ISSN 1230-7483
e-ISSN 2720-5983

Problems of Forensic Sciences 2025, vol. 142, 143, 185–205

DOI: 10.4467/12307483PFS.25.009.22916

RAPID IDENTIFICATION OF SPECIES IN CARVINGS USING FTIR AND CHEMOMETRICS TO COMBAT ILLEGAL TRADE

Ramesh KARUNYAA[1], Shinta Ann JOSE[1], Senthilkumar PRIYADHARSHINI[2], Radhakrishnan Uma MAHESWARI[1], Chandrasekaran Bala AMARNATH[1], Chanthini BASKAR[3], Kalaiyarasan Boopathy THIYAGARAJAN[1], Senbagapriya SEKAR[1]

[1] *Advanced Institute for Wildlife Conservation, Tamil Nadu Forest Department, Vandalur, Chennai, Tamil Nadu, India*
[2] *Prince Shri Venkateshwara Arts and Science College, Gowrivakkam, Chennai, Tamil Nadu, India*
[3] *School of Electronics Engineering, Vellore Institute of Technology, Chennai, India*

Abstract

Ivory and its products are in high demand in both national and international markets due to their charismatic qualities and exotic values. However, increased law enforcement efforts and legal restrictions have limited the ivory trade and the preparation of its products. To meet the market demand, fake ivory items are now being made from osseous materials, which have flooded the market. This situation complicates identification efforts by frontline law enforcement and wildlife forensic laboratories. Current ivory identification methods face several challenges, including inconsistent accuracy, high costs, slow turnaround times, and the issue of destructive sample requirements. To address these issues, this study developed a simple, rapid, and accurate method for identifying ivory products using FTIR spectroscopy combined with partial least squares discriminant analysis (PLS-DA). We received seven (n = 7) carvings from law enforcement agencies to identify whether the carvings are of ivory origin. Initially, we performed the FTIR analysis for all the carvings and compared the spectra with known FTIR spectra of Asian elephant ivory and bone (served as internal reference). The results indicated that out of seven carvings, samples S1–S4 and S7 were found not to be of ivory origin. In contrast, the FTIR spectra recorded for two carvings (S5 and S6) were identical to FTIR spectra of ivory and bone. To confirm these results further, we employed PLS-DA to assess whether carvings S5 and S6 were indeed made of ivory or a material with a similar chemical composition, likely bone. We also used a commercial IR library to identify the chemical composition of carvings S1–S4 and S7. The PLS-DA analysis indicated that carvings S5 and S6 were crafted from bone-like materials, whereas the IR library analysis showed that carvings S1–S4 and S7 were prepared using sheet molding compounds and polymers. To further investigate the biological origin of the bone materials used in carvings S5 and S6, DNA analysis was performed. The results indicated that the crafted materials were derived from *Bubalus bubalis* (domestic water buffalo). This study demonstrated a simple, rapid and cost-effective method for identifying the origin of ivory in carvings. Additionally, it opened new avenues for screening carvings using ivory-specific FTIR spectra, which have potential applications in wildlife forensic analysis.

Keywords

Bone; Ivory; IR library; Counterfeit carvings; Ivory carvings; Ivory identification.

Received 23 April 2025; accepted 14 July 2025

1. Introduction

Wildlife crimes involving the exploitation of a diverse range of species for societal/religious rites, traditional medicine, and other financial benefits have dramatically increased in recent years [1]. The UNODC *World Wildlife Crime Report 2024* documented that between 2015 and 2021, a wide range of species was recorded in seizures, i.e., corals (16%), crocodilians (9%), elephants (6%), bivalve molluscs

(6%), carnivores (5%), parrots and cockatoos (4%), orchids (4%), turtles and tortoises (4%), snakes (4%), rosewoods (4%), ginsengs (3%), costus root (3%), aloes and other Liliales (3%), cacti (3%), even-toed ungulates (2%), sturgeons and paddlefish (2%), pangolins (2%), sea snails (2%), lizards (2%), birds of prey (1%) and others (16%). Additionally, the report emphasised that the species most affected by wildlife crime, elephants (with a 15% share in the standardised seizure index), are listed as one of the top species affected by wildlife crime [2].

Ivory is made of dense bone tissue surrounded by enamel. Specifically, it consists of three components: organic material (collagen), mineral material (hydroxyapatite), and fluids (water) [3]. The overall structure of the organic collagen filament network contributes to the mechanical integrity and strength of ivory. As a result, ivory is harder and more durable than wood or bone. It resists chipping, cracking, and deteriorating even over long periods [4, 5]. Due to these properties, ivory has been utilised for both practical (e.g., weaponry tools) and aesthetic (e.g., religious artefacts, artworks, and luxury goods) purposes for over a thousand years [6].

Owning ivory and ivory carvings (all ivory products) is often viewed as a symbol of wealth and power. This perception has led to a high demand for ivory, which significantly contributes to the decline of elephant populations due to poaching for their tusks [7, 8]. To protect these populations, the *Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora* (CITES) banned the international trade of Asian and African elephant species by listing them in Appendix I in 1973 and 1989, respectively [9]. However, driven by economic incentives and market demand, traders often create counterfeit items using bone, chemically synthesised substances, and plant-based products [3]. This trend complicates law enforcement efforts, as it is difficult to visually distinguish between artefacts made of ivory and those made from alternative materials. Consequently, there is an urgent need to develop an accurate, rapid, cost-effective, and user-friendly method for identifying ivory products.

CITES has issued an *Identification Guide for Ivory and Ivory Substitutes* and recommended several techniques for identifying these materials, including morphological examination, FTIR spectroscopy/Raman spectroscopy, and mitochondrial DNA analysis [10]. Morphometric methods rely on the Schreger angles of ivory but have limitations as their accuracy decreases when the ivory is carved or damaged [11–13]. To date, DNA-based species identification is considered the 'gold standard' [14]. In light of this, studies have shown the identification of ivory through DNA analysis [15–19]. However, it has drawbacks, including high costs, lengthy processing times, and challenges associated with extracting DNA from carved artefacts, as the DNA may be denatured or fragmented during the crafting process [15]. However, various studies have explored alternative identification methods based on the inorganic components of ivory, such as isotope analysis, X-ray fluorescence, near-infrared spectroscopy, and Raman spectroscopy [20–23].

Among these methods, FTIR spectroscopy has gained considerable attention in wildlife forensic analysis due to its rapid, portable, cost-effective nature and suitability for field deployment. Several FTIR studies have successfully identified species from samples such as hair, blood, nails, and claws [24–28]. Additionally, a few studies have demonstrated the ability to trace the origin of ivory in suspected artefacts [28]. However, to enhance the practical applications of FTIR analysis in wildlife forensics, it is crucial to develop a sample-specific IR library similar to a chemical IR library. This would facilitate forensic analysis in two main ways: 1) by screening whether the suspected items are of biological origin and 2) by identifying the unknown samples by comparing known FTIR spectra. So far, minimal studies have focused on establishing FTIR references for wildlife objects. For instance, Jose et al. reported an FTIR reference library for Asian elephant ivory and mongoose hair, but beyond that, there has been limited research in this area [29].

One of the major challenges in wildlife forensic analysis is identifying ivory origin in carvings seized by law enforcement agencies. All carvings have already undergone processing and treatment with various chemical methods before they are received for analysis. Consequently, identifying the carvings, whether from ivory or not, becomes increasingly tricky through conventional forensic analysis. To address this challenge, Su et al. demonstrated the identification of elephant and mammoth ivory using ultra-performance liquid chromatography (UPLC) [30], while Gilbert et al. [31] reported on the species identification of ivory and bone museum objects using a proteomics approach. However, these analytical methods require high-end instrumentation and extensive sample preparation. Given these drawbacks, there is a need for simpler methods to screen seized carvings and determine whether they contain any ivory or other materials.

In light of this, the current study demonstrates FTIR spectroscopy combined with chemometrics analysis to identify carvings suspected of being made from ivory. Several carvings were received by the Institute

From The Law Enforcement Agency to identify and verify their ivory origin, and the following methods were employed: 1) FTIR spectra were recorded for the carvings, and the spectra were compared with known ivory and bone samples (severed as reference spectra); 2) PLS-DA analysis was employed to differentiate ivory and bone (as both materials share a similar chemical composition); 3) a commercial IR library was used to identify non-biological materials that may have been used in the carvings.

2. Materials and methods

2.1. Case history

The law enforcement agency sent seven carvings (n = 7) to the Advanced Institute for Wildlife Conservation (Tamil Nadu Forest Department, Vandalur, Chennai, India) to identify if ivory was used for carving preparation (Fig. 1). All samples were carefully packed and sealed, and a chain of custody form was included.

2.2. Preliminary screening

We initially recorded the height, width, and weight of all carvings received for analysis (Table 1). To determine whether the carvings were made from biological sources or chemical materials, we performed the FTIR spectroscopy analysis. Below, we have described the sampling method used for the FTIR analysis.

Table 1
Geometric measurements for the carvings

S. no	Sample name	Sample ID*	Height × width (cm)	Weight (kg)
1	Elephant carving	S1	17 × 25	2.296
2	Elephant carving	S2	16 × 21	1.684
3	Elephant carving	S3	16.5 × 22	1.580
4	Elephant carving	S4	15 × 17	1.350
5	Pendant chain	S5	Unmeasurable	0.012
6	Box	S6	15.15 × 7.15	0.429
7	Krishna carving	S7	11.43 × 30	1.327

* In the manuscript, sample ID is used to describe.

2.3. Sampling for FTIR analysis

Before sampling, all carvings were wiped with 70% isopropanol (AR grade) and air-dried for 5 to 10 minutes. To understand what materials are used in carvings' surface coating and what materials are inside (interior) of carvings, we used two types of sampling: 1) surface scraping using sterile surgical blades (Glass Van) and 2) drilling 7 to 15 mm into the carvings to collect interior samples (Bosch Professional 1 mm drill bit). We collected surface samples from S1–S7, taking two samples from two different locations for each carving. For S1–S4, we drilled and collected samples from the interior, with two samples taken from different locations for each carving. However, samples S5, S6, and S7 were too thin, so we only collected surface samples. Hence, for FTIR analysis, we collected

Fig. 1. Carvings suspected of ivory were received for analysis (n = 7; numbered S1–S7) from the Law Enforcement Agency.

a total of 22 samples (surface sampling: 7 × 2 = 14; interior sampling: 4 × 2 = 8), and all samples were analysed using FTIR as described below.

2.4. FTIR analysis

Before FTIR analysis, all samples were individually minced using a sterile mortar and pestle to obtain a fine powder. Subsequently, 1 g of potassium bromide (KBr) (IR spectroscopy grade, CAS: 7758-02-3) was added, blended, and the 13 mm KBr pellets were prepared for all samples. Additionally, a blank KBr pellet without any sample was prepared and used as a blank before recording the spectrum for the samples. The FTIR analysis was conducted using an Alpha II spectrometer (Bruker Optics, Ettlingen, Germany) equipped with a ZnSe crystal accessory and a deuterated triglycine sulfate (DTGS) detector. Initially, a blank KBr pellet was analysed to obtain a background scan before recording the FTIR spectra of the samples. The spectra were acquired in the mid-infrared range of 4000–500 cm^{-1}, with a spectral resolution of 4 cm^{-1}. Each sample was analysed in triplicate, resulting in a total of 66 spectra (42 spectra from 14 surface samples and 24 spectra from 8 interior samples). At the end of each sample analysis, the sample holder and instrument accessories were cleaned with acetone (AR grade) to prevent cross-contamination between samples.

2.5. Identifying the origin of the carving using the internal FTIR reference library for bone, ivory and commercial IR reference library

Initially, to evaluate whether ivory was used to prepare the carvings, we visually examined all FTIR spectra, particularly the spectral patterns and wavenumbers, and compared them with the FTIR internal reference library for ivory [29]. If we found that the FTIR spectra of the carving matched those of ivory, we proceeded to compare them with the internal reference library for bone. This was important as bones have similar chemical compositions to ivory and have often been used as a substitute for ivory in carvings [3] (the development of the FTIR reference library for bone is provided in the Supplementary information 1). Further, if we identified that the carving's FTIR spectra were identical to the internal FTIR reference library for bone and ivory, we used chemometric analysis to confirm whether the carvings were prepared using ivory or bone materials. Furthermore, the carving FTIR spectra did not match either bone or ivory; we used the commercially available IR reference libraries to identify the materials used in the carving (Bruker polymer ATR crystal spectral library).

