

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Katedra ekologie

Toxicita výsypkových substrátů a
možnosti jejího zmírnění

Spoil heap toxicity and possibilities
for remediation

Lenka Venclovská

Praha 2011

vedoucí diplomové práce:
Doc., Mgr., Ing. Jan Frouz, CSc.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem předkládanou práci zpracovala samostatně a použila jen uvedené prameny a literaturu. Současně dávám svolení k tomu, aby tato práce byla zpřístupněna v příslušné knihovně UK a prostřednictvím elektronické databáze vysokoškolských kvalifikačních prací v depozitáři Univerzity Karlovy a používána ke studijním účelům v souladu s autorským právem.

Dne 25. 04. 2011

Poděkování

Ráda bych poděkovala Doc., Mgr., Ing. Janu Frouzovi, CSc. za cenné rady a praktickou pomoc při zpracovávání mé diplomové práce. Dále také Jitce Weydové, která mi pomohla při zpracovávání odebraných vzorků a jejich vyhodnocení. V neposlední řadě i Ing. Aleně Lukešové, CSc. za konzultace a pomoc při odborné práci v laboratoři.

Abstrakt

Obsahem této diplomové práce je ověření možnosti zmírnění toxicity výsypkových půd na Sokolovsku pomocí vytvoření biologické krusty. Hlavní otázkou této práce bylo, zda je možné pomocí řas vytvořit na toxických substrátech biologickou krustu, která by mohla zlepšit vlastnosti substrátů a přispět tím k urychlení sukcese. Správnost této teorie byla ověřena pomocí 2 pokusů na toxických substrátech Sokolovských výsypek. Pomocí prvního laboratorního pokusu byly vybrány dva substráty, na kterých vyšší rostliny ve většině případů ani nenaklíčily. Proto byla ověřena možnost na takto fyto toxických půdách vytvořit biologickou krustu. Na tyto substráty (vápněné a nevápněné) byly následně v terénu aplikovány vybrané druhy řas a v průběhu 3 let pozorovány a vzorkovány. Na základě výsledků z fluorescenční mikroskopie jasně vyplývá, že jedinou řasou z testovaných, která na zvolených plochách přežila a vytvořila kompaktní viditelné krusty, byla řasa r. *Klebsormidium*. Bylo také prokázáno, že na vývoj biologických krust nemá vliv vápnění substrátů.

Abstract

The content of this diploma thesis is to verify of possibilities for remediation spoil heap toxicity in Sokolov area, by the help of creating biological crusts. The main question of this work is the possibility of using algae to create biological crust on toxical substrates, which could improve the properties of substrates and contribute to the acceleration of succession. The correctness of this theory was tested using two tests on toxic soils in spoil heaps near Sokolov. In the first test (laboratory test) have been chosen two of the soils and the higher plants, in most cases, even did not germinate.

That is why we decided to verify the second option to create biological crust in these phytotoxic soils. Therefore we applied selected kinds of algae in the field, some areas were liming, and the field has been monitoring and sampling during next three years. The results show that the application of dolomitic limestone does not affect progress of biological crusts. The result of the fluorescent microscopy clearly shows, that Klebsormidium algae was the only one of the tested algae, which survived and progressed compact visible crusts.

Obsah

1	Úvod	7
2	Literární přehled:	8
2.1	Těžba uhlí a její environmentální dopady	8
2.2	Toxicita výsypkových substrátů a její příčiny	10
2.3	Biologická krusta a její význam při rozvoji iniciálních ekosystémů	11
3	Materiál a metody	12
3.1	Materiál	12
3.2	Metody	15
3.2.1	Laboratorní pokus	16
3.2.2	Terénní pokus	16
4	Výsledky	19
4.1	Výsledky laboratorního pokusu	19
4.2	Výsledky terénního pokusu	21
4.2.1	Množství chlorofylu	21
4.2.2	Fluorescenční mikroskopie, odhad pokryvnosti a pH	24
5	Diskuse	32
6	Závěr	36
7	Literatura	37
8	Přílohy	44

1 Úvod

V České republice je uhlí, převážně hnědé uhlí, nejdůležitějším domácím energetickým zdrojem a i přes razantní útlum uhelného průmyslu po roce 1990 se podílí 62% na celkové produkci elektrické energie. Rozhodující část hnědého uhlí je využívána pro výrobu elektrické energie a tepla (Kryl, 2006).

Těžba uhlí ovšem přináší řadu environmentálních problémů. Jsou jimi především jevy ovlivňující poměry v krajině, jako je vznik nového reliéfu, změna stratigrafických poměrů, narušení hydrogeologických poměrů, devastace pedosféry, ovlivnění mikroklimatu a kvality ovzduší, v neposlední řadě i devastace biosféry (Szczepanska et al., 1998). Kromě těchto faktorů ovlivňujících poměry v krajině, jsou dalším negativem těžby rovněž recentní útvary, jako jsou zbytkové jámy a výsypky (Vráblíková et al., 2009). Jedním z nejvýznamnějších environmentálních problémů související se vznikem výsypek je toxicita substrátu. Položili jsme si tedy otázku, jakým způsobem je možné tuto toxicitu zmírnit.

Vzhledem k tomu, že biologické krusty patří k prvním souvislým porostům při spontánní sukcesi na toxických substrátech, bylo cílem této práce ověřit možnosti vytvoření biologických krust inokulací řas, sinic a vápněním. Cílem práce bylo zjistit, zda tyto zásahy mohou urychlit rozvoj biologických krust na toxických plochách, vytipovat druhy řas vhodných k inokulaci a ověřit technologickou reálnost inokulace.

Nejprve byly vybrány druhy, které by snášely extrémní podmínky na toxických plochách (Pietrasiak et al., 2011).

Sinice a řasy, které byly v pokusu použity, byly vybrány na základě předchozích průzkumů na výsypkách, s tím, že dobře snášejí extrémní podmínky. Na nich se podařilo identifikovat 56 druhů půdních řas a sinic, z toho 34 druhů zelených řas (Trochová, 1999; Lukešová, 2001). Na terénní pokus byly vybrány 3 druhy zelených řas a 1 druh sinic.

Dále jsme testovali, zda bude mít na růst společenstev vliv přítomnost vápence na toxických substrátech.

Terénní pokus by měl všechny kladené otázky zodpovědět a přispět tím částečně k pochopení a možnosti urychlení sukcesních pochodů, které

umožní obnovení lokalit po těžbě i bez rekultivačních opatření (Mudrák et al., 2010).

2 Literární přehled

2.1 Těžba uhlí a její environmentální dopady

Z porovnání objemů celosvětových zásob ropy, zemního plynu a tuhých paliv je zřejmé, že uhlí zůstane i z pohledu velmi dlouhé perspektivy důležitým energetickým zdrojem a jeho význam v celosvětovém měřítku, v porovnání se současností, naopak poroste (Valášek, 1998). Rozhodující část hnědého uhlí je využívána pro výrobu elektrické energie a tepla. Menší objem produkce je zpracován na tříděné uhlí pro obyvatelstvo, malé a střední spotřebiče (jako kotelny, výtopny a závodové elektrárny), dále na výrobu briket a pro chemické zpracování (Kryl, 2006).

Ani Česká republika nemá do budoucna jinou možnost, než vytvořit účelnou skladbu všech zdrojů primárních energií, to znamená včetně optimálního podílu uhlí, zejména hnědého, na celkových palivoenergetických potřebách státu. Tato skutečnost však musí být ekologicky přijatelná zejména v oblastech s intenzivní báňskou činností a výrobou elektrické energie na bázi uhlí (Valášek, 1998). Největší české hnědouhelné pánve vznikly v tektonickém příkopu a sledují směr souběžně s Krušnými horami a severozápadní hranicí ČR. Celková rozloha uhlonosné sedimentace na naše území činí 1 900 km².

V České republice mají z dlouhodobého pohledu praktický význam pouze hnědouhelné pánve situované v podkrušnohorském úvalu severozápadních Čech. Severočeská hnědouhelná pánev je tak jediným českým rozvojovým ložiskem hnědého uhlí, s možnou, skutečně dlouhodobou perspektivou (Valášek, 1998). V oblasti podkrušnohorských pánví se většinou vymezují Severočeská, Sokolovská a Chebská pánev. Na celkové produkci hnědého uhlí v ČR se Sokolovská pánev podílí zhruba 21 %. Dobývání zde probíhá povrchoвым způsobem (Geofond, 2008).

S povrchovou těžbou uhlí ovšem souvisí i zásadní environmentální problémy s technogenní transformací krajiny. Dochází k destrukci přírodních složek krajiny, zejména se mění reliéf, horninové prostředí, půdní profil, hydrické i klimatické poměry a je významně ovlivněna biota. Tyto celospolečensky závažné problémy vyžadují účinná revitalizační opatření (Vráblíková, 2002).

Proto s povrchovou těžbou hnědého uhlí souvisí i rekultivace celé oblasti. Aby rekultivace probíhala optimálním směrem a s optimálními výsledky, musí začít již monitorováním procesních řetězců povrchové skrývky. Použitím vhodných mechanismů lze ovlivňovat fyzikální i chemické vlastnosti zemin uložených na konečných etážích výsypek, které tak budou vytvářet co nejvhodnější půdotvorný substrát (např. pro lesní rekultivace, lehčí, propustnější zeminy, pro zemědělské rekultivace zeminy, které budou vhodné jako půdotvorný substrát pro vznik hnědozemí nebo hnědých půd, které jsou v dané oblasti obvyklé).

U biologických rekultivací na rozdíl oproti lesnickým nebo zemědělským spočívá zejména v tom, že opracovávaným materiálem není půda, ale substrát, který se teprve v průběhu následujících let rekultivace půdou začne stávat. Dalším významným rozdílem je velká heterogenita povrchu výsypek daná stávajícími technologiemi velkstrojového zakládání zemin v důlnětechnické etapě rekultivací, tedy při prováděném tvarování výsypek a odvalů (Voštová et al., 2006). Významnou složkou revitalizačních opatření jsou biotechnické úpravy krajiny představující celý soubor organizačních, biologických, kulturačních a agrotechnických opatření. Tato opatření umožňují progresivní vývoj krajinného prostoru a přímo působí na vývoj, stav a potenciál základních složek pedosféry, hydrosféry, rostlinných společenstev a atmosféry. Komplexní multidisciplinární přístup k obnově území je rozhodující pro vytváření funkčního přírodního i životního prostředí (Vráblíková, 2002).

Rekultivace ve své klasické podobě je v podkrušnohorských revírech prováděna téměř 50 let. Za tuto dobu prošla postupně kvalitativním vývojem, kdy původní extenzivní koncepce byla výrazně orientována na ozeleňování jednotlivých pozemků. V dalších fázích se postupně rozvinuly všechny její formy (zemědělská, lesnická, hydrická, rekreační),

později však s neúměrnou preferencí rekultivace zemědělské. Současná koncepce rekultivací dává důraz na řešení velkých územních celků, přičemž zvýrazňuje prvky ekologické rovnováhy a snaží se realizovat takové způsoby řešení, které umožňují nenásilné včlenění rekultivovaných ploch do okolního území. Jsou hledány cesty, aby komplexní revitalizace území řešila nejen přírodní složku obnovy postiženého regionu, kterou je rekultivace půdy a krajiny, ale aby také účinně přispěla i k řešení otázek sociálně ekonomických.

V sokolovském revíru byly k 01.01.2000 ukončeny rekultivační práce na ploše 2 298 ha, rozpracovány jsou na výměře 1 451 ha, po roce 2000 do konce životnosti revíru budou zahájeny a ukončeny na ploše 5 522 ha. V rámci severočeského hnědouhelného revíru byly k 01.01.2000 ukončeny rekultivace na ploše 7 559 ha. Rozpracovány k témuž datu jsou rekultivace na ploše 6 155 ha, do konce životnosti revíru bude rekultivována ještě plocha 14 836 ha (Svoboda, 2000).

2.2 Toxicita výsypkových substrátů a její příčiny

Při povrchové těžbě dochází k odkrytí nadložních hornin, které jsou deponovány na výsypky. Tyto deponované nadložní horniny se značně liší od běžných půd (Frouz et al., 2008). Jsou to zpravidla zrnitostně extrémní velmi těžké jíly až s 90% obsahem jílovitých částic, které mají nízkou biologickou aktivitu a extrémní pH nebo naopak písky či šterkové usazeniny (Dimitrovský, 2001; Hezina, 2000). Na Sokolovsku je většina nadloží tvořena jíly cyprisového souvrství, které mají příznivé vlastnosti, ale existují zde vrstvy tvořené uhelnými jíly a tufity, které mohou být fytotoxické i po 40 letech. Fakt, že tyto plochy nezarůstají, přináší řadu dalších sekundárních problémů (kyselé důlní vody, atd.) (Frouz et al., 2005). Fytotoxické zeminy jsou v podstatě skrývkové zeminy slojových vrstev. Většinou jde o heterogenní směs zemin texturálně lehčích, písčitohlinitých až písčitých s příměsí vypálených jílu a s vysokým podílem uhelné hmoty, limonitovaného pískovce, pyritu, a místy i sideritu (Řehoř et al., 2004). Jedná se vlastně o jezerní sedimenty, které se usazovaly na dně třetihorního jezera před 16-21 mil. let (Frouz, 2007).

Pro snižování fytotoxicity a obsahu těžkých kovů je nejefektivnějším prostředkem vápnění, a to zejména na kyselých půdách (Zrůst, 2003). Prospěšnou vlastností dolomitického vápence je stimulace respirační a mikrobiální aktivity a významná zásoba celkového dusíku, kterou je ovlivňována mikrobiální biomasa v návaznosti na makro a mezo faunu (Kula, 2007).

