

Danuta Kowalczyk-Pecka\*

**WPŁYW RODZAJU CHELATU MIEDZI NA POZIOM AKUMULACJI  
METALU W TKANKACH MIĘKKICH I MUSZLACH *CEPAEA NEMORALIS*  
(*GASTROPODA: PULMONATA*)**

**THE EFFECT OF COPPER CHELATE TYPE ON THE LEVEL OF  
ACCUMULATION OF THIS METAL IN THE SOFT TISSUES AND  
SHELLS OF *CEPAEA NEMORALIS* (*GASTROPODA: PULMONATA*)**

**Słowa kluczowe:** *Cepaea nemoralis*, ślimaki, miedź, depozyt, EDTA, lizyna, chelat, bio-wskaźniki.

**Key words:** *Cepaea nemoralis*, snails, copper, deposit, EDTA, lysine, chelate, bioindicators.

*The survival and growth of snails depend on biotope type and on the concentration of pollutants. Analyzing bioaccumulation of pollutants in snail tissues provides information on the biological accessibility of these factors in the environment. The snails used in the study came from a natural population of the species *Cepaea (Cepaea) nemoralis* (Linnaeus, 1758), from a habitat with low human impact. The snails were fed for 90 days under laboratory conditions with a special medium supplemented with various amounts of copper from a salt solution, copper EDTA chelate and copper lysine chelate. Significant differences were found in the amount of copper deposited in the soft tissues, especially the hepatopancreas, compared to the shell, which reflects long-term exposure to pollutants. The snails assimilated more copper ions from the lysine chelate and the water solution of copper sulphate than from the EDTA chelate. Comparison of metal concentrations in the tissues of different groups of snails shows numerous differences, which depend on the testing methods used and on the types of pollutants occurring at the study sites. Analysis of metal content in various species of snails collected in their natural habitats has shown differences in accumulation of pollutants among phylogenetically related species, which could be the result of differences in metabolism and food preferences.*

---

\* Dr Danuta Kowalczyk-Pecka – Katedra Zoologii, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie, ul. Akademicka 13, 20-950 Lublin; tel.: 81 445 69 62; e-mail: danakp@wp.pl

## 1. WPROWADZENIE

Przypuszcza się, że *Gastropoda* wywierają silny wpływ na obieg pierwiastków w środowisku, przez zmianę dostępności makroelementów w lądowych ekosystemach. Wbrew pozorom istotności tego problemu niewiele jest dokładnych ilościowych badań, które dotyczą roli lądowych mięczaków w obiegu pierwiastków [Dallinger i in. 2001].

Analiza bioakumulacji polutantów w tkankach ślimaków dostarcza informacji o dostępności biologicznej tych czynników w środowisku. Selekcja naturalna faworyzuje te osobniki, które są w stanie przetrwać w stale wymagających warunkach przez wykazywanie różnych form tolerancji na zanieczyszczenia, prowadząc do tworzenia się lokalnych, zaadaptowanych populacji lub ekotypów [Beeby i Richmond 1991]. Dziedziczna tolerancja jest najefektywniej demonstrowana przez porównanie podmiotów nienarażonych na ekspozycję i pochodzących z populacji z różną historią ekspozycji. Dotychczas najlepiej opisane są genetyczne adaptacje na różne metale toksyczne wśród lądowych bezkręgowców: u stawonogów, pierścienic, prowadzone są prace z lądowymi mięczakami [Dallinger i in. 2001].