2.6. Chemometric analysis to distinguish carvings from ivory or bone (similar chemical compositions to ivory)

Studies have shown that FTIR spectroscopy combined with chemometric analysis, such as principal component analysis (PCA) or partial least squares discriminant analysis (PLS-DA), can effectively discriminate between species based on the infrared absorbance variations of the chemical compounds present in the samples [32, 33]. In this study, we employed the PLS-DA model to identify whether the FTIR spectra of the carvings were identical to ivory or bone based on the difference in IR absorbance.

To construct the PLS-DA model, we used six FTIR datasets from Asian elephant ivory (data reproduced from our previous study) [29] and bone samples (Supplementary information 1). Then, the FTIR spectra was selected in the range of 3500 cm^{-1} to 500 cm^{-1}, and the spectral data underwent pre-processing steps: 1) conversion of transmittance data into absorbance, 2) smoothing using a second-order Savgol filter (Savitzky-Golay algorithm), and 3) normalisation and mean-centering. After these preparations, we constructed the PLS-DA model to discriminate the ivory and bone.

To validate the PLS-DA model, we tested it using two FTIR datasets from ivory (data also sourced from a previous study) [29]. Furthermore, the model was used for external blind validation with carving FTIR spectra identical to ivory and bone. All PLS-DA analyses were performed using MATLAB R2020b, equipped with PLS Toolbox 8.2.

2.7. DNA analysis for the identification of carving's origin

Based on the PLS-DA results, we analysed the DNA to identify the biological source of the carvings (i.e., species identification). Samples for DNA extraction were collected from carvings, as detailed in section 2.3.

2.7.1. Decalcification

Approximately 150 mg of powdered samples were obtained from the carvings for the decalcification process. To accomplish this, 700 µl of EDTA (0.5 M, pH 8.0) was added to the samples and incubated in an Eppendorf thermomixer at 58°C with shaking at

600 rpm. The EDTA was replaced with fresh EDTA every hour to effectively remove chelated calcium ions, with a total incubation time of 12 hours. After the final incubation, the EDTA was completely removed, and DNA was extracted from the decalcified pellet.

2.7.2. DNA extraction

We performed DNA extractions on the decalcified pellet using the QIAamp DNA Investigator Kit (catalogue number: 56504), following the manufacturer's instructions with minor modifications to the lysis step. The extracted DNA was then quantified using a NanoDrop spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific Inc., Massachusetts, United States), and stored at –20°C for future use.

2.8. Polymerase chain reaction (PCR) and DNA sequencing

To identify the biological source of the carvings, we amplified partial fragments of the mitochondrial genes 12S ribosomal RNA (12S rRNA) and 16S ribosomal RNA (16S rRNA) using reported universal primers [34], *viz*. 12S rRNA, F: 5'-CCCAAACTG GGATTAGATACCC-3', 5'-GTTTGCTGAAGATG GCGGTA-3'; 16S rRNA, F: 5'-GCCTGTTTACCA AAAACATCAC-3', 5'CTCCATAGGGTCTTCTC GTCTT-3'. PCR experiments were performed in 25µL reaction, with 12.5µL IX red dye master mix (Ampliqon, $MgCl_2$ 1.5 mM and 2.0 mM Taq DNA polymerase), 10 pM of each primer, 20 ng DNA and final volume adjusted with RT-PCR grade water (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific). The PCR reaction was conducted using a thermocycler (Eppendorf Private Limited, Hamburg, Germany) with a total of 35 cycles. The PCR conditions were as follows: for the 12S rRNA, the settings were 95°C for 5 minutes, followed by 95°C for 45 seconds, 60.8°C for 1 minute, and 72°C for 1 minute, with a final extension at 72°C for 10 minutes. For the 16S rRNA, the conditions were 95°C for 5 minutes, then 95°C for 20 seconds, 60.5°C for 25 seconds, and 72°C for 32 seconds, and a final extension for 72°C for 10 minutes. After completing the PCR, the amplicons were analysed on a 2% agarose gel; then the PCR amplicons were extracted using a QIAquick Gel Extraction Kit (catalogue number 28704) following the manufacturer's protocol. Subsequently, the amplicons were sequenced bidirectionally using an Applied Biosystems 3500 Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, United States).

2.9. DNA sequencing results, BLAST analysis and phylogenetic construction

The raw DNA sequences (12S rRNA and 16S rRNA) were examined for quality, errors, miscalls, and background noise. Subsequently, gene-wise concatenated sequences were generated, and these resulting sequences were then analysed using the basic local alignment search tool (BLAST) on the NCBI database to identify the species. Based on the BLAST results, we retrieved the following 12S rRNA and 16S rRNA DNA sequences from NCBI: *Bubalus bubalis*_ NC_049568.1, *Bos indicus*_NC_005971.1, *Bos taurus*_NC_006853.1, *Axis porcinus*_12s_JN632600.1, *Rusa unicolor*_OR077747.1, *Axis axis* _OR143296.1. Additionally, we also used DNA sequences from our internal genomic repository.

For the phylogenetic analysis, all DNA sequences were aligned using ClustalW multiple alignments in BioEdit (version 7.7). Based on the Bayesian information criterion (BIC) score, we identified the best-fit models: for 12S rRNA, T92 = Tamura 3-parameter + G + I and TN93 + G; for 16S rRNA, GTR + G + I, respectively. Phylogenetic trees were constructed using the maximum likelihood (ML) method in MEGA 11.0 with default parameters, and the consistency of the internal branches was tested through 1,000 bootstrap replications.

3. Results and discussion

Wildlife forensic laboratories frequently receive several samples for analysis (e.g., tissue to carvings). Through conventional forensic analysis (amplification of the partial fragments of the mitochondrial genes or morphometric analysis), it is very difficult to identify the taxonomic origin. Most of the time, the samples received for forensic analysis are below the average quality, and getting amplifiable DNA from the samples has become more challenging for forensic professionals. Another important issue in forensic analysis is discrimination between genuine wildlife articles and counterfeit ones; nowadays, numerous items are mimicked as originating from wild animals, using chemical composition or materials from domestic animals. Therefore, it is crucial to develop methods to address these challenges and accurately identify the taxonomic origin of the samples. Accurate identification will enable effective legislative action and support conservation efforts for endangered species.

3.1. FTIR spectroscopy, PLS-DA analysis and IR spectral library examination for the identification of carvings origin

The current study aimed to identify the origin of ivory using FTIR spectroscopy combined with chemometrics analysis. Initially, the carvings were analysed through FTIR spectroscopy, and their spectra were visually examined and compared to known FTIR spectra of ivory, which served as a reference. The results indicated that out of seven carvings, five carvings' (S1–S4 and S7) spectral patterns and wavenumbers (1732 cm^{-1}, 1445 cm^{-1}, 1283 cm^{-1}, 1020 cm^{-1}, 883 cm^{-1}, 801 cm^{-1}, and 744 cm^{-1}) did not match with the internal ivory reference peaks at 1658 cm^{-1}, 1547 cm^{-1}, and 1242 cm^{-1}, which are attributed to proteins in ivory. The peaks at 1453 cm^{-1}, 1027 cm^{-1}, 965 cm^{-1}, 871 cm^{-1}, and 600 cm^{-1} correspond to hydroxyapatite in ivory [29] (Fig. 2a and 2b). The results confirmed that these carvings (S1–S4 and S7) were not ivory-made. To further investigate the materials used in these carvings we utilised a commercially available infrared (IR) reference library. The findings indicated that sheet molding compounds (consist of a mixture of glass fiber, epoxy resin, curing agents, thickening agents, calcium carbonate, bentonite and other additives) [35] and polymers were used in their crafting (Supplementary information 2).

In contrast, the FTIR spectra for two carvings (S5 and S6) were identical to ivory. However, minor variations were observed in the amide-III region (Fig. 2b). Nevertheless, visual examination of the spectra may introduce observer bias. To address this, we further confirmed our findings with our internal FTIR spectral library for bone (due to ivory and bone having similar chemical compositions and frequently being used as a substitute for ivory) [3, 36, 37]. The results suggested that we could not visually distinguish the FTIR spectral variations between ivory and bone, preventing us from determining whether carvings S5 and S6 were made from bone or ivory. To overcome this issue, we employed the PLS-DA analysis to ascertain the material used in crafting these two carvings.

In Fig. 3, the results of the PLS-DA analysis are presented, including the loading plot in Fig. 3d, which displays the latent variable (LV) scores for ivory, bone (used as internal references), and carvings (S5 and S6). We observed variations in infrared (IR) absorption in the range of 2000 cm^{-1} to 500 cm^{-1}, which are attributed to chemical compositions

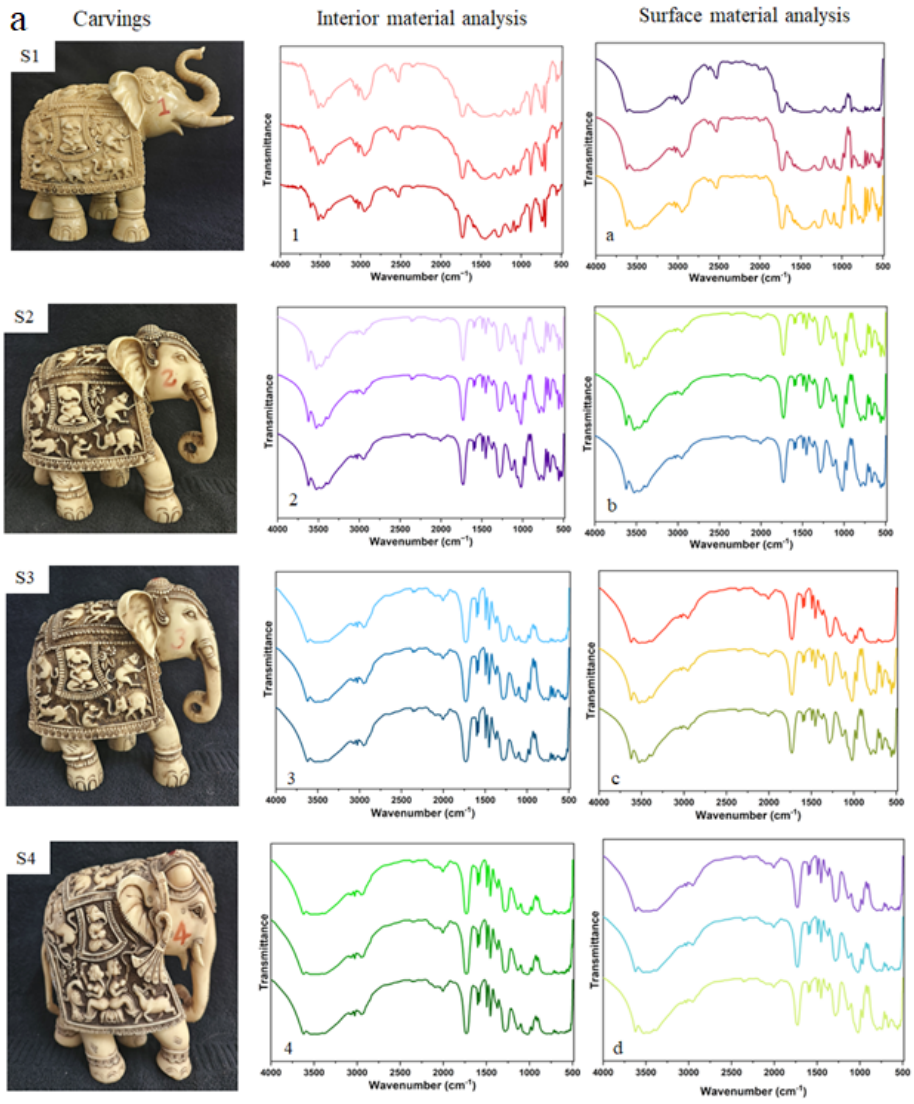


Fig. 2a. FTIR analysis of carvings: S1–S4 carvings suspected for ivory; interior materials analysis (1–4); surface materials analysis (a–d). All the analyses were performed in triplicate.

such as proteins and hydroxyapatite found in bone, ivory, and carvings. Based on these IR absorption variations, the PLS-DA model successfully discriminated the samples into two distinct groups: bone and ivory (as shown in Fig. 3a). The PLS-DA model achieved a high level of accuracy, with an R-square value of 0.98 for calibration and demonstrated 100% accuracy in distinguishing between ivory and bone samples. The PLS-DA model was then validated using two ivory datasets, with the results shown in Fig. 3b. The validation data was grouped as ivory and achieved an R-square value of 0.93. This R-square value confirms the robustness of the PLS-DA model in predicting and differentiating between ivory and bone. Additionally, we used datasets from carvings (S5 and S6) for blind and external validation. The results in Fig. 3c showed that the carving datasets (S5 and S6) were classified as bone samples. This result indicates that the carvings (S5 and S6) were likely crafted from bone material, not ivory. Overall, FTIR spectroscopy combined with PLS-DA analysis showed that among the seven carvings, carvings S1–S4 and S7 were made from sheet molding compounds and polymers. In contrast, carvings S5 and S6 were likely crafted from bone materials.

