 mW.



Rys. 73 Widmo ramanowskie uzyskane dla próbki rostrum belemnitu *Belemnitella sp.* z Jury Krakowsko-Czestochowskiej. Uwagę zwraca szczególnie wysoki poziom szumów pochodzących z fluorescencji w ciemnej strefie, odpowiadającej widocznym pierścieniom.

Próbkę analizowano w taki sposób, aby uzyskać sygnał ze strefy jaśniejszej oraz ciemniejszej, tworzących widoczne na zdjęciu optycznym pierścienie. Dla obu pomiarów zastosowano identyczne warunki. Rys. 73 przedstawia widma uzyskane dla obu stref belemnitu. Wysokie tło zagłusza nawet główne najbardziej intensywne pasmo węgla wapnia ($\nu=1087\text{cm}^{-1}$). Tło jest dużo wyższe w przypadku analizy stref ciemnych. Świadczy to o tym, że w strefach ciemnych znajduje się większa ilość niezidentyfikowanych związków ulegających znacznej fluorescencji niż w strefach jasnych.



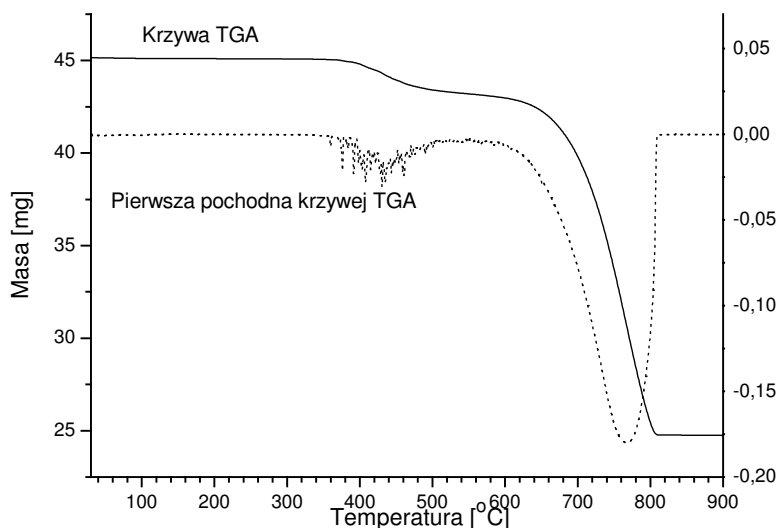
Rys. 74 Dyfraktogram dla próbki rostrum *Belemnitella sp.*. Metoda proszkowa.

Żeby potwierdzić obecność w próbce *Belemnitella sp.* minerałów wykrytych za pomocą spektrofotometrii w podczerwieni i spektrometrii Ramana, przeprowadzono analizy XRD, metodą proszkową, dla części zewnętrznej i wewnętrznej rostrum.

Uzyskano prawie identyczne wyniki dla obu stref. Rys. 74 przedstawia dyfraktogram uzyskany dla próbki z części zewnętrznej rostrum wraz z naniesionymi wzorcami ICDD® kalcytu i kwarcu. Próbka składa się głównie z kalcytu oraz małej ilości kwarcu. Wynik ten jest zgodny z wynikami analiz FTIR i ramanowskiej, co potwierdza przydatność tych technik do analiz strukturalnych. Obecność kwarcu świadczy o zaawansowanej diagenecie próbki. Wyniki analizy EPMA (Rys. 66) sugerowały, że próbka była penetrowana zarówno przez glinokrzemiany jak i krzemionkę a rezultaty analizy XRD wskazują, że wykryła ona w postaci kwarcu.

Aby dokonać oceny zawartości w próbce *Belemnitella sp.* związków organicznych wykonano dla badanej próbki analizę elementarną za pomocą analizatora Carlo Erba z limitem detekcji 0,1%. Stwierdzono obecność: C na poziomie 11,46% i H na poziomie 0,95%. Nie stwierdzono obecności N i S (nieprzekroczony limit detekcji), co świadczy o nieobecności w próbce białek w znacznych stężeniach.

W celu ustalenia ilości materii organicznej w próbce wykorzystano również analizę na termowadze. Krzywa TGA i jej pierwsza pochodna (Rys. 75) wskazują, że próbka traci wagę w dwóch etapach.



Rys. 75 Krzywa TGA uzyskana dla sproszkowanej próbki rostrum *Belemnitella sp.* (*rostrum solidum*). W pierwszym etapie w zakresie temperatur od ok. 45°C do ok. 600°C zachodzi mniejszy ubytek masy (ok. 4,78%). Powyżej 600°C spadek wagi jest gwałtowny i na tym etapie próbka traci ok. 40,39% masy wyjściowej. Uzyskany wynik może świadczyć o tym, że w

pierwszym etapie zachodzi rozkład materii organicznej obecnej w próbkach i/lub dehydratacja wody obecnej w sieci krystalicznej a w drugim rozkład węglanu wapnia.

Trudno jest ocenić jednak, jaka jest zawartość kalcytu w próbce nie znając zawartości domieszek mineralnych matrycy. Biorąc pod uwagę fakt, że materia organiczna powinna się spalić podczas termalnej analizy wagowej w całości, możemy przyjąć, że w rostrum belemnitu może znajdować się maksymalnie 4,7÷5,0% materii organicznej nie wykrytej przy pomocy sondy Ramana ze względu na duży poziom fluorescencji badanego materiału ani za pomocą spektrofotometrii w podczerwieni ze względu na silną absorpcję promieniowania IR przez węglan wapnia. Należy też wziąć pod uwagę, że wynik z termalnej analizy wagowej może być zawyżony, gdyż w pierwszym etapie może zachodzić również dehydratacja wody, która może znajdować się w sieci krystalicznej uwodnionych minerałów zanieczyszczających główny składnik matrycy próbki - kalcyt.

Oznaczenie średniej zawartości procentowej wykrytych metodą EPMA pierwiastków wykonano metodą absorpcyjnej spektrometrii atomowej (AAS) oraz emisyjnej spektrometrii atomowej ze wzbudzeniem w plazmie (ICP-AES). Było to konieczne w celu weryfikacji pomiarów wykonanych za pomocą sondy elektronowej (EPMA). Wyniki analiz umieszczono w Tab. 6.

Tab. 6 Stężenia pierwiastków w rostrum *Belemnitella sp.* oznaczone za pomocą AAS oraz ICP-AES.

| Pierwiastek | Stężenie | |
|-------------|--------------|------------------|
| | FAAS[ppm] ±σ | ICP-AES [ppm] ±σ |
| Mg | 2640 ±87 | 4670 ±199 |
| Mn | 20 ±0,9 | Nie wykonano |
| Na | 2315 ±101 | 2200 ±78 |
| Sr | 820 ±49 | 1400 ±66 |
| Fe | 30 ±1 | 22 ±0,8 |
| K | Nie wykonano | <0,6 |

Wyniki uzyskane obiema metodami są zbliżone i częściowo zgodne z wartościami podanymi dla belemnitów przez Saelena (Sælen and Karstang 1989). W cytowanej pracy minimalne i maksymalne wartości wynoszą odpowiednio dla Sr 546 i 1812 ppm, żelaza – 47 i 3887 ppm (bardzo zanieczyszczona próbka), manganu – 0 i 1769 ppm i magnezu 410 i 5152 ppm a więc oznaczone stężenia w próbce *Belemnitella sp.* pochodzącej z Jury

Krakowsko – Częstochowskiej mieszczą się w zakresie charakterystycznym dla belemnitów. Obecność manganu świadczy o diagenecie próbki i potwierdza dużą czułości analizy PIXE, dzięki której było możliwe wykrycie manganu o zawartości nieprzekraczającej 20 ppm.

Podsumowanie

Przedstawione w tym rozdziale wyniki pokazują, że rostra *Belemnitida* są bardzo ciekawymi obiektami badań, pod względem chemicznym i strukturalnym. Sugestie, że pierścienie na przekroju poprzecznym rostrum są przyrostami okresowymi uzasadniają dodatkowe zainteresowanie belemnitami, ponieważ na podstawie analiz chemicznych i strukturalnych rostrów możemy badać zmiany klimatyczne w epokach życia stworzeń. Próbki rostr *Hibolites sp.*, *Belemnella sp.* i *Belemnitella sp.* analizowano metodami: mikroskopii optycznej, dyfraktometrii rentgenowskiej - XRD, spektrometrii fluorescencji rentgenowskiej XRF z zastosowaniem źródeł wzbudzenia takich jak promieniowanie rentgenowskie ze źródła synchrotronowego, protony i elektrony. Próbka *Belemnitella sp.* została poddana dodatkowo analizom metodą spektrometrii ramanowskiej, spektrofotometrii w podczerwieni oraz termicznej analizy wagowej.

Wszystkie próbki zawierają jedną główną fazę krystaliczną wykrytą za pomocą dyfrakcji rentgenowskiej - kalcyt. W strefie zewnętrznej utworzyły się duże monokryształy, a w rdzeniu blisko linii wierzchołkowej (strefa wewnętrzna) drobniejsze kryształy. Obserwuje się większą przezroczystość próbki w strefie monokrystalicznej. Próbka *Belemnitella sp.* zawierała dodatkowo dużą ilość kwarcu.

Pierwsze analizy fluorescencyjne wykonane za pomocą sondy rentgenowskiej metodą (SRIXE) pozwoliły na wykrycie w próbce *Hibolites sp.*: P, Ti, Fe, Zn oraz Ca. Wapń był głównym składnikiem próbki. Duża zbieżność sygnału wapnia z sygnałem promieniowania rozproszonego wykazała, że porowatość jest głównym czynnikiem wpływającym na zmienność sygnału wapnia w tego rodzaju próbkach. Podobieństwo w rozkładzie liniowym Zn, Fe i Ti oraz duża zawartość tych pierwiastków wewnątrz drobnokrystalicznej i porowatej strefy środkowej próbki może sugerować diagenetyczne pochodzenie żelaza, cynku i tytanu.

Prawie wszystkie wykryte metodą EPMA pierwiastki (Na, Mg, Al, Si, P, S, Cl i K) w rostrum belemnitu *Hibolites sp.* miały rozkład liniowy odwrotnie proporcjonalny do sygnału wapnia. To samo odnosi się do zawartości nadmiarowego węgla. W tej próbce glin był ściśle związany z obecnością krzemu a sód z obecnością chloru. Wprost

proporcjonalne zależności występujące pomiędzy potasem i chlorem oraz sodem i chlorem wskazują, że pierwiastki te mogą znajdować się w próbce w postaci KCl i NaCl. Proporcjonalna zależność pomiędzy glinem a krzemem wyrażona w stosunku molowym Al/Si zbliżonym do wartości 2:1 jest natomiast oznaką tworzenia się w szkielecie zasadowych glinokrzemianów z roztworów Si(OH)_4 i Al(OH)_3 . Z wyników uzyskanych metodą EPMA oraz analiz ilościowych pierwiastków można wywnioskować również, że w próbce występuje pewien nadmiar węgla w stosunku do wapnia i tlenu. Jego zawartość obliczona w stosunku do węglanu wapnia występującego w próbce okazała się większa niż wynikałoby to ze stechiometrii. Dodatkowo, nadmiarowy przebieg zmian węgla wzdłuż przeprowadzonego skanu okazał się odwrotnie proporcjonalny do profilu wapnia, co mogłoby świadczyć o innym niż węglanowym pochodzeniu węgla. Nadmiar węgla w matrycy mineralnej, już wcześniej obserwowany w szkielecie mięczaków, może świadczyć o zachowaniu się części materii organicznej występującej pierwotnie w próbkach (Weiner et al. 1979) lub wtórnym zanieczyszczeniu próbki przez związki organiczne.

Niektóre pierwiastki takie jak: Mn, Fe, Cu i Zn wykryte w próbce *Belemnella sp.* metodą SRIXE miały sygnały (i stężenia) podobnie jak w przypadku próbki *Hibolites sp.*, odwrotne do sygnału wapnia. Tam gdzie sygnał wapnia się zmniejszał, zawartość wymienionych pierwiastków się zwiększała. Maksymalne wartości sygnałów dla wymienionych metali pokrywały się z jaśniejszymi strefami próbek. Krzem był jedynym pierwiastkiem, który zachowywał się inaczej niż reszta pierwiastków. W strefie wewnętrznej zawartość krzemu i wapnia zmieniała się wprost proporcjonalnie a w strefie zewnętrznej krzem był odwrotnie proporcjonalny do rozkładu sygnału wapnia. Zmiany sygnału elektronów wstecznie rozproszonych dla próbki *Belemnella sp.* mogą świadczyć o zmianach gęstości w materiale (matrycy) rostrum szczególnie w strefie centralnej próbki.

Powyższe badania potwierdziły, że materiał kalcytowy rostrum belemnitu *Belemnella sp.* uległ bardzo intensywnie procesowi diagenety. Oryginalny kalcyt występujący w strefie zewnętrznej uległ transformacji w monokryształ. Niektóre pierwiastki znalazły się w rostrum podczas pierwotnej krystalizacji minerału. Obecność krzemu jest pozostałością procesów diagenety, zachodzących w próbkach. Drobne kryształy ze strefy środkowej mogły się formować w małych szczelnych strefach z nasyconych roztworów. Podobny skład pierwiastków śladowych wydaje się potwierdzać takie źródło kalcytu dla strefy wewnętrznej belemnitów. Według mnie małe kryształki

nigdy nie miały odpowiednich warunków, żeby przekształcić się w monokryształy z powodu ograniczonej przestrzeni w strefie środkowej próbki i brak penetracji przez wodę. Zmiany diagenetyczne nie wpłynęły w ogóle na zmianę kształtów i rozmiarów oryginalnie powstałego rostrum belemnitu. Można przypuszczać, że wewnętrzne drobne struktury przypominające pierścienie w belemnitach przetrwały do dzisiaj.

Skan liniowy EPMA ujawnił wewnętrzną strukturę belemnitu i potwierdził jego budowę pierścieniową. Pierścienie te nie pokrywają się jednak precyzyjnie z morfologią optyczną próbki. Jeśli założylibyśmy, że określone zmiany sygnału magnezu są związane ze zmianami rocznymi, moglibyśmy stwierdzić, że belemnity żyły bardzo krótko (kilka lat). Sygnał strontu, który można by również wykorzystać jako wskaźnik zmian rocznych, nie pojawił się podczas analizy próbki *Belemnella sp.* metodą SRIXE.

Rostrum *Belemnitella sp.* było badane w szerszym zakresie. Oprócz analiz przeprowadzonych za pomocą sondy elektronowej wykonano szereg klasycznych analiz ilościowych i jakościowych na obecność związków zarówno organicznych jak i nieorganicznych.

W rostrum belemnitu *Belemnitella sp.* wykryto przy pomocy sondy elektronowej obecność takich pierwiastków jak C, Fe, O, Na, Mg, Al, Si, i Ca. Wszystkie pierwiastki miały rozkład radialny odwrotnie proporcjonalny do sygnału wapnia. Analizy FTIR i ramanowskie, które miały potwierdzić występowanie związków organicznych w rostrum nie dały zadowalających rezultatów. Analizy Ramana wykonane dla próbek belemnitu okazały się nieskuteczne ze względu na bardzo duży poziom fluorescencji materiału próbki występujący podczas pomiaru. Zarejestrowano tylko pik 1087cm^{-1} pochodzący od węglanu wapnia. Należy zauważyć, że ciemne pierścienie występujące na przekroju poprzecznym próbki charakteryzowały się dużo wyższym poziomem fluorescencji.

Uzyskany wynik termicznej analizy wagowej (TGA) może świadczyć o tym, że w pierwszym etapie w próbce *Belemnitella sp.* zachodzi rozkład materii organicznej obecnej w próbkach i/lub dehydratacja wody obecnej w sieci krystalicznej ewentualnych zanieczyszczeń a w drugim rozkład węglanu wapnia. Trudno jest ocenić jednak, jaka jest zawartość kalcytu w próbce, nie znając dokładnie jakościowego i ilościowego składu domieszek mineralnych matrycy. Biorąc pod uwagę fakt, że materia organiczna powinna się spalić podczas termalnej analizy wagowej w całości, możemy przyjąć, że w rostrum belemnitu może znajdować się maksymalnie $4,7\div 5,0\%$ materii organicznej.

Nadmiar węgla wykryty metoda EPMA mógłby świadczyć o obecności pozostałości organicznych w próbkach. Nie potwierdzają jednak tego bardzo czuła analiza FTIR i mikroanaliza wykonana za pomocą spektrometru Ramana. Myślę, że nie należy oczekiwać zbyt dużych ilości związków organicznych, ponieważ próbki skamielin są wysoko-zmineralizowane i w związku z tym stężenia ewentualnych domieszek organicznych są bardzo niewielkie. Analiza FTIR wykonana dla rostrum *Belemnitella sp.* wykazała tylko obecność kalcytu, ale pozwoliła na wykluczenie występowania aragonitu co jest czasami niemożliwe nawet w przypadku analiz XRD, dużo mniej czułych przy stężeniu domieszek nie przekraczających 1%. Dzięki tej metodzie możliwe było również potwierdzenie obecności kwarcu w nierozpuszczalnej pozostałości po dekalcytacji próbki oraz wykluczenie obecności nierozpuszczalnych związków organicznych, w tym również chityny.

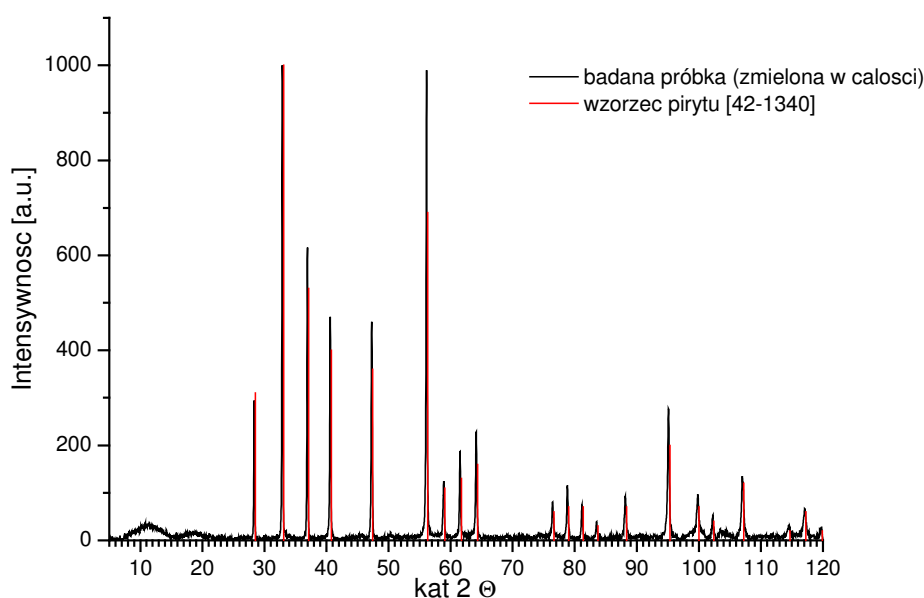
Koncentryczne pierścienie przyrostu widziane na zdjęciach optycznych przekrojów poprzecznych rostrów *Hibolites sp.* oraz *Belemnitella sp.* są najprawdopodobniej związane z rocznymi (lub innymi okresowymi) przyrostami warstw, przypominają one warstwy okresowe występujące w szkieletach współczesnych mięczaków i koralii. Stwierdzono, że stosunek molowy Mg/Ca i jego zmiany wzdłuż linii przecinającej kolejne pierścienie występujące na przekroju poprzecznym rostrów wykazuje zbieżność z profilami optycznymi próbek belemnitów.

Zgromadzone wyniki mogą stanowić dobrą podstawę do podjęcia obszernych badań rostrów jako wskaźników sezonowych zmian temperatury w wodach oceanicznych w czasach życia belemnitów. Trudno jest natomiast ustalić uniwersalną i absolutną skalę paleotemperaturową, ponieważ molowy stosunek Mg/Ca zależy również, choć w mniejszym stopniu, od rodzaju organizmu i szkieletu przez niego tworzonego. Należy zwrócić uwagę na procesy metaboliczne przebiegające w żywych stworzeniach, ponieważ one mogą również wywrzeć niemały wpływ na obecność niektórych pierwiastków w szkieletach i ich wzajemne stosunki (Purton-Hildebrand et al. 2001).

3.3.3. Szkielet *Ammonitida Kosmoceras duncani*

W celu określenia i scharakteryzowania chemicznego składu oraz uzyskania informacji o strukturze i przestrzennym rozmieszczeniu składników chemicznych ścianki zewnętrznej oraz wewnętrznej przegrody w muszli amonitu *Kosmoceras duncani* z wieku Kelowej (Tab. 1) pochodzącego z Riazania wykonano standardową analizę dyfrakcyjną (XRD) oraz serię oznaczeń z wykorzystaniem nowoczesnych technik mikroanalitycznych takich jak: Spektrometria Ramana, μ -XRF, μ PIXE oraz EPMA.

Na wstępie wykonano analizę sproszkowanego większego fragmentu szkieletu w zakresie kątów 2θ od $5-120^\circ$. Dyfraktogram uzyskany w tej analizie przedstawia Rys. 76.

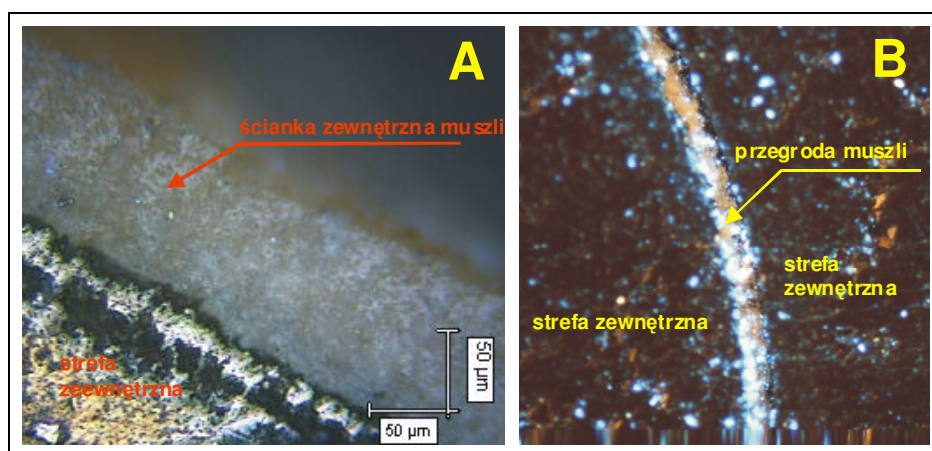


Rys. 76 Dyfraktogram uzyskany metoda proszkową dla próbki amonitu zmielonego w całości, zestawiony z wzorcem pirytu [42-1340].

