Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra agroenvironmentální chemie a výživy rostlin

Včela medonosná jako biomonitor přítomnosti stříbra na lokalitě

Diplomová práce

Bc. Kateřina Kölblová

Ochrana a využívání přírodních zdrojů

Ing. Lukáš Praus, Ph.D.

© 2025 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci " Včela medonosná jako biomonitor přítomnosti stříbra na lokalitě" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 20. 04. 2025 _____

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala Ing. Lukášovi Prausovi, Ph.D. za odborné rady a pomoc při zpracovávání této diplomové práce. Velmi oceňuji jeho profesionální a vřelý přístup, trpělivost a ochotu po celou dobu vedení. Jeho odborné znalosti mi umožnily nahlédnout na vědeckou práci s větší hloubkou a pochopením. Děkuji za spolupráci, která pro mě byla velkou isnpirací. Dále bych pak chtěla poděkovat také mé rodině a přátelům za podporu v průběhu celého studia.

Včela medonosná jako biomonitor přítomnosti stříbra na lokalitě

Souhrn

Tato diplomová práce se zabývá možností využití včely medonosné (*Apis mellifera*) jako biomonitoru přítomnosti stříbra (Ag) v životním prostředí. Cílem bylo ověřit, zda lze pomocí rutinního analytického postupu stanovit detekovatelný obsah stříbra v tělech včel, a využít tato data k odlišení stříbronosných lokalit od referenčních oblastí. Hypotéza práce vycházela z předpokladu, že včely medonosné, přicházejí při hledání potravy do pravidelného kontaktu s prachovými a půdními částicemi, které mohou obahovat stopy stříbra. Tyto částice mohou ulpívat na povrchu těla včel či být absorbovány do jejich tkání.

V rámci laboratorního byly testovány různé metody mineralizace a složení extrakčního činidla. Jako nejvhodnější se ukázala kombinace mikrovlnné mineralizace včelích těl bez předchozí homogenizace a použití Leffortovy lučavky jako oxidačního činidla. Tato metoda byla validována na referenčním materiálu (Metranal 01). Pro vlastní stanovení obsahu Ag byla využita metoda ICP-MS, využívající reakční režim s kyslíkem (O_2), což umožnilo efektivní eliminaci spektrálních interferencí, které mohou ovlivnit přesnost stanovení obsahu Ag.

Výsledky ukázaly, že včely ze stříbronosných lokalit vykazovaly konzistentně vyšší obsah Ag ve srovnání s kontrolními lokalitami, kde se koncentrace pohybovaly převážně pod detekčním limitem metody (LOD). Práce tak potvrzuje možnost stanovení stopových koncentrací stříbra ve včelím těle pomocí moderních analytických technik, což může sloužit jako efektivní nástroj pro screening výskytu stříbra v prostředí. Výsledky práce mohou sloužit jako podklad pro další výzkumy i pro praxi v oblasti environmentální chemie a ochrany přírody.

Klíčová slova: včela medonosná; stříbro; prvková analýza; ICP-MS; biomonitoring

Honeybee as a biomonitor of silver occurrence in a locality

Summary

This thesis explores the potential use of the honeybee (*Apis mellifera*) as a biomonitor of silver (Ag) presence in the environment. The primary objective was to determine whether a routine analytical procedure can detect trace amounts of silver in bee tissues, and whether such data can be used to distinguish Ag-enriched localities from reference areas. The working hypothesis assumed that honeybees, while foraging, come into regular contact with dust and soil particles that may contain trace levels of silver. These particles can adhere to the surface of the bees' bodies or be partially absorbed into their tissues.

In the laboratory phase, various sample digestion methods and compositions of extraction reagents were tested. The most effective approach was found to be microwave-assisted digestion of whole bee bodies (without prior homogenization), combined with the use of Leffort's aqua regia as the oxidizing agent. This method was validated using a certified reference material (Metranal 01). For the quantification of silver, inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) was employed in oxygen (O_2) reaction mode, which enabled effective suppression of spectral interferences that could compromise the accuracy of Ag determination.

The results demonstrated that bees collected from silver-bearing localities consistently exhibited higher Ag concentrations compared to those from reference areas, where concentrations were generally below the method detection limit (LOD). These findings confirm the feasibility of detecting trace levels of silver in bee tissues using advanced analytical techniques and support the use of bees as an efficient screening tool for assessing silver occurrence in the environment. The outcomes of this study may serve as a foundation for further research and practical applications in the fields of environmental chemistry and nature conservation.

Keywords: honeybee; silver; elemental analysis; ICP-MS; biomonitoring

Obsah

1 Úvod 8

2 Vědecká hypotéza a cíle práce 9

3 Literární rešerše 10

3.1 Včela medonosná 10

3.2 Biomonitoring 10

3.2.1 Biomonitoring vs. konvenční metody hodnocení znečištění ŽP 12

3.2.2 Včela jako biomonitor 12

3.2.2.1 Včely jako biomonitory rizikových prvků 14

3.2.2.2 Včelí produkty jako biomonitory 17

3.2.2.3 Mechanismy akumulace toxických látek v tělech včel 19

3.3 Stříbro 20

3.3.1 Výskyt stříbra v přírodě 20

3.3.2 Stříbro na území České republiky 21

3.3.3 Vybrané lokality 22

3.3.3.1 Stříbronosné lokality Hluboš, Krsov a Trhové Dušníky na Příbramsku 22

3.3.3.2 Stříbronosná lokalita Jáchymov 23

3.3.4 Stříbro na celosvětové úrovni 24

3.3.5 Využití stříbra 24

3.3.6 Ekotoxikologie stříbra 25

3.3.7 Typy akumulace stříbra 26

3.3.8 Těžba a zpracování stříbra 27

3.3.8.1 Amalgamace 28

3.3.8.2 Kyanidové loužení 29

3.3.8.3 Environmentální dopady těžby stříbra 29

3.3.8.4 Alternativní metody získávání stříbra 31

3.3.8.5 Alternativní metody detekce stříbra 32

3.4 Metoda ICP-MS 34

3.4.1 Princip metody 34

3.4.2 Interference 36

3.4.2.1 Spektrální interference 36

3.4.2.2 Nespektrální interference 39

3.4.3 Stanovení stříbra technikou ICP-MS 39

3.4.3.1 Interference při stanovení stříbra 40

4 Metodika 43

4.1 Popis vybraných lokalit **43**
4.1.1 Stříbronosné lokality 43
4.1.2 Referenční lokality 44
4.2 Sběr vzorků **45**
4.3 Validace metody analýzou půdy **46**
4.3.1 Extrakce stříbra na topné desce 46
4.3.2 Extrakce stříbra mikrovlnným ohřevem 47
4.4 Validace metody analýzou včelích těl **47**
4.4.1 Extrakce stříbra s využitím topné desky 48
4.4.2 Extrakce stříbra mikrovlnným ohřevem 50
4.5 Stanovení obsahu Ag ve vzorcích včel z experimentálních lokalit **51**

5 Výsledky **52**
5.1 Signál analytu a potenciálních interferentů v modelové půdní matrici **52**
5.1.1 NoGas mód 52
5.1.2 Reakční režim s kyslíkem 56
5.2 Stanovení Ag v referenčním půdním materiálu **60**
5.3 Stanovení obsahu Ag v modelových vzorcích včel **63**
5.4 Stanovení obsahu Ag ve vzorcích včel z experimentálních lokalit **66**

6 Diskuze **69**

7 Závěr **73**

8 Literatura **74**

1 Úvod

Kontaminace životního prostředí rizikovými prvky (RP) představuje vážná ekologická i zdravotní rizika. Stříbro (Ag), ať už ve formě iontů či nanočástic je typickým příkladem kovů, jehož průmyslové a technologické využití roste. V důsledku antropogenní činnosti se však může dostávat do prostředí např. prostřednictvím průmyslových odpadních vod či emisí. Ačkoliv je stříbro známo svými antimikrobiálními účinky a tradičně je považováno za méně toxické ve srovnání s jinými RP, vzhledem ke své biologické perzistenci, schopnosti akumulace v přírodních ekosystémech a biologických systémech je Ag předmětem rostoucího zájmu v oblasti environmentální chemie a ekotoxikologie. Jeho přítomnost v životním prostředí může ovlivnit biodiverzitu a potenciálně ohrozit některé ekosystémy i organismy, které jsou na tyto ekosystémy vázány, včetně hmyzích opylovačů (Tang et al. 2009; Liu et al. 2013). V souvislosti s narůstajícím důrazem na šetrné a efektivní metody monitorování kvality prostředí se do popředí dostávají metody využívající organismy (tzv. biomonitory). Jedním z perspektivních organismů v tomto kontextu je i včela medonosná (*Apis mellifera*) (Zavrtnik et al. 2014). Včela medonosá patří mezi klíčové opylovače v ekosystémech a současně představuje také cenný biomonitor environmentálních změn a kontaminace prostředí. Díky svému způsobu života, který zahrnuje široký prostorový dosah při sběru pylu a nektaru, kontaktu s rostlinami a pohybu v různých mikrohabitatech, přichází do styku s látkami přítomnými v okolním prostředí. Stává se tak vhodným nástrojem pro monitorování kontaminace prostředí různými chemickými látkami, včetně rizikových prvků. Na základě možnosti analyzovat včelí tělo i včelí produkty (med, vosk, pyl), nám může poskytnout jedinečné možnosti monitorování přítomnosti nejen těžkých kovů v různých typech prostředí, ale tento postup je také velmi cenný pro hodnocení kontaminace životního prostředí na lokální úrovni (Perugini et al. 2011; Zavrtnik et al. 2014; Bargańska et al. 2015; Papa et al. 2022).

Zejména v posledních letech se rozvíjí metody stanovení vybraných prvků v různých matricích pomocí moderních analytických technik, např. ICP-MS (Thomas et al. 2001).

Včela medonosná tedy může sloužit jako biologický vzorek ke zjištění přítomnosti a distribuce stříbra ve vybraných lokalitách. Dle tohoto přístupu je potenciálně možné získat komplexní přehled o expozici životního prostředí vůči tomuto kovu (Perugini et al. 2011; Zavrtnik et al. 2014).

2 Vědecká hypotéza a cíle práce

Využití včely medonosné (*Apis mellifera L.*) má značný praktický potenciál pro monitoring kontaminace životního prostředí. Analýza obsahu rizikových prvků (RP) ve včelím těle představuje užitečný zdroj informací o zatížení složek životního prostředí jednotlivými RP. Analogicky, prvková analýza včel by mohla najít uplatnění v dalších, dosud neověřených aplikačních oblastech, např. ve screeningu území z hlediska přítomnosti ušlechtilých kovů.

Cílem práce je předložení důkazu o praktické využitelnosti výše popsaného předpokladu, na jehož základě lze rozhodnout o hypotézách:

a) obsah stříbra (Ag) ve včelím těle je stanovitelný rutinním postupem kombinujícím mineralizaci vzorku a techniku ICP-MS;
b) stanovený obsah Ag ve včelím těle lze využít k odlišení stříbronosné lokality od lokality bez anomálního výskytu Ag.

Součástí práce je stručná rešerše zaměřená na výskyt stříbronosných rud v ČR, metody získávání Ag, zvláště s ohledem na jejich dopady na životní prostředí, a na metody průzkumu naležišť Ag.

3 Literární rešerše

3.1 Včela medonosná

Včela medonosná (*Apis mellifera*) je klíčovým druhem v terestrických ekosystémech po celém světě. Jedná se o eusociální druh hmyzu z řádu blanokřídlých s vysoce organizovanou koloniální strukturou, která umožňuje efektivní shromažďování potravy a přizpůsobení se měnícím se podmínkám prostředí (Papa et al. 2022).

Její ekologická role spočívá zejména v opylování kvetoucích rostlin, což zásadně ovlivňuje biodiverzitu, stabilitu ekosystémů i produkci zemědělských plodin (Papa et al. 2022). Celosvětově se řadí také mezi nejčastější jednodruhové opylovače zemědělských plodin (Garibaldi et al. 2013). Tento druh včely se vyvinul v úzkém vztahu s rostlinami, které využívají hmyzí opylování, a jeho přítomnost má zásadní význam pro udržení ekologických procesů v přírodě.

Další významnou ekologickou funkcí včel je podpora biodiverzity. Opylované rostliny slouží jako potrava a úkryt pro mnoho dalších druhů, včetně hmyzu, ptáků a savců. Přítomnost včel tedy nepřímo ovlivňuje celou potravní síť a přispívá ke stabilitě ekosystémů.

Díky dlouhé historii domestikace a záměrného transportu včely medonosné došlo k jejímu současnému kosmopolitnímu rozšíření, které zahrnuje všechny kontinenty kromě Antarktidy a několika oceánských ostrovů (Hung et al. 2018). V posledních desetiletích však čelí včely medonosné rostoucím environmentálním hrozbám, které mohou narušit jejich populace a tím i ekosystémové funkce, které poskytují (Hristov et al. 2021).

3.2 Biomonitoring

Pojem biomonitoring popisuje využití biologických materiálů či živých organismů k získávání kvantitativních a kvalitativních informací o určitých aspektech životního prostředí. Tyto informace vycházejí ze schopnosti sledované látky buď pasivně ulpět, nebo být aktivně přijímána organismem po určitou dobu, díky čemuž lépe odráží podmínky okolního prostředí. (Forbes et al. 2015). V rámci těchto environmentálních monitorovacích studií se však setkáváme také s pojmem bioindikátor. V běžném užití jsou termíny biomonitoring a bioindikace zaměnitelné, avšak ve vědecké komunitě mají tyto pojmy konkrétnější významy (Holt & Miller 2011). Důležité je, že biomonitor je vždy bioindikátor, zatímco bioindikátor nemusí nutně splňovat podmínky biomonitoru (Markert et al. 2003). Bioindikátory představují biologické procesy či organismy (případně jejich části či

společenstva), které se využívají k získávání a hodnocení informací o kvalitě prostředí v průběhu času. Poskytují tedy kvalitativní odpověď živých organismů na environmentální stresory. Naproti tomu biomonitory zajišťují kvantitativní měření těchto reakcí. Jsou to organismy, či opět jejich části, které přinášejí údaje o kvantitativních aspektech kvality životního prostředí. Jako příklad můžeme uvést lišejník *Lecanora conizaeiodes* – svou přítomností v prostředí indikuje špatnou kvalitu ovzduší a tím nám slouží jako bioindikátor. Jako biomonitor by sloužil v případě sledování reakce na přítomnost a závažnost znečištění ovzduší, což by se projevilo například snížením počtu rostlin lišejníků v postižené oblasti, kvantitativními změnami v obsahu chlorofylu či nárůstem obsahu kontaminující látky v biomase lišejníku (Markert et al. 2003; Holt & Miller 2011). Obecně je environmentální bionidikátor definován jako druh, který předvídatelně reaguje na změny prostředí a indikuje tak jeho kvalitu. Biomonitor je často popisován jako druh, který indikuje také kvantitativní aspekty životního prostředí (Forbes et al. 2015).

Za účelem monitorování ekosystémů jsou velmi často využívány lišejníky společně s mechy, zejména k hodnocení kvality ovzduší. Na rozdíl od většiny cévnatých rostlin, které získávají živiny především z půdy pomocí kořenového systému, metabolismus lišejníků striktně závisí na interakci s atmosférou a jsou poměrně vysoce citlivé na její znečištění (Forbes et al. 2015; Frati & Brunialti 2023).

Nejen rostliny, ale také zvířata či bakterie hrají důležitou roli jako bioindikátory či biomonitory prostředí. Zooplankton, měkkýši, ryby či obojživelníci jsou běžně využívány ke sledování kontaminace vodních ekosystémů těžkými kovy, jelikož kvalita vod přímo ovlivňuje jejich populaci, druhy, početnost i chování. (Yin et al. 2008; Zhou et al. 2008). Jako environmentální biomonitory se využívají také živočišné tkáně a orgány. Například z peří sýkory koňadry (*Parus major*) a sýkory modřinky (*Cyanistes caeruleus*) byly zjištěny zvýšené koncentrace těžkých kovů (Cd, Pb, Cu, Zn), což dokazuje, že ptačí peří je dalším užitečným biomonitorem pro lokální kontaminaci těžkými kovy (Dauwe et al. 2002).

Biomonitoring tedy hraje klíčovou roli při zjišťování komplexního přehledu o stavu ekosystémů. Poskytuje důležité informace nejen o přítomnosti znečišťujících látek či imisí, ale také o jejich vlivu na živé organismy a celkovou kvalitu prostředí. Na základě toho je biomonitoring nepostradatelným nástrojem pro hodnocení účinnosti opatření na ochrany přírody a udržitelného rozvoje (Cairns 2005).