Obnova půdního fondu na výsypkách představuje dlouhodobý proces, jehož kvalitativní úroveň je závislá na řadě počátečních a druhotných faktorů jako je: reliéf tělesa výsypky, použití výsypkových zemin k rekultivačním účelům, meliorační úpravě zemin, agrotechnika, vegetační pokryv apod. (Vráblíková, 2002).

2.3 Biologická krusta a její význam při rozvoji iniciálních ekosystémů

Seriózní přístupy k rekultivacím výsypek a obnově ekosystémů kladou důraz na přírodní procesy. Jedním z přírodních způsobů rekultivace je ponechání vybraných ploch spontánní sukcesi. Leckde je potřeba jen upravit faktory prostředí – například zvednout hladinu vody, dodat živiny, navézt příhodný materiál nebo dodat žádoucí organismy, či naopak odstranit nevhodné druhy. Spontánní sukcese vede k poměrně pestrým porostům, které dobře plní estetické, protierozní i další ekologické funkce. Sukcese vede k přírodě bližším ekosystémům (Vráblíková, 2009) a nerekulitované plochy ponechané sukcesi jsou z pravidla až dvakrát druhově bohatší než plochy rekultivované (Prach, 2006).

Pokud je vývoj těžby správně navržen a poté jsou lokality ponechány sukcesi, chovají se často jako refugia pro ohrožené a ustupující organismy a mohou významně přispívat k místní biologické rozmanitosti (Prach, et al., 2011; Šálek et al., 2010; Chuman, 2005; Henrychová, 2008). Jedním z důležitých faktorů pro rozvoj zkoumání vhodnosti sukcese je i úspora finančních prostředků (Vráblíková, 2009).

Napomoci nastartovat primární sukcesi lze pomocí vytvoření biologických krust.

Biologická půdní krusta je tvořena živými organizmy (především sinicemi, řasami, hyfami hub, mechy a lišejníky) a jejich vedlejšími produkty, jimiž jsou propojeny, vázány a spojovány půdní částice v krustu. Krusta je až 1 cm silná, podobná zvlněné plsti a tak kompaktní, že na ní téměř nerostou cévnaté rostliny (Lukešová et al., 2010; Pietrasiak et al., 2011). Tato souvislá vrstva chrání a stabilizuje povrch půdy před erozí větrem a vodou, ovlivňuje odtok a infiltraci vody, váže atmosférický dusík a uhlík do půdy (Belnap et al., 2001). Fototrofní mikroorganismy jsou důležité pro cyklicitu a uhlíkovou produktivitu biologických půdních krust, které zvyšují obsah vody, interakci živin a mechanickou stabilitu půdy. S ohledem na očekávané klimatické změny, kdy bude půd s nevyhovujícími vlastnostmi přibývat, budou vlastnosti biologických krust stále potřebnější. Proto se pozitivní vlastnosti biologických krust, jako je mechanická fixace půd a živin, dají v budoucnu prakticky využít (Csotonyi et al, 2010).

3 Materiál a metody

3.1 Materiál

Území, kde byly odebrány vzorky substrátů a následně realizován terénní pokus se nachází v Sokolovské hnědouhelné pánvi, jejíž výsypky spadají do bioregionu Chebsko – Sokolovského, který je tvořen převážně kyselými písiky a jíly, s četnými podmáčenými stanovišti (Frouz, 2001; Frouz et al., 2006).

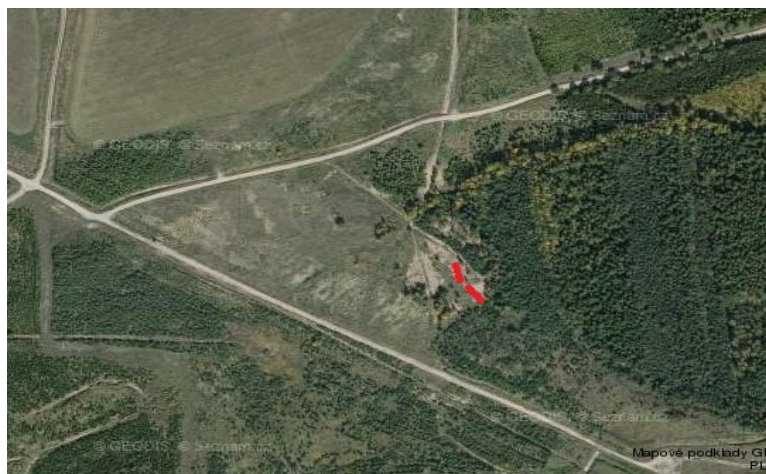
Z hlediska morfologie lze tuto oblast charakterizovat jako stupňovitý, oboustranný, příčně asymetrický příkop, protažený ve směru ZJZ – VSV. Na jihovýchodě sousedí s Chebskou pánví, na severovýchodě sousedí se Severočeskou hnědouhelnou pánví (Krajíček et al., 2003).

Dnešní morfologie Sokolovské pánve se značně změnila, především v důsledku těžby a následném navezení skrývky a vytvoření výsypek, které značně převyšují dřívější horizont. Nejvýznamnější je Podkrušnohorská výsypka (Obr.č.1), která vznikla postupným sloučením jednotlivých výsypek přibližně před 20 lety (Krajíček et al., 2003). Samotné těleso výsypky je tvořeno pestrou směsicí cypřišových jílu a jílovců (Frouz et al.,

2006), uhelných jíílů, uhlí a posypových materiálů. V jižní části se vyskytují tufitické jílovce ze skrývkových řezů Medard – Libník, přesypané vesměs cypřišovými jíly a jílovci, které izolují toxické materiály tufitických jílovců (Culek et al., 1996). Na Podkrušnohorské výsypce jsme pro její rozmanitost násypových substrátů odebrali několik typů zemin (Př.č. 1, Tab.č. 1), které jsme otestovali v rámci laboratorního pokusu a následně na ní vybrali plochu, kde jsme založili terénní pokus (Obr.č. 1 - 2).



Obr.č. 1: Podkrušnohorská výsypka (zdroj: www.mapy.cz).



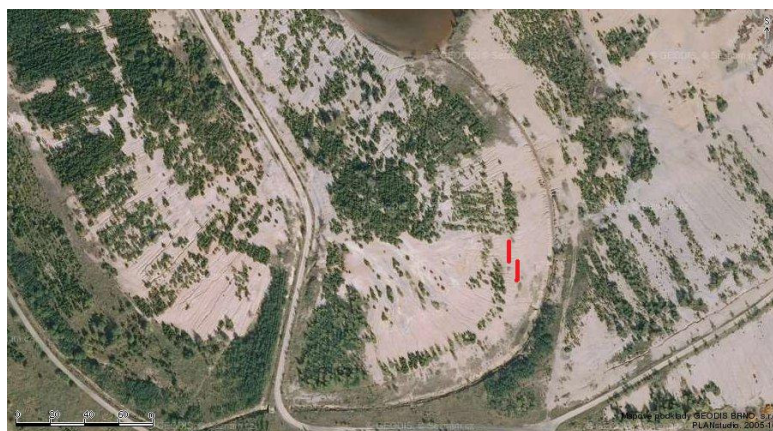
Obr.č. 2: Pokusné plochy (červeně) na Podkrušnohorské výsypce (zdroj: www.mapy.cz).

Další výsypkou, kde probíhal terénní pokus, byla výsypka Lítov - Boden (Obr.č.3 - 4) mezi obcemi Lítov a Chlum Svaté Máří. Tato lokalita leží v krajině s geomorfologicky velmi členitým územím, mezi Sokolovskou

a Chebskou pánví. Na výsypce Lítov byla ukončena těžba již v roce 1974 (Krajíček et al., 2003).



Obr.č.3: Výsypka Lítov – Boden (zdroj:www.mapy.cz).



Obr.č.4: Označení pokusných ploch na výsypce Lítov – Boden (zdroj:www.mapy.cz).

Tab.č.1: Chemické vlastnosti jednotlivých substrátů použitých v laboratorním pokusu podle Frouze et al. (2005); pH znamená pH ve vodném roztoku, LOI ztrátu žiháním, polyfenoly jsou polyfenoly extrahovatelné v 80% alkoholu, obsah těžkých kovů značí celkové obsahy, u ostatních prvků se jedná o dostupné formy.

substrát	plocha	pH	LOI	Na	K	Al	Fe	Polyfenoly	Be	Cr	Zn	As
			%	μg/kg	μg/kg	mg/kg	mg/kg	μg/kg	μg/kg	μg/kg	μg/kg	μg/kg
uhelný jíl	Lítov	3.05	11.8	102	16	426	1.75	12.7	0.31	1.60	1.07	18.42
uhelný jíl	Chodov	3.45	13.4	76	16	212	1.21	18.6	0.26	1.80	1.52	11.24
cyprisový jíl	Podkušnohorská	8.25	5.6	82	150	<1	<0,1	0.8	0.38	3.55	6.06	1.58
cyprisový jíl	Podkušnohorská	8.33	5.3	364	177	<1	<0,1	1.7	0.52	3.38	6.32	3.33
tufitový jíl	Podkušnohorská	3.43	5.4	104	27	599	0.62	5.8	0.44	1.93	5.11	4.70

3.2 Metody

Cílem diplomové práce bylo vytvořit porost, který by bránil erozi, a proto jsme se kromě vyšších rostlin zaměřili i na půdní řasy a sinice.

Míra toxicity odebraných vzorků substrátů byla ověřena laboratorním pokusem, na základě kterého byly vybrány 2 typy půd: uhelné jíly na výsypce Lítov (Obr.č.5: Substrát č. 1) a tufitové jíly na Podkušnohorské výsypce (skluzu) (Obr.č.5: Substrát č. 5). Na těchto půdách jsme provedli terénní pokus přímo na Sokolovských výsypkách.



Obr.č. 5: Odebrané vzorky substrátů k laboratornímu pokusu.

3.2.1 Laboratorní pokus

Na Sokolovské pánvi jsme odebrali 5 vzorků toxických substrátů (Obr.č. 5), které jsme si označili čísly 1 - 5. Do připravených průhledných kelímků jsme navážili 60 g substrátu. Dno jsme proděravěli a vložili do druhého kelímku s kouskem navlhčené vaty. Do jednoho kelímku jsme zaseli přibližně 30 semen každé z následujícího druhu rostlin: *Sinapis alba* - hořčice bílá (a), *Arrhenatherum elatius* – ovsík vyvýšený (b), *Agrostis capillaris* – psineček obecný (c), *Centaurea jacea* – chrpa luční (d), *Echium vulgare* – hadinec obecný (e), *Centaurea stoebe* – chrpa latnatá (f), *Medicago lupulina* – tollice dětelová (g). Po zasetí jsme semena orosili vodou a nechali 30 dní na světle při teplotě cca 25 ° Celsia. Každý druh rostliny byl vyset na daný substrát ve čtyřech opakováních. Tedy 5 vzorků substrátů po 4 opakování a 7 druzích rostlin. Celkem jsme tedy měli 140 pokusných vzorků.

Po uplynutí měsíce jsme každou rostlinu, která se na půdě uchytila, opatrně vyjmuli a změřili její nadzemní a podzemní část. Takto získané údaje jsme zaznamenali do tabulky a to tak, že pokud na jedné misce vyklíčilo semen více, údaje o nadzemních částech a údaje o podzemních částech jsme sečetli (Tab.č. 2 - 4).

3.2.2 Terénní pokus

Laboratorní pokus ukázal, že některé typy půd jsou natolik toxické, že na nich rostliny ani nevyklíčily. Rozhodli jsme se proto ověřit, zda bude možné na těchto půdách vytvořit pomocí půdních řas biologickou krustu, která by zabraňovala erozi půdy a přispěla k lepší retenci vody. Na základě předešlých prací v dané lokalitě (Trochová, 1999; Lukešová 2001) jsme vybrali konkrétní druhy řas a po kultivaci je aplikovali na vybrané lokality. Těmito lokalitami byla oblast na Lítovské (Obr.č. 4) a Podkrušnohorské výsypce (Obr.č. 2). Zatímco na Podkrušnohorské výsypce předchozí průzkum ukázal přítomnost řasových krust, na Lítovské výsypce, při dlouhodobém předchozím výzkumu, nebyly řasové krusty pozorovány.

K terénnímu pokusu byly vybrány řasy rodu *Chlorella*, *Klebsormidium*, *Myrmecia* a sinice *Nostoc*. Řasa r. *Klebsormidium* byla kultivována v Petriho miskách. Řasy r. *Chlorella*, *Myrmecia* a sinice *Nostoc* jsme ze zavřených zkumavek se šikmým agarem přenesli kovovým drátkem s očkem. Ten jsme nejprve sterilizovali nad plamenem a poté jsme ho namočili do samotného agaru, aby vychladl. Řasy byly přeneseny do Erlenmeyerových baněk o objemu 250 ml s připraveným živným médiem BBM (Bolds Basal Medium).

Živné médium BBM bylo připraveno následujícím postupem: Na 1000 ml roztoku jsme použili 10 ml roztoku NaNO_3 (25 g/1000 ml), 10 ml roztoku $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (5 g/1000 ml), 10 ml $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (7,5 g/1000 ml), 10 ml roztoku K_2HPO_4 (7,5 g/1000 ml), 10 ml roztoku NaCl (2,5 g/1000 ml) a 10 ml roztoku KH_2PO_4 (17,5 g/1000 ml). Dále jsme přidali 1 ml roztoků EDTA+KOH (5 g Chelatonu III + 3.1 g KOH /100 ml), 1 ml roztoku $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.498 g + H_2SO_4 - 0.1 ml/100 ml), 1 ml H_3BO_3 (1.142 g/100 ml) a roztok mikroprvků (8.82 g $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1.44 g $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0.71 g MoO_3 , 1.57 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ a 0.49 g $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$). Vzniklý roztok jsme doplnili deionisovanou vodou na 1000 ml (Bischoff et al., 1963).

Řasy, které jsme přenesli do roztoku BBM, jsme za stálého okysličování nechali při stálé teplotě (cca 26° C) a za stálého světla, rozmnožovat 3 měsíce. Poté jsme aplikovali řasy na předem určené a vymezené čtverce.

Na vybraných lokalitách na Lítovské (Obr.č. 4) a Podkrušnohorské výsypce (Obr.č. 2) byly vyznačeny 2 plochy, které byly rozděleny do čtverců a na nichž byly aplikovány řasy (Př.č. 2).

Plocha byla rozdělena na 24 čtverců o velikosti čtverce 0,5 m x 0,5 m. Plochy byly na každé ze zvolených výsypek dvě, kvůli ověření správnosti.

Na každé ploše byla aplikována konkrétní řasa přímo na půdu a poté na půdu, která byla předtím povápněna. Vápnění na plochách bylo provedeno vždy na čtvercích, které byly ve svahu níže než plochy nevápněné, aby nemohlo dojít ke kontaminaci ploch neošetřených vápnem při deštích. Čtverce, které byly nějakým způsobem ošetřeny, obklopovaly vždy plochy bez ošetření, aby nedocházelo k jejich vzájemnému ovlivnění. Na každou plošku bylo aplikováno 250 ml husté řasové suspenze jenž obsahovala 10^5 buněk v 1 ml.

V průběhu tří let byly na plochách 4x odebrány vzorky a následně vyhodnoceny v Ústavu půdní biologie, Akademie věd ČR v Českých Budějovicích (Obr.č. 6-11). Vzorky byly odebrány Kopeckého válečkem – dvakrát povrchová krusta z každého čtverce do hloubky 5 mm (včetně kontrol). Odebrané vzorky jsme označili a následně ve tmě zamrazili na teplotu - 40 °C do doby, než jsme je v laboratoři vyhodnotili. Laboratorní práce spočívaly ve zjištění obsahu chlorofylu *a* na jednotlivých čtvercích. Pokusem jsme chtěli zjistit, jaké řasy se na jakých půdách množí nejlépe. Laboratorní práce jsme provedli následně: z jednotlivých vzorků jsme navážili na elektronických vahách Kern ABS/ABJ 3 gramy půdy, které jsme přesypali do třecí misky. Následně jsme k půdě přidali 30 ml acetonu a 30 sekund třeli bez přítomnosti světla. Vzniklou suspenzi jsme přesunuli do 100 ml kádinek a postavili na šikmou plochu. Takto jsme zpracovali všechny vzorky. Po 15 minutách jsme z kádinek odebrali vzniklý roztok a napipetovali jej do označených centrifugačních zkumavek (Př.č. 5). Následně jsme vzorky ve zkumavkách odstředili v centrifuze a minipipetou přenesli 100 µl jednotlivých surových extraktů do připravené mikrotitrační destičky. Jedna řada jamek byla naplněna čistým acetonem, který sloužil jako kontrola správnosti měření. Extrakty v mikrotitrační destičce jsme podrobili měření absorbance chlorofylu v přístroji SUNRISE Elisa reader při měření ($\lambda = 644\text{nm}$) a referenční vlnové délce ($\lambda = 662, 663$ a 750 nm). Obsah chlorofylu byl vypočten podle vzorce McKinney (1941).

Výsledky chlorofylu (Obr.č. 6 - 9) znázorňují množství biomasy na dané ploše (čtverci).

V březnu 2011 jsme provedli další odběry substrátu a zjišťovali kvalitativní složení společenstev (Ettl et al., 1988; Komárek, 1998; Stach, 1966). Ze středu každého čtverce jsme odebrali do Petriho misky povrchovou vrstvu zeminy, kterou jsme zdokumentovali. Nafoceny byly také jednotlivé čtverce pro kontrolu odhadu pokryvnosti krustami řas nebo sinic (Obr.č.10-13).

V laboratoři jsme zaznamenali náš vizuální odhad pokryvnosti substrátu řasami, sinicemi nebo mechy vzhledem k celkovému množství substrátu v Petriho misce. Odhad pokryvnosti jsme zaznamenali do tabulek a následně ověřili pod binokulární stereo lupou. Pro porovnání pokusných ploch

s okolím jsme ve vzdálenosti 3 m z každé strany z každé lokality odebrali vzorky a taktéž ověřili jejich kvalitativní složení pod fluorescenčním mikroskopem (Obr.č. 14).

Z každého vzorku z Petriho misky jsme skalpelem nebo pinzetou odebrali povrchové vrstvy substrátu, včetně povrchu kamínků, krust, půdy, atd. (Příloha č.6). Na podložní sklíčko jsme kapátkem nanесли kapku vody, do níž jsme umístili odběr ze skalpelu a překryli krycím sklíčkem. Z každé Petriho misky (tedy z každého čtverce) jsme udělali 3 preparáty. Celkem bylo tedy ze 40 Petriho misek uděláno 120 preparátů. Jednotlivé preparáty jsme následně mikroskopovali pod fluorescenčním mikroskopem Olympus BX51 pod 20ti násobným zvětšením ve světle viditelné fluorescence v oblasti spektra zelené a modré barvy (Př.č. 6). Na krycím sklíčku jsme vždy kontrolovali celé 2 pásy, jak v oblasti modrého, tak zeleného spektra. Údaje jsme zaznamenávali do tabulky tak, že jsme po prohlédnutí všech 3 preparátů z jedné Petriho misky (z jednoho čtverce) zaznamenali všechny zjištěné mikroorganismy (Pouličková et al., 2001) do tabulky (Obr.č. 10 - 14) a zdokumentovali jsme je pomocí fotografií z mikroskopu (Př.č. 6).

V neposlední řadě jsme ověřili vliv aplikace dolomitického vápence na substrát Podkrušnohorské a Lítovské výsypky. Ze všech čtverců (vápněných i nevápněných) na jednotlivých plochách jsme odebraly vzorek půdy a následně ve vodném roztoku 1:5 jsme měřili pH metrem se skleněnou elektrodou pH. Výsledky ze čtverců bez vápnění a s vápněním jsme průměrněovali a hodnoty zaznamenali.

4 Výsledky

4.1 Výsledky laboratorního pokusu

Z výsledku laboratorního pokusu vyplývá, že cyprisové jílly jsou nejpříznivější ke klíčení a růstu rostlin (Tab.č. 2 - 4). Růst jak nadzemních, tak podzemních částí všech sledovaných druhů rostlin na těchto substrátech je statisticky významně větší než na všech ostatních půdách (jednocestná

ANOVA $p < 0,05$). Ostatní půdy jsou pro rostliny toxické a to do té míry, že vysetá semena ani nenaklíčila (Tab.č. 2 - 4).

Tab.č. 2: Délka nadzemní a kořenové části u rostlin na jednotlivých substrátech (cm), hodnoty za symbolem \pm představují směrodatnou odchylku. Statisticky homogení skupiny jsou označeny stejnými písmeny ANOVA Tukey test $p < 0,05$.

Substrát	Druhy - části rostlin			
	<i>Sinapis alba</i>		<i>Arrhenatherum elatius</i>	
	kořen	stonek	kořen	stonek
Uhelný jíl (výsypka Lítov)	0 \pm 0,0a	0 \pm 0,0a	0,8 \pm 0,05a	13,8 \pm 0,9b
Uhelný jíl (výsypka Chodov)	0 \pm 0,0a	0 \pm 0,0a	0 \pm 0,0a	0 \pm 0,0a
Cyprisový jíl (Podkrušnohorská výsypka)	86,8 \pm 1,3c	184,5 \pm 3,7c	110,6 \pm 2,7b	201,4 \pm 4,0c
Cyprisový jíl (Podkrušnohorská vys.)	35,2 \pm 1,2b	23,3 \pm 0,7b	251,4 \pm 3,4c	602,5 \pm 7,5d
Tufitový jíl (Podkrušnohorská výsypka)	0 \pm 0,0a	0 \pm 0,0a	0 \pm 0,0a	0 \pm 0,0a

Tab.č. 3: Délka nadzemní a kořenové části na jednotlivých substrátech (cm), hodnoty za symbolem \pm představují směrodatnou odchylku. Statisticky homogení skupiny jsou označeny stejnými písmeny ANOVA Tukey test $p < 0,05$.

Substrát	Druhy - části rostlin			
	<i>Agrostis capillaris</i>		<i>Centaurea jacea</i>	
	Kořen	Stonek	Kořen	stonek
Uhelný jíl (výsypka Lítov)	0 \pm 0,0a	0 \pm 0,0a	0 \pm 0,0a	0 \pm 0,0a
Uhelný jíl (výsypka Chodov)	0 \pm 0,0a	0 \pm 0,0a	0 \pm 0,0a	0 \pm 0,0a
Cyprisový jíl (Podkrušnohorská výsypka)	24,2 \pm 0,7b	61,3 \pm 1,3b	100,8 \pm 1,4b	108,7 \pm 1,3b
Cyprisový jíl (Podkrušnohorská výsypka)	22,9 \pm 0,7b	63,5 \pm 1,5b	150,3 \pm 1,5c	260 \pm 2,0c
Tufitový jíl (Podkrušnohorská výsypka)	0 \pm 0,0a	0 \pm 0,0a	0 \pm 0,0a	0 \pm 0,0a

Tab.č. 4: Délka nadzemní a kořenové části na jednotlivých substrátech (cm), hodnoty za symbolem \pm představují směrodatnou odchylku. Statisticky homogení skupiny jsou označeny stejnými písmeny ANOVA Tukey test $p < 0,05$.

Substrát	Druhy - části rostlin					
	<i>Echium vulgare</i>		<i>Centaurea stoebe</i>		<i>Medicago lupulina</i>	
	kořen	stonek	kořen	stonek	kořen	stonek
Uhelný jíl (výsypka Lítov)	0 \pm 0,0a	0 \pm 0,0a	0 \pm 0,0a	0 \pm 0,0	0 \pm 0,0a	0 \pm 0,0a
Uhelný jíl (výsypka Chodov)	0 \pm 0,0a	0 \pm 0,0a	0 \pm 0,0a	0 \pm 0,0	0 \pm 0,0a	0 \pm 0,0a
Cyprisový jíl (Podkrušnohorská výsypka)	12,2 \pm 0,5 b	25 \pm 0,9b	185 \pm 1,9b	217,9 \pm 2,0	35,1 \pm 1,1b	54,6 \pm 1,4b
Cyprisový jíl (Podkrušnohorská výsypka)	37,2 \pm 1,1 c	48 \pm 1,3c	132 \pm 1,6c	187,6 \pm 1,9	27,5 \pm 0,9b	61,4 \pm 1,7c
Tufitový jíl (Podkrušnohorská výsypka)	0 \pm 0,0a	0 \pm 0,0a	0 \pm 0,0a	0 \pm 0,0	0 \pm 0,0a	0 \pm 0,0a

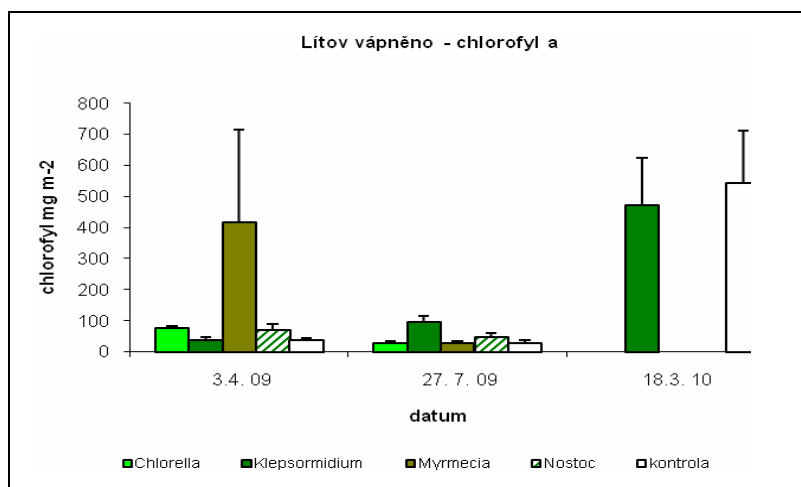
4.2 Výsledky terénního pokusu

4.2.1 Množství chlorofylu

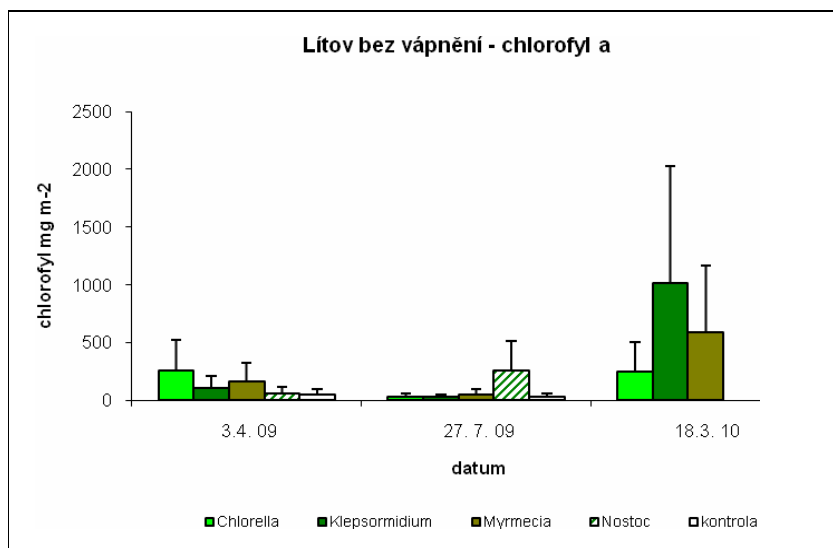
Trojcestná ANOVA s použitím termínu odběru jako kovariáty, nevykázala žádný statisticky významný vliv lokality, vápnění ani inokulace řasami nebo sinicemi (pro chlorofyl a $F=0,60$; $p < 0,425$, $F=0,45$; $p < 0,778$, $F=0,89$; $p < 0,3471$). Ze získaných údajů je patrné, že v prvním roce po aplikaci řas a sinic nijak výrazně kultury nenarůstaly, výjimkou jsou vysoké hodnoty chlorofylu a u řasy r. *Myrmecia* (Obr.č. 6).

V posledním odběru (18.03.2010) došlo k výraznému nárůstu obsahu chlorofylu a (tento rozdíl je signifikantní $p < 0,05$ pro všechny druhy inokulací a kontroly – párový t test mezi podzimním a jarním odběrem). V tomto termínu nebylo možné odebrat vzorky z některých čtverců na lokalitě, protože byly ještě pod souvislou vrstvou sněhu. Lze však předpokládat (dle výsledků ze vzorků, které se odebrat podařilo), že by neodebrané řasy měly podobný vývoj – tedy výrazný vzrůst populace (Obr.č. 6 - 9).

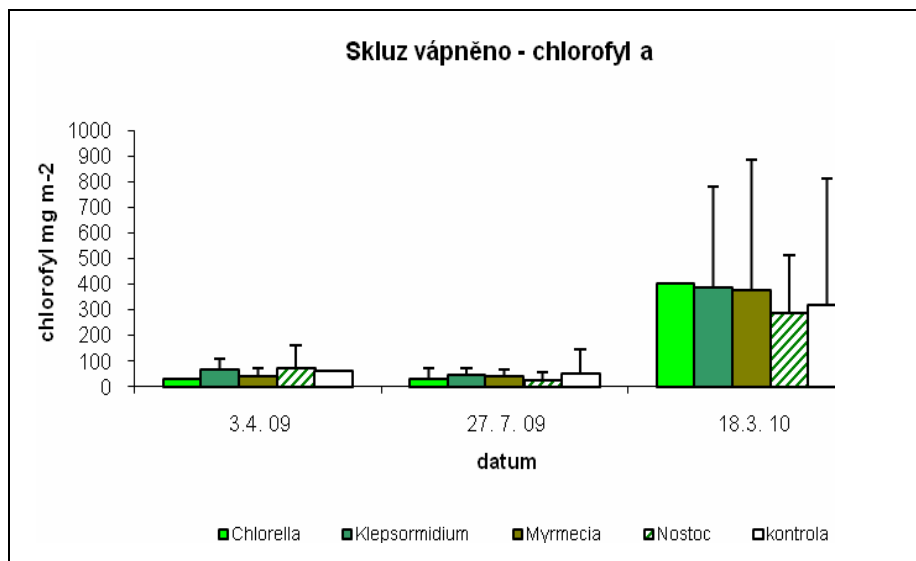
Plochy na Podkrušnohorské výsypce vykazují podobný vývoj jako výsledky z výsypky Lítov. Shodný je také fakt, že k výraznějšímu namnožení sinic a řas došlo až přibližně za rok od aplikace na pokusné plochy, výjimkou jsou vysoké hodnoty chlorofylu *a* u řasy r. *Chlorella* (Obr.č. 9). Z výsledků i z vizuálního porovnání ploch (Př.č. 3 - 4) je patrné, že biologickou krustu se vytvořit podařilo. V posledním odběru taktéž došlo k výraznému nárůstu obsahu chlorofylu *a* (tento rozdíl je signifikantní $p < 0,05$ pro všechny druhy inokulací a kontroly – párový t test mezi podzimním a jarním odběrem).



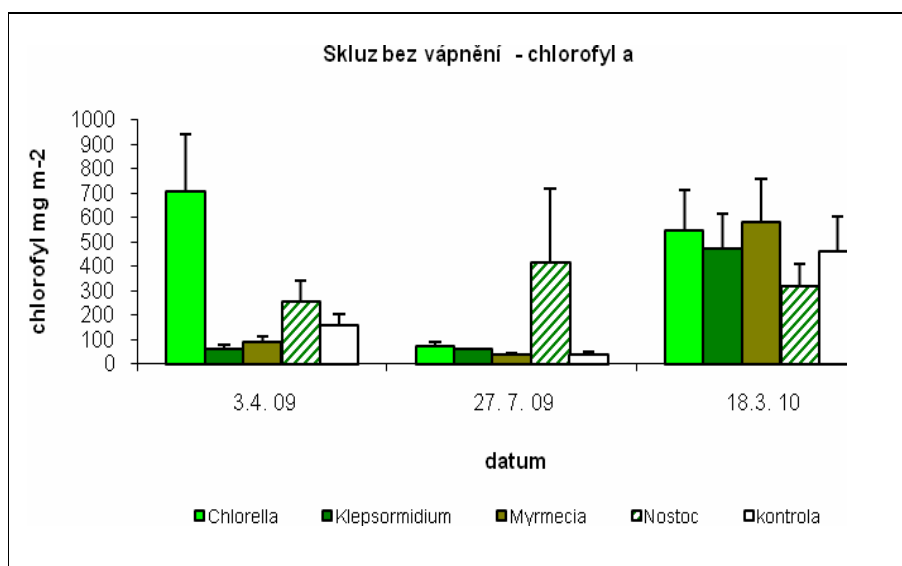
Obr.č. 6 : Hodnoty chlorofylu *a* řas a sinic na výsypce Lítov s vápněním, úsečkou je vyznačena směrodatná odchylka.



Obr. č. 7: Hodnoty chlorofylu *a* řas a sinic na výsypce Lítov bez vápnění, úsečkou je vyznačena směrodatná odchylka.



Obr.č. 8: Hodnoty chlorofylu a řas a sinic na Podkrušnohorské výsypce (skluz) s vápněním, úsečkou je vyznačena směrodatná odchylka.













Obr.č. 9: Hodnoty chlorofylu a řas a sinic na Podkrušnohorské výsypce (skluz) bez vápnění, úsečkou je vyznačena směrodatná odchylka.

4.2.2 Fluorescenční mikroskopie, odhad pokryvnosti a pH

Na základě výsledků chlorofylu a terénního pozorování, kde jsme zjistili výrazné přerůstání mezi jednotlivými ploškami, jsme se rozhodli pomocí fluorescenční mikroskopie zjistit, zda na plochách ošetřených zvolenými druhy řas a sinic prospívá inokulovaná řasa či sinice, a nebo došlo k rozšíření některého z druhů. Prvním krokem byl odhad pokryvnosti jednotlivých vzorků (Obr.č. 10 - 14). Z vizuální kontroly je patrné, že na obou plochách z lokality nazvané Skluz 1 (Obr.č. 10) a Skluz 2 (Obr.č. 11) na Podkrušnohorské výsypce byly patrné krusty řasy rodu *Klebsormidium* a velký výskyt mechů. Na plochách Lítov 1 (Obr.č. 12) a Lítov 2 (Obr.č. 13) lokality Lítovské výsypky vizuálně převažovala řasa r. *Klebsormidium*, která tvořila také krusty, ale v menší míře než na Podkrušnohorské výsypce. Stejně tak byl menší i výskyt mechů na lokalitě Lítov než na Podkrušnohorské výsypce. Ani na jedné z ploch není prokazatelný pozitivní vliv vápnění na množství řas ani mechů. Tento fakt nám později potvrdili i výsledky fluorescenční mikroskopie.

Výsledky z odběrů vzorků z okolí (3 m) ploch ukázaly, že na ploše Lítov vykazovala jedna plocha porost řas dominovaný druhy r. *Klebsormidium* a vizuálně viditelné krusty. V ostatních vzorcích nebyly pozorovány žádné řasy. Na Podkrušnohorské výsypce byly na všech kontrolních vzorcích zaznamenána řasová společenstva, na kterých převažovala řasa r. *Klebsormidium* (Obr.č. 14).

Vzorok substrátů odebrané na lokalitě Lítov na vápněných a nevápněných plochách, ukázaly velký a statisticky významný (t test $p < 0,05$) rozdíl v pH, kde pH na nevápněné ploše bylo $2,9 \pm 0,1$ a na vápněné ploše $5,4 \pm 0,3$. Na Podkrušnohorské výsypce byl rozdíl mezi povápněnými a nepovápněnými třetmenty menší a to $4,8 \pm 0,8$ na nevápněné a $6,5 \pm 0,7$ na vápněné ploše a nebyl statisticky významný.

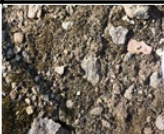









řasa	plocha	vápěno	odhad pokrývnosti	fluorescenční mikroskopie		foto	
CHLORELLA	Skluz 1	ano	< 90% mechy a lišejníky	<i>Klebsormidium</i>	mechy	balíčky drobných kokálních řas, <i>Pinnularia borealis</i> , <i>Radiococcaceae</i> -ohromne shluky	
CHLORELLA	Skluz 1	ne	90-100% mechy a <i>Klebsormidium</i>	<i>Klebsormidium</i> (velké mn.)	mechy	<i>Hantzschia</i> , <i>Pinnularia borealis</i> , drobné zelené kokální řasy	
KLEBSORMIDIUM	Skluz 1	ano	100% <i>Klebsormidium</i>	<i>Klebsormidium</i> (velké mn.)	mechy (drobně)	protonemata mechů, zel. Kokální, <i>Zygonium ericetorum</i>	
KLEBSORMIDIUM	Skluz 1	ne	100% <i>Klebsormidium</i> + mechy	<i>Klebsormidium</i> (krusty)	mechy	mraky <i>Klebsormidium</i> , <i>Pinnularia borealis</i> , drobné kokální na částicích, <i>Nostoc</i>	
MYRMECIA	Skluz 1	ano	100% mechy a <i>Klebsormidium</i>	<i>Klebsormidium</i> (krusty)	mechy		
MYRMECIA	Skluz 1	ne	100% <i>Klebsormidium</i> + mechy	<i>Klebsormidium</i>	mechy	shluky buněk zel.řas, <i>Nostoc</i> - malé kolonie	
NOSTOC	Skluz 1	ano	100% mechy a lišejníky	<i>Klebsormidium</i>	mechy	<i>Klebsormidium mucosum</i> , sarcinogenní balíčky zel.řas, EPF, buňky ze skupiny <i>Radiococcaceae</i>	
NOSTOC	Skluz 1	ne	90-100% mechy a <i>Klebsormidium</i>	<i>Klebsormidium</i>	mechy	<i>Klebsormidium mucosum</i> , <i>Hantzschia</i> , iniciální <i>Nostoc</i> a <i>Microcoleus</i> , drobné kokální zelené řasy	
KONTROLA	Skluz 1	ano	50-60% mechy a <i>Klebsormidium</i>	<i>Klebsormidium</i>	mechy	<i>Pinnularia borealis</i> , <i>Klebsormidium crenulatum</i> -protonemata, <i>Phormidium</i> , kokální - <i>Botrydopsis</i>	
KONTROLA	Skluz 1	ne	20% mechy	<i>Klebsormidium</i> (malé mn.)	mechy (protone mata)	<i>Pinnularia borealis</i> , ojedinele <i>Phormidium</i>	

Obr.č. 10: Odhad pokrývnosti vzorku v procentech, druhové složení preparátů a fotografie konkrétních čtverců na ploše Skluz 1.










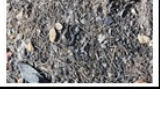
Výsledky vizuálního odhadu pokrývnosti vzorků v Petriho miskách jsou z lokality na Podkrušnohorské výsypce označené Skluz 1 následující: Převážná část vzorků z této lokality je pokryta z 90 - 100% řasou

r. *Klebsormidium* a mechy. Konkrétně 8 čtverců s inokulací řasy r. *Chlorella* s vápněním, *Chlorella*, *Myrmecia* s vápněním, *Myrmecia*, sinice *Nostoc* s vápněním a *Nostoc*. Jeden ze čtverců označený jako kontrola s vápněním měl vizuální pokryvnost 50 - 60% a jeden ze čtverců označený jako kontrola byl z 20% pokryt mechy. Odhad pokryvnosti ověřila následná fluorescenční mikroskopie, která potvrdila přítomnost řasy r. *Klebsormidium* ve všech vzorcích půdy. Dále byla zjištěna přítomnost mechů, rozsivek *Pinnularia borealis*, *Hantzschia amphioxys*, iniciální *Nostoc* a *Microcoleus*, *Phormidium*, ve velkém množství zelené kokální řasy a kromě inokulované řasy *Klebsormidii* se podařilo ve vzorcích identifikovat i *Zygonium ericetorum* a *Klebsormidium mucosum* (Obr.č. 10).

Výsledky vizuálního odhadu pokryvnosti vzorků v Petriho miskách jsou z lokality na Podkrušnohorské výsypce označené Skluz 2 následující: Převážná část vzorků z této lokality je pokryta z 90-100% řasou r. *Klebsormidium* a mechy. Konkrétně 8 čtverců s inokulací řasy r. *Chlorella* s vápněním, *Chlorella*, *Klebsormidium*, *Myrmecia*, sinice *Nostoc* s vápněním a *Nostoc*, kontrola s vápněním a kontrola. Dva čtverce označené *Klebsoridium* s vápněním a *Myrmecia* s vápněním s vápněním měly vizuální pokryvnost 60%. Odhad pokryvnosti ověřila následná fluorescenční mikroskopie, která potvrdila přítomnost řasy r. *Klebsormidium* ve všech vzorcích půdy. Dále byla zjištěna přítomnost mechů, rozsivek *Pinnularia borealis*, *Hantzschia amphioxys*, větší množství sinice *Nostoc*, *Microcoleus*, *Phormidium*, *Leptolyngbya*, ve velkém množství kokální zelené řasy a kromě inokulované řasy r. *Klebsormidium* se podařilo ve vzorcích identifikovat i *Klebsormidium mucosum* (Obr.č. 11).

řasa	plocha	vápněno	odhad pokrývnosti	fluorescenční mikroskopie		foto	
CHLORELLA	Skluz 2	ano	>90% mechy		mechy	Nostoc, shluky kokálních zelených řas	
CHLORELLA	Skluz 2	ne	>90% mechy (plodné)		mechy		
KLEBSORMIDIUM	Skluz 2	ano	60% mechy	<i>Klebsormidium</i>	mechy	velké mn. kokálních shluků zelených řas, komplexy <i>Microcoleus</i> , velké balíčky <i>Nostoc</i> , <i>Leptolyngbya</i>	
KLEBSORMIDIUM	Skluz 2	ne	100% <i>Klebsormidium</i> + mechy	<i>Klebsormidium</i>	mechy	<i>Klebsormidium</i> , balíčky zel. řas, velké shluky větších zelených buněk, ojediněle fragment LPP či <i>Phormidium</i>	
MYRMECIA	Skluz 2	ano	60% <i>Klebsormidium</i> + mechy	<i>Klebsormidium</i>	mechy	částice se shluky kokálních buněk, <i>Microcoleus vaginatus</i> , <i>Leptolyngbya</i> , <i>Hantzschia</i> , <i>Klebsormidium mucosum</i> , <i>Phormidium</i> , <i>Nostoc</i>	
MYRMECIA	Skluz 2	ne	90% <i>Klebsormidium</i> + mechy	<i>Klebsormidium</i>	mechy	<i>Leptolyngbya</i> , <i>Nostoc</i>	
NOSTOC	Skluz 2	ano	> 90% <i>Klebsormidium</i> + mechy	<i>Klebsormidium</i>	mechy	<i>Nostoc</i> , shluk kokálních zelených řas	
NOSTOC	Skluz 2	ne	100% mechy + <i>Klebsormidium</i>	<i>Klebsormidium</i> (krusty)	mechy	shluky buněk zelených řas	
KONTROLA	Skluz 2	ano	90-100% mechy a <i>Klebsormidium</i>	<i>Klebsormidium</i>		<i>Nostoc</i> , shluky zel.řas	
KONTROLA	Skluz 2	ne	>90% mechy	<i>Klebsormidium</i>	mechy	shluky zelených řas, <i>Leptolyngbya</i> , <i>Nostoc</i> , iniciální <i>Pinnularia borealis</i> , v malém mn.sinice	

Obr.č. 11: Odhad pokrývnosti vzorku v procentech, druhové složení preparátů a fotografie konkrétních čtverců na ploše Skluz 2.

řasa	plocha	vápněno	odhad pokrývnosti	fluorescenční mikroskopie		foto	
CHLORELLA	Lítov 1	ano	80% mechy a <i>Klebsormidium</i>	<i>Klebsormidium</i>	mechy	zelené kokální řasy na částicích i shlucích	
CHLORELLA	Lítov 1	ne	5-10% mechy	<i>Klebsormidium</i>	mechy	velké mn. dorbných kokálních zelených řas ve shlucích, sarcinoidní balíčky	
KLEBSORMIDIUM	Lítov 1	ano	30-40% mechy a <i>Klebsormidium</i>	<i>Klebsormidium</i> (velké mn.)	mechy	jehličí, <i>Navicula</i> cf. <i>nivalis</i> , <i>Hantzschia</i> - velké mn., <i>Pinularia borealis</i> , kokální zel. balíčky na částicích, <i>Nostoc</i> - krátká i dlouhá vlákna, LPP dlouhá, <i>Cyanothece aerug.</i>	
KLEBSORMIDIUM	Lítov 1	ne	90% <i>Klebsormidium</i>	<i>Klebsormidium</i>		na částicích - shluky větších buněk, ojediněle i sólo zelené b., sarc. balíčky, ojediněle <i>Hantzschia</i> a, možná <i>Cylindrocystis</i>	
MYRMECIA	Lítov 1	ano	20-30% <i>Klebsormidium</i>	<i>Klebsormidium</i>		velké mn. prázdných schránek rozsivek	
MYRMECIA	Lítov 1	ne	30-40% <i>Klebsormidium</i> + mechy	<i>Klebsormidium</i> (krusty)	mechy (protone mata)	sarcinoidní balíky zelených řas	
NOSTOC	Lítov 1	ano	100% <i>Klebsormidium</i>	<i>Klebsormidium</i> (krusty)		sólo buňky zel. řas, sarc. balíčky zel. řas	
NOSTOC	Lítov 1	ne	makroskopicky 0%, jehličí, kamínky	<i>Klebsormidium</i> (nepatrně)		málo všeho! sólo zelené buňky a balíčky zel. řas	
KONTROLA	Lítov 1	ano	100% <i>Klebsormidium</i>	<i>Klebsormidium</i>			
KONTROLA	Lítov 1	ne	0%, jehličí, kamínky	<i>Klebsormidium</i> (malé mn.)		buňky zelených kokálních řas i ve shlucích	

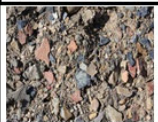









Obr.č. 12: Odhad pokrývnosti vzorku v procentech, druhové složení preparátů a fotografie konkrétních čtverců na ploše Lítov I.

Výsledky vizuálního odhadu pokrývnosti vzorků v Petriho miskách jsou z lokality na výsypce Lítov označené Lítov I následující: Část vzorků z této lokality je pokryta z 80 - 100% řasou r. *Klebsormidium* a mechy. Konkrétně 3 čtverce s inokulací řasy r. *Chlorella* s vápněním, *Klebsoridium*, *sinicí*









Nostoc s vápněním, kontrola s vápněním. Dva čtverce s inokulací řasy r. *Klebsormidium* s vápněním a *Myrmecia* s vápněním měly pokryvnost 30 - 40%. Pokryvnost 5 - 20% vykazovaly čtverce ošetřené řasou r. *Chlorella* a *Myrmecia* s vápněním. Na čtvercích ošetřených sinicí *Nostoc* a čtverci kontrola nebyly pozorovány žádné řasy ani mechy. Odhad pokryvnosti ověřila následná fluorescenční mikroskopie, která potvrdila přítomnost řasy r. *Klebsormidium* v 9 z 10 vzorcích půdy. Dále byla zjištěna přítomnost mechů, rozsivek *Pinnularia borealis*, *Hantzschia*, *Navicula (Luticola) nivalis*, iniciální *Nostoc*, *Navicula nivalis*, masové množství zelených kokálních řas (Obr.č. 12).

Výsledky vizuálního odhadu pokryvnosti vzorků v Petriho miskách jsou z lokality na výsypce Lítov označené Lítov 2 následující: Tři čtverce ošetřené řasou r. *Chlorella* s vápněním, *Chlorella* a kontrola s vápněním mají pokryvnost 80 - 100%. Tři čtverce s pokryvností 50 - 60 % byly ošetřeny sinicí *Nostoc*, řasou r. *Klebsormidium* s vápněním a kontrola. Čtverec ošetřený sinicí *Nostoc* s vápněním měl pokryvnost 30 - 40%. Čtverec s inokulovanou řasou r. *Klebsormidium* měl pokryvnost 20% a dva čtverce byly pokryty méně než 5% mechem a to čtverce ošetřené řasou r. *Myrmecia* s vápněním a *Myrmecia*.

Odhad pokryvnosti ověřila následná fluorescenční mikroskopie, která potvrdila přítomnost řasy r. *Klebsormidium* ve většině vzorcích půd. Dále byla zjištěna přítomnost mechů, rozsivek *Hantzschia*, *Microcoleus*, *Phormidium*, *Zygonium*, *Leptolyngbya*, *Navicula nivalis*, ve velkém množství zelené kokální řasy a kromě inokulované řasy r. *Klebsormidium* se podařilo ve vzorcích identifikovat i *Klebsormidium mucosum* (Obr.č. 13).

řasa	plocha	vápněno	odhad pokrývnosti	fluorescenční mikroskopie		foto	
CHLORELLA	Lítov 2	ano	70-80% <i>Klebsormidium</i>	<i>Klebsormidium</i> (velké mn.)		na velkých částicích - velké mn. kokálních řas, <i>Hantzschia</i>	
CHLORELLA	Lítov 2	ne	100% <i>Klebsormidium</i> , jehličí	<i>Klebsormidium</i> (krusty)			
KLEBSORMIDIUM	Lítov 2	ano	60% <i>Klebsormidium</i>	<i>Klebsormidium</i> (krusty)	mechy	dost <i>Phormidium</i> - dlouhé i krátké, možná i <i>Microcoleus</i> , <i>Hantzschia amphioxys</i> , trochu <i>Klebsormidium</i> , ojedinelé <i>Zygogonium ericetorum</i> ,	
KLEBSORMIDIUM	Lítov 2	ne	20% mechy a <i>Klebsormidium</i>			kokální zel., 10 sinicových buněk, krátké <i>Phormidium</i> - trošku	
MYRMECIA	Lítov 2	ano	<5% <i>Klebsormidium</i>	<i>Klebsormidium</i>		<i>Hantzschia</i> , <i>Zygogonium ericetorum</i> . Možná i <i>Botrydiopsis</i>	
MYRMECIA	Lítov 2	ne	<5% mechy		mechy (velké mn.)	mechy ve velkém mn., <i>Phormidium</i> , <i>Leptolyngbya</i> , balíky zelených řas, <i>Hantzschia</i> , <i>Navicula nivalis</i>	
NOSTOC	Lítov 2	ano	30-40% <i>Klebsormidium</i> + mechy	<i>Klebsormidium</i>		shluky a kokální zel.řasy - velké mn., i velké shluky velkých buněk (Myrmecoidni), 1 malý fragment <i>Phormidium</i>	
NOSTOC	Lítov 2	ne	50-60% mechy a <i>Klebsormidium</i>	<i>Klebsormidium</i>	mechy	balíčky kokálních zelených řas	
KONTROLA	Lítov 2	ano	80% <i>Klebsormidium</i>	<i>Klebsormidium</i>		kokální zelené - sólo i sacrinoidní balíčky, i <i>Myrmecia</i> - balíky, ojedinelé sinice - <i>Phormidium</i> , <i>Microcoleus</i>	
KONTROLA	Lítov 2	ne	60% <i>Klebsormidium</i> + mechy	<i>Klebsormidium</i>	mechy	<i>Phormidium</i> , iniciální <i>Leptolyngbya</i> , <i>Hantzschia</i> , <i>Klebsormidium mucosum</i> , <i>Microcoleus vaginatus</i>	

Obr.č. 13: Odhad pokrývnosti vzorku v procentech, druhové složení preparátů a fotografie konkrétních čtverců na ploše Lítov 2.

Výsypka	plocha	vápněno	odhad pokrývnosti	fluorescenční mikroskopie			foto
Lítov	1	ne	0% zjištěno vizuálně			drobné balíčky kokálních zelených řas	
Lítov	2	ne	30% <i>Klebsoridium</i>	<i>Klebsoridium</i>		zelené kokální řasy - malé mn., prázdné stránky rozsivek	
Lítov	3	ne	0% zjištěno vizuálně			bez nálezu	
Lítov	4	ne	0% zjištěno vizuálně			iniciální <i>Nostoc</i> , balíčky kokálních zelených řas	
Podkrušnohorská	1	ne	60% <i>Klebsoridium</i>	<i>Klebsoridium</i>		<i>Hantzschia</i> , iniciální <i>Nostoc</i> , drobné shluky zel.kokálních řas	
Podkrušnohorská	2	ne	70% <i>Klebsoridium</i> , mechy	<i>Klebsoridium</i>	mechy	<i>Hantzschia</i> , <i>Pinullaria borealis</i> , <i>Leptolyngbya</i> , zelené kokální řasy	
Podkrušnohorská	3	ne	30% <i>Klebsoridium</i>	<i>Klebsoridium</i>		drobné mn. zelených kokálních řas, <i>Hantzschia</i>	
Podkrušnohorská	4	ne	>60% <i>Klebsoridium</i> , mechy	<i>Klebsoridium</i>	mechy	balíčky drobných kokálních řas, <i>Pinnularia borealis</i> , <i>Radiococcaceae</i>	

Obr.č. 14: Odhad pokrývnosti vzorku v procentech, druhové složení preparátů a fotografie konkrétních čtverců na výsypce Lítov a Podkrušnohorské výsypce.

Výsledky vizuálního odhadu pokrývnosti vzorků v Petriho miskách jsou z kontrolních odběrů substrátu ze vzdálenosti 3 m od pokusných ploch na lokalitě Podkrušnohorské výsypky a výsypky Lítov následující: Z odebraných vzorků z lokality Lítov měly 3 čtverce vizuální pokrývnost 0 % a jeden čtverec byl pokryt ze 30 % řasou r. *Klebsormidium*. Při následná fluorescenční mikroskopii se nám vizuální odhad pokrývnosti potvrdil. Identifikovali jsme ještě drobné balíčky zelených kokálních řas, prázdné schránky rozsivek (jen malé množství) a iniciální sinici *Nostoc*. Z odebraných vzorků na lokalitě Podkrušnohorské výsypky měly 3 čtverce pokrývnost 60 - 70 % řasou r. *Klebsormidium* a mechy, jeden čtverec byl pokryt řasou r. *Klebsormidium* jen ze 30 %. Odhad pokrývnosti na Podkrušnohorské výsypce ověřila následná fluorescenční mikroskopie, která potvrdila přítomnost řasy r. *Klebsormidium* ve všech vzorcích. Dále jsme identifikovali mechy, rozsivku *Hantzschia*, *Pinullaria borealis*, *Radiococcaveae*, iniciální sinici *Nostoc* a značné množství zelených kokálních řas (Obr.č. 14).

5 Diskuse

Z celkových výsledků vyplývá, že cyprisové jílky na Podkrušnohorské výsypce jsou výhodnějším substrátem pro růst rostlin než uhelné a tufitové jílky (Tab.č. 2 - 4). To souhlasí s dřívějšími výsledky Frouze et al. (2005), který sledoval toxicitu 46 různých výsypkových substrátů pro roupici *Enchytraeus crypticus*. Porovnání růstu semenáčků (Tab.č. 2) a vlastností výsypkových substrátů (Tab.č. 1) ukazuje, že toxicita substrátů po těžbě může mít více příčin. Plochy, které jsme identifikovali jako toxické, měly nízké pH, vyšší obsah polyfenolů a dostupného hliníku (Tab.č. 1). U dvou z nich přesahovaly hodnoty arsenu hodnoty přípustné pro zemědělské půdy (Ministerstvo životního prostředí, 2002). To opět souhlasí s výsledky Frouze et al. 2005, který udává, že toxicita substrátů koresponduje s nízkým pH, které také zvyšuje rozpustnost hliníku a dalších kovů, které mohou přispívat k toxicitě substrátů (Van Gestel, 1992; Posthuma et al., 1988). Nicméně některé substráty mohou být toxické v důsledku vysoké koncentrace iontů (Frouz, 2005; Buekers, 2010). Půdy, na kterých probíhal terénní pokus lze označit za fyto toxické, proto jsme pro vytvoření biologické krusty vybrali sinice a řasy, které jsou schopné přežívat v oblastech s vysokou koncentrací solí a extrémními hodnotami pH (Kalina, 2005). Další výhodnou vlastností těchto organismů pro vytvoření biologických krust, je jejich rychlá schopnost regenerace, která je zásadní na plochách s častými disturbancemi (ať už se jedná o pouštní duny či výsypkové substráty). Tato výhodná schopnost byla v průběhu několika let zkoumána a prokázána na písčinych dunách v Izraeli (Kindron, 2007; Kidron et al., 2009; Kidron et al., 2010b) a písčinych substrátech v Holandsku (Pluis, 1994). Výskyt řas byl prokázán nejen na výsypkách na Sokolovsku, ale byl dokumentován a zkoumán také na plochách po těžbě uhlí na Mostecku (Lukešová et al., 1987).

Výsledky terénního pokusu, spočívajícím ve stanovení obsahu chlorofylu *a* na pokusných plochách, se ve všech odběrech nijak výrazně neliší od množství chlorofylu *a* na kontrolách (Obr.č. 4 - 11). To by naznačovalo, že inokulace ploch řasami a sinicemi nemá žádný vliv na tvorbu řasové krusty na těchto lokalitách. V posledním odběru došlo k prudkému nárůstu obsahu chlorofylu *a* na všech sledovaných variantách včetně kontrol.

To by mohlo znamenat, že v tomto období došlo na všech plochách k nárůstu řas a sinic, a nebo, že inokulovaná společenstva přerostla ze svých vymezených čtverců do okolí včetně kontrol. Skutečnost, že se tak stalo na všech plochách současně podporuje i vizuální posouzení plochy a složení společenstva, které je na všech plochách s dominancí druhu *r. Klebsormidium*.

To hovoří spíše pro druhou možnost, že za příznivé vlhkosti půdy přerostly řasy *r. Klebsormidium* všechny ostatní treatmenty. Velikost kontrolních čtverců (0,5 m) se tedy jeví jako nedostačující. Zjištění, že došlo k přerůstání krust do ostatních ploch také podporuje fakt, že na Velké Podkrušnohorské výsypce se zdá být podobný vývoj řas i na kontrolních plochách a je proto pravděpodobné, že inokulace neměla zásadní vliv pro rozvoj řasového společenstva. To potvrzuje i nález řas *r. Klebsormidium* na této ploše během předchozího průzkumu (Lukešová, 1987). Naproti tomu předchozí průzkum na Lítovské výsypce neukázal řasy žádné a i kontrolní odběry provedené na konci pokusu zaznamenaly řasy pouze na jedné ze čtyř kontrolních ploch. To by nasvědčovalo tomu, že inokulace na této ploše výrazně podpořila rozvoj řasové krusty. Z hlediska tvorby krust je zásadní zejména zelená řasa *r. Klebsormidium* s vláknitou stélkou, která tvoří snáze biologické krusty. To dokládají i fotografie pořízené na Lítovské výsypce v březnu 2011 (Příl.č.5). Ke stejnému výsledku dospěl ve svých studiích na písčiny substrátech v Holandsku i Pluis (1994).

Z množství chlorofylu *a* v průběhu roku 2009 lze usuzovat, že přestože došlo k založení pokusu v časně jarním období, vlhkost zřejmě nebyla dostačující, aby mohlo dojít k výraznějšímu namnožení řas. K výraznému nárůstu řas a sinic došlo přes dlouhé zimní období, kdy bylo na substrátech větší množství povrchové vlhkosti. Toto zjištění potvrzuje i výzkum biologické krusty v Holandsku (Pluis, 1994). V dalších pokusech by bylo vhodnější aplikovat řasy v podzimním období, aby byla zajištěna dostatečná vlhkost, která je jedním z hlavních parametrů pro jejich růst. Tento fakt podporují i studie z Negevské pouště v Izraeli, kde byla zjištěna pozitivní korelace mezi obsahem chlorofylu a vlhkostí v průběhu dne. (Kidron et al., 2000; Kidron et al., 2002; Kidron et al., 2009; Kidron et al. 2010a; Levin et al., 2007). Dále bylo zjištěno, že posun biologické krusty negativně

koreloval s posunem slunečního záření v průběhu dne (Kidron et al., 2010b). Výzkumem bylo prokázáno, že zatímco fyzikální podmínky určují druhové složení, a tedy typ krusty, krusta je zase odpovědná za fyzikální vlastnosti povrchu, které mohou do značné míry ovlivnit ekologické a geomorfologické procesy (Zhao et al., 2010).

Po zjištění, že došlo k přerůstání řas do ostatních ploch, jsme se rozhodli k odběru vzorků a pomocí fluorescenční mikroskopie ověřit, zda jsou na daných čtvercích inokulované řasy, či převládly jen některé rody. Z výsledků jasně vyplývá, že na zvolených lokalitách se nejvíce namnožila a nejlépe rozšířila řasa *Klebsormidium*. Jen ve 2 vzorcích (ze 120) byly zjištěny buňky řasy rodu *Myrmecia* a v některých také přítomnost iniciální sinice *Nostoc*. Inokulovaná řasa *Chlorella* ani na jedné z ploch nebyla zjištěna. Nejenom, že se řasa r. *Klebsormidium* vyskytovalo na drtivé většině čtverců, ale také vytvořila viditelné krusty (Příl.č. 5).

Krusty řasy *Klebsormidium* byly identifikovány na Podkrušnohorské výsypce i na výsypce Lítov. Na Podkrušnohorské výsypce, narozdíl od Lítova, se ve větším množství objevovaly mechy. Na obou lokalitách byla zjištěna přítomnost také jiného *Klebsormidia*, než jsme na lokality nanесли, a to *Klebsoridia mucosum*, které se na plochy pravděpodobně dostalo z blízkého okolí pokusných ploch. Tento jev koresponduje i s výzkumem Rydgrena et al. (2011), jehož výzkum ukázal, že po ponechání ploch primární sukcesy se vegetační kryt z řas, mechů a lišejníků podobal vegetačnímu krytu v blízkém okolí. Lze tedy potvrdit, že druhová skladba kopíruje sukcesní trajektorii ve směru vegetace v okolí (Rydgren et al., 2011). Výše zmíněné pravděpodobně souvisí i s výskytem většího množství mechů na plochách z Podkrušnohorské výsypky než z Lítova. Bezprostřední okolí ploch na Podkrušnohorské výsypce je výrazným zdrojem mechů, ať už se jedná o blízký porost několika stromů břízy bělokoré (*Betula pendula*) nebo o velkou plochu s porostem travin (Př.č. 2).

Na Lítovské výsypce byly řasy zaznamenány pouze v jednom kontrolním vzorku, a taktéž dlouhodobé studie na sousední substrátově podobné ploše prováděné před založením pokusu nepotvrdily presenci řas (Hrčková, 2008).

To svědčí o tom, že na ploše Lítov měla inokulace významný stimulační vliv pro rozvoj společenstva.

Statisticky významný vliv vápnění substrátů byl prokázán pouze na výsypce Lítov. Na Podkrušnohorské výsypce prokázán nebyl, přestože pH na obou plochách vlivem vápnění vzrostlo. Úprava pH vápněním však neměla prokazatelný vliv ani na množství chlorofylu, ani na množství a diverzitu mikroorganismů v substrátech.

Podářilo se vytvořit biologické krusty na substrátech, které byly pro vyšší rostliny fyto toxické. Toto zjištění potvrzuje i Lukešová a Komárek (1987), která se zabývala rozšířením řas a mechorostů na toxických substrátech v severočeském Mostě, kde potvrdila možnost těchto organismů osídlovat extrémní stanoviště.

6 Závěr

Uhelné a tufitové jíly jsou výsypkové substráty, které jsou výrazně nepříznivé pro růst rostlin. Naopak na cyprisových jílech je růst rostlin za jinak příhodných vlhkostních podmínek poměrně rychlý.

Vytvoření biologické krusty je jednou z možností, jak pozitivně ovlivnit vlastnosti substrátů, tedy i fyto toxických půd vznikajících navážením materiálu při povrchové těžbě uhlí.

Terénní pokus potvrdil, že biologickou krustu lze na daných fyto toxických plochách vytvořit, aniž by musely být ošetřeny dolomitických vápencem. Jediný rod řasy z testovaných, který může na těchto půdách přežít a namnožit se, až do té míry, aby vytvořil krustu, je prokazatelně rod *Klebsormidium*. Závěrem lze tedy říci, že se podařilo vytvořit biologickou krustu a tím přispět ke zmírnění toxicity výsypkových substrátů.

7 Literatura

Belnap, J., Lange, O. (2001): Biological Soil Crusts: Structure, Function, and Management. *Springer*, 503 pp.

Bishoff, H.W. & Bold, H.C. (1963): Phycological Studies. IV., Some soil algae from Enchanted Rock and related algal species. *Univ. Texas Publ.*, 95 pp.

Buekers, J., Mertens, J, Smolders, E. (2010): Toxicity of the molybdate anion in soil is partially explained by effects of the accompanying cation or by soil pH. *Environmental toxicology and chemistry*, pp. 1274 - 1278.

Culek, M. (1996): Biogeografické členění české republiky, *Enigma*, 347 pp.

Csotonyi, J. T., Swiderski, J., Stackebrandt, E., Yurkov, V. (2010): A new environment for aerobic anoxygenic phototrophic bacteria: biological soil crusts. *Environmental microbiology reports* . 5, 2, 651 - 656 pp.

Česká geologická služba – Geofond, Ministerstvo životního prostředí, (2008): *Surovinové zdroje České republiky, Nerostné suroviny*, from <http://www.geofond.cz/cz/o-nas/dokumenty/rocenka-surovinove-zdroje-cr-nerostne-suroviny>, 168 pp.

Dimitrovský, K. (2001). Tvorba nové krajiny na Sokolovsku. *Sokolovská uhelná, a. s.*

Ettl, H., Gartner, G. (1988): Chlorophyta II, Tetrasporales, Chlorococcales, Gloedendrales. 1. 436 pp.

Frouz, J., Keplin, B., Pizl, V., Tajovský, K., Starý, J., Lukešová, A., Nováková, A., Balík, V., Hanel, L., Materna, J., Duker, C., Chalupský, J., Rusek, J., Heinkele, T. (2001): Soil biota and upper soil layer

development in two contrasting post-mining chronosequences. *Ecological engineering*, 17 (2-3), pp. 275 - 284.

Frouz, J., Křišťufek, V., Bastl, J., Kalčík, J., Vaňková, H. (2005): Determination of toxicity of spoil substrates after brown coal mining using a laboratory reproduction test with *Enchytraeus crypticus* (*Oligochaeta*). *Water air and soil pollution*. 162 (1 - 4), pp. 37 - 47.

Frouz, J., Elhottová D., Kuráž, V., Šourková, M., (2006): Effects of soil macrofauna on other soil biota and soil formation in reclaimed and unreclaimed post mining sites: Results of a field microcosm experiment. *Applied soil ecology*, 33 (3), pp. 308 - 320.

Frouz, J., Popperl J., Přikryl I., Štrudl J. 2007: Tvorba nové krajiny na Sokolovsku, *Sokolovská uhelná, Právní nástupce a.s.*, 26 pp.

Frouz, J., Prach, K., Pizl V. (2008): Interactions between soil development, vegetation and soil fauna during spontaneous succession in post mining sites. *European journal of soil biology*, 44 (1), pp. 109 - 121.

Hendrychová, M. (2008): Reclamation success in post-mining landscapes in the Czech Republic: A review of pedological and biological studies. *Journal of Landscape Studies*. 1, 5, 63 - 78 pp.

Hezina, T. (2000): Porovnání koncentrací rozpuštěných látek ve výsypkových vodách a neutralizace kyselých vod jílovými minerály - závěrečná zpráva, from <http://home.zf.jcu.cz/public/departments/lae/text/2000/6vodySU.pdf>.

Holá, V. (2007): Metody průkazu tvorby biofilmu u lékařsky významných mikrobu. Dizertační práce, Masarykova univerzita Brno, 70 pp.

Hrčková, K. (2008): Algae and cyanobacteria colonizing toxic soils on coal-mining dumps, Diplomová práce, *Jihočeská universita v Českých Budějovicích*, 69 pp.

Chuman, T. (2005): Změna krajiny vlive těžby nerostných surovin na Skutečsku. *Venkovská krajina*. 3, 4, s. 60 - 63 pp.

Kalina, T., Váňa, J. (2005): *Sinice, řasy, houby, mechorosty a podobné organismy v současné biologii*, Karolinum, 606 pp.

Kidron G. J., Barzilay, E., Sachs, E. (2000): Microclimate control upon sand microbiotic crusts, western Negev Desert, Israel. *Geomorphology*, 36 (1-2), pp. 1 - 18.

Kidron, G. J., Herrnstadt, I., Barzilay, E. (2002): The role of dew as a moisture source for sand microbiotic crusts in the Negev Desert, Israel. *Journal of arid environments*, 52 (4), pp. 517 - 533.

Kidron, G. J. (2007): Millimeter-scale microrelief affecting runoff yield over microbiotic crust in the Negev Desert. *Catena*, 70 (2), pp. 266 - 273.

Kidron, G. J., Vonshak, A., Abeliovich, A. (2009): Microbiotic crusts as biomarkers for surface stability and wetness duration in the Negev Desert. *Earth surface processes and landforms*, 34 (12), pp. 1594 - 1604.

Kidron, G. J., Vonshak, A., Dor, I., Barinová, S., Abeliovich, A. (2010a): Properties and spatial distribution of microbiotic crusts in the Negev Desert, Israel. *Catena*, 82 (2), pp 92 - 101.

Kidron, G. J., Temina, M. (2010b): Lichen Colonization on Cobbles in the Negev Desert Following 15 Years in the Field. *Geomicrobiology journal*, 27 (5), pp. 455 - 463.

Komárek, J. (1998): Cyanoprokaryota, Teil 1, Chronococcales. 3. 548 pp.

Krajíček, L., Rothbauer, I. (2003): Územní prognóza území dotčeného těžbou hnědého uhlí na Sokolovsku, *Atelier T-plan*, pp. 16 - 27.

Kryl, V. (2006): Hnědé uhlí jako strategická surovina v primárních zdrojích výroby elektrické energie v ČR. *Sborník vědeckých prací Vysoké školy báňské – Technické univerzity Ostrava*, pp. 9 - 13.

Kula, E. (2007): Půdní a epigeická fauna stanovišť ovlivněných vápněním a její dynamika. *Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, Lesnická a dřevařská fakulta, Grantový projekt Lesy ČR, s.p.*, 24 pp.

Levin, N., Kidron, G. J., Ben-Dor, E. (2007): Surface properties of stabilizing coastal dunes: combining spectral and field analyses. *Sedimentology*, 54 (4), pp. 771 - 788.

Lukešová, A. (2001): Soil Algae in Brown Coal and Lignite Post Mining Areas in Central Europe (Czech republic and Germany). *Restoration Ecology*, 9 (4), pp. 341 - 350.

Lukešová, A., Komárek, J. (1987): Succession of soil algae on dumps from strip coal-mining in the Most region (Czechoslovakia). *Folia geobotanica & phytotaxonomica*, 22 (4) pp. 355 - 362.

Lukešová A., Kociánová M., Váňa J., Štursová H., Elster J., Harčarik J., Halda J., Kocourková J., & Jankovská V. (2010): Vyvažované půdy tundry Krkonoš a Abisko Mts – předběžná srovnávací studie. *Opera Corcontica* 47: 55 – 82

Ministerstvo životního prostředí (2002): Vyhláška č. 355/2002 Sb. kterou se stanoví emisní limity a další podmínky provozování ostatních stacionárních zdrojů znečišťování ovzduší emitujících těkavé organické látky z procesů aplikujících organická rozpouštědla a ze skladování a distribuce benzínu, Sbírnka zákonů, 213 pp.

Mudrak, O., Frouz, J., Velichova, V. (2010): Understory vegetation in reclaimed and unreclaimed post-mining forest stands. *Ecological Engineering*. 36, pp. 783 - 790.

Pietrasiak, N., Johansen, J., Drenovsky, R. E. (2011): Geologic composition influences distribution of microbiotic crusts in the Mojave and Colorado Deserts at the regional scale. *Soil biology & biochemistry*. 5, 2, 967 - 974 pp.

Pluis, J. L. A. (1994): Algal crust formation in the inland dune area, Laarder Wasmear, the Netherlands Plant Ecology. *Vegetatio*. 113, pp. 41 - 51.

Posthuma, L., Noteboom, J., de Groot, A.C., Peijnenburg, W.J.G.M. (1988): Soil acidity as a major determinant of zink partitioning and zink uptake in oligochaete worms exposed in contaminated fields soils, in S. Sheppard, J., Bembridge, M. Holmstrup and L.Posthuma (eds), *Advances in Earthworm Ecotoxicology. SETAC press, Pencasola*, pp.111-127.

Poulickova, A., Jurcak, J.(2001): *Maly obrazovy atlas nasich sinic a řas*, Univerzita Palackeho, 81 pp.

Prach, K. (2006): Přiroda pracuje zadarmo: Technicka, nebo přirodnı rekultivace? *Vesmır* 85. 8, 5, 272 - 277 pp.

Prach, K., Rehounek, K., Rehounek, J., Konvalinkova, P. (2001): Ecological Restoration of Central European Mining Sites: A Summary of a Multi-site Analysis. *Landscape research*. 2, 3, s. 263 - 268 pp.

Rydgren, K., Halvorsen, R., Odland, A., Skjerdal, G. (2001): Restoration of alpine spoil heaps: Successional rates predict vegetation recovery in 50 years. *Ecological engineering*. 2, 2, 294 - 301 pp.

Řehoř, M., Ondráček, V., Šálek, M. (2004): Přínos výzkumných projektů pro rekultivační praxi Severočeských dolů, a.s. Chomutov, příloha *Zpravodaje Hnědého uhlí 4/2009*, pp. 78 - 82.

Salek, M., Hendrychova, M., Rehor, M. (2010): Breeding habitat of sparrowhawks, *Accipiter nisus* on spoil heaps after coal mining. *Acta oecologica-international journal of ecology*. 2, 2, 197 - 201 pp.

Sourkova, M., Frouz, J., Santuckova, H. (2005): Accumulation of carbon, nitrogen and phosphorus during soil formation on alder spoil heaps after brown-coal mining, near Sokolov (Czech Republic). *Geodera*. 1-2, 1, 203 - 214 pp.

Stamach, K. (1966): Cyanophyta - sinice: Glaukophyta - Glaukofity. 1. 806 pp.

Svoboda, I. (2000): Rekultivace území po těžbě uhlí povrchoým způsobem, *IUAPPA 2000*, 29 - 32 pp.

Szczepanska, J., Twardowska, I. (1998): Distribution and environmental impact of coal-mining wastes in Upper Silesia, Poland, *Environmental geology*. 38(3), 249 pp.

Trochová, J. (1999): Sukcese půdních řas a sinic na výsypkách po těžbě uhlí v oblasti Sokolova, Bakalářská práce. *Biologická fakulta Jihočeské univerzity*, 13 pp.

Van Gestel, C.A.M. (1992): The influence of soil characteristic on the toxicity of chemicals for Earthworms. *Ecotoxicity od Earthworms*. 7. 44 - 54 pp.

Voštová, V., Růžička, M. (2006): Povrchová těžba a optimální rekultivace, from http://www.umad.de/infos/iuappa/pdf/B_21.pdf, 191 - 193 pp.

Vráblíková, J., Vráblík, P. (2009): Návrh postupů pro revitalizaci krajiny v Podkrušnohoří, *Studia oecologica*, II/2009, 3-8/96 pp.

Vráblíková, J., Vráblík, P. (2009): Těžba uhlí - významná disparita Podkrušnohoří. *Studia Oecologica*. 1, 1, 58 - 65 pp.

Zhao, H., Guo, Y., Zhou, R., Drake, S. (2010): Properties and spatial distribution of microbiotic crusts in the Negev Desert, Israel, *Catena*, 82 (2), pp. 92 - 101.

Zrůst, J. (2003): Riziko pěstování brambor v půdách kontaminovaných těžkými kovy, *Výzkumný ústav rostlinné výroby*, 15 pp.

8 Přílohy

Příloha č. 1 : Odebrané vzorky substrátů k laboratornímu pokusu.



Substrát č. 1: Uhelný jíl z výsypky Lítov (foto: L. Venclovská).

Substrát č.2: Uhelný jíl z výsypky Chodov (foto: L. Venclovská).

Substrát č.3: Cyprisový jíl z Podkrušnohorské výsypky (foto: L. Venclovská).

Substrát č.4: Cyprisový jíl z Podkrušnohorské výsypky (foto: L. Venclovská).

Substrát č.5: Tufitový jíl z Podkrušnohorské výsypky (foto: L. Venclovská).

Příloha č. 2: Založení terénního pokusu.



Založení pokusu na Podkrušnohorské výsypce (vlevo) a výsypce Lítov (vpravo) (foto: J. Frouz).



Založení pokusu na Lítovské výsypce (foto: L. Venclovská).



Označení pokusných ploch na výsypce Lítov (foto: L. Venclovská).



Pokusné plochy na Podkrušnohorské výsypce zvané Skluz 1 a Skluz 2

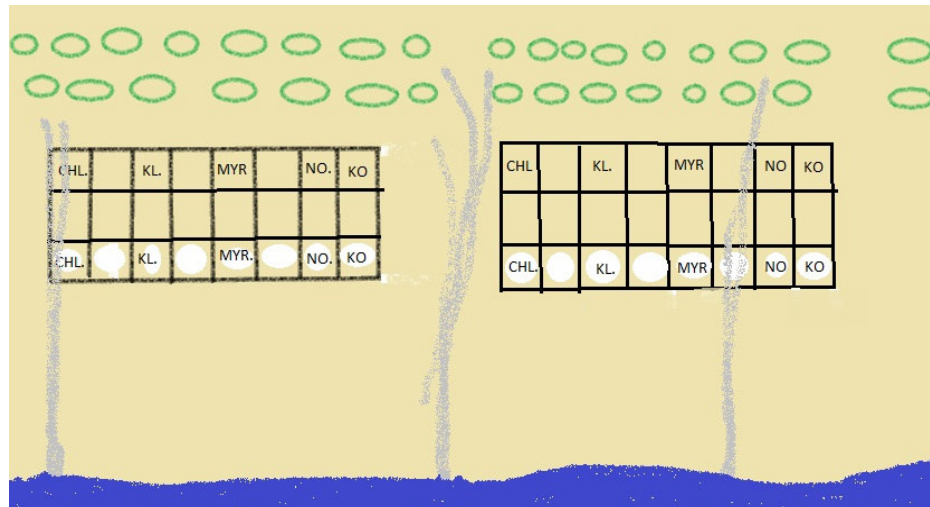
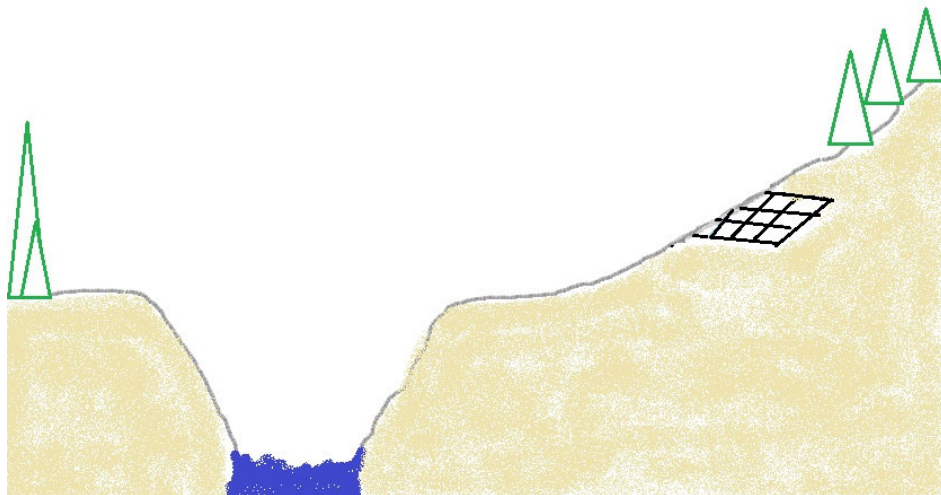


Schéma rozmístění ploch pro terénní pokus na výsypce Lítov, způsob ošetření včetně vyznačení vápnění bílou barvou. Zelená kola označují porost jehličnanů, modrá barva vodu a šedá barva vrásky v půdě.



Profil terénu na výsypce Lítov.

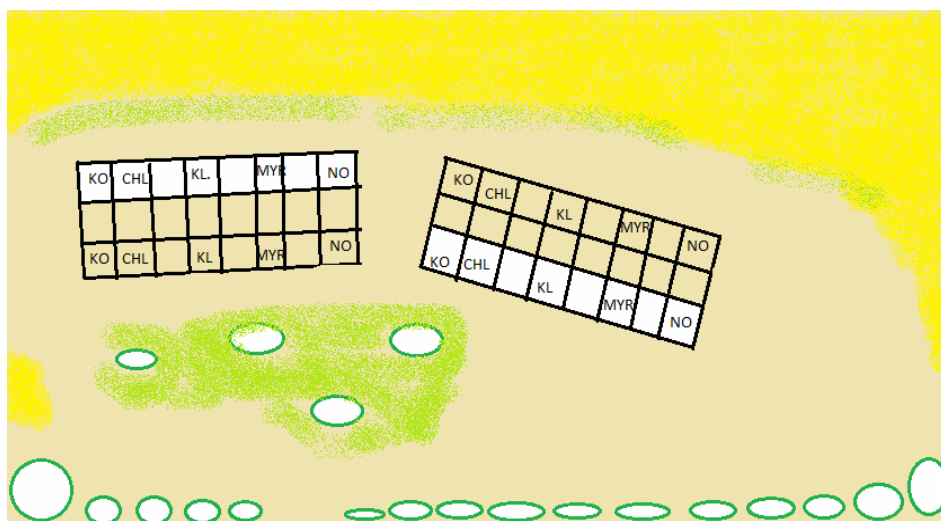
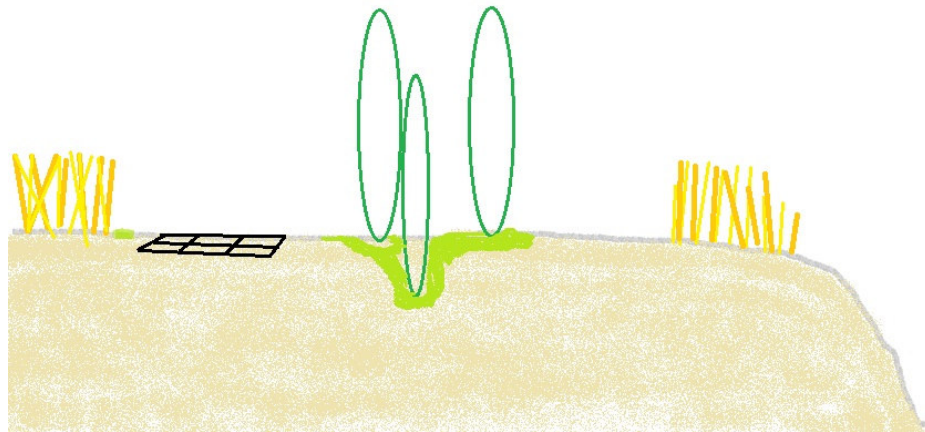
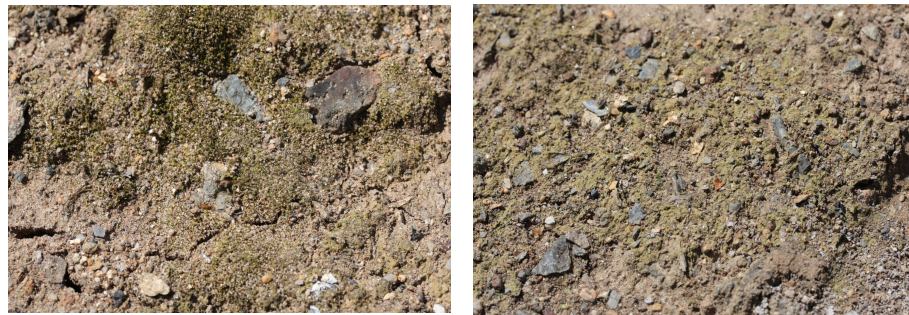


Schéma rozmístění ploch pro terénní pokus na Podkrušnohorské výsypce, způsob ošetření ploch včetně vyznačení vápnění bílou barvou. Žlutá barva značí travnatý porost, světle zelená mechy a zelené oblouky porost listnatých stromů (převážně břízy bělokoré).

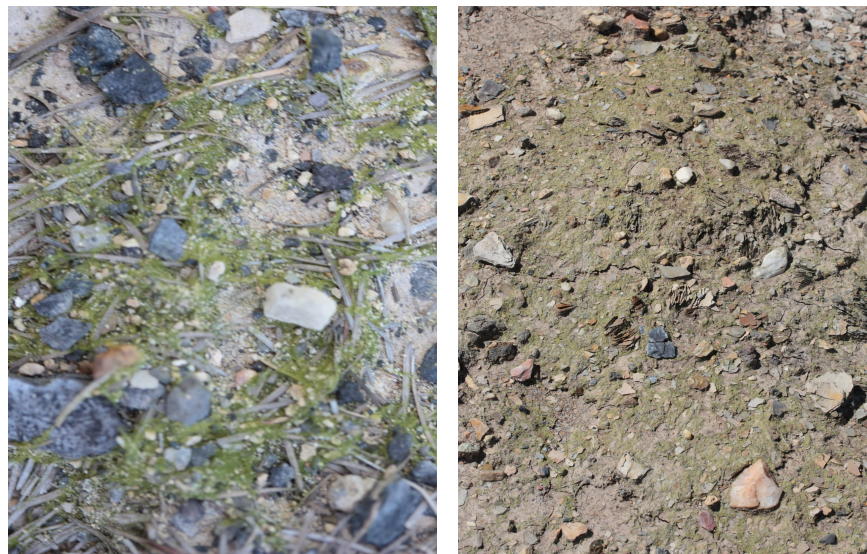


Profil terénu na Podkrušnohorské výsypce.

Příloha č. 3: Odběr vzorků ze dne 27.07.2009.



Biologická křusta na Podkrušnohorské výsypce (foto: L. Venclovská).



Biologické křusty na výsypce Lítov (foto: L. Venclovská).

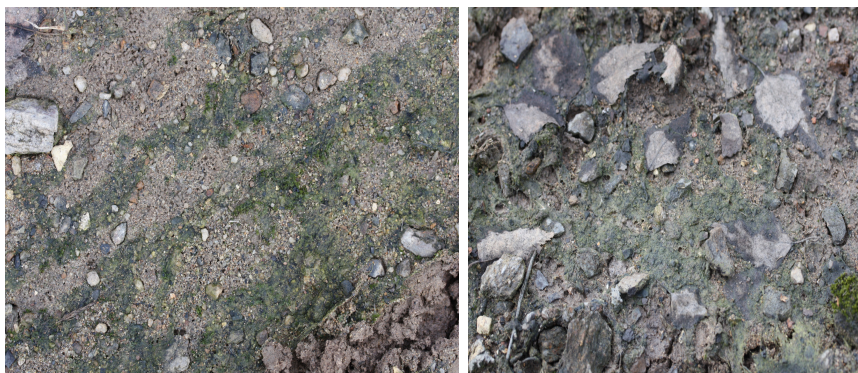


Biologická křusta na výsypce Lítov (foto: L. Venclovská).

Příloha č. 4: Odběr vzorků ze 18.03.2010.



Pokusné plochy na lokalitě Lítov (foto: L. Venclovská).



Biologická krusta na Podkrušnohorské výsypce (foto: L. Venclovská).

Příloha č. 5: Odběr vzorků 30.03.2011



Odběr vzorků z plochy Skluz 2 (foto: L. Venclovská).



Ukázka krusty *Klebsormidia* na čtverci ošetřeném vápnem na ploše Skluz 1 (foto: L. Venclovská).



Ukázka krusty *Klebsormidia* na čtverci ošetřeném sinicí *Nostoc* na ploše Skluz 2 (foto: L. Venclovská).



Plochy na výsypce Lítov (foto: L. Venclovská).



Ukázka krusty *Klebsormidia* na čtverci ošetřeném sinicí *Nostoc* s vápněním na ploše Lítov 1 (foto: L. Venclovská).



Ukázka krusty *Klebsormidia* na čtverci ošetřeném řasou *Chlorella* na ploše Lítov 1 (foto: L. Venclovská).



Splachy pod pokusnými plochami v depresích na lokalitě na Lítovské výsypce (foto: L. Venclovská).



Splachy pod pokusnými plochami v depresích na lokalitě na Lítovské výsypce (foto: L. Venclovská).

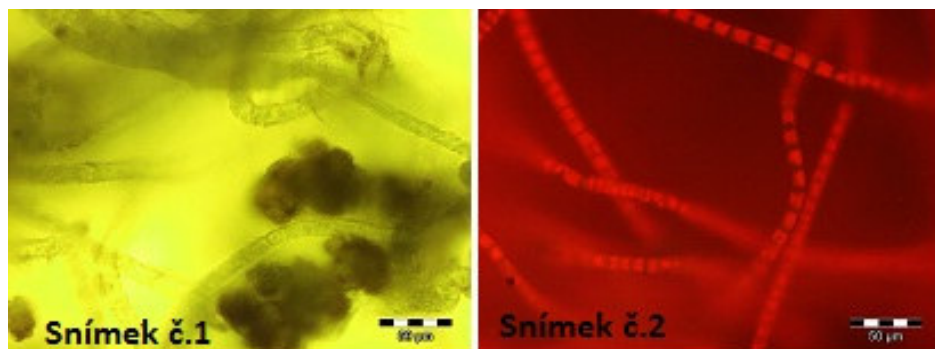


Splachy pod pokusnými plochami v depresích na lokalitě na Lítovské výsypce (foto: L. Venclovská).

Příloha č. 6: Fluorescenční mikroskopie

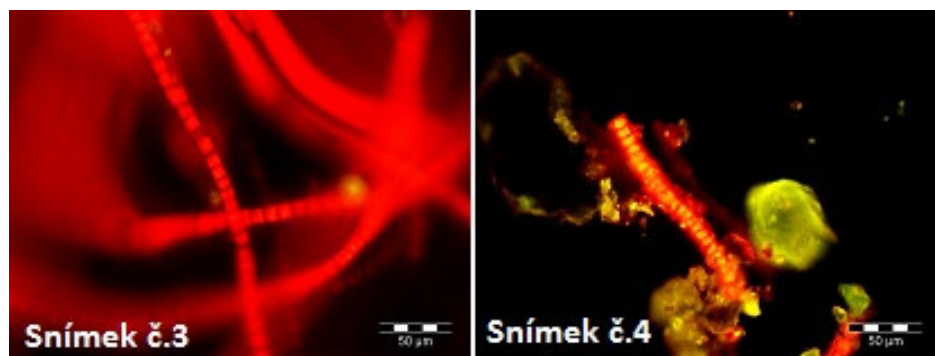


Zpracování preparátů pro fluorescenční mikroskopii ze vzorků půd (foto: L. Venclovská).



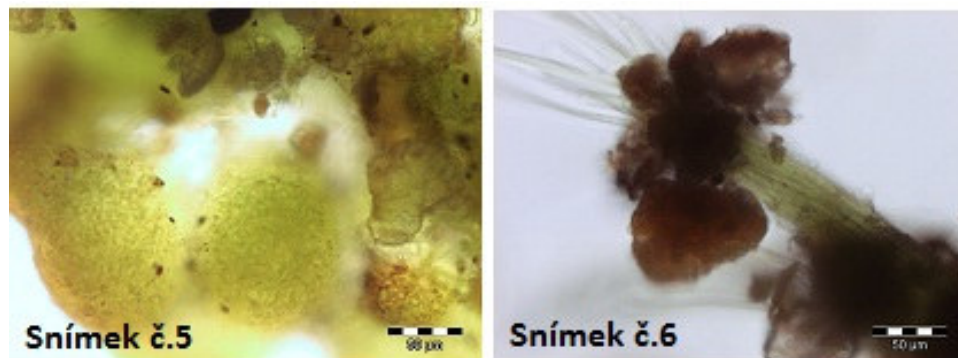
Snímek č.1: *Klebsormidium* ze světelného mikroskopu preparátu z půdy ošetřené *Klebsormidiem* na ploše Skluz 1 (foto: L. Venclovská).

Snímek č.2: *Klebsormidium* z fluorescenčního mikroskopu z preparátu z půdy ošetřené *Klebsormidiem* na ploše Skluz 1 (foto: L. Venclovská).



Snímek č.3: *Klebsormidium* z fluorescenčního mikroskopu preparátu z půdy ošetřené *Chlorellou* na ploše Lítov 1 (foto: L. Venclovská).

Snímek č.4: *Klebsormidium* a sinice *Nostoc* z fluorescenčního mikroskopu preparátu z půdy ošetřené *Chlorellou* na ploše Skluz 1 (foto: L. Venclovská).



Snímek č.5: *Sinice Nostoc* z preparátu z půdy ošetřené *Klebsormidiem* s vápněním na ploše Skluz 2 (foto: L. Venclovská).

Snímek č.6: *Sinice Microcoleus vaginatus* z preparátu z půdy ošetřené *Myrmecií* s vápněním na ploše Skluz 2 (foto: L. Venclovská).