Głównym minerałem zidentyfikowanym podczas analizy był piryt. Otrzymany wynik wskazywał, że szkielet występujący pierwotnie w postaci aragonitu (Dauphin 2002; Kulicki et al. 2007) mógł ulec praktycznie całkowitemu rozpuszczeniu a zachował się tylko pirytowy odlew muszli. Obecność dwóch szerokich pików występujących na dyfraktogramie w zakresie kątów 2θ od 5 do 25° może świadczyć, że w próbce znajduje się pierwotna lub wtórna materia organiczna.

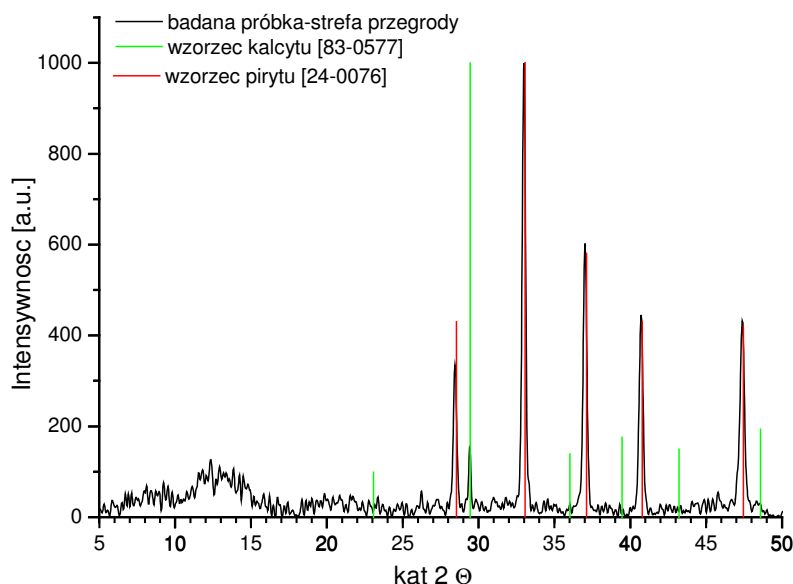
Obserwacja wzrokowa oraz mikroskopowa przeprowadzona dla badanej próbki (Rys. 77) sugeruje jednakże, że badana muszla zawiera nadal pierwotny minerał (jaśniejszy od pirytu), występujący w jej przegrodach wewnętrznych oraz w ścianie

zewewnętrznej tworzącej ornamentację muszli. Jego zawartość jest jednak wyraźnie na tyle niska, że nie możliwe jest wykrycie jego obecności metodą XRD, gdy pomiar wykonuje się dla uśrednionej próby.



Rys. 77 Zdjęcia optyczne próbki przekroju muszli amonitu obrazujące ściankę zewnętrzną (A) oraz przegrodę (B). Do obserwacji przegrody zastosowano światło UV.

Z tego względu kolejne próbki do analizy XRD przygotowano izolując i mieląc fragmenty ścianki zewnętrznej oraz ścianki przegrody muszli amonitu. **Rys. 78** przedstawia dyfraktogram uzyskany dla próbki przegrody. Pomiar wykonano w zakresie 2θ 5-50° z rozdzielczością 0,02°.

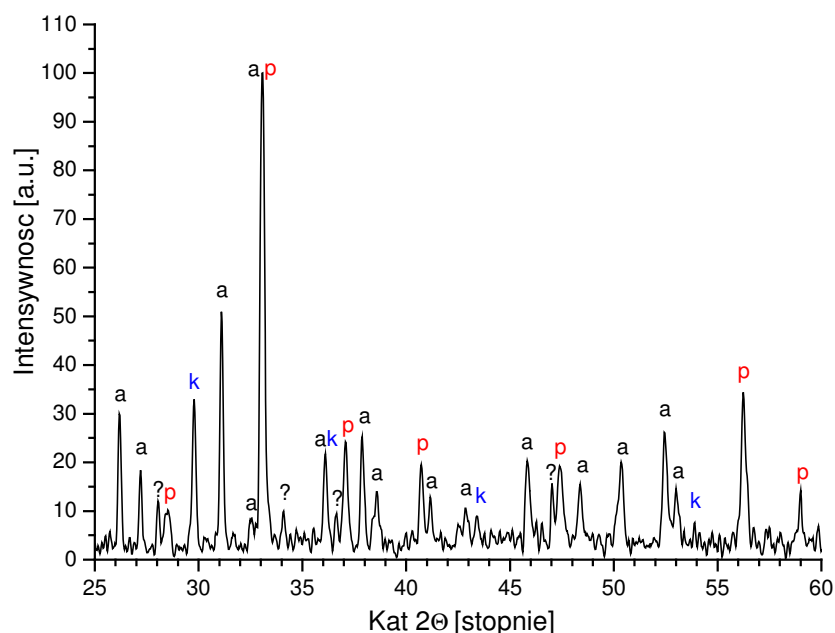


Rys. 78 Dyfraktogram uzyskany metoda proszkową dla fragmentu muszli amonitu zawierającego zachowaną przegrodę oraz dyfraktogramy wzorcowe pirytu [24-0076] oraz kalcytu [83-0577].

Oprócz pików charakterystycznych dla pirytu oraz materii organicznej w zakresie $5\div 20^\circ$ pojawił się wyraźny sygnał kalcytu. Mineral ten wchodzi bez wątpliwości w skład

badanej przegrody. Z uzyskanego wyniku można wnioskować, że pierwotnie aragonitowa przegroda muszli uległa podczas diagenetyzacji przeobrażeniu w kalcyt.

Rys. 79 przedstawia dyfraktogram uzyskany dla próbki ścianki zewnętrznej muszli. Pomiar wykonano w zakresie 2θ 25-60° z rozdzielczością 0,02°. Sproszkowany fragment muszli, w którym na podstawie obserwacji optycznych oceniono, że zawiera inny minerał niż piryt dał rzeczywiście bardziej złożony sygnał XRD.



Rys. 79 Dyfraktogram uzyskany metoda proszkową dla fragmentu muszli amonitu zawierającego zachowaną ściankę zewnętrzną. Literami zaznaczono piki pochodzące kolejno od aragonitu (a), pirytu (p) i kalcytu (k).

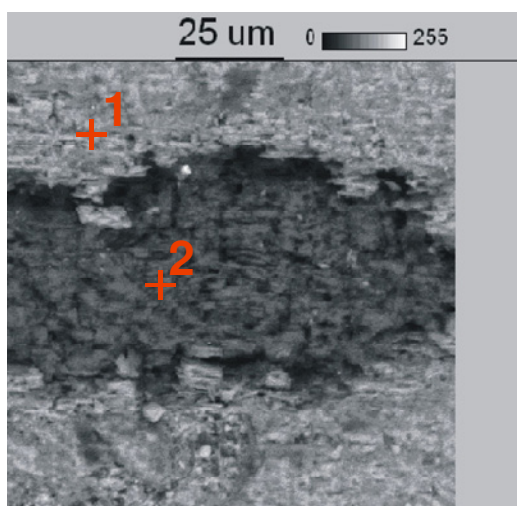
W próbce wykryto obecność aragonitu, kalcytu i pirytu. Widać, że badana ścianka zawiera dwie najczęściej występujące w przyrodzie formy węgla wapnia. Aragonit uznano za materiał pierwotny. Kalcyt wytworzył się, podobnie jak dla przegrody, podczas przemiany polimorficznej z aragonitu.

Po wstępnych analizach składu mineralogicznego wykonanych dla wybranych fragmentów próbki wykonano szereg analiz mikro-strukturalnych. Aby ułatwić dyskusję, uzyskane za pomocą sond wyniki dla przegrody i ścianki zewnętrznej przedstawiono osobno. Ze względu na dość niewielką grubość warstwy pierwotnej muszli oraz postać, w jakiej się zachowała (cienka warstwa węgla wapnia mocno przylegająca do warstwy pirytowej), niemożliwa była ilościowa separacja warstw oraz oznaczenie ilościowe za pomocą standardowych metod AAS oraz ICP-AES. Z tego względu zdecydowano się na

analizę ilościową EDS za pomocą sondy elektronowej w wybranych punktach lepiej zachowanej ścianki zewnętrznej muszli.

Ścianka przegrody

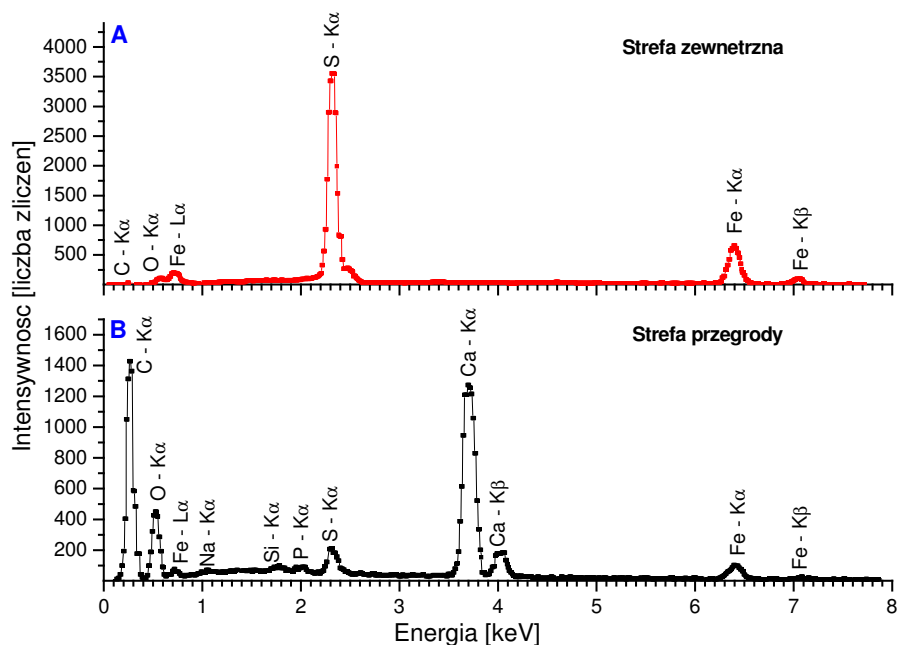
Po przeprowadzeniu analizy dyfrakcyjnej wykonano dla ścianki przegrody muszli amonitu obserwację pod mikroskopem elektronowym oraz analizę EDS w wybranych punktach w celu oceny morfologii i składu pierwiastkowego próbki. Obserwacje oraz analizy EDS wykonano za pomocą sondy elektronowej Wydziału Nauk Geologicznych, Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie. Na tym samym urządzeniu przeprowadzono również skany liniowe i mapowanie wykrytych pierwiastków. Przed analizami wykonano na SEM zdjęcie za pomocą elektronów wstecznie rozproszonych od próbki, na których zaznaczono miejsca pomiarów. Rys. 80 przedstawia zdjęcie SEM oraz punkty, w których przeprowadzono analizę jakościową. Pomiar przeprowadzono z użyciem wiązki elektronów o średnicy 2µm. Czas pomiaru wynosił 30s na punkt.



Rys. 80 Zdjęcie SEM przekroju poprzecznego przegrody wewnętrznej muszli amonitu wraz z zaznaczonymi punktami gdzie, przeprowadzono analizę EDS.

Z widm uzyskanych podczas pomiaru EDS (Rys. 81) widać, że badane obszary różnią się składem chemicznym. Obszar na zewnątrz przegrody (punkt 1, Rys. 81a) zawiera praktycznie tylko siarkę i żelazo, co odpowiadałoby występowaniu pirytu, wykrytemu metodą dyfrakcyjną. Niewielka ilość C i O odpowiada prawdopodobnie występowaniu śladowej ilości węglanów żelaza bądź małym domieszkom kalcytu. Rys. 81b przedstawia widmo uzyskane dla punktu wewnątrz przegrody muszli (punkt 2). W tej strefie głównym składnikiem materiału jest wapń. Duża ilość węgla i tlenu obecna w próbce pozwala stwierdzić, że głównym składnikiem przegrody jest węglan wapnia w postaci kalcytu (wykryty też metodą XRD). Oprócz węgla, wykryto w tej strefie niewielką ilość żelaza i

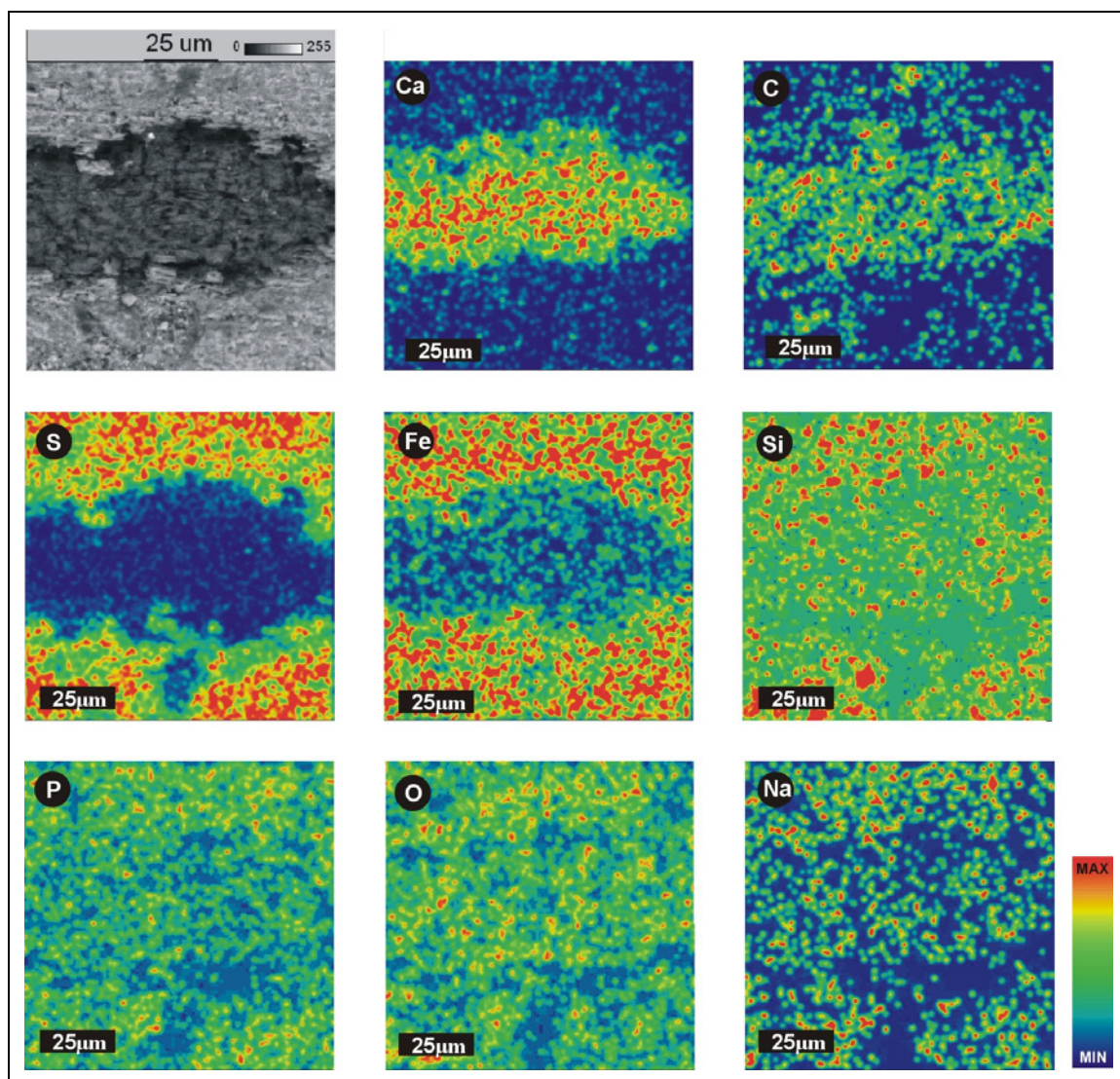
siarki pochodzących od pirytu, (co świadczyłyby o penetracji ścianki przez piryt) oraz krzemu, fosforu i sodu stanowiących prawdopodobnie również wtórne zanieczyszczenie próbki.



Rys. 81 Widmo EDS uzyskane A) dla pomiaru 1 w warstwie ścianki przegrody, B) dla pomiaru 2 w warstwie przylegającej do ścianki przegrody amonitu *Kosmoceras duncani*.

Żeby dokładnie ocenić stopień wzajemnego przenikania się warstw oraz pierwiastków w nich występujących, przeprowadzono analizę powierzchniową pozwalającą na uzyskanie mapy rozkładu dla wykrytych pierwiastków (C, O, Fe, Si, P, S oraz Ca) i wyniki umieściłem na Rys. 82. Na otrzymanych mapach najbardziej miarodajny jest rozkład wapnia, odpowiadający obszarowi zachowanej ścianki przegrody. Rozkład węgla nie nakłada się idealnie z wapniem, co mogłoby świadczyć o tym, że wapń związany w próbce nie występuje wyłącznie w postaci węglanu, ale również w innej formie. Co ciekawe, poza strefą ścianki wyraźne są małe wtrącenia węgla występujące w warstwie pirytowej, bez związku z wapniem. Rozkład powierzchniowy żelaza i siarki jest prawie identyczny. Największe ich stężenia występują poza interesującą nas przegrodą muszli, co świadczy, że matrycą poza ściankami muszli jest piryt (FeS_2). Sygnały od fosforu, tlenu oraz sodu rozkładają się na badanym obszarze dość równomiernie. Sygnał krzemu jest mniejszy w strefie przegrody, co nie jest zgodne z uzyskanymi wynikami pomiarów punktowych przedstawionych na widmach. Strefa kalcytowa wydaje się znacznie mniej zanieczyszczona chemicznie niż strefa pirytu. Jest to dobry znak, bo

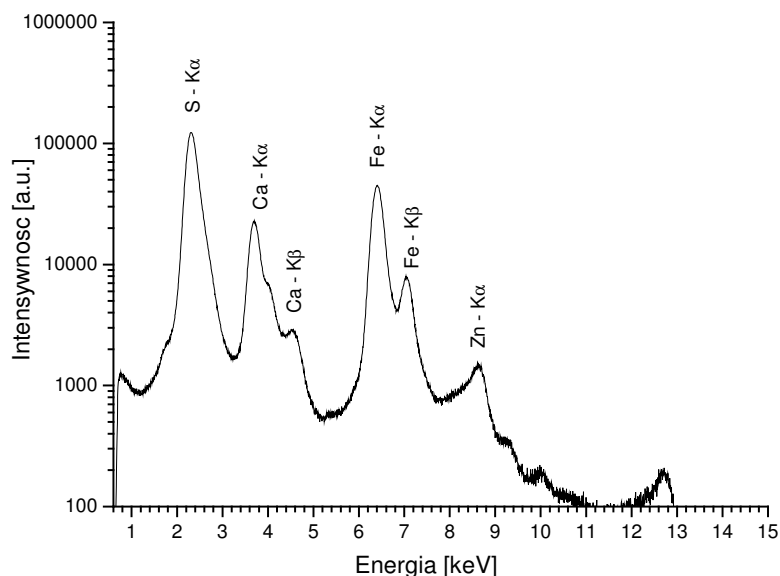
wykazuje, że pierwotne przegroda w znacznym stopniu uniknęła penetracji przez płyny infiltrujące skamielinę.



Rys. 82 Mapy rozkładu sygnałów Ca, C, S, Fe, Si, P, O i Na uzyskanych metodą EPMA dla przekroju poprzecznego muszli amonitu zawierającego przegrodę wraz ze zdjęciem badanego obszaru, uzyskanym poprzez rejestrację sygnału elektronów wstecznie rozproszonych na próbce.

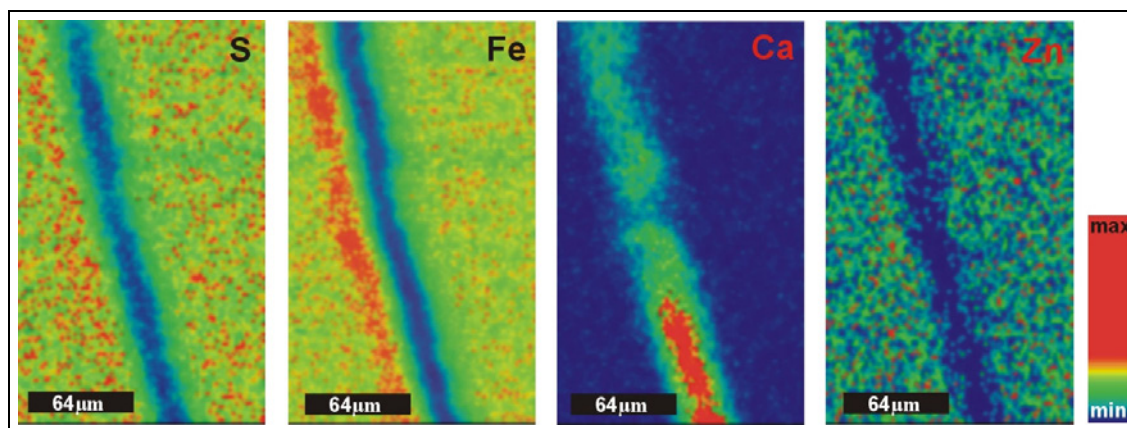
Podobnie jak dla szkieletu *Sepia Officinalis* dla przegrody muszli amonitu *Kosmoceras duncani* wykonano analizy uzupełniające za pomocą sondy protonowej oraz rentgenowskiej. Chciałem w ten sposób zarejestrować w próbce ciężkie pierwiastki i określić ich rozkład przestrzenny.