3.2.1 Biomonitoring vs. konvenční metody hodnocení znečištění ŽP

Oproti standartním metodám, kde se testy provádějí přímo a měří se fyzikálně-chemické parametry prostředí (např. okolní teplota, salinita, koncentrace živiny i xenobiotik) využití bioty k posouzení kumulativních dopadů chemického znečištění či změn životního prostředí v průběhu času nabízí několik výhod. Biomonitory přidávají časovou složku odpovídající délce života nebo době výskytu organismu v konkrétním místě, což umožňuje integraci současných, minulých či budoucích podmínek prostředí. Mnohá chemická a fyzikální měření charakterizují podmínky stanoviště pouze v době odběru vzorků, což vyšuje pravděpodobnost chybějících dat o znečišťujících látkách a expozici. Kromě toho se xenobiotika mohou vyskytovat v extrémně nízkých koncentracích a k detekci těchto koncentrací je nutné zdlouhavé analýzy vysoce citlivými technikami. Rozsah tolerance biomonitorů poskytuje přehled o biologicky relevantních úrovních xenobiotik, bez ohledu na jejich koncentraci (Holt & Miller 2011). Zároveň biomonitory upozorní na podrobnosti o působení konkrétních stresorů na biologickou rozmanitost a funkčnost ekosystému (Bates et al. 2007). Společným problémem chemických a fyzikálních měření je zjednodušení komplikované reakce, typické pro druhově bohaté biotopy. Biomonitory znázorňují komplikovanou spletitost ekosystémů a náležitě reprezentují dynamický obraz stavu životního prostředí (Duffy 2003; Holt & Miller 2011).

3.2.2 Včela jako biomonitor

Včela medonosná (*Apis mellifera*) představuje nejen klíčové opylovače ekosystémů, ale rovněž významný biomonitor environmentální kvality. Její schopnost sběru nektaru, pylu a vody na rozsáhlých územích poskytuje komplexní informace o kontaminaci životního prostředí. Včely jsou schopny akumulovat široké spektrum chemických látek včetně pesticidů, těžkých kovů, polycyklických aromatických uhlovodíků (PAH) či jiných polutantů, což umožňuje analyzovat jejich přítomnost v tělech včel či ve včelích produktech (vosk, med, propolis, mateří kašička). Včelařská činnost tak poskytuje člověku nejen kvalitní potraviny, látky používané jako suroviny ve farmacii, ale dokáže nám poskytnout i cenné informace o přítomnosti xenobiotik v životním prostředí a jejich vlivu na zdraví člověka i ekosystémů (Papa et al. 2022).

Včela medonosná je předmětem vědeckého výzkumu již několik desetiletí. Koncept využití včel pro monitorování kvality životního prostředí sahá až do roku 1935, kdy J. Svoboda navrhl využití včel jako zdroje cenných informací o vlivu průmyslové činnosti na ekosystémy v daných lokalitách. O dvacet pět let později on a jeho tým prostřednictvím

včelího biomonitoringu zaznamenali zvýšené hladiny stroncia (izotopu ^{90}Sr) v životním prostředí, což bylo pravděpodobně důsledkem atmosférických jaderných testů. Od 70. let 20. století se včely začaly pravidelně využívat k monitorování kontaminace životního prostředí těžkými kovy, zejména v urbanizovaných a průmyslových oblastech. Současně se staly klíčovým nástrojem pro sledování přítomnosti pesticidů v zemědělských regionech a byly využívány i ke studiu distribuce radionuklidů v přírodě (Celli & Maccagnani 2003).

Tato významná role včely medonosné je způsobena jejími morfologickými a behaviorálními charakteristikami. Díky své schopnosti pokrýt rozsáhlé území a citlivosti na chemické látky se včely staly jedním z nejdůležitějších bioindikátorů environmentálního znečištění. Během sběru potravy jsou včely vystaveny vysokému množství organických i anorganických znečišťujících látek kontaminující vzduch, vodu, půdu i vegetaci (Celli & Maccagnani 2003; Papa et al. 2022; Marcoccia et al. 2024). Tyto kontaminanty ulpívají na včelích tělech či jsou sbírány společně s pylem a nektarem. Následně jsou přeneseny zpět do úlů, kde dochází k jejich akumulaci a mohou tak být následně odebrány a kvantifikovány pomocí různých technik. (Perugini et al. 2011; Girotti et al. 2020; Zarić et al. 2022; Marcoccia et al. 2024). Přesto, že jsou jednotlivé včely poměrně zranitelné vůči environmentálním stresorům, včelstvo jako celek, je odolnější a je schopné akumulovat kontaminanty nebo na ně reagovat, aniž by se zhroutilo, což umožňuje dlouhodobé sledování kolonie za účelem mapování kontaminantů v geografické oblasti (Cunningham et al. 2022).

Využití včel medonosných poskytuje oproti jiným systémům monitorování také mnoho výhod. Obecně je včelařství považováno ze méně nákladnou činnost, a tudíž můžeme hovořit o nízkých pořizovacích i provozních nákladech. Dále díky pokrytí značné plochy území jsou včely spolehlivými pasivními vzorkovači znečišťujících látek. (Papa et al. 2022; Marcoccia et al. 2024). Letový rádius včelích dělnic při hledání zdrojů potravy obvykle dosahuje 1-10 km^2, v některých případech však může být až 100km^2 (Couvillon & Ratnieks 2015; Zarić et al. 2022). Tato vlastnost činí ze včel cenný prvek pro biomonitoring, neboť shromažďují vzorky z rozmanitých lokalit a poskytují prostorově i časově integrované údaje o stavu ekosystémů.

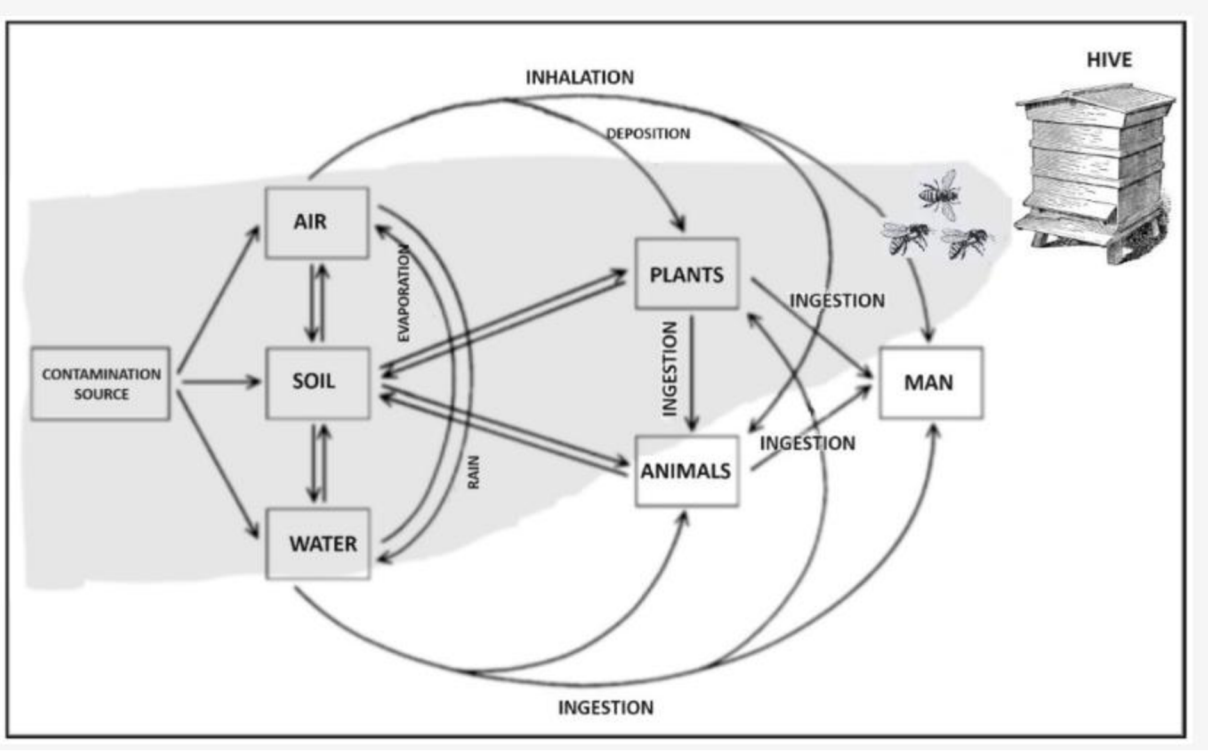
Zároveň prostřednictvím medu a dalších včelích produktů tak shromažďují důkazy o tom, že se znečišťující látky dostávají do potravního řetězce a vystavují opylovače a další organismy požití těchto látek. V neposlední řadě se jedná o velmi neinvazivní způsob biomonitoringu, jelikož využití včel nemá žádný negativní dopad na životní prostředí. Kromě toho nabízí včela jako živý organismus také možnost studovat letální i subletální účinky expozice polutantům na biologický systém (Papa et al. 2022). Včela medonosná je tedy

nejúplnější biosenzor, jelikož kromě indikace kvality i změn v prostředí je také bioakumulátorem, který může poskytnout značné množství údajů o stavu životního prostředí (Lambert et al. 2012; Girotti et al. 2020).

3.2.2.1 Včely jako biomonitory rizikových prvků

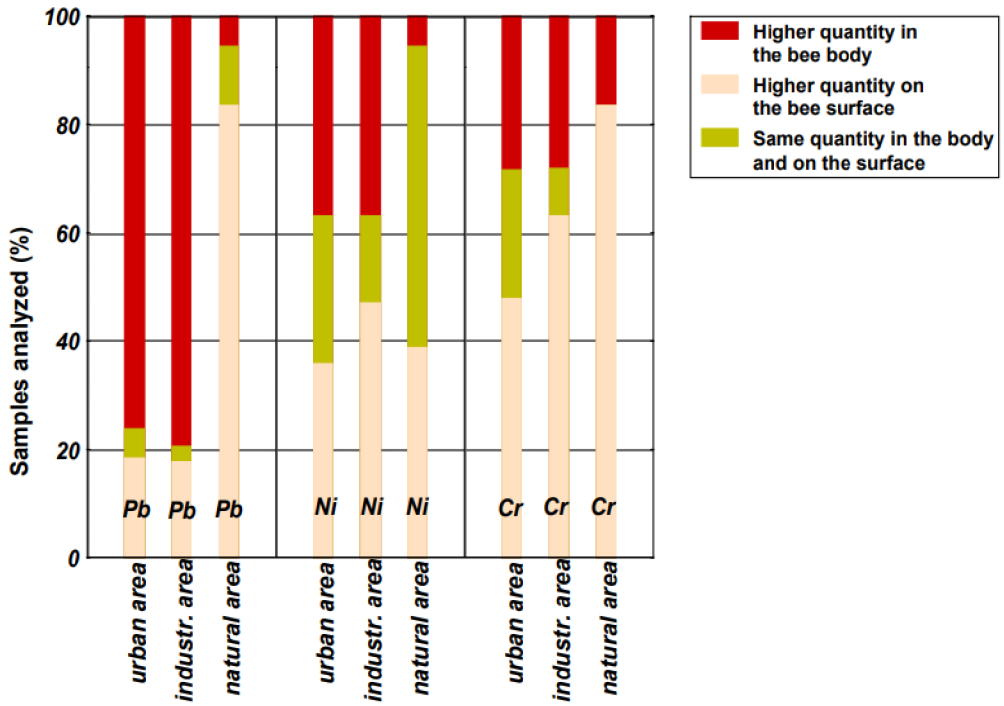
Lidská činnost produkuje a redistribuuje kontaminanty, jejichž množství a toxicita často překračuje homeostatickou schopnost prostředí se očistit. Systematická analýza a monitorování životního prostředí je proto stále naléhavější (Bargańska et al. 2015). Rizikové prvky se nacházejí ve všech složkách životního prostředí, včetně vody, půdy, vzduchu, sedimentů i rostlin. Rizikové prvky mohou pocházet z přírodních zdrojů (např. sedimenty, horniny, sopečná činnost), antropogenní činnost má však na kontaminaci životního prostředí primární podíl. Těžké kovy jsou definovány jako kovy s vysokou specifickou hmotnostní, resp. hustotou alespoň pětkrát vyšší než voda (Tchounwou et al. 2012; Zavrtnik et al. 2024). Dalším aspektem je jejich toxicita, z toho důvodu se zahrnují také metaloidy jako arsen (As) a selen (Se) (Jannetto & Cowl 2023). Pro účely biomonitoringu je důležitá také biologická klasifikace, která rozděluje kovy na ty, které rostliny potřebují pro růst a vývoj (např. Cu, Fe, Mn, Mo, Ni a Zn), na kovy nezbytné pro určité organismy (např. Co, Cr, Fe, Mn, Mo, V, Zn) a fytotoxické kovy (např. Cd, Hg, Pb). Je pozoruhodné, že hranice mezi rostlinnou živinou a fytotoxicitou může být velmi tenká i pro stejný prvek (Asati et al. 2016). Těžké kovy interagují s přírodními chemickými a fyzikálními sloučeninami a mění svou formu. Mohou se vázat nebo sorbovat na přírodní látky, což může zvýšit, případně snížit jejich dostupnost. Jelikož těžké kovy nepodléhají biologickému rozkladu, ale hromadí se v prostředí, jejich zvýšené koncentrace představují pro životní prostředí problém. Rizikové prvky, jako jsou olovo (Pb), kadmium (Cd), rtuť (Hg), měď (Cu) a arsen (As), patří mezi hlavní znečišťující látky v životním prostředí. Tyto prvky mohou pocházet z průmyslových emisí, dopravních exhalací, těžby nerostů, spalování fosilních paliv nebo aplikace hnojiv a pesticidů v zemědělství. Včely představují efektivní nástroj pro monitorování RP, protože jejich těla a produkty mohou akumulovat tyto toxické prvky a sloužit jako indikátory znečištění (Zavrtnik et al. 2024). Včely indikují přítomnost kontaminace v prostředí dvěma způsoby: zvýšenou mortalitou a rezidui některých toxických látek v medu, pylu a ve včelách samotných (Celli & Maccagnani 2003). Včelí těla lze po úpravě analyzovat na přítomnost RP různými metodami, např. atomovou absorpční spektrometrií (AAS), hmotnostní spektrometrií s indukčně vázaným plazmatem (ICP-MS) nebo rentgenovou fluorescenční spektroskopií (XRF). Tyto metody umožňují zjištění koncentrací RP v jednotlivých vzorcích s vysokou

přesností a správností (Zavrtnik et al. 2014). Jelikož včely v každém aspektu své činnosti přicházejí do styku se všemi segmenty životního prostředí (voda, vzduch, půda a rostliny) hraje zde velmi důležitou roli také akumulace kontaminantů v prostředí. Pokud existuje zdroj kontaminace v důsledku hydrologických procesů (výpar, déšť), kontaminace cirkuluje s vodou jednotlivými abiotickými složkami prostředí a dostává se k biotickým složkám, včetně včel (viz Obrázek 1) (Porini et al. 2003; Girotti et al. 2020).



Obrázek 1: Šíření kontaminantů v prostředí s vyznačením působení včel (Porini et al. 2003)

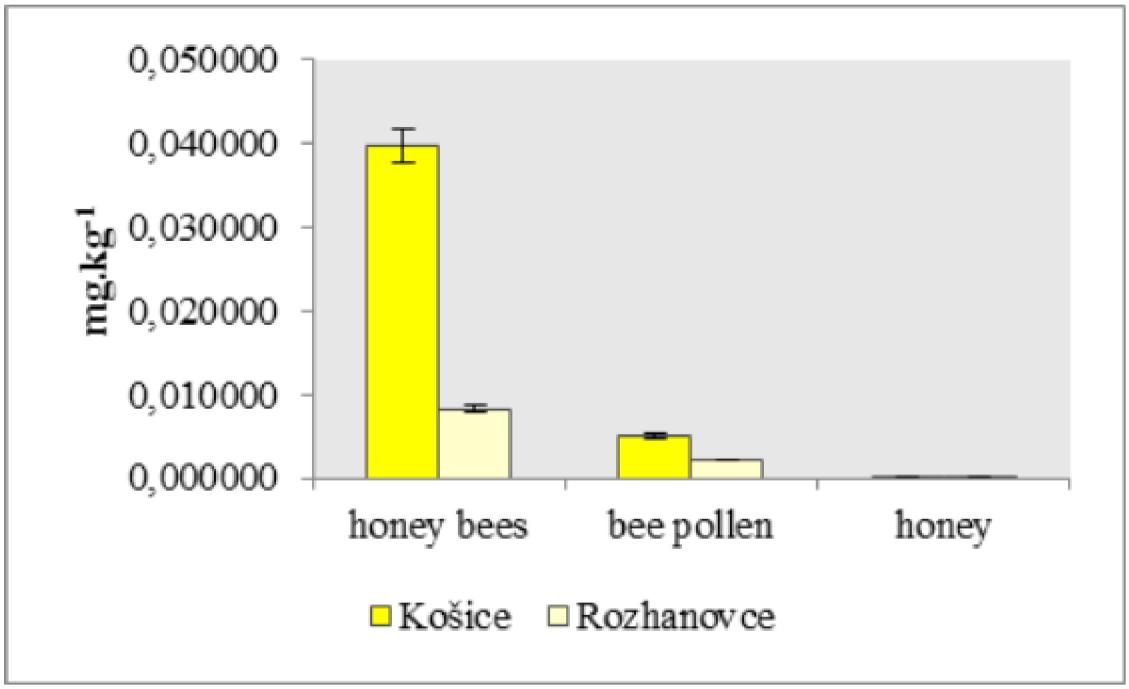
Porini et al. (2003) ve svém výzkumu dokázal, že koncentrace olova (Pb) byla vyšší uvnitř včelích těl, které se pohybovaly v městském a průmyslovém prostředí, než na jejich povrchu (viz Obrázek 2). Tento trend byl v přírodních oblastech obrácený. Nikl a chrom byly naopak detekovány spíše na povrchu včelích těl. To naznačuje, že v oblastech s chronickým znečištěním dochází k vyšší absorpci olova včelami během letu a sběru potravy, zatímco v méně kontaminovaných prostředích se těžké kovy zachycují na tělech včel obtížněji.



Obrázek 2: Distribuce těžkých kovů zjištěné na povrchu a uvnitř včelích těl ve vztahu ke třem různým prostředím (Porini et al. 2003)

Giglio et al. 2017 analyzoval několik prvků (As, Bi, Cd, Co, Cr, Cu, Ni, Pb, Sr, V a Zn) za účelem stanovení jejich kvalitativní a kvantitativní povahy ve vzorcích včelí tkáně s ohledem na vzdálenost od průmyslového centra. Mezi zdroje RP patřily topné systémy, spalovny, doprava, průmyslové emise, likvidace odpadu, výroba železa a oceli a těžba uhlí. Studie prokázala zvýšené koncentrace Cr a Cu v tělech včel v městském prostředí a lze je tedy přičíst kontaminaci z dopravy a topných systémů. Naopak zvýšené koncentrace Cd byly zjištěny ve vzorcích z průmyslové oblasti.

Velmi nebezpečným těžkým kovem je také rtuť (Hg), která pochází z přírodních i antropogenních zdrojů v anorganické formě jako elementární rtuť, kationt rtuti Hg^+ či v organické formě jako methylrtuť. Výzkum na východním Slovensku měl za cíl zjistit celkový obsah Hg v tělech včel a jejich produktech, medu a pylu. Koncentrace Hg byla nejvyšší v tělech včel a nejnižší v medu. Celkově však byly analyzované vzorky kontaminovány Hg v malém množství, které nepředstavovalo nebezpečí vstupu Hg do potravního řetězce. Byl však potvrzen statisticky významný vztah mezi lokalitou a obsahem Hg ve včelách a včelích produktech (viz Obrázek 3) (Toth et al. 2016).



Obrázek 3: Koncentrace Hg v tělech včel, včelím pylu a medu z lokalit na východním Slovensku (Toth et al. 2016)

Na základě těchto a mnoha dalších studií existuje prokázaná souvislost mezi koncentracemi RP v prostředí a jejich obsahem ve včelách a jejich produktech, což ovlivňuje jejich zdraví a úmrtnost. Výše zmíněná bioakumulace a poškození se týkají nejčastěji studovaných prvků (Cd, Hg, Pb, As), kterými jsou včely vystaveny v průmyslových oblastech měst a v městských aglomeracích, kde dochází k hromadění toxických látek v půdě a vegetaci. Díky biomonitoringu RP s pomocí včel lze optimalizovat opatření na ochranu životního prostředí a lépe pochopit dopady průmyslových procesů (Zavrtnik et al. 2014; Mair et al. 2023).

3.2.2.2 Včelí produkty jako biomonitory

Analýza environmentálního znečištění může probíhat také prostřednictvím chemických rozborů včelích produktů. Med, pyl, vosk či propolis jsou považovány za výborné indikátory znečištění životního prostředí toxickými látkami, ať už jde o těžké kovy, radioaktivní prvky nebo perzistentní organické polutanty, jako jsou pesticidy (Bargańska et al. 2015). Každá z těchto složek poskytuje specifické informace o znečištění. Pyl je dobrým ukazatelem přítomnosti těžkých kovů a pesticidů, zatímco vosk umožňuje detekci lipofilních látek, včetně některých organických polutantů. Propolis, který včely sbírají z pryskyřic rostlin, odráží

kvalitu vegetace v okolí úlu a je často využíván při studiu přítomnosti polycyklických aromatických uhlovodíků (PAH) či dalších organických látek (Otradovcová 2010; Hossain et al. 2022). Přítomnost xenobiotik v těchto produktech může zhoršit jejich kvalitu a vlastnosti a ohrozit tak i lidské zdraví (Bargańska et al. 2015).

Různé studie se zaměřily na analýzu těžkých kovů v těchto matricích a jejich schopnost reflektovat úroveň znečištění v životním prostředí. Gajger et al. (2019) analyzoval 18 vzorků pláství z včelího vosku ze tří včelínů v kontinentálním Chorvatsku a odhalil přítomnost Cr, Cu, Ni, Pb, Mn, Rb, Sr a Zn. Ukázalo se, že stáří pláství a jejich geografický původ ovlivňují obsah toxických kovů, přičemž nejvyšší koncentrace byly nalezeny u Cr, Cu, Ni a Pb. V této studii Cd, Cu a Pb poškodily celé včelstvo zpomalením vývoje plodu se sníženou hmotností ve stádiu kukly v závislosti na dávce, snížením míry přežití a snížením energetické hladiny u dospělých včel. Obsah hliníku negativně ovlivnil chování včel při hledání potravy snížením počtu včel vracejících se ze sběru a omezením jejich schopnosti najít pastviny bohaté na sacharidy. To dokazuje, že včelí vosk je dlouhodobým akumulátorem těžkých kovů a dalších environmentálních kontaminantů. Jeho schopnost zadržovat škodlivé látky je důsledkem jeho lipofilních vlastností (Kast et al. 2021).

V roce 2019 Conti et al. (2019) během studia hodnocení bioakumulační schopnosti různých biomonitorů zavedl nový index bioakumulace – Overlap Bioaccumulation Index (OBI). V rámci ekologického monitoringu představuje OBI inovativní přístup k hodnocení úrovně kontaminace prostředí rizikovými prvky na základě analýzy bioakumulace v různých biologických matricích, včetně včel a jejich produktů. Tento index umožňuje kvantifikovat schopnost jednotlivých složek včelího ekosystému akumulovat specifické prvky a poskytuje srovnávací rámec pro hodnocení environmentální kvality. Význam OBI byl potvrzen ve studii Conti et al. (2022), která analyzovala vzorky včel a jejich produktů (vosku, pylu, propolisu) získaných v městském prostředí italské metropole. Během rozsáhlého sběru vzorků bylo měřeno čtrnáct prvků a jejich distribuce byla vyhodnocena pomocí indexu OBI. Výsledky studie ukázaly, že včely a vosk jsou hlavními akumulátory mědi, cínu a manganu, což jsou prvky převážně pocházející z emisí dopravy. Naopak med vykazoval nízkou míru bioakumulace, což potvrzuje jeho bezpečnost jako potravinového produktu, avšak omezuje jeho využitelnost jako indikátoru environmentální kontaminace. Tento index umožňuje porovnávat bioakumulaci RP v různých složkách ekosystému a může být efektivně využit pro sledování počátečních fází znečištění a sloužit jako podklad pro environmentální management a ochranu biodiverzity (Conti et al. 2019; Conti et al. 2022).

3.2.2.3 Mechanismy akumulace toxických látek v tělech včel

Toxické látky, včetně stříbra, se do těl včel dostávají především prostřednictvím kontaminovaného nektaru, pylu a vody. Jelikož včely nejsou schopny detekovat reálné koncentrace kovů či metaloidů, expozice včel kovovým polutantům se promítá také do prostředí úlu a jejich produktů (Monchanin et al. 2024). Po jejich vstupu do organismu jsou tyto látky rozváděny hemolymfou do různých orgánových systémů. Včely vykazují schopnost bioakumulace těžkých kovů, přičemž klíčovou roli v jejich detoxikaci hrají proteiny, jako jsou metallothioneiny, které se vážou na kovové ionty a podporují jejich eliminaci z organismu (Salvaggio et al. 2017). Zhelyazkova (2012) analyzovala vzorky včel a jejich sekretů a vyšší koncentrace těžkých kovů (Cd, Zn, Pb, Cd, Co, Ni, Mn a Fe) byla nalezena ve fekálních exkretech než ve včelích tělech. To naznačuje, že střevo je pro tyto kovy biologickou bariérou. Koncentrace Ni, Cd, Co a Pb byly ve včelích exkrementech nejvyšší. Cu, Fe a Zn se ukládaly v jiných částech těla a nebyly účinně vylučovány extrementy. Bylo zjištěno, že Fe se může ukládat v trofocytech v podkoží trupu a Cu a Zn se mohou hromadit v hemolymfě a prsních svalech. Výzkum dále ukazuje, že včely mají schopnost filtrovat těžké kovy z nektaru. Z tohoto důvodu je med „nejčistším“ produktem včel (Zhelyazkova 2012; Zavrtnik et al 2024).

Stříbro se v tělech včel převážně ukládá v tukovém tělese a hemolymfě, kde může narušovat enzymatické reakce a celkový buněčný metabolismus. Dlouhodobá expozice vede k narušení funkcí mitochondrií, což vyvolává zvýšenou produkci reaktivních forem kyslíku (ROS), a tím oxidační stres, který může poškozovat buněčné struktury. Kromě toho může stříbro negativně ovlivnit složení střevní mikrobioty včel, což oslabuje jejich imunitní odpověď a zvyšuje jejich zranitelnost vůči patogenům (Gekière et al. 2023).

Negativní vliv se promítá také do morfologie včel. Byla prokázána souvislost mezi expozicí včel těžkým kovům a vývojovými poruchami, včetně zmenšení mozku. Neurotoxické účinky těžkých kovů, včetně stříbra, mohou interferovat se signálními dráhami v centrálním nervovém systému včel, což se projevuje snížením orientačních schopností a narušením jejich navigačního chování či paměťových funkcí. Tyto změny mohou vést k úbytku včelstev, čímž se negativně ovlivní ekosystémové služby, jako je opylování rostlin. Jelikož včely nejsou schopny vyhnout se expozici těžkých kovů, je nutné zaměřit se na další studie o vlivu znečištění na včely medonosné a přehodnocení stávajících environmentálních limitů, které jsou v současnosti považovány za bezpečné (Monchanin 2021).

3.3 Stříbro

Stříbro (Ag, *Argentum*) je přirozeně se vyskytující ušlechtilý kov stříbrolesklé barvy, který se vyznačuje mezi všemi známými kovy nejvyšší elektrickou a tepelnou vodivostí, což má za následek jeho široké využití v různých oblastech průmyslu (Luoma 2008). Stříbro krystalizuje v krychlové soustavě s plošně centrovanou mřížkou díky čemuž má stříbro také velmi dobrou kujnost a tažnost. Bod tání je stanoven na 962 °C a bod varu na 2162 °C. Tvrdost stříbra dle Mohsovy stupnice odpovídá hodnotě 2,5, což řadí tento prvek mezi měkké kovy. Ušlechtilost stříbra značí vysokou odolnost stříbra vůči oxidaci a korozi. Na suchém vzduchu je stabilní, nicméně v přítomnosti sirovodíku H_2S dochází k tvorbě vrstvy sulfidu stříbrného Ag_2S, což se projevuje jako charakteristické černání povrchu kovu. Stříbro se vyskytuje především v oxidačních stavech Ag^{+I}, zatímco v oxidech je Ag^{II+} nestabilní a vykazuje silné oxidační vlastnosti. Kationt Ag^{3+} je v přírodě spíše vzácný a také velmi nestabilní. Stříbro má dva stabilní izotopy: ^{107}Ag a ^{109}Ag. Přirozený poměr těchto dvou izotopů je přibližně 51,8 % pro ^{107}Ag a 48,2 % pro ^{109}Ag. Oba tyto izotopy mají téměř shodné chemické vlastnosti (Kirk et al. 1994; Smith & Fickett 1995; Greenwood & Earnshaw 1997; Markner-Jäger 2008). Kromě těchto stabilních izotopů bylo identifikováno více než 30 radioaktivních izotopů stříbra s nukleonovými čísly v rozmezí od 93 do 130. Mezi nejvýznamnější radioizotopy patří Ag-110m, který se významně uplatňuje v oblasti jaderné medicíny a environmentálního monitoringu v důsledku svého vzniku při provozu jaderných reaktorů (Wood 2011).

3.3.1 Výskyt stříbra v přírodě

V zemské kůře se stříbro vyskytuje poměrně v nízkých koncentracích. Průměrný obsah je odhadován na 0,07- 0,1 mg/kg (Janes & Playle 1995). Tam, kde jsou jeho koncentrace nejvyšší, lze stříbro těžit. Například na západě Jižní Ameriky, v jižním Mexiku či v západních částech USA mohou koncentrace v půdě dosahovat hodnot až 1000 mg/kg (Kirk et al. 1949). V mořské vodě dosahuje koncentrace stříbra přibližně od 0,0003 mg/l do 0,001 mg/l. Ranville & Flegal (2005) však zaznamenali nárůst koncentrace Ag v mořské vodě na hodnotu 0,0013 mg/l oproti roku 1983, kdy koncentrace dosahovala hodnoty 0,0003 mg/l.

Stříbro je v přírodě k nalezení jak v ryzí formě, tak ve formě rudních či nerudních minerálů. Většina celosvětové produkce stříbra však pochází ze sekundárního produktu při těžbě a zpracování rud jiných kovů. Akumulace stříbra v přírodním prostředí probíhá několika způsoby. Geochemická akumulace probíhá především v sedimentech, kde je stříbro

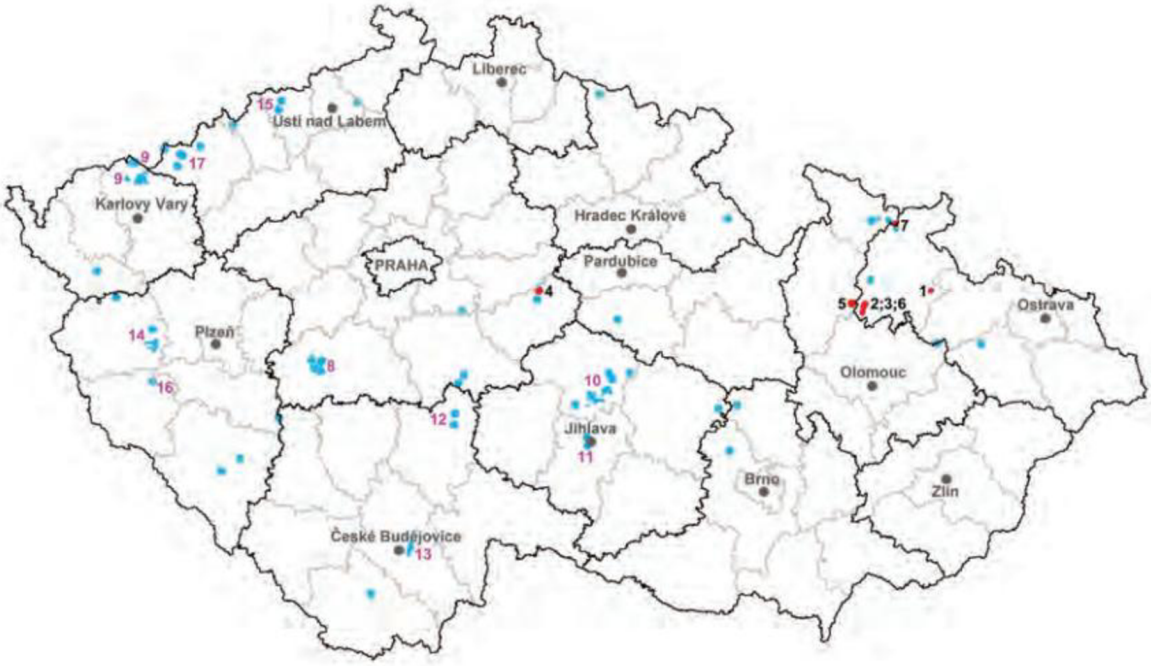
sorbováno na jílové minerály či organickou hmotu. Biologická akumulace probíhá v organismech jako jsou řasy, bakterie či některé druhy bezobratlých, které jsou schopny hromadit stříbro ve svých tkáních. Tento proces je zásadní pro biomonitoring kontaminace životního prostředí stříbrem. Částice stříbra se prostřednictvím emisí z průmyslových procesů a spalování fosilních paliv dostávají také do ostatních složek biosféry i atmosféry, což představuje další významný mechanismu akumulace (Boyle 1968).

3.3.2 Stříbro na území České republiky

Z historického hlediska těžba stříbra a dalších nerostů jako zlato, železo, cín, olovo, zinek a měď významně přispěla na území dnešní České republiky k rozvoji jednotlivých regionů, ale i státu jako celku (Pálenský et al. 2011). Zcela první průmyslová těžba stříbra pochází z let 985-995, kdy na hradišti v Malíně Slavníkovci razili své stříbrné denáry (Křížková et al. 2009). Nejstarší stříbrný důl se nacházel ve městě Stříbro, kde je těžba doložena až do roku 1188 (Geologický klub 2015). Významnými hornickými městy byla například Jihlava či Kutná hora, kde vzešly v platnost první horní práva – Jihlavský horní zákon (1249) a *Ius regale montamorum* (1300). Tato práva sloužila jako vzor v mnoha dalších zemích světa až do 19. století (Pálenský et al. 2011). Dolování stříbra dalo vzniknout také mincovnímu systému. Již v roce 1300 se v Kutné hoře razily první pražské groše (Vorel 200). Největšího rozmachu dosáhla těžba stříbra na našem území v 16. století. V tuto dobu se těžilo např. v Českém Krumlově či na několika lokalitách v Krušných horách jako např. Hora Sv. Kateřiny, Abertamy, Hrob, Mikulov, Vejprty či Boží Dar (Geologický klub 2015). V 16. století, byl také v Jáchymově ražen známý stříbrný Jáchymovský tolar, ze kterého pochází etymologie slova dolar (Boyle 1968). Nejdůležitějším nalezištěm bylo ložisko nacházející se v Příbrami, které v dobách Rakouska-Uherska bylo dokonce hlavním producentem stříbra (Majer 2004). Až do útlumu prací na počátku 90. let se velká část stříbra získávala těžbou polymetalických rud Pb-Zn a U-Ag na příbramském ložisku. Dalšími významnými revíry pak byly také Havlíčkův Brod, Vejprty, Stará Vožice či Rudolfov. Všechny tyto lokality byly v minulosti významným zdrojem evropského stříbra.

V současné době se na území České republiky již stříbro netěží, oficiálně byla těžba ukončena v roce 1993 a poslední těžební lokalitou byly Zlaté Hory-západ. Nemalá ložiska jsou však stále k nalezení. Množství stříbra je na v České republice vyčísleno na 532 tun. Tato ložiska stříbra jsou však nebilanční, což znamená, že pro svůj nízký obsah užitkových složek, malou mocnost ložiska či komplikované podmínky těžby, jsou v podstatě nedobyvatelná (Starý et al. 2022). Tato ložiska se nacházejí na lokalitách jako je Horní Benešov, Horní

Město, Horní Město Šibenice, Kutná Hora, Oskava, Ruda u Rýmařova a Zlaté Hory. Další naleziště jako je Roudný-Aleška či Újezd u Kasejovic byly již z evidence vyřazeny (Geologický klub 2015). Pro tyto lokality však samozřejmě existuje možnost využití v budoucnosti (Starý et al. 2022).



Obrázek 4: Ložiska stříbra v České republice

- *Vytěžené a ostatní zdroje*
- *Výhradní evidovaná ložiska*

(Starý et al. 2022)

3.3.3 Vybrané lokality

3.3.3.1 Stříbronosné lokality Hluboš, Krsov a Trhové Dušníky na Příbramsku

Oblast Příbramska představuje významné ložisko polymetalických rud a je známá pro svou bohatou historickou těžební činnost, zejména co se týče souvislosti s těžbou stříbra, uranu a olova. Povrchově zde byla těžena také „žlutá“ a „červená“ železná ruda (limonit a hematit) (Litochleb et al. 2012). Těžba stříbra na tomto území má dlouhou historii, sahající až do středověku. Hlavním místem těžby stříbronosných polymetalických rud byla oblast březohorského revíru, který zahrnoval tři hlavní ložiska: březohorské, bohutínské a černojasmké (Roubal 2006). Nejintenzivnější těžební činnost probíhala hlavně v 19. století, kdy zde byly otevřeny četné štoly a šachty zaměřené na těžbu hlavně stříbrných a olověných rud. Dodnes jsou patrné pozůstatky této činnosti ve formě hald a propadlin v terénu.

K ukončení těžby došlo v první polovině 20. století a většina důlních děl byla zatopena či zasypána (Majer 2004). V současné je území předmětem zájmu studií, které se zaměřují na detailní popis geologických a mineralogických vlastností ložiska, které mohou v budoucnu poskytnout cenné informace pro případné budoucí využití (Roubal 2006).

Vybraná lokalita se nachází v centrální části příbramského uran-polymetalického revíru, který je součástí středočeské oblasti Českého masivu. Geologické podloží je tvořeno tektonicky porušeným horninovým komplexem tvořeném sedimentárními horninami neoproterozoika jako jsou prachovce, břidlice a droby štěchovické skupiny, ale hlavně břidlicemi kambria Barrandienu. Tyto horniny jsou intenzivně tektonicky porušeny a prostoupeny žilnými systémy různé orientace. Polymetalické rudy olova, zinku a stříbra vytvářejí v této oblasti spíše izolované lokality. V okolí obce Hluboš jsou však významné zejména žíly ve směru severovýchod-jihozápad, které jsou typické právě polymetalickým charakterem. Mineralizace v této lokalitě je charakterizována přítomností vysokého obsahu stříbra, molybdenu částečně olova, anomálních výskytů Vanadu a samozřejmě také dalších kovů. Hlavními rudními minerály jsou galenit (PbS), sfalerit (ZnS) a ryzí stříbro (Ag). Dále jsou zde k nalezení minerály jako akantit (Ag_2S), pyrargyrit (Ag_3SbS_3), dyskrazit (Ag_3Sb) a také allargentum (Litochleb et al. 2012; Škácha et al.2012).

3.3.3.2 Stříbronosná lokalita Jáchymov

Jáchymov je město s bohatou hornickou historií, zejména spojenou s těžbou stříbra, nacházející se v severozápadní části České republiky v Krušných horách, které jsou součástí Českého masivu. Významným centrem těžby a zpracování stříbrných rud se stalo již v 16. století a rychle se stalo také centrem mincovnictví. Geologické podlaží této oblasti je tvořeno převážně metamorfovanými horninami, jako jsou ruly, svory a fylity. Tyto horniny jsou protkány karbonátovými a křemennými žilami bohatými na polymetalickou mineralizaci včetně stříbra, uranu, kobaltu, niklu a dalších kovů. Depozice těchto rudních minerálů byla umožněna cirkulací hydrotermálních roztoků v tektonických zlomech. Stříbronosné žíly v Jáchymově obsahují širokou škálu minerálů. Hlavními minerály obsahující stříbro na této lokalitě jsou akanit (Ag_2S), pyrargyrit (Ag_3SbS_3), stefanit (Ag_5SbS_4) a také ryzí stříbro. Tyto minerály se často vyskytují v asociaci se sulfidickými minerály jako galenit (PbS), sfalerit (ZnS) a chalkopyrit ($CuFeS_2$). Kromě stříbra se v Jáchymově těžily také uraninit (UO_2), ze kterého se získával uran. V 19. století se zde pozornost přesunula právě na těžbu uranu na výrobu barev pro sklářský a keramický průmysl. Na přelomu 19. a 20. století byly z jáchymovského uraninitu izolovány nové prvky, radium a polonium což přispělo k rozvoji

radiochemie a medicíny a na místě vznikly známé radonové lázně. Intenzivní těžba zde probíhala i v období po druhé světové válce, avšak v 60. letech 20. století byla postupně utlumována.

V dnešní době je Jáchymov známý hlavně jako lázeňské město využívající léčivé radonové vody. Opuštěná důlní díla, haldy či historické budovy jsou stále k vidění jako pozůstatky těžební činnosti. I tato oblast je pro své unikátní mineralogické diverzitě předmětem zájmu mineralogů a geologů (Svatoňová 2013; Škácha et al. 2014)

3.3.4 Stříbro na celosvětové úrovni

Co se týče světové těžby stříbra, nejvýznamnějšími producenty jsou Mexiko s ročním výtěžkem 6 319 tun, Čína 3 415 tun a Peru 3 347 tun. Mezi další významné producenty stříbra patří také Chile, Bolívie, Polsko, Rusko, Austrálie, USA, Argentina či Indie, jejichž roční výtěžnost stříbra se pohybuje mezi 719–1625 tunami. Navzdory intenzivní globální těžbě, poptávka po tomto prvku již třetím rokem masivně převyšuje nabídku a zásoby celosvětového stříbra jsou spíše deficitní. Nejvyšší požadavky na odběr stříbra jsou kladeny hlavně z průmyslových odvětví, které v předešlých letech z hlediska poptávky dosahují historických rekordů. Tento tlak na odběr stříbra je způsoben hlavně stále silnější poptávkou po solární energii. Zároveň však v posledních letech zaznamenáváme pokles nákupu investičního stříbra a snižuje se také poptávka po stříbře ze šperkařského průmyslu. V roce 2023 převyšovala poptávka nabídku zhruba o 5000 tun. Celková roční produkce stříbra se pohybuje kolem 31 000 tun. Nejvíce se na tom podílí těžba, která zajišťuje převážnou část stříbrných zásob. Nemalý význam má také recyklace, která je v současnosti stále více prosazována a celkově se na produkci stříbra podílí asi z 15 % (The Silver Institute 2024). Odhaduje se, že pokud se spotřeba stříbra bude nadále pohybovat ve stejném měřítku, mohlo by k jeho úplnému vytěžení dojít již během 15-20 let (Česká mincovna 2015). Nicméně je třeba vzít v potaz rozvíjející se recyklaci a současně také nástup moderních technologií, které nám mohou zpřístupnit nové možnosti těžby, díky kterým mohou zásoby stříbra vydržet ještě několik desetiletí či dokonce nikdy vyčerpány nebudou (Vojáček 2018; The Silver Institute 2024).

3.3.5 Využití stříbra

Stříbro je jak z historického hlediska, tak i aktuálně klíčovým materiálem s rozsáhlým spektrem využití. Pro své vlastnosti, mezi které patří vynikající tepelná a elektrická vodivost a také výborná kujnost a tažnost je stříbro nepostradatelným prvkem. Nejvíce je stříbro využíváno v elektrotechnickém průmyslu. Je součástí většiny elektronických zařízení

(mobilní telefony, televize či počítače), ale i bateriových článků, katalyzátorů či solárních panelů (Česká mincovna 2015). Mezi další využití stříbra patří také zdravotnictví. V medicíně je využívána k léčení různých povrchových zranění koloidní forma stříbra, což je směs malých částic stříbra v deionizované vodě. Vnitřní užití koloidních stříbra je však pro zdraví velmi nebezpečné a v Evropské Unii od roku 2010 zakázané. V oboru stomatologie je stříbro součástí amalgámových výplní. Stříbro má silné antimikrobiální účinky a již po tisíciletí se používá pro čištění vody a k léčení popálenin bylo využívané již ve středověku. Pro své dezinfekční vlastnosti je nyní stříbro implementováno také do spotřebních produktů jako jsou oděvy se stříbrnými vlákny či ledničky a pračky (Barillo & Marx 2014). V neposlední řadě je nutné zmínit také šperkařství, kosmetický průmysl, využití pro výrobu klasického fotofilmu, optických médií, zrcadel či barev. Stříbro je tedy klíčovým materiálem, který nás doprovází téměř v každém aspektu života a jehož význam v 21. století je nezpochybnitelný (Česká mincovna 2015; Talarska et al. 2021).

3.3.6 Ekotoxikologie stříbra

V případě stříbra je hlavním zdrojem znečištění průmyslová těžba, metalurgie, fotografický průmysl a odpadní vody. Široká škála využití tohoto kovu tedy představuje další zdroj znečištění životního prostředí (Křížková et al. 2009). Agenturou pro ochranu životního prostředí (EPA) je od roku 1977 stříbro označeno jako prioritní znečišťující látka v přírodních vodách. Toto označení je založeno na perzistenci stříbra v životním prostředí a jeho vysoké toxicitě pro některé formy života (Luoma 2008). Současně však stříbro nepatří mezi nejzávažnější znečišťující látky ohrožující životní prostředí, jelikož velmi snadno tvoří soli, jako sulfidy či chloridy, které jsou velmi špatně ve vodě rozpustné (Křížková et al. 2009). Toxicita obecně velmi závisí na tom, jak je daná chemická látka prezentována organismu a na její dostupnosti z biologického hlediska. Z tohoto důvodu musí jakýkoli expoziční scénář pro stříbro brát v úvahu jeho chemickou formu. Toxicita stříbra se pohybuje v několika řádech v závislosti na formě stříbra a na médiu, ve kterém se nachází. V půdách se stříbro vyskytuje především ve spojení se železem, olovem či tellurem. Jednomocný iont je běžný v povrchových vodách jako sulfidové, hydrogenuhličitanové nebo síranové soli, případně je adsorbovaný na organických či anorganických materiálech (Purcell & Peters 1998).

V poslední době se předmětem zájmu staly také toxikologické účinky nanočástic stříbra. Nanočástice stříbra jsou zahrnuty do mnoha spotřebních produktů včetně textilií, lékařských výrobků, domácích spotřebičů, kosmetiky, barev a mnoho dalšího. Výroba, užívání

a likvidace těchto produktů jsou tak potenciálními cestami expozice životního prostředí. Nanočástice jsou definovány jako materiál, kde minimálně 50 % všech částic vykazuje alespoň jeden z rozměrů menších než 100 nm. Nanočástice stříbra patří mezi uměle vytvořené nanomateriály. Dle několika studií nanočástice mohou uvolňovat ionty Ag^+ a vykazovat tak cytotoxické účinky na mikroorganismy i vyšší organismy včetně člověka (Luoma 2008; McGillicuddy et al. 2017). Stanovení stříbra, včetně analýzy nanočástic stříbra, v životním prostředí a biologických systémech za pomocí moderních analytických metod by v budoucnosti mohlo přispět k lepšímu pochopení jejich toxikologických vlastností a environmentálních dopadů (Mitrano et. al 2012).

3.3.7 Typy akumulace stříbra

V přírodě je stříbro k nalezení v různých formách a podléhá akumulaci v různých prostředích v závislosti na geochemických podmínkách. Tyto formy lze poté rozdělit dle jejich chemického složení, minerálních sdružení a způsobu uložení (Mat 2019). V ryzí podobě se stříbro vyskytuje velmi zřídka. Krystaluje hlavně v soustavě kubické a velmi často je tak k nalezení v podobě drátků, plíšků, šupin či různých kostrovitých a kusovitých agregátů. Nálezy Ag v krystalické podobě jsou vzácné, jeho krystaly bývají ve tvaru hexaedru nebo oktaedru (Zimák 2005; Mat 2019). Vzniká jako druhotný minerál sulfidických ložisek nebo může být součástí hydrotermálních rudních žil. Na území České republiky je ryzí stříbro k nalezení na území jáchymovských a příbramských ložisek. Aktivně se ryzí stříbro těží však už jen místy na ložiscích v Kanadě, USA, Bolivii, Peru, Mexiku a Chile (Zimák 2005).

Nejčastější formou je stříbro vázané v minerálech (např. akanit, argentit, pyrargyrit, freibergit či andorit a další). Nejvyšší obsah stříbra ze všech minerálů, až 98,87 % Ag, má nerost allargentum (Křížková et al. 2009). Stříbro je velmi často k nalezení v polymetalických rudách, společně se sulfidy jiných kovů (např. olovo, měď, železo) (Křížková et al. 2009). Největší význam mají však rudy olověné, kde je stříbro k nalezení např. v anglesitu, cerusitu a galenitu. V České republice se stříbro vyskytovalo převážně ve vázané formě v izomorfních příměsích sulfidických polymelatických rud, hlavně galenitu PbS (Starý et al. 2022).

Stříbro se nenachází pouze v pevné formě jako minerál či součást rudných ložisek. Vyskytuje se také v rozpuštěné formě volných iontů Ag^+ či v různých chemických sloučeninách a komplexech, ale také může být akumulováno v sedimentech a půdách. Rozpuštěné formy stříbra jsou typicky přítomné téměř ve všech složkách životního prostředí, ať už antropogenního či přirozeného původu. Rozpuštěné formy Ag hrají významnou roli v transportu, biologické dostupnosti a potenciální toxicitě stříbra. Stříbro v sedimentech může

být ve formě minerálních zrn či adsorbováno na povrchu jílových minerálů, organických látek či oxidů železa a manganu. Největší význam má tato forma akumulace v oceánech a jezerech, kde dochází k dlouhodobému ukládání stříbra (Boyle 1968).

3.3.8 Těžba a zpracování stříbra

Materiály obsahující stříbro pocházejí z různých zdrojů. např. manganová stříbrná ruda, žáruvzdorná antimonová ruda, koncentráty sulfidu stříbra, koncentráty sulfidu olovnatého a zinečnatého, těžební odpadní voda, použité fotografické/radiografické filmy, elektronické a elektrické materiály, odpadní šperky, stříbrné zboží, pájecí slitiny, katalyzátory, baterie, zubní amalgám, ortopedické materiály a roztoky pro kovoobrábění, a jsou k dispozici v mnoha formách (Syed 2016). Primárními zdroji je stříbro vázané v polymetalických rudách, minerálech či jako ryzí kov. Sekundární zdroje stříbra zahrnují převážně druhotné suroviny z jeho zpracování (Kubečka 2016). Problematika opětovného získávání kovů z druhotných surovin ať už z pohledu efektivního využití či z pohledu legislativního, ekonomického, ekologického a technologického nemá jednoduché řešení. Většina z těchto odpadů je totiž z důvodu vysoké toxicity řazena mezi odpady nebezpečné. Po ekonomické stránce mohou však tyto odpady sloužit jako hodnotná druhotná surovina (Drongová et al. 2006). Nerostné suroviny, včetně rud obsahující stříbro, se obvykle netěží v podobě, která by umožňovala jejich okamžité zpracování. Kromě kýženého užitkového minerálu se při těžbě získává i nemalé množství vedlejších jalových nerostů a hornin, které je nutné odseparovat. Nejprve se tyto rudy upravují na formu vhodnou pro následné metalurgické zpracování či přímý prodej. Tento proces se nazývá úpravnictví, jehož cílem je získat cenné složky ve formě vysoce koncentrovaných produktů, které jsou připravené k dalšímu využití. V rámci úpravnictví se uplatňuje mechanická příprava (drcení, mletí a třídění) a separace stříbra od jaloviny za pomoci gravitační separace, flotace, chemického loužení a magnetické či elektrostatické separace. Procesy samozřejmě závisí na typu rudy, která může být oxidická, galenitová, polymetalická či ušlechtilá a také na koncentraci stříbra v dané rudě (Kubečka 2016; Závada 2018).

Na úpravnictví navazuje metalurgické zpracování stříbra, kde cílem je separovat stříbro od dalších kovů, odstranění nečistot a rafinace stříbra do požadované čistoty. K tomuto zpracování stříbrné rudy se využívá z velké části pyrometalurgie, využívající tavení rud za vysokých teplot či hydrometalurgie, která naopak využívá chemickou cestu v podobě kyanidace, elektrolýzy, kupelace a spíše historicky také amalgamace (Závada 2018).

Dnes je nejvýznamnějším průmyslovým způsobem získávání stříbra především kyanidové loužení, často používané ve spojení s flotací a pyrometalurgickými nebo hydrometalurgickými procesy. Významnou roli hraje také recyklace stříbra z odpadních materiálů (Syed 2016).

3.3.8.1 Amalgamace

Amalgamace představuje historicky významný způsob získávání stříbra, který využívá schopnost rtuti (Hg) tvořit slitinu s drahými kovy. Tato metoda byla široce využívána zejména v období 16.-19. století, kdy představovala hlavní technologii separace stříbra z rud. Největšího rozmachu dosáhla v období španělské kolonizace Ameriky, kdy v roce 1554 vyvinul španělský metalurg Bartolomé de Medina tzv. „patio process“, který umožňoval extrakci stříbra z nízkoprocentních rud. Tento proces byl masově zaveden v jihoamerických dolech, zejména v Potosí (Bolívie), Zacatecas (Mexiko) a dalších regionech s bohatými zásobami stříbra (Branding & Cross 1972; Nriagu 1994; Lacerda & Salomons 1998; Brown 2017). Ve 20. století byla amalgamace postupně nahrazena jinými metodami, zejména kyanidovým loužením, které bylo bezpečnější a efektivnější. Rtuť byla označena za vysoce toxickou, což vedlo k regulaci jejího použití a snížení jejího významu v těžebním průmyslu (Lacerda 1997).

V průběhu procesu je rozdrcená stříbronosná ruda smíchána s vodou, čímž vznikne kal. Následně je do suspenze přidána Hg, která se selektivně váže na stříbro za vzniku amalgámu. Pro separaci amalgámu od zbytkového minerálního materiálu je nutné jej zahřát na teplotu 350–500 °C, čímž dojde k odpaření rtuti a separaci čistého stříbra (Guerrero-Quintero 2015). Ipřesto, že pro zahřívání amalgámu byla vyvinuta speciální žáruvzdorná baňka, tzv. retorta, velmi často se zahřívání provádělo v otevřeném prostoru, což vedlo k rozsáhlému uvolňování emisí Hg do atmosféry. Toxická rtuť se rovněž šířila do vodních ekosystémů, kde docházelo k její bioakumulaci v potravním řetězci. Úniky rtuti do okolních řek, jezer a půdy vedly k rozsáhlé kontaminaci, přičemž rtuť se v prostředí může odpařovat a následně kondenzovat, což přispívá k její globální distribuci (Nriagu 1994; Lacerda & Salomons 1998).

Ačkoli byla amalgamace po staletí klíčovou metodou těžby stříbra, její dlouhodobé využívání významně přispělo ke kontaminaci životního prostředí. V současnosti jsou proto preferovány modernější a bezpečnější technologie, které minimalizují zdravotní a ekologická rizika. Nicméně historická kontaminace rtutí zůstává vážným environmentálním problémem, který vyžaduje rozsáhlé sanační zásahy (Nriagu 1994).

3.3.8.2 Kyanidové loužení

Proces kyanidace je nejvíce využívaným procesem při extrakci zlata a stříbra za posledních 100 let (Xie & Dreisinger 2007). Ve 20. století se kyanidové loužení stalo standardní metodou těžby stříbra, čímž vytlačilo amalgamaci, která byla spojena s vysokou toxicitou rtuti (Chamberlain & Pojar 1984). Jedná se o hydrometalurgický proces, během kterého dochází k extrakci stříbra z rud pomocí vodného roztoku kyanidových solí, nejčastěji kyanidu sodného (NaCN) za přítomnosti kyslíku. Chemická reakce probíhá dle následující rovnice:

$$4Ag + 8NaCN + 2H_2O + O_2 \rightarrow 4Na[Ag(CN)_2] + 4NaOH$$

(Chamberlain & Pojar 1984; Duru 2017).

I přesto že je NaCN spojen s významnými ekologickými a zdravotními riziky, nadále zůstává preferovaným loužícím činidlem v řadě závodech po celém světě a pracuje se na nových technologiích, jejichž cílem je toto činidlo využít co nejúčinnějším způsobem (Larrabure & Rodríguez-Reyes 2021). Jedním z hlavních zdrojů produkce stříbra je totiž stříbro jako vedlejší produkt ze zpracování zlata a kyanidové loužení je tak klíčovým procesem při zpracování nízkoprocentních rud, kde by jiné metody byly neekonomické. Vzhledem k intenzivní těžbě v posledních desetiletích došlo k vyčerpání vysokoprocentních rud a v důsledku toho je nyní nutnost soustředit se na méně kvalitní stříbrné rudy, které obvykle vykazují složité či žáruvzdorné chování a snižují tak účinnost loužících procesů (Fraser et al. 1991; Ragnarsdóttir 2016). Na základě tohoto kyanidace vede k nízkému výtěžku vyextrahovaného stříbra či k nadměrné spotřebě kyanidu sodného, což ve výsledku může učinit proces ekonomicky i ekologicky nepřijatelným (Deschênes et al. 2011). Zároveň je také z mineralogických důvodů při tradičním procesu kyanidace pozorována výrazně nižší výtěžnost stříbra oproti zlatu (Xie & Dreisinger 2007). Za účelem zvýšení účinnosti extrakce stříbra je zkoumáno mnoho inovativních způsobů a technologií, díky kterým by kyanidace byla ekologičtější, ekonomičtější či případně byla zcela nahrazena jiným extrakčním činidlem (Chamberlain & Pojar 1984; Duru 2017).

3.3.8.3 Environmentální dopady těžby stříbra

Těžební sektor, jakožto klíčový faktor hospodářského rozvoje, zajišťuje nezbytné suroviny pro většinu průmyslových odvětví (Haghighizadeh et al. 2024). Těžba a rafinace

kovů je však spojena se vznikem plynných emisí CO_2, SO_2, NO_x, emisí pevných prachových částic, odpadních vod a pevných odpadů (Dudka & Adriano 1997). Primární zdroje kontaminace zahrnují těžební činnost, výrobní a zpracovatelské operace a postupy nakládání s odpady. Důsledky těžebního průmyslu na životní prostředí (kontaminace a degradace půdy, znečištění vody ovlivňující vodní ekosystémy, absorpce xenobiotik rostlinami a zdravotní rizika spojená s expozicí těžkým kovům spolu s účinky na faunu a biologickou rozmanitost) tak představují závažný a naléhavý environmentální problém (Haghighizadeh et al. 2024).

Mezi hlavní environmentální problémy spojené s těžbou stříbra patří degradace ekosystémů, uvolňování toxických kovů a chemikálií, vysoká spotřeba vody a produkce odpadů. Povrchová i hlubinná těžba vede k zásadním změnám krajinného rázu a ke zničení původních ekosystémů. Odlesňování, eroze půdy a narušení vodních toků vede k poklesu biodiverzity zejména v oblastech s citlivými ekosystémy (Agboola et al. 2020). Kyselé důlní vody z kovových a uhelných dolů, je jedním z mnoha globálních problémů v oblasti životního prostředí současné doby. Okyselování půdy v důsledku chemických procesů těžby může způsobit mobilizaci toxických kovů a následnou kontaminaci povrchových i podzemních vod. Sulfidické odpady (pyritické odpady či rudy) podléhají oxidaci vlivem atmosférických a vodních procesů, což vede k tvorbě kyselých vod s vysokým obsahem síranů, železa a potenciálně rizikových prvků (Singovszka et al. 2020). Také opuštěná odkaliště představují riziko, zejména pokud se nacházejí v oblasti městských zón (Castro & Sánchez 2003). Havárie odkaliště dolu na zlato, stříbro a měď v Mount Polley v Kanadě je příkladem. V roce 2014 došlo k protržení hráze odkaliště a do okolních jezer a řeky Cariboo bylo vylito 25 miliard litrů kontaminované vody a hlušinového materiálu. V roce 2018 bylo shromážděno několik druhů bezobratlých a všechny druhy vykazovaly zvýšené koncentrace kovů a snížené přežití. Tyto výsledky dokazují, že kovy z jemných sedimentů jsou biologicky dostupné a potenciálně toxické i několik let po expozici biologických materiálů (Pyle et. al 2022).

Proces amalgamce a kyanidové loužení stříbra je dodnes široce používán v řemeslných a menších dolech, kde nedochází k řádnému proškolení horníků. Nedbalé zacházení s rtutí a kyanidy tak vede k jejich akumulaci v ekosystémech, což je příčinou vážných zdravotních a environmentálních problémů (Castro & Sánchez 2003; Johnson 2015). Vzhledem k tomu, že rtuť je toxická a perzistentní v životním prostředí, problémy z uvolňování rtuti z historické těžby zlata a stříbra jsou stále aktuální. Odhaduje se, že mezi lety 1580 a 1900 bylo v Severní, Středí a Jižní Americe a v Austrálii, kde bylo k těžbě těchto drahých kovů využíváno amalgamce, bylo do atmosféry uvolněno přibližně 156 000 t rtuti a více než 250 000 t rtuti do životního prostředí. Pro porovnání, současné antropogenní emise v USA jsou přibližně

100 t ročně. Vysoké emise rtuti do životního prostředí měly za následek závažnou kontaminaci půdy, vod a v důsledku bioakumulace negativně ovlivnily některé druhy živočichů a člověka (Strode et al. 2009).

Samotné stříbro má také negativní dopad na životní prostředí. Stříbrné ionty (Ag^+) jsou toxické pro vodní i suchozemské bezobratlé i obratlovce (včetně člověka). Z výše uvedených důvodů je nezbytné minimalizovat negativní dopady těžby. Zavádění ekologičtějších těžebních metod, snížení spotřeby vody či přísnější regulace jsou způsoby, jak šetrněji získávat a využívat Ag i v budoucnu (Fleming 2005; Vapur et al. 2005; Haghighizadeh et al. 2024).

3.3.8.4 Alternativní metody získávání stříbra

Těžba stříbra se v posledních desetiletích stále více zaměřuje na ekologicky šetrné technologie, které minimalizují negativní dopady na životní prostředí. Mezi nejvýznamnější alternativy tradiční těžby patří hydrometalurgické a biotechnologické metody. Tyto přístupy umožňují efektivní separaci stříbra z rud a sekundárních zdrojů při současné redukované spotřebě energie a chemických činidel. Běžně užívanými louhovacími činidly jsou v tomto ohledu využívány zejména amoniak (NH_3), thiomočovina ($SC(NH_2)_2$, thiosíran ($S_2O_3^{2-}$) či halogenidy, konkrétně chlor (Cl) (Hyk & Kitka 2017; Lei et al. 2018). Využití thiomočoviny pro extrakci stříbra se ukázalo jako slibná alternativa oproti konvenční kyanidaci. Proces se vykazuje větší selektivitou, rychlejší kinetikou extrakce, nízkým dopadem na životní prostředí a také snadnější manipulací s činidlem (Öncel et al. 2005). Další výhoda oproti kyanidu existuje při zpracování žáruvzdorných sulfidických rud předúpravou ve vysoce kyselých roztocích – před kyanidací je nutná neutralizace, zatímco k vyluhování thiomočoviny dochází v kyselém roztoku, který lze přímo zpracovat. Thiomočovina není stabilní a snadno se rozkládá v alkalickém roztoku. Pokud je jako oxidant použit železitý iont Fe^{3+}, probíhá reakce v kyselém prostředí dle následující rovnice:

$$Ag + 3CS(NH_2)_2 + Fe^{3+} = Ag[CS(NH_2)_2]_3^+ + Fe^{2+}$$

(Jing-ying et al. 2012).

Další alternativou ke konvenčním technikám zpracování kovů z rud jsou biotechnologické postupy zpracování (Asgari et al. 2022). Biologický prospěch lze definovat jako využití mikroorganismů (bakterie, houby, řasy, kvasinky) při zpracování nerostů. Biotechnologické aplikace (biohydrometalurgie a bio-benefiace) si vyžádaly náležitou

pozornost vzhledem k jejich ekonomickým a ekologickým výhodám ve srovnání s konvenčními metodami. Aplikace biohydrometalurgie zahrnuje dva různé procesy – bioloužení a biooxidaci. Bioloužení se týká rozpouštění kovu z jeho rudy a biooxidace zajišťuje předběžné úpravy pro uvolnění Ag ze žáruvzdorných sulfidových rud. Bio-benefiace zahrnuje bioflotaci a bioflokulaci, což jsou účinné přístupy pro efektivní zpracování rudy, které zahrnují specifickou eliminaci nežádoucích nebo hlušinových minerálů (Mishra et al. 2022). Jako příklad lze uvést využití bakterie *Acidithiobacillus ferrooxidans*, která byla využita při bioflotaci kovonosných odpadů s obsahem stříbra (Kovář 2015). Princip flotace sulfidických a nesulfidických minerálů spočívá v úpravě povrchu částic, na čemž závisí hydrofobnost případně hydrofilnost daného minerálu. Mikroorganismy jsou této „úpravy“ schopny. Díky schopnosti přilnout k povrchu částic, mohou ovlivňovat právě tuto vlastnost minerálu. Určité mikroorganismy jsou dokonce schopny adsorpce iontů těžkých kovů, což je velmi atraktivní pro ochranu životního prostředí (Xue et al. 2023). Kovář (2015) dokázal flotační metodou s využitím bakterie *Acidithiobacillus ferrooxidans* získat dvojnásobnou až trojnásobnou kovnatost vzorku. Nevýhodou této metody jsou vysoké ztráty. Téměř 30 % Ag přešlo do odpadu. Tento problém je možné řešit například následnými flotacemi a stříbro v odpadu vyseparovat (Kovář 2015). Dalšími mikroorganismy vhodnými pro biouložení Ag stříbra z rudy se prokázaly také mikroskopické houby *Fusarium* a *Trichoderma* (Mishra et al. 2022).

3.3.8.5 Alternativní metody detekce stříbra

Tradiční metody geologické prospekce obvykle zahrnují postupy jako je odběr povrchových vzorků hornin a sedimentů, chemická analýza půd, mineralogické rozbory, realizace geochemických map, geofyzikální měření či provádění průzkumných vrtů. Vedle těchto klasických přístupů však existují alternativní formy geologického průzkumu, které využívají schopnost některých organismů (rostliny, živočichové a houby) akumulovat stříbro ve svých tkáních a sloužit tak jako přirozené bioindikátory či biomonitory výskytu a dostupnosti stříbra v životním prostředí (Cecchi et al. 2017).

Například studie od Lazim et al. (2023) se zaměřila na hodnocení koncentrací stříbra ve vodním ekosystému. V rámci výzkumu byly odebrány vzorky říčních sedimentů, vody, suchozemských rostlin (náhodný výběr) a několika druhů ryb (*Oreochromis niloticus*, *Anabas testudineus*, *Clarias macrocephalus,…)*, které byly následně podrobeny analýze metodou ICP-MS. Všechny analyzované vzorky vykazovaly detekovatelnou přítomnost stříbra, přičemž nejvyšší koncentrace byla zaznamenána ve svalovině *Oreochromis niloticus* (až

161,94 mg/kg). Poměrně vysoké hodnoty byly rovněž zjištěny u rostlin (3,17 ± 1,09 mg/kg) a říčních sedimentů (4,08 ± 2,19 mg/kg). U říčních sedimentů však byla v průběhu roku pozorována výrazná variabilita v obsahu Ag, připisovaná vymývaní stříbra z matrice. Tato fluktuace naznačuje nižší stabilitu sedimentů jako monitorovací matrice z hlediska dlouhodobého sledování. Naproti tomu biologické vzorky, zejména ryby a rostliny, vykazovaly stabilnější koncentrace, což podtrhuje jejich vhodnost pro použití jako spolehlivé biomonitory environmentální zátěže stříbrem.

V jiné studii se prokázaly jako výborný bioakumulátor také mykorhizní (*A. submembranacea*, *A. crocea* a *Boletus edulis)* a saprobní houby (*Lepista nuda)*, které na studované lokalitě (Lhota u Příbrami) vykazovaly výbornou schopnost akumulovat Ag z půdního prostředí. Analýza vzorků byla provedena opět metodou ICP-MS a naměřené hodnoty se pohybovaly v rozmezí (84–692 mg/kg). Výsledky výzkumu potvrzují klíčovou úlohu hub v biogeochemických procesech spojených s cyklem stříbra v životním prostředí (Borovička et al. 2010).

Pro účely biomonitoringu se po celém světě používá také široká škála vodních mechů. Čtyři vodní mechy (*Fontinalis squamosa, Brachythecium rivulare, Platyhypnidium riparioides, Thamnobryum alopecurum)* a sladkovodní červená řasa (*Lemanea fluviatilis*) spolu se vzorky vody z toků z oblasti dolu Góis ve středním Portugalsku byly analyzovány na několik prvků, včetně Ag prvků. Přestože byly koncentrace naměřené ve vzorcích vody pod úrovní detekce, ve vzorcích rostlin byly obsahy těchto prvků (Zr, V, Cr, Mo, Ru, Os, Rh, Ir, Pt, Ag, Ge a Bi) nad detekčním limitem. Nejvyšší průměrné koncentrace těchto prvků vykazovaly mechy *T. alopecurum* a *B. rivulare*. Výzkum tak potvrzuje, že vodní mechorosty mohou být vhodné pro biomonitoring kvality vody a biogeochemický průzkum ve sladkých vodních útvarech díky jejich vysoké akumulační multiprvkové kapacitě z vodního prostředí (Favas et al. 2018). Zjištění naznačují, že biogeochemické přístupy využívající analýzu biologických indikátorů – jako jsou rostliny, houby či bezobratlí – mohou sloužit jako účinný nástroj pro detekci přítomnosti stříbra v environmentálních matricích (Borovička et al., 2010; Favas et al. 2018, Wagner et al. 2022). Vzhledem k prokázané schopnosti těchto organismů akumulovat stříbro se nabízí perspektiva rozšíření tohoto konceptu i na jiné organismy, například včely. Tato metoda by mohla představovat ekologicky šetrnou, nákladově efektivní a technicky nenáročnou alternativu ke klasickým geochemickým průzkumům.

3.4 Metoda ICP-MS

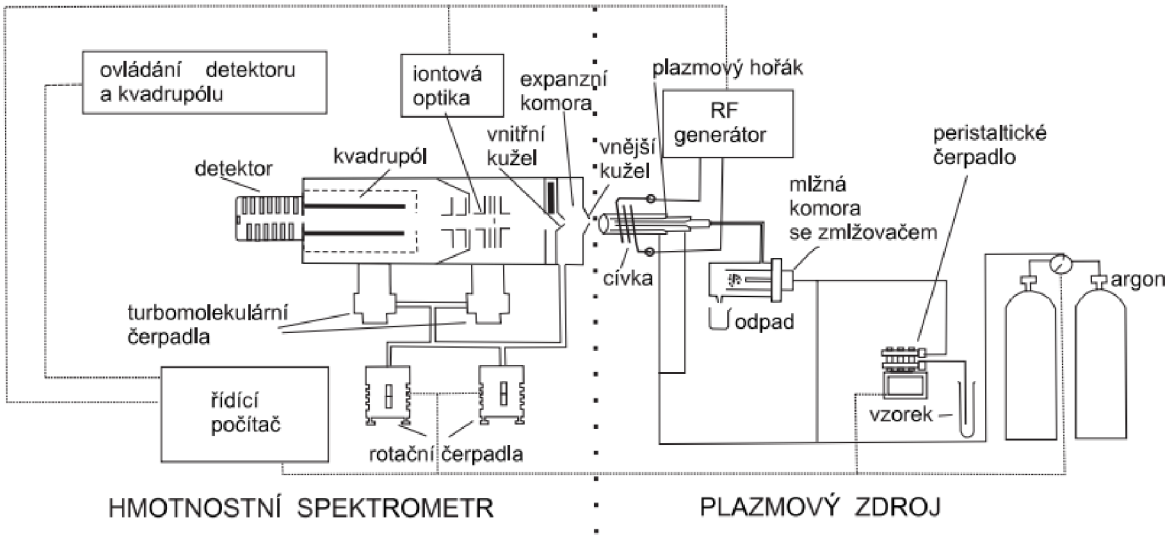
Hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP-MS) je analytická technika využívaná především k detekci a kvantifikaci prvků na stopové i ultrastopové úrovni (Mihaljevič et al. 2004). Představuje jednu z nejpokročilejších a nejcitlivějších metod elementární analýzy v širokém spektru matric vzorků (Jakubec & Bendl 1996). Tato metoda je charakteristická vysokou citlivostí, přesností a schopností analyzovat široké spektrum prvků periodické tabulky, včetně kovů, polokovů a vybraných nekovů. ICP-MS také poskytuje informace o izotopovém složení zkoumaných vzorků (Pluháček & Maier 2020; Thomas 2001).

Technika ICP-MS je schopna detekovat prvky na koncentrační úrovni v rozsahu miligramů na litr (mg/l) až pikogramů na litr (pg/l). Její flexibilita umožňuje kombinaci s dalšími analytickými metodami, jako je vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) nebo plynová chromatografie (GC), což rozšiřuje její aplikační možnosti v oblasti environmentální analytiky, biomedicíny a geochemie. Další významnou modifikací ICP-MS je spojení s laserovou ablací (LA-ICP-MS), které umožňuje přímou analýzu pevných vzorků bez nutnosti chemické přípravy. Díky těmto vlastnostem a své schopnosti poskytovat rychlé a přesné výsledky je metoda ICP-MS nepostradatelným nástrojem v různých oblastech medicíny, průmyslu a přírodních věd, včetně geochemie, biologie, a environmentální chemie (Pluháček & Maier 2020).

3.4.1 Princip metody

Základní princip této metody spočívá v kombinaci využití indukčně vázaného plazmatu (ICP – Inductively Coupled Plasma), které slouží jako zdroj kladně nabitých částic a hmotnostní spektrometrie (MS – Mass Spectrometry), která tyto částice detekuje (Mihaljevič et al. 2004). Pro sestavení přístroje ICP-MS bylo nutné vyřešit umožnění pohybu nabitých iontů z prostředí s atmosférickým tlakem do prostředí s vysokým vakuem. To znamenalo spojení obou hlavních částí – plazmového zdroje a hmotnostního spektrometru. Spojení těchto částí tvoří tzv. expanzní komora. Hmotnostní spektrometr je tvořený iontovou optikou, kvadrupólem a detektorem. Tyto součásti, včetně expanzní komory jsou čerpadly zbavovány vzduchu, aby jeho částice nerušily vlastní stanovení a také aby byl zajištěn volný pohyb vzniklých iontů z plazmy do analyzátoru. Plazmový zdroj je poté tvořen radiofrekvenčním generátorem, indukční cívkou a plazmovým hořákem (Pluháček & Maier 2020).

Stanovovaný vzorek, obvykle ve formě roztoku, je pomocí peristaltické pumpy zaváděn do systému pro zavádění vzorku. Tento systém se skládá ze zmlžovače a mlžné komory. Ve zmlžovači dochází k rozprašování vzorku za vniku aerosolu, což se projevuje jako uvolňování jemně dispergovaných kapiček roztoku. Vzniklý aerosol je následně pomocí injektoru vpravovány do plazmového hořáku s argonovým plazmatem (Thomas 2001). Toto argonové plazma vzniká v plazmovém hořáku pomocí radiofrekvenčního generátoru a indukční cívky (Pluháček & Maier 2020). Při průchodu aerosolu vzorku různými teplotními zónami plazmového hořáku probíhá několik transformačních kroků: vysoušení (odpaření kapalného aerosolu na pevné částice), sublimace (přeměna pevných částic na plynnou fázi) a atomizace (rozklad molekul na jednotlivé atomy) (Thomas 2001; Otruba 2015). K atomizaci dochází po přechodu vzorku do analytické zóny plazmy, kde se teplota pohybuje kolem 7000–8000 K a jednotlivé prvky se atomizují a ionizují a představují tak elementární složení vzorku (Thomas 2001). Množství a zastoupení jednotlivých iontů vznikajících z analytu záleží na energii kmitajících elektronů v plazmatu. Minimální množství této energie potřebné pro ionizaci atomu se nazývá ionizační energie či potenciál. Většina prvků má však svůj ionizační potenciál nižší než argon, a tudíž získá v plazmatu dostatek energie potřebné k vytvoření kladně nabitých iontů, které můžeme následně analyzovat (Pluháček & Maier 2020). Vzniklé kladně nabité ionty už pak putují do vlastního spektrometru skrze expanzní komoru a za pomoci iontové optiky. Iontová optika slouží k zaostření a řízení toku iontů z expanzní komory do analyzátoru. Tento systém využívá elektrostatická pole k selekci nabitých částic a jejich vedení na analyzátor. Následně ionty procházejí kvadrupólem, který umožňuje pohyb iontů směrem k detektoru. Záleží na náboji a hmotnosti každého jednotlivého iontu, tj na parametru m/z. Kvadrupólové tyče mění podmínky napětí během zlomků sekundy což nám zprostředkuje analýzu v celém hmotnostním spektru během několika sekund. Ionty, které kvadrupólem neprojdou, se na některé z tyčí vybijí a jsou odstraněny vakuovými pumpami. Ionty prošlé kvadrupólem dopadají na detektor, kde je již jejich proud převáděn na elektrický signál a dále zpracováván a interpretován (Pluháček & Maier 2020; Otruba 2015).



Obrázek 5: Schéma hmotnostního spektrometru s indukčně vázaným plazmatem (Mihaljevič et al. 2004).

3.4.2 Interference

Navzdory své popularitě a velkou řadou výhod metody ICP-MS, trpí tato technika interferenčními problémy. Interference představují nežádoucí jev, jelikož mohou negativně ovlivnit kvalitu získaných dat, zvláště v případě analýzy složitých a proměnlivých vzorků (např. geologické materiály) při stopové a ultrastopové analýze. Interference pocházejí z různých zdrojů (matrice vzorku, médium rozpouštědla, plazmový plyn či unášené atmosférické plyny). Je tedy důležité tyto interference odhalit a zaměřit se na aplikaci strategií, které lze použít k jejich odstranění nebo zmírnění (Li et al. 2007; Balaram 2021). Rozlišujeme dva hlavní typy interferencí – spektrální a nespektrální (Loula et al. 2019).

3.4.2.1 Spektrální interference

Spektrální interference vznikají, pokud mají odlišné ionty stejný poměr hmotnosti k náboji (m/z) jako analyzovaný izotop prvku. Spektrální interference mohou být způsobeny jiným izotopem prvku, tzv. izobarická interference (např. 114Cd+ a 114Sn+), víceatomovými ionty (např. 52Cr+ a 40Ar12C+) či dvojitě nabitými ionty (Pick et al. 2010). Tato situace následně vede k překrývání signálu analytu a interferujícího iontu na detektoru přístroje, což má za následek nadhodnocenou hodnotu koncentrace analytu (Kalinitchenko et al. 2008; Loula et al. 2019).

K izobarickým interferencím dochází v případě, pokud dva odlišné prvky sdílejí izotopy se stejným hmotnostním číslem. Například rubidium (Rb) a stroncium (Sr) mají izotopy

o hmotnosti 87. Proto jakýkoli signál měřený při m/z = 87 může být interpretován jako zároveň Rb i Sr (Balaram 2021). Samozřejmě neexistují dva izotopy s naprosto totožnou hmotností, ale rozdíl mezi překrývajícími se izotopy je extrémně nízký (Kutscher & Nelms 2017). Pro některé prvky je řešením vybrat izotop, který netrpí překrývajícími se interferencemi. To však může vést k nižšímu zastoupení náhradního izotopu a následně nižší citlivosti analýzy. Toto řešení taktéž nelze aplikovat v případě monoizotopických prvků (Balaram 2021). Velmi často se korekce izobarických interferencí provádí také pomocí matematických metod. Pro odstranění izobarických interferencí (^{87}Rb a ^{87}Sr) a (^{204}Hg a ^{204}Pb) se jako jedna z účinných technik ukázalo využití kolizně-reakční cely (CRC) s pomocí reakčních plynů O_2 a NH_3 v trojitém kvadrupólovém systému ICP-MS (Kutscher & Nelms 2017).

Polyatomické interference jsou výsledkem kombinace dvou či více izotopů ze stejných či různých prvků v plazmatu. Vzhledem k tomu, že samotné použití argonu jako plazmového plynu generuje velké množství polyatomických iontů na bázi Ar, detekční limity jsou pro tyto prvky vysoké (Pick et al. 2010; Balaram 2021). Například nejhojnější izotop argonu $^{40}Ar^{+}$ nejenže je izobarickým interferentem s nejhojnějším izotopem vápníku $^{40}Ca^{+}$, ale v asoiaci s kyslíkem tvoří polyatomický iont $^{40}Ar^{16}O^{+}$, čím výrazně interferuje stanovení izotopu železa $^{56}Fe^{+}$. Dále např. asocitát $^{40}Ar^{35}Cl^{+}$ komplikuje stanovení $^{75}As^{+}$ či $^{40}Ar^{12}C^{+}$ ztěžuje stanovení $^{52}Cr^{+}$. Kromě toho mohou četné interferující specie produkovat také atmosférické plyny z okolního vzduchu, dále složky matrice vzorku, kyseliny, rozpouštědla a další činidla. Velmi často se objevuje interference způsobené vápníkem (Ca), titanem (Ti) či baryem (Ba). Tyto prvky tvoří silné oxidové vazby a způsobují vážné interference při stanovení jiných prvků. (Thomas 2008; Balaram 2021).

Tabulka 1: Hlavní spektrální interference pro vybrané izotopy (Pick et al. 2010)

Izotop	Zastoupení v %	Polyatomické ionty
^{52}Cr	83.76	$^{40}Ar^{12}C$, $^{35}Cl^{16}O^{1}H$, $^{36}Ar^{16}O$, $^{38}Ar^{14}N$, $^{37}Cl^{15}N$, $^{36}S^{16}O$
^{53}Cr	9.55	$^{37}Cl^{16}O$, $^{40}Ar^{13}C$
^{54}Fe	5.82	$^{40}Ar^{14}N$, $^{38}Ar^{16}O$, $^{37}Cl^{16}O^{1}H$
^{56}Fe	91.66	$^{40}Ar^{16}O$, $^{40}Ca^{16}O$, $^{37}Cl^{18}O^{1}H$
^{58}Ni	67.88	$^{23}Na^{35}Cl$, $^{40}Ar^{18}O$, $^{40}Ca^{18}O$, $^{42}Ca^{16}O$
^{60}Ni	26.23	$^{44}Ca^{16}O$, $^{23}Na^{37}Cl$, $^{36}Ar^{24}Mg$
^{75}As	100.0	$^{40}Ar^{35}Cl$, $^{59}Co^{16}O$, $^{23}Na^{12}C^{40}Ar$, $^{36}Ar^{39}K$
^{78}Se	23.52	$^{40}Ar^{38}Ar$, $^{38}Ar^{40}Ca$
^{80}Se	49.82	$^{40}Ar^{40}Ar$
^{82}Se	9.19	$^{12}C^{35}Cl_2$, $^{40}Ar_2{}^{1}H_2$

3.4.2.1.1 Korekce spektrálních interferencí pomocí kolizně/reakčních cel

U kvadrupólových ICP-MS spektrometrů jsou k minimalizaci polyatomických interferencí preferovány technologie kolizních/reakčních cel na bázi jednoduchých iontově-molekulových kolizí a reakcí. Tyto cely využívají pro překonání interference tzv. multipóly (kvadrupólové, hexapólové či oktopólové), které jsou umístěny před analytickým kvadrupólem a je do nich zaveden inertní (kolizní) nebo reaktivní plyn. Na základě využitého plynu rozdělujeme dva základní principy: režim kolize a režim reakce (Balaram 2021).

Kolizní režim využívá technologie kolizně-reakční cely (CRC). Jako kolizní plyn je nejčastěji aplikováno helium (He), popřípadě neon (Ne), xenon (Xe), argon (Ar). Princip odstranění interferujících iontů v CRC spočívá v rozdílu jejich kinetické energie. Během průchodu kolizní komorou dochází ke srážkám iontů s molekulami plynu, přičemž víceatomové interferující ionty (např. polyatomy) ztrácejí podstatně více energie než jednodušší ionty analytu. Tento rozdíl umožňuje jejich efektivní potlačení ještě před dosažením detektoru. Zároveň vlastní kolize a fokusace iontového svazku pomocí multipólového pole přispívají k zachování signálu analytu a ke zvýšení selektivity celého systému (Balcaen et al. 2015; Balaram 2021).

Naopak reakční režim využívá technologii dynamické reakční cely (DRC), do které je zaváděn reaktivní plyn – typicky kyslík (O_2), vodík (H_2) či amoniak (NH_3). Reakční plyn vstupuje do chemických reakcí buď s interferujícími ionty, čímž dochází k přeměně na jiné sloučeniny s odlišným hmotnostním poměrem (m/z), nebo přímo s ionty analytu, které jsou

cíleně převedeny do nových molekulárních iontů. Tento tzv. „mass-shift“ posouvá signál analytu mimo oblast spektra zatíženou interferencemi či interferenční ionty mimo oblast spektra analytu (Balcaen et al. 2015).

3.4.2.2 Nespektrální interference

Nespektrální interference jsou naopak způsobeny fyzikálními nebo chemickými vlastnostmi matrice vzorku, které ovlivňují signál analytu skrze účinnost ionizace nebo transport analyzovaného prvku. Dalším faktorem ovlivňující rozsah nespektrálních interferencí jsou také parametry nastavení přístroje. Signál může být jak zvýšen, tak snížen a daný vliv se zvyšuje s variabilitou dané matrice. Například přítomnost vysokých koncentrací solí nebo organických látek může potlačit signál či způsobit také jeho zvýšení (Loula et al. 2019).

Nespektrální interference se nejčastěji dělí na vratné a nevratné. Reverzibilní nespektrální interference způsobující dané zesílení/potlačení signálu jsou dočasné a trvají pouze po dobu analýzy daného vzorku. Zesílení signálu je způsobeno prostřednictvím reakcí přenosu náboje v plazmě nejčastěji na základě přítomnosti síry (S) či uhlíku (C) (Nakazawa et al. 2014; Loula et al. 2019). Zatímco zesílení signálu u ICP-MS způsobené sírou bylo pozorováno pouze u několika prvků (Te, Se a As), zesílení související s uhlíkem je mnohem běžnější. Nespektrální interference, které snižují ICP-MS signál, jsou způsobeny zejména alkalickými kovy a kovy alkalických zemin (Goessler et al. 1998).

Při analýze roztoků rozpuštěných prvků lze reverzibilní nespektrální interference korigovat vhodnou kalibrační metodou, jako je vnitřní standardizace, metoda přidávání standardu nebo ředění izotopů (Loula et al. 2019).

Naopak nevratné nespektrální interference postupně vedou k úplné ztrátě signálu, která přetrvává i po ukončení zavádění vzorku. Nejčastěji je tento typ interferencí způsoben v důsledku usazování solí či oxidů v samotném přístroji (Balaram 2021).

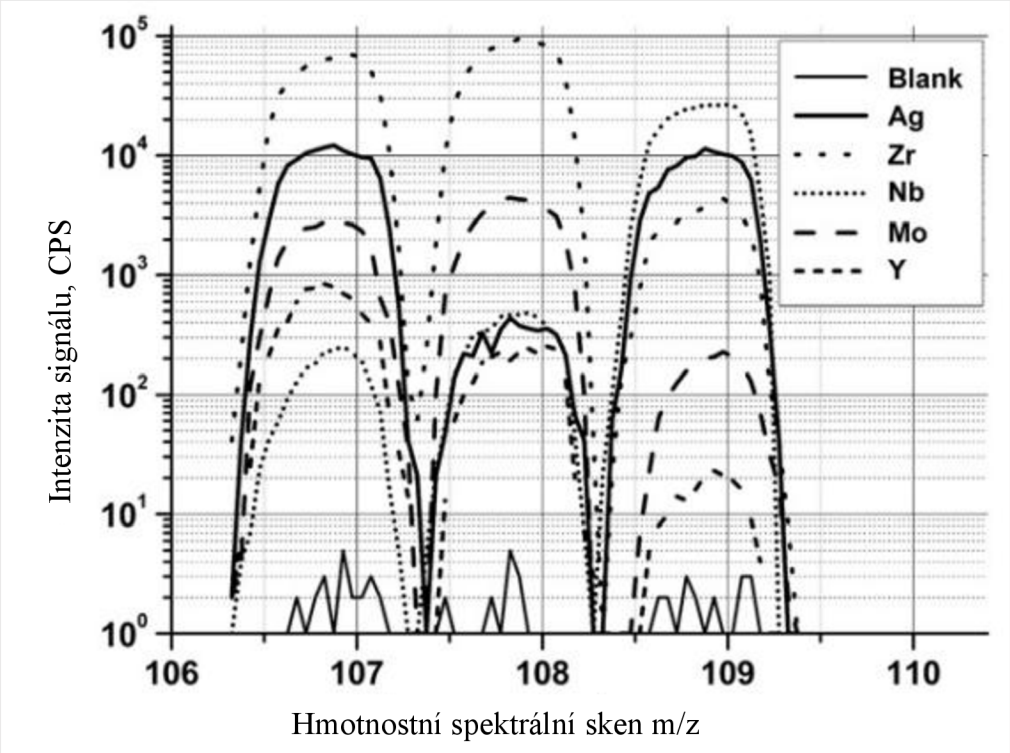
3.4.3 Stanovení stříbra technikou ICP-MS

Environmentální, geologický i socioekonomický význam stříbra vyvolává zájem o využití spolehlivých analytických metod, které jsou vhodné ke kvantifikaci tohoto prvku v reálných vzorcích. Z tohoto důvodu je při určování stopových množství stříbra (Ag) v biologických a geologických vzorcích běžně využívána metoda hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP-MS), jelikož tato metoda se vyznačuje schopností kvantifikovat stříbro s vysokou přesností a vynikající citlivostí. V praxi se využívá také jiných

metod jako například absorpční spektrometrie s elektrotermickou atomizací (ETA-AAS), atomová emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP-AES), avšak tyto metody nemusí zcela vyhovovat z důvodu nedostatečné citlivosti pro ultra-stopovou analýzu či časové náročnosti (Li et al. 2007).

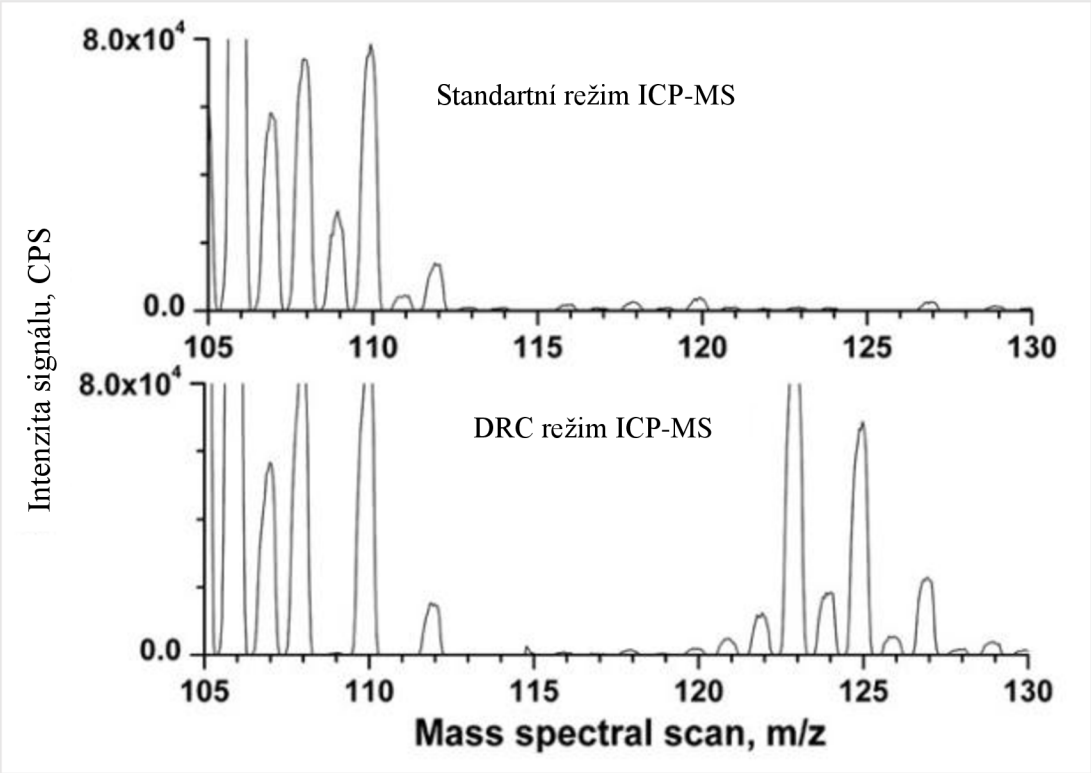
3.4.3.1 Interference při stanovení stříbra

Bohužel také stanovení stříbra trpí vážnými spektrálními interferencemi. Při stanovení Ag ve vzorcích půd a sedimentů jsou spektrální interference nejčastěji způsobovány polyatomickými ionty molybdenu (Mo), niobu (Nb), zirkonu (Zr) a yttria (Y) (Li et al. 2007). Ionizovaný izotop stříbra $^{107}Ag^{+}$ běžně interferuje s $^{91}ZrO+$, $^{90}Zr^{16}OH^{+}$ a $^{89}Y^{18}O^{+}$. Ionizovaný izotop stříbra $^{109}Ag^{+}$ se překrývá v hmotnostním spektru s $^{93}Nb^{16}O+$, $^{92}Zr^{16}OH^{+}$ a $^{92}Mo^{16}OH^{+}$. Z tohoto důvodu, pokud jsou ekvivalentní koncentrace těchto oxidů a hydroxidů řádově vyšší než koncentrace Ag ve vzorku, mohlo by to vést k výrazně chybným výsledkům. Problematicky se jeví přítomnost zmíněných interferujících prvků zejména v půdních a geologických vzorcích. Průměrná koncentrace Zr, Y, Nb, a Mo v zemské kůře je 2300krát, 340krát, 150krát a 14krát vyšší než průměrná koncentrace Ag (Rudnick & Gao 2003; Guo et al. 2011). Pro minimalizaci vlivu těchto spektrálních interferencí bylo vyvinuto několik strategií, z nichž jako nejúčinnější se prokázalo použití iontově molekulárních reakcí v dynamické reakční cele (DRC) s použitím kyslíku (O_2) jako reakčního plynu. Tuto metodu zkoumal ve své práci Guo et al. (2011). Obrázek 3 zobrazuje hmotnostní spektrální sken v rozmezí 106 až 110 m/z pro 1 ng/ml Ag (tj. analyt), 2000 ng/ml Zr, 500ng/ml Y, 200ng/ml Nb a 100ng/l Mo (interferenty) a 1% HNO_3 (jako slepý vzorek).



Obrázek 6: Hmotnostní spektrální sken v rozmezí m/z = 106 až 110 pro 1% HNO3 jako slepý pokus, 1ng/ml Ag, 2000 ng/ml Zr, 500 ng/ml Y, 200 ng/ml Nb a 100 ng/l Mo za standartních provozních podmínek ICP-MS (Guo et al. 2011)

Z obrázku 3 je zřejmé, že intenzita signálu na m/z = 107 pro roztok 1 ng/ml Ag činila zhruba 10 000 CPS (counts per second), avšak signál pro $^{91}ZrO^{+}$ a $^{94}ZrOH$ byl zhruba 70 000 CPS, což přibližně odpovídá koncentraci 7 ng/ml Ag. Pro $^{89}Y^{18}O^{+}$ byl zaznamenán signál 820 CPS, což odpovídá 0,08 ng/ml roztoku Ag. Také pro hmotnostní skeny na m/z = 109 byly zaznamenány značné interference. Intenzita signálu $^{93}Nb^{16}O^{+}$, $^{92}Zr^{16}OH^{+}$ a $^{92}Mo^{16}OH^{+}$ se pohybovala kolem 30 000 CPS, což odpovídá 3ng/ml Ag. Z tohoto důvodu tyto interference, zejména oxidů a hydroxidů zirkonu a niobu, mohou vést k významné pozitivní odchylce pro stopové či ultrastopové koncentrační hladiny stříbra. Díky použití O_2 jako reakčního plynu při optimalizovaném průtoku lze však tyto interferující prvky účinně eliminovat. Hmotnostní spektrální sken pro m/z = 105 až 130 při využití O_2 v DRC potvrdil úspěšné odstranění těchto interferencí (viz Obrázek 4). Vzhledem k tomu, že Ag v DRC nereaguje s O_2, zůstaly signály pro m/z = 107 a 109 výhradně pro stanovení Ag a interferenční ionty byly „přesunuty“ na jiné hodnoty m/z (tzv. mass shift mód) (Guo et al. 2011).



Obrázek 7: Hmotnostní spektrální sken pro roztok 2000 ng/ml Zr + 500 ng/l Y+ 200 ng/ml Nb + 100 ng/mlMo za standardních podmínek ICP-MS (Rpq=0,25, O_2průtok = 0 ml min/1) a podmínky ICP-MS v režimu DRC (Rpq=0,75, O_2průtok = 2,4 ml min/1). Skenované hmoty byly m/z=105 až 130. (Guo et al. 2011)

Reakční mechanismy pro odstranění interferencí Nb, Zr a Mo s O_2 v DRC se uvádějí takto:

- $NbO^+ + ½O_2 \rightarrow Nb_2^+$
- $ZrOH^+ + ½O_2 \rightarrow ZrO_2^+$
- $ZrOH^+ + O_2 \rightarrow ZrO_3H^+$
- $MoOH^+ + ½O_2 \rightarrow MoO_2H^+$

(Guo et al. 2011).

4 Metodika

Na čtyřech vybraných lokalitách na území České republiky s předpokládaným výskytem stříbra, popsaných v literární rešerši, a na čtyřech referenčních lokalitách byl proveden terénní odběr vzorků včel. Před samotným stanovením obsahu Ag ve včelách metodou ICP-MS byla optimalizována extrakční metoda jak na referenčním půdním materiálu (říční sediment – Metranal 01), tak na biologických vzorcích – včelách. Porovnávala se účinnost dvou extrakčních technik: mikrovlnné extrakce (MW) a ohřevu na topné desce (HP), přičemž byly testovány tři různé oxidační směsi (lučavka královská, Leffortova lučavka a směs $HCl:HNO_3$ v poměru 1:1). Při analytickém stanovení byl kladen důraz na detekční schopnost měřícího systému, na výsledky nezatížené spektrálními interferencemi a na detekční limit metody. Naměřené obsahy Ag ve včelách byly následně statisticky zpracovány a vyhodnoceny.

4.1 Popis vybraných lokalit

4.1.1 Stříbronosné lokality

Stříbronosné lokality byly detailně popsány v kapitole 3.3.3, nicméně v této kapitole uvádím popis přesného místa odběru vzorků.

- Hluboš – obec Hluboš leží ve Středočeském kraji asi 6 km od města Příbram. Obec je lemována vodními toky řeka Litavka a Hlubošský potok. Vzork byly sbírány na louce (49.7438061N, 14.0117569E) pod Kostelem Nejsvětější Trojice.
- Krsov – vrchol Krsov (500 m.n.m) se nachází nad údolím řeky Litavky asi 3 km od obce Hluboš na Příbramsku. Vzorky byly sbírány z louky mezi vrcholy Krsov a Prašivý Vršek (49.7506172N, 14.0071433E).
- Trhové Dušníky – obec Trhové Dušníky je také lokalizována v okrese Příbram. Obcí protéka řeka Litavka a Příbramský potok, v jehož okolí byly vzorky sbírány (49.7104581N, 14.0130425E).
- Jáchymov – lázeňské město Jáchymov se nachází v okrese Karlovy Vary, přibližně 7 km od hranic s Německem. Vzorky z této lokality byly odebírány v blízkosti bývalých dolů (50.3723236N, 12.9119025E).

4.1.2 Referenční lokality

Referenční lokality byly vybrány s využitím dostupných geologických informací a mapových podkladů tak, aby vykazovaly absenci jakýchkoliv historických či geochemických důkazů o výskytu stříbra. Tyto lokality sloužily jako kontrolní pro porovnání obsahu stříbra ve včelím homogenátu s výsledky získanými ze stříbronosných oblastí.

- Sudovo Hlavno – Obec Sudovo Hlavno leží ve Středočeském kraji severovýchodně od Prahy v oblasti charakteristické nížinným reliéfem a intenzivním zemědělským využitím krajiny. Historicky ani geochemicky zde nebyl zaznamenán výskyt stříbra či jiných cenných kovů. Z těchto důvodů bylo Sudovo Hlavno zvoleno jako referenční lokalita pro hodnocení přirozené hladiny stříbra ve včelím homogenátu, neboť představuje území s nízkým rizikem kontaminace antropogenními či přírodními zdroji kovů. Vzorky byly sbírány na jetelovém poli (50.2607289N, 14.6791672E) na okraji obce.
- Louny – Město Louny nachází v Ústeckém kraji na území severozápadních Čech. Průmyslově je oblast známa zejména zpracováním zemědělských produktů, potravinářstvím a strojírenstvím, ale v širším regionu se historicky uplatňoval i těžký průmysl navázaný na Mosteckou a Teplickou pánev. Nicméně v okolí nebyl dosud evidován žádný výskyt stříbronosných rud. Oblast se vyznačuje nízkou geologickou variabilitou a lokalita tak poskytuje vhodné kontrolní podmínky pro hodnocení obsahu stříbra ve včelím homogenátu. Vzorky byly sbírány na travnaté ploše (50.3619333N, 13.7723222E) na okraji města.
- Šlovice – Šlovice jsou osada a část obce Hřebečníky ležící ve Středočeském kraji v okrese Rakovník. Lokalita se nachází v zemědělsky využívané oblasti bez výraznější průmyslové zátěže. V této oblasti nebyly historicky evidovány žádné těžební aktivity související s drahými kovy, ani geochemické anomálie naznačující jejich přirozený výskyt. Z těchto důvodů byla lokalita Šlovice zařazena jako referenční území pro účely diplomové práce, aby bylo možné objektivně srovnat obsahy stříbra ve včelím homogenátu s lokalitami s předpokládaným zvýšeným výskytem tohoto kovu. Vzorky byly sbírány na louce asi 1 km za osadou (49.9689461N, 13.7416747E).
- Libčice nad Vltavou – Město Libčice nad Vltavou se nachází ve Středočeském kraji,

severozápadně od Prahy, na levém břehu řeky Vltavy. Oblast má převážně průmyslově-zemědělský charakter a v minulosti byla známá zejména díky cihelnám a strojírenské výrobě, která však v posledních dekádách postupně ustoupila. Lokalita byla proto vybrána jako referenční oblast pro srovnání se stříbronosnými lokalitami, jelikož umožňuje hodnotit přirozenou hladinu kovů ve včelích vzorcích bez vlivu lokální těžby nebo geologického pozadí bohatého na drahé kovy. Vzorky zde byly sbírány v okolí řeky Vltavy (50.1868903N, 14.3779350E)

4.2 Sběr vzorků

Odběr vzorků včel byl prováděn na předem vybraných lokalitách s cílem získat reprezentativní vzorky pro následnou analýzu přítomnosti stříbra v tělech včel. Odběr probíhal za standardizovaných podmínek v průběhu vegetační sezóny, kdy je aktivita včel nejvyšší.

Pro účely sběru včel byl využit jednoduchý, avšak účinný odchytový systém sestávající z plastového, bílého kanystru a uzavíratelných plastových sáčků. Spodní část kanystru byla odříznuta, aby bylo umožněno zachycení vzorku přiklopením. Na otevřeném víku kanystru byl přichycen vždy jeden plastový sáček, který sloužil již k odběru jednotlivých jedinců včel.

Samotný proces odchytu probíhal následujícím způsobem: po lokalizaci jedince byl kanystr přiložen k podkladu tak, aby včel byla uvnitř prostoru nádoby a nemohla uniknout. Včely se instinktivně pokoušely unikat směrem vzhůru, čímž samovolně vletěly do připraveného plastového sáčku. Jakmile se včela ocitla v sáčku, byl sáček uzavřen, čímž bylo zabráněné jejímu úniku. Tento postup byl opakován, dokud nebylo odchyceno požadované množství vzorků, tj. přibližně 30–40 jedinců na lokalitu.

Po ukončení odchytu byly plastové sáčky se včelami umístěny do malé přenosného mrazícího boxu, kde byly okamžitě vystaveny nízké teplotě pro minimalizaci metabolismu a zabránění degradaci vzorků. Následně byly vzorky transportovány do laboratorních podmínek, kde byly skladovány při teplotě -20 °C až do provedení analytických postupů.

Přísné dodržování standartních postupů při odchytu, transport a uchovávání vzorků bylo nezbytné pro zajištění integrity biologického materiálu a získání validních výsledků při následných chemických analýzách.

4.3 Validace metody analýzou půdy

Tato strategie byla navržena s ohledem na hypotézu, že stříbro se v prostředí vyskytuje především ve formě mikroskopických částic ryzího kovu, které jsou rozptýleny v půdě nebo ve vzdušném prachu. Tyto částice se mohou usazovat na těle včely nebo do něj pronikat prostřednictvím dýchací či ústní soustavy. Z tohoto důvodu byla při nastavování extrakční metody využita simulace přírodního prostředí pomocí standardizovaného říčního sedimentu, který díky své jemnozrnné a rovnoměrné povaze umožňuje přesné a opakovatelné vyhodnocení účinnosti extrakce. V rámci laboratorních analýz byla provedena validace metody pro stanovení obsahu stříbra v půdě. Bylo nutné ověřit, zdali použitá metoda poskytuje výsledky odpovídající referenčnímu vzorku (říční sediment – Metranal 1 – ANALYTIKA). Validace proběhla srovnáním obsahu Ag stanoveného metodami otevřeného rozkladu na topné desce (HP) a metodou mikrovlnného ohřevu (MW) v kombinaci se třemi variantami extrakčních směsí (lučavka královská, Leffortova lučavka a směs HCl a HNO_3 v poměru 1:1). Cílem bylo zjistit, která kombinace metody s extrakční směsí poskytuje nejvyšší účinnost extrakce.

4.3.1 Extrakce stříbra na topné desce

Nejprve bylo naváženo 6 půdních vzorků referenčního materiálu o hmotnosti 500 mg s přesností 0,1 mg. Vzorky referenčního materiálu byly naváženy do zkumavek o objemu 35 ml. Následně bylo do zkumavek pomocí pipety přidáno 6 ml kyselin v různém poměru:

- Do 2 vzorků byla přidána lučavka královská (kombinace kyselin HCl a HNO_3 v poměru 3:1 (4,5ml:1,5ml)).
- Do 2 vzorků byla přidána směs HCl a HNO_3 v poměru 1:1 (3ml:3ml).
- Do 2 vzorků byla přidána Leffortova lučavka (kombinace kyselin HCl a HNO_3 v poměru 1:3 (1,5ml:4,5ml)).

Zbývající 3 zkumavky byly ponechány pro každou variantu kombinace kyselin jako slepé vzorky (tzv. blanky), bez vzorku referenčního materiálu.

Obě použité chemikálie – kyselina chlorovodíková (HCl) a kyselina dusičná (HNO_3) byly ve formě vysoce čistých reagenčních látek (Analpure®, Analytika, Česká republika).

Vzorky byly následně zahřívány po dobu 2 hodin na topné desce při teplotě 95 °C, přikryté hodinovým sklíčkem pro minimalizaci odpařování a zaručení stabilní extrakce analytu. Po fázi ohřevu byly vzorky doplněny superčistou vodou (≥ 18,2 MΩ/cm; Milli-Q systém, Millipore, SAS, Francie) na objem 0,04 l a ponechány sedimentovat. Před vlastní

analýzou byly vzorky ještě ředěny v poměru 1:1 superčistou vodou na konečný objem 0,08 l. Analýza obsahu Ag v referenčním materiálu proběhla pomocí hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem ICP-MS. Tento postup zajistil spolehlivé výsledky a umožnil validaci analytické metody pro následné vzorky biologického materiálu.

4.3.2 Extrakce stříbra mikrovlnným ohřevem

Homogenizované vzorky půdy byly s přesností 0,1 mg naváženy v množství 200 mg do křemenných zkumavek o objemu 35 ml. Pro rozklad byly použity tři různé směsi minerálních kyselin v celkovém objemu 6 ml, a to:

- lučavka královská ($HCl:HNO_3$ v poměru 3:1)
- směs HCl a HNO_3 v poměru 1:1
- tzv. Leffortova lučavka ($HCl:HNO_3$ v poměru 1:3)

Obě kyseliny (chlorovodíková a dusičná) byly ve vysoké čistotě (Analpure®, Analytika, ČR). Pro každou extrakční variantu byly připraveny tři paralelní vzorky, přičemž pro směs v poměru 3:1 (lučavka královská) bylo do každého vzorku přidáno 4,5 ml HCl a 1,5 ml HNO_3. Směs v poměru 1:1 byla aplikována v objemu 3 ml + 3 ml a Leffortova směs v poměru 1:3 pak jako 1,5 ml HCl + 4,5 ml HNO_3. Každá extrakční varianta byla doplněna o tři slepé (blank) vzorky.

Po hermetickém uzavření zkumavek teflonovými víčky probíhal rozklad vzorků pomocí mikrovlnné extrakce na zařízení Discover SP-D (CEM Corp., USA) podle následujícího teplotního profilu: zahřátí na 130 °C po dobu 5 minut, následné udržení této teploty dalších 5 minut, poté zvýšení teploty na 160 °C a opětovné setrvání při této teplotě po dobu 5 minut.

Po ochlazení byly extrakty doplněny ultračistou vodou (vodivost $\geq$ 18,2 MΩ/cm; Milli-Q systém, Millipore, SAS, Francie) na finální objem 40 ml. Před samotnou ICP-MS analýzou byly roztoky ještě ředěny v poměru 1:1 s ultračistou vodou.

4.4 Validace metody analýzou včelích těl

Po validaci metody analýzou půdy byla analogickým způsobem provedena validace pro biologický materiál – vzorky včel. Hlavním cílem experimentu bylo ověřit stanovitelnost stříbra ve včelích vzorcích a zároveň provést test výtěžnosti (tzv. recovery test) jako validační krok metody. Recovery test spočíval v přidání známého množství analytu (tzv. spiking) do vzorku za účelem ověření správnosti metody.

Vzhledem k rozdílné matrici vzorku bylo nutné optimalizovat podmínky extrakce za stejných podmínek jako pro refereční materiál Metranal 01. Využity tedy byly opět dvě metody rozkladu – mikrovlnný ohřev (MW) a ohřev na topné desce (HP) v kombinaci se třemi kombinacemi kyselin HCl a HNO_3 v různých poměrech:

- Lučavka královská (HCl:HNO_3 v poměru 3:1
- Směs HCl:HNO_3 v poměru 1:1
- Leffortova lučavka (HCl:HNO_3 v poměru 1:3)

Ve fázi testu výtěžnosti nahrazovaly certifikovaný materiál přídavek standartního roztoku (spiking) Ag.

Pro tento účel byly využity včely z lokalit bez předpokládaného výskytu Ag (referenční lokality). Vzorky včel byly nejprve vysušeny pro dobu 24 hodin při teplotě 60 °C, aby se odstranila veškerá vlhkost. Vysušené včely byly následně prostřednictvím třecí misky s tloučkem mechanicky rozmělněny na jemný prášek (homogenát), čímž bylo dosaženo jednotného materiálu vhodného pro následné analytické stanovení.

Pro minimalizaci kontaminace stopovým znečištěním bylo veškeré laboratorní nádobí nejprve vloženo do loužící lázně 8% roztoku HNO_3 na dobu minimálně 12 hodin, poté několikrát vypláchnuty ultračistou Milli-Q vodou a následně vysušeny. Tento postup byl nezbytný pro odstranění případných reziduí kovových kontaminantů, které by mohly negativně ovlivnit přesnost měření.

4.4.1 Extrakce stříbra s využitím topné desky

Nejprve bylo do skleněných kádinek naváženo šest vzorků včelího homogenátu o hmotnosti 150 mg. V rámci recovery testu byly tři vzorky podrobeny procesu spikování. Spikování bylo provedeno přídavkem standartního roztoku o koncentraci 1000 µg/l Ag. Do každého vzorku bylo přidáno množství o objemu 100 µl roztoku, čímž bylo dosaženo obsahu 0,1µg Ag na jeden vzorek.

Tři vzorky s včelím homogenátem byly analyzovány bez procesu spikování (pouze s použitím kombinace kyselin HCl a HNO_3 o celkovém objemu 6 ml) v poměrech:

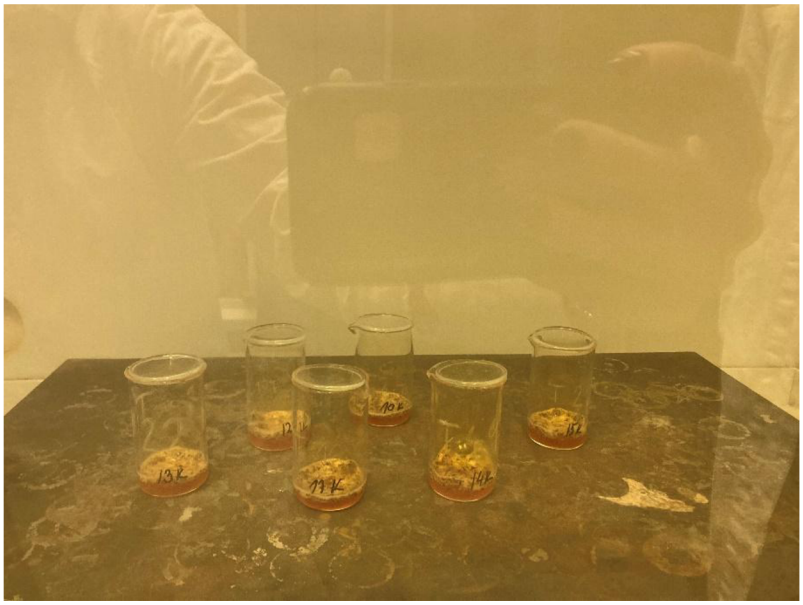
- lučavka královská (HCl:HNO_3 v poměru 3:1)
- směs HCl a HNO_3 v poměru 1:1
- tzv. Leffortova lučavka (HCl:HNO_3 v poměru 1:3)

Tento proces byl prováděn za účelem zjištění, zdali je stříbro měřitelné nad limitem detekce i ve vzorcích bez předpokládaného zvýšeného obsahu Ag. Tento přístup umožňuje

potvrdit, že analyzovaná metoda je schopná detekovat přítomnost stříbra i v případě stopových koncentrací.

Další tři vzorky byly ponechány jako kontrolní (bez včelího homogenátu). Tyto vzorky obsahovaly 9,9 ml čistého roztoku společně s 0,1 ml roztoku o koncentraci 1000 µg/l Ag, což odpovídá 100násobnému ředění standardu. Výsledné koncentrace vzorků odpovídaly koncentraci 1 µg/l Ag.

Následně byly všechny vzorky byly zahřívány na topné desce při konstantní teplotě 95°C. Kádinky byly během extrakce přikryty hodinovým sklíčkem, aby se minimalizovaly ztráty způsobené odpařováním těkavých složek. Při převedení extraktu na finální objem 25 ml byly ve všech vzorcích zaznamenány organické voskové částice, které se objevily až po ředění ultračistou Milli-Q vodou. Nejnápadnější byly tyto částice za použití lučavky královské a nejméně výrazné byly u lučavky Leffortovy. Pro jejich eliminaci byly vzorky následně ředěny v poměru 1:1 (5 ml vzorku + 5 ml Milli-Q vody) v 15ml zkumavce. Alikvot byl následně odebírán ze střední části zkumavky, čímž bylo zajištěno, že lipofilní kontaminanty, které přilnuly na stěny nádoby, nebyly přeneseny do analytického vzorku. Tímto způsobem bylo dosaženo eliminace potřeby filtrace před analýzou. Na základě těchto skutečností byla v následujících krocích upřednostněna Leffortova lučavka jako extrakční směs biologické matrice – včel.



Obrázek 8: Zahřívání vzorků biologického materiálu (včel) na topné desce

4.4.2 Extrakce stříbra mikrovlnným ohřevem

V rámci metody nízkotlakého mikrovlnného ohřevu (MW), byly pro extrakci Ag ze včelích těl optimalizovány podmínky teplotního režimu a složení extrakčního média. Nejprve byl včelí homogenát navážen v množství 120 mg do křemenných zkumavek a podroben rozkladu ve třech kombinacích poměrů kyselin HCl a HNO_3 o objemu 6 ml na vzorek:

- lučavka královská (HCl:HNO_3 v poměru 3:1)
- směs HCl a HNO_3 v poměru 1:1
- tzv. Leffortova lučavka (HCl:HNO_3 v poměru 1:3)

Pro dosažení rovnoměrného rozkladu bylo do každé zkumavky vloženo teflonové míchátko.

Tři vzorky byly podrobeny procesu spikování (přídavku) roztokem o koncentraci 1000 µg/l Ag. Do každého vzorku bylo přidáno 100 µl roztoku Ag, což odpovídá přídavku 0,1 µg Ag na vzorek.

Pro kontrolní účely byly připraveny další tři vzorky, do nichž bylo přidáno 9,9 ml základního roztoku a 0,1 ml (100 µl) roztoku obsahujícího 1000 µg/l Ag, což odpovídá ředění standardu v poměru 1:100 a přídavku 0,1 µg Ag na vzorek. Tento postup byl navržen pro ověření výtěžnosti (recovery) metody a sledování potenciálních ztrát či interferencí při různých extrakčních podmínkách.

Testovaný ohřevný program začínal zahřátím na 130 °C po dobu 5 minut, následně byla teplota udržována po stejnou dobu. Poté byla teplota zvýšena na 160 °C během 5 minut a stabilizována po dalších 5 minut. Tento přístup však vedl k výrazné ventilaci plynů, což mohlo způsobit nežádoucí změny objemu extraktu. Z tohoto důvodu byly testovány mírnější podmínky ohřevu (120 °C a 150 °C), které zajistily úplný rozklad vzorku a zároveň minimalizovaly ztráty těkavých složek.

Při převedení extraktu na finální objem 40 ml byly ve vzorcích stejně jako u metody extrakce na topné desce (HP) zaznamenán vyskyt nerozloženého organického materiálu na laboratorním nádobách. V případě HP metody však byla tato kontaminace mnohem výraznější, což naznačuje nižší účinnost rozkladu biologické matrice než u metody MW.

Ná základě tohoto zjištění byla metoda extrakce mikrovlnným ohřevem vybrána jako preferovaná metoda ke stanovení obsahu Ag ve vzorcích včel z experimentálních loklait. Zároveň byla jako extrakční směs zvolena Leffortova lučavka (popsáno v kapitole 4.4.1).

4.5 Stanovení obsahu Ag ve vzorcích včel z experimentálních lokalit

Včely byly naváženy (0,15 g) s přesností 0,1 mg do křemenných zkumavek (35 ml). Ke vzorkům byla přidána Leffortova lučavka (tj. směs 4,5 ml HNO_3 a 1,5 ml HCl) a magnetické teflonové míchadlo. Vzorky byly následně uzavřeny teflonovým víčkem a podrobeny mineralizaci v mikrovlnném rozkladném zařízení (Discover SP-D, CEM Corp., USA). Pro mineralizaci byl aplikován tento teplotní program: ohřev na 130 °C v průběhu 5 min, udržení této teploty po dobu 5 min, další ohřev na teplotu 160 °C v průběhu 5 min a udržení této teploty po dobu 5 min. Vychladlé mineralizáty včel byly naředěny ultračistou vodou Milli-Q na konečný objem 100 ml a analyzovány technikou ICP-MS.

Konfigurace ICP-MS zahrnovala autosampler SPS 4, koncentrický zmlžovač MicroMist, dvouplášťovou Scottovu mlžnou komoