

**Univerzita Karlova**  
**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Ekologie



**Bc. Jan Mengr**

Akumulace těžkých kovů v tkáních bezobratlých živočichů na struskopopílkových odkalištích

Accumulation of heavy metals in tissues of terrestrial arthropods at fly ash deposits

Diplomová práce

Vedoucí práce: RNDr. Robert Tropek, PhD.

Praha, 2017

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze,

Podpis: .....

Jan Mengr

## **Poděkování**

Na prvním místě bych rád poděkoval svému školiteli Robertu Tropkovi za zadání a vedení této práce, trpělivost, motivaci, poskytnutí řady podkladů a dobré rady. Rovněž bych rád poděkoval Jakubu Strakovi za determinaci blanokřídých a Stanislavě Matějkové s Martinem Mihaljevičem za měření koncentrací prvků ve vzorcích. Filipu Tichánkovi děkuji za poradenství a Gabriele Wofkové děkuji za poskytnutí fylogenetické matice pro sestavení fylogenetického stromu. Nemohu opomenout poděkovat Jiřímu Hadravovi, Danu Bendovi a Zuzaně Matějkové za pomoc při sběru materiálu. Velký dík patří samozřejmě všem mým blízkým za podporu po celou dobu studia.

Podstatná část této práce byla hrazena Grantovou agenturou ČR (P504/12/2525)

## Obsah

1. Úvod a cíle práce.....	7
2. Uvedení do problematiky .....	8
2.1. Píščiny mizí a nahrazuje je popílek.....	8
2.2. Popílkoviště a jejich význam pro psamofilní druhy žahadlových blanokřídých.....	10
2.3. Vybrané prvky v popílku .....	12
2.4. Vlivy vybraných prvků na organismy .....	13
Hypotézy .....	21
3. Materiál a metody .....	21
3.1. Lokality .....	21
3.2. Sběr materiálu .....	23
3.3. Zpracování vzorků .....	23
3.4. Statistické analýzy.....	25
Koncentrace prvků v substrátu podle typu substrátu .....	25
Koncentrace prvků v substrátu podle jednotlivých lokalit.....	25
Koncentrace prvků ve tkáních hmyzu podle typu substrátu .....	26
Koncentrace prvků ve tkáních hmyzu podle typu substrátu a potravní strategie	26
4. Výsledky .....	27
4.1. Koncentrace prvků v substrátu popílkovišť a písčín.....	27
4.2. Koncentrace prvků ve tkáních žahadlových blanokřídých (vliv substrátu)....	30
4.3. Koncentrace prvků ve tkáních žahadlových blanokřídých (vliv substrátu a potravy) .....	30
5. Diskuze.....	36
6. Závěr .....	40
7. Literatura .....	41
8. Přílohy.....	56

## Abstrakt

Přirozená stanoviště psamofilních druhů žahadlových blanokřídlých, kterými jsou vnitrozemské písčiny, mizí, kvůli čemuž se tyto druhy stávají ohroženými nebo dokonce vymírají. V poslední době se však ukazuje, že žahadloví blanokřídlí nalézají náhradu za písek v popílku odkališť. Popílek je ovšem bohatý na těžké kovy, které do svých tkání akumulují rostliny, obratlovci a v neposlední řadě také bezobratlí. Tyto prvky pak různým organismům působí rozličné potíže, od mírných komplikací až po těžké komplikace mnohdy končící smrtí jedince. Cílem této práce je zjistit, zda a případně které ze sedmnácti vybraných prvků (Ag, Al, As, Ba, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Hg, Mn, Ni, Pb, Se, Sr, V a Zn) 55 druhů žahadlových blanokřídlých ze dvou písčin a dvou odkališť akumulují do svých tkání v závislosti na typu substrátu a potravní strategii. Pomocí t-testu bylo prokázáno, že koncentrace všech vybraných prvků jsou vyšší v substrátu odkališť než v substrátu písčin, přičemž pomocí metody PCA bylo zjištěno, že ačkoliv jsou koncentrace v substrátu obou písčin podobné, substráty odkališť se značně liší. Pomocí metody GLM a GEE za použití fylogenetické korekce byl testován vztah mezi typem substrátu a koncentrací vybraných prvků ve tkáních blanokřídlých. Ukázalo se, že blanokřídlí z odkališť nadpoloviční část vybraných prvků do svých tkání akumulují ve větším množství než blanokřídlí z referenčních lokalit. Nakonec byl testován vztah koncentrace vybraných prvků ve tkáních blanokřídlých k typu substrátu a potravní strategii pomocí metody GEE za použití fylogenetické korekce, přičemž se ukázalo, že potravní strategie má na množství naakumulovaných prvků jen malý vliv. Poznatky, které tato práce přinesla, jsou klíčové pro další výzkum vlivu vybraných prvků na žahadlové blanokřídlé z odkališť a v budoucnu podpoří argumenty pro ochranu odkališť jako biotopu důležitého pro ochranu některých druhů žahadlových blanokřídlých i dalších obyvatel odkališť před vymřením.

**Klíčová slova:** těžké kovy, žahadloví blanokřídlí, vátý písek, odkaliště, písek, popílek, ekotoxikologie, akumulace

## **Abstract**

Natural habitats of psammophilous species of aculeate hymenoptera, which are inland drift sand, are disappearing. This causes these species to become threatened or even extinct. However, ash contains heavy metals that are accumulated in tissues by plants, vertebrates, and invertebrates. These elements cause various organisms different complications, ranging from mild complications to serious complications often ending with the death of an individual. The aim of this work is to determine whether and, if so, what selected elements (Ag, Al, As, Ba, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Hg, Mn, Ni, Pb, Se, Sr, V and Zn) 55 species of aculeate hymenoptera accumulate from two coal fly ash deposits and two sand dunes in their tissues, depending on the type of substrate and the food strategy. Using t-test, the concentrations of all selected elements were found to be higher in fly ash than in sand and using the PCA method it was found, that although sands are similar in terms of element concentration to each other, the ash deposits differ from each other. The concentration of selected elements in the hymenoptera relative to the substrate type was tested using the GLM and GEE method with phylogenetic correction. The results show that the hymenoptera from coal fly ash deposits, related to the type of substrate, accumulate more than half of the selected elements in their tissues in higher concentrations than hymenoptera from sands. Finally, the relation of the concentration of selected elements in the hymenoptera tissue to the substrate type and the feeding strategy was tested using the GEE method with phylogenetic correction, showing that food strategy has little effect on the accumulation of selected elements. The knowledge gained by this work is crucial for further research on the influence of selected elements on hymenoptera from coal fly ash deposits and will support future arguments for conservation of coal fly ash deposits as important biotope for protecting hymenoptera and other coal fly ash inhabitants from extinction.

**Key words:** heavy metals, Aculeata, drift sand, coal fly ash deposit, sand, fly ash, ecotoxicology, accumulation

## 1. Úvod a cíle práce

Žahadloví blanokřídlí svou rozmanitostí přímo vybízejí k volbě jako modelová skupina bezobratlých pro studium postindustriálních stanovišť. Většina z nich má malé areály, jsou mezi nimi zastoupeni masožravé i býložravé druhy a jsou atraktivní skupinou vzhledem ke své funkci opylovačů v ekosystémech. S malým areálem ovšem souvisí i úzká specializace na konkrétní typy stanovišť, která v mnohých případech v přírodě mizí (Macek et al. 2010)

Obecně se diverzita stanovišť v krajině zmenšuje. Ubývají přechodné typy stanovišť, jakými jsou například ranně sukcesní plochy (Riksen et al. 2006). Příkladem takového stanoviště jsou vnitrozemské písčiny. Na písek jakožto substrát jsou mimo jiných vázány psamofilní druhy žahadlových blanokřídlých (Macek et al. 2010). Problém tkví v tom, že díky činnosti člověka, přírodní váté písky mizí. Jednak je postupný zánik těchto stanovišť způsoben aktivním zalesňováním, ale také absencí velkých býložravců a požárů coby disturbančních činitelů (Řehouňková et al. 2016).

V tomto bodě se projevuje ochranný potenciál postindustriálních stanovišť. Žahadloví blanokřídlí se totiž z písčin přesouvají na strukturou podobný jemnozrný substrát, jakým je popílek (Řehounek et al. 2010; Tropek and Řehounek 2012; Tropek et al. 2013). Popílek však není ideální náhradou za písek. Těžké kovy obsažené v popílku ho totiž činí potenciálně toxickým pro žahadlové blanokřídlé podobně, jako je tomu například u obratlovců (Hopkins et al. 1998; Rowe et al. 2001; Hopkins et al. 2002; Ganser et al. 2003).

U různých skupin od rostlin (Caroli et al. 1999; Zákravský et al. 2004) přes obojživelníky (Hopkins et al. 1998; Rowe et al. 2001) po vodní (AbdAllah 2014) a terestrické bezobratlé (Eeva et al. 2004; Gramigni et al. 2011; Gramigni et al. 2013) byla dokumentována akumulace těžkých kovů na odkalištích a také více či méně výrazné projevy vlivu toxicity těchto prvků na organismy. Existují však také poznatky o odolnosti vůči vlivům těžkých kovů nebo o jejich účinné detoxikaci. Takové vlastnosti pak některé organismy předurčují k úspěšnému přežití na odkalištích.

V této práci je zkoumán rozdíl mezi dvěma písčinami a dvěma odkališti. Zkoumáno je jak chemické složení substrátu pro zjištění koncentrací vybraných prvků, zejména těžkých kovů v něm obsažených, tak i vliv substrátu na koncentraci

vybraných prvků ve tkáních žahadlových blanokřídých. Přítomnost těžkých kovů je totiž prvním upozorněním na možnost, že odkaliště nepředstavuje pro žahadlové blanokřídle náhradní substrát, nýbrž že jde o smrtelnou past.

### **Cíle práce**

- Zjistit zda má typ substrátu vliv na akumulaci vybraných prvků do tkání blanokřídých.
- Zjistit zda má vliv substrátu a potravní strategie vliv na akumulaci vybraných prvků do tkání blanokřídých

## **2. Uvedení do problematiky**

V naší krajině chybí zejména stanoviště s ranou sukcesí a zároveň nedostatkem živin. Takovým stanovištěm jsou například vnitrozemské písčiny. Je tomu tak z několika důvodů. Prvním z nich je potlačení výskytu disturbančních činitelů v krajině. Člověk se například v minulosti zasloužil o vymizení velkých herbivorů a v dnešní době zabraňuje například požárům. Spolu s modernizací zemědělství, kdy vznikají jednolitě rozsáhlé monokultury, se člověk zasloužil o to, že už v naší krajině nezbylo mnoho stanovišť vhodných pro volně žijící druhy rostlin a živočichů (Konvička et al. 2005).

### **2.1. Písčiny mizí a nahrazuje je popílek**

Vnitrozemské písčiny jsou v dnešní době na pokraji vymizení. Modelovou zemí budiž Holandsko, kde se zhruba od devatenáctého století začalo se zalesňováním dun převážně borovicí lesní (*Pinus silvestris*) a došlo tak ke snížení rozlohy dun i míry větrné eroze a následně nastalo urychlení už tak problematického přirozeného zarůstání písčin (Riksen et al. 2006). Sukcese byla později ještě více urychlena upuštěním od využívání písčin pro pastvu a vlivem těchto skutečností pak zanikly dříve otevřené písečné duny a s nimi se ztratilo i mnoho na písek vázaných druhů (Riksen et al. 2006). Dále dochází k ukládání atmosférického dusíku do substrátu písčin, čímž je stimulován růst řas. Tento jev urychluje stabilizaci zbylých otevřených písčin a tím i jejich zánik (Van den Ancker et al. 1985).

Poslední lokality s vátými písky jsou také místy, kde lze najít kriticky ohrožené druhy rostlin a živočichů vázaných na suchá a teplá stanoviště s jemnozrnným,



mechanicky nestabilním substrátem. Společenstva, která žijí na písčích, jsou druhově chudá, přičemž fauna těchto společenstev je vysoce specializovaná a přizpůsobená extrémním podmínkám panujícím na písčínách, jakými jsou vysoká teplota, sucho a vysoká míra zejména větrné eroze (Riksen et al. 2008).

Například významná přírodní rezervace s příznačným názvem Váté písky, jejíž písek pochází ze sedimentů řeky Moravy a byl vyvát během pleistocénu, hostí několik ohrožených druhů rostlin vázaných teplá slunná stanoviště s prosychavým substrátem (Hoskovec 2008). Jiná písčina a přírodní památka Vesecký kopec je též zajímavou lokalitou. I když se o vyhlášení přírodní památky zasloužili spíše entomologové, lze na lokalitě najít několik zvláště chráněných druhů rostlin (Gutzerová 2013).

Pro tuto práci je však na písčínách zajímavější výskyt ohrožených písčinných druhů bezobratlých, zejména pak žahadlových blanokřídlých. Výše zmíněná přírodní památka Vesecký kopec je totiž zajímavá nejen z hlediska výskytu rostlin, ale i bezobratlých. Vyskytuje se zde několik zvláště chráněných druhů pavouků (Dolanský 2002), síťokřídlého hmyzu (Dolanský 1998) a brouků (Prausová et al. 2007 podle Mlejnek a Klouček 2004). Jedním z nejvýznamnějších nálezů na této lokalitě je zástupce mravencovníkovitých brouků *Anthicus bimaculatus* (Prausová et al. 2007 podle Kejval a Mikát 2006), který je kriticky ohroženým druhem a jeho výskyt byl pro území potvrzen po celých sto letech (Prausová et al. 2007).

Zdá se, že nejbohatší skupinou písčiny jsou blanokřídlí. Nachází se zde hned několik kriticky ohrožených druhů, jako zlatěnky *Holopyga chrysonota* a *Chrysis indica* (Prausová et al. 2007 podle Udržal in litt. 2007), dlouhoretky *Bembix rostrata* (Prausová et al. 2007 podle Udržal pers. comm. 2007), kutilka *Tachysphex helveticus*, ploskočelka *Lasioglossum intermedium*, ruděnka *Sphex marginatus* nebo nomáda *Nomada moescheri*. Z ohrožených druhů lze jmenovat kutilku *Ammophila pubescens*, pískorypku *Andrena apicata* nebo ploskočelku *Lasioglossum quadrinotatum* (Prausová et al. 2007 podle Bogusch in litt. 2007). Největší část tvoří zranitelné druhy, z nichž lze jmenovat: zlatěnky *Chrysis germani* a *Pseudomalus violaceus* (Prausová et al. 2007 podle Udržal in litt. 2007), vosu prostřední (*Dolichovespula media*), kutilku *Bembecinus tridens*, uzlatku *Cerceris arenaria* (Prausová et al. 2007 podle Bogusch in litt. 2007) a mnoho dalších.

Pokud by například tyto zmíněné písčiny zanikly, ať už vlivem nedostatku péče

o ně stálými disturbancemi, nebo by byly dokonce cíleně zalesněny, některé druhy, které na nich žijí, by pravděpodobně z našeho území vymizely.

Váté písky jsou eolické sedimenty, vzniklé zvětráním mořských usazenin nebo naplavenin řek a potoků. Pro váté písky je klíčové působení větru. V první řadě totiž vítr ze sedimentů odvál nejjemnější částice a na místě zůstal jen křemenný písek s minimálním podílem jiných minerálů. Vlivem větrných turbulencí se pak dále jednotlivá zrnka písku zaoblila (Koster 2009). Duny vátého písku jsou tvořeny poměrně jemným materiálem, jehož jednotlivé frakce tvořící dunu mají průměr zrnok pohybující se v rozmezí mezi 150 a 420 mikrometru (Koster 2009).