Furthermore, we reviewed the existing literature to understand the detailed chemical composition of ivory and bone, which are reported to have similar composition, and how these factors influence infrared (IR) absorbance [13, 38–42]. We found that the organic collagen matrix in ivory is complex, that the mineral apatite crystals it contains are non-spherical, and that the hydroxyapatite crystals in ivory are smaller than those found in other types of dentine and bone. This unique chemical property makes ivory finer and denser than bone or other teeth due to its distinct hydroxyapatite matrix, chemical composition, and variations in its growth, formation, and structure.

Next, a study conducted by Vollrath et al. [3] reported that bones have a higher mineral content and lower water content compared to ivory, leading to differences in their mechanical properties. In ivory, fibrous collagen material helps to bridge cracks, contributing to its structural integrity. In contrast, bones have a complex structure composed of osteons, which enhance toughness by acting as barriers to crack propagation. Overall, ivory's hierarchical and highly organised microstructure makes it an anisotropic material, meaning its properties vary in different directions. These unique characteristics set ivory apart from other materials, including shells, bones, plants, and artificial substances like celluloid and various plastics used as substitutes. Additionally, it has been confirmed that ivory can be identified

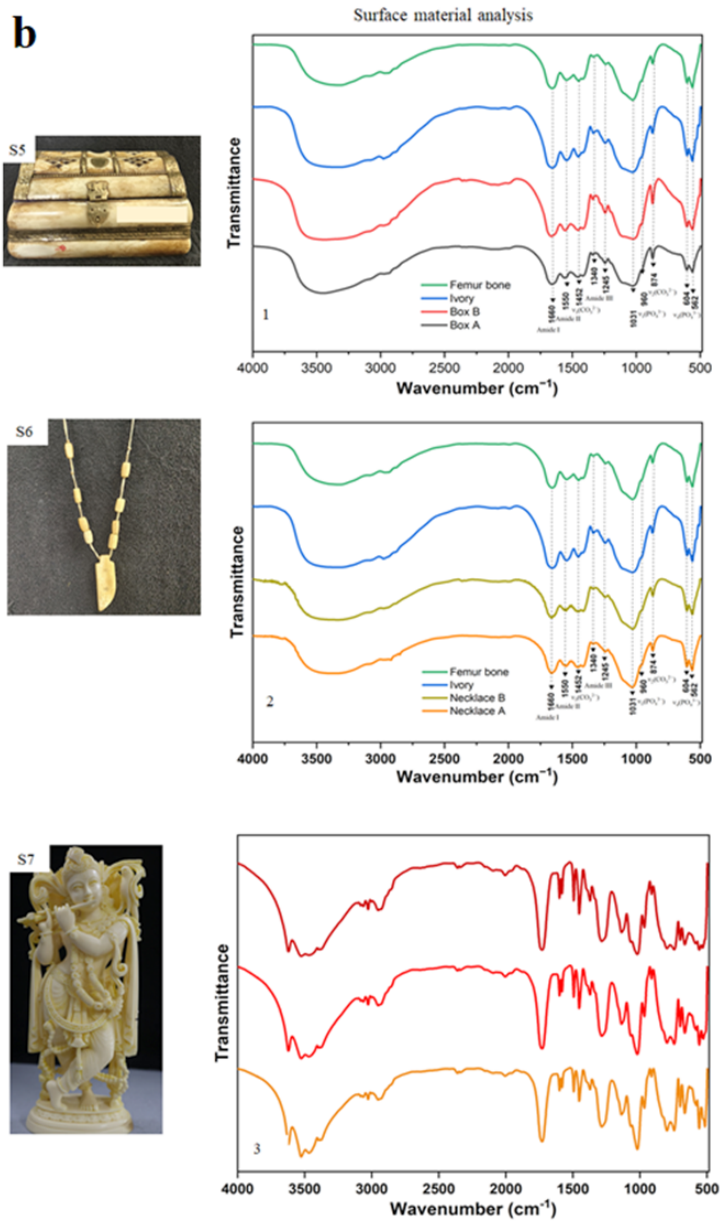


Fig. 2b. FTIR analysis of carvings S5–S7, carvings suspected for ivory, surface materials analysis (1–3). The FTIR spectra recorded for S5–S6 were identical to ivory and bone. (Box-A = samples from bottom, Box-B = samples from lid, Necklace-A = samples from tip, Necklace-B = Samples from ring). FTIR analysis for carving S7.

based on its chemical properties through FTIR spectroscopy combined with chemometric analysis. Ivory exhibits unique infrared absorption patterns, which can be utilised to identify ivory and its products.

3.2. DNA analysis to identify the biological origin of bone

The FTIR analysis indicated that carvings S5 and S6 were likely to be made from bone material. This prompted us to investigate the biological origin of the bone, which will also help identify if any wild animal bones were used in their creation. DNA was extracted from these carvings, and two RNA genes (12S rRNA and 16S rRNA) were amplified and sequenced. Initially, the BLAST analysis revealed that the carvings (S5 and S6) were identical to *Bubalus bubalis*, commonly known as the domestic water buffalo. The 12S rRNA showed 100% similarity for S5 and 92.98% for S6, while the 16S rRNA exhibited 98.75% similarity for S5 and 100% for S6 to *Bubalus bubalis,* respectively. Furthermore, the phylogenetic analysis indicated that carvings S5 and S6 demonstrated 100% bootstrap support with *Bubalus bubalis* for the 12S rRNA (Fig. 4). In contrast, the 16S rRNA showed 100% bootstrap support for S6 and 98% for S5 with *Bubalus bubalis* (Fig. 5). A pairwise comparison of nucleotides also confirmed the highest similarity with *Bubalus bubalis* (Supplementary information 3). Overall, this study effectively identified the carvings through FTIR spectroscopy combined with PLS-DA, and examination of the IR library. The results indicated that among the seven carvings, S1 to S4 were made from sheet molding compounds, carving S7 was made from a polymer, and carvings S5 and S6 were likely to be crafted from bone material derived from *Bubalus bubalis*. Furthermore, it was confirmed that the carvings analysed do not contain any components from wild animal species.

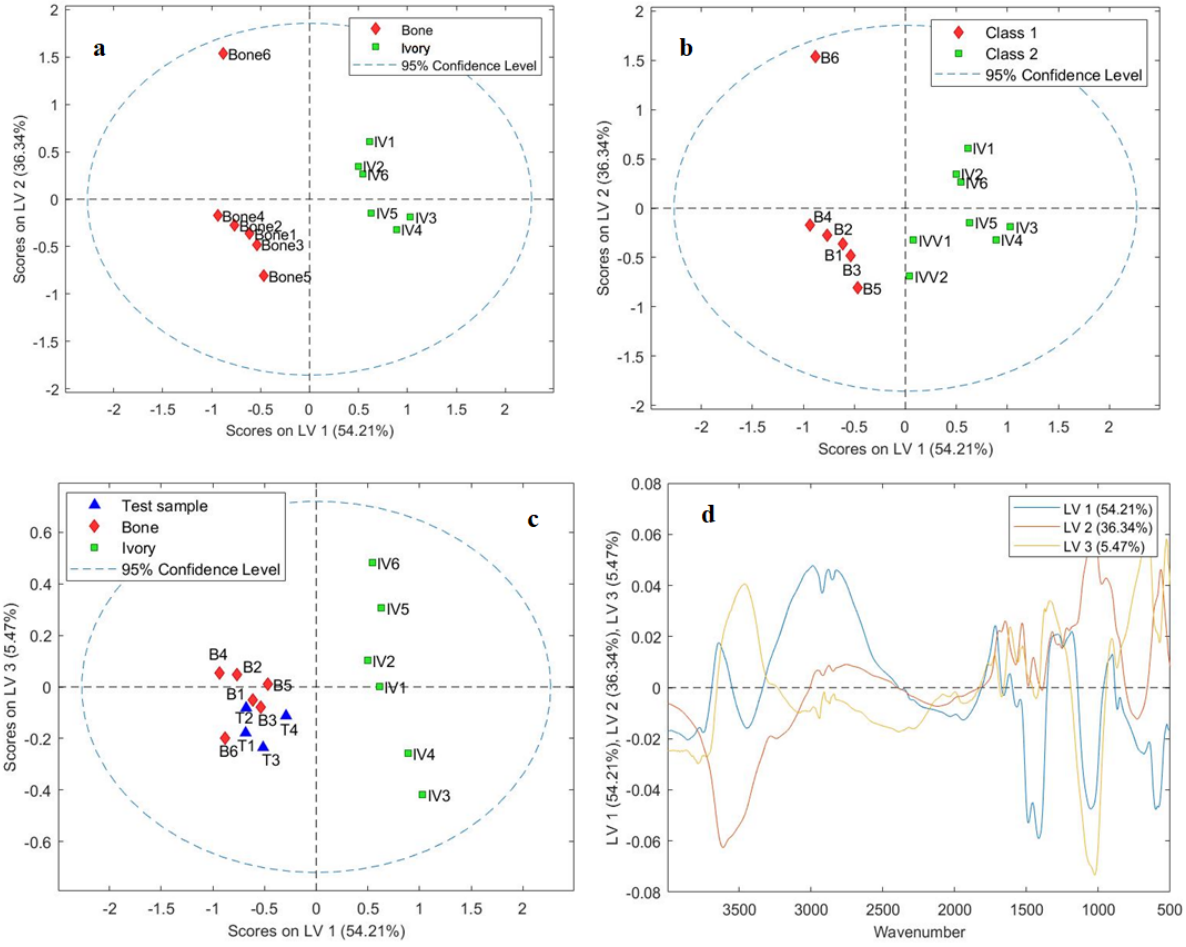


Fig. 3. PLS-DA analysis for the identification of carvings origin: a) score plot = ivory vs. bone; b) score plot for the validation of ivory samples; c) score plot for external validation (identification of carvings S5 and S6) (T1 = S5 from tip, T2 = S5 from ring, T3 = S6 from bottom, S6 = samples from lid); d) loading plot.

The results also indicated to wildlife forensic experts that a combination of techniques is essential for identifying carvings or objects that may contain wildlife articles.

3.3. Future perspective on developing an article-specific FTIR library to combat illegal trade

The UNODC *World Wildlife Crime Report 2024* documented that illegal trade in protected species is increasing globally, with nearly all species diversity recorded in seizures [2]. The report also indicated that one of the demand sectors for wildlife articles listed amongst others, is *exclusive market in goods for adornment, display and demonstration of status*. In light of this, wildlife articles are used for the above-mentioned purposes and are subjected to various physical/chemical treatments to alter their original structure or are modified to get the desired visual appeal. This makes it challenging for forensic labs to identify whether suspected objects contain any wildlife products. Additionally, items made from domestic

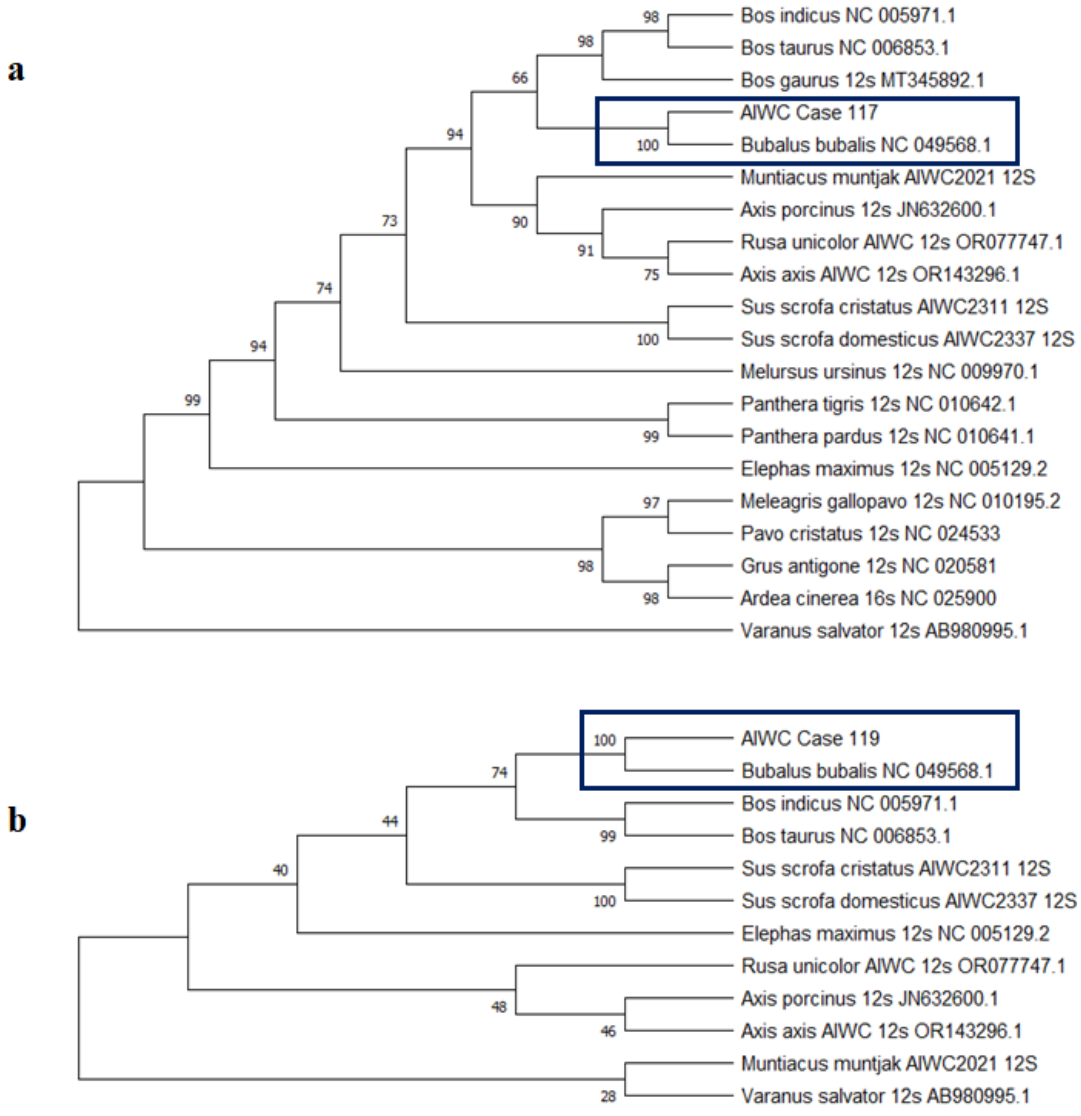


Fig. 4. The maximum likelihood phylogenetic trees were constructed using a partial mitochondrial 12S rRNA gene, amplified and sequenced from the carvings S5 and S6 and other wild animals, including Asian elephants, were obtained from AIWC in-house repository and NCBI. The results confirmed that the carvings were likely crafted using bone materials from *Bubalus bubalis.* a) AIWC Case 117 = carving S5 and b) AIWC Case 119 = carving S6.

animals are frequently used to imitate those from wild animals and different chemical compositions are often employed to create various products.

When modified articles such as carvings, paintings, and artefacts are received for forensic analysis, it is crucial to first screen them for possessing any biological or other materials. This preliminary screening helps reduce the costs, time, and workload associated with conventional forensic analysis. In previous work, we demonstrated the importance of developing an FTIR spectral library for ivory. In the current study, we showcased the practical forensic application of this FTIR spectral library to determine whether carvings are made from ivory. Our findings confirm that FTIR-based analysis allows for rapid, cost-effective, and minimally invasive examination (current study used KBr pellet). Therefore, this study advocates for the development of article-specific FTIR spectral libraries, which will address the following parameters: 1) identifying whether suspected articles originate from biological or non-biological sources, 2) using known FTIR spectra to identify suspected articles, and 3) applying chemometrics (especially PLS-DA) analysis to discriminate between articles that may have similar chemical compositions.

Conclusion

In wildlife forensic laboratories, identifying whether carvings are made from ivory through DNA analysis poses significant challenges. This study demonstrated a method for identifying ivory in carvings using FTIR spectroscopy combined with PLS-DA.

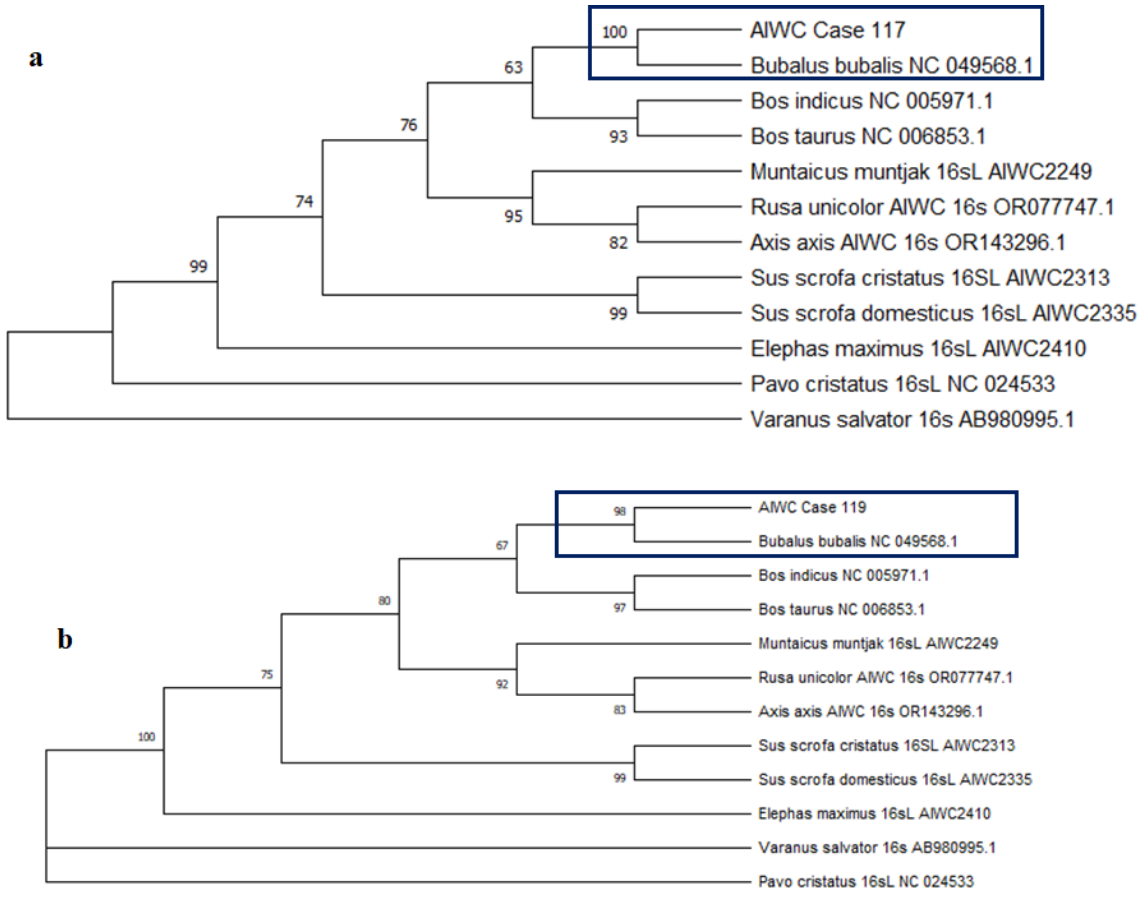


Fig. 5. The maximum likelihood phylogenetic trees were constructed using a partial mitochondrial 16S rRNA gene amplified and sequenced from the carvings S5 and S6 and other wild animals, including Asian elephants were obtained from AIWC in-house repository and NCBI. The results confirmed that the carvings were likely crafted using bone materials from *Bubalus bubalis.* a) AIWC Case 117 = carving S5 and b) AIWC Case 119 = carving S6.

The results showed that out of seven carvings, four (S1–S4) were made from sheet molding compounds, carving S7 was made from a polymer, and carvings S5 and S6 were likely to be crafted from bone material (further research is needed to confirm this). DNA analysis was used to identify the biological source of the bone, which was *Bubalus bubalis*. Overall, this study provides a simple, rapid, and cost-effective method for identifying the origin of carvings. Additionally, the findings suggest the potential for developing a specific FTIR spectral library, which could significantly enhance wildlife forensic analysis.

Data and materials availability

All the data were included in the article and the Supplementary information.

Informed consent statement

This study did not use any animal or human samples.

Conflicts of interest

The authors declare that they have no competing interests.

Funding

This study was funded by the Government of Tamil Nadu under the *Modernization of Forest Force* scheme.

Acknowledgements

The authors sincerely thank Ms. Prema Murugesan, Morphometry Laboratory at AIWC, for her valuable assistance with sample collection for FTIR analysis. We acknowledge Mr. Sasipriyan P., Junior Research Fellow, Centre for Conservation Education, AIWC, for documenting photographs of the carvings.

Contributions

SAJ and PS: data generation, formal analysis, and graph preparation. KR and UMR: molecular study. KBT: the idea and methodology development, data analysis, molecular study, original draft preparation, and supervision. CBA: DNA sequencing and manuscript editing. CB: chemometric analysis and manuscript editing. AU: manuscript editing and funding arrangements. All authors have read and approved the manuscript for publication.

Supplementary information 1

1. Development of FTIR spectral library for bone

1.1. Sample collection

To establish the spectral library for bone samples, we collected six bone samples (five bone samples from *Trachypithecus johnii* – specifically, one rib, two thigh bones, one elbow bone, and one vertebra – and one thigh bone from *Panthera tigris*) from the Morphometry Lab, Advanced Institute for Wildlife Conservation, Vandalur, Chennai, India. Prior to analysis, bone samples were wiped with 70% Isopropanol (AR grade) and air-dried for 5 to 10 minutes, and we drilled 5 to 10 mm in two different locations of the bones and collected the samples. For this study, we took 12 samples (6 bone samples × 2 sampling sites for each bone) and the FTIR analysis was performed as described below.

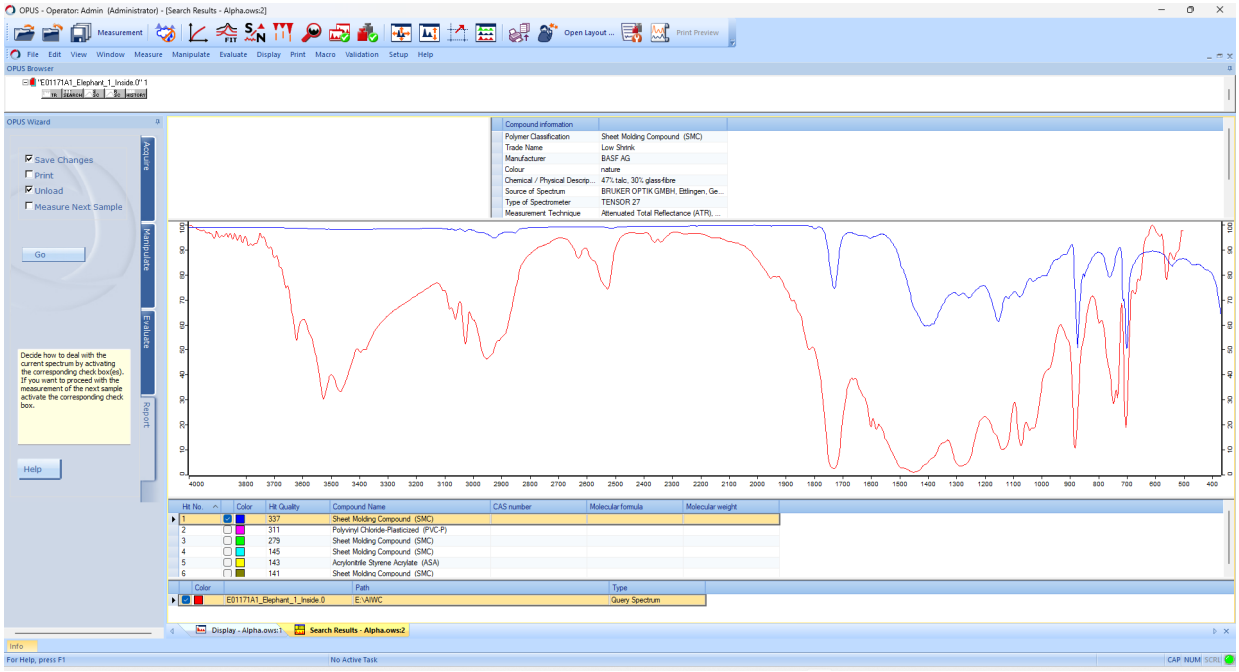
1.2. FTIR analysis

The FTIR spectra for all bone samples were recorded as described in Section 2.4. of the manuscript. For the development of the FTIR spectral library for bone, we recorded 12 FTIR spectra, which were used as internal references in the current study.

1.3. Chemometric analysis

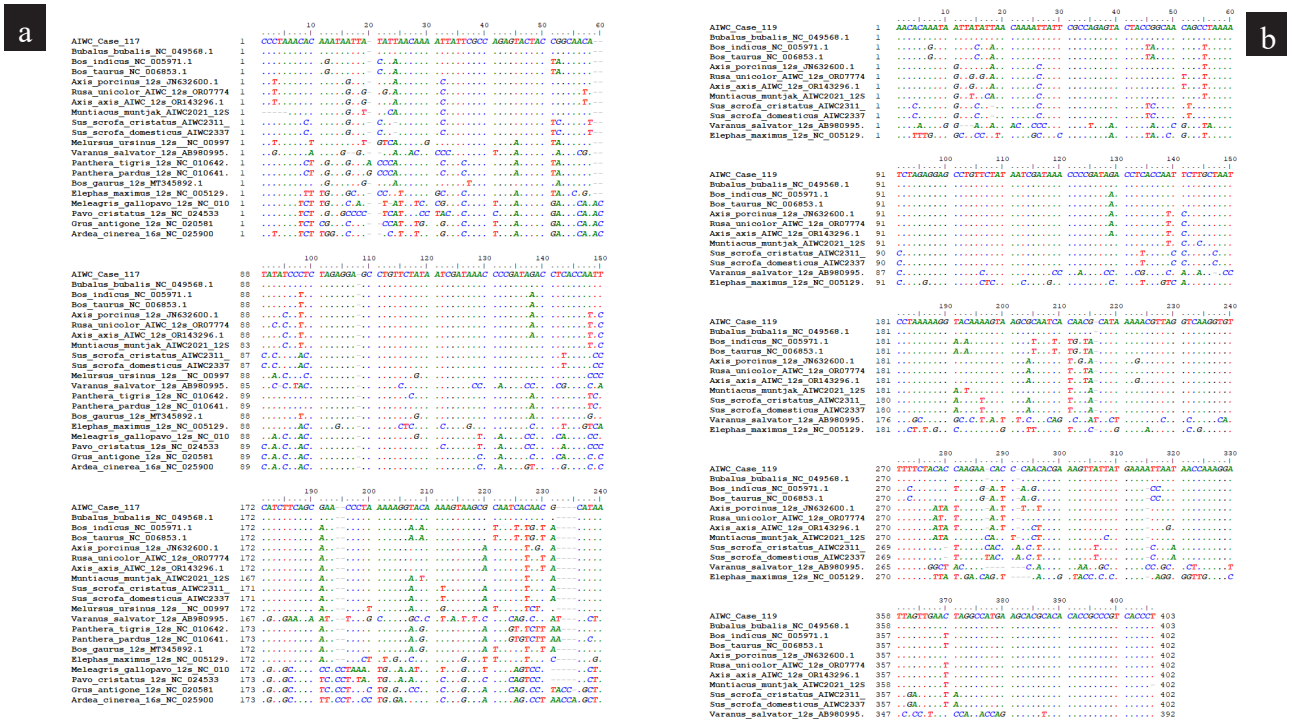
Before the chemometric analysis, 1) the sample spectra were averaged (2 spectra recorded for each sample) and 2) the transmission data were converted into absorbance. These six datasets were then utilized to construct the PLS-DA model as described in the manuscript.

Supplementary information 2



Suppl. Fig. 1. The FTIR spectra for carvings S1–S4 were similar; thus, we presented one representative result from the commercial IR library.

Supplementary information 3



Suppl. Fig. 2. A partial 12S rRNA gene was amplified from carvings S5 and S6 and compared pairwise nucleotides similarity. The results indicated the highest similarity to the *Bubalus bubalis*. a) AIWC Case 117 = carving S5 and b) AIWC Case 119 = carving S6.

Suppl. Fig. 3. A partial 16S rRNA gene was amplified from carvings S5 and S6 and compared pairwise nucleotides similarity. The results indicated that highest similarity to the *Bubalus bubalis*. a) AIWC Case 117 = carving S5 and b) AIWC Case 119 = carving S6.

References

1. Anagnostou M, Doberstein B. Illegal wildlife trade and other organised crime: a scoping review. Ambio. 2022 Jul;51(7):1615-31.
2. United Nations Office on Drugs and Crime (UNODC). World Wildlife Crime Report 2024: Trafficking in protected species [online]. Available from: https://www.unodc.org/documents/data-and analysis/wildlife/2024/Wildlife2024_Final.pdf.
3. Vollrath F, Mi R, Shah DU. Ivory as an important model bio-composite. Curator: The Museum Journal. 2018 Jan;61(1):95-110.
4. Su XW, Cui FZ. Direct observations on apatite crystals in ivory. Journal of Materials Science Letters. 1997 Jul;16(14):1198-200.
5. Su XW, Cui FZ. Hierarchical structure of ivory: from nanometer to centimeter. Materials Science and Engineering: C. 1999 May 1;7(1):19-29.
6. Lisa G. Erickson and Terry S. Gross. Exotic materials in the decorative arts: keys to the identification of ivory, Urban Chateau [online]. Available from: http://urbanchateau.com/library/articles/ivory.
7. Stiles D. The ivory trade and elephant conservation. Environmental Conservation. 2004 Dec;31(4):309-21.
8. Chase MJ, Schlossberg S, Griffin CR, Bouché PJ, Djene SW, Elkan PW, et al. Continent-wide survey reveals massive decline in African savannah elephants. PeerJ. 2016 Aug 31;4:e2354.
9. Rock K, Musing L. An overview of seizures of CITES-listed wildlife in the European Union. TRAFFIC. 2022.
10. Baker BW, Jacobs RL, Mann MJ, Espinoza EO, Grein G. Identification guide for ivory and ivory substitutes. WWF; 2020.
11. Espinoza EO, Mann MJ. The history and significance of the Schreger pattern in proboscidean ivory characterization. Journal of the American Institute for Conservation. 1993 Jan 1;32(3):241-8.
12. Singh RR, Goyal SP, Khanna PP, Mukherjee PK, Sukumar R. Using morphometric and analytical techniques to characterize elephant ivory. Forensic Science International. 2006 Oct 16;162(1-3):144-51.
13. Ábelová MA. Schreger pattern analysis of Mammuthus primigenius tusk: analytical approach and utility. Bulletin of Geosciences. 2008 Jan 1;83(2):225-32.

14. Corradini B, Gianfreda D, Ferri G, Ferrari F, Borciani I, Santunione AL, et al. Forensic species identification: practical guide for animal and plant DNA analysis. International Journal of Legal Medicine. 2024 Nov;138(6):2271-80.
15. Wasser SK, Mailand C, Booth R, Mutayoba B, Kisamo E, Clark B, et al. Using DNA to track the origin of the largest ivory seizure since the 1989 trade ban. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2007 Mar 6;104(10):4228-33.
16. Lee JC, Hsieh HM, Huang LH, Kuo YC, Wu JH, Chin SC, et al. Ivory identification by DNA profiling of cytochrome b gene. International Journal of Legal Medicine. 2009 Mar;123(2):117-21.
17. Gupta SK, Thangaraj K, Singh L. Identification of the source of ivory idol by DNA analysis. Journal of Forensic Sciences. 2011 Sep;56(5):1343-5.
18. Ewart KM, Lightson AL, Sitam FT, Rovie-Ryan JJ, Mather N, McEwing R. Expediting the sampling, decalcification, and forensic DNA analysis of large elephant ivory seizures to aid investigations and prosecutions. Forensic Science International: Genetics. 2020 Jan 1;44:102187.
19. Wasser SK, Wolock CJ, Kuhner MK, Brown III JE, Morris C, Horwitz RJ, et al. Elephant genotypes reveal the size and connectivity of transnational ivory traffickers. Nature Human Behaviour. 2022 Mar;6(3):371-82.
20. Ziegler S, Merker S, Streit B, Boner M, Jacob DE. Towards understanding isotope variability in elephant ivory to establish isotopic profiling and source-area determination. Biological Conservation. 2016 May 1;197:154-63.
21. Buddhachat K, Brown JL, Thitaram C, Klinhom S, Nganvongpanit K. Distinguishing real from fake ivory products by elemental analyses: A Bayesian hybrid classification method. Forensic Science International. 2017 Mar 1;272:142-9.
22. Shan W, Ming-zhe Z, Hui-zhen Y, Zhe C, Wen-xiu Y, Quan Z, et al. Ivory identification based on near infrared spectroscopy. Spectroscopy and Spectral Analysis. 2023 Aug 1;43(8):2397-406.
23. Edwards HG, Farwell DW. Ivory and simulated ivory artefacts: Fourier transform Raman diagnostic study. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy. 1995 Nov 16;51(12):2073-81.
24. Sharma CP, Sharma S, Sharma V, Singh R. Rapid and non-destructive identification of claws using ATR-FTIR spectroscopy–a novel approach in wildlife forensics. Science & Justice. 2019 Nov 1;59(6):622-9.
25. Sharma A, Verma R, Kumar R, Chauhan R, Sharma V. Chemometric analysis of ATR-FTIR spectra of fingernail clippings for classification and prediction of sex in forensic context. Microchemical Journal. 2020 Dec 1;159:105504.
26. Sharma CP, Sharma S, Singh R. Species discrimination from blood traces using ATR FT-IR spectroscopy and chemometrics: application in wildlife forensics. Forensic Science International: Animals and Environments. 2023 Dec 1;3:100060.
27. Jose SA, Thiyagarajan KB, Baskar C, Singh R, Vasanthakumari D, Udhayan A. Discrimination of mongoose hair from domestic cattle hair, human hair, and synthetic fiber using FTIR spectroscopy and chemometric analysis: a rapid, cost-effective, and field-deployable tool for wildlife forensics. RSC advances. 2024;14(50):36937-44.
28. Cartier LE, Krzemnicki MS, Gysi M, Lendvay B, Morf NV. A case study of ivory species identification using a combination of morphological, gemmological and genetic methods. Journal of Gemmology. 2020 Jul 1;37(3).
29. Ann Jose S, Thiyagarajan KB, Ganesan S, Chandrasekaran BA, Baskar C, Singh R, et al. Development of FTIR spectral library for the identification of Asian elephant ivory: an innovative approach in wildlife forensics. Discover Applied Sciences. 2024 Nov 2;6(11):586.
30. Su C, Xie Y, Wang B, Cui L, Liu B, Zhou Y, et al. A novel UPLC-based method to identify elephant and mammoth ivory. Scientific Reports. 2025 Feb 17;15(1):5810.
31. Gilbert C, Krupicka V, Galluzzi F, Popowich A, Bathany K, Claverol S, et al. Species identification of ivory and bone museum objects using minimally invasive proteomics. Science Advances. 2024 Jan 26;10(4):eadi9028.
32. Mariey L, Signolle JP, Amiel C, Travert J. Discrimination, classification, identification of microorganisms using FTIR spectroscopy and chemometrics. Vibrational spectroscopy. 2001 Nov 8;26(2):151-9.
33. Ballabio D, Consonni V. Classification tools in chemistry. Part 1: linear models. PLS-DA. Analytical methods. 2013;5(16):3790-8.
34. Kitano T, Umetsu K, Tian W, Osawa M. Two universal primer sets for species identification among vertebrates. International journal of legal medicine. 2007 Sep;121(5):423-7.
35. Wang J, Deng Z, Huang Z, Li Z, Yue J. Study on preparation and properties of bentonite-modified epoxy sheet molding compound. e-Polymers. 2021 May 4;21(1):309-15.
36. Hoelzig H, Muenster T, Blanke S, Kloess G, Garmasukis R, Koenig A. Ivory vs. osseous ivory substitutes – non-invasive diffractometric discrimination. Forensic Science International. 2020 Mar 1;308:110159.
37. Sharma CP, Bhatia D, Singh R. Ivory or bone? Discrimination using ATR-FTIR spectroscopy and chemometrics. Science & Justice. 2025 Apr 23:101261.
38. Martínez-Reina J, Domínguez J, García-Aznar JM. Effect of porosity and mineral content on the elastic constants of cortical bone: a multiscale approach. Biomechanics and modeling in mechanobiology. 2011 Jun;10(3):309-22.
39. Meyers MA, Chen PY, Lin AY, Seki Y. Biological materials: structure and mechanical properties. Progress in materials science. 2008 Jan 1;53(1):1-206.

40. Mkukuma LD, Skakle JM, Gibson IR, Imrie CT, Aspden RM, Hukins DW. Effect of the proportion of organic material in bone on thermal decomposition of bone mineral: an investigation of a variety of bones from different species using thermogravimetric analysis coupled to mass spectrometry, high-temperature X-ray diffraction, and Fourier transform infrared spectroscopy. Calcified tissue international. 2004 Oct;75(4):321-8.
41. Palmer LC, Newcomb CJ, Kaltz SR, Spoerke ED, Stupp SI. Biomimetic systems for hydroxyapatite mineralization inspired by bone and enamel. Chemical reviews. 2008 Nov 12;108(11):4754-83.
42. Palombo MR, Villa P. Schreger lines as support in the Elephantinae identification. The World of Elephants. Consiglio Nazionale Richerche, Roma. 2001 Oct:656-60.

ORCID
Kalaiyarasan Thiyagarajan 0000-0001-9211-4205

Corresponding author
Kalaiyarasan Thiyagarajan, Ph.D.
Advanced Institute for Wildlife Conservation
Tamil Nadu Forest Department
Vandalur, Chennai 600-048, India
email: t.biokalai@gmail.com

SZYBKA IDENTYFIKACJA GATUNKÓW ZA POMOCĄ FTIR I CHEMOMETRII W CELU ZWALCZANIA NIELEGALNEGO HANDLU

1. Wprowadzenie

W ostatnich latach dramatycznie wzrosła liczba przestępstw przeciwko dzikiej przyrodzie polegających na wykorzystywaniu różnorodnych gatunków do celów społecznych, w obrządkach religijnych i medycynie tradycyjnej oraz czerpaniu z nich innych korzyści finansowych [1]. Według raportu Biura ONZ ds. Narkotyków i Przestępczości (UNODC) z 2024 r. o przestępstwach przeciwko dzikiej przyrodzie popełnianych na całym świecie w latach 2015–2021 skonfiskowano wiele różnych gatunków, tj. koralowce (16%), krokodyle (9%), słonie (6%), małże (6%), drapieżniki (5%), papugi i kakadu (4%), storczyki (4%), żółwie morskie i lądowe (4%), węże (4%), palisandry (4%), żeń-szeń (3%), korzeń kostowca (3%), aloesy i inne liliowce (3%), kaktusy (3%), parzystokopytne (2%), jesiotry i wiosłonosowate (2%), pangoliny (2%), ślimaki morskie (2%), jaszczurki (2%), ptaki drapieżne (1%) i inne (16%). Raport podkreśla, że jednym z najbardziej dotkniętych przestępstwami tego typu gatunków są słonie (15% udział w standaryzowanym wskaźniku konfiskat) [2].

Kość słoniowa składa się z gęstej tkanki kostnej otoczonej szkliwem. W szczególności tworzą ją trzy elementy: materia organiczna (kolagen), minerały (hydroksyapatyt) i płyny (woda) [3]. Budowa ogólna sieci włókien organicznego kolagenu odpowiada za spójność mechaniczną i wytrzymałość kości słoniowej, dzięki czemu jest ona trwalsza niż drewno czy zwykła kość. Jest odporna na odłupywanie i pękanie, a także niszczeje bardzo powoli z upływem czasu [4, 5]. Z powodu tych właściwości kość słoniową od ponad tysiąca lat stosuje się do wytwarzania towarów zarówno praktycznych (np. broni, narzędzi), jak i estetycznych (np. parafernalia religijne, dzieła sztuki, dobra luksusowe) [6].

Posiadanie kości słoniowej i wykonanych z niej rzeźb (wszelkich produktów z kości słoniowej) jest często uznawane za symbol bogactwa i władzy. Doprowadza to do dużego zapotrzebowania na kość słoniową, co z kolei istotnie wpływa na zmniejszanie się populacji słoni z powodu kłusownictwa w celu uzyskania ich kłów [7, 8]. Załącznik I z 1973 i 1989 roku Konwencji o międzynarodowym handlu dzikimi zwierzętami i roślinami gatunków zagrożonych wyginięciem (*Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora*, CITES) zakazuje handlu międzynarodowego gatunkami słoni odpowiednio azjatyckich i afrykańskich [9]. Wielu handlarzy, motywowanych przez bodźce ekonomiczne i popyt, tworzy jednak falsyfikaty kości słoniowej ze zwykłych kości, substancji otrzymanych chemicznie i produktów roślinnych [3]. Trend ten komplikuje ściganie przestępców, ponieważ produkty wykonane z autentycznej kości słoniowej są trudne do odróżnienia wzrokowo od falsyfikatów. Powstaje więc pilna potrzeba opracowania trafnej, szybkiej i łatwej w użyciu metody identyfikacji produktów wykonanych z kości słoniowej.

CITES opublikowało „Przewodnik po identyfikacji kości słoniowej i jej substytutów", w którym zaleca stosowanie kilku technik identyfikacji, w tym badania morfologiczne, spektroskopię FTIR/Ramana i analizę DNA mitochondrialnego [10]. Metody morfometryczne, wykorzystujące kąty Schregera w kości słoniowej, mają ograniczone zastosowanie z powodu utraty trafności w przypadku próbek rzeźbionych lub uszkodzonych [11–13]. Jak dotąd za standard uznaje się identyfikację gatunków na podstawie analizy DNA [14], stąd też wiele prac wykorzystało tę metodę do identyfikacji kości słoniowej [15–19]. Analiza DNA ma jednak pewne wady, w tym duże koszty, długi czas przetwarzania i utrudnioną ekstrakcję DNA z towarów rzeźbionych z powodu jego denaturacji lub fragmentacji w trakcie wytwarzania [15]. Z drugiej strony w różnych pracach badano metody identyfikacji wykorzystujące składniki nieorganiczne kości słoniowej, takie jak analiza izotopowa, fluorescencja w promieniowaniu X, spektroskopia w bliskiej podczerwieni czy spektroskopia Ramana [20–23].

Spośród tych metod szczególnym zainteresowaniem w kontekście kryminalistycznej analizy dzikiej przyrody cieszy się spektroskopia FTIR dzięki szybkości, przenośności, niskim kosztom i przydatności do badań terenowych. W kilku pracach za pomocą FTIR zidentyfikowano gatunki na podstawie próbek sierści, krwi, pazurów, szponów itp. [24–28]. Innym autorom udało się również ustalić pochodzenie kości słoniowej w produktach potencjalnie z niej wykonanych [28]. Aby jednak poszerzyć praktyczne zastosowania FTIR w kryminalistycznej analizie dzikiej przyrody, należy koniecznie opracować bibliotekę IR obejmującą konkretne próbki, podobnie jak ma to miejsce w chemicznej bibliotece IR. Ułatwi to badania kryminalistyczne na dwa główne sposoby: 1) możliwość sprawdzenia, czy podejrzewane towary są pochodzenia biologicznego, 2) możliwość identyfikacji nieznanych próbek przez porównanie ze znanymi widmami FTIR. Jak dotąd bardzo niewiele artykułów skupiało się na tworzeniu wzorców FTIR na potrzeby analizy próbek dzikiej przyrody. W jednym z nich Jose i in. podają bibliotekę wzorców FTIR dla kości słoni azjatyckich i sierści mangusty, ale oprócz niego badania w tym zakresie są ograniczone [29].

Jednym z najpoważniejszych wyzwań w kryminalistycznej analizie dzikiej przyrody jest identyfikacja pochodzenia kości słoniowej w rzeźbach konfiskowanych przez organy ścigania. Wszystkie takie produkty siłą rzeczy jeszcze przed analizą kryminalistyczną przechodzą obróbkę różnymi metodami chemicznymi, co znacznie utrudnia ustalenie metodami konwencjonalnymi, czy zostały one wykonane z kości słoniowej, czy nie. W odpowiedzi na te problemy Su i in. przeprowadzili identyfikację kości słoniowej i mamuciej za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczowej, UPLC (ang. *ultra-performance liquid chromatography*) [30], a Gilbert i in. [31] – identyfikację gatunków na podstawie przedmiotów wykonanych z kości słoniowej i kości pochodzących z kolekcji muzealnej metodą protemiczną. Takie metody analityczne wymagają wysokiej klasy sprzętu i przygotowania próbek. Wymienione wady powodują potrzebę opracowania prostszych metod analizy skonfiskowanych produktów pod kątem zawartości kości słoniowej i innych materiałów.

Dlatego w niniejszej pracy zastosowano spektroskopię FTIR w połączeniu z analizą chemometryczną do analizy rzeźb podejrzewanych o zawieranie kości słoniowej. Kilka takich produktów otrzymał nasz Instytut od Agencji Ścigania Przestępczości z prośbą o ustalenie, czy wykonano je z kości słoniowej. Dokonano tego za pomocą następujących metod: 1) zarejestrowano widma FTIR produktów, a następnie porównano je z próbkami kości słoniowej i kości o znanych widmach, 2) przeprowadzono analizę PLS-DA w celu odróżnienia kości słoniowej od zwykłej kości (ponieważ oba materiały mają podobny skład chemiczny), 3) na podstawie komercyjnej biblioteki IR zidentyfikowano materiały niebiologiczne, które mogły znajdować się w badanych produktach.

2. Materiały i metody

2.1. Historia przypadku

Organy ścigania dostarczyły Zaawansowanemu Instytutowi Ochrony Dzikiej Przyrody (Wydział Leśnictwa Stanu Tamilnadu, Vandalur, Madras, Indie) siedem rzeźb (n = 7) z prośbą o ustalenie, czy wytworzono je z kości słoniowej (Ryc. 1). Wszystkie próbki były starannie zapakowane i zapieczętowane. Dołączono do nich formularz łańcucha dowodowego.

2.2. Badania wstępne

Analizę rozpoczęto od zmierzenia wysokości, szerokości i wagi wszystkich otrzymanych próbek (Tabela 1). Zastosowano spektroskopię FTIR w celu ustalenia, czy próbki były wykonane z materiałów biologicznych, czy chemicznych. Poniżej opisano metodę próbkowania użytą w ramach analizy FTIR.

2.3. Próbkowanie na potrzeby analizy FTIR

Przed próbkowaniem wszystkie rzeźby przetarto 70% izopropanolem (klasy AR) i pozostawiono do wyschnięcia na powietrzu na 5–10 minut. Użyto dwóch typów próbkowania w celu ustalenia, z jakich materiałów wykonano powłokę rzeźb i ich wnętrze: 1) powłokę zeskrobano za pomocą sterylnych ostrzy chirurgicznych (Glass Van), 2) próbki z wnętrza uzyskano, wiercąc otwory o średnicy od 7 do 15 mm (wiertło Bosch Professional 1 mm). Z powłoki rzeźb S1–S7 pobrano po dwie próbki z dwóch różnych miejsc. Rzeźby S1–S4 wiercono i pobrano po dwie próbki wnętrza z różnych miejsc. Rzeźby S5–S7 były bardzo cienkie, dlatego pobrano z nich tylko próbki powłoki. Ostatecznie uzyskano więc 22 próbki ($7 \times 2 = 14$ próbek powłoki i $4 \times 2 = 8$ próbek wnętrza). Wszystkie próbki zanalizowano metodą FTIR zgodnie z poniższym opisem.

2.4. Analiza FTIR

Przed analizą FTIR każdą próbkę zmielono sterylnym moździerzem na drobny proszek. Następnie dodano 1 g bromku potasu (KBr) (klasa spektroskopii IR, nr CAS: 7758-02-3), wymieszano i przygotowano 13-milimetrowe pelety KBr dla wszystkich próbek. Dodatkowo przygotowano pusty pelet KBr, niezawierający żadnej próbki, który stosowano jako pustą próbkę przed pomiarem widm. Analizę FTIR przeprowadzono za pomocą spektrometru Alpha II (Bruker Optics, Ettlingen, Niemcy) wyposażonego w kryształ ZnSe i wykrywacz DTGS (deuterowanego siarczanu trójglicyny). Początkowo zanalizowano pusty pelet KBr, otrzymując w ten sposób skan tła przed pomiarem widm próbek. Widma otrzymano w zakresie średniej podczerwieni (4000–500 cm^{-1}) przy rozdzielczości widmowej 4 cm^{-1}. Poszczególne próbki analizowano trzykrotnie, co dało razem 66 widm (42 widma z 14 próbek powłok i 24 widma z 8 próbek wnętrza). Po zanalizowaniu każdej próbki trzymak do próbek i akcesoria pomiarowe czyszczono acetonem (klasy AR), żeby zapobiec zanieczyszczaniu krzyżowemu materiału.

2.5. Ustalanie składu rzeźb na podstawie wewnętrznej biblioteki wzorców FTIR dla kości słoniowej i kości oraz komercyjnej biblioteki wzorców IR

Aby ustalić, czy rzeźby wykonano z kości słoniowej, poszczególne widma FTIR najpierw badano wzrokowo, zwracając szczególną uwagę na wzory widmowe i liczby falowe, a potem porównywano je z wewnętrzną biblioteką wzorców FTIR dla kości słoniowej [29]. Jeśli widmo FTIR danej rzeźby pokrywało się z widmem kości słoniowej, porównywano je z wewnętrzną biblioteką

wzorców dla kości. Było to o tyle istotne, że zwykła kość ma skład zbliżony do kości słoniowej i dlatego jest częstym jej zamiennikiem w rzeźbach [3] (proces opracowywania biblioteki wzorców FTIR dla kości przedstawiono w części Informacje uzupełniające 1). Następnie, jeśli widmo FTIR danej rzeźby i widmo z wewnętrznej biblioteki wzorców FTIR dla kości i kości słoniowej okazały się identyczne, za pomocą analizy chemometrycznej ustalano, czy rzeźbę tę wykonano z kości słoniowej, czy kostnych zamienników. Jeśli z kolei widmo FTIR rzeźby nie pokrywało się z widmem kości ani kości słoniowej, jej skład ustalano na podstawie komercyjnej biblioteki wzorców IR (biblioteka widm polimerowych kryształów ATR, Bruker).

2.6. Zastosowanie analizy chemometrycznej w celu odróżnienia kości słoniowej od zwykłej kości (z powodu ich zbliżonego składu chemicznego)

Badania pokazują, że spektroskopia FTIR w połączeniu z analizą chemometryczną, w tym analizą głównych składowych (*principal component analysis*, PCA) czy analizą dyskryminacyjną metodą cząstkową najmniejszych kwadratów (*partial least squares discriminant analysis*, PLS-DA), pozwala skutecznie rozróżniać gatunki na podstawie zmian absorpcji w podczerwieni związków chemicznych obecnych w próbkach [32, 33]. W niniejszym badaniu zastosowaliśmy model PLS-DA do wykrycia widm FTIR tych rzeźb, które były identyczne z widmami kości słoniowej i kości na podstawie różnicy w absorbancji IR, a tym samym ustalenia materiału, z którego próbki były wykonane.

Model PLS-DA skonstruowano za pomocą sześciu zestawów danych FTIR pozyskanych z kości słoniowej słoni azjatyckich (dane te pochodziły z naszej wcześniejszej pracy) [29] i próbek kości (Informacje uzupełniające 1). Następnie wybrano widmo FTIR w zakresie od 3500 cm^{-1} do 500 cm^{-1}, a dane widmowe poddano przetwarzaniu wstępnemu zgodnie z następującą kolejnością: 1) dane dotyczące przepuszczalności przekształcono na dane dotyczące absorpcji, 2) wygładzono za pomocą filtra Savgola drugiego rzędu (algorytm Savitzky'ego-Golaya), 3) znormalizowano i wycentrowano względem średniej. Po przetwarzaniu wstępnym skonstruowano model PLS-DA pozwalający odróżnić kość słoniową od zwykłej kości.

Model zwalidowano, sprawdzając go za pomocą dwóch zestawów danych FTIR dotyczących kości słoniowej (dane te pochodziły z naszej wcześniejszej pracy) [29]. Model ten wykorzystano również do zewnętrznej ślepej walidacji na podstawie widm FTIR identycznych z kością słoniową i kością. Wszystkie analizy PLS-DA przeprowadzono w programie MATLAB R2020b z dodatkiem PLS Toolbox 8.2.

2.7. Analiza DNA w celu ustalenia pochodzenia rzeźb

Na podstawie wyników PLS-DA zanalizowano DNA w celu ustalenia biologicznego źródła rzeźb (tj. w celu identyfikacji gatunku). Próbki do ekstrakcji DNA pobrano z rzeźb zgodnie z procedurą opisaną w części 2.3.

2.7.1. Dekalcyfikacja

Z rzeźb pozyskano sproszkowane próbki o wadze ok. 150 mg na potrzeby dekalcyfikacji, którą przeprowadzono, dodając do próbek 700 µl EDTA (0.5 M, pH 8.0), a następnie inkubując je w termomikserze firmy Eppendorf w temperaturze 58°C i przy prędkości wytrząsania 600 obr./min. Co godzinę wymieniano EDTA na świeży, żeby skutecznie usuwać chelatowane jony wapnia. Całkowity czas inkubacji wynosił 12 godzin. Po ostatniej inkubacji usuwano cały EDTA, a z dekalcyfikowanego peletu ekstrahowano DNA.

2.7.2. Ekstrakcja DNA

Do ekstrakcji DNA z dekalcyfikowanych peletów użyto zestawu QIAamp DNA Investigator (numer katalogowy 56504) zgodnie z zaleceniami producenta przy niewielkich modyfikacjach na etapie lizy. Następnie zliczano wyekstrahowane DNA za pomocą spektrofotometru NanoDrop (Thermo Fisher Scientific Inc., Massachusetts, USA) i przechowywano w temp. –20°C do dalszej analizy.

2.8. Reakcja łańcuchowa polimerazy (PCR) i sekwencjonowanie DNA

Aby zidentyfikować biologiczne źródło rzeźb, wzmocniono fragmenty genów mitochondrialnych 12S rybosomalnego RNA (12S rRNA) i 16S rybosomalnego RNA (16S rRNA) za pomocą raportowanych uniwersalnych starterów [35], tj. 12S rRNA, F: 5'-CCCAAACT GGGATTAGATACCC-3', 5'-GTTTGCTGAAGATG GCGGTA-3', 16S rRNA, F: 5'-GCCTGTTTACCAAA AACATCAC-3', 5'CTCCATAGGGTCTTCTCGTC TT-3'. Analizy PCR przeprowadzono w reakcji o objętości 25 µl, z użyciem 12,5 µl mieszanki barwnika IX red (Ampliqon, $MgCl_2$ 1,5 mM i 2,0 mM polimerazy DNA Taq), 10 pM każdego startera i 20 ng DNA, końcową objętość dostosowano wodą klasy RT-PCR (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific). PCR przeprowadzono za pomocą termocyklera (Eppendorf Private Limited, Hamburg, Germany). Zastosowano łącznie 35 cykli. Warunki PCR były następujące: w przypadku 12S rRNA – 95°C przez 5 minut, następnie 95°C przez 45 sekund, 60,8°C przez 1 minutę i 72°C przez 1 minutę oraz dodatkowo przez 10 minut na końcu w 72°C. W przypadku 16S rRNA warunki były następujące: 95°C przez 5 minut,

następnie 95°C przez 20 sekund, 60,5°C przez 25 sekund i 72°C przez 32 sekundy, oraz dodatkowo przez 10 minut na końcu w 72°C. Po zakończeniu PCR zanalizowano amplikony na 2% żelu agarozowym, po czym ekstrahowano za pomocą zestawu QIAquick Gel Extraction Kit (numer katalogowy 28704) zgodnie z zaleceniami producenta. Następnie amplikony zsekwencjonowano dwukierunkowo za pomocą analizatora genetycznego Applied Biosystems 3500 (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA).

2.9. Wyniki sekwencjonowania DNA, analiza BLAST i konstrukcja filogenetyczna

Badano surowe sekwencje DNA (12S rRNA i 16S rRNA) pod względem jakości, błędów, nieprawidłowych odczytów i szumu. Następnie wygenerowano sekwencje połączone według genów i poddano je analizie przy użyciu podstawowego narzędzia do wyszukiwania lokalnych dopasowań (*basic local alignment search tool*, BLAST) w bazie danych NCBI w celu identyfikacji gatunków. Wyniki analizy BLAST pozwoliły wyodrębnić następujące sekwencje DNA 12S rRNA i 16S rRNA z bazy NCBI: *Bubalus bubalis*_NC_049568.1, *Bos indicus*_NC_005971.1, *Bos taurus*_NC_006853.1, *Axis porcinus*_12s_JN632600.1, *Rusa unicolor*_OR077747.1, *Axis axis*_OR143296.1. Wykorzystano również sekwencje DNA z własnego wewnętrznego repozytorium genomowego.

Na potrzeby analizy filogenetycznej wszystkie sekwencje DNA dopasowano za pomocą narzędzia ClustalW do dopasowywania wielu sekwencji w programie BioEdit (wersja 7.7). Na podstawie Bayesowskiego kryterium informacyjnego (*Bayesian information criterion*, BIC) zidentyfikowano najlepiej dopasowane modele: T92 = Tamura 3-parameter + G + I i TN93 + G dla 12S rRNA oraz GTR + G + I dla 16S rRNA. Skonstruowano drzewa filogenetyczne metodą największego prawdopodobieństwa (*maximum likelihood,* ML) w programie MEGA 11.0 przy domyślnych wartościach parametrów. Spójność gałęzi wewnętrznych sprawdzano na podstawie 1000 replikacji bootstrapowych.

3. Wyniki i dyskusja

Laboratoria kryminalistyczne zajmujące się badaniem dzikiej przyrody często otrzymują kilka próbek do analizy (tkanki, rzeźby itp.). Ustalanie pochodzenia taksonomicznego za pomocą konwencjonalnych metod kryminalistycznych (amplifikacji fragmentów genów mitochondrialnych czy analizy morfometrycznej) jest bardzo trudne. W większości przypadków jakość próbek otrzymanych do analizy jest poniżej przeciętnej, a uzyskanie z nich DNA nadającego się do amplifikacji stanowi coraz większe wyzwanie dla kryminalistyków. Innym istotnym aspektem analizy kryminalistycznej jest odróżnianie autentycznych próbek dzikiej przyrody od falsyfikatów. Ostatnio pojawia się wiele towarów udających swoim składem chemicznym pochodzenie naturalne lub pochodzących od zwierząt domowych. Jest zatem niezwykle ważne, aby opracować metody pozwalające sprostać powyższym problemom i trafnie ustalać pochodzenie taksonomiczne próbek. Taka trafna identyfikacja umożliwi podjęcie działań legislacyjnych i wspomoże ochronę gatunków zagrożonych wyginięciem.

3.1. Spektroskopia FTIR, analiza PLS-DA i porównanie z biblioteką widm IR na potrzeby ustalania pochodzenia rzeźb

Celem niniejszej pracy było ustalenie pochodzenia kości słoniowej za pomocą spektroskopii FTIR połączonej z analizą chemometryczną. Analizę rozpoczęto od spektroskopii FTIR. Uzyskane widma siedmiu rzeźb badano wzrokowo i porównywano ze znanymi widmami FTIR kości słoniowej, które posłużyły za wzorce. Otrzymane wyniki wskazały, że wzory widmowe rzeźb S1–S4 i S7 oraz ich liczby falowe (1732 cm^{-1}, 1445 cm^{-1}, 1283 cm^{-1}, 1020 cm^{-1}, 883 cm^{-1}, 801 cm^{-1} i 744 cm^{-1}) nie pokrywały się z pikami w widmie kości słoniowej dla wzorca wewnętrznego, tj. 1658 cm^{-1}, 1547 cm^{-1} i 1242 cm^{-1}, które przypisuje się białkom zawartym w kości słoniowej. Piki przy 1453 cm^{-1}, 1027 cm^{-1}, 965 cm^{-1}, 871 cm^{-1} i 600 cm^{-1} odpowiadają hydroksyapatytowi w kości słoniowej [29] (Ryc. 2a i 2b). Wyniki potwierdziły, że rzeźby S1–S4 i S7 nie były wykonane z kości słoniowej. Rzeźby poddano dalszym badaniom z użyciem komercyjnej biblioteki wzorców IR. Otrzymane wyniki pokazały, że wykonano je ze związków chemicznych przeznaczonych do formowania arkuszy (tj. mieszanki włókna szklanego, żywicy epoksydowej, środków utwardzających, środków zagęszczających, węglanu wapnia, bentonitu i innych dodatków) [35] oraz polimerów (Informacje uzupełniające 2).

W przeciwieństwie do nich, widma pozostałych dwóch rzeźb (S5 i S6) były identyczne z kością słoniową, z wyjątkiem niewielkich różnic w paśmie Amide-III (Ryc. 2b). Badania wzrokowe widm mogą jednak wprowadzić błędy obserwatora. Dlatego uzyskane wyniki dodatkowo potwierdzono, porównując je z wewnętrzną biblioteką widm FTIR dla kości (ponieważ kość i kość słoniowa mają zbliżony skład chemiczny, przez co ta pierwsza jest częstym zamiennikiem tej drugiej) [3, 36, 37]. Stwierdzono, że badaniem wzrokowym widm FTIR nie udało się odróżnić kości słoniowej od kości, co z kolei nie pozwoliło ustalić, czy rzeźby S5 i S6 wykonano z kości słoniowej, czy zwykłej kości. Aby sprostać temu problemowi, materiał, z którego wykonano te dwie rzeźby, ustalano metodą PLS-DA.

Wyniki przedstawia Ryc. 3, w tym wykres ładunku czynnikowego na Ryc. 3d, pokazujący produkty macierzy dla zmiennej ukrytej (*latent variable*, LV) dla kości słoniowej, kości (stosowanej tu jako wzorce wewnętrzne) oraz rzeźb S5 i S6. Zaobserwowano różnice w absorpcji podczerwieni w zakresie od 2000 cm^{-1} do 500 cm^{-1}, odpowiadające składowi chemicznemu, np. białkom i hydroksyapatytowi obecnym w kości, kości słoniowej i rzeźbach. Na podstawie tych różnic w absorpcji IR model PLS-DA pozwolił na podzielenie próbek na dwie grupy: kość oraz kość słoniową (Ryc. 3a). Model PLS-DA wykazał się dużą trafnością (współczynnik determinacji R^2 dla kalibracji wyniósł 0,98), w tym 100% trafnością w odróżnianiu próbek kości słoniowej od próbek kości. Model PLS-DA następnie zwalidowano za pomocą dwóch zestawów danych dotyczących kości słoniowej. Wyniki walidacji przedstawiono na Ryc. 3b. Po pogrupowaniu danych walidacyjnych jako kość słoniową uzyskano R^2 o wartości 0,93, co potwierdziło solidność modelu PLS-DA w odniesieniu do przewidywania i odróżniania kości słoniowej od kości. Dodatkowo na podstawie zestawów danych uzyskanych z rzeźb (S5 i S6) do prób ślepych i walidacji zewnętrznej. Zgodnie z wynikami przedstawionymi na Ryc. 3c oba zestawy zostały zaklasyfikowane jako próbki kości. Wskazuje to, że rzeźby S5 i S6 prawdopodobnie wykonano z materiału kostnego, a nie kości słoniowej. Spektroskopia FTIR w połączeniu z analizą PLS-DA pokazała, że spośród siedmiu badanych rzeźb próbki S1–S4 oraz S7 wykonano ze związków chemicznych przeznaczonych do formowania arkuszy i polimerów. W przeciwieństwie do nich rzeźby S5 i S6 prawdopodobnie wykonano z materiału kostnego.

Dokonano również przeglądu literatury w celu ustalenia szczegółowego składu chemicznego kości słoniowej i kości, który według różnych badaczy jest podobny, i wpływu tych czynników na absorpcję w podczerwieni [13, 38–42]. Okazało się, że kryształy mineralnego apatytu zawartego w matrycy organicznego kolagenu w kości słoniowej są niesferyczne, oraz że zawarte w niej kryształy hydroksyapatytu są mniejsze niż te w innych typach zębiny i kości. Dzięki tej charakterystycznej matrycy hydroksyapatytowej, składowi chemicznemu oraz różnicom we wzroście, w powstawaniu i strukturze kość słoniowa jest drobniejsza i gęstsza niż kość i inne zęby.

Vollrath i in. [3] w swoim badaniu stwierdzili większą zawartość minerałów i mniejszą zawartość wody w kościach w porównaniu do kości słoniowej, co odpowiada za różnice we właściwościach mechanicznych pomiędzy tymi dwoma materiałami. Pęknięcia powstające w kości słoniowej są uzupełniane włóknistym kolagenem, zwiększającym jej spójność strukturalną. Natomiast kości mają skomplikowaną strukturę złożoną z osteonów, które zapobiegają rozprzestrzenianiu się pęknięć i w ten sposób wzmacniają wytrzymałość kości. Ogólnie rzecz ujmując, z powodu swojej zhierarchizowanej i ściśle zorganizowanej mikrostruktury kość słoniowa jest materiałem anizotropowym, tzn. wykazuje różne właściwości w zależności od kierunku. Te niepowtarzalne cechy wyróżniają kość słoniową spośród innych materiałów, w tym skorup, kości, materiałów roślinnych i sztucznych substancji stosowanych jako substytuty, takich jak celuloid czy różne tworzywa sztuczne. Dodatkowo potwierdzono, że kość słoniową można zidentyfikować na podstawie jej właściwości chemicznych przy użyciu spektroskopii FTIR i analizy chemometrycznej. Kość słoniowa wykazuje niepowtarzalne wzory absorpcji podczerwieni, na podstawie których można zidentyfikować ją oraz produkty z niej wykonane.

3.2. Analiza DNA jako sposób ustalania pochodzenia kości

Analiza FTIR pokazała, że rzeźby S5 i S6 były prawdopodobnie wykonane z materiału kostnego. Skłoniło to autorów niniejszej pracy do zbadania jego pochodzenia biologicznego, co pomogłoby też ustalić, czy rzeźby wykonano z kości zwierzęcych. Z obu rzeźb wyekstrahowano DNA, a dwa geny RNA (12S rRNA oraz 16S rRNA) zamplifikowano i zsekwencjonowano. Przeprowadzona w pierwszej kolejności analiza BLAST ujawniła, że rzeźby S5 i S6 były identyczne z gatunkiem *Bubalus bubalis*, znanym powszechnie jako wół domowy. 12S rRNA wykazało 100% podobieństwa do *Bubalus bubalis* w przypadku S5 oraz 92,98% podobieństwa w przypadku S6, a 16S rRNA – odpowiednio 98,75% oraz 100%. Ponadto analiza filogenetyczna wskazała na 100% zgodność bootstrapową rzeźb S5 i S6 z *Bubalus bubalis* dla 12S rRNA (Ryc. 4), podczas gdy dla 16S rRNA rzeźba S6 miała 100% zgodność bootstrapową, a S5 – 98% (Ryc. 5). Porównanie par nukleotydów również potwierdziło największe podobieństwo do *Bubalus bubalis* (Informacje uzupełniające 3). Podsumowując, w niniejszym badaniu skutecznie zidentyfikowano rzeźby przy użyciu spektroskopii FTIR w połączeniu z analizą PLS-DA i porównaniem do biblioteki IR. Uzyskane wyniki wskazują, że spośród siedmiu badanych rzeźb, rzeźby S1–S4 wykonano ze związków chemicznych przeznaczonych do formowania arkuszy, S7 – z polimeru, a S5 i S6 – prawdopodobnie z materiału kostnego pochodzącego z gatunku *Bubalus bubalis*. Co więcej, udowodniono, że badane rzeźby nie zawierały żadnych związków pochodzących od dzikich zwierząt. Wyniki dostarczają również ważnej informacji kryminalistykom zajmującym się analizą dzikiej przyrody, tj. wskazują, że połączenie różnych technik jest niezbędne do identyfikacji rzeźb lub innych przedmiotów mogących zawierać materiały pochodzenia zwierzęcego.

3.3. Perspektywy opracowania biblioteki widm FTIR konkretnych towarów w celu zwalczania nielegalnego handlu

Według raportu UNODC z 2024 r. na całym świecie wzrasta nielegalny handel gatunkami chronionymi, na co wskazują konfiskaty gatunków o ogromnej różnorodności [2]. Raport informuje również, że jednym z sektorów popytu na produkty pochodzące z dzikiej fauny i flory jest „ekskluzywny rynek towarów służących jako ozdoby, elementy wystawy i oznaki statusu". Dlatego produkty te wykorzystuje się do wyżej wymienionych celów i poddaje się różnym formom obróbki fizycznej i chemicznej, żeby zmienić ich pierwotną strukturę bądź w inny sposób je zmodyfikować i osiągnąć w ten sposób zamierzony efekt estetyczny. Utrudnia to laboratoriom kryminalistycznym wykrywanie zawartości dzikiej fauny i flory w badanych produktach. Co więcej, produkty pochodzące od zwierząt domowych często służą jako imitacje produktów pochodzących od zwierząt dzikich, a w samym procesie produkcji bierze udział wiele różnych składników chemicznych.

Po otrzymaniu do analizy kryminalistycznej towarów takich jak rzeźby, obrazy i inne wytwory kulturowe, bardzo ważne jest, żeby najpierw sprawdzić, czy nie zawierają one żadnych materiałów biologicznych lub innych. Taka wstępna analiza pozwala zmniejszyć wymiar czasu i pracy oraz koszty związane z konwencjonalnymi metodami kryminalistycznymi. W naszej poprzedniej publikacji pokazaliśmy, jak ważne jest stworzenie biblioteki widm FTIR dla kości słoniowej. W obecnym badaniu zademonstrowaliśmy praktyczne zastosowanie takiej biblioteki w celu ustalenia, czy rzeźby zostały wykonane z kości słoniowej. Otrzymane wyniki potwierdziły, że spektrometria FTIR to szybka, tania i prawie nieinwazyjna metoda analizy kryminalistycznej (w tym przypadku używano peletu KBr). Dlatego autorzy niniejszego badania sugerują tworzenie bibliotek gromadzących widma FTIR konkretnych produktów umożliwiających: 1) stwierdzenie, czy dane produkty pochodzą ze źródeł biologicznych, czy niebiologicznych, 2) identyfikację badanych artykułów na podstawie znanych widm FTIR, 3) stosowanie analizy chemometrycznej (zwłaszcza PLS-DA) w celu rozróżnienia produktów, które mogą mieć zbliżony skład chemiczny.

Wnioski

Ustalanie, czy dane próbki wykonano z kości słoniowej za pomocą analizy DNA stanowi poważne wyzwanie dla laboratoriów kryminalistycznych zajmujących się badaniami dzikiej przyrody. W niniejszym badaniu przedstawiono metodę identyfikacji kości słoniowej w rzeźbach wykorzystującą spektroskopię FTIR w połączeniu z PLS-DA. Otrzymane wyniki pokazały, że cztery spośród siedmiu analizowanych rzeźb (S1–S4) wykonano ze związków chemicznych przeznaczonych do formowania arkuszy, rzeźbę S7 – z polimeru, a rzeźby S5 i S6 prawdopodobnie wykonano z materiału kostnego (potwierdzenie tej obserwacji wymaga dalszych badań). Po zanalizowaniu DNA zawartego w próbce kości, okazało się, że pochodziła ona z gatunku *Bubalus bubalis* (wół domowy). Podsumowując, niniejsza praca dostarcza prostej, szybkiej i taniej metody ustalania pochodzenia rzeźb. Ponadto uzyskane wyniki sugerują możliwość stworzenia wyspecjalizowanej biblioteki widm FTIR, która potencjalnie znacznie usprawni analizę kryminalistyczną dzikiej przyrody.

Dostępność danych i materiałów

Wszystkie dane przedstawiono w artykule i w informacjach uzupełniających.

Oświadczenie o świadomej zgodzie

W badaniu nie wykorzystano próbek zwierzęcych ani ludzkich.

Konflikt interesów

Autorzy oświadczają brak konfliktów interesów.

Finansowanie

Badanie dofinansowano ze środków Rządu Tamilnadu w ramach programu „Modernizacja Służb Leśniczych".

Podziękowania

Autorzy pragną podziękować pani Premie Murugesan z Laboratorium Morfometrii w Zaawansowanym Instytucie Ochrony Dzikiej Przyrody za jej cenną pomoc przy poborze próbek do analizy FTIR. Autorzy dziękują też panu Sasipriyanowi P., młodszemu stypendyście i pracownikowi naukowemu w Centrum Nauczania o Ochronie Przyrody w Zaawansowanym Instytucie Ochrony Dzikiej Przyrody za udokumentowanie fotografii rzeźb.

Wkład

SAJ i PS: tworzenie danych, analiza formalna i przygotowanie wykresów. KR i UMR: badania molekularne. KBT: pomysł na badania, opracowanie metodologii, analiza danych, badania molekularne, sporządzenie pierwszej wersji manuskryptu i nadzór. CBA: sekwencjonowanie DNA i redakcja manuskryptu. CB: analiza chemometryczna i redakcja manuskryptu. AU: redakcja manuskryptu i pozyskanie dofinansowania. Wszyscy autorzy przeczytali manuskrypt i zgodzili się na jego publikację.