Miedź (Cu) dostaje się do ekosystemów różnymi drogami, m.in. wraz z herbicydami, fungicydami i moluskocydami oraz z zanieczyszczoną wodą. Minimalne stężenia miedzi są niezbędne do wzrostu organizmów. Zwłaszcza *Gastropoda* potrzebują dużych dawek miedzi jako składnika barwnika oddechowego – hemocyjaniny. Miedź jest podstawowym przejściowym metalem, który jest kofaktorem wielu enzymów takich jak oksydaza cytochromowa, dehydrogenaza alkoholowa [Soo-Kyung 2003]. Jednak w wysokich koncentracjach miedź jest toksyczna dla żywych komórek [Laskowski i Hopkin 1996a]. Ta toksyczność wynika ze szkodliwego działania reszt hydroksylowych tworzonych podczas cyklu redox w przemianach  $Cu^+$  i  $Cu^{2+}$ . *Gastropoda* narażone na wysokie stężenia miedzi wykazują spadek pobierania tlenu. Biologiczne ligandy, takie jak peptydy i proteiny, utrzymują homeostazę miedzi i chronią żywe komórki przed możliwym działaniem toksycznym dzięki mechanizmom wiążącym metal [Hammer 1986, Dallinger i in. 2001].

Najczęściej charakteryzowaną proteiną związaną z oddziaływaniem metali jest metalotioneina o niskiej masie molekularnej (6–10 kDa), bogata w cysteinę i wykazującą silne zdolności wiązania m.in. kadmu, cynku i miedzi [Soo-Kyung 2003].

Mięczaki z rodziny *Helicidae* są grupą roślinożerców, co sugeruje, że mogą być potencjalnymi gatunkami monitorującymi stan środowiska przyrodniczego. Ślimaki mogą bez negatywnych konsekwencji dla siebie asymilować metale ciężkie w dużej dawce. Obecność dziedzicznych mechanizmów tolerancji, takich jak zwiększona zdolność usuwania lub wiązania zanieczyszczeń, może być obecnie udowodniona jedynie przez badania porównawcze osobników z tą lub bez tej cechy. Zwierzęta wskaźnikowe są używane do mapowania biodostępności komponentów zanieczyszczeń z poszczególnych źródeł, ale raczej nie do oszacowania ich toksycznego znaczenia [Beeby i Richmond 2002].

Celem pracy była analiza wielkości depozytu miedzi w tkankach stopy i wątrobotrzustki oraz w muszlach dzikiej populacji ślimaków *Cepaea nemoralis* (*Gastropoda: Pulmonata*),

w zależności od rodzaju i wielkości suplementu diety podawanej w warunkach laboratoryjnych. Porównano akumulację miedzi w odniesieniu do chemicznej formy, w jakiej była podawana – w postaci roztworu siarczanu miedzi, w postaci chelatu z EDTA i chelatu z lizyną.

## 2. MATERIAŁ I METODY BADAŃ

Wykorzystane do badań ślimaki pochodziły z naturalnej populacji gatunku: *Cepaea* (*Cepaea*) *nemoralis* [Linnaeus 1758] – wstężyk gajowy (ślimak gajowy).

Ślimaki zebrano ręcznie z jednego siedliska o niskim stopniu antropopresji, o ograniczonym dostępie polutantów środowiskowych, w obrębie miasta Lublina (N51°14'06,3"; E22°33'25,3") z miejsc zarośniętych roślinnością ruderalną. Zbioru ślimaków wstężyków gajowych dokonano jednorazowo, w czerwcu 2008 r. Do badań wybierano osobniki o muszlach podobnej wielkości, co przy próbach środowiskowych może być pewną gwarancją zbliżonego wieku osobników. Muszla wstężyków gajowych miała średnio ok. 20 mm wysokości. Ślimaki po uprzednim dokładnym przemyciu wodą destylowaną, wkładano po 10 sztuk do perforowanych pojemników plastikowych o wymiarach 15x15x5 cm. Przez 90 dni badane ślimaki przetrzymywano w komorze fitotronowej (BIOGENET), w stałej temperaturze 15°C, przy zachowaniu stałej wilgotności 90%. Fotoperiod dobowy ustalono na 18h L/6h D. Jako środowiskową grupę kontrolną wykorzystano ślimaki zebrane bezpośrednio w terenie (10 sztuk), pozostawione na 48 godzin bez pokarmu, w celu oczyszczenia ich układu pokarmowego, a następnie zamrożone w temperaturze -25°C do dalszych analiz. Ślimakom doświadczalnym natomiast, podawano w warunkach laboratoryjnych raz w tygodniu przygotowany pokarm. Pożywka zawierająca ok. 5% suchej masy została spreparowana według następującej formuły [za Laskowski i Hopkin 1996b z modyfikacjami]: 1 g agaru (Difco), 3 g wysuszonego i sproszkowanego korzenia marchwi zwyczajnej (*Daucus carota* L.) oraz 0,5 g mleka w proszku (pełne 26% tłuszczu SM Siedlce) + 0,5 g otrębów pszennych, 0,01 g CaCO<sub>3</sub> (BDH Ltd, UK) zawieszano w wodzie redestylowanej do otrzymania 100 ml podłoża. Na jałowe płytki Petriego wylewano po 15 ml gotowego podłoża.

Grupy badawcze ślimaków otrzymywały raz w tygodniu pożywkę z dodatkiem jonów Cu<sup>2+</sup> pochodzących z roztworu siarczanu miedzi (CuSO<sub>4</sub>) – w stężeniu: 1; 2,5; 5; 15 i 30 ppm/ml pożywki (odpowiednio grupy oznaczone w pracy: Cu1; Cu 2,5; Cu 5; Cu 15; Cu 30). Kolejnym badanym pięciu grupom ślimaków podawano pożywkę z dodatkiem chelatu miedzi z EDTA, w stężeniach 1; 2,5; 5; 15 i 30 ppm/ml pożywki (odpowiednio grupy oznaczone w pracy: Cu+EDTA 1; Cu+EDTA 2,5; Cu+EDTA 5; Cu+EDTA 15; Cu+EDTA 30). Następnich pięć grup wstężyków otrzymywało raz w tygodniu pożywkę z dodatkiem chelatu miedzi z lizyną w stężeniach 1; 2,5; 5; 15; 30 ppm/ml pożywki (odpowiednio grupy oznaczone w pracy: Cu+Liz 1; Cu+Liz 2,5; Cu+Liz 5; Cu+Liz 15; Cu+Liz 30). Zwiększające się dawki suplementu w grupach badawczych oznaczono jako D (dawka) I – V; odpowiadające 1; 2,5; 5; 15; 30 ppm/ml pożywki.

Kontrolna laboratoryjna grupa ślimaków otrzymywała również raz w tygodniu pożywkę bez suplementów. Po 12 tygodniach żywienia w warunkach laboratoryjnych badane ślimaki pozostawiono na 48 godzin bez pożywki w celu oczyszczenia ich układu pokarmowego, a następnie zamrożono w temperaturze  $-25^{\circ}\text{C}$  do dalszych analiz. Próbkę tkanek (wątrobo-trzustki i stopy) i muszli ślimaków suszono przez 18 godzin w temperaturze  $80^{\circ}\text{C}$ , aż do uzyskania stałej suchej masy. Każda próba była ważona, następnie umieszczana w ilości ok. 200 mg w 5 ml 50%  $\text{HNO}_3$  i ostrożnie podgrzewana w bloku grzewczym w temperaturze  $80^{\circ}\text{C}$  przez 2 godziny i 2,5 godziny w  $210^{\circ}\text{C}$  w celu mineralizacji próby. Ostudzoną zawiesinę filtrowano (sączek Whatman 541) i uzupełniano do objętości 25 ml destylowaną, dejonizowaną wodą. Tej samej procedurze poddano podawaną ślimakom pożywkę z dodatkiem agaru.

Zawartość cynku analizowano metodą absorpcyjnej spektrometrii atomowej w Centralnym Laboratorium Analitycznym Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie. Do pracy, w celu wstępnego porównania depozytów metali, wyniki podawano w  $\mu\text{g}$  w przeliczeniu na g suchej masy tkanki i muszli ślimaków. Wartości średnie porównywano, wykorzystując test Tukeya.

### 3. WYNIKI I DISKUSJA

Zrozumienie taksonomicznych cech tolerancji na polutanty może pozwolić na ekstrapolację danych uzyskanych z gatunków modelowych do natywnych gatunków zasiedlających regiony narażone na zanieczyszczenia. Takie uogólnianie jest użyteczne w badaniach bioindykatorów, jeżeli brak taksonów wrażliwych na polutanty wśród lokalnych populacji może wskazywać na negatywne działanie metali. Różnice wielkości tolerancji na polutanty, których nie można wytłumaczyć powiązaniem filogenetycznym, mogą powstawać u organizmów blisko spokrewnionych na poziomie odpowiedzi komórkowej i molekularnej, pod wpływem poszczególnych czynników stresowych.

Istotna rola miedzi u *Pulmonata* sugeruje efektywną fizjologiczną regulację gospodarki tego metalu powodującą utrzymanie mniej więcej stałego poziomu miedzi w tkankach, niezależnie od drastycznie wzrastającego jej poziomu w środowisku, również za przyczyną zmniejszenia pobierania pokarmu, co stwierdzono dla np. *Siphonaria* [de Pirro 2005].

Liczne prace badawcze przyczyniają się do wyjaśnienia procesów bioakumulacji i dystrybucji metali w organizmach lądowych ślimaków. Jednak badania te nie zawsze dostarczają wystarczających wyjaśnień. Wiąże się to z różną dostępnością pierwiastków z obszaru, z którego próba jest pobrana i specyficznymi różnicami w wewnętrznym mechanizmie regulującym u poszczególnych gatunków. Badania lądowych mięczaków, zwłaszcza ślimaków, sugerują że różnice w akumulacji metali w ich miękkich tkankach zależą od rozmiarów ciała, wieku i pory roku. Z powodu ich skomplikowanego metabolizmu, szczegóły biochemicznych powiązań pomiędzy zawartością metali w ciele ślimaków i otaczającym środowiskiem nie są jeszcze dostatecznie poznane.

Prowadzone analizy miały na celu ocenę biodostępności miedzi podawanej w różnych dawkach i w różnych formach chemicznych, dla ślimaków z taksonu *Cepaea nemoralis*.

W tkankach stopy ślimaków największy depozyt miedzi odnotowano w grupach badawczych, którym podawano miedź w dawce 30 ppm/ml pożywki (D V), zarówno w postaci soli siarkowej, jak i w postaci chelatu z lizyną oraz EDTA (tab. 1).

**Tabela 1.** Porównanie depozytu miedzi w tkankach stopy *Cepaea nemoralis* po suplementacji pokarmu chelatami i siarczanem miedzi w różnych dawkach ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  s.m.)

**Table 1.** Comparison of deposit of cooper accumulated in foot tissues of *Cepaea nemoralis* after supplementation of food by the chelats and the sulphate of copper in different doses ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  D.W.)

Suplement	Tkanki stopy		
	$\text{Cu}^{2+}$	$\text{Cu}^{2+}+\text{Liz}$	$\text{Cu}^{2+}+\text{EDTA}$
D I'	96,53±2,45 <sup>a</sup>	92,36±4,65 <sup>a</sup>	75,05±2,02 <sup>b</sup>
D II	143,91± 5,78 <sup>a</sup>	166,61±8,54 <sup>b</sup>	145,56±4,99 <sup>a</sup>
D III	161,14±6,22 <sup>a</sup>	185,43±8,31 <sup>b</sup>	217,37±7,27 <sup>c</sup>
D IV	681,00±12,59 <sup>a</sup>	546,03±10,76 <sup>b</sup>	411,05±9,87 <sup>c</sup>
D V	657,53±11,97 <sup>a</sup>	606,00±12,33 <sup>ab</sup>	564,98±10,65 <sup>b</sup>

**Objaśnienia:** DI-DV dawki miedzi dodawane do pożywki – opisane szczegółowo w rozdziale Materiały i metody; wartości podano jako średnie ± odchylenie standardowe, n=10; wartości oznaczone różnymi literami w tym samym wierszu są znacząco różne (P<0,05). s.m. – sucha masa.

Zawartość miedzi w tym narządzie wzrastała niezależnie od formy podania w miarę zwiększania dawki miedzi dodawanej do pożywki. W kontroli środowiskowej depozyt miedzi wyniósł prawie 123  $\mu\text{g}$  Cu/g suchej masy, a w kontroli laboratoryjnej prawie 73  $\mu\text{g}$  Cu/mg suchej masy. Różnica depozytu miedzi w tkankach stopy grup kontrolnych może wynikać z wykorzystania zgromadzonego wcześniej metalu w naturalnych procesach fizjologicznych. Należy uwzględnić niską zawartość miedzi w pożywce wynoszącą 0,45  $\mu\text{g}$  Cu/g suchej masy. Porównując wchłanianość miedzi w tkankach stopy w zależności od formy podania, przy stężeniu 1 ppm (D I) i stężeniach najwyższych, tzn. 15 i 30 ppm (D IV i D V odpowiednio), stwierdzono, że najwięcej miedzi zgromadziło się po podaniu roztworu soli. Przy średnich dawkach stosowanych w doświadczeniu, tj. 2,5 i 5 ppm (odpowiednio D II i D III) depozyt miedzi był wysoki po podaniu metalu w chelacie z lizyną oraz z EDTA.

W tkankach wątrobotrzustki akumulacja miedzi w grupach badawczych, którym podawano miedź w dawce najniższej, tj. 1 ppm/ml pożywki w postaci chelatu z EDTA, była znacząco większa niż przy podaniu metalu wraz z lizyną lub w postaci roztworu soli (tab. 2). W próbach badawczych, w których podawano miedź w dawkach średnich D II (2,5 ppm) i D III (5 ppm), zarówno w postaci roztworu soli, jak i w chylatach, akumulacja miedzi była porównywalna, ok. 200  $\mu\text{g}$  Cu/g suchej masy. Wysoki poziom depozytu metalu stwierdzono w wątrobotrzustce mięczaków, którym podawano miedź w chelacie z lizyną w dawkach D IV

(15 ppm) i D V (30 ppm) oraz w dawce D V podawanego roztworu soli siarkowej. W kontroli środowiskowej akumulacja miedzi w gruczole trawiennym była rzędu prawie 207  $\mu\text{g Cu/mg}$  suchej masy, a w kontroli laboratoryjnej prawie 69  $\mu\text{g Cu/g}$  suchej masy tkanki.

Wielu autorów wskazuje na zdolności akumulacyjne oraz detoksyfikacyjne wątrobotrzustki w gospodarce metalami ciężkimi [Gomot i Pihan 1997], stężeniem metali w środowisku [Beeby i Richmond 2002] lub uwarunkowaniach laboratoryjnych [Gomot de Vauflery i Pihan 2000]. Obserwowano zależności liniowe pomiędzy koncentracją metali w tym narządzie, a często odnotowywano wielokrotnie większy depozyt metali w wątrobotrzustce niż w innych tkankach miękkich [Menta i Parisi 2001]. Porównując depozyt miedzi w ciele badanych *Cepaea nemoralis* stwierdzono, niezależnie od formy podania metalu, że różnice w ilości zmagazynowanej miedzi w tkankach stopy i wątrobotrzustki nie są zbyt duże (tab. 1 i tab. 2).

**Tabela 2.** Porównanie depozytu miedzi w wątrobotrzustce *Cepaea nemoralis* po suplementacji pokarmu chelatami i siarczanem miedzi w różnych dawkach ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  s.m.)

**Table 2.** Comparison of deposit of cooper accumulated in hepatopancreas of *Cepaea nemoralis* after supplementation of food by the chelats and the sulphate of copper in different doses ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  D.W.)

Suplement	Wątrobotrzustka		
	$\text{Cu}^{2+}$	$\text{Cu}^{2+}+\text{Liz}$	$\text{Cu}^{2+}+\text{EDTA}$
D I'	84,06 $\pm$ 3,54 <sup>a</sup>	79,88 $\pm$ 3,55 <sup>ab</sup>	90,92 $\pm$ 4,02 <sup>c</sup>
D II	211,08 $\pm$ 8,32 <sup>a</sup>	219,19 $\pm$ 9,01 <sup>a</sup>	179,52 $\pm$ 6,37 <sup>b</sup>
D III	225,38 $\pm$ 8,54 <sup>a</sup>	222,21 $\pm$ 8,56 <sup>a</sup>	221,64 $\pm$ 7,98 <sup>a</sup>
D IV	620,49 $\pm$ 13,02 <sup>a</sup>	858,91 $\pm$ 15,97 <sup>b</sup>	664,54 $\pm$ 12,33 <sup>ab</sup>
D V	955,05 $\pm$ 18,65 <sup>a</sup>	871,39 $\pm$ 16,54 <sup>b</sup>	724,23 $\pm$ 11,41 <sup>c</sup>

**Objaśnienia:** DI-DV dawki miedzi dodawane do pożywki – opisane szczegółowo w rozdziale Materiały i metody; wartości podano jako średnie  $\pm$  odchylenie standardowe, n=10; wartości oznaczone różnymi literami w tym samym wierszu są znacząco różne (P<0,05).  
s.m. – sucha masa

Wyniki te zdają się potwierdzać wcześniejsze obserwacje wyjątkowego mechanizmu eliminacji nadmiaru miedzi z organizmu *Gastropoda* [Laskowski i Hopkin 1996a]. Nie odnotowano ograniczania konsumpcji pożywienia wraz ze wzrostem stężenia miedzi dodawanej do pożywki. Zjawisko takie jest odnotowywane u ślimaków narażonych na działanie innych metali [Swalileh i Ezzughayyar 2001] i jest to traktowane jako forma obrony fizjologicznej przed intoksykacją.

Depozyt polutantów w muszlach ślimaków jest odbiciem długotrwałego narażenia organizmu na czynnik szkodliwy. Największą akumulację miedzi w muszlach, zaobserwowano dla grupy badawczej, której podawano miedź o stężeniu 30 ppm (D V) w postaci chelatu z EDTA (tab. 3). Wartość ta wyniosła ponad 17  $\mu\text{g Cu/g}$  suchej masy. Dopiero wysokie doświadczalne dawki suplementów podawanych w pożywce, tj. 15 i 30 ppm, mogły mieć zauważalny wpływ na poziom depozytu miedzi w analizowanych muszlach. Zawartość miedzi w kontroli środowiskowej i w kontroli laboratoryjnej była podobna – ok. 5  $\mu\text{g Cu/g}$  suchej masy.

**Tabela 3.** Porównanie depozytu miedzi w muszlach *Cepaea nemoralis* po suplementacji pokarmu chelatami i siarczanem miedzi w różnych dawkach ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  s.m.)

**Table 3.** Comparison of deposit of cooper accumulated in shells of *Cepaea nemoralis* after supplementation of food by the chelats and the sulphate of copper in different doses ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  D.W.)

Suplement	Muszla		
	Cu <sup>2+</sup>	Cu <sup>2+</sup> +Liz	Cu <sup>2+</sup> +EDTA
D I'	3,62±0,05 <sup>a</sup>	4,10±0,08 <sup>b</sup>	3,69±0,07 <sup>a</sup>
D II	5,35±0,11 <sup>a</sup>	7,42±0,26 <sup>b</sup>	7,03±0,19 <sup>b</sup>
D III	6,93±0,12 <sup>a</sup>	10,72±0,39 <sup>c</sup>	8,85±0,28 <sup>b</sup>
D IV	10,14±0,42 <sup>a</sup>	12,88±0,48 <sup>b</sup>	9,87±0,37 <sup>a</sup>
D V	12,32±0,56 <sup>a</sup>	13,41±0,62 <sup>b</sup>	17,09±0,85 <sup>c</sup>

**Objaśnienia:** DI-DV dawki miedzi dodawane do pożywki – opisane szczegółowo w rozdziale Materiały i metody; wartości podano jako średnie ± odchylenie standardowe, n=10; wartości oznaczone różnymi literami w tym samym wierszu są znacząco różne (P<0,05).  
s.m. – sucha masa

W badaniach dotyczących *Helix pomatia* i *H. aspersa* [Menta i Parisi 2001] stwierdzono biomagnifikację cynku, kadmu, żelaza w gruczole trawiennym, ale nie wykazano tego zjawiska dla miedzi. Po ekspozycji na różne dawki miedzi u *Helix aspersa* nie odnotowano zdecydowanej tendencji do akumulacji miedzi w wątrobotrzustce, *Helix pomatia* natomiast był zdolny do skutecznego eliminowania tego metalu z układu pokarmowego i z gruczołu trawiennego, co pozwalało na utrzymywanie stałego poziomu miedzi w tkankach.

Również Beeby i Richmond [2002] wnioskowali, że u ślimaków *Helix aspersa* brak korelacji pomiędzy stężeniem miedzi w tkankach a ilością tego metalu w środowisku. Ponadto spośród czterech badanych metali (Pb, Zn, Cd i Cu) – miedź najszybciej była eliminowana z tkanek. Podobne wnioski prezentował Dallinger i Wieser [1984] dodając, że wątrobotrzustka nie jest głównym miejscem gromadzenia miedzi u *Gastropoda*. Ponadto wydaje się, że *Helix* jest słabo wrażliwy na wahania stężenia miedzi.

Tolerancja ślimaków na wysokie dawki takich metali jak cynk (Zn) lub miedź (Cu) może być również wyjaśniona przez umieszczanie metali w pirofosforanowych granulach w komórkach wapiennych wątrobotrzustki. Hemocyjanina stanowi przejściowe miejsce wiązania nadmiaru miedzi, a także część jest wiązana przez matalotioneinę [Gomot i Pihan 1997]. Jednak tego typu granule nie zostały znalezione np. u *Helix aspersa*. Jeżeli tego typu granule są nierozpuszczalne, to ślimaki mogą być uznawane za detoksyfikatory a nie za potencjalne źródło rozprzestrzeniania wymienionych metali. Jednym z prawdopodobnych powodów efektywnego pobierania miedzi jest być może to, że w naturalnym środowisku metal ten występuje w koncentracjach zbliżonych do minimalnego zapotrzebowania żywieniowego tych zwierząt [Laskowski i Hopkin 1996a].

Wyniki badań własnych wskazują na zasadność analizowania depozytu miedzi jako polutanta środowiskowego raczej w tkankach miękkich, w doświadczeniach laboratoryjnych

trwających od czterech do ośmiu tygodni. Natomiast u ślimaków pochodzących bezpośrednio z prób środowiskowych oraz w doświadczeniach długoterminowych można wykorzystać do analiz depozytu metali również muszle.

#### 4. PODSUMOWANIE

W środowiskach, w których miedź jest uznawana za zanieczyszczenie i występuje w dużych ilościach i w różnych związkach chemicznych, staje się ona szczególnie toksyczna dla bezkręgowców zależnych od hemocyjaniny, np. dla rodzaju *Cepaea*. Związki chelatowe z zasady mają ułatwiać wchłanianie metali przez rośliny i zwierzęta. Wyniki przeprowadzonego doświadczenia wskazują, na podstawie określonego depozytu, większą przyswajalność miedzi podawanej w roztworze siarczanu, niż z chelatami tego metalu. Analizując jednak rezultaty, trzeba brać pod uwagę specyficzny sposób gospodarowania miedzią przez ślimaki należące do *Helicidae*, w tym różne mechanizmy eliminacji miedzi, wpływające na ostateczną wielkość depozytu w tkankach ślimaków. Możliwe, że miedź podawana w chelatach z lizyną i EDTA była równie efektywnie wchłaniana do tkanek badanych ślimaków jak metal pochodzący z roztworu soli, ale również efektywnie i szybko wykorzystywana w procesach fizjologicznych, co być może znalazło odbicie w końcowej wielkości depozytu miedzi.

W długo trwających doświadczeniach, polegających na analizie gromadzenia miedzi w tkankach ślimaków, można w celu wyjaśnienia tego zagadnienia wykonać okresowe frakcyjne analizy akumulacji metalu.

***Składam serdeczne podziękowania Panu mgr. Stanisławowi Pecce z Instytutu Żywności i Żywotności Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie za ogromną pomoc przy przygotowaniu tej pracy.***

#### PIŚMIENNICTWO

- BEEBY A., RICHMOND L. 1991. Adaptation of homeostatic mechanisms; lead assimilation and mineral metabolism in the snail *Helix aspersa* from a polluted ecosystem. In: Terrestrial and Aquatic Ecosystems. Perturbation and Recovery ed. Ravera O. Ellis Horwood, New York: 165–170.
- BEEBY A., RICHMOND L. 2002. Evaluating *Helix aspersa* as a sentinel for mapping metal pollution. *Ecological Indicators*. 1: 261–270.
- DALLINGER R., WIESER W. 1984. Patterns of accumulation, distribution and liberation of Zn Cu, Cd and Pb in different organs of the land snail *Helix pomatia* L. *Comparative Biochemistry and Physiology* 79C: 117–124.

- DALLINGER R., BERGER B., TRIEBSKORN-KÖHLER R., KÖHLER H. 2001. Soil biology and ecology. In: Biology of Terrestrial Mollusc ed. Barker G. CABI Publishing, Cambridge: 489–524.
- GOMOT A., PIHAN F. 1997. Comparison of the bioaccumulation capacities of copper and zinc in two snail subspecies (*Helix*). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 38: 85–94.
- GOMOT DE VAUFLEURY A., PIHAN F. 2000. Growing snails used as sentinels to evaluate terrestrial environment contamination by trace elements. *Chemosphere* 40: 275–284.
- HAMMER D., H. 1986. Metallothionein. *Annual Review Biochemistry* 55, 913–951.
- LASKOWSKI R., HOPKIN S.P. 1996a. Accumulation Of Zn, Cu, Pb and Cd in the garden snail (*Helix aspersa*): Implications for predators. *Environmental Pollution* 91: 289–297.
- LASKOWSKI R., HOPKIN S.P. 1996b. Effect of Zn, Cu, Pb and Cd on fitness In snails (*Helix aspersa*). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 34: 59–69.
- MENTA C., PARISI V. 2001. Metal concentrations in *Helix pomatia*, *Helix aspersa* and *Arion rufus*: a comparative study. *Environmental Pollution* 115: 205–208.
- DE PIRRO M., MARSHALL D.J. 2005. Phylogenetic differences in cardiac activity, metal accumulation and mortality of limpets exposed to copper: A prosobranch-pulmonate comparison. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 322: 29–37.
- SOO-KYUNG R., JIN-SUNG P., IN-SOOK L. 2003. Purification and characterization of a copper-binding protein from Asian periwinkle *Littorina brevicula*. *Comparative Biochemistry and Physiology* 134C: 101–107.
- SWAILEH K.M., EZZUGHYYAR A. 2001. Dose-dependent effects of dietary Pb and Zn on feeding and growth rate of the landsnail *Helix engaddensis*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 50: 9–14.