Váté písky se vyznačují velkými rozdíly mezi denní a noční teplotou. Typické jsou i rychlé změny vlhkosti substrátu (Exeler et al. 2009). To proto se obyvatelé vátých písčin vyznačují adaptací na extrémní výkyvy teplot a vlhkosti s častými disturbancemi (Exeler et al. 2009).

Nabízí se tedy otázka náhradního biotopu za vátý písek. Řešení existuje. Prostředím s holým jemným substrátem, s vysokou prosychavostí a vysokými denními teplotami jsou odkaliště (Tropek et al. 2013).

## **2.2. Popílkoviště a jejich význam pro psamofilní druhy žahadlových blanokřídлых**

Popílek je svou strukturou podobný o řád jemnějšímu vátému písku. Zrnka popílku jsou totiž v průměru menší než deset mikrometrů a mohou na první pohled připomínat písek (Ramezianpour 2014).

Popílek a spolu s ním i struska vznikají jako odpadní materiál při spalování uhlí v elektrárnách a teplárnách, nebo také ve větších továrnách (Řehounek et al. 2010).

Hoření uhlí je koncentrační proces, při kterém organická látka z největší části vyhoří. Při tomto procesu dále unikají všechny lehce těkavé složky. Zbývá již výše zmíněný popel a struska. Anorganické nespálené části uhlí, hlavně minerály, se nazývají popeloviny. Jako popeloviny jsou označovány příměsi anorganických prvků a jejich sloučenin, které jsou součástí uhlí. Původ mají v buňkách rostlin, nebo je do rašeliniště, které dalo vzniknout uhlí, naplavila podzemní voda (Kolář 1969).

Obsah popelovin v uhlí závisí na celkovém procesu vzniku uhlí a vlivu prostředí, které se přitom uplatnilo. Prvek, například Fe může být v jednom uhlí vázán jako sulfid, v jiných jako uhličitan. I když se v tomto případě při hoření uhlí vyvine některý z oxidů Fe, je proces, který vede ke vzniku těchto oxidů, pokaždé jiný.

Fyzikální a chemické vlastnosti popílku proto závisí na výchozím materiálu a na charakteru spalování. Například lze říci, že čím jemněji rozemleté je použité palivo, tím jemnější jsou nespalitelné zbytky, tedy popílek (Kolář 1969).

V praxi je používáno několik možných způsobů ukládání popílku. Jedna z možností, používaná do 90. let 20. století, je ukládání tzv. hydrickou cestou, kdy je popílek a další odpady ve směsi s vodou odváděn do odkalovacích nádrží nebo lagun, kde poté všechny pevné částice sedimentují. Takovému místu se říká odkaliště. Druhou možností je popílek v suchém stavu dopravit na skládku pomocí lanovek nebo dopravních pásů. Takové místo se nazývá složiště popílku. Tato metoda je však kvůli vysoké prašnosti velice ojedinělá. Poté, co bylo v 90. letech minulého století zavedeno odsíření elektráren, došlo snad jen kromě malých producentů popílku, ke změně způsobu ukládání. Vedlejším produktem odsíření je totiž tzv. energosádrovec. Ten se míchá s popílkem a struskou, přičemž vzniká směs, tzv. stabilizát., který pokud po uložení zmokne, ztuhne. Stabilizovaná směs sice nepráší, ale zato je obtížná její obnova (Řehounek et al. 2010).

Fyzikální vlastnosti popílku popsané výše, spolu s vysokými denními teplotami zamezují mnohým druhům kolonizovat popílek a ten se tak stává vhodným pro osídlení psamofilními druhy živočichů, nebo některými ne vždy psamofilními rostlinami (Řehounek et al. 2010). Například na struskopopílkovém odkališti v Třinci byly objeveny významné druhy rostlin, jejichž stanoviště s vátým pískem příliš nesouvisí. (Ladányi 2009).

Vezmeme-li v potaz téma diplomové práce, je zdaleka nejzajímavější výskyt žahadlových blanokřídých na odkalištích. Na toto téma byl proveden rozsáhlý průzkum v oblasti Polabí, kdy výsledkem studie dvou tamních odkališť bylo nalezení 227 druhů žahadlových blanokřídých, z nichž 4 druhy uvedené v červené knize byly do té doby považovány u nás za vyhynulé, konkrétně *Arachnospilla westerlundii*, *Evagetes littoralis*, *Halictus smaragdulus* a *Nysson hrubanti*. Dále bylo nalezeno 13 kriticky ohrožených druhů s pouhou hrstkou známých lokalit, dále 22 ohrožených a 33 zranitelných druhů. Z celkového počtu druhů bylo 31 výhradně specialisty na váté písky, kteří se nevyskytují na jiných méně ohrožených jemnozrnných substrátech. Zdá se, že popílek se pro některé druhy žahadlových blanokřídých stává posledním útočištěm (Tropek et al. 2013).

Bohužel popílek je na rozdíl od písku poměrně bohatý na těžké kovy, které mnohým živočichům působí někdy až smrtelné potíže (Hopkins et al. 1998).

### 2.3. Vybrané prvky v popílku

Potenciální nebezpečí odkališť, coby náhradního biotopu za váté písky je ukryto v samotném složení popílku. Chemická charakteristika popílku se významně odvíjí od geologických podmínek na nalezišti uhlí a od různých postupů využívaných při jeho spalování v elektrárnách. Proto má popílek z odlišných tepelných elektráren odlišné složení (Shaheen et al. 2014). Popílek je možné rozlišovat na dva typy v závislosti na typu spalovaného uhlí. Za první typ F, vznikající spalováním antracitu a černého uhlí s obsahem CaO méně než 7% a za druhý typ C, vznikající spalováním hnědého uhlí s obsahem vápníku až 30% (Wang and Wu 2006). Právě obsah vápníku a také obsah síry v uhlí mají vliv na výsledné pH popílku, které se tak pohybuje mezi 4,5 a 13,25 (Riehl et al. 2010). Jak lze očekávat, popílek vzniklý spálením uhlí s vyšším podílem S je kyselější, než popílek vzniklý spálením uhlí s vyšším podílem CaO. (Jala and Goyal 2006). Hodnota pH popílku je totiž důležitá z hlediska dostupnosti vybraných prvků pro rostliny. Dostupnost vybraných prvků totiž koreluje s poklesem pH popílku (Lopareva-Pohu et al. 2011).

Těžké kovy jsou významnými environmentálními polutanty, jejichž toxicita je závažným environmentálním problémem. Pojmem „těžký kov“ bývají obvykle označovány metalické prvky, které jsou toxické nebo jedovaté i při malých koncentracích (Lenntech Water Treatment and Air Purification 2017). Podobně specifikuje těžké kovy i Duffus (2002), podle kterého lze takto označit kov nebo polokov, který představuje hrozbu pro životní prostředí, bez ohledu na jeho hustotu.

Prvky pro účely této práce byly vybrány podle dostupných studií, převážně obratlovců, zabývajících se ekotoxikologií odkališť uvedených v následující kapitole a podle studií složení popílku (viz Tabulka 1). Zároveň bylo nutné brát ohled na proveditelnost měření koncentrace prvků ve tkáních blanokřídlého hmyzu vzhledem ke zvolené metodě měření. Tímto způsobem byly nakonec vybrány následující prvky, nejen těžké kovy: Ag, Al, As, Ba, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Hg, Mn, Ni, Pb, Se, Sr, V a Zn. U těchto prvků existují důkazy o negativním vlivu na organismy při zvýšených koncentracích.

**Tabulka 1:** Koncentrace vybraných prvků v popílku dle studií

Prvky s vyšší koncentrací (g.kg <sup>-1</sup> )	Studie popílku				
	Riehl et al. (2010)	Jala and Goyal (2006)	Tripathi et al. (2009)	Lopareva-Pohu et al. (2011)	Hopkins et al. (1998)
Al	108,5	312	neměřeno	0,47	15,78
Fe	36,6	68	0,0032	0,31	neměřeno
Prvky s nižší koncentrací (mg.kg <sup>-1</sup> )	Studie popílku				
	Riehl et al. (2010)	Jala and Goyal (2006)	Tripathi et al. (2009)	Lopareva-Pohu et al. (2011)	Hopkins et al. (1998)
Ag	neměřeno	neměřeno	neměřeno	neměřeno	0,048
As	neměřeno	6,2	Pod limitem detekce	20,4	39,64
Ba	neměřeno	neměřeno	neměřeno	neměřeno	83,8
Cd	0,03	1,9	13,4	neměřeno	0,25
Co	26	58	21,1	17	6,42
Cr	148	330	38,2	46	10,87
Cu	57	0,002	65,8	38	18,39
Hg	neměřeno	neměřeno	Pod limitem detekce	0,40	neměřeno
Mn	679	739	0.006	418	29,30
Ni	88	13	44.2	48	13,73
Pb	97	35	20.0	39	6,46
Se	neměřeno	3,6	neměřeno	neměřeno	4,38
Sr	neměřeno	neměřeno	neměřeno	neměřeno	55,82
V	182	neměřeno	neměřeno	neměřeno	28,77
Zn	167	79	57,7	85	27,10

## 2.4. Vlivy vybraných prvků na organismy

Mechanismy, které podtrhují toxicitu těžkých kovů u bezobratlých se pravděpodobně neliší od těch, které se projevují v jiných organismech, jako jsou například rostliny a obratlovci (Van Starleen and Donker 1994). Z toho důvodu je tato kapitola věnována nejen bezobratlým, ale také vlivu vybraných prvků na rostliny a obratlovce. Lze předpokládat, že **rostliny**, coby zdroj potravy pro herbivory, pro ně představují významný zdroj vybraných prvků. Vzhledem k tématu práce nelze opomenout italskou studii, zabývající se koncentrací As, Cd, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb, Pt, Sn, V a Zn v medu včel medonosných. Studie cílí na možnost využít med jako indikátor znečištění. Pro tuto práci je však zajímavější to, že nektar obsahuje

v různých koncentracích zmíněné prvky a je tedy pravděpodobně zdrojem akumulace vybraných prvků do těl herbivorních blanokřídých (Caroli et al. 1999). Studie zkoumající akumulaci Mg, Mn, K, Fe, Cu, Co, Cr, Ni, Pb a Zn v rostlinách z odkaliště elektrárny Chvaletice se zabývá přímo tím, ve kterých částech rostliny se jaké prvky shromažďují. Ukázalo se, že kovy se hromadí zejména v kořenech, zatímco biogenní prvky se hromadí v listech a stonku (Zákravský et al. 2004). To by mohlo napovídat, které prvky by mohl akumulovat herbivor v závislosti na části rostliny, kterou se živí.

Nejčastějším předmětem studie těžkých kovů v rostlinách je ale jejich vliv na samotné rostliny. Vybrané prvky se ve vyšších koncentracích na rostlinách podepisují vesměs podobně. Například Zn negativně ovlivňuje metabolismus rostlin, což má za následek zpomalení růstu nadzemních i podzemních částí rostliny (Fontes and Cox 1998) a podobný je i vliv Pb, které v závislosti na koncentraci zpomaluje růst rostlin, například sezamu indického (*Sesamum indicum*) (Kumar et al. 1993). O fytotoxickém působení Co na rostliny je poznatků méně. Studie na rajčatech (*Lycopersicon esculentum* L.) poukazují na negativní vliv Co na biomasu rostliny. O něco významněji na rostliny působí Cd, Cu a Mg, kdy Cd způsobuje mimo zpomalení růstu také chlorózu listů a může zapříčinit až smrt rostliny (Guo et al. 2008). Cu v půdě působí na rostlinu jako cytotoxin. Působí oxidativní stres a poškozuje rostlinu. To vede ke zpomalení růstu a chloróze listů (Lewis et al. 2001). Zajímavá je toxicita Mg, která se u některých druhů rostlin projevuje chlorózou starších listů a postupuje směrem k mladším. U jiných druhů se naopak vliv Mg začne projevovat poškozením nejmladších listů (Bachman and Miller 1995). Jiné prvky na rostliny působí ve formě iontů. V případě Ni jsou to ionty  $Ni^{2+}$ , které způsobují chlorózu a nekrózu listů (Pandey and Sharma 2002). Podobně se projevuje vliv  $Fe^{2+}$ . Ionty v rostlině zapříčiňují tvorbu volných radikálů, které nevratně narušují buněčnou strukturu a poškozují membrány, DNA a proteiny (De Dorlodot et al. 2005)

Významná část dostupné literatury zabývající se ekotoxikologií bezobratlých přímo z odkališť je zaměřena na **vodní bezobratlé**, kteří však stále mají k těm terestrickým blíže než obratlovcům zmíněni na konci této kapitoly. Oproti terestrickému prostředí má vodní tu vlastnost, že se některé prvky ze sedimentů vyluhují do vody a jsou pak v některých případech lépe dostupné. Je proto dobré se nejprve zaměřit na to, jaký je zdroj naakumulovaných prvků u vodních bezobratlých, neboť se zdá, že

některé prvky jsou významněji akumulovány z potravy a jiné z prostředí. Navíc v procesu akumulace prvků v tkáních hrají roli zprostředkovatele různé procesy zahrnující endocytózu, membránové kanály a pasivní ligandy (AbdAllah 2014).

Studie různých druhů vodních bezobratlých potvrzují, že zdrojem zejména Cd a Zn ve tkáních bezobratlých je kontaminovaná potrava stejně tak jako v případě As, Co, Cu, Pb a Zn. V každém z laboratorních experimentů byli jedinci vystaveni kontaminované vodě, což mělo jen zanedbatelný nebo dokonce žádný vliv na koncentraci prvků ve tkáních, zatímco podávání kontaminované potravy vždy vedlo k akumulaci prvků do tkání (Munger and Hare 1997; Kim, et al. 2012; Croisetière et al. 2006). Jak už bylo zmíněno, u některých prvků byla také pozorována akumulace z vody. Toto tvrzení podporuje studie koretry *Chaoborus flavitans*, která odhalila, že 65% naakumulovaného Ni pochází z vody (Ponton and Hare 2010). U chrostíků *Hydropsyche* byla pozorována silná korelace mezi akumulací Zn, Cu, Pb a Cd a jejich koncentrací ve vodě a v sedimentech (Solà and Prat 2006).

Co se vlivu těžkých kovů na vodní bezobratlé týče, nejsou výsledky různých studií jednoznačné. Například v případě raků *Procambarus acutus* byl vlivem As, Cd, Cr, Cu a Se pozorován zvýšený výdej energie (Standart Metabolic Rate) zpomalující jejich růst (Rowe et al. 2001). Naproti tomu u ostatních studovaných druhů nebyly vlivem prvků obsažených v popílku pozorovány žádné potíže. Studie mlže, korbikuly asijské (*Corbicula fluminea*), sice odhalila akumulaci As, Se, Cd a Hg, ale nebyly pozorovány žádné potíže. Mlži vlivem teplejší vody rostli do velkých rozměrů i v místech s největší koncentrací těchto prvků a nebyl proto pozorován vliv na růst (Peltier et al. 2009). Při jiné studii, kdy byly larvy vážek *Anisoptera: Libellulidae* vystaveny vodě s Cd, Pb a Cu se ukázalo, že jsou larvy tolerantní k vysokým hladinám Cd a Pb v řádech mg/L, ale k Cu jen o koncentraci 150 µg/L (Tollett et al. 2009).

Také detoxikaci některých těžkých kovů je věnováno několik dostupných studií. Například jedním z mechanismů detoxikace Zn by mohla být metamorfóza, jako u jepice *Centroptilum triangulifer*. U této jepice byla pozorována vyšší akumulace Zn u larev než u dospělců, zároveň však larvy při metamorfóze většinu naakumulovaného zinku ztratily (Kim et al. 2012). Také studie chrostíků potvrzují, že vodní bezobratlí disponují obrannými mechanismy, kterými se brání akumulaci těžkých kovů. Chrostíci se totiž dovedou naakumulovaných těžkých kovů efektivně

zbavovat. Je zajímavé, že v případě Cd naakumulovali jedinci, kteří se v minulosti s tímto prkem setkali menší množství tohoto prvku než jedinci, kteří mu byli vystaveni poprvé. Překvapivá je i rychlost, jakou se chrostíci dovedou Cd ale také Zn a Pb zbavovat. Za pouhých 24 hodin se jedinci byli schopni zbavit až 75 % naakumulovaného množství těchto prvků (Solà and Prat 2006; Cain et al. 2006). Studie sladkovodních plžů jako je ampulárka nilská (*Lanistes carinatusta*) a mořských plžů, jako je *Nerita* sp., odhalila schopnost, jakou se plži brání těžkým kovům, jakými, jsou Cu a Cd. Prvním důležitým zjištěním bylo, že toxicita těžkých kovů je vztažena k tomu, zda jsou jen uloženy ve tkáních jako granula, nebo jsou metabolicky aktivní a u plžů se pak projevují buněčnou nekrózou, nebo přítomností vakuol v trávicích buňkách (AbdAllah 2014). Druhým zjištěním je způsob, jakým se vodní měkkýši těžkých kovů zbavují. Měkkýši totiž úspěšně detoxikují přijaté kovy vazbou na speciální aminokyselinu zvanou metallothionin, nebo kovy váží na jiné sloučeniny,  $PbCO_3$  (AbdAllah and Moustafa 2002). U vodních bezobratlých byla také zkoumána možnost negativní korelace mezi příjmem vápníku a dalších prvků. Konkrétně byla sledována korelace mezi akumulací vápníkem a akumulací Cd a Zn. Ačkoliv mají Cd a Zn stejnou dráhu příjmu jako Ca, nebyla pozorována žádná korelace mezi těmito prvky (Poteat and Buchwalter 2014).

**Terestrickým bezobratlým** se doposud věnovalo z hlediska akumulace těžkých kovů a jejich vlivu spíše méně studií. Jednou z nejstudovanějších skupin jsou mravenci. Bylo například zjištěno, že u mravenců *Crematogaster scutellaris* z lokality s vyšší koncentrací vybraných prvků, dochází k akumulaci vyšších hladin Zn, Sr a Fe do tkání dělníků než u dělníků z referenční lokality, přičemž Zn se ukládá do stěny střeva, do Malpighiho trubic pak Zn a Sr, do tuku se ukládá Fe (Gramigni et al. 2011). Také studie mravenců (*Formica aquilonia*) potvrzuje, že mravenci z lokality znečištěné blízko slévárnou naakumulovali vyšší hladiny As, Ni, Cu, a Pb. Hodnoty byly někdy až překvapivě rozdílné. V porovnání s mravenci na referenční lokalitě, byla ve tkáních dělníků ze znečištěné lokality naměřena tisíckrát vyšší hladina Pb, čtrnáctkrát vyšší hladina Cu a devětkrát vyšší hladina As (Eeva et al. 2004). Studie různých druhů mravenců specifikovala místa akumulace těžkých kovů, kdy nejvyšší hladiny byly naměřeny v mesenteronu, dále pak v Malpighiho trubicích a metenteronu (Rabitsch 1997). Zdá se, že těžké kovy se do těl mravenců dostávají složitější cestou. Z rostliny do karnivorů nebo herbivorů a z nich pak do těl mravenců



(Gramigni et al. 2013). Navíc se mravenci zdají být tolerantní ke znečištění těžkými kovy. Je to pravděpodobně důsledek jejich sociální struktury. Byl totiž pozorován pokles míry intoxikace těžkými kovy v hierarchii jejich sociálního systému (Maavara et al. 1994). Díky tomu se dokáží kolonie mravenců reprodukovat i v těžce znečištěných lokalitách (Eeva et al. 2004). Dalším poměrně podrobně studovaným druhem je stínka obecná (*Porcellio scaber*), přičemž se zánčný počet studií zabývá právě vlivem některých těžkých kovů na stínky. Například Cd u stínek negativně ovlivňuje míru přežití (Drobne 1997 podle Beyer et al. 1984) a růst (Donker and Bogert 1991; Van Wensem et al. 1992). Cd a Pb negativně ovlivňují míru přežití (Drobne 1997 podle Beyer et al. 1984), pravděpodobně kvůli negativnímu působení na buňky hepatopankreatu (Köhler et al. 1996) a Fe a Mn negativně ovlivňují dýchací funkce. Za zmínku stojí i sekundární vlivy těžkých kovů. Intoxikace těžkými kovy se u stínek projevuje menším vzrůstem a tedy i snížením reprodukce, protože u *P. scaber* je lineární vztah mezi velikostí těla a reprodukcí (Van Starleen and Donker 1994). Kromě mravenců a stínek je několik dostupných studií věnováno i dalším terestrickým bezobratlým. Studie vlivu iontů Zn na octomilky (*Drosophila melanogaster*) odhalila, že ionty Zn ve vysokých koncentracích v cytoplasmě hemocytů indukuje PCD (programmed cell death) (Filipiak et al. 2012). Podobně jako se u vodních bezobratlých vyskytuje akumulace prvků z vody, tak i u suchozemských byla potvrzena akumulace prvku z půdy. Přímá akumulace Mn z půdy do tkání byla pozorována u terestrických plžů, jako je hlemýžď kropenatý (*Cornu aspersum*), u kterého výrazně kleslo množství přeživších mladých jedinců ve chvíli, kdy koncentrace Mn v hepatopankreatu přesáhla 300 mg/kg suché váhy (Bordean et al. 2014). Dalším prvkem je Ag, které ve formě nanočástic proniká do tkání bezobratlých a je pro ně toxické, což bylo testováno a potvrzeno například u žížaly hnojní (*Eisenia fetida*; Gomes et al. 2015) nebo chvostoskoka *Folsomia candida* (Mendes et al. 2015). Zajímavou skupinou bezobratlých na odkalištích pavouci a zejména rozdíl v akumulaci těžkých kovů zemními a síťovými druhy. Hladiny Cd, Pb, Cu a Zn jsou vyšší u síťových než u zemních druhů, zatímco Fe a Mn akumulovaly druhy bez rozdílu. Navíc existuje korelace mezi Cd v tělech pavouků a v částicích prachu. Neméně zajímavý je i rozdíl mezi akumulací u samců a samic, kdy jsou koncentrace Cd, Ni a Pb vyšší u samců než u samic (Wilczek and Migula 1996; Wilczek et al. 2005). Nejblíže této práci se zdá být studie zednice

rezavé (*Osmia rufa*) z lokalit znečištěných blízkými hutěmi na Zn a Pb v Polsku a Velké Británii. Byl pozorován negativní vliv Cd, Pb, a Zn na reprodukci a míru přežití. Na jednu samici ze znečištěné lokality připadaly tři až čtyři plodové buňky a úmrtnost potomstva se pohybovala mezi padesáti až šedesáti procenty. Na referenčních lokalitách na jednu samici připadalo osm až deset plodových buněk a úmrtnost potomstva se pohybovala mezi deseti a třiceti procenty. Zároveň byl pozorován negativní vliv Cd, Pb a Zn na velikost jedinců ze znečištěných lokalit (Moroń et al. 2014).

Mnoho studií vlivu těžkých kovů na organismy žijících na odkalištích se zabývá obratlovci. Ve vodě, která slouží pro transport popílku na odkaliště, žijí mnohdy **ryby**. Zdá se, že například oproti níže zmíněným plazům mají ryby s prvky obsaženými v popílku větší potíže. Pakaprovec jezerní (*Erimyzon sucetta*) byl podroben laboratornímu experimentu s použitím substrátu z odkaliště. Vyšší koncentrace Se a V v těle se projevovaly menším vzrůstem jedince a ztrátou šupin (Hopkins et al. 2000). Jiný laboratorní experiment byl zaměřen na rychlost pohybu pakaprovců. Ukázalo se, že jedinci vystavení kontaminovanému substrátu dosahovali nižší maximální rychlosti pohybu (Snodgrass et al. 2003).

Stejně jako u dalších skupin obratlovců se mezi rybami vyskytují druhy, kterým popílek nevadí. Příkladem může být gambusie Holbrookova (*Gambusia holbrooki*), která se zdá být tolerantní k těžkým kovům i přes skutečnost, že jsou v jejích tkáních obsaženy (William A. Hopkins et al. 2003; Staub et al. 2004). U ryb byl také zaznamenán jev, který by mohl mít význam pro jejich přežití na odkališti. Bylo zjištěno, že u ryb dochází k intoxikaci záber Al, který způsobuje dýchací problémy, ale pouze v případě, že ve vodě není dostatek Ca, který vytlačuje ionty Al (Gensemer and Playle 1999).

**Obojživelníci** jsou jednou z nejčastěji studovaných skupin obratlovců na odkalištích. Například ropucha hrabavá (*Anaxyrus terrestris*) je příkladem toho, jak těžké kovy negativně působí na jedince. Bylo zjištěno, že u jedinců držených na popílkem znečištěné bažině v blízkosti odkaliště elektrárny u města Aiken v Jižní Karolině se procentuální úspěšnost přežití rané fáze larválního stádia snížila o 16 % a celková mortalita byla 100%, to vše pravděpodobně vlivem As, Cd, Cr, Cu, Se a dalších prvků (Rowe et al. 2001). U samic ropuchy hrabavé z téhož odkaliště byly zjištěny zvýšené hladiny Ni a Se. Ve vejcích pak byla ukládána Cu a Pb.

Doprovodným jevem přitom bylo zmenšení snůšky o 27 % (Metts et al. 2013). Zdá se, že tento jev není u obojživelníků neobvyklý, neboť u samic ropuchy americké (*Anaxyrus americanus*) bylo pozorováno, že Hg přenesená ze samic do vajec negativně ovlivňuje růst, úspěch metamorfózy a přežití potomstva (Todd et al. 2011). Jiná laboratorní studie ropuchy americké poukazuje na přenos Se a Hg ze samice do vajec (Bergeron et al. 2010). U ropuchy pruhované (*Limnodynastes peronii*) byla pozorována akumulace Se, Co a As, přičemž tyto prvky jsou považovány za příčinu opožděné metamorfózy (Lanctôt et al. 2016). U larev skokana volského (*Lithobates catesbeianus*) byly na popílkovišti pozorovány výrazné deformace v podobě laterálního zahnutí ocasu blízko jeho kořene a zároveň naměřena vysoká hladina As, Cd, Se, Cu, Cr a V (Hopkins et al. 2000). U larev skokana východoamerického (*Lithobates sphenoccephalus*) byl laboratorní experimentem odhalen vliv Hg na délku metamorfózy, zejména se prodloužila doba ztráty ocasu (Unrine et al. 2004). Při jiném laboratorním experimentu se ukázalo, že V získaný potravou nemá vliv na růst, ale jedinci krmení kontaminovanou potravou častěji umírali při metamorfóze (Rowe et al. 2009).

Na druhou stranu jsou mezi obojživelníky také druhy, kterým těžké kovy v substrátu odkališť nevadí. Příkladem takového druhu může být skokan lesní (*Lithobates sylvaticus*) u něhož nebyl při vystavení Hg v laboratorních podmínkách pozorován žádný vliv tohoto prvku (Wada et al. 2011). Pravděpodobně nejodolnějším testovaným druhem, co se tolerance Hg týče, je mločik dvoupásý (*Eurycea bislineata*), u něhož byla naměřena sedmnáctkrát vyšší koncentrace Hg než u ostatních dosud dokumentovaných obojživelníků (7,5 ng/g), u nichž tato a nižší koncentrace Hg negativně ovlivňovaly rychlost pohybu jedince a tím i jeho schopnosti lovit. Koncentrace však byla stanovena celých homogenizovaných těl mločíků a nelze proto určit, do kterých tkání se Hg ukládá (Burke et al. 2010).

Z existence více či méně rezistentních druhů vyplývá existence mechanismů, kterými se druhy brání toxinům akumulovaným z prostředí, nebo potravy. Možným detoxikačním mechanismem by mohl být jev pozorovaný u výše zmíněného skokana volského. Larvy tohoto skokana se totiž při metamorfóze částečně zbavily naakumulovaných prvků (Snodgrass et al. 2003).

Vliv těžkých kovů byl studován i u **plazů**. Jedním ze studovaných druhů je užovka mokasínová (*Nerodia sipedon*), u které byl zaznamenán vliv Hg na mladé jedince,

kteří po kontaminaci vykazovali nižší ochotu útočit na kořist a byli méně úspěšní při lovu (Chin et al. 2013b). U užovky páskované (*Nerodia fasciata*) bylo zjištěno na odkališti elektrárny u města Aiken v Jižní Karolíně, že kořist užovek, tedy pulci, žáby a ryby, obsahuje As a Se. V hadech pak byly naměřeny zvýšené hladiny obou prvků, čímž by mohl být vysvětlen jejich původ v užovkách. Spolu s Cd a V je u užovek páskovaných As a Se ukládán v ledvinách, játrech a/nebo v gonádách (Hopkins et al. 1999; Hopkins et al. 2001)

Stejně jako u obojživelníků byl i u plazů pozorován přenos prvků ze samice do vajec, jako například přenos Hg u užovky mokasínové (Chin et al. 2013a), nebo Se u užovky domácí (*Boaedon fuliginosus*; Hopkins et al. 2004) a aligátora amerického (*Alligator mississippiensis*; Roe et al. 2004).

Zdá se, že kromě výše zmíněné užovky mokasínové, nepůsobí těžké kovy plazům žádné zaznamenané problémy. Nebyl pozorován vliv Se z potravy (až 20 µg/g) na životní funkce ani reprodukční aktivitu samic užovky domácí (Hopkins et al. 2004) ani nebyl pozorován vliv As, Cd, Cr, Se a V na užovku páskovanou, která při laboratorním experimentu dokonce ani neakumulovala Cu (Hopkins et al. 2002).

Odkaliště mimo ryb, obojživelníků a plazů hostí také další obratlovce, kterými jsou **ptáci**. Vliv těžkých kovů na ptáky byl zdokumentován v několika studiích. Studie kadáverů vlhoveců (*Quiscalus quiscula*) z okolí Savah River v Jižní Karolíně (USA) odhalila přítomnost As, Cd a Se v peří a játrech dospělých ptáků, u mláďat jen v peří (Bryan et al. 2012). Této studii předcházela jiná, zabývající se u vlhoveců přenosem Se z matky na potomstvo. Ukázalo se, že Se se skutečně přenáší z matky do vajec, přičemž zajímavá je vyšší koncentrace Se ve druhém vejci ve snůšce. Zároveň se ale naměřená koncentrace ve vejcích neukázala jako toxická (Bryan et al. 2003). U ptáků je také zkoumána akumulace Hg. Ukazuje se, že u ptáků dochází k akumulaci Hg, ale předpokládá se, že se ptáci Hg dovedou zbavovat, neboť ji ukládají do keratinizovaných tkání (Wada et al. 2009). Tento jev potvrzuje i studie orlovců říčních (*Pandion haliaethus*) odchycených na různých místech Jižní Karolíny (USA), kdy byla Hg nalezena v peří mláďat. Na druhou stranu stejná studie odhalila, že u starých ptáků je mnohem více Hg v játrech. Dále tato studie naznačuje, že přítomnost Hg v keratinizovaných tkáních by mohla značit dřívější kontakt s tímto prvkem (Hopkins et al. 2007).

Za zmínku stojí i **savci**. Konkrétně na netopýrech hnědých (*Eptesicus fuscus*) byl proveden rozsáhlý výzkum, zkoumající jedince ze Hg znečištěných lokalit z USA, Mexika a části Kanady, při kterém byla naměřena až 2,6 krát vyšší koncentrace Hg v tělech samic z kontaminovaných lokalit, než u samic z referenčních lokalit. Přitom bylo v srsti naměřeno 260 krát větší množství Hg než v krvi a proto se tak srst jeví jako významné úložiště Hg (Wada et al. 2010).

### **Hypotézy**

- Blanokřídlý hmyz z odkališť akumuluje do svých tkání vyšší hladiny než blanokřídlý hmyz z písčin.
- Množství naakumulovaných prvků je odlišné v různých trofických úrovních.

## **3. Materiál a metody**

Pro účely této práce bylo vybráno sedmnáct prvků (Ag, Al, As, Ba, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Hg, Mn, Ni, Pb, Se, Sr, V a Zn). Prvky byly vybrány podle očekávatelnosti v substrátu odkališť, předpokládaných negativních vlivů dle dostupných studií a podle měřitelnosti koncentrace prvků ve vzorcích vzhledem ke zvoleným níže uvedeným metodám měření.

### **3.1. Lokality**

Čtyři vybrané lokality, dvě písčiny a dvě odkaliště, kde probíhal sběr materiálu, se nacházejí v oblasti Polabí, blízko města Pardubice. Tato oblast se nachází na severu České republiky. V Polabí je mírně teplé podnebí s průměrnými teplotami 8-9 °C a ročním srážkovým úhrnem 550-700 mm (Tropek et al. 2013 podle Quitt 1971). V Polabí byl v historii běžný biotop kontinentálních vátých písků. Bohužel tento biotop v dnešní době téměř vymizel v důsledku zalesňování a/nebo vlivem sukcese (Tropek et al. 2013).

Písčina Vesecký kopec se nachází severozápadně od vesnice Veská (N 50° 2' 33", E15° 51' 19", 238 m n.m. ). Vesecký kopec je morfologický útvar tvořený navátými mladopleistocenními písky z Labské říční terasy. Písečný přesyp je pozůstatkem duny, která zde vznikla v aridním prostředí během čtvrtohor. Od konce

šedesátých let 20. století do roku 2004 tu probíhala těžba písku, do té doby byla tato duna považována za největší v Čechách. Po ukončení těžby byla na Veseckém kopci zahájena rekultivace překrytím skrývkou a následným vysázením borovic a dubů. Díky iniciativě místních entomologů byla tato rekultivace zastavena a v roce 2004 byl písčný přesyp vyhlášen přechodně chráněnou plochou. Dnes jsou rozměry nezalesněné plochy asi 120 x 60 m. Tato plocha a na ní vázaná flóra a fauna je předmětem ochrany. V rámci zachování obnažené části území se provádí pravidelné narušování půdního substrátu a odstraňování náletových rostlin, dále se odstraňují konkurenčně silné rostliny v okolí přírodní památky (Prausová et al. 2007).

Druhá písčina leží severně od obce Semín (N 50° 03' 34.4", E 15° 31' 07.2", 222 m n. m.). Jedná se o lokalitu tvořenou vátými písky z období mladopleistocénu až holocénu. Průměrná velikost zrn je 0,5 mm (web1). Na této lokalitě je patrné cílené zalesňování borovicí.

První odkaliště patří k teplárně Synthesia u obce Semtín. Odkaliště se nachází západně od obce Rosice (N 50° 02' 36.0", E 15° 42' 59.1", 217 m n. m.). Jedná se o systém malých otevřených ploch lemovaných rákosem, s nepravidelnou disturbancí, kolem velké vodní plochy uprostřed. V závislosti na době uplynulé od poslední disturbance, v podobě hydrického ukládání popílku a strusky, tvoří jednotlivé dílčí plochy škálu od nejranější sukcese až po pokročilejší, kdy už mech začíná substrát stabilizovat. Této škále odpovídalo i množství blanokřídlých ulovených na ploškách, kdy byla úspěšnost pastí nejvyšší na ploškách s nedávnou disturbancí, ale zároveň již nepodmáčeným substrátem. Celková plocha odkaliště, povětšinou zarostlá rákosem a místy i stromy činí 29,3 ha. Dílčí plošky pak hrubým měřením přibližně 1500 – 1800 m<sup>2</sup>.

Druhé odkaliště patří k elektrárně Bukovina a leží jižně od obce Bukovina nad Labem (N 50° 06' 56.8", E 15° 49' 46.3", 250 m n. m.). Jedná se o rozsáhlou otevřenou plochu s oblastmi rané fáze sukcese. Od roku 1960 zde byl hydrickou cestou ukládán popílek z elektrárny Opatovice nad Labem sedimentací, poté, na začátku druhého tisíciletí, se díky zavedení odsíření změnila technologie ukládání popílku a sedimentační proces byl proto ukončen. S tím souvisí i další krok, při kterém byly hlavní části odkalovací nádrže vyčerpány a odkrytý popílek byl ponechán spontánní sukcesi (Tropek et al. 2013). Lokality jsou zemědělsky nebo lesnický rekultivovány překrytím popílku ornici (Tropek et al. 2012). I přesto k roku

2009 tvořila odkrytá plocha popílků zhruba 10 ha (Tropek et al. 2013).

### 3.2. Sběr materiálu

Žahadloví blanokřídli byli sbíráni po čtyři dny mezi 1. červnem a 19. červencem 2015, vždy za teplého a slunečného počasí. Při každém výjezdu dva až čtyři lidé aktivně (odchyt entomologickými sítěmi) i pasivně (žluté misky: průměr 15 cm, hloubka 5 cm, naplněné vodou s trochou detergentu) odchyťovali žahadlové blanokřídle na vhodných stanovištích. Nabíraný materiál byl uložen v 96% ethanolu. Ke sběru byly vybrány slunečné dny s maximálními teplotami okolo 28-33 °C. Na každou ze čtyř lokalit připadá celkem 10 hodin aktivního sběru, přičemž sběr prováděli dva až čtyři lidé. Sběr probíhal 3 hodiny dopoledne a 2 hodiny odpoledne. Misky byly na lokalitě rozmístěny vždy ráno před začátkem aktivity hmyzu a sebrány po 16. hodině téhož dne, kdy aktivita hmyzu klesla.

Na všech lokalitách bylo odebráno také 10 vzorků substrátu z vrchních 20 cm, přičemž kvůli podchycení variability jednotlivých lokalit byl substrát sbírán z míst s různými odstíny.

### 3.3. Zpracování vzorků

Vzorky **substrátu** byly nejdříve sušeny 72 hodin při 70 °C. Poté byly pomocí síta ze vzorků odstraněny příliš velké složky a vzorky byly rozemlety na analytickou jemnost (< 63 μm) v achátových miskách pomocí planetového mlýnku. Následné analýzy byly provedeny pracovníky laboratoře prof. RNDr. Martina Mihaljeviče, CSc. (Ústav geochemie, mineralogie a nerostných zdrojů), 0,2 g každého kvartovaného vzorku bylo rozpuštěno na Petriho misce v 10 ml koncentrované HF a 5 ml koncentrované HClO<sub>4</sub> a následně odpařeno do sucha. Proces byl zopakován s 5 ml HF a 0,5 ml HClO<sub>4</sub>. Vzorky byly poté rozpuštěny ve 2% roztoku HNO<sub>3</sub> a přeneseny do 100ml odměrné baňky. Ve vzniklých roztocích byly změřeny koncentrace prvků pomocí hmotnostní spektrometrie.

Analýza byla provedena na hmotnostním spektrometru s indukčně vázanou plazmou (ICPMS) typu X Series II firmy Thermo Scientific (Německo). Nastavený výkon radiofrekvenčního generátoru byl 1 400 W, odražená energie pak byla <1. Průtok chladicího plynu byl nastaven na 14 L/min, průtok plynu zamlžovačem byl 0,78 L/min, průtok plazmového plynu pak byl 1,3 L/min. Byl použit Meinhardův

zamlžovač. Režim snímání byl nastaven na Peak jump, počet bodů na pík byl 3. Doba záznamu signálu byla 10 ms, doba ustálení kvadrupólu 10 ms. Opakovalo se třikrát, počet skenů na opakování byl 80. Dále byl použit duální mód detektoru. Kvalita analytického procesu byla verifikována pomocí referenčních materiálů SRM2711 (NIST, USA, Montana Soil) a SRM2709 (NIST, USA, San Joaquin Soil).

**Zvířata** byla při přípravě pro determinaci opláchnuta vodou, aby byla zbavena nečistot zachycených na povrchu a poté byla uložena do čistého etanolu. Materiál byl determinován Dr. Jakubem Strakou. Při testování metodiky se ukázalo, že limitní hmotnost vzorku pro analýzu činí před vysušením a rozemletím 0,8g. Po determinaci zvířat proto byly v rámci jednoho druhu a sběru vytvořeny za pomoci analytických vah skupiny tak, aby jejich hmotnost před vysušením a rozemletím činila alespoň zmíněných 0,8 g, čímž vznikly skupiny po 2 až třiceti kusech.

Následně byli jedinci sušeni 72 hodin při teplotě 70 °C (převzato ze studie Wilczek et al. 2005). Po vysušení byla zvířata ve skupinách znova zvážena. Následně byla rozemleta pomocí rotorového mlýnku na 0,12 mm. Takto bylo získáno 95 vzorků, které byly analyzovány Mgr. Stanislavou Matějkovou (Analytická laboratoř, Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, v.v.i.) emisní spektrometrií s indukčně vázaným plazmatem elektronickou valorizací.

K analýze byl použit plně simultánní ICP-OES spektrometr SpectroArcos (SpectroAnalytical Instruments, Německo) s radiálním pohledem do plazmatu, který byl nastaven na výkon 1 600 W. Průtok chladícího plynu byl 15 L/min, plazmový plyn protékal rychlostí 1,2 L/min. Snímání signálu proběhlo v transientním modu. Rychlost vzorkování byla 10 Hz, integrační interval byl 100 ms/1 integrace. Jako zařízení pro elektrotermickou valorizaci bylo použito ETV-4000c s autosamplerem AD 50. Nosným plynem byl argon s průtokem 0,140 L/min, by-pass plyn měl průtok 0,380 L/min, jako reakční plyn byl použit R12s průtokem 2 ml/min. Teplotní program byl nastaven takto: 0 – 300°C/10 s, 300 – 600°C/50 s, 550 – 2000°C/35 s, 2000 – 2500°C/20 s, 2500°C/3 s, chlazení, celková délka programu pak byla 120 s.



### 3.4. Statistické analýzy

Rozdíl v koncentracích jednotlivých studovaných prvků v popílku a písku byl testován párovým t-testem s Bonferroniho korekcemi. v prostředí R (R Core Team 2015).

Heterogenita mezi vzorky substrátů byla analyzována pomocí metody hlavních komponent (PCA (Hotelling 1933)) v prostředí R (R Core Team 2015)

Vliv typu substrátu na koncentraci vybraných prvků ve tkáni blanokřídlých byl v prostředí R za použití fylogenetické korekce analyzován metodou Generalized Estimating Equations (GEE (Liang and Zeger 1986)) a pro srovnání bez fylogenetické korekce metodou GLM (McCullagh and Nelder 1998).

Vliv typu substrátu a potravní strategie na koncentraci vybraných prvků ve tkáni blanokřídlých za použití fylogenetické korekce byl taktéž analyzován metodou GEE v prostředí R.

V analýzách s použitím fylogenetické korekce byly zohledněny fylogenetické vztahy mezi jednotlivými druhy. Tyto korekce byly použity kvůli rozdílným druhům z popílku, které mohou mít různé preadaptace. Kladogram, z něhož byla vytvořena distanční matice, byl vytvořen z kladogramu sestaveného Gabrielou Wofkovou (2016) na základě prací Bogusch et al. (2007) a Hedke et al. (2013). Kladogram byl rekonstruován pouze s druhy, které byly analyzovány v této práci. K zobrazení a kontrole byl použit program FigTree (<http://www.tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree>, 2016).

Fylogenetické distance byly definovány jako počty nodů mezi jednotlivými taxony, v prostředí R pak byla pro odstranění zbytečných nodů použita funkce „collapse.singles“ z balíčku APE (Paradis et al. 2004).

#### **Koncentrace prvků v substrátu podle typu substrátu**

Rozdíl v koncentracích jednotlivých studovaných prvků v popílku a písku byl testován párovým t-testem s Bonferroniho korekcemi.

#### **Koncentrace prvků v substrátu podle jednotlivých lokalit**

Pro stanovení heterogenity substrátů jednotlivých lokalit byla provedena analýza hlavních komponent (PCA) v prostředí R s pomocí balíčku vegan (Oksanen et al.

2016). Vysvětlovanou proměnnou byla příslušnost vzorku k lokalitě a vysvětlující proměnnou naměřené koncentrace v jednotlivých vzorcích. Nejprve byly chybějící hodnoty v naměřených koncentracích nahrazeny průměrnou koncentrací prvku na lokalitě. Poté byla data standardizována pomocí funkce „decostand“ a následná analýza hlavních komponent byla provedena pomocí funkce „rda“.

### **Koncentrace prvků ve tkáních hmyzu podle typu substrátu**

Pro otestování vlivu substrátu na koncentraci vybraných prvků ve tkáních byly naměřené koncentrace prvků ve tkáních analyzovány v Gamma rozložení. Pomocí funkce „`compar.gee`“ z balíčku APE (Paradis et al. 2004) byl sestaven model s funkcí „`log`“. Byly vytvořeny základní modely pro každý prvek, jejichž vysvětlovanou proměnnou byl typ substrátu a vysvětlující proměnnou byly naměřené koncentrace jednotlivých prvků. Do modelu byla také začleněna fylogenetická korekce za použití balíčku phytools (Revell 2016). Nakonec byla použita Bonferroniho korekce.

Naměřené koncentrace byly také analyzovány v binomickém rozložení pomocí funkce „`glm`“. Byly vytvořeny základní modely pro každý prvek, jejichž vysvětlovanou proměnnou byl typ substrátu a vysvětlující proměnnou byly naměřené koncentrace jednotlivých prvků. Do modelu ale nebyla začleněna fylogenetická korekce, což bylo důvodem provedení této analýzy. Vytvořené modely byly dále analyzovány analýzou variance (ANOVA) a testovány pomocí Chi-kvadrát testu. Nakonec byla použita Bonferroniho korekce.

### **Koncentrace prvků ve tkáních hmyzu podle typu substrátu a potravní strategie**

Naměřené koncentrace prvků ve tkáních byly analyzovány v Gamma rozložení. Pomocí funkce „`compar.gee`“ z balíčku APE (Paradis et al. 2004) byl sestaven model s funkcí „`log`“. Byly vytvořeny základní modely pro každý prvek, jejichž vysvětlovanou proměnnou byl typ substrátu v kombinaci s potravní strategií a vysvětlující proměnnou byly naměřené koncentrace jednotlivých prvků. Do modelu byla také začleněna fylogenetická korekce za použití balíčku phytools (Revell 2016). Nakonec byla použita Bonferroniho korekce.

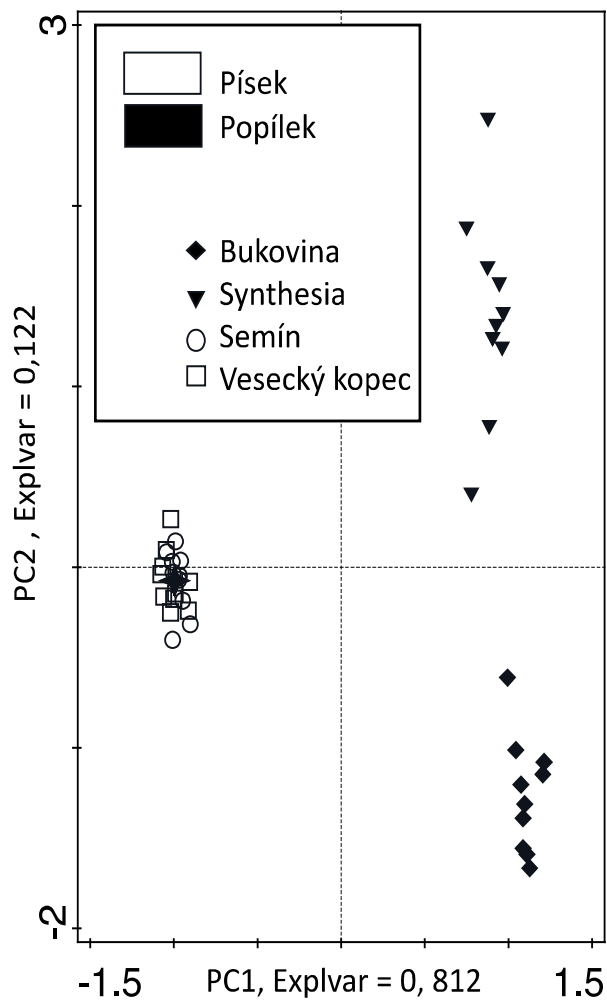
## 4. Výsledky

Celkově se podařilo kombinací aktivního a pasivního sběru sesbírat na dvou písčínách a dvou odkalištích v oblasti Polabí 55 druhů žahadlových blanokřídlých v dostatečném množství pro vznik 95 vzorků. Ve vzorcích byla následně změřena koncentrace vybraných prvků. Ze zmíněných 95 vzorků, které dohromady tvořilo 896 jedinců, pocházelo 52 vzorků z odkališť a 43 vzorků z písčín.

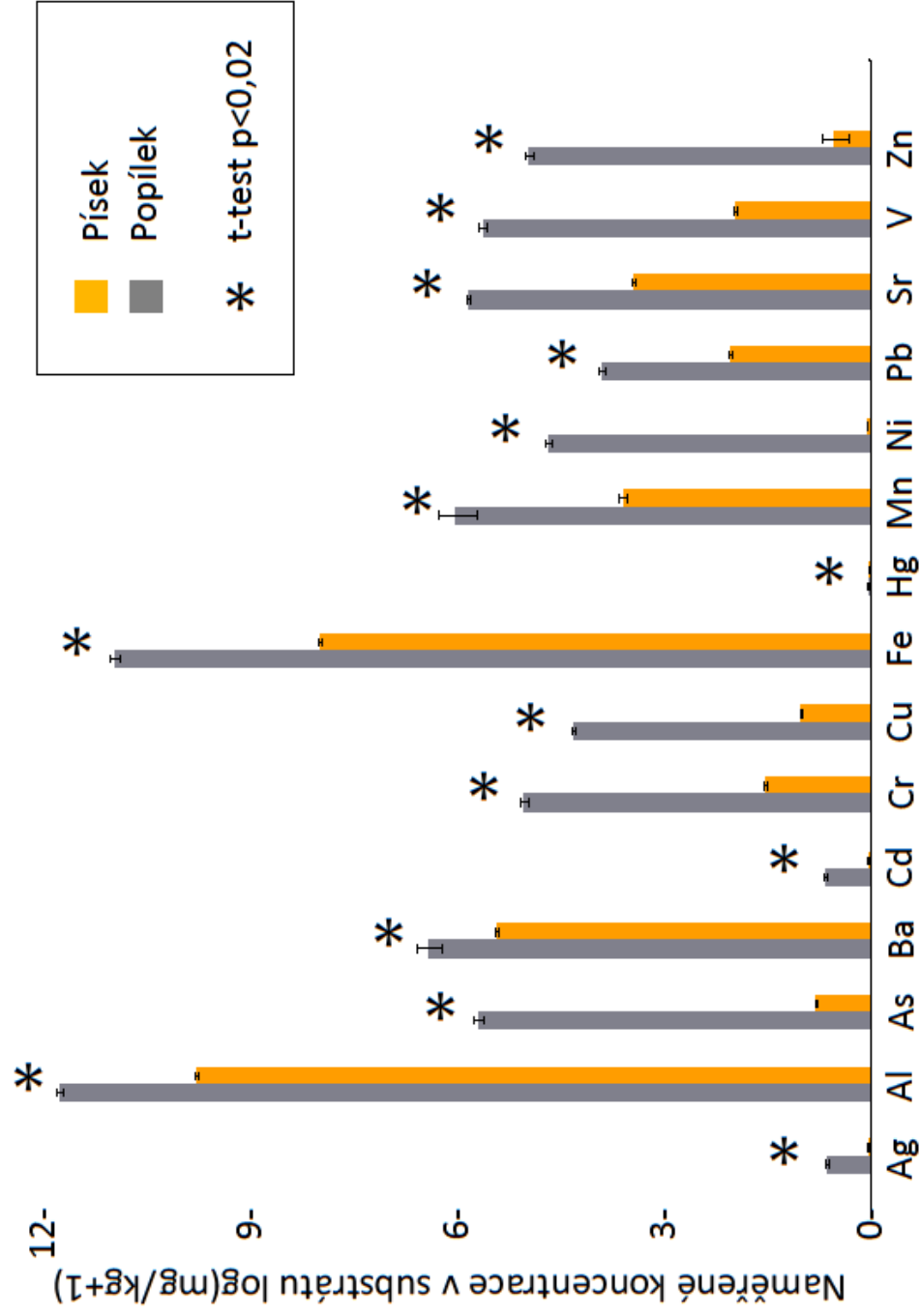
### 4.1. Koncentrace prvků v substrátu popílkovišť a písčín

Koncentrace všech sedmnácti prvků byly průkazně vyšší v substrátu odkaliště než v substrátu písčín což je patrné z výsledného grafu, který zobrazuje logaritmicky transformované naměřené koncentrace jednotlivých prvků v obou typech substrátu (Obrázek 2). Dále se ukázalo, že substrát písčín je poměrně homogenní, zatímco vzorky popílku se od sebe liší jak v rámci každé lokality, tak v rámci typu substrátu (Obrázek 1).

**Obrázek 1:** Znázornění heterogenity lokalit za použití analýzy hlavních komponent (viz kapitola 3.4.). Jednotlivé značky znázorňují vzorky z příslušných lokalit. Rozložení vzorků znázorňuje heterogenitu mezi typy substrátu, oběma odkališti a heterogenitu substrátu v rámci každého odkaliště. Hladina průkaznosti byla v tomto případě 0,001.



**Obrázek 2:** Porovnání průměrných hodnot naměřených koncentrací v substrátech testovaných pomocí t-testu s Bonferroniho korekcí (viz. kapitola 3.4). Jednotlivé sloupce zobrazují logaritmičky transformované naměřené koncentrace jednotlivých prvků v obou typech substrátů s vyznačením směrodatné odchylky. Hladina průkaznosti byla v tomto případě 0,02.



#### **4.1. Koncentrace prvků ve tkáních žahadlových blanokřídých**

Z celkového počtu sedmnácti vybraných prvků, se u jedenácti podařil prokázat za použití fylogenetické korekce vliv substrátu na míru akumulace vybraných prvků do tkání žahadlových blanokřídých, konkrétně: Al, As, Cd, Co, Fe, Mn, Se, Sr, V a Zn. Tento výsledek je patrný z Tabulky 2, která obsahuje výsledky analýzy metodou GEE a je znázorněn Obrázkem 3, který zobrazuje logaritmičsky transformované naměřené koncentrace jednotlivých prvků ve tkáních žahadlových blanokřídých z obou typů substrátu.

Na druhou stranu bez použití fylogenetické korekce, se jako signifikantní jeví vyšší množství Al, As, Cd, Fe, Se, Sr a V ve tkáních žahadlových blanokřídých z odkališť. Tento výsledek je patrný z Tabulky 3, která obsahuje výsledky analýzy modelů vytvořených metodou GLM za použití analýzy variance s Bonferroniho korekcí.

#### **4.1. Koncentrace prvků ve tkáních žahadlových blanokřídých**

Pouze u šesti vybraných prvků ze sedmnácti se podařil prokázat vliv substrátu v kombinaci s potravní strategií zvířat. V případě herbivorních blanokřídých (požírají pouze rostliny nebo jejich části; Townsend et al. 2010) z odkališť se ukázalo, že jedinci akumulují větší množství Cr, Fe, a Mn na odkališti, zatímco hladina Cu a Zn je u herbivorů vyšší na písčínách. Obdobně nesourodé výsledky se ukázaly i u karnivorů (požírají pouze živočichy nebo jejich části; Townsend et al. 2010), kdy tkáň jedinců z odkališť obsahovaly méně Cr, Mn, a Zn, než tkáň jedinců z písčín, zatímco hladiny Fe byly vyšší ve tkáních jedinců z odkališť. Dále se ukázalo, že v případě Cu se hladiny vybraných prvků obsažených ve tkáních karnivorů z odkališť neliší od hladiny vybraných prvků ve tkáních karnivorů z písčín. Tyto výsledky jsou uvedeny v Tabulce 4 a znázorněny na Obrázku 4, který zobrazuje logaritmičsky transformované naměřené koncentrace jednotlivých prvků ve tkáních herbivorů a karnivorů z odkališť a písčín.

**Tabulka 2:** Výsledky analýz metodou GEE s použitím Bonferroniho korekce pro analýzu vlivu substrátu na koncentraci vybraných prvků ve tkáních žahadlových blanokřídličů (viz kapitola 3.4.)

	Ag		Al		As		Ba		Cd		Co	
	Intercept	Odkaliště	Intercept	Odkaliště	Intercept	Odkaliště	Intercept	Odkaliště	Intercept	Odkaliště	Intercept	Odkaliště
Estimate	-2.9721	-0.1203	4.4108	0.5063	4.4108	1.5627	1.7151	-0.3579	-2.3579	0.8946	-1.9777	0.2009
SE	0.3345	0.08158	0.1728	0.0421	0.4684	0.1142	0.6741	0.1644	0.3213	0.0784	0.1875	0.0457
t	-8.8859	-1.4745	25.5241	12.0119	-3.1154	13.6793	2.5443	-2.1769	-7.3387	11.4161	-10.5492	4.3943
P	1	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0.7332		<0,0001		0.0043	
	Cr		Cu		Fe		Hg		Mn		Ni	
	Intercept	Odkaliště	Intercept	Odkaliště	Intercept	Odkaliště	Intercept	Odkaliště	Intercept	Odkaliště	Intercept	Odkaliště
Estimate	1.1099	0.4928	3.1588	-0.0291	4.8086	0.2180	-2.9736	-0.1247	3.2063	0.1816	-0.3500	0.6988
SE	0.6585	0.1606	0.0700	0.0171	0.1567	0.0382	0.3199	0.0780	0.2614	0.0638	2.7026	0.6592
t	1.685	3.0681	45.1230	-1.7036	30.6812	5.7030	-9.2944	-1.5986	12.2647	2.8485	-0.1295	1.0601
P	0.1029	1	1		0.0002		1		0.1703		1	
	Pb		Se		Sr		V		Zn			
	Intercept	Odkaliště	Intercept	Odkaliště	Intercept	Odkaliště	Intercept	Odkaliště	Intercept	Odkaliště		
Estimate	-0.4157	-0.0327	-0.5276	1.5766	0.4639	0.5198	-3.2324	1.6324	5.0604	0.9737		
SE	0.3264	0.0796	0.3627	0.0885	0.1627	0.0397	0.5952	0.1452	0.8585	0.2094		
t	-1.2735	-0.4105	-1.4546	17.8212	2.8510	13.0971	-5.4306	11.2442	5.8947	4.6505		
P	1	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001		0.0023			

Legenda: Estimate = odhad regresních koeficientů modelu; SE = střední chyba průměru, určující odlišnost průměru hodnot náhodně získaného vzorku a průměru hodnot základního souboru; t = hodnota t-testu porovnávaných koncentrací; P= hladina významnosti po Bonferroniho korekci.

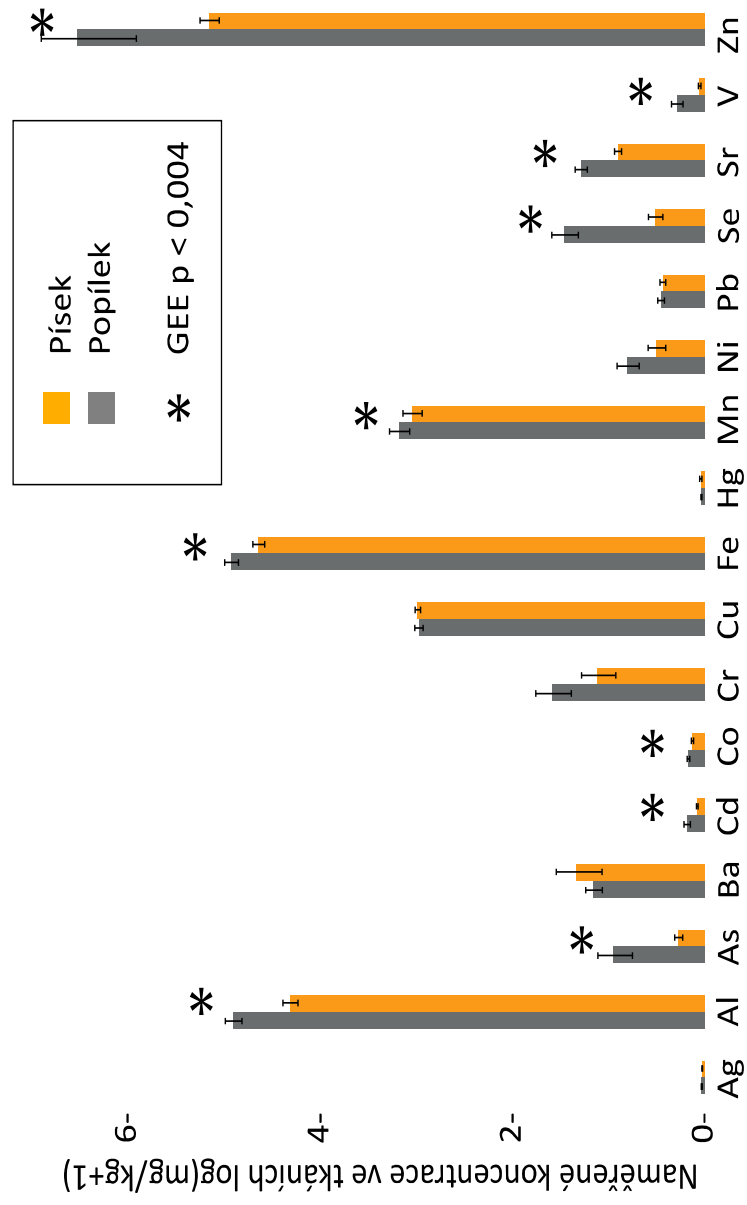
**Tabulka 3:** Výsledky analýz variance finálních modelů vytvořených metodou GLM bez použití fylogenetické korekce pro zjištění vlivu substrátu na koncentraci vybraných prvků ve tkáních blanokřídých (viz kapitola 3.4.)

		Df	D.R.	Chi	P
Ag	Null	90	125.26		
	Ag	89	120.68	0.0324	0.5508
Al	Null	90	125.26		
	Al	89	104.97	>0.0001	>0.0001
As	Null	90	125.26		
	As	89	78.557	>0.0001	>0.0001
Ba	Null	90	125.26		
	Ba	89	122.47	0.0943	1
Cd	Null	90	125.26		
	Cd	89	109.15	>0.0001	>0.0001
Co	Null	90	125.26		
	Co	89	121.73	0.0604	1
Cr	Null	90	125.26		
	Cr	89	124.17	0.2958	1
Cu	Null	90	125.26		
	Cu	89	125.16	0.7488	1
Fe	Null	90	125.26		
	Fe	89	114.66	0.0011	0.0187
Hg	Null	90	125.26		
	Hg	89	124.67	0.4405	1
Mn	Null	90	125.26		
	Mn	89	123.96	0.2537	1
Ni	Null	90	125.26		
	Ni	89	119.7	0.0183	0.3111
Pb	Null	90	125.26		
	Pb	89	124.45	0.3693	1
Se	Null	90	125.26		
	Se	89	73.341	>0.0001	>0.0001
Sr	Null	90	125.26		
	Sr	89	91.517	>0.0001	>0.0001
V	Null	90	125.26		
	V	89	85.719	>0.0001	>0.0001
Zn	Null	90	125.26		
	Zn	89	122.58	0.1015	1

Legenda: Null = nulový model; Df = Stupně volnosti; D.R. = Devianční rezidua; Chi = výsledek Chi-kvadrát testu; P= hladina významnosti po Bonferroniho korekci.



**Obrázek 3.** Porovnání naměřených koncentrací vybraných prvků ve tkáních žahadlových blanokřídlých z odkališť a písčin metodou GEE za použití fylogenetické korekce (viz kapitola 3.4.). Jednotlivé sloupce zobrazují logaritmičky transformované naměřené koncentrace jednotlivých prvků ve tkáních blanokřídlých z obou typů substrátů s vyznačením směrodatné odchylky. Hladina průkaznosti byla v tomto případě 0,004.

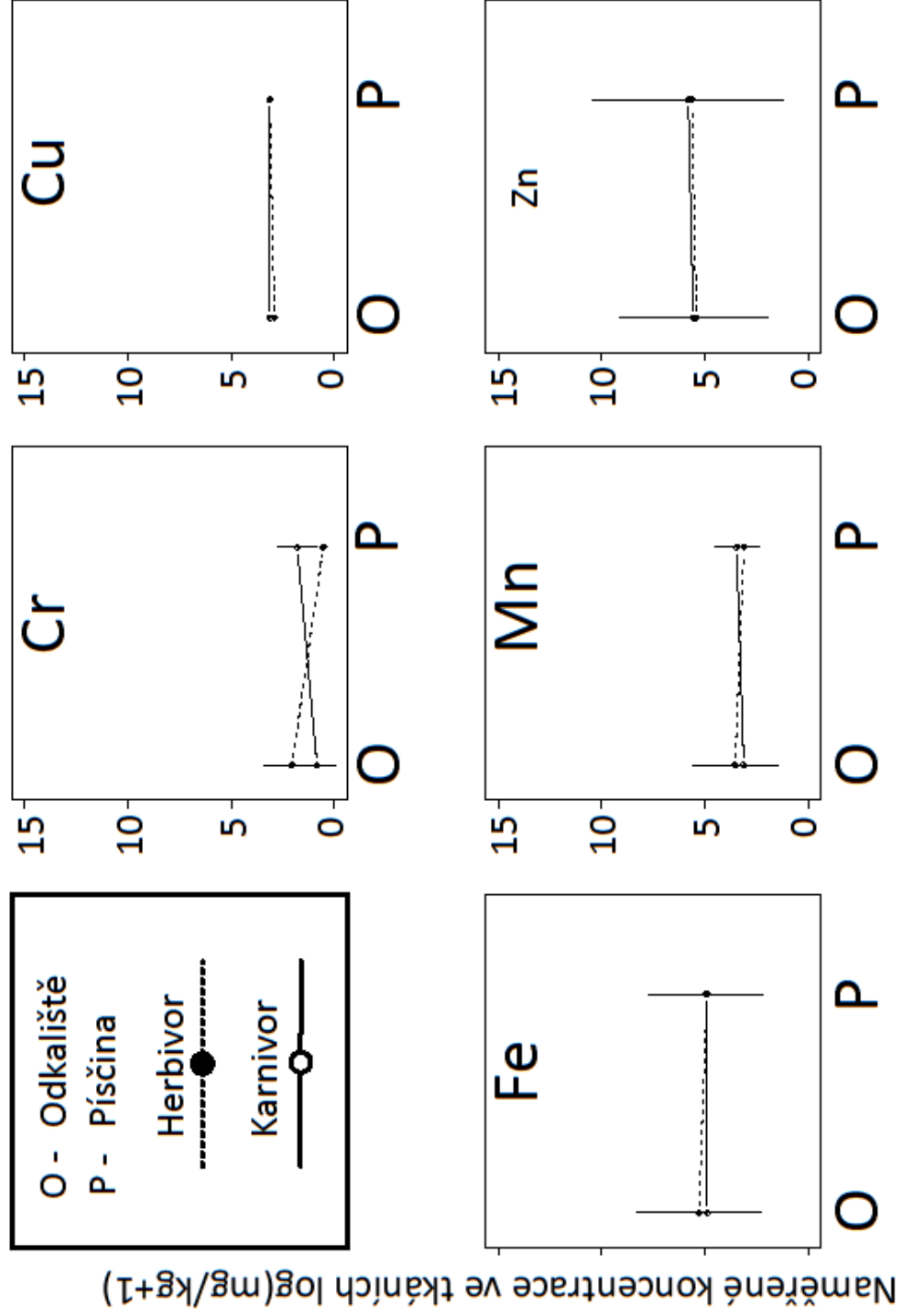


**Tabulka 4:** Výsledky analýz metodou GEE s použitím fylog. korekce pro analýzu vlivu substrátu a potravní strategie na koncentraci vybraných prvků ve tkáních blanokřídlých (viz kapitola 3.4.)

		Estimate	SE	t	P			Estimate	SE	t	P
Ag	Intercept	-3.5630	0.5889	-6.0506	0.1937	Hg	Intercept	-3.4881	0.5749	-6.0666	0.0660
	Karnivor	0.7127	0.6047	1.1786			Karnivor	0.6348	0.5904	1.0751	
	Odkaliště	0.1380	0.1250	1.1039			Odkaliště	0.2244	0.1220	1.8388	
	Karn.:Odkal.	-0.4675	0.1658	-2.8187			Karn.:Odkal.	-0.5341	0.1619	-3.2986	
Al	Intercept	4.2710	0.3280	13.0223	1	Mn	Intercept	2.7782	0.4975	5.5839	0.0049
	Karnivor	0.1828	0.3368	0.5426			Karnivor	0.5561	0.5109	1.0885	
	Odkaliště	0.5732	0.0696	8.2319			Odkaliště	0.5332	0.1056	5.0491	
	Karn.:Odkal.	-0.1292	0.0924	-1.3989			Karn.:Odkal.	-0.6200	0.1401	-4.4248	
As	Intercept	-2.0649	1.0949	-1.8859	0.3450	Ni	Intercept	-0.4561	3.1972	-0.1426	1
	Karnivor	0.6968	1.1243	0.6197			Karnivor	0.1388	3.2832	0.0423	
	Odkaliště	2.1736	0.2324	9.3515			Odkaliště	1.2080	0.6787	1.7798	
	Karn.:Odkal.	-0.7872	0.3084	-2.5528			Karn.:Odkal.	-0.9906	0.9005	-1.1000	
Ba	Intercept	0.9710	1.0630	0.9134	0.1002	Pb	Intercept	-0.4561	3.1973	-0.1426	1
	Karnivor	0.8593	1.0916	0.7872			Karnivor	0.1388	3.2832	0.0423	
	Odkaliště	0.2368	0.2257	1.0492			Odkaliště	1.2080	0.6788	1.7798	
	Karn.:Odkal.	-0.9325	0.2994	-3.1145			Karn.:Odkal.	-0.9906	0.9005	-1.1001	
Cd	Intercept	-2.9040	0.6745	-4.3056	1	Se	Intercept	-0.6454	0.6617	-0.9754	0.2437
	Karnivor	0.6593	0.6926	0.9520			Karnivor	0.0844	0.6794	0.1243	
	Odkaliště	0.9809	0.1432	6.8504			Odkaliště	1.2874	0.1404	9.1651	
	Karn.:Odkal.	-0.1509	0.1899	-0.7943			Karn.:Odkal.	0.5057	0.1863	2.7139	
Co	Intercept	-1.9772	0.3102	-6.3739	0.6661	Sr	Intercept	0.3350	0.2967	1.1294	0.4827
	Karnivor	0.0127	0.3185	0.0400			Karnivor	0.1760	0.3046	0.5779	
	Odkaliště	0.3012	0.0658	4.5733			Odkaliště	0.6271	0.0629	9.9570	
	Karn.:Odkal.	-0.1956	0.0874	-2.2383			Karn.:Odkal.	-0.2000	0.0835	-2.3940	
Cr	Intercept	0.2509	1.2285	0.2042	0.0312	V	Intercept	-3.8951	1.3778	-2.8269	0.2170
	Karnivor	1.0187	1.2615	0.8075			Karnivor	0.7461	1.4149	0.5273	
	Odkaliště	1.2131	0.2608	4.6516			Odkaliště	2.4658	0.2925	8.4301	
	Karn.:Odkal.	-1.2543	0.3460	-3.6253			Karn.:Odkal.	-1.0737	0.3880	-2.7668	
Cu	Intercept	3.2484	0.1260	25.7972	0.0040	Zn	Intercept	4.0646	1.7182	2.3655	0.0346
	Karnivor	-0.1219	0.1293	-0.9424			Karnivor	1.2776	1.7644	0.7241	
	Odkaliště	-0.1234	0.0267	-4.6175			Odkaliště	1.9425	0.3647	5.3254	
	Karn.:Odkal.	0.1600	0.0354	4.5117			Karn.:Odkal.	-1.7323	0.4839	-3.5797	
Fe	Intercept	4.7586	0.2469	19.2754	0.00159						
	Karnivor	0.0839	0.2535	0.3309							
	Odkaliště	0.4017	0.0524	7.6638							
	Karn.:Odkal.	-0.3419	0.0695	-4.9167							

Legenda: Legenda: Estimate = odhad regresních koeficientů modelu; SE = střední chyba průměru, určující odlišnost průmětu hodnot náhodně získaného vzorku a průměru hodnot základního souboru; t = hodnota t-testu porovnávaných koncentrací; P= hladina významnosti po Bonferroniho korekci.

**Obrázek 4:** Porovnání naměřených koncentrací vybraných prvků ve tkáních herbivorů a karnivorů z odkališť a písčín metodou GEE za použití fylogenetické korekce (viz kapitola 3.4.). Hladina průkaznosti byla v tomto případě nižší než 0,05.



## 4. Diskuze

Dle očekávání průkazně vyšší koncentrace vybraných prvků v substrátu popílku odpovídají výsledkům jiných studií, zabývajících se obsahem prvků v substrátu odkališť (Hopkins et al. 1998; Jala and Goyal 2006; Tripathi et al. 2009; Riehl et al. 2010; Lopareva-Pohu et al. 2011). Jedná se však pouze o okrajový výstup této práce. Většina prvků byla v substrátu odkališť naměřena v podobných koncentracích. Prvky které se svými vysokými koncentracemi vymykaly, byly Al a Fe, zatímco velice nízké byly naměřené hladiny Ag, Cd a Hg. Porovnat koncentrace jednotlivých prvků s jinými odkališti.

Překvapivá je v porovnání s popílkem vysoká koncentrace některých vybraných prvků také na písku. Měřením koncentrací vybraných prvků v písku byly totiž odhaleny poměrně vysoké (ne však vyšší než v popílku) koncentrace Al, Ba, Fe, Mn a Sr. Je velice pravděpodobné, že se jedná o kontaminaci z blízkých elektráren spalujících uhlí podobně jako tomu je například na Mostecku (Ustyak and Petrikova 1996). V praxi by to mohlo znamenat, že blanokřídli, kteří se přesouvají z písčiny na odkaliště, se minimálně ve studované oblasti s těmito prvky již setkali. Pravděpodobně se tedy v případě Al, Ba, Fe, Mn a Sr nejedná o ty prvky, které by způsobovali selekci druhů na odkalištích. Na druhou stranu nelze vyloučit, že přítomnost těchto prvků na písčínách nezpůsobila v minulosti selekci druhů blanokřídlych i na písku a že citlivé druhy nejsou zastoupeny ani na jedné lokalitě.

Důležité jsou výsledky analýz koncentrací prvků ve tkáních blanokřídlych. Signifikantně vyšší hladiny Al, As, Cd, Co, Fe, Mn, Se, Sr a V naměřené ve tkáních blanokřídlych za použití metody GEE potvrzují předpoklad, že blanokřídli z odkališť prokazatelně akumulují vyšší hladiny zmíněných než blanokřídli z písčin. Vyšší hladina As, Fe, Sr a Zn ve tkáních blanokřídlych z odkališť odpovídá výsledkům studií mravenců (Eeva et al. 2004; Gramigni et al. 2011). Je proto možné, že akumulace těchto prvků je vázána na kontakt se substrátem, které je pro mravence i psamofilní žahadlové blanokřídle běžný. Vyšší hladina Cd a Zn odpovídá studii pavouků (Wilczek et al. 2005). Jelikož jsou pavouci karnivorní, existuje jistá pravděpodobnost, že tyto prvky akumulují z části v důsledku požívání tkání žahadlových blanokřídlych a dalšího hmyzu. Hladiny Cd a Zn byly vyšší také u zednice rezavé (Moroń et al. 2014). Je pravděpodobné, že vzhledem k potravě

zednice rezavé, kterou tvoří pyl a nektar (Macek et al. 2010), právě zdrojem zmíněných prvků rostlinná potrava. Na druhou stranu byly u některých ze zmíněných skupin naměřeny prokazatelně vyšší hladiny Cu, Ni a Pb (Eeva et al. 2004; Wilczek et al. 2005; Moroń et al. 2014). Přesný původ prvků ve tkáních blanokřídlých, které byly analyzovány v této práci lze jen odhadovat, neboť to není předmětem této práce.

Skutečnost, že blanokřídlí z odkališť do svých tkání ve vyšších koncentracích akumulují více než polovinu vybraných prvků, vyvrací možný předpoklad, že tato skupina vybrané prvky vůbec nepřijímá. Na druhou stranu, to že ve tkáních jedinců byly naměřeny někdy i vysoké koncentrace vybraných prvků nemusí nutně znamenat, že by tím blanokřídlí významně trpěli. Samotný fakt, že na odkalištích žijí i původně vyhynulé druhy (Tropek et al. 2013) poukazuje na možnost, že jsou prvky ve tkáních blanokřídlých uloženy v podobě, která jim, přinejmenším nezpůsobuje vážné potíže. Schopnost ukládat prvky do tkání v metabolicky neaktivní, tudíž neškodné, podobě byla zdokumentována u vodních plžů (AbdAllah 2014). Dále je možné, že naměřené koncentrace některých prvků nepochází ze tkání, ale z trávicího traktu zvířat. Aby byla tato možnost vyloučena, musela by být zvířata před vysušením pitvána. Asi nejzajímavější výsledek této práce vznikne při srovnání naměřených koncentrací vybraných prvků v obou typech substrátu s naměřenými koncentracemi ve tkáních blanokřídlých. Zatímco v substrátu odkališť byly mnohdy naměřeny několikanásobně vyšší koncentrace těžkých kovů než v substrátu písčín, tkáně blanokřídlých tak markantní rozdíl v koncentraci obsažených prvků nevykazovaly. Z toho lze usuzovat, že se blanokřídlí dovedou akumulaci většiny prvků efektivně bránit podobně jako je tomu u jiných skupin bezobratlých. V případě psamofilních blanokřídlých by mohlo jít o jistou formu preadaptace, kdy se přinejmenším některé druhy v minulosti již s těžkými kovy setkali. Takovým prostředím je v přírodě například sopečný popel (Rodrigues et al. 2008). Stejně tak je ale možné, že si blanokřídlí z písčín obstarávají potravu v lesních porostech obklopující písčiny. V této práci nebyla věnována pozornost obsahu těžkých kovů v půdě přilehlého okolí, nicméně nelze vyloučit, že v důsledku filtrace vzduchu, která probíhá v korunách stromů, se hromadí částice prachu s těžkými kovy lesní půdě. K hromadění by pak docházelo zejména v povrchové vrstvě, protože přísun těžkých kovů bývá zpravidla vyšší než jejich ztráta do podzemní vody (Van Starleen and Donker 1994). Problém také tkví v nedostatku informací o citlivosti jednotlivých druhů na vybrané prvky. I kdyby byly

v této práci porovnávány koncentrace prvků ve tkáních jednotlivých druhů, neznamenaloby to, že druhy, které akumulují nejvíce, jsou nejcitlivější. Naopak nejcitlivější druhy pravděpodobně na odkalištích vůbec nežijí. Pro tyto druhy pak zachování odkališť nemá význam, a proto nelze popílek považovat za plnohodnotnou náhradu za vátý písek. Na druhou stranu se přinejmenším na studovaných lokalitách úbytek písčiny nezastavil a pro velké množství druhů pravděpodobně těžké kovy obsažené v popílku nepředstavují závažný problém (Tropek et al. 2013) a právě pro tyto druhy má ochrana odkališť velký význam.

Posledním studovaným faktorem byl vliv potravy a substrátu na akumulaci vybraných prvků do tkání. Navzdory předpokladu, že jedinci z odkališť akumulují vyšší množství vybraných prvků do svých tkání, v důsledku vyšší koncentrace těchto prvků v prostředí, které obývají, se ukázalo, že je toto tvrzení pravdivé jen u zlomku vybraných prvků. Svou roli zde zřejmě sehrála kombinace faktorů. Jedním z nich by mohlo být rozdílné druhové složení na popílku a písku, kdy některé druhy byly hojně zastoupeny buďto na jednom nebo na druhém substrátu. V této práci nebyly měřeny koncentrace vybraných prvků v rostlinách a ani nebyl proveden botanický průzkum na lokalitách. Nicméně lze předpokládat, že se lokality stejně jako faunou lišily i flórou. Je možné, že různí herbivoři měli k dispozici nebo dávali přednost na různých lokalitách odlišným druhům rostlin a tím se měnilo i množství vybraných prvků, které akumulovali. Dalším faktorem je pak biologická dostupnost naakumulovaných prvků pro případné karnivory (Rodrigues et al. 2008). Vzhledem k druhové rozdílnosti typů substrátu, bylo i zastoupení druhů karnivorů na obou typech substrátu rozdílné. Různé druhy karnivorů si vybírají odlišnou kořist (Macek et al. 2010), která pravděpodobně akumuluje rozdílné množství vybraných prvků a ukládá je v biologicky dostupné nebo nedostupné podobě (Rodrigues et al. 2008).

Nelze vyloučit roli detoxikace a prevence intoxikace některých prvků. Za předpokladu, že žahadloví blanokřídílí, ať už herbivoři nebo karnivoři, získají většinu své tělesné váhy během larválního stádia, kdy intenzivně přijímají potravu (Macek et al. 2010), je pravděpodobné, že i většinu vybraných prvků přijímají tyto bezobratlí před metamorfózou. Nelze vyloučit, že právě během metamorfózy dochází k částečné a možná i druhově specifické detoxikaci některých prvků, jako je tomu například u jepice *Centroptilum triangulifer*, která se během metamorfózy zbavuje účinně zinku (Kim 2012). Svůj vliv má pravděpodobně také prevence intoxikace

jedinců některými vybranými prvky, jako je tomu u chrostíků *Hydropsyche californica*, kdy bylo pozorováno, že jedinci, kteří se s Cd již setkali, naakumulovali menší množství tohoto prvku než jedinci vystavení Cd poprvé (Cain et al. 2006) a nelze vyloučit podobný jev u žahadlových blanokřídlých.

## 5. Závěr

I přes to, že se na studovaných lokalitách potvrdil předpoklad, že substrát odkališť obsahuje vyšší koncentrace než substrát písčín, stále platí, že struskopopílková odkaliště jsou významná z hlediska ochrany mnohdy ohrožených psamofilních žahadlových blanokřídlých (Tropek et al. 2012, 2013). Právě skutečnost že se psamofilní žahadloví blanokřídlí na odkalištích vyskytují i přes přítomnost vybraných prvků nejen v substrátu popílku ale také v jejich tkáních, vede nevyhnutelně k závěru, že toto téma není v žádném případě vyčerpáno.

Zdá se, že blanokřídlí disponují schopností efektivní obrany proti akumulaci těžkých kovů v jejich tkáních. Proto by bylo do budoucna dobré, zaměřit se na to, zda je tato schopnost vlastní všem nebo pouze některým druhům psamofilních žahadlových blanokřídlých. Je totiž pravděpodobné, že existuje část blanokřídlých, kteří kvůli neschopnosti vypořádat se s těžkými kovy nemohou žít na odkalištích. Z toho důvodu nelze považovat odkaliště za plnohodnotnou náhradu za písčiny a je proto nutné chránit jak písčiny, tak odkaliště před jejich zánikem.



## 6. Literatura

- AbdAllah, A. T., 2014. Light structure as biomarker for heavy metal bioaccumulation and toxicity in molluscan gastropods, *Microscopy: advances in scientific research and education*, 330-334.
- AbdAllah, A. T., Moustafa, M. A., 2002. Accumulation of lead and cadmium in the marine prosobranch *Nerita Saxtilis*, chemical analysis, light and electron microscopy, *Environmental Pollution* 116 (2), 185–191.
- Bachman, G. R., Miller, W. B., 1995. Iron chelate inducible iron/manganese toxicity in zonal geranium, *Journal of Plant Nutrition* 18 (9): 1917–29.
- Bergeron, Ch.M., Bodinof, C. M., Unrine J. M., Hopkins, W. A., 2010. Bioaccumulation and maternal transfer of mercury and selenium in amphibians, *Environmental Toxicology and Chemistry* 29 (4): 989–97.
- Bogusch, P., Straka, J., Přidal, A., 2007. Annotated checklist of the Aculeata (Hymenoptera) of the Czech Republic and Slovakia. *Acta Entomologica Musei Nationalis Pragae, Supplementum* 11, 1–300.
- Bordean, D. M., Nica, D. V., Harmanescu, M., Banatean-Dunea, I., Gergen, I. I., 2014. Soil manganese enrichment from industrial inputs: A gastropod perspective. *PLoS ONE* 9 (1).
- Bryan, A. L., Hopkins, W. A., Baionno, J. A., Jackson, B. P., 2003. Maternal transfer of contaminants to eggs in common grackles (*Quiscalus quiscula*) nesting on coal fly ash basins. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 45 (2): 273–77.
- Bryan, A.L., Hopkins, W.A., Parikh, J.H., Jackson, B.P., Unrine, J.M., 2012. Coal fly ash basins as an attractive nuisance to birds: Parental provisioning exposes

- nestlings to harmful trace elements. *Environmental Pollution* 161 (12): 170–77.
- Burke, J. N., Bergeron, C. M., Todd, B. D., Hopkins W. A., 2010. Effects of mercury on behavior and performance of northern two-lined salamanders (*Eurycea bislineata*). *Environmental Pollution* 158 (12): 3546–51.
- Cain, D. J., Buchwalter, D. B., Luoma, S. N., 2006. Influence of metal exposure history on the bioaccumulation and subcellular distribution of aqueous cadmium in the insect *Hydropsyche californica*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 25 (4): 1042–1049.
- Caroli, S., Forte, G., Iamiceli, A. L., Galoppi, B., 1999. Determination of essential and potentially toxic trace elements in honey by inductively coupled plasma-based techniques. *Talanta* 50 (2): 327–336.
- Chin, S. Y., Willson, J. D., Cristol, D. A., Drewett, D. V.V., Hopkins, W. A., 2013a. High levels of maternally transferred mercury do not affect reproductive output or embryonic survival of northern watersnakes (*Nerodia sipedon*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 32 (3): 619–26.
- Chin, S. Y., Willson, J. D., Cristol, D. A., Drewett, D. V.V., Hopkins, W. A., 2013b. Altered behavior of neonatal northern watersnakes (*Nerodia sipedon*) exposed to maternally transferred mercury. *Environmental Pollution* 176 (13): 144–50.
- “Cittadella.cz.” 2016. *Cittadella.cz*. 7. August 2016  
[http://www.cittadella.cz/europarc/index.php?p=index&site=NPP\\_seminsky\\_presyp\\_cz](http://www.cittadella.cz/europarc/index.php?p=index&site=NPP_seminsky_presyp_cz).
- Croisetière, L., Hare, L., Tessier, A., 2006. A field experiment to determine the relative importance of prey and water as sources of As, Cd, Co, Cu, Pb, and Zn for the aquatic invertebrate *Sialis velata*. *Environmental Science & Technology* 40 (3): 873–79.

- De Dorlodot, S., Lutts, S., Bertin, P., 2005. Effects of ferrous iron toxicity on the growth and mineral composition of an interspecific rice. *Journal of Plant Nutrition* 28 (1): 1–20.
- Dolanský, J., 1998. Příspěvek k poznání arachnofauny východního Polabí. VČ. Sb. přír.–Práce a Studie, 107–16.
- Dolanský, J., 2002. Arachnofauna písčín a bílých strání východních Čech. VČ. Sb. přír.–Práce a Studie, 285–310.
- Donker, M.H., Bogert, C.G., 1991. Adaptation to cadmium in three populations of the isopod *Porcellio scaber*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology* 100 (1–2): 143–46.
- Drobne, D., 1997. Terrestrial isopods - a good choice for toxicity testing of pollutants in the terrestrial environment. *Environmental Toxicology and Chemistry* 16 (6): 1159–1164.
- Duffus, J. H., 2002. 'Heavy metals' a meaningless term? (IUPAC Technical Report). *Pure and Applied Chemistry* 74 (5).
- Eeva, T., Sorvari, J., Koivunen, V., 2004. Effects of heavy metal pollution on red wood ant (*Formica s. str.*) populations. *Environmental Pollution* 132 (3): 533–39.
- Exeler, N., Kratochwil, A., Hochkirch, A., 2009. Restoration of riverine inland sand dune complexes: Implications for the conservation of wild bees. *Journal of Applied Ecology* 46 (5): 1097–1105.
- Filipiak, M., Tylko, G., Pyza, E., 2012. Zinc induces caspase-dependent mitochondrial pathway of the programmed cell death in haemocytes of *Drosophila melanogaster*. *BioMetals* 25 (3): 507–16.

- Fontes, Rr L. F., Cox, F. R., 1998. Iron deficiency and zinc toxicity in soybean grown in nutrient solution with different levels of sulfur. *Journal of Plant Nutrition* 21 (8): 1715–22.
- Ganser, L. R., Hopkins, W. A., O’Neil, L., Hasse, S., Roe, J. H., Sever, D. M., 2003. Liver histopathology of the southern watersnake, *Nerodia fasciata fasciata*, following chronic exposure to trace element-contaminated prey from a coal ash disposal site. *Journal of Herpetology* 37 (1): 219–26.
- Gensemer, R. W., Playle, R. C., 1999. The bioavailability and toxicity of aluminum in aquatic environments. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 29 (4): 315–450.
- Gomes, S. I.L., Hansen, D., Scott-Fordsmand, J. J., Amorim, M. J.B., 2015. Effects of silver nanoparticles to soil invertebrates: Oxidative stress biomarkers in *Eisenia fetida*. *Environmental Pollution* 199 (15): 49–55.
- Goodyear, K. L., McNeill, S., 1999. Bioaccumulation of heavy metals by aquatic macro-invertebrates of different feeding guilds: A review. *Science of the Total Environment* 229 (1): 1–19.
- Gramigni, E., Calusi, S., Chelazzi, G., Del Greco, F., Delfino, G., Gelli, N., Giuntini, L., Massi, M., Santini, G., 2011. Analysis of metal deposit distribution in ants (*Crematogaster scutellaris*) at the florence external scanning microbeam. *X-Ray Spectrometry* 40 (3): 186–90.
- Gramigni, E., Calusi, S., Gelli, N., Giuntini, L., Massi, M., Delfino, G., Chelazzi, G., Baracchi, D., Frizzi, F., Santini, G., 2013. Ants as bioaccumulators of metals from soils: Body content and tissue-specific distribution of metals in the ant *Crematogaster scutellaris*. *European Journal of Soil Biology* 58 (13): 24–31.

- Guo, J., Dai, X., Xu, W., Ma, M., 2008. Overexpressing GSH1 and AsPCS1 simultaneously increases the tolerance and accumulation of cadmium and arsenic in *Arabidopsis thaliana*. *Chemosphere* 72 (7): 1020–26.
- Gutzerová, N., 2013. “Botany.cz.” 18. September 2016 <http://botany.cz/cs/vesecky-kopec/>.
- Hedtke, S. M., Patiny, S., Danforth, B. N., 2013. The bee tree of life: A supermatrix approach to apoid phylogeny and biogeography. *BMC Evolutionary Biology* 13 (1): 138.
- Hopkins, W. A., Mendonça, M. T., Rowe, C. L., Congdon, J. D., 1998. Elevated trace element concentrations in southern toads, *Bufo terrestris*, exposed to coal combustion waste. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 35 (2): 325–329.
- Hopkins, W. A., Roe, J. H., Snodgrass, J. W., Jackson, B. P., Kling, D. E., Rowe, C. L., Congdon, J. D., 2001. Nondestructive indices of trace element exposure in squamate reptiles. *Environmental Pollution* 115 (1): 1–7.
- Hopkins, W. A., Roe, J. H., Snodgrass, J. W., Jackson, B. P., Gariboldi, J. C., Congdon, J. D., 2000. Detrimental effects associated with trace element uptake in lake chubsuckers (*Erimyzon sucetta*) exposed to polluted sediments. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 39 (2): 193–99.
- Hopkins, W. A., Congdon, J., Ray, J. K., 2000. Incidence and impact of axial malformations in larval bullfrogs (*Rana catesbeiana*) developing in sites polluted by a coal-burning power plant. *Environmental Toxicology and Chemistry* 19 (4): 862.
- Hopkins, W. A., Hopkins, L. B., Unrine, J. M., Snodgrass, J., Elliot, J. D., 2007. “Mercury concentrations in tissues of osprey from the Carolinas, USA. *Journal of Wildlife Management* 71 (6): 1819–29.

- Hopkins, W. A., Roe, J. H., Snodgrass, J. W., Staub, B. P., Jackson, B. P., Congdon, J. D., 2002. Effects of chronic dietary exposure to trace elements on banded water snakes (*Nerodia fasciata*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 21 (5): 906.
- Hopkins, W.A., Rowe, C. L., Congdon, J. D. 1999. Elevated trace element concentrations and standard metabolic rate in banded water snakes (*Nerodia fasciata*) exposed to coal combustion wastes. *Environmental Toxicology and Chemistry* 18 (6): 1258.
- Hopkins, W. A., Staub, B. P., Baionno, J. A., Jackson, B. P., Roe, J. H., Ford, N. B., 2004. Trophic and maternal transfer of selenium in brown house snakes (*Lamprophis fuliginosus*). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 58 (3): 285–93.
- Hopkins, W. A., Tatara, C. P., Brant, H. A., Jagoe, C. H., 2003. Relationships between mercury body concentrations, standard metabolic rate, and body mass in eastern mosquitofish (*Gambusia holbrooki*) from three experimental populations. *Environmental Toxicology and Chemistry* 22 (3): 586.
- Hoskovec, L., 2008. “Botany.cz.” 24. February 2016 <http://botany.cz/cs/vate-pisky/>.
- Hotelling, H., 1933. Analysis of a complex of statistical variables into principal components. *Journal of Educational Psychology*, no. 24: 417-441-520.
- „Figtree“ <http://www.tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree>, 2016.
- Jala, S., Goyal, D. 2006. Fly ash as a soil ameliorant for improving crop production - a review. *Bioresource Technology* 97 (9): 1136–47.

- Kim, K. S., Funk, D. H., Buchwalter, D. B., 2012. Dietary (periphyton) and aqueous Zn bioaccumulation dynamics in the mayfly *Centroptilum triangulifer*. *Ecotoxicology* 21 (8): 2288–96.
- Köhler, H.-R., Hiittenrauch, K., Berkus, M., Gräff, S., Alberti, G., 1996. Cellular hepatopancreatic reactions in *Porcellio scaber* (Isopoda) as biomarkers for the evaluation of heavy metal toxicity in soils. *Applied Soil Ecology* 3 (1): 1–15.
- Kolář, L., 1969. Popílky a Možnost Jejich Využití. Praha: Mír 1.
- Konvička, M., Beneš, J., Čížek, L., 2005. Ohrožený Hmyz Nelesních Stanovišť: Ochrana a Management. Olomouc: Sagittaria.
- Koster, E. A., 2009. The European aeolian sand belt: Geoconservation of drift sand landscapes. *Geoheritage* 1 (2–4): 93–110.
- Kumar, G., Singh, R. P., Sushila. 1993. Nitrate assimilation and biomass production in *Sesamum indicum*. Seedlings in a lead enriched environment. *Water, Air, & Soil Pollution* 66 (1–2): 163–71.
- Ladányi, V., 2009. Třinecké odkaliště jako refugium zajímavých druhů. *Živa* 2009 (6): 255–56.
- Lancôt, C., Bennett, W., Wilson, S., Fabbro, L., Leusch, F.D.L., Melvin, S.D., 2016. Behaviour, development and metal accumulation in striped marsh frog tadpoles (*Limnodynastes peronii*) exposed to coal mine wastewater. *Aquatic Toxicology* 173 (April): 218–27.
- Lenntech Water Treatment and Air Purification. 2017. Water treatment. Lenntech, Rotterdamseweg, Netherlands. 2. January 2017 <http://www.lenntech.com/processes/heavy/heavy-metals/heavy-metals.htm>.

- Lewis, S., Donkin, M. E., Depledge, M. H., 2001. Hsp70 expression in *Enteromorpha intestinalis* (Chlorophyta) exposed to environmental stressors. *Aquatic Toxicology* 51 (3): 277–91.
- Liang, K.-Y., Zeger, S. L. 1986. Longitudinal data analysis using generalized linear models. *Biometrika* 73 (1): 13.
- Lopareva-Pohu, A., Pourrut, B., Waterlot, C., Garçon, G., Bidar, G., Pruvot, C., Shirali, P., Douay, F., 2011. assessment of fly ash-aided phytostabilisation of highly contaminated soils after an 8-year field trial. *Science of The Total Environment* 409 (3): 647–54.
- Macek, J., Straka, J., Bogusch, P., Dvořák, L., Bezděčka, P., Tyrner, P., 2010. Blanokřídli České Republiky. Vyd. 1. Atlas. Praha: Academia.
- Maavara, V., 1994. sampling of different social categories of red wood ants (*Formica s. str.*) for biomonitoring. *Environmental sampling for trace analysis* (1994): 465.
- McCullagh, P., Nelder, J. A., 1998. Generalized Linear Models. 2nd ed. Monographs on Statistics and Applied Probability 37. Boca Raton: Chapman & Hall/CRC.
- Mendes, L., Maria, V., Scott-Fordsmand, J., Amorim, M., 2015. Ag nanoparticles (ag nm300k) in the terrestrial environment: effects at population and cellular level in *Folsomia candida* (Collembola). *International Journal of Environmental Research and Public Health* 12 (10): 12530–42.
- Metts, B. S., Buhlmann, K. A., Tuberville, T. D., Scott, D. E., Hopkins, W. A., 2013. Maternal transfer of contaminants and reduced reproductive success of southern toads (*Bufo [Anaxyrus] terrestris*) exposed to coal combustion waste. *Environmental Science & Technology* 47 (6): 2846–53.
- Moroń, D., Szentgyörgyi, H., Skórka, P., Potts, S. G., Woyciechowski, M., 2014. Survival, reproduction and population growth of the bee pollinator, *Osmia*



- Rufa* (Hymenoptera: Megachilidae), along gradients of heavy metal pollution..  
Insect Conservation and Diversity 7 (2): 113–21.
- Munger, C., Hare, L., 1997. Relative importance of water and food as cadmium sources to an aquatic insect (*Chaoborus punctipennis*): Implications for predicting Cd bioaccumulation in nature. Environmental Science & Technology 31 (3): 891–895.
- Oksanen, J., Blanchet, F. G., Friendly, M., Kindt, R., Legendre, P., McGlinn, D., Minchin, P. R., et al. 2016. Community Ecology Package.
- Pandey, N., Sharma, C. P., 2002. Effect of heavy metals Co<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup> and Cd<sup>2+</sup> on growth and metabolism of cabbage. Plant Science 163 (4): 753–58.
- Paradis, E., Claude, J., Strimmer, K., 2004. APE: Analyses of Phylogenetics and Evolution in R Language. *Bioinformatics* 20 (2): 289–90.
- Peltier, G. L., Wright, M. S., Hopkins, W. A., Meyer, J. L., 2009. Accumulation of trace elements and growth responses in *Corbicula fluminea* downstream of a coal-fired power plant. Ecotoxicology and Environmental Safety 72 (5): 1384–91.
- Ponton, D. E., and Hare. L., 2010. Nickel dynamics in the lakewater metal biomonitor *Chaoborus*. Aquatic Toxicology 96 (1): 37–43.
- Poteat, M. D., Buchwalter, D. B., 2014. Calcium uptake in aquatic insects: influences of phylogeny and metals (Cd and Zn). Journal of Experimental Biology 217 (7): 1180–86.
- Prausová, R., Mikát, M., Mikeska, M., 2007. Plán péče o přírodní památku Vesecký kopec na období 2012-2021. Rada pardubického kraje.

- Rabitsch, W. B., 1997. Tissue-specific accumulation patterns of Pb, Cd, Cu, Zn, Fe, and Mn in workers of three ant species (*Formicidae*, *Hymenoptera*) from a metal-polluted site. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 32 (2): 172–177.
- R Core Team. 2015. R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing. Available at: <https://www.r-project.org/>.
- Ramezaniapour, A. A., 2014. Fly ash. Cement replacement materials, by Ali Akbar Ramezaniapour, Springer Berlin Heidelberg. 47–156.
- Řehounek, J., Řehouňková, K., Prach, K., 2010. Ekologická obnova území narušených těžbou nerostných surovin a průmyslovými deponiemi. České Budějovice: Calla.
- Řehouňková, K., Čížek, L., Řehounek, J., Šebelíková, L., Tropek, R., Lencová, K., Bogusch, P., Marhoul, P., Máca, J., 2016. Additional disturbances as a beneficial tool for restoration of post-mining sites: A multi-taxa approach. *Environmental Science and Pollution Research* 23 (14): 13745–53.
- Revell, L. J., 2016. Phylogenetic Tools for Comparative Biology (and Other Things) (version 0.6-00).
- Riehl, A., Elsass, F., Duplay, J., Huber, F., Trautmann, M., 2010. changes in soil properties in a fluvisol (calcaric) amended with coal fly ash.” *Geoderma* 155 (1–2): 67–74.
- Riksen, M., Ketner-Oostra, R., Van Turnhout, C., Nijssen, M., Goossens, D., Jungerius, P. D., Spaan, W., 2006. Will we lose the last active inland drift sands of Western Europe? The origin and development of the inland drift-sand ecotype in the Netherlands.” *Landscape Ecology* 21 (3): 431–47.

- Riksen, M., Spaan, W., Stroosnijder, L., 2008. How to use wind erosion to restore and maintain the inland drift-sand ecotype in the Netherlands? *Journal for Nature Conservation* 16 (1): 26–43.
- Rodrigues, A., Cunha, L., Amaral, A., Medeiros, J., Garcia, P., 2008. Bioavailability of heavy metals and their effects on the midgut cells of a phytophagous insect inhabiting volcanic environments. *Science of The Total Environment* 406 (1–2): 116–22.
- Roe, J. H., Hopkins, W. A., Baionno, J. A., Staub, B. P., Rowe, C. L., Jackson, B. P., 2004. maternal transfer of selenium in Alligator mississippiensis nesting downstream from a coal-burning power plant. *Environmental Toxicology and Chemistry* 23 (8): 1969.
- Rowe, C. L., Heyes, A., Hopkins, W., 2009. Effects of dietary vanadium on growth and lipid storage in a larval anuran: Results from studies employing ad libitum and rationed feeding. *Aquatic Toxicology* 91 (2): 179–86.
- Rowe, C. L., Hopkins, W. A., Coffin, V.R., 2001. Failed recruitment of southern toads ( *Bufo terrestris* ) in a trace element-contaminated breeding habitat: Direct and indirect effects that may lead to a local population sink. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 40 (3): 399–405.
- Rowe, C. L., Hopkins, W. A., Zehnder, C., Congdon, J. D., 2001. Metabolic costs incurred by crayfish (*Procambarus acutus*) in a trace element-polluted habitat: Further evidence of similar responses among diverse taxonomic groups. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 129 (3): 275–283.
- Shaheen, S. M., Hooda, P. S., Tsadilas, C. D. 2014. Opportunities and challenges in the use of coal fly ash for soil improvements – a review. *Journal of Environmental Management* 145 (December): 249–67.

- Snodgrass, J. W., Staub, B. P., Jackson, B. P., Hopkins, W. A., Congdon, J. D., 2003. Altered swimming performance of a benthic fish (*Erimyzon sucetta*) exposed to contaminated sediments. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 44 (3): 383–89.
- Snodgrass, J. W., Hopkins, W. A., Roe, J. H., 2003. Relationships among developmental stage, metamorphic timing, and concentrations of elements in bullfrogs (*Rana catesbeiana*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 22 (7): 1597.
- Solà, C., Prat, N. 2006. Monitoring metal and metalloid bioaccumulation in Hydropsyche (Trichoptera, Hydropsychidae) to evaluate metal pollution in a mining river. whole body versus tissue content. *Science of The Total Environment* 359 (1–3): 221–31.
- Staub, B. P., Hopkins, W. A., Novak, J., Congdon, J. D., 2004. Respiratory and reproductive characteristics of eastern mosquitofish (*Gambusia holbrooki*) inhabiting a coal ash settling basin. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 46 (1): 96–101.
- Todd, B. D., Bergeron, C. M., Hepner, M. J., Hopkins, W. A. 2011. Aquatic and terrestrial stressors in amphibians: A test of the double jeopardy hypothesis based on maternally and trophically derived contaminants. *Environmental Toxicology and Chemistry* 30 (10): 2277–84.
- Tollett, V. D., Benvenuti, E. L., Deer, L. A., Rice, T. M. 2009. Differential toxicity to Cd, Pb, and Cu in dragonfly larvae (Insecta: Odonata). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 56 (1): 77–84.
- Townsend, C.R, Begon, M., Harper, J. L., 2010. *Základy ekologie*. V Olomouci: Univerzita Palackého.

- Tripathi, R. C., Masto, R. E., Ram, L. C. 2009. Bulk use of pond ash for cultivation of wheat–maize–eggplant crops in sequence on a fallow land. *Resources, Conservation and Recycling* 54 (2): 134–39.
- Tropek, R., Cerna, I., Straka, J., Cizek, O., Konvicka, M., 2013. Is coal combustion the last chance for vanishing insects of inland drift sand dunes in Europe? *Biological Conservation* 162 (June): 60–64.
- Tropek, R., Kadlec, T., Hejda, M., Kocarek, P., Skuhrovec, J., Malenovský, I., Vodka, S., Spitzer, L., Banar, P., Konvicka, M., 2012. Technical reclamations are wasting the conservation potential of post-mining sites. A case study of black coal spoil dumps. *Ecological Engineering* 43 (12): 13–18.
- Tropek, R., Řehounek, J., 2012. Bezobratlí postindustriálních stanovišť: význam, ochrana a management. České Budějovice: Entomologický ústav AV ČR : Calla - Sdružení pro záchranu prostředí.
- Unrine, J. M., Jagoe, C. H., Hopkins, W. A., Brant, H. A., 2004. Adverse effects of ecologically relevant dietary mercury exposure in southern leopard frog (*Rana sphenoccephala*) larvae. *Environmental Toxicology and Chemistry* 23 (12):
- Ustyak, S., Petrikova, V., 1996. Heavy metal pollution of soils and crops in northern Bohemia. *Applied Geochemistry* 11 (1–2): 77–80.
- Van den Ancker, J. A. M., Jungerius, P. D., Mur, L.R., 1985. The role of algae in the stabilization of coastal dune blowouts. *Earth Surface Processes and Landforms* 10 (2): 189–192.
- Van Starleen, N.M., Donker, M.H. 1994. Heavy metal adaptation in terrestrial arthropods - physiological and genetic aspects. *Proc. Exp. Appl. Entomol.* 5 (1994).

- Van Wensem, J., Krijgsman, M., Postma, J. F., Van Westrienen, R. W., Wezenbeek, J. M., 1992. A comparison of test systems for assessing effects of metals on isopod ecological functions. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 24 (2): 203–16.
- Wada, H., Bergeron, C. M., McNabb, F.M. A., Todd, B. D., Hopkins, W. A., 2011. Dietary mercury has no observable effects on thyroid-mediated processes and fitness-related traits in wood frogs. *Environmental Science & Technology* 45 (18): 7915–22.
- Wada, H., Cristol, D. A., McNabb, FM. A., Hopkins, W. A., 2009. Suppressed adrenocortical responses and thyroid hormone levels in birds near a mercury-contaminated river. *Environmental Science & Technology* 43 (15): 6031–38.
- Wada, H., Yates, D. E., Evers, D. C., Taylor, R. J., Hopkins, W. A. 2010. Tissue mercury concentrations and adrenocortical responses of female big brown bats (*Eptesicus fuscus*) near a contaminated river. *Ecotoxicology* 19 (7): 1277–84.
- Wang, S., Wu, H., 2006. Environmental-benign utilisation of fly ash as low-cost adsorbents. *Journal of Hazardous Materials* 136 (3): 482–501.
- Wilczek, G., Babczynska, A., Majkus, Z. 2005. Body burdens of metals in spiders from the lidice coal dump near Ostrava (Czech Republic). *Biologia* 60 (5): 599–605.
- Wilczek, G., Migula, P., 1996. Metal body burdens and detoxifying enzymes in spiders from industrially polluted areas. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry* 354 (5): 643–647.
- Wofková, G., 2016. Diverzita znaků žahadlových blanokřídlých na stanovištích s jemným substrátem. Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, Katedra ekologie, 12-9-2016

Zákravský, P., Hroudová, Z., Rauch, O., 2004. Response of *Phragmites australis* to heavy metal loaded habitats. In Kovář, P. Natural Recovery of Human-Made Deposits in Landscape: Biotic Interactions and Ore/ash-Slag Artificial Ecosystems, Vyd. 1. Praha: Academia.

## 7. Přílohy

### Příloha 1: Mapa studovaných lokalit v oblasti Polabí

Na mapě je vyznačena poloha všech čtyř lokalit vybraných pro tuto studii, zobrazeno na mapách <https://mapy.cz/>.





## Příloha 2: Kladogram

Kladogram, který byl použit pro fylogenetickou korekci v analýzách.