Podczas pomiaru za pomocą sondy protonowej w próbce wykryto tylko cztery pierwiastki: S, Ca, Fe oraz Zn.



Rys. 83 Widmo kumulacyjne uzyskane z obszaru zawierającego przegrodę ze szkieletu amonitu *Kosmoceras duncani* zebrane podczas pomiaru PIXE.

Uzyskane widmo (Rys. 83) okazało się bardzo ubogie, gdyż oprócz Ca, Fe i S pojawił się tylko cynk. Niemniej dla tego pomiaru również wykonano mapy rozkładu obecnych pierwiastków (Rys. 84).

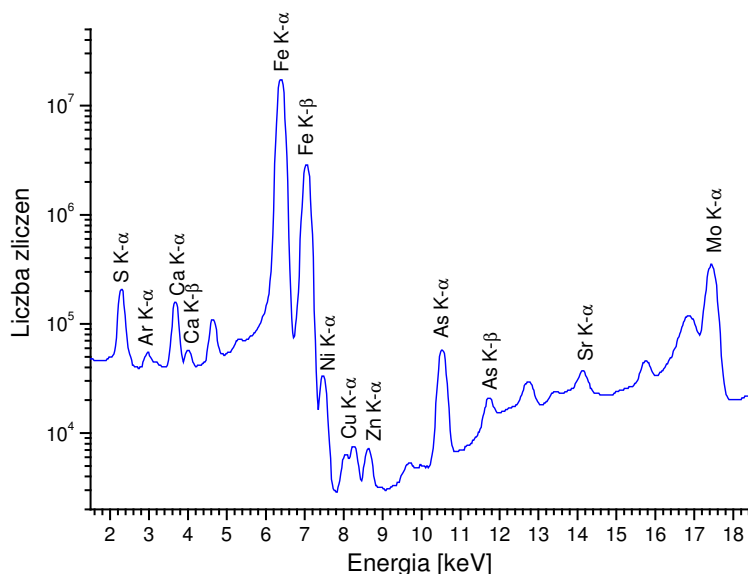


Rys. 84 Mapy rozkładu sygnałów siarki żelaza, wapnia i cynku na powierzchni przekroju poprzecznego szkieletu amonitu zawierającego fragment przegrody uzyskane przy pomocy sondy protonowej.

Rozmieszczenie siarki żelaza i wapnia odpowiada uzyskanemu wcześniej w analizie za pomocą sondy elektronowej. W zachowanej ściance przegrody znajduje się największa ilość wapnia a w strefach do niej przylegających najwięcej żelaza i siarki, co odpowiada występowaniu pirytu. Przestrzenne rozmieszczenie cynku na badanym przekroju poprzecznym najbardziej koreluje z sygnałem żelaza, co mogłoby świadczyć o

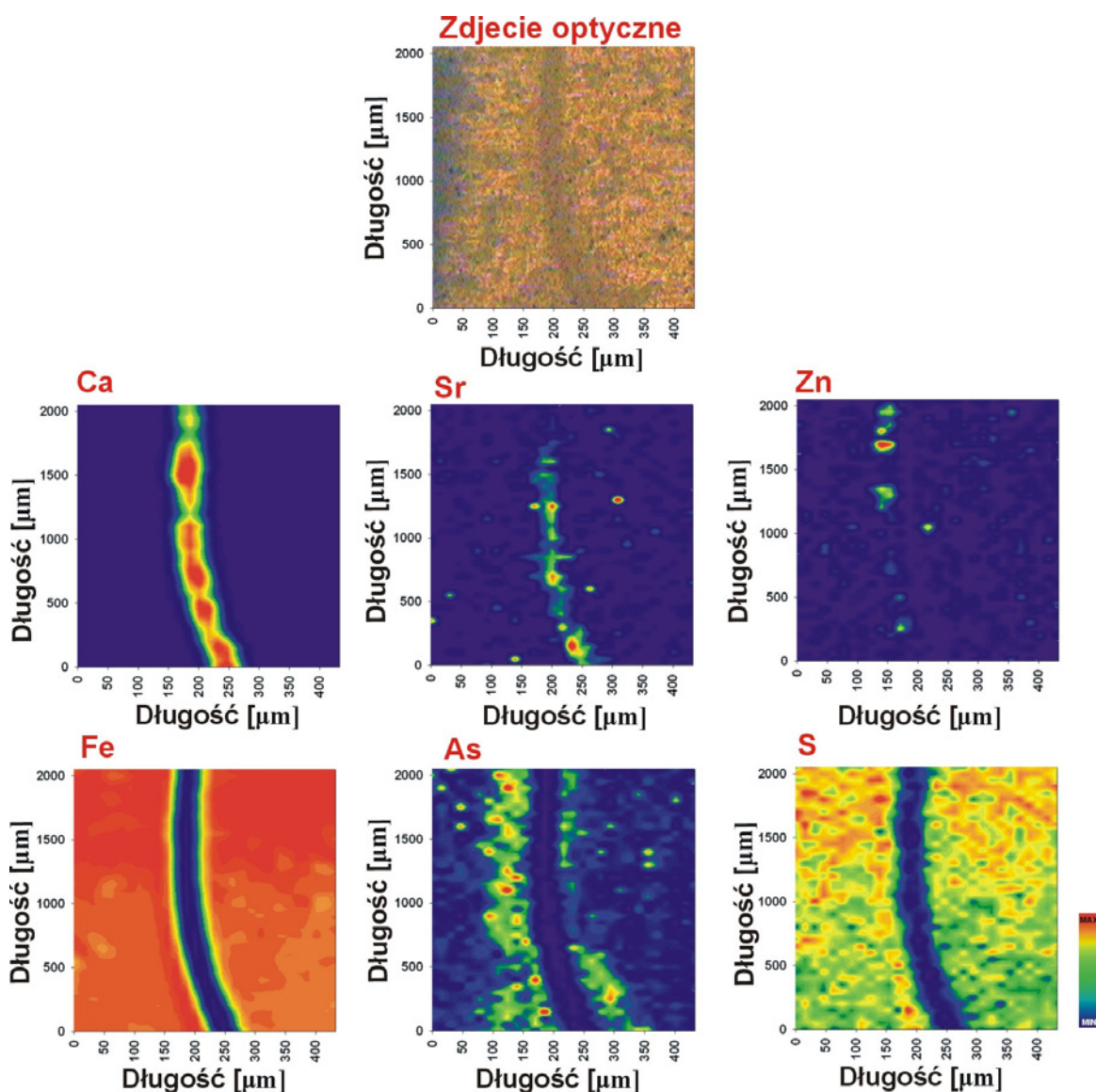
występowaniu w próbce minerału cynkowego w bardzo małym stężeniu (nie wykrytego żadną metodą) jako domieszki pirytu.

Żeby poszerzyć wiedzę o badanej próbce dla analizowanego fragmentu zawierającego przegrodę muszli wykonano również analizę XRF. Analizę wykonano dla obszaru dobrze zachowanego fragmentu przegrody w Instytucie Międzynarodowej Energii Atomowej w Seibersdorf (Austria) za pomocą spektrometru XRF opisanego w części aparaturowej. Najpierw wykonano pomiary jakościowe w celu określenia składu pierwiastkowego próbki. Kolejnym etapem była już analiza powierzchniowa przekroju poprzecznego przegrody amonitu. Na Rys. 85 znajduje się widmo kumulacyjne zebrane dla analizowanego obszaru. Jest to suma sygnałów z wszystkich punktów poddanych analizie. W badanym fragmencie oprócz Fe, S oraz Ca wykrytych metodą EPMA oraz Zn wykrytego za pomocą sondy protonowej pojawiły się sygnały pochodzące od Ar, Ni, Cu oraz As.



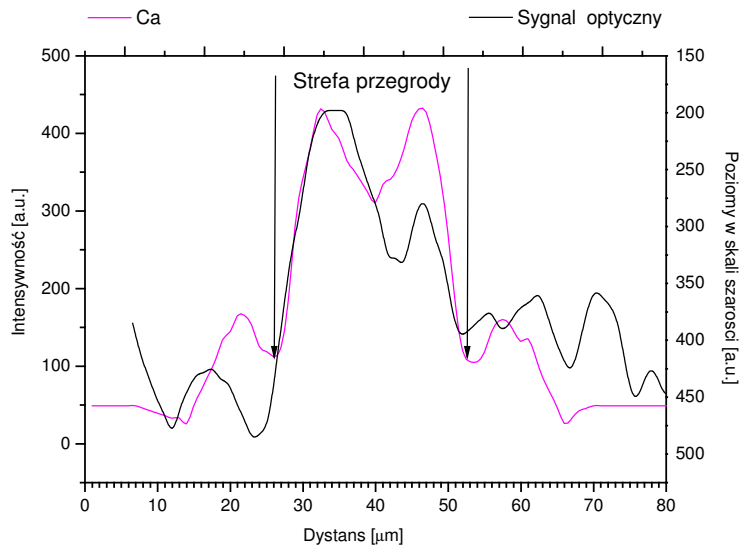
Rys. 85 Widmo kumulacyjne mikro-fluorescencji rentgenowskiej uzyskane podczas analizy powierzchniowej przekroju poprzecznego przegrody muszli amonitu.

Dla wszystkich zidentyfikowanych pierwiastków, po kalibracji widma oraz po scałkowaniu pików za pomocą programu Spector wyznaczono mapy rozkładu pierwiastków (Rys. 86). Równolegle, korzystając z danych uzyskanych podczas mapowania dla badanej przegrody, wykonano profile liniowe pierwiastków i zestawiono je ze sobą oraz z profilem optycznym uzyskanym ze zdjęcia optycznego.

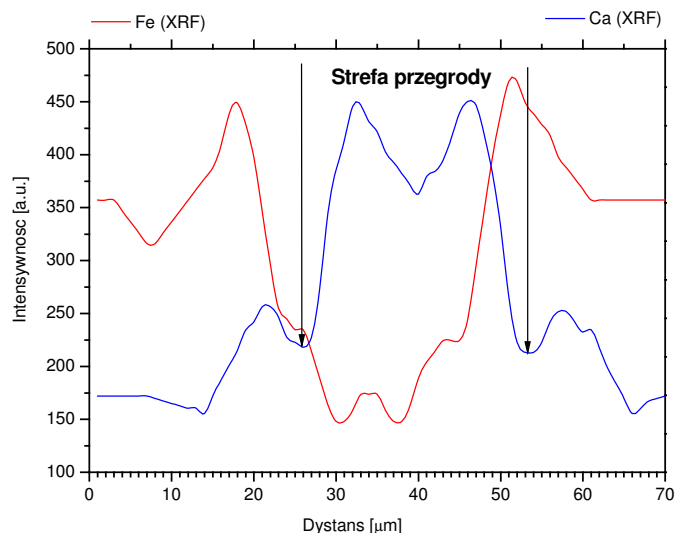


Rys. 86 Mapy rozmieszczenie pierwiastków: Ca, Sr, Zn, Fe, As i S na przekroju poprzecznym przegrody w próbce amonitu *Kosmoceras duncani* wraz ze zdjęciem optycznym badanego obszaru.

Na **Rys. 86** zawierającym również zdjęcie optyczne widać, że analizowany fragment składa się z dwóch zróżnicowanych struktur. Wapń znajduje się w centralnej części analizowanego materiału, w cieńszym wewnętrznym paśmie widocznym na zdjęciu optycznym (**Rys. 86**), rozpoznanym jako kalcytowe i tworzące przegrodę amonitu. Na **Rys. 87** zestawiono profil optyczny z profilem wapnia, co potwierdza te obserwacje. Mapy rozkładu żelaza i siarki są całkowitym przeciwieństwem rozkładu wapnia (**Rys. 86 i 88**). Pierwiastki te swoje maksimum osiągają w zewnętrznych strefach analizowanego fragmentu. Rozkład żelaza i siarki potwierdza, iż w danej strefie znajduje się siarczek żelaza, dlatego też identyfikujemy ją jako strefę pirytową.



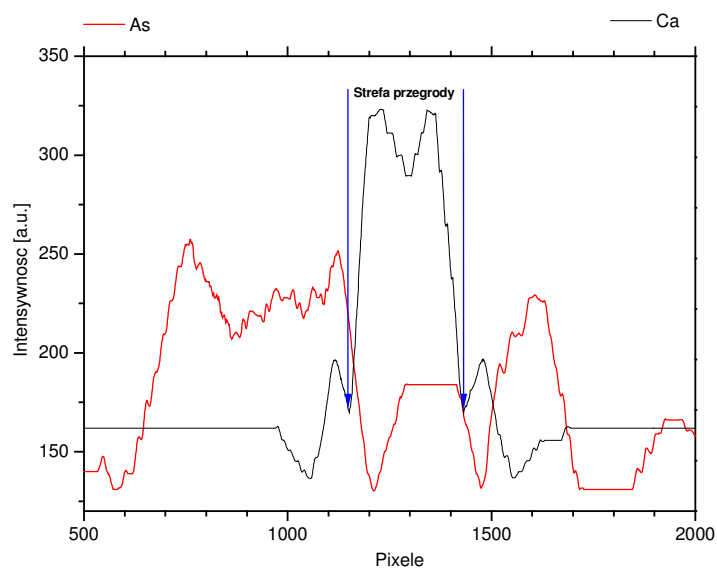
Rys. 87 Odwrócony profil optyczny na linii pomiaru przegrody amonitu zestawiony z uzyskanym sygnałem wapnia (strzałkami zaznaczono zakres strefy przegrody muszli).



Rys. 88 Profile Fe i Ca na przekroju poprzecznym przegrody muszli amonitu *Kosmoceras duncani*.

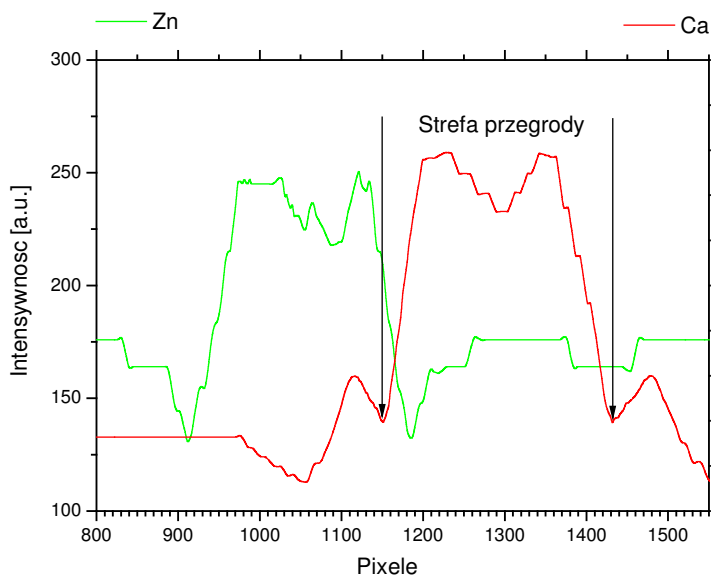
Arsen jest pierwiastkiem występującym w strefie pirytowej. Jego rozkład nie jest jednolity, gdyż swoje maksimum osiąga na granicy stref (Rys. 86). Potwierdza to wykonany profil liniowy (Rys. 89). Wraz z wnikaniem do struktury pirytowej, stężenie maleje i świadczy to prawdopodobnie o adsorpcji arsenu na kalcycie

Podobny rozkład przedstawia mapa cynku (Rys. 86), która tworzy wyłącznie otulinę dla wewnętrznego pasma wapiennego, ale tylko po jednej stronie. Stężenie cynku również maleje wraz z wnikaniem w warstwę pirytową.



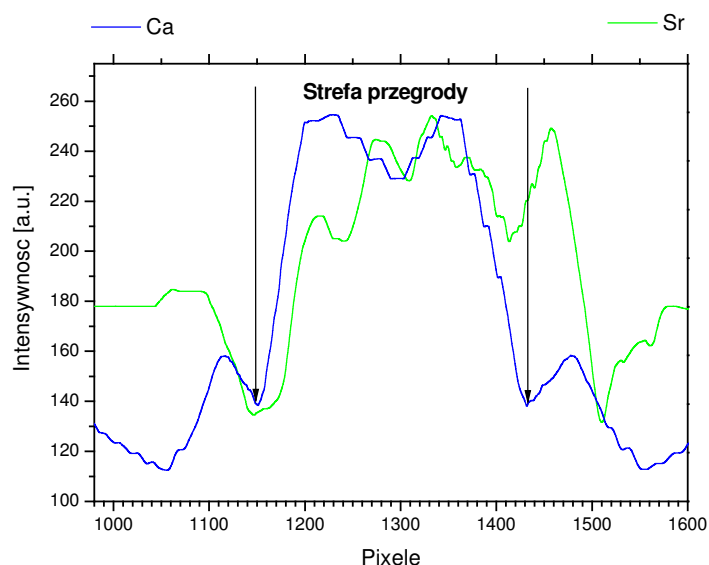
Rys. 89 Sygnały As i Ca wzdłuż linii pomiaru przekroju poprzecznego przegrody muszli amonitu *Kosmoceras duncani*.

Na Rys. 90 znajdują się zestawione profile wapnia i cynku obrazujące omawianą zależność.



Rys. 90 Zestawione sygnały Zn i Ca wzdłuż linii pomiaru przekroju poprzecznego przegrody muszli amonitu *Kosmoceras duncani*.

Rozkład strontu jest analogiczny z rozkładem wapnia (Rys. 86 i 91). Obecność strontu, który wbudowuje się głównie w strukturę aragonitową mógłby świadczyć o tym, że badany fragment był pierwotnie aragonitowy a przemiana w kalcyt zaszła w wyniku diagenety próbki.

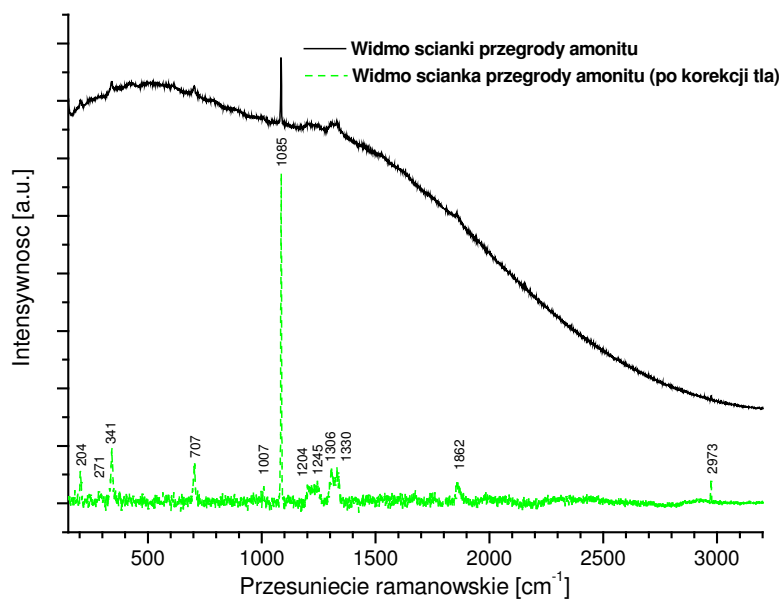


Rys. 91 Zestawione profile Ca i Sr dla przekroju poprzecznego przegrody muszli amonitu.

Po analizach z wykorzystaniem fluorescencji rentgenowskiej przeprowadzono analizy za pomocą mikro-sondy ramanowskiej w celu uzyskania informacji dotyczących rozkładu związków organicznych i nieorganicznych obecnych w próbce. Rozpoznanie przeprowadzono na podstawie widm wzorcowych pirytu i kalcytu oraz zakresów pasm charakterystycznych, odpowiadającym poszczególnym cząsteczkom, wiązaniom bądź grupom funkcyjnym.

Widma ramanowskie charakteryzują się często dużym poziomem szumów (fluorescencja), dlatego nie zawsze w analizie pojawiają się wszystkie piki pochodzące od danego związku, dlatego czasami przeprowadza się analizę na podstawie najbardziej intensywnych pików. W takim przypadku możemy jedynie przeprowadzić charakterystykę rozmieszczenia pewnej grupy związków takich jak węglany, siarczany oraz związków organicznych zawierających grupy C-H, O-H, N-H, C-N itp.

Analizy za pomocą spektrometru Ramana dla przegrody amonitu były prowadzone w wybranych punktach, w celu optymalizacji warunków pomiaru. Rys. 92 przedstawia widmo uzyskane w środku ścianki w pełnym zakresie pomiarowym spektrometru od 150 do 3200 cm^{-1} . Analizę dla przegrody wykonano stosując laser o długości fali $\lambda=514\text{nm}$ i mocy 0,8mW. Czas pomiaru na punkt wynosił 20s.

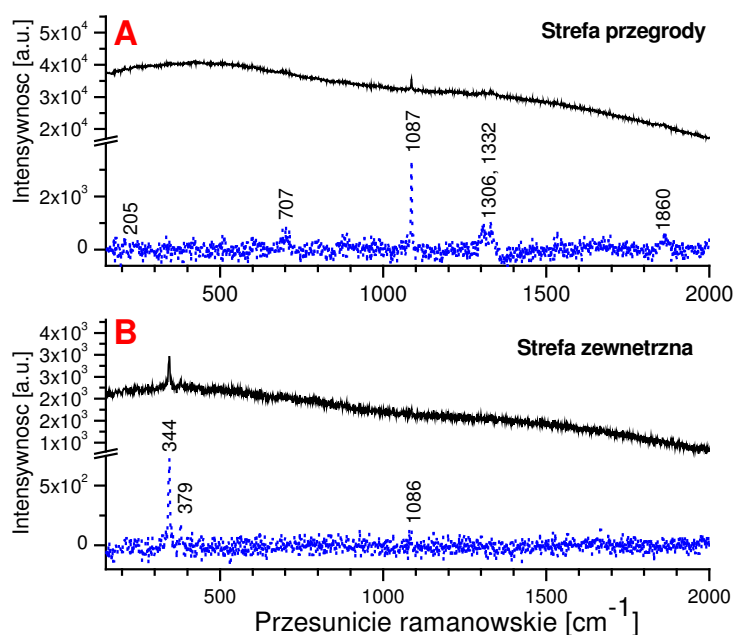


Rys. 92 Widmo ramanowskie uzyskane dla przegrody szkieletu amonitu *Kosmoceras Duncani*.

W widmie, które posiada bardzo duży poziom tła można dostrzec (szczególnie po korekcji tła) kilka charakterystycznych pików. Piki dla $\nu=204\text{cm}^{-1}$, 707cm^{-1} , 1085cm^{-1} i 1862cm^{-1} można przyporządkować węglanowi wapnia. Piki 271cm^{-1} i 341cm^{-1} pochodzą od pirytu. Pik 1007cm^{-1} został przyporządkowany grupie siarczanowej a 2973cm^{-1} grupie C-H₂. Dwa piki 1306 oraz 1330 pochodzą od grupy piroksenowej pochodzącej od krzemianów łańcuchowych (nie wykrytych metoda dyfrakcyjną), które pojawiły się w wyniku diagenetycznych przemian próbki. Dwa piki 1204cm^{-1} oraz 1245cm^{-1} można przyporządkować do glinokrzemianów.

Po analizie wstępnej i zoptymalizowaniu parametrów pracy spektrometru Ramana przeprowadzono kilka dalszych analiz w reprezentatywnych punktach próbki w celu wykrycia określenia stopnia zmienności składu chemicznego na badanej powierzchni przedstawiającej przekrój poprzeczny przegrody. Wyniki analiz punktowych wykonanych w ograniczonym zakresie $150 \div 2000 \text{ cm}^{-1}$ (w celu skrócenia czasu analizy), znajdują się na [Rys. 93](#). Do analizy za pomocą spektrometru ramanowskiego wybrano analogiczny fragment jak do analizy EPMA. W badanym fragmencie można wyróżnić dwie strefy. Pierwsza to przegroda a druga stanowi warstwa ją otaczająca. Na widmie uzyskanym dla strefy pierwszej ([Rys. 93a](#)) (w środku przegrody) pojawia się głównie sygnał pochodzący od węglanów w postaci pików $\nu=1860\text{cm}^{-1}$, $\nu=1089\text{cm}^{-1}$, $\nu=707\text{cm}^{-1}$ i $\nu=232\text{cm}^{-1}$ oraz piki: podwójny ν ($1306,1332$) pochodzący od piroksenów – krzemianów łańcuchowych o wzorze $\text{AB}[\text{Si}_2\text{O}_6]$, gdzie A – to najczęściej Ca, Na lub Li a B – Mg, Fe lub Al. W strefie zewnętrznej ([Rys. 93b](#)) pojawiają się piki 344cm^{-1} i 379cm^{-1} pochodzące od pirytu oraz

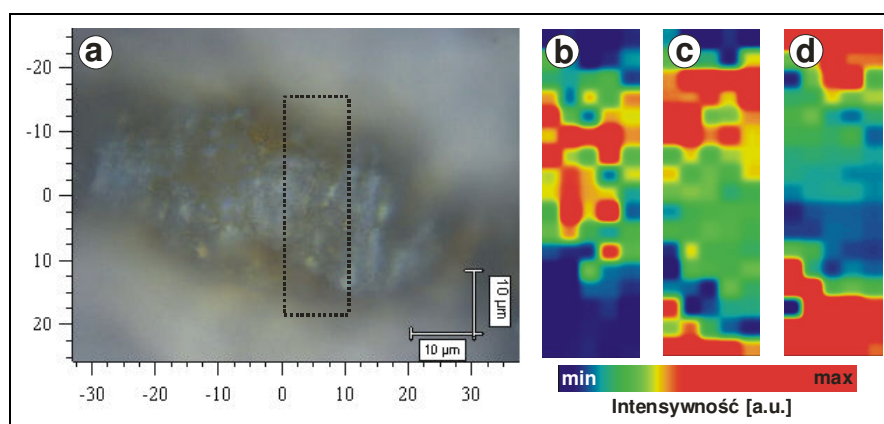
bardzo mały pik $\nu=1086\text{cm}^{-1}$ pochodzący od grupy węglanowej, co odpowiada z obecności małych ilości węgla w tej strefie za pomocą metody EPMA.



Rys. 93 Widma ramanowskie dla strefy przegrody (A) oraz zewnętrznej sąsiadującej z nią strefy pirytowej (B).

Po analizie punktowej przeprowadzono analizy powierzchni przekroju próbki zawierającego przegrodę oraz przylegającą do niej warstwę pirytową. Dla strefy zawierającej piki 1306 oraz 1332cm^{-1} oraz wybranych pików 1087cm^{-1} i 344cm^{-1} i wytyczono mapy rozkładu intensywności.

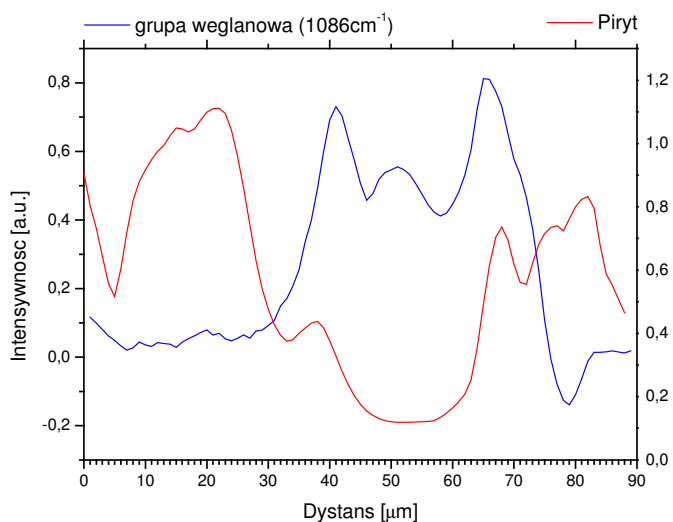
Rys. 94a przedstawia zdjęcie optyczne badanego fragmentu z zaznaczonym obszarem analizy powierzchniowej (prostokąt - linia przerywana).



Rys. 94 Mapy rozkładu związków obecnych w wewnętrznej przegrodzie szkieletu amonitu uzyskane za pomocą sondy ramanowskiej. A - Zdjęcie optyczne przekroju poprzecznego z zaznaczonym obszarem analizy, B - mapa rozkładu węglanu wapnia (pasmo - 1087cm^{-1}), C - mapa rozkładu piroksenów (pasma - 1306 oraz 1332cm^{-1}), D - mapa rozkładu pirytu (pasmo - 344cm^{-1}).

Na Rys. 94b-d pokazano mapy rozkładu grupy węglanowej, piroksenów oraz pirytu. Na podstawie analizy można również stwierdzić, że warstwę otulającą przegrodę badanej muszli stanowi piryt. Nie udało się jednak potwierdzić, że przegroda jest zbudowana z kalcytu (wyniki analizy XRD). Pik $\nu=707\text{cm}^{-1}$ jest przesunięty względem wzorca aragonitowego dla $\nu=702\text{cm}^{-1}$ i kalcytu dla $\nu=712\text{cm}^{-1}$. Na podstawie uzyskanego widma i piku 1087cm^{-1} można jednak potwierdzić, że materiałem przegrody jest węgiel.

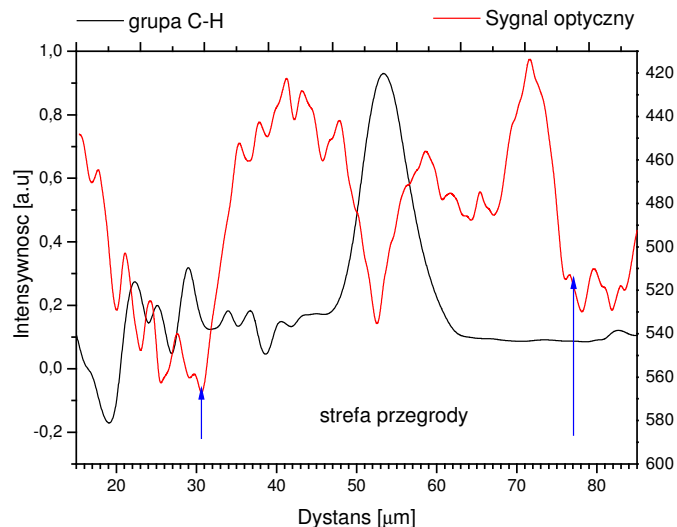
W celach porównawczych z analizą XRF (z lampą molibdenową jako źródłem promieniowania rentgenowskiego) przeprowadzono również skan liniowy za pomocą spektrometru Ramana w miejscu analiz XRF przedstawionych na Rys. 92. w ten sposób, aby uzyskać chemiczne profile poprzeczne dla badanej przegrody. W tym przypadku wykonano pomiar w pełnym zakresie pomiarowym ν od $150\div 3200\text{cm}^{-1}$, aby pozwolić na ustalenie rozkładu grup C-H₂ pochodzących od związków organicznych, które pojawiły się przy $\nu=2973\text{cm}^{-1}$ (Rys. 92).



Rys. 95 Zestawione profile piryty i węglanu wapnia uzyskane za pomocą spektrometru Ramana.

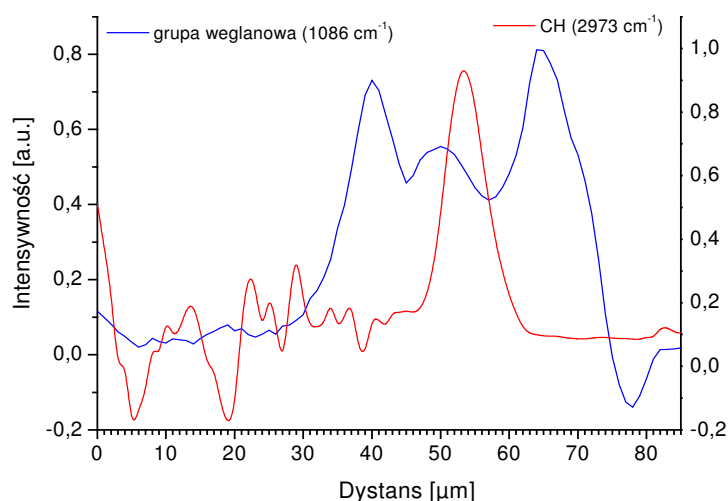
Pomiar wykonano z zastosowaniem lasera o długości fali $\lambda=514\text{nm}$ i mocy $1,6\text{mW}$, wzdłuż linii o długości $90\mu\text{m}$ przecinającej przegrodę. Analizę wykonywano z krokiem $1\mu\text{m}$, stosując wiązkę lasera o średnicy $1\mu\text{m}$.

Analogicznie jak w metodzie XRF, gdzie sygnały Ca i Fe były odwrotnie proporcjonalne wzdłuż linii pomiaru (Rys. 86) w analizie ramanowskiej uzyskano odwrotne sygnały piryty i węglanów przy $\nu=1086\text{cm}^{-1}$ (Rys. 95). Jest to liniowy odpowiednik do map rozkładu obu związków.



Rys. 96 Profil grupy CH_2 zestawiony z odwróconym profilem optycznym. Strzałkami zaznaczono strefę przegrody w badanym fragmencie.

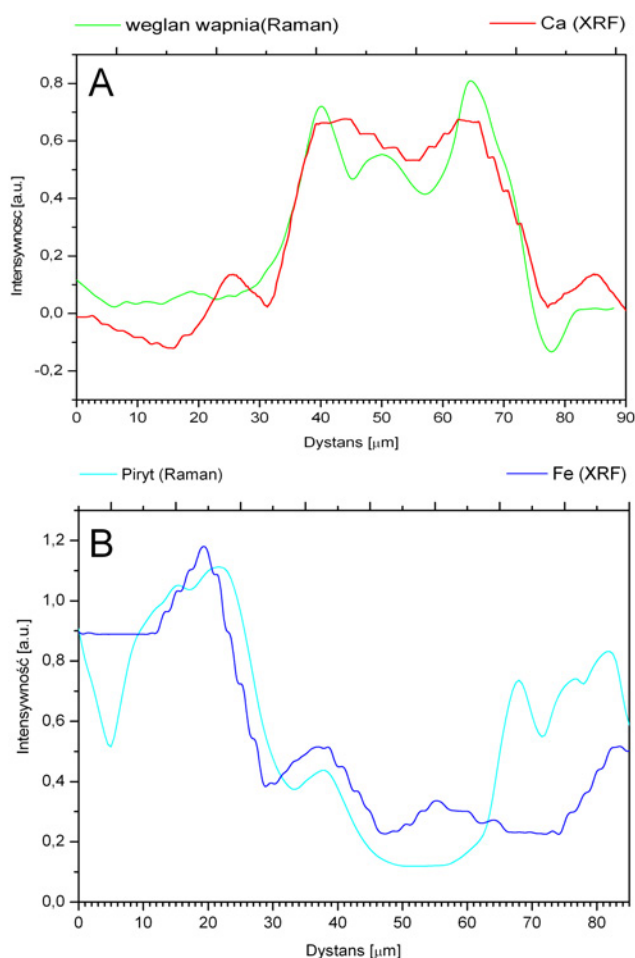
Profile niektórych związków zostały zestawione z profilem optycznym ze względu na fakt, że profil ten okazał się już bardzo wiarygodny przy ocenie składu chemicznego próbek przy okazji wcześniejszych pomiarów. Rys. 96 przedstawia nałożone profile: optyczny oraz sygnału C-H_2 pochodzącego od materii organicznej obecnej w próbce. Widać wyraźnie, że wygląd zewnętrzny próbki (jej kolor, nasycenie barwą) jest powiązany z jej składem chemicznym. Tak jest w tym przypadku gdzie największa intensywność sygnału C-H_2 występuje dokładnie w środku strefy przegrody. Jest to bardzo logiczne, ponieważ jeśli zachowała się jakaś materia organiczna w próbce, to jej największe stężenie będzie w środku ścianki.



Rys. 97 Profil grupy węglanowej zestawiony z profilem grupy CH_2 .

Podobnie jest dla grupy węglanowej, której rozkład jest analogiczny z profilem optycznym (Rys. 97)

Jak już wcześniej sugerowano, metody XRF oraz μ -spektrometria Ramana doskonale się uzupełniają w kompletnej analizie składu chemicznego próbek, szczególnie przy ustalaniu mikrostruktur próbek. Wyniki uzyskane w tej pracy potwierdzają tę tezę.



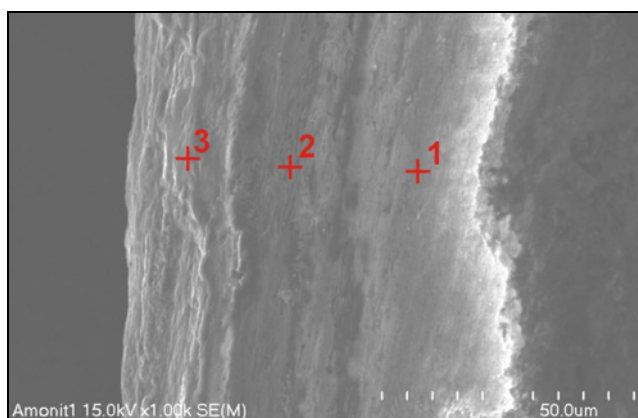
Rys. 98 Nałożone profile chemiczne, A) grupy węglanowej i wapnia, B) piryty i żelaza uzyskane kolejno za pomocą spektrometru Ramana i sondy rentgenowskiej.

Jest to widoczne szczególnie przy analizach przegrody oraz sąsiadujących z nią warstw. Mając niepełną informację o próbce w postaci rozkładu pierwiastków wapnia i żelaza uzyskaną za pomocą sondy rentgenowskiej uzupełniono ją analizami za pomocą spektrometru Ramana. Analizy pozwoliły na detekcję kalcytu w obszarze występowania wapnia i piryty w miejscach najintensywniejszego występowania siarki bądź żelaza. Profile uzyskane z obu metod zostały przedstawione na Rys. 98.

Ścianka zewnętrzna muszli

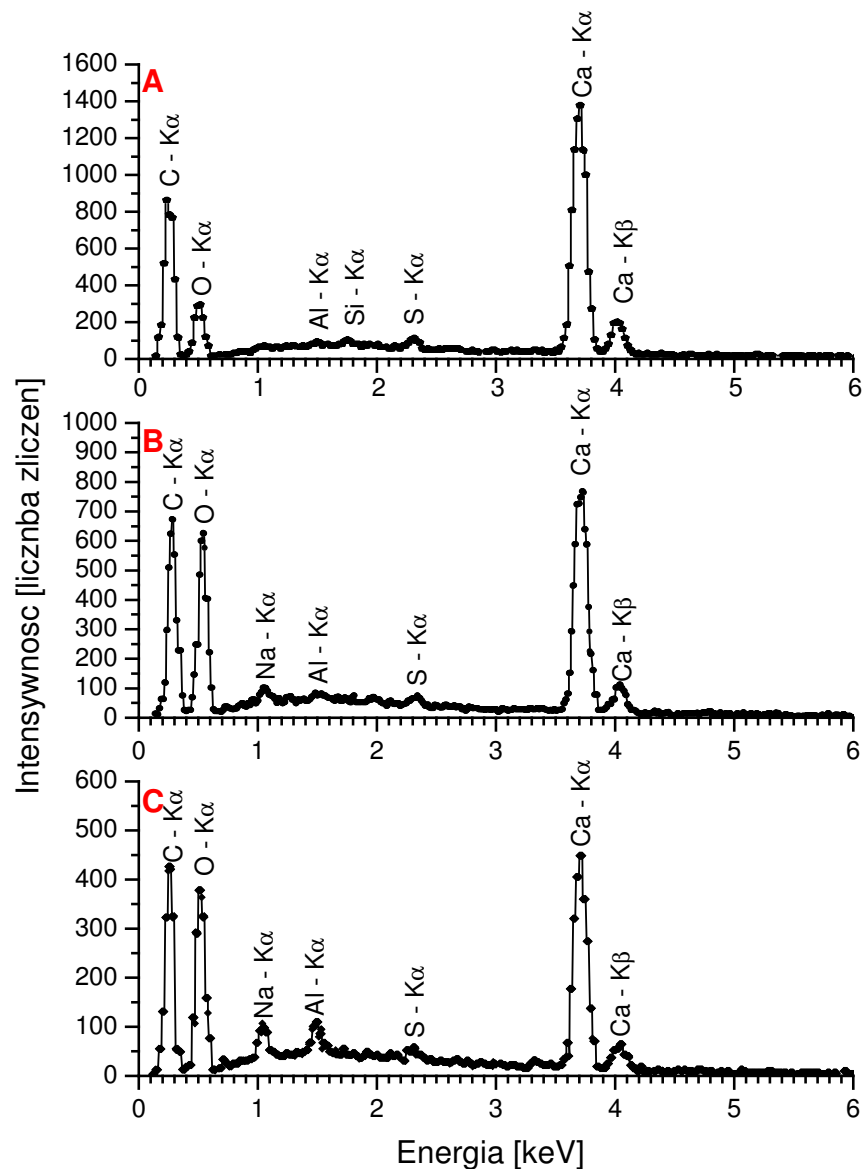
Dla ścianki zewnętrznej muszli amonitu, podobnie jak dla próbki przegrody po analizie dyfrakcyjnej wykonano obserwację pod mikroskopem elektronowym, analizę EDS w wybranych punktach oraz przeprowadzono skany liniowe i mapowanie wykrytych pierwiastków. Operacje te wykonano w laboratorium Instytutu Nauk Geologicznych Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie za pomocą sondy elektronowej.

Rys. 99 przedstawia zdjęcie SEM z użyciem elektronów wstecznie rozproszonych wraz z zaznaczonymi punktami analiz. Już po samym zdjęciu widać, że strefa ścianki zewnętrznej jest dużo lepiej zachowana od badanych wcześniej przegród. Pomiar EDS wykonano w trzech punktach. W punkcie pierwszym graniczącym ze strefa pirytową (Rys. 100a) wykryto C, O, Al, Si, S i Ca. W punkcie drugim w środku ścianki (Rys. 100b) jest już brak krzemu a pojawia się sód. Również zmieniają się proporcje C i O na korzyść tlenu, którego jest w tym miejscu więcej. Większa ilość tlenu świadczy o większej zawartości węglanów w środku ścianki.



Rys. 99 Zdjęcie SEM przekroju poprzecznego ścianki zewnętrznej muszli amonitu wraz z zaznaczonymi punktami, gdzie przeprowadzono analizę EDS.

W punkcie trzecim najbliższym brzegu zewnętrznego ścianki (Rys. 100c) wzrasta zawartość sodu i glinu, co świadczy o tym, że większa penetracja ścianki muszli przez te pierwiastki zachodzi od strony zewnętrznej otoczenia próbki.



Rys. 100 Widmo EDS uzyskane A) dla punktu 1, B) dla punktu 2, C) dla punktu 3 na przekroju ścianki zewnętrznej (Rys. 99) muszli amonitu *Kosmoceras duncani*.

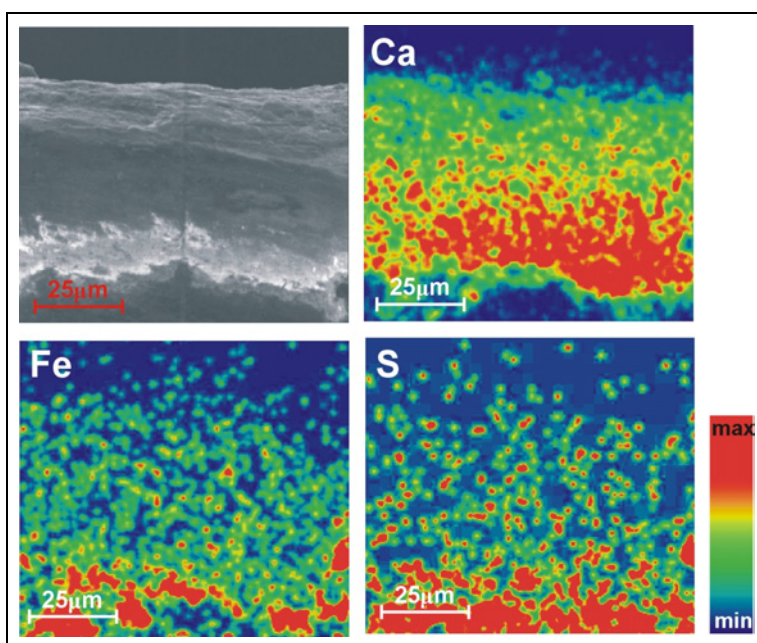
Na podstawie tych trzech pomiarów można również stwierdzić zmiany ilości krzemu są odwrotne do sodu i glinu, co może świadczyć o zmianie proporcji glinokrzemianów i krzemionki.

Stężenia wykrytych z pomocą sondy elektronowej pierwiastków zestawiono w [Tab. 7](#). Wyniki potwierdzają ocenę widm, ale trzeba zaznaczyć, że stężenia głównych pierwiastków również ulegają wahaniom. Szczególnie dotyczy to wapnia, którego w punkcie 1 było 30,5% a w punkcie 3 16,8%. Stężenie węgla i siarki obniża się w środku ścianki.

Tab. 7 Stężenia pierwiastków wykrytych w punktach 1-3 (Rys. 99) na przekroju poprzecznym ścianki zewnętrznej badanego amonitu.

| Pierwiastek | C | O | S | Ca | Na | Al | Si |
|------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Pomiar 1 | 34.72 | 33.02 | 0.92 | 30.53 | 0.00 | 0.11 | 0.24 |
| Stężenie [%] ± σ | ±0.41 | ±0.67 | ±0.10 | ±0.34 | ±0.00 | ±0.05 | ±0.05 |
| Pomiar 2 | 26.81 | 53.64 | 0.33 | 18.84 | 0.89 | 0.28 | 0.04 |
| Stężenie [%] ± σ | ±0.43 | ±1.06 | ±0.05 | ±0.28 | ±0.10 | ±0.05 | ±0.05 |
| Pomiar 3 | 28.80 | 50.52 | 0.44 | 16.84 | 2.08 | 1.15 | 0.00 |
| Stężenie [%] ± σ | ±0.55 | ±0.82 | ±0.07 | ±0.35 | ±0.12 | ±0.08 | ±0.00 |

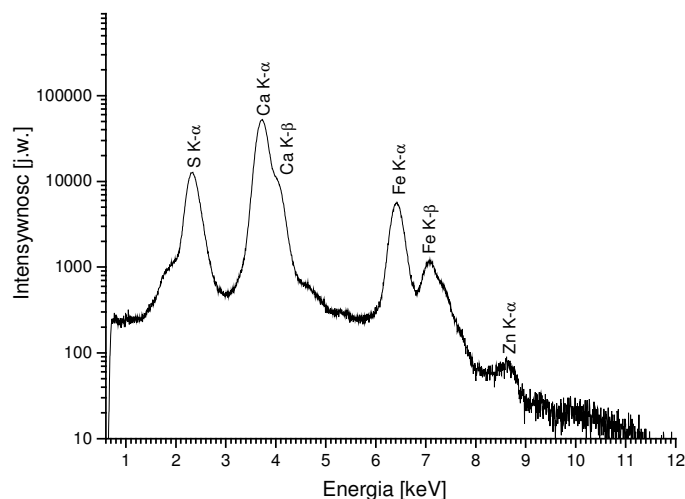
Dodatkowo wykonano mapę rozkładu wapnia, żelaza oraz siarki na badanej powierzchni zawierającej ściankę muszli (Rys. 101).



Rys. 101 Mapy rozkładu stężeń Ca, Fe, i S uzyskane metodą EPMA dla fragmentu szkieletu amonitu zawierającego ściankę zewnętrzną, zestawione z obrazem elektronów wstecznie rozproszonych badanego obszaru.

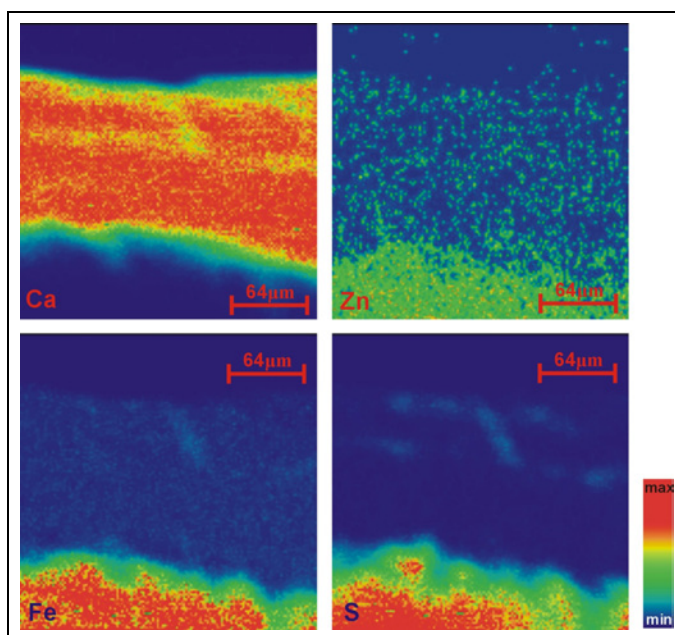
Widać wyraźnie, że stężenie wapnia jest zgodne z pomiarami punktowymi tj. więcej wapnia znajduje się po stronie wewnętrznej ścianki, bliżej wewnętrznej strefy pirytovej widocznej na mapach jako rozkład żelaza i siarki.

Analiza za pomocą sondy protonowej, która miała pozwolić na uzyskanie sygnałów od cięższych pierwiastków podobnie jak w przypadku przegrody pozwoliła tylko na wykrycie czterech pierwiastków wyróżnionych na widmie kumulacyjnym (Rys. 102) dla obszaru zawierającego ściankę zewnętrzną oraz przylegającą do niej wewnętrzną warstwę pirytową. W stosunku do analizy za pomocą sondy elektronowej (EPMA) metoda ta pozwoliła na dodatkową detekcję jedynie cynku.



Rys. 102 Widmo kumulacyjne uzyskane z obszaru zawierającego ściankę zewnętrzną szkieletu amonitu *Kosmoceras duncani* podczas pomiaru PIXE.

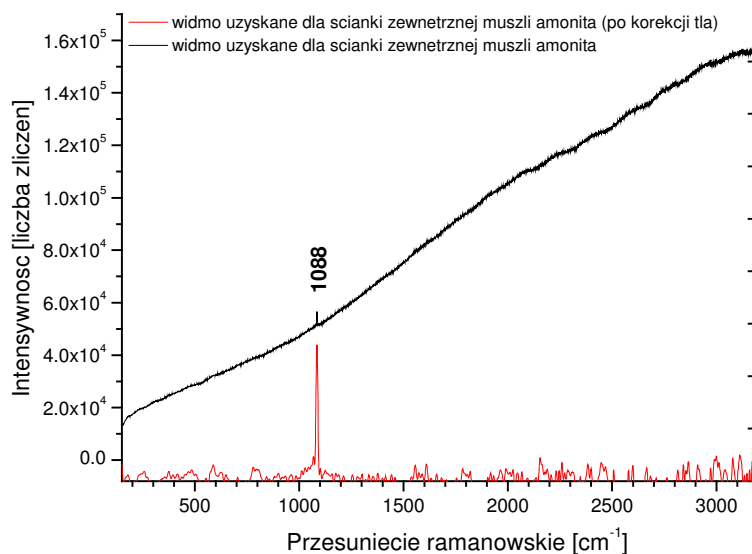
Rys. 103 przedstawia mapy rozkładu Ca, Zn, Fe i S na przekroju muszli zawierającym jej ściankę zewnętrzną. Widać tutaj wyraźną analogię do map EPMA. Jeśli rozpatrywać oddzielnie sąsiadujące warstwy ścianki i strefy pirytowej rozkład cynku jest dość równomierny zarówno w ściance muszli, jaki i w strefie pirytowej, ale jego obecność jest zdecydowanie wyższa w strefie pirytowej.



Rys. 103 Mapy rozkładu stężeń wapnia, cynku, żelaza i siarki na przekroju poprzecznym ścianki zewnętrznej muszli amonitu *Kosmoceras duncani* uzyskane podczas pomiaru PIXE

Analizy za pomocą spektrometru Ramana wykonano w celu wykrycia związków chemicznych obecnych w próbkach oraz ustalenia ich rozmieszczenia. Analizę dla ścianki

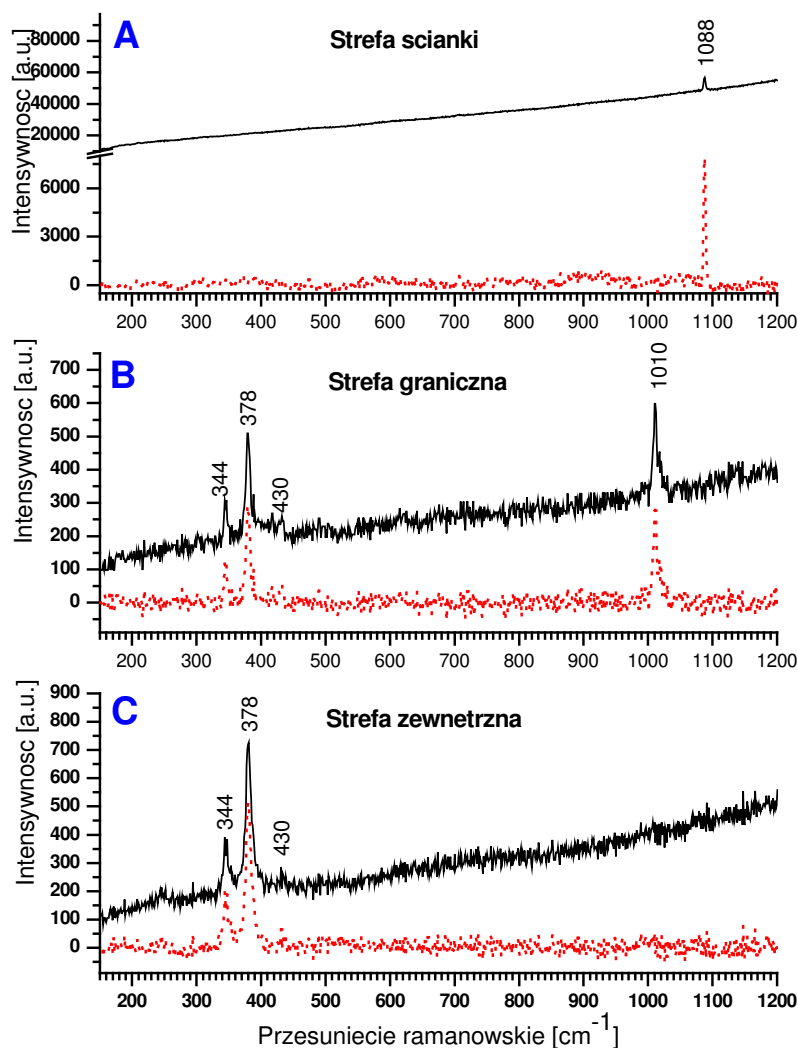
wykonano stosując laser o długości fali $\lambda=785$ nm oraz mocy 3 mW a czas pomiarów wynosił 20s na punkt.



Rys. 104 Widmo ramanowskie uzyskane dla ścianki zewnętrznej szkieletu amonitu *Kosmoceras Duncani*.

Dla ścianki muszli najpierw wykonano widmo w pełnym zakresie ($150\div 3200$ cm^{-1}) a po rozpoznaniu jakościowym pomiary wykonano w zawężonym zakresie ν do $150\div 1200$ cm^{-1} w celu skrócenia czasu pomiaru. Wynik analizy w pełnym zakresie pomiarowym na przekroju poprzecznym ścianki zewnętrznej muszli znajduje się na Rys. 104. W tej strefie pojawił się tylko jeden pik $\nu=1088\text{cm}^{-1}$ pochodzący do węglanu wapnia. Wyniki analiz punktowych wykonanych w zakresie $150 \div 1200$ cm^{-1} znajdują się na Rys. 105.

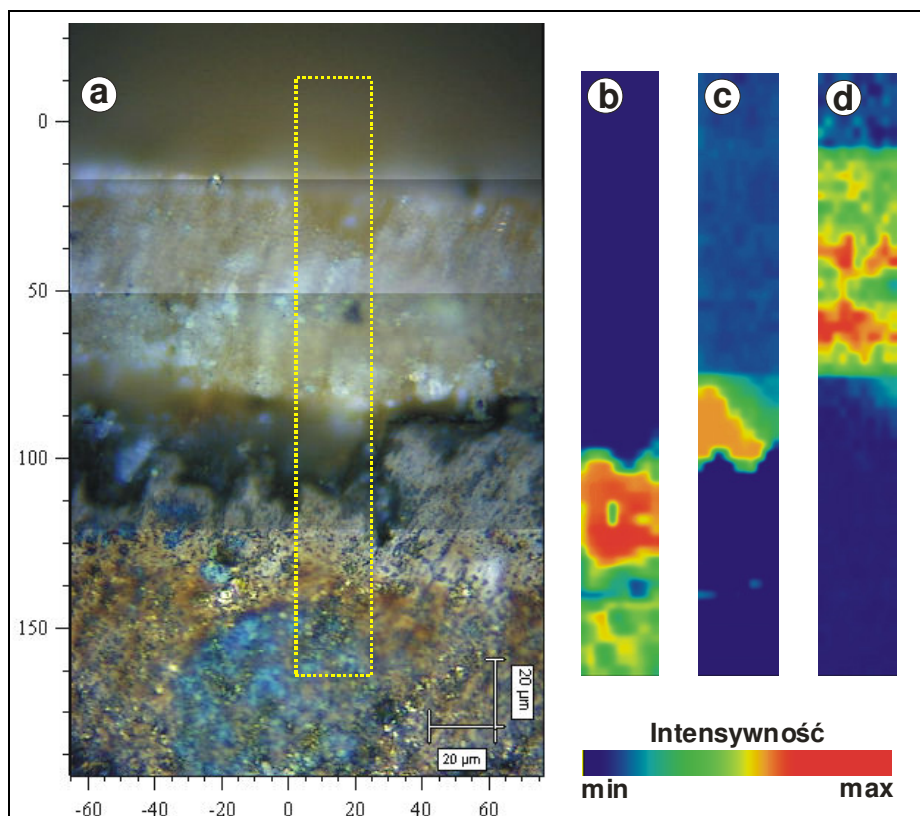
Całkowity badany obszar składa się z trzech stref. W pierwszej strefie (Rys. 105a) w ściance amonitu pojawia się tylko pik pochodzący od węglanu $\nu=1088\text{cm}^{-1}$. W strefie granicznej (Rys. 105b) pomiędzy ścianką a warstwą wewnętrzną występują piki ν (344cm^{-1} , 378cm^{-1} i 430cm^{-1}) charakterystyczne dla piryty oraz pik $\nu=1010\text{cm}^{-1}$ charakterystyczny dla grupy siarczanowej. Duża ilość wapnia pojawiająca się w tej strefie (obserwacje EPMA) mogłaby wskazywać, że na granicy strefy aragonitowej i pirytovej znajduje się siarczan wapnia - CaSO_4 , co jest bardzo prawdopodobne ze względu na sąsiedztwo siarczku, który na granicy warstw utlenia się do siarczanu.



Rys. 105 Widma ramanowskie dla trzech charakterystycznych stref ścianki i sąsiadującej z nią strefą pirytową. 1) Strefa ścianki, 2) Strefa graniczna, 3) Strefa zewnętrzna (pirytowa).

W strefie zewnętrznej (Rys. 105c) pojawiają się piki pochodzące wyłącznie od pirytu. W lepiej zachowanej ściance zewnętrznej pojawił się tylko jeden pik pochodzący od węgla. Może to być spowodowane kilkoma czynnikami. Po pierwsze do tej analizy zastosowano laser o długości fali 785nm (przy przegrodzie stosowano laser zielony $\lambda=514\text{nm}$). Po drugie sygnały uzyskane dla ścianki przegrody w postaci pików 1204 cm^{-1} , 1245 cm^{-1} , 1306 cm^{-1} i 1330 cm^{-1} charakterystycznych dla glinokrzemianów pojawiły się w warstwie przegrody w wyniku zachodzących przemian diagenetycznych.

Po analizie punktowej wykonano analizę powierzchniową przekroju próbki i dla wybranych pików: 1010 cm^{-1} i 1088 cm^{-1} oraz strefy pików pochodzącej od pirytu ($\nu=339\text{ cm}^{-1}$ i $\nu=439\text{ cm}^{-1}$) przeprowadzono mapy rozkładu.



Rys. 106 Mapy rozkładu związków obecnych w ścianie szkieletu amonitu uzyskane za pomocą sondy ramanowskiej. Zdjęcie optyczne przekroju poprzecznego z zaznaczonym obszarem analizy (żółty prostokąt) (a), mapa rozkładu pirytu (b) i mapa rozkładu siarczanów (c) i mapa rozkładu aragonitu (d).

Rys. 106a przedstawia zdjęcie optyczne badanego fragmentu z zaznaczonym obszarem analizy powierzchniowej (prostokąt- linia przerywana) uzyskane podczas pomiaru a na Rys. 106b-d pokazano mapy rozkładu pirytu, piku 1010 pochodzącego od siarczanów oraz węglanów dla piku $\nu=1088\text{ cm}^{-1}$. Na podstawie widma z Rys. 105a trudno jest ocenić, która forma polimorficzna węglanu znajduje się w ścianie badanego szkieletu, gdyż nie występuje charakterystyczny pik w zakresie $700\text{-}712\text{ cm}^{-1}$. Jednak na podstawie analiz dyfrakcyjnych (Rys. 79) można dowodzić, że próbka zawiera głównie aragonit z bardzo niewielką domieszką kalcytu.

Podsumowanie

Przedstawione w tej pracy wyniki pokazują, że okazy muszli *Ammonitida* są bardzo ciekawymi obiektami, które cechują się dość zróżnicowaną budową o dużej wytrzymałości mechanicznej. Próbki muszli *Kosmoceras duncani* analizowano metodami: mikroskopii optycznej, dyfrakcji rentgenowskiej - XRD, spektrometrii fluorescencji rentgenowskiej (XRF) z zastosowaniem różnych wiązek wzbudzających (promieniowanie rentgenowskie z lampy katodowej, protony, elektrony) i spektroskopii ramanowskiej. Pierwsza metoda,

mikroskopia optyczna, nie daje nam żadnej chemicznej informacji, lecz umożliwia ukazanie warstwowej struktury budowy muszli. Co więcej, *post factum* ukazuje nam miejsce lokacji związków organicznych (Rys 97) Kolejna analiza, XRD umożliwiła sprecyzowanie struktury związków nieorganicznych, jakie występują wewnątrz muszli. Nie pozwoliła jednak na precyzyjne określenie struktury w poszczególnych miejscach próbki. Badania przeprowadzone metodami XRF, EPMA i PIXE miały ogromne znaczenie w wykryciu składu pierwiastkowego próbki i ich rozmieszczeniu na przekroju poprzecznym badanego obiektu. Oprócz położenia, przy pomocy barw, jesteśmy w stanie ustalić stężenie pierwiastków. Podsumowaniem procesu analizy są punktowe pomiary mikro- ramanowskie, które dały informacje o specyficznym rozłożeniu materii nieorganicznej oraz organicznej w badanej skamieniałości.

Na podstawie przeprowadzonych analiz można stwierdzić, iż podstawowym materiałem budulcowym próbki amonitu *Kosmoceras duncani* jest CaCO_3 . Skład chemiczny ścianki zewnętrznej i przegrody muszli różnią się nieznacznie. Lepiej zachowana ścianka zewnętrzna zawiera głównie pierwotny materiał aragonitowy. W próbce ścianki zewnętrznej znajdują się również pewne ilości kalcytu powstałego z przeobrażenia aragonitu. Ścianka przegrody zawiera tylko aragonit. Kolejnym nieorganicznym związkiem, jaki udało się zidentyfikować w próbce jest disiarczek żelaza występujący w postaci pirytu. Jest to związek, który znajduje się głównie poza strefami węglanowymi, które jako materiał pierwotny były głównym przedmiotem zainteresowania. Siarczan wapnia wykryty za pomocą spektrometru Ramana na pograniczu warstw węglanowej i pirytovej pojawił się w większej ilości w przypadku analizy ścianki zewnętrznej amonitu a w śladowej w przypadku analizy przegrody. Siarczan pojawia się w wyniku utlenienia jonów siarczkowych pirytu. Niektóre sygnały pochodzące z analizy ramanowskiej wskazują, że oprócz struktury nieorganicznej (mineralnej) można oczekiwać w badanej muszli obecności związków organicznych,. Może świadczyć o tym obecność pików $\nu=2973\text{cm}^{-1}$, charakterystycznego dla grupy C-H₂ oraz obecność dwóch niezidentyfikowanych pasm w strefie 5-25° kątów 2 θ , charakterystycznej dla rozprożeń związków wielkocząsteczkowych.

Analizowany materiał zawiera również szereg pierwiastków. W ściance zewnętrznej wykryto obecność C, O, Al, Si, S, Zn i Ca a w ściance przegrody C, O, Fe, S, Na, Si, P, Ca, Zn, Ar, Ni, Cu, As i Sr. Różnice składu pierwiastkowego tych dwóch fragmentów muszli są spowodowane większym przeobrażeniem ścianki przegrody i jej

większym zanieczyszczeniem oraz faktem, że metodą mikro-fluorescencji rentgenowskiej (XRF), która pozwoliła na detekcje największej liczby pierwiastków przeprowadzono ze względu ograniczony dostęp do aparatury analizę tylko przegrody muszli.

Należy podkreślić, że niektóre metody bardzo dobrze się uzupełniają. Zaczynając od analiz XRD na początku badań można było stwierdzić obecność w próbkach materiałów krystalicznych o dość dużym stężeniu takich jak piryt, aragonit i kalcyt. Nie było możliwe jednak dokładne określenie miejsc występowania tych struktur. Analiza Ramanowska to umożliwiła, chociaż nie było możliwe pełne rozróżnienie występowania miejsc kalcytu i aragonitu. Metoda ta charakteryzuje się dużą rozdzielczością przestrzenną ($1\mu\text{m}$) i nadaje się doskonale do badań mikro-strukturalnych. Wadą tej metody jest za to w niektórych przypadkach występowanie dużej fluorescencji, co obserwowano w niniejszych badaniach.

Podczas analiz mikro-strukturalnych za pomocą sondy ramanowskiej dostrzegamy brak dostatecznej informacji jakościowej w poszczególnych miejscach próbki (część pików na poziomie tła), dlatego bardzo ważne jest uzupełnienie brakujących wyników analizą elementarną przeprowadzoną na tym samym obszarze. Do tych celów należy zastosować przynajmniej jedną metodę pozwalającą na wzbudzenie charakterystycznego promieniowania rentgenowskiego pierwiastków taką jak: EPMA, PIXE lub XRF. W badaniach przekroju poprzecznego przegrody szkieletu amonitu w celach porównawczych zastosowano wszystkie trzy metody. Metoda XRF okazała się być najbardziej miarodajna między innymi, dlatego, że wiązka promieni X, którą bombardujemy próbkę ma największą głębokość penetracji w porównaniu z elektronami i protonami. Dzięki temu uzyskujemy sygnał z głębiej położonych obszarów próbki, które nie ulegały zanieczyszczeniu bądź częściowemu zniszczeniu podczas przygotowywania próbek do analizy (przygotowanie zglądu - ciecie, szlifowanie, polerowanie). Zaletą tej metody jest również możliwość pracy bez zastosowania próżni podczas pomiarów. Wadą jest natomiast większa szerokość wiązki (w tym przypadku $15\mu\text{m}$), ale podczas badania próbki amonitu było to praktycznie bez znaczenia, gdyż zastosowanie mniejszego kroku pomiaru niż szerokość wiązki pozwoliło na uzyskanie miarodajnych wyników. Wadą jest również niemożliwość analizy lżejszych pierwiastków, których sygnały są absorbowane w powietrzu na drodze do detektora. Analiza EPMA okazała się być bardziej narażona na błędy. Według mnie było to spowodowane mniejszą głębokością penetracji próbki przez wiązkę elektronów, przez co sygnał w większym stopniu pochodził z zanieczyszczonej

powierzchni próbki oraz był widoczny większy wpływ nierówności przygotowanej powierzchni na uzyskane wyniki. Również analiza elementarna w tej metodzie okazała się być obarczona sporymi błędami. Zaletą tej metody okazała się możliwość analizy zawartości węgla w próbkach, co jest nieosiągalne w analizach PIXE i XRF. Analiza za pomocą sondy protonowej, która teoretycznie wydawała się najbardziej odpowiednia ze względu na bardzo niski poziom szumów, który jej towarzyszy i dużą czułość szczególnie dla cięższych pierwiastków nie pozwoliła na uzyskanie wielu informacji. Wykryto w próbkach w obu przypadkach, tj. dla próbki przegrody i ścianki zewnętrznej tylko wapń, żelazo, siarkę i cynk.

4. Wnioski końcowe

Szkielet *Sepia Officinalis* składa się głównie z β -chitynowych przegród oraz aragonitowych kolumn. Warstwy przegród są połączone również chitynowymi kolumnami tworząc razem komory. Kolumny aragonitowe natomiast składają się z cieńszych warstw tworząc wysoce-uporządkowaną podstrukturę. Analizy ramanowskie dla pojedynczej kolumny w dużym stopniu potwierdzają, iż kolumny są zbudowane z naprzemiennych warstw aragonitu i związku organicznego, którym jest chityna. Kolumny występujące w szkielecie tworzą strukturę łączącą cechy struktur pryzmatycznych i kolumnowych struktur perłowych opisywanych w części literaturowej. Z przebiegu badań wynika, że chityna tworzy rusztowanie dla całej konstrukcji, w którą wbudowują się dopiero kryształy aragonitu, z natury bardzo kruche. Połączenie cech chityny i aragonitu w tym materiale kompozytowym daje niezwykle właściwości mechaniczne konstrukcji przy jej małej masie.

Analiza XRD dla płaszczyzn równoległych i prostopadłych do przegród i odpowiednio kolumn pozwoliła ustalić preferowaną orientację aragonitu w kolumnach jako $\langle 001 \rangle$. Może być to wskazówką do ewentualnej kontrolowanej krystalizacji struktur aragonitowych w tworzonych materiałach biomimicznych.

Podwyższona ilość azotu oznaczona na analizatorze CHN w stosunku do rozpoznanej w próbce chityny spowodowana jest obecnością białek (odpowiadających za proces biomineralizacji), trudno wykrywalnych stosowanymi w niniejszej pracy metodami.

Analiza rostrów belemnitów wykazała, że składają się one głównie z kalcytu, który jest często zanieczyszczony, szczególnie w strefach wewnętrznych blisko linii wierzchołkowej i w strefach bliskich krawędzi zewnętrznych przekrojów poprzecznych rostrów takimi pierwiastkami jak: Si, Al, Mn i Ti. Analizy mikrodyfrakcyjne wykazują ponadto, że strefy zewnętrzne składają się z dobrze przekryształizowanych monokryształów, podczas gdy w strefach wewnętrznych występuje materiał polikrystaliczny.

Obecność bardzo charakterystycznych koncentrycznych warstw na zdjęciach optycznych przekroju poprzecznego rostrów belemnitów pozwala przypuszczać, że warstwy dostrzegane na zdjęciach optycznych są warstwami przyrostów okresowych. Analiza stosunków molowych Mg/Ca (uważanych za chemiczne wskaźniki temperaturowe) w próbkach belemnitów za pomocą sondy elektronowej i ich korelacja z sygnałem optycznym próbek pozwala przypuszczać, że kolor warstw dostrzeganych na zdjęciach optycznych jest związany ze zmianami stosunku Mg/Ca, a pośrednio temperatur

tworzenia szkieletów. Wyliczony na podstawie zawartości magnezu i wapnia stosunek Mg/Ca dla próbki *Hibolites* sp. mieścił się w granicach 9-12 [mmolMg/molCa]. Korzystając następnie ze skali termometrycznej wyprowadzonej przez Rosenthal i in. (Rosenthal et al. 1997) (wzór V) oraz średniego stosunku Mg/Ca 11,14 mmolMg/molCa ustalono na podstawie rostrum *Hibolites* sp. że średnia temperatura oceanu mogła wynosić +25°C. Dla próbki *Belemnitella* sp. wartość średnią stosunku Mg/Ca wynosiła 18,37 mmolMg/molCa. zbyt duże diagenetyczne zmiany w próbce uniemożliwiają wykorzystanie jej jako wiarygodnego wskaźnika temperatury. Uznano, że wyznaczona temperatura byłaby obciążona zbyt dużym błędem.

Budowa szkieletu mątwy spokrewnionej z belemnitami charakteryzująca się obecnością w części brzusznej cienkich warstw chitynowych przegród i grubych warstw mineralnych (obszar kolumn aragonitowych) mogłaby wskazywać, że widoczne na przekrojach szkieletów belemnitów cienkie warstwy w kształcie pierścieni mogą tworzyć się podczas diagenety z przegród chitynowych występujących pierwotnie w szkieletach.

Niestety, wysiłki w celu znalezienia pozostałości materii organicznej w belemnitach nie przyniosły pozytywnego rezultatu, poza pewnymi wskazówkami z analizy termogravimetrycznej i wynikami z niektórych pomiarów EPMA, gdzie pojawił się węgiel w pewnym nadmiarze w stosunku do tego związanego w kalcycie.

Należałoby ustalić, dlaczego w przypadku amonitów resztki pierwotnej materii organicznej wykrywa się z łatwością a w belemnicie nie. Trzeba podkreślić także, że bez udziału organicznej matrycy trudno sobie wyobrazić ściśle mineralogiczną syntezę obiektów o kształcie stożka z bardzo prostych krystalitów kalcytu czy aragonitu.

Ważnym elementem wglądu w konstrukcję rozważanych materiałów jest obserwacja efektu samopowtarzalności niektórych struktur. Najlepiej obserwowane jest to na przykładzie komór szkieletu sepii, ale efekt ten można obserwować w szkielecie amonitu i być może w pierścieniach widocznych na poprzecznych przekrojach belemnitów

Analiza muszli amonitu *Kosmoceras Duncani* wykazała, że podstawowym materiałem, z którego składa się szkielet jest węglan wapnia. W ścianie zewnętrznej, lepiej zachowanej, głównym minerałem jest aragonit, pierwotnie występujący w szkielecie. W ściankach przegród nastąpiła przemiana polimorficzna aragonitu w kalcyt. Piryt, trzeci składnik występujący w próbce wytworzył się prawdopodobnie z tkanki miękkiej stworzenia i otula ściankę zewnętrzną z jednej strony (od środka muszli), przegrody wewnętrzne z dwóch stron.

Do oceny rozmieszczenia składników próbek często użyteczne jest odniesienie sygnałów chemicznych do sygnału optycznego uzyskanego z obszarów poddanych analizie. Sygnał optyczny uzyskany za pomocą dobrego mikroskopu jest zadziwiająco czuły, ale bez uzupełniających badań chemicznych jest informacyjnie ubogi.

Metoda spektrofotometrii w podczerwieni stosowana tradycyjnie do analiz związków organicznych może być czasami z dużym powodzeniem stosowana do oznaczeń jakościowych różnych struktur mineralnych. W omawianej pracy było możliwe rozróżnienie kalcytu i aragonitu za pomocą tej techniki.

Metody emisyjne ze wzbudzeniem charakterystycznego promieniowania X pierwiastków wymagające zastosowania próżni (EPMA i PIXE) powodowały częściową destrukcję próbek szkieletów mątwy, przez co wyniki analiz były obarczone błędem wynikającym z nierówności badanej powierzchni, co ograniczało ich zastosowanie w przypadku analiz badanych próbek. Metoda PIXE ze względu na dużą energię wiązki protonów ($2\div 2,5\text{MeV}$) powodowała jeszcze dodatkową destrukcję badanej powierzchni. Problemy te w mniejszym stopniu dotyczyły analizy szkieletu amonitu *Kosmoceras duncani* (nierówna płaszczyzna przegrody) a były zupełnie niezauważalne podczas analiz rostrów belemnitów.

Bardzo dobrą metodą do szybkiej oceny stopnia zachowania lub stopnia zanieczyszczenia skamieniałych próbek w wyniku diagenety jest wykonanie mapy rozkładu krzemu metodą EPMA dla dobrze przygotowanych gładkich przekrojów poprzecznych próbek. Przy pomocy tej metody można identyfikować na powierzchni próbki miejsca dobrze zachowane – nadające się np. do badań paleo-środowiskowych w celu wyznaczenia skali termometrycznej oraz te bardzo zanieczyszczone, które należy z tych badań wykluczyć, jeśli chcemy uzyskać wiarygodne wyniki. Uzyskuje się dzięki tej metodzie również określenie miejsc najbardziej zanieczyszczonych. W przypadku szkieletów belemnitów najbardziej zanieczyszczone były strefy znajdujące się w okolicach rdzenia próbki (strefa wewnętrzna blisko linii wierzchołkowej) i zewnętrznych brzegów próbek stykających się z otaczającym środowiskiem. Metodę tę można stosować zamiennie z pomiarami katodoluminescencji, do których wymagany jest dodatkowy detektor CL. Pomiary te nie dają jednak informacji o składzie jakościowym i ilościowym zanieczyszczeń.

Spektrometria Ramana okazuje się być bardzo uniwersalną techniką pozwalającą jednocześnie na analizę składu, struktury i rozmieszczenia w mikroskali związków

obecnych w próbkach. Możliwa jest analiza zarówno związków nieorganicznych z rozróżnieniem struktur krystalograficznych jak i organicznych. Dodatkowo technika ta doskonale uzupełnia się z technikami, gdzie wywoływana jest emisja charakterystycznego promieniowania X pierwiastków i badane jest rozmieszczenie przestrzenne pierwiastków (XRF, PIXE, EPMA) gdyż w przypadku analizy ramanowskiej uzyskujemy rozkład grup chemicznych na badanej próbce a technikami fluorescencyjnymi rozkład pierwiastków, przy czym wcześniejsza detekcja pierwiastków jest często niezbędna do prawidłowej interpretacji rozproszeń ramanowskich.

Analizy dyfraktometryczne z zastosowaniem promieniowania rentgenowskiego oprócz informacji o składzie mineralnym próbek pozwalają również na wstępną ocenę obecności polimerowych związków organicznych występujących w obecności dobrze skryształizowanych związków nieorganicznych. Jest to możliwe dzięki analizie rozproszeń w zakresie małych kątów 2Θ . Dzięki tej metodzie możliwe było m. in. rozstrzygnięcie, że w przegrodzie szkieletu sepii znajduje się β -chityna oraz stwierdzenie obecności słabo skryształizowanej pierwotnej lub wtórnej materii organicznej w szkielecie amonitu.

W niniejszej pracy z dużym powodzeniem wykonano analizy rozproszeń od substancji niekryształicznych, możliwe do przeprowadzenia za pomocą klasycznego zestawu do dyfrakcji rentgenowskiej. W przypadku takich polimerów jak chityna metoda ta przynosi bardzo dobre wyniki.

Trójwymiarowa analiza rozkładu pierwiastków wykonana za pomocą sondy XRF z detektorem konfokalnym jest doskonałą metodą pozwalającą na ocenę rozmieszczenia w przestrzeni pierwiastków obecnych w próbkach o małej gęstości i niezawierających ciężkich pierwiastków. Widać to wyraźnie po wynikach uzyskanych dla fragmentu części brzusznej szkieletu mątwy. W przypadku analiz próbek muszli amonitu *Kosmoceras Duncani* próbki o większej gęstości, absorpcja sygnałów pierwiastków z głębiej położonych analizowanych warstw w próbce uniemożliwia takie oznaczenie.

Metody SRIXE i PIXE ze względu na dużą energię wiązek wzbudzających wyróżniają się ze wszystkich możliwością detekcji pierwiastków ciężkich obecnych w próbkach. Z kolei EPMA jako jedyna pozwala na detekcję i analizę węgla w próbkach. W niektórych miejscach z takiej analizy wynika sugestia podziału węgla na ten obecny w związkach organicznych i nieorganicznych.

Zaletą metod PIXE i EPMA jest ich duża rozdzielczość przestrzenna ze względu na większe możliwości skupiania naładowanych cząstek elementarnych. W przypadku analiz

SRIXE i XRF uzyskuje się tradycyjnie wiązki o średnicy ok. 10-20 μ m, co ogranicza ich rozdzielczość. Podczas analiz mapowania jest to po części redukowane dzięki mniejszemu krokowi pomiaru poprzez zastosowanie bardzo precyzyjnych ruchomych stolików pomiarowych. W przypadku analiz SRIXE i XRF pojedynczy wynik jest zawsze średnią uzyskaną z pola padania wzbudzającej wiązki o średnicy wynoszącej 10÷20 μ m. W przypadku analiz PIXE i EPMA wartość ta wynosi odpowiednio do 8 i 2 μ m.

Perspektywy dalszych badań

W dalszych badaniach mikrostruktury szkieletu *Sepia Officinalis* należy skupić się na przestrzennym rozmieszczeniu związków organicznych takich jak białka i ich pochodne. Wymaga to z jednej strony zastosowania urządzenia pomiarowego o dużej rozdzielczość przestrzennej, a z drugiej zastosowania metody, która pozwoli na detekcję i rozróżnienie występujących w nim związków. Obiecującą techniką, która mogłaby by znaleźć zastosowanie jest spektrometria mas jonów wtórnych (SIMS) z zastosowaniem działa fulerenowego, które pozwala wybijać wtórne jony związków wielkocząsteczkowych (do 10 tys. Da) z minimalną lub bez fragmentacji cząsteczek. Wartościowe wyniki można by również otrzymać stosując metodę obrazowania za pomocą spektrometru MALDI-TOF MS.

Korzystnie byłoby również przejście przy badaniu do jeszcze mniejszych niż mikrometrowe rozmiarów, najlepiej do rozmiarów cząsteczkowych i przeprowadzenie badań nanostruktury szkieletu sepii. Poznanie nanostruktury byłoby wstępem do badań nad mechanizmami biomineralizacji zachodzącymi podczas tworzenia biokompozytów. Należy podjąć studia nad formą połączeń związków organicznych z nieorganicznymi w biomateriale oraz wyjaśnić i opisać charakter wiązań i określić oddziaływania fizykochemiczne na granicy faz organicznych i nieorganicznych.

W badaniach nad szkieletem *Sepia Officinalis* trzeba ponadto uwzględnić oddziaływania chityny z jonami tworzącymi węglany, białka frakcji słabo i dobrze rozpuszczalnych, które osadzają się na powierzchni chityny oraz połączone oddziaływania chityny, białek rozpuszczalnych w roztworze oraz jonów tworzących struktury krystaliczne. Należy skupić się także na poznaniu procesów indukowania i przyspieszania przez białka, aminokwasy i/lub jony metali procesu krystalizacji z roztworu jonów tworzących strukturę mineralną.

Dokładne poznanie nanostruktury biomateriałów oraz mechanizmów biomineralizacji byłoby wstępem do syntezy struktur biomimicznych przypominających szkielet *Sepia Officinalis* i charakteryzujących się bardzo korzystnymi właściwościami takimi jak duża wytrzymałość na ciśnienie hydrostatyczne, duża wyporność przy małej gęstości i masie, szybka biodegradacja i możliwość przyjmowania przez organizmy jako przeszczepy, co mogłoby mieć zastosowanie w medycynie.

Rozwój biomimiki to nie jedyna korzyść z badania biomateriałów. Również odpowiednia modyfikacja materiałów naturalnych takich jak szkielet sepia może pozwolić na uzyskanie bardzo praktycznych i użytecznych materiałów.

Przykładem może być chociażby modyfikacja szkieletu małży poprzez delikatne wytrawienie części mineralnej i zastępowaniu jej różnymi wypełniaczami organicznymi lub nieorganicznymi osadzonymi na „rusztowaniu” chitynowym. Możemy również modyfikować powierzchnię wytrawionej sieci chitynowej szkieletu a przygotowywany materiał modelować nadając mu różne korzystne właściwości takie jak zdolności sorpcyjne i katalityczne (Ogasawara et al. 2000). Materiał można by odpowiednio modyfikować gotując szkielet w roztworach nadając mu pożądane właściwości użyteczne w medycynie, co już było podejmowane przez Rocha i in. (Rocha et al. 2005), którzy poprzez transformację hydrotermalną wytworzyli ze szkieletu sepia hydroksyapatyt oraz Kannana i in. (Kannan et al. 2007), którzy uzyskali podobny sposób hydroksyapatyt podstawiony fluorem.

Dalsze badania struktur skamieniałości mogą umożliwić precyzyjne określenie zmian temperaturowych zachodzących w czasach prehistorycznych, może pomóc w zrozumieniu procesów obiegu wapnia, węgla i tlenu w litosferze i równowagi kwasu węglowego z dwutlenkiem węgla w różnych epokach, co pozwoli np. opisać i/lub zweryfikować długoterminowe trendy ekologiczne.

Zadaniem dla chemika mogłoby być w przypadku badań rostrów belemnitów wyznaczenie dokładnej skali termometrycznej bazującej na stosunku Mg/Ca konkretnie dla tego gatunku, co ograniczyłoby błędy wynikające z zastosowania skali powstałej dla innych gatunków, stworzeń tworzących szkielety. W tym celu należałoby się posłużyć zweryfikowaną już skalą termometryczną z użyciem wskaźnika $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ i bazując na niej ustalić odpowiednie poprawki oraz wyprowadzić wzór do obliczeń temperaturowych dla na podstawie stosunku Mg/Ca dla rostrów belemnitów.

Dalsze analizy muszli amonitów natomiast mogły by pozwolić na pogłębienie wiedzy dotyczącej procesów diagenety zachodzących w litosferze na przeciągu milionów lat oraz procesów podmiany węglanów wapnia występujących pierwotnie w ściankach muszli przez piryt, krzemionkę i glinokrzemiany.

Ogólnie należy zwrócić uwagę, że opisane w niniejszej rozprawie doktorskiej wyniki należą prawie w całości do wyników w skali mikro, z tłem podanym w mikroskali i

są w zasadzie kompletne. Przy badaniu szkieletów tutaj omawianych należałoby teraz przejść teraz do skali nanometrycznej.

Informacje i podziękowania

Na końcu pracy chciałbym podziękować wszystkim osobom, bez których pomocy trudno by mi było wykonać tą pracę.

Pragnę złożyć szczególnie podziękowania osobom, które udostępniły mi aparaturę, udzieliły nieocenionego instruktażu i pomocy podczas analiz. Panom prof. dr hab. Wojciechowi Kwiatkowi, dr Januszowi Lekkiemu oraz dr Erazmowi Dutkiewiczowi z Instytutu Fizyki Jądrowej im H. Niewodniczańskiego w Krakowie, Panu dr hab. Wojciechowi Paszkowiczowi z Instytutu Fizyki PAN w Warszawie, Panu prof. Narcis'owi Mestres z ICMAB, Panu Prof. Pierre'owi Chevallier'owi z LURE i Panu dr Gerald'owi Falkenberg'owi z HASYLAB.

Panu dr Pedro Gómez-Romero dziękuję za gościnność i opiekę w trakcie mojego pobytu w Instytucie Materiałów (ICMAB) w Barcelonie.

Serdecznie dziękuję koleżance Dr Emilii Fornal z Katedry Chemii KUL za wnikliwe uwagi podczas wykonywania badań, za uważne i wnikliwe przeczytanie tekstu niniejszej rozprawy, co pozwoliło na wyeliminowanie wiele braków i niedociągnięć.

Panom dr Robertowi Mrocze oraz dr Dariuszowi Węgrzynkowi dziękuję za wykonanie analiz za pomocą sondy rentgenowskiej, co pozwoliło na uzyskanie wyników trójwymiarowego rozmieszczenia pierwiastków w szkielecie mątwy.

Panom mgr Stanisławowi Jachymkowi oraz dr Hubertowi Wierzbowskiemu dziękuję za przekazanie mi do badań próbek skamieniałości.

Panu Marianowi Palowi z Zakładu Mineralogiczno-Jubilerskiego „Inkluz” w Lublinie dziękuję za pomoc w przygotowywaniu zgładów do mikroanaliz.

Dziękuję również niewymienionym tutaj koleżankom i kolegom z Katedry Chemii KUL, którzy wspierali mnie swoją życzliwością i pomocą w trakcie wykonywania niniejszej pracy.

Niektóre badania zostały częściowo wykonane w ramach grantów:

HPMT – CT – 2000 – 00006 Stypendium Marie – Curie w Instytucie Materiałów (ICMAB), Barcelona, Hiszpania

2003 – DA – 009 – 03 Ośrodek Synchrotronowy LURE, Orsay, Francja

2004 – I – 03 – 087 Ośrodek Synchrotronowy HASYLAB, Hamburg, Niemcy

Bibliografia

- Addadi, L., J. Moradian, E. Shay, N. G. Maroudas, and S. Weiner. 1987. A chemical model for the cooperation of sulfates and carboxylates in calcite crystal nucleation: Relevance to biomineralization. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 84:2732-2736.
- Addadi, L., and S. Weiner. 1985. Interaction between acidic proteins and crystals: stereochemical requirements in biomineralization. *Proc. Natl. Acad. sci.* 82:4110-4114.
- Addadi, L., and S. Weiner. 1986. Interactions between acidic macromolecules and structured crystal surfaces. stereochemistry and biomineralization. *Mol. Cryst. Liq. Cryst.* 134:305-322.
- Aizenberg, J., G. Lambert, L. Addadi, and S. Weiner. 1996. Stabilization of Amorphous Calcium Carbonate by Specialized Macromolecules in Biological and Synthetic Precipitates. *Adv. Mater.* 8:222-225.
- Appellöf, A. 1893. Die Schalen von Sepia, Spirula und Nautilus studien über den Bau und das Wachstum. *I. svenka Vetensk. Akad. Handl.* 25:1-106.
- Arkell, W. J. 1950. A classification of the Jurassic ammonites. *J. Paleontology* 24:354-364.
- Arkell, W. J. 1957. *Cephalopoda: Ammonoidea*, in R. C. Moore, eds., *Treatise on Invertebrate Paleontology*. Lawrence Kansas: Geol. Soc. Amer. and Univ. Kansas Press.
- Atherton, E., and R. C. Sheppard, eds. 1975. *Proceedings of the 13th European Peptide symposium, Israel 1974*. New York: Wiley.
- Bauerlein, E., eds. 2000. *Biomineralization: From biology to biotechnology and medical application*. Weinheim: Wiley-VCH.
- Bandel, K., T. Engeser, and J. Reitner. 1984. Die Embryonalentwicklung von Hibolithes (Belemnitida, Cephalopoda). *Neues Jb. Geol. Paläont. Abh.* 167 275-303.
- Bandel, K., and C. Kulicki, eds. 1988. *Belemniteuthis polonica: A belemnite with an aragonitic rostrum*. In: *Cephalopods - Present and past*, Wiedmann, J. and Kullmann J. (eds) Stuttgart: Schweiz. Verlag.
- Barskov, I. S. 1973. Microstructure of the skeletal layers of sepia and spirula compared with the shell layers of other molluscs. *Paleont. J.* 3:285-294.
- Beck, J. W., R. L. Edwards, E. Ito, F. W. Taylor, J. Recy, F. Rougerie, P. Joannot, and C. Henin. 1992. Sea-surface temperature from coral skeletal strontium/calcium ratios. *Science* 257:644-647.
- Beedham, G. E. 1958. Observations on the non-calcareous component of the shell of the *Lamellibranchia*. *Q. J. Microsc. Sci.* 99:341-357.
- Beurlen, K., and G. Lichter, eds. 1997. *Leksykon Przyrodniczy. Skamieniałości*. Warszawa: Świat Książki.
- Bierstedt, A., B. A. Stankiewicz, D. E. G. Briggs, and R. P. Evershed. 1998. Quantitative and qualitative analysis of chitin in fossil arthropods using a combination of colorimetric assay and pyrolysis - gas chromatography - mass spectrometry. *The Analyst* 123:139-145.
- Birchall, J. D., and N. L. Thomas. 1983. On the architecture and function of cuttlefish bone. *J. Mater. Sci.* 18:2081-2086.
- Birkelund, T. 1967. Submicroscopic shell structures, in early growth-stages of mastrichtian ammonites (Saghalinites and Scaphites). *Med Dansk Geol. For.* 17:95-101.

- Birkelund, T., and J. Hansen. 1968. Early shell growth and structures of the septa and the siphuncular tube in some Mastrichtian ammonoidea. *Med. Dansk. Geol. For.* 17:95-101.
- Blackwell, J. 1969. (structure of chitin). *Biopolymers* 7:281-298.
- Boggild, O. B. 1930. The shell structure of the mollusks. *Kgl. Danske Vidensk Selsk Skr.* 9/2:231-236.
- Bolewski, A., and W. Żabiński, eds. 1979. *Metody badań minerałów i skał*. Warszawa: Wyd. Geologiczne.
- Brand, U. 1989. Aragonite-calcite transformation based on Pennsylvanian molluscs. *Geological Society of America Bulletin* 101:377-390.
- Brececic, L., and A. E. Nielsen. 1989. Solubility of amorphous calcium carbonate. *J. Cryst. Growth* 98:504-510
- Cardenas, G., G. Cabrera, E. Taboada, and S. Patricia Miranda. 2004. Chitin characterisation by SEM, FTIR, XRD and ¹³C cross polaryzation/mass angle spinning NMR. *J. App. Polym. Sci.* 93:1876-1885.
- Carlström, D. 1957. crystal structure of α -chitin. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 3:669-683.
- Carre, M., I. Bentaleb, O. Bruguier, E. Ordinola, N. T. Barrett, and M. Fontugne. 2006. Calcification rate influence on trace element concentrations in aragonitic bivalve shells: Evidences and mechanisms. *Geochim. Cosmochim. Acta* 70:4906.
- Carter, J. G. 1980. Guide to bivalve shell microstructures. In Rhoads, D. C., Lutz, R. A. . *Skeletal growth of aquatic organisms*, Plenum Press, New York:645-673.
- Chateigner, D., C. Hedegaardb, and H.-R. Wenkc. 2000. Mollusc shell microstructures and crystallographic textures. *Journal of Structural Geology* 22 1723-1735.
- Checa, A. G., F. J. Esteban-Delgado, and A. B. Rodri'guez-Navarro. 2007. Crystallographic structure of the foliated calcite of bivalves. *Journal of Structural Biology* 157: 393-402.
- Chen, C. C., and A. L. Boskey. 1985. Mechanisms of proteoglycan inhibition of hydroxyapatite growth. *Calcif.Tissue Int.* 37:395-399.
- Chevallier, P., P. Dhez, F. Legrand, A. Erko, Y. Agafonov, L. A. Panchenko, A. Yakshin, and J. Trace 1996. *J. Trace Microprobe Techn.* 14.
- Choi, C.-S., and Y.-W. Kim. 2000. A study of the correlation between organic matrices and nanocomposite materials in oyster shell formation. *Biomaterials* 21:213-222.
- Conway Morris, S. 1986. The community structure of the Middle Cambrian Phyllopod Bed (Burgess Shale). *Palaeontology* 29:423-467.
- Crenshaw, M. A. 1972. The soluble matrix from *Mercenaria merceneria* shell. *Biomineral. Res. Rep.* 6:6-11.
- Crenshaw, M. A., ed. 1982. *Mechanism of normal biological mineralization of calcium carbonate In : Biological mineralization and deminarelization*. Nancollas, G. H. (eds). Berlin: Springer Verlag.
- Crenshaw, M. A., and H. Ristedt, eds. 1976. *The histochemical localization of reactive groups in septal nacre from Nautilus pompilus L. In: The Mechanisms of Mineralization in the invertebtares and plants*, Watabe M. and Wilbur K. M. (eds) University of South Caroline Press.
- Daley, R. L., and D. W. Boyd. 1996. The role of skeletal microstructure during selective silicification of brachiopods. *J. Sediment Res. A* 60 155-162.
- Dauphin, Y. 1985. Implications of microstructural composition in some fossil and recent coleoid cephalopod shells. *Palaeontographica A* 191:69-83.
- Dauphin, Y. 1987. Les microstructures des rostres de cephalopodes. VIII - apport de la microanalyse localisee pour l'interpretation de l'etat diagenetique des rostres d'aulacocerides (Trias -Turquie). *Paleontographica Abt. A.* 199:217-231.

- Dauphin, Y. 1996. The organic matrix of coleoid cephalopod shells: Molecular weights and isoelectric properties of the soluble matrix in relation to biomineralization processes. *Mar. Biol.* 125:525-529.
- Dauphin, Y. 2001. Comparative studies of skeletal soluble matrices from some Scleratinian corals and Molluscs. *Intern. J. Biol. Macromol.* 28:293-304.
- Dauphin, Y. 2002. Fossil organic matrices of the Callovian aragonitic ammonites from Lukow (Poland): Location and composition. *Int. J. Earth Sci. (Geol Rundsch)* 91:1071-1080.
- Dauphin, Y. 2006. Structure and composition of the septal nacreous layer of *Nautilus macrophalus* L. (Mollusca, Cephalopoda). *Zoology* 109:85-95.
- Dauphin, Y., and A. Denis. 1990. Analyse microstructurale des tests de Mollusques du Callovien de Lukow (Pologne)- comparaison de l'etat de quelques types structuraux majeurs. *Rev. Paleobiol.* 9:27-36.
- Dauphin, Y., and F. Marin. 1995. The compositional analysis of recent cephalopod shell carbohydrates by Fourier transform infrared spectrometry and high performance anion exchange - pulsed amperometric detection. *Experientia* 51:278-283.
- Dauphin, Y., C. T. Williams, and I. S. Barskov. 2007. Aragonitic rostra of the Turonian belemnite *Goniocamax*: Arguments from diagenesis. *Acta Palaeontologica Polonica* 52 85-97.
- De Villiers, J. P. R. 1971. *Am. Mineral.* 56:758. ICSD no.15194.
- de Villiers, S., G. T. Shen, and B. K. Nelson. 1994. The Sr/Ca-temperature relationship in coralline aragonite: Influence of variability in (Sr/Ca)seawater and skeletal growth parameters. *Geochim. Cosmochim. Acta* 58:192-208.
- Degens, E. T., D. Spencer, and R. H. Parker. 1967. Paleobiochemistry of molluscan shell proteins. *Comp. Biochem. Physiol.* 20:553-579.
- Dickens, B., and W. E. Brown. 1970. *Inorg. Chem.* 9:480.
- Dillman, P., P. Populus, P. Chevallier, P. Fluzin, G. Beranger, and A. Firsov. 1997. *J. Trace Microprobe Techn.* 15.
- Ditchfield, P. W. 1997. High northern palaeolatitude Jurassic-Cretaceous palaeotemperature variation: New data from Kong Karls Land, Svalbard. *Palaeogeogr. Palaeoclimatol. Palaeoecol.* 130 163-175.
- Donovan, D. T. 1964. Cephalopod phylogeny and classification. *Biol. Rev. Cambridge Phil. Soc* 39 259-287.
- Doucet, F. J., C. Schneider, S. J. Bones, A. Kretzmer, I. Moss, P. Tekely, and C. Exley. 2001. The formation of hydroxyaluminosilicates of geochemical and biological significance. *Geochim. Cosmochim. Acta* 65:2461-2467.
- Drozdova, T. V., A. V. Karyakin, and V. A. Krasnova. 1971. Chemical composition and infrared absorption spectra of the organic matrix of the shell in the squid *Sepia pharaonis*. *Zh. Evolyut. Biokhim. Fiziol* 7:350-356.
- Dwyer, G. S., T. M. Cronin, P. A. Baker, M. E. Raymo, J. S. Buzas, and T. Correge. 1995. North atlantic deepwater temperature change during late pliocene and late quaternary climatic cycles. *Science* 270:1347-1351.
- Dwyer, G. S., T. M. Cronin, P. A. Baker, and J. Rodriguez-Lazaro. 2000. Changes in North Atlantic deep-sea temperature during climatic fluctuations of the last 25,000 years based on ostracode Mg/Ca ratios. *Geochem. Geophys. Geosyst. (AGU electronic journal: <http://g-cubed.org/>)*. 1
- Dzik, J., ed. 2003. *Dzieje życia na ziemi: Wprowadzenie do paleobiologii*. III ed. Warszawa: Wydawnictwo Naukowe PWN.

- Effenberger, H. 1981. Crystal structure and infrared absorption spectrum of synthetic monohydrocalcite, CaCO₃·H₂O. *Monatsh. Chem.*, 112:899-909.
- Effenberger, H., K. Mereiter, and Zemann. 1981. *Z. Kristallogr* 156:233. ICSD no 100676.
- Efremov, I. 1940. Taphonomy: new branch of paleontology. *Pan-American Geologist* 74:81-93.
- Ehrlich, H., M. Krautter, T. Hanke, P. Simon, C. Knieb, S. Heineman, and H. Worch. 2007a. First evidence of the presence of chitin in skeletons of marine sponges. Part II. Glass sponges (Hexactinellida: Porifera). *Journal of experimental zoology (Mol. Dev. Evol.)* 308B:417-483.
- Ehrlich, H., M. Maldonado, K.-D. Spindler, C. Eckert, T. Hanke, R. Born, C. Goebel, P. Simon, S. Heineman, and H. Worch. 2007b. First evidence of the presence of chitin in skeletons of marine sponges. Part I. Verongidae (Demospongia: Porifera). *Journal of experimental zoology (Mol. Dev. Evol.)* 308B:347-356.
- Erben, H. K., G. Flajs, and A. Siehl. 1964. Ammonoids: Early ontogeny of ultramicroscopical shell structure. *Nature* 219:396-398.
- Exley, C., and J. D. Birchall. 1993. A mechanism of hydroxyaluminosilicate formation. *Polyhedron* 12:1007-1017.
- Eyden, P. 2003. Ammonites: A General Overview. <http://www.tonmo.com/images/content/ammonite-fig7>.
- Falini, G., S. Albeck, S. Weiner, and L. Addadi. 1996. Control of aragonite or calcite polymorphism by mollusk shell macromolecules. *Science* 271:67-69.
- Falini, G., S. Weiner, and L. Addadi. 2003. Chitin-Silk Fibroin Interactions: Relevance to Calcium Carbonate Formation in Invertebrates. *Calcif. Tissue Int.* 72:548-554.
- Flannery, M. B., W. Stott, D. E. G. Briggs, and R. P. Evershed. 2001. Chitin in the fossil record: identification and quantification of D-glucosamine. *Organic Geochemistry* 32:745-754.
- Florek, M., E. Fornala, P. Gómez-Romero, E. Zieba, W. Paszkowicz, J. Lekki, J. Nowak, and A. Kuczumow. 2008. Complementary microstructural and chemical analyses of *Sepia officinalis* endoskeleton *Materials Science and Engineering C* doi:10.1016/j.msec.2008.09.040
- Florek, M., H. S. Youn, C.-U. Ro, H. Wierzbowski, J. Osan, W. Kazimierzak, and A. Kuczumow. 2004. Investigation of chemical composition of belemnite rostra by synchrotron-based X-ray microfluorescence and diffraction and electron microprobe. *Journal of Alloys and Compounds* 362:99-106.
- Freitas, P. S., L. J. Clarke, H. Kennedy, C. A. Richardson, and F. Abrantes. 2006. Environmental and biological controls on elemental (Mg/Ca, Sr/Ca and Mn/Ca) ratios in shells of the king scallop *Pecten maximus*. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 70:5119-5133.
- Fricke, M., and D. Volcmer. 2007. Crystalization of calcium carbonate beneath insoluble monolayers: Suitable models of mineral-matrix interactions in Biomineralization? *Top Curr Chem* 270:1-41.
- Frisia, S. 2000. Calcium carbonate and carbonic acid system in Geochemistry: www.kluweronline.com.
- Frye, K. 2002. Aragonite group. In *Mineralogy*, edited by <http://reference.kluweronline.com/>.
- Gaetani, G. A., and A. L. Cohen. 2006. Element partitioning during precipitation of aragonite from seawater: a framework for understanding paleoproxies. *Geochim. Cosmochim. Acta* 70:4617-4634.
- Gallery, C. S. Intermediate Temperature Solid Conductors. <http://staff.aist.go.jp/nomura-k/english/itscgallery-e.htm>.

- Goldhaber, M. B., R. C. Aller, J. K. Cochran, J. K. Rosenfeld, C. S. Martens, and R. A. Berner. 1977. Sulfate reduction, diffusion, and bioturbation in Long Island Sound sediments: report of the FOAM group. *American Journal of Science* 277:193-237.
- Goodrich, J. D., and W. T. Winter. 2007. α - Chitin nanocrystals prepared from shrimp shells and their specific surface area measurement. *Biomacromolecules* 8:252-257.
- Gregoire, C., ed. 1972. *Structure of the molluscan shell. In: Chemical Zoology , Vol 7. Mollusca. Chap. 2 (eds) M. Florkin and B. T. Scheer.* New York: Academic Press.
- Grimes, S. T., F. Brock, D. Rickar, K. L. Davies, D. Edwards, D. E. G. Briggs, and R. J. Parkes. 2001. Understanding Fossilisation: Experimental pyritisation of plants. *Geology* 26:123-126.
- Hare, P. E. 1963. Amino acids in the proteins from aragonite and calcite in the shells of *Mytilus californianus*. *Science* 139:216-217.
- Hasse, B., H. Ehrenberg, J. C. Marxen, W. Becker, and M. Epple. 2000. Calcium carbonate modifications in the mineralized shell of the freshwater snail *Biomphalaria glabrata*. *Chemical European Journal* 6:3679-3685.
- Hesse, K. F., H. Kueppers, and E. Suess. 1983. *Z. Kristallogr* 163:227. ICSD no 31305.
- Hewitt, R. A. 1975. Analysis of aragonite from the cuttlebone of sepia *Officinalis* L. *Marine Geology* 18:M1-M5.
- Hryniewicz, A. Z., and E. Rokita, eds. 1999. *Fizyczne metody badań w biologii, medycynie i ochronie środowiska.* Warszawa: PWN.
<http://www.models.kvl.dk/users/engelsen/specarb/specarb.html>.
- Iwata, K. 1975. Ultrastructure of the conchiolin matrices in the molluscan nacreous layers. *J. Fac. Sci. Hokkaido Univ., Ser IV* 17:173-229.
- Jamieson, J. C. 1953. Phase Equilibrium in the System Calcite-Aragonite. *J. Chem. Phys.* 21.
- Jang, M.-K., B.-G. Kong, Y.-I. Jeong, C. H. Lee, and J.-W. Nah. 2004. Physiochemical Characterisation of α -chitin, β -chitin and γ -chitin separated from natural resources. *J. Polym. Sc. A: Polym. Chem.* 42:3423-3432.
- Jeunieux, C., ed. 1963. *Chitine et chitinolyse.* Paris: Masson.
- Jiménez-Berrocoso, Á., M. Zuluaga, and J. Elorza. 2004. Minor- and trace-element intra-shell variations in Santonian inoceramids (Basque-Cantabrian Basin, northern Spain): diagenetic and primary causes. *Facies* 50:35-60.
- Kannan, S., J. H. G. Rocha, S. Agathopoulos, and J. M. F. Ferreira. 2007. Fluorine-substituted hydroxyapatite scaffolds hydrothermally grown from aragonitic cuttlefish bones. *Acta Biomaterialia* 3:243-249.
- Kato, T. 2000. Polymer/calcium carbonate layered thin-film composites. *Adv. Mater.* 12:1543-1546.
- Keith, J., S. Stockwell, D. Ball, K. Remillard, D. Kaplan, and R. Sherwood. 1993. Comparative analysis of macromolecules in mollusc shells. *Comp. Biochem. Physiol.* 105B:487-496.
- Kitano, Y., and D. W. Hood. 1962. Calcium carbonate crystals formed from sea water by inorganic processes. *J. Oceanogr. Soc. Jpn.* 18:141
- Kitano, Y., A. Kanamori, and A. Tokuyama. 1969. Effects of organic matter on solubilities and crystal form of carbonates. *Am. Zool.* 9:681-688.
- Klein, R., K. C. Lohmann, and C. W. Thayer. 1996a. Bivalve skeletons record sea-surface temperature and $\delta^{18}\text{O}$, via Mg/Ca and $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ ratios. *Geology* 24:415-418.
- Klein, R., K. C. Lohmann, and C. W. Thayer. 1996b. Sr/Ca and $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ratios in skeletal calcite of *mytilus trossulus*: Covariation with metabolic rate, salinity and carbon isotopic composition of seawater. *Geochim. Cosmochim. Acta* 60:4207-4221.

- Klein, R. T., K. C. Lohmann, and C. H. Kennedy. 1997. Elemental and isotopic proxies of paleotemperature and paleosalinity: climate reconstruction of the marginal northeast Pacific ca. 80 ka. *Geology* 25:363-366.
- Klug, C., T. Bruhwiler, D. Korn, G. Schweigert, A. Brayard, and J. Tilsley. 2007. Ammonoid shell structures of primary organic composition. *Paleontology* 50:1463-1478.
- Kobayashi, I., and T. Samata. 2006. Bivalve shell structure and organic matrix. *Materials Science and Engineering C* 26:692 - 698.
- Kolditz, L., ed. 1994. *Chemia nieorganiczna*. Warszawa: PWN
- Krampitz, G., J. Engeles, and C. Cazaux, eds. 1976. *biochemical studies on water soluble proteins and related components of gastropod shells*. In *The mechanisms of mineralization in the invertebrates and plants*. (eds) N. Watabe and K. M. Wilbur. Columbia: Univ. of South Carolina Press.
- Krauskopf, K. B., and D. K. Bird, eds. 1999. *Introduction to geochemistry*. New York: McGraw-Hill.
- Kuczumow, A., B. Vekemans, O. Schalm, L. Vincze, W. Dorriné, K. Gysels, and R. Van Grieken. 1999. Application of auxiliary signals in X-ray fluorescence and electron microprobe analysis for density evaluation. *X-ray spectrometry* 28:282-291.
- Kulicki, C. 1975. Structure and mode of rigin of the ammonite proseptum *Acta Palaeontologica Polonica* 20:535-541.
- Kulicki, C., K. Tanabe, and N. H. Landman. 2007. Primary structure of the connecting ring of ammonoids and its preservation. *Acta Palaeontologica Polonica* 52:823-827.
- Kummel, B. 1952. A classification of the Triassic ammonoids,. *J. Paleontology*, 26:847-853.
- Lea, D. W., T. A. Mashiotta, and H. J. Spero. 1999. Controls on magnesium and strontium uptake in planktonic foraminifera determined by live culturing. *Geochim. Cosmochim. Acta* 63 2369-2379.
- Lear, C., Y. Rosenthal, and N. Slowey. 2002. Benthic foraminiferal Mg/Ca-paleothermometry: A revised core-top calibration. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 66:3375-3387.
- Lear, C. H., H. Elderfield, and D. C. Wilson. 2000. Cenozoic Deep-sea temperatures and global ice volumes from Mg/Ca in benthic foraminiferal calcite. *Science* 287:269-272.
- Lebed, S., M. Cholewa, Z. Cioch, B. Cleff, P. Golonka, D. N. Jamieson, G. J. F. Legge, S. Łazarski, A. Potempa, C. Sarnecki, and Z. Stachura. 1999. Design and first results of the nuclear microprobe in Cracow *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res. B* 158:44-47.
- Legrand, A. P., ed. 1999. *The surface properties of silicas*. New York: John Wiley and Sons.
- Levi, Y., S. Albeck, A. Brack, S. Weiner, and L. Addadi. 1998. Control Over Aragonite Crystal Nucleation and Growth: An In Vitro Study of Biomineralization. *Chem. Eur. J.* 4:389-396.
- Liber-Madziarz, E., and B. Teisseyre, eds. 2000. *Mineralogia i petrografia*. Wrocław: Oficyna Wyd. Politech. Wrocław.
- Linn, L. J., M. L. Delaney, and E. R. M. DruVel. 1990. Trace-metals in contemporary and 17th-century Galapagos coral records of seasonal and annual variations. *Geochim. Cosmochim. Acta* 54:387-394.
- Lovley, D. R. 1991. Dissimilatory Fe(III) and Mn(IV) reduction. *Microbiological Reviews* 55:259-287.
- Lowenstam, H. A. 1981. Minerals Formed by organisms. *Science* 211:1126-1131.

- Lowenstam, H. A., and S. Weiner, eds. 1989. *On Biomineralization*. Oxford: Oxford University Press.
- Lukeneder, A. 2005. First nearly complete skeleton of the Crataceous duvaliid belemnite *Conobelus*. *Acta Geologica Polonica* 55:147-162.
- Machado, J., R. Marvo, C. Ferreira, G. Moura, M. Reis, and J. Coimbra. 1994. Study on mucopolysaccharides as a shell component of *Anodonta cyganea*. *Bulletin de l'Institut oceanographique, Monaco* 14.
- Majeti, N. V., and R. Kumar. 2000. A review of chitin and chitosan applications. *Reactive and functional polymers* 46:1-27.
- Makowski, H. 1952. La faune calloviene de Lukow en Pologne. *Paleontol. Pol.* 4:1-54.
- Mann, S., ed. 2001. *Biomineralization: Principles and Concepts in Bioinorganic Materials Chemistry*. New York: Oxford University Press.
- Marin, F., P. Corstjens, B. De Gaulejac, E. De Vrind-De Jong, and P. Westbroek. 2000. Mucins and molluscan calcification: molecular characterization of mucoperlin, a novel mucin-like protein from the nacreous shell layer of the fan mussel *Pinna nobilis* (Bivalvia, Pteriomorphia). *J. Biol. Chem.* 275 20667-20675.
- Marshall, J. D. 1992. Climatic and oceanographic isotopic signals from the carbonate rock record and their preservation. *Geol. Mag.* 129 143-160.
- Masuda, F., and M. Hirano. 1980. Chemical composition of some modern marine pelecypod shells. *Sci. Rept. Inst. Geosc., Univ. Trakuba B* 1:163-177.
- McArthur, J. M., D. T. Donovan, M. F. Thirlwall, B. W. Fouke, and D. Matthey. 2000. Strontium isotope profile of the early toarcian (Jurassic) oceanic anoxic event, the duration of ammonite biozones, and belemnite palaeotemperatures. *Earth Planet. Sci. Lett.* 179:269-285.
- McArthur, J. M., P. Doyle, M. J. Leng, K. Reeves, C. T. Williams, R. Garcia-Sanchez, and R. J. Howarth. 2007. Testing palaeo-environmental proxies in jurassic belemnites: Mg/Ca, Sr/Ca, Na/Ca, $\delta^{18}O$ and $\delta^{13}C$. *Palaeogeogr. Palaeoclimatol. Palaeoecol.* 254:464-480.
- McCauley, J. W. 2002. Calcite group. In *Mineralogy*, edited by <http://reference.kluweronline.com>.
- McRoberts, C. A. 1998. The sea level did it: A review of Mass Extinctions and their Aftermath by A. Hallam and P. Wignall. *American Paleontologist* 6:10-11.
- Meyer, H. J. 1969. *Z. Kristallogr* 128:183. ICSD no 18127.
- Miller, A. K., and W. M. Furnish. 1954. The classification of the Paleozoic ammonoids. *J. Paleontology* 28:685-692.
- Minke, R., and J. Blackwell. 1978. The structure of α -chitin *J. Mol. Biol.* 120:167-181.
- Mitsuguchi, T., E. Matsumoto, O. Abe, T. Uchida, and P. J. Isdale. 1996. Mg/Ca Thermometry in Coral Skeletons. *Science* 274:961 - 963.
- Miyamoto, H., T. Miyashita, M. Okushima, S. Nakano, T. Morita, and A. Matsushiro. 1996. A carbonic anhydrase from the nacreous layer in oyster pearls. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 93:9657-9660.
- Miyashita, T., R. Takagi, M. Okushima, S. Nakano, H. Miyamoto, and E. Nishikawa. 2000. Complementary DNA cloning and characterization of pearlins, a new class of matrix protein in the nacreous layer of oyster pearls. *Mar. Biotechnol.* 2:409-418.
- Mogilevskaya, E. L., T. A. Akopova, A. N. Zelenetskii, and A. N. Ozerin. 2006. The crystal structure of chitin and chitosan. *Polymer Science A* 48:116-123.
- Müller, M., R. Hori, T. Itoh, and J. Sugiyama. 2002. X-ray microbeam and electron diffraction experiments on developing xylem cell walls. *Biomacromolecules* 3:182-186.

- Mutvei, H. 1969. On the micro- and ultrastructure of the conchiolin in the nacreous layer of some recent and fossil molluscs. *Stockh. Contrib. Geol* XX (1):1-16.
- Naef, A., ed. 1922. *Die fossilen Tintenfische: eine paläozoologische Monographie*. Jena: Fisher.
- Naka, K., and Y. Chujo. 2001. Control of crystal nucleation and growth of calcium carbonate by synthetic substrates. *Chem. Mater.* 13:3245-3259.
- Nakahara, H., and M. Kakei. 1983. The central dark line in developing enamel crystallite: An electron microscopic study. *Bull. Josai Dent. Univ.* 12:1-7.
- Nancollas, G. H., ed. 1989. in *Biom mineralization, Chemical and Biochemical Perspectives*, eds. S. Mann, J. Webb and R. J. P. Williams. Weinheim: VCH.
- Nealson, K. H., and D. Saffarini. 1994. Iron and manganese in anaerobic respiration: environmental significance, physiology, and regulation. *Annual Reviews of Microbiology* 48:311-343.
- Nixon, M., and J. Z. Young, eds. 2003. *The Brains and Lives of Cephalopods*. Oxford: Oxford University Press.
- Nowak, J., M. Florek, W. Kwiatek, J. Lekki, P. Chevallerier, E. Zięba, N. Mestres, E. M. Dutkiewicz, and A. Kuczumow. 2005. Composite structure of wood cells in petrified wood. *Materials Science and Engineering C* 25 119- 130.
- Nudelman, F., B. A. Gotliv, L. Addadi, and S. Weiner. 2006. Mollusk shell formation: Mapping the distribution of organic matrix components underlying a single aragonitic tablet in nacre. *Journal of Structural Biology* 153 176-187.
- Nyström, J., U. Lindha, E. Duncab, and H. Mutveib. 1995. A study of *M. margaritifera* shells from the River Pauliströmsån, S. Sweden. *Nuclear Microprobe Technology and Applications* 104:612-618.
- Ogasawara, W., W. Shenton, S. A. Davis, and S. Mann. 2000. Template mineralization of ordered macroporous Chitin-silica composites using Cuttlebone - derived organic matrix. *Chem. Mater.* 12:2835-2837.
- Okamoto, G., T. Okura, and K. Goto. 1957. *Geochim. Cosmochim. Acta* 12.
- Parker, S. P., ed. 1982a. *Synopsis and Classification of living organisms*. I vols. New York: McGraw-Hill Inc.
- Parker, S. P., eds. 1982b. *Synopsis and Classification of living organisms*. II vols. New York: McGraw-Hill Inc.
- Paszkwicz, W. 2005. Application of a powder diffractometer equipped with a strip detector and Johansson monochromator to phase analysis and structure refinement. *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res. A* 551:162-177.
- Pinta, M., eds. 1977. *Absorpcyjna spektrometria atomowa. Zastosowania w analizie chemicznej*. Warszawa: PWN.
- Pokroy, B., A. N. Fitch, P. L. Lee, J. P. Quintana, E. a. N. Caspi, and E. Zolotoyabko. 2006. Anisotropic lattice distortions in the mollusk-made aragonite: A widespread phenomenon. *Journal of Structural Biology* 153:145-150.
- Price, N. B., and A. Hallam. 1967. Variation of Strontium Content within Shells of Recent Nautilus and Sepia. *Nature* 215:1272 - 1274
- Purton-Hildebrand, L. M. A., G. W. Grime, G. A. Shields, and M. D. Brasier. 2001. The use of external micro-PIXE to investigate the factors determining the Sr:Ca ratio in the shells of fossil aragonitic molluscs. *Nucl. Instrum. Methods B* 181 506-510.
- Raiswell, R., K. Whaler, S. Dean, M. L. Coleman, and D. E. G. Briggs. 1993. A simple three-dimensional diffusion-plus-precipitation model applied to localized pyrite formation in framboids, fossils and detrital iron minerals. *Marine Geology* 113:636-652.
- Raup, D. M., and S. M. Stanley, eds. 1984. *Podstawy paleontologii*. Warszawa: PWN.

- Revol, J. F., and R. H. Marchessault. 1993. In vitro chiral nematic ordering of chitin crystallites. *Int. J. Biol. Macromol.* 15:329-335.
- Rexfort, A., and J. Mutterlose. 2006. Stable isotope records from *Sepia Officinalis* - a key to understanding the ecology of belemnites? *Earth Planet. Sci. Lett.* 247:212-221.
- Rickard, D. 1997. Kinetics of pyrite formation by the H₂S oxidation of iron (II) monosulfide in aqueous solutions between 25°C and 125°C: The rate equation. *Geochim. Cosmochim. Acta* 61:115-134.
- Rinuando, M. 2006. Chitin and chitosan: Properties and applications. *Prog. Polym. Sci.* 31:603-632.
- Rocha, J. H. G., A. F. Lemos, S. Kannan, S. Agathopoulous, and J. M. F. Ferreira. 2005. Hydroxyapatite scaffolds hydrothermally grown from aragonitic cuttlefish bones. *Journal of Material Chemistry* 15:5007-5011
- Rosales, I., S. Robles, and S. Quesada. 2004. Elemental and Oxygen Isotope Composition of Early Jurassic Belemnites: Salinity vs. Temperature Signals. *Journal of Sedimentary Research* 74:342-354.
- Rosenthal, Y., E. A. Boyle, and N. Slowey. 1997. Temperature control on the incorporation of magnesium, strontium, fluorine and cadmium into benthic foraminiferal shells from Little bahama bank: prospects for thermocline paleoceanography. *Geochim. Cosmochim. Acta* 61:3633-3643.
- Rudall, K. M. 1963. Chitin/protein complexes of insect cuticles. *Adv. Insect Physiol* 1:257-313.
- Rusenko, K. W., J. E. Donachy, and A. P. Wheeler, eds. 1991. *Purification and characterization of shell matrix phosphoprotein from the american oyster in: Surface Reactive peptides and polymers: Discovery and commercialization.* Edited by A. C. Society. Washington.
- Ryka, W., and A. Maliszewska, eds. 1982. *Słownik petrograficzny.* . Warszawa; Wydawnictwa Geologiczne. .
- Sælen, G. 1989. Diagenesis and construction of the belemnite rostrum. *Extract Paleontology* 32 765-798.
- Sælen, G., and T. V. Karstang. 1989. Chemical signatures of belemnites. *N. Jb. Geol. Paläont. Abh. Bd.* 177 333-346.
- Samata, T. 1990. Ca-binding glycoproteins in molluscan shells with different type of ultrastructure. . *Veliger* 32:190-201.
- Schifano, G. 1982. Temperature-magnesium relations in the shell carbonate of some modern marine gastropods. . *Geol. Mag.* 35:321-332.
- Schlücker, S., M. D. Schaeberle, S. W. Huffman, and I. W. Levin. 2003. Raman microspectroscopy: A comparison of point, line and wide field Imaging methodologies. *Analytical Chemistry* 75:4312-4318.
- Schrader, B., H. Schulz, G. N. Andreev, H. H. Klump, and J. Sawatzki. 2000. Non-destructive NIR-FT-Raman spectroscopy of plant and animal tissues, of food and works of art. *Talanta* 53:35-45.
- Senior, J. R. 1971. Wrinkle-layer structures in Jurassic ammonites. *Palaeont.* 14:107-113.
- Sherrard, K. M. 2000. Cuttlebone morphology limits habitat depth in eleven species of sepia (Cephalopoda: Sepiidae). *Biol. Bull.* 198:404-414.
- Siever, R. 1957. The silica budget in the sedimentary cycle *American Mineralogist* 42:821-841.
- Sikes, C. S., and A. P. Wheeler, eds. 1983. *A systematic approach to some fundamental questions of calcium carbonate calcification in: Biomineralization and Biological Metal Accumulation.* Westbrook P. and De Jong E.W. (eds) Dordrecht: D. Reidel.

- Simkiss, J. K. 1965. The organic matrix of the oyster shell. *Comp. Biochem. Physiol.* 16:427-435.
- Simkiss, J. K., and K. M. Wilbur, eds. 1989. *Biomineralization: Chemical and Biochemical Perspectives* Weinheim: VCH.
- Simkiss, K. 1993. in *Biomineralization 93*, ed. D. Allemand, . Monaco: Musee Oceanographique 49-54.
- Smith, G. D., and R. J. H. Clark. 2004. Raman microscopy in archaeological science. *Journal of Archaeological Science* 31:1137-1160.
- Spaeth, C. 1971. *Paläont.Z.* 45:33-40.
- Stanley, S. M., and L. A. Hardie. 1998. Secular oscillations in the carbonate mineralogy of reef-building and sediment-producing organisms driven by tectonically forced shifts in seawater chemistry. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 144 3-19.
- Steuber, T. 1999. Isotopic and chemical intra-shell variations in low-Mg calcite of rudist bivalves (Mollusca-Hippuritacea): disequilibrium fractionations and late Cretaceous seasonality. *Intern. J. Earth Sci.* 88 551-570.
- Stevens, G. R. 1971. *J. Roy. Soc. New Zealand* 1:145-158.
- Stevens, G. R., eds. 1973. *Atlas of Palaeobiogeography*. Amsterdam: Elsevier.
- Stolarski, J., A. Meibom, R. Przeniosło, and M. Mazur. 2007. A Cretaceous Scleractinian Coral with a Calcitic Skeleton. *Science* 318:92-94.
- Sudo, S., T. Fujikawa, T. Nagakura, T. Ohkubo, K. Sakaguchi, M. Tanaka, K. Nakashima, and T. Takahasi. 1997. Structures of mollusc shell framework proteins. *Nature* 387:563-564.
- Sunderlin, K. 2002. Diagenetic alterations in carbonate glacial lake sediments, Hardin County, Ohio. *15th Keck Symposium Volume, Amherst College*.
- Tan, T. L., D. Wong, and P. Lee. 2004. Iridescence of a shell mollusk *Heliotis Glabra*. *Opt. Express* 12:4847-4854.
- Taylor, J. D., W. J. Kennedy, and A. Hall. 1969. Shell structure and mineralogy of the Bivalvia. Introduction. Nuculacae-Trigonacae. *Bull. Br. Mus.(Nat. Hist.) Zool.* 3:1-125.
- Tiseanu, I., T. Craciunescu, N. B. Mandache, and O. G. Dului. 2005. X-ray computer axial tomography application in life sciences. . *J. Optoelectronics Adv. Mater.* 7:1073-1078.
- Török, S., J. Labar, and R. Van Grieken. 1998. X-ray spectrometry. *Analytical Chemistry* 70:495R-517R.
- Tozer, E. T. 1972. Observations on the shell structure of Triassic ammonoids. *Palaeont* 15:637-654.
- Urey, H. C., S. Epstein, R. Buchsbaum, and H. A. Lowenstam. 1951. Carbonate-water isotopic temperature scale. *Bull. Geol. Soc. America* 62:417-426.
- Van der Putten, E., F. Dehairs, E. Keppens, and W. Baeyens. 2000. High resolution distribution of trace elements in the calcite shell layer of modern *mytilus edulis*: environmental and biological controls. *Geochim. Cosmochim. Acta* 64 997-1011.
- Vandenabeele, P., B. Wehling, L. Moens, H. Edwards, M. De Reu, and V. Hooydonk. 2000. Analysis with mikro-Raman spectroscopy of natural organic binding mrdia an varnishes used in art. *Analitica Chimica Acta* 407:261-274.
- Veizer, J. 1974. Chemical diagenesis of belemnite shells and possible consequences of paleotemperature determinations. *Geol. Paläont. Abh. Bd.* 147:91-111.
- Veizer, J., and P. Fritz. 1976. Possible control of post-depositional alteration in oxygen paleotemperature determinations. *Earth Planet. Sci. Lett.* 23:255-260.

- Wada, K. 1964. Studies on the mineralization of calcified tissue in molluscs. VII Histological and Histochemical studies of organic matrices in shells. . *Bull. Natl. Pearl Res. Lab.* 9:1078-1080.
- Wainwright, S. A., W. D. Briggs, J. D. Currey, and J. M. Gosline, eds. 1982. *Mechanical Design in Organisms*. New Jersey: Princeton University Press.
- Wansard, G. 1996. Quantification of paleotemperature changes during isotopic stage 2 in the La draga continental sequence (NE Spain) based on the Mg/Ca ratio of freshwater ostracods. *Quaternary Science Reviews* 15:237-245.
- Watt, M., ed. 1985. *The principles and practice of electron microscopy*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Wegrzynek, D., R. Mroczka, A. Markowicz, E. Chinea-Cano, and S. Bamford. 2008. Experimental evaluation of X-ray optics applied for microanalysis. *X-ray spectrometry* 37:635-641.
- Wei, G., M. Sun, X. Li, and B. Nie. 2000. Mg/Ca, Sr/Ca and U/Ca ratios of a porites coral from Sanya Bay, Hainan Island, South China Sea and their relationships to sea surface temperature. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 162:59-74.
- Weiner, S. 1979. Aspartic acid-rich proteins: Major components of the soluble organic matrix of mollusk shells. *Calcif. Tissue Int.* 29:163-167.
- Weiner, S. 1986. Organization of extracellularly mineralized tissues: a comparative study of biological crystal growth. *CRC Crit. Rev. Biochem.* 20:365-408.
- Weiner, S., and L. Hood. 1975. Soluble protein of the organic matrices of mollusk shells: A potential template for shell formation *Science* 190:987-989.
- Weiner, S., and H. A. Lowenstam. 1977. Discrete molecular weight components of the organic matrices of mollusk shells. *Jour. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 30:45-51.
- Weiner, S., H. A. Lowenstam, B. Taborek, and L. Hood. 1979. Fossil mollusk shell organic matrix components preserved for 80 millions years. *Paleobiology* 5:144-150.
- Weiner, S., and W. Traub. 1984. Macromolecules in mollusk shells and their functions in biomineralization. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* 304:425-434.
- Weiss, I. M., S. Kaufmann, K. Mann, and M. Fritz. 2000. Purification and characterization of perlucin and perlustrin, two new proteins from the shell of the mollusc *Haliothis laevigata*. . *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 267:17-21.
- Weiss, I. M., N. Tuross, L. Addadi, and S. Weiner. 2002. Mollusc Larval Shell Formation: Amorphous Calcium Carbonate Is a Precursor Phase for Aragonite. *JOURNAL OF EXPERIMENTAL ZOOLOGY* 293:478-491.
- Wheeler, A. P., and C. S. Sikes. 1989. Matrix-crystal interaction in CaCO₃ biomineralization - In: *Biomineralization Chemical and Biochemical Perspectives*. Mann S., Webb J. and William R. P. (eds.), VCH, New York. 95-132.
- Wierzbowski, H. 2002. Detailed oxygen and carbon isotope stratigraphy of the Oxfordian in Central Poland. *Intern. J. Earth Sci.* 91:304-314.
- Wright, C. W. 1952. A classification of Cretaceous ammonites. *J. Paleontology*, 26:213-222.
- www.fao.org.
- Wyckoff, R. W. G., ed. 1963. *Crystal Structures I*. New York: Wiley and Sons.
- Young, K. 2002. Ammonoidea *Paleontology* - <http://reference.kluweronline.com>.
- Zhang, C., and R. Zhang. 2006. Matrix proteins in the outer shells of molluscs. *Mar Biotechnol* 8:572-586.

Zhu, Z., H. Tong, Y. Ren, and J. Hu. 2006. Meretrix lusoria—a natural biocomposite material: In situ analysis of hierarchical fabrication and micro-hardness. *Micron* 37:35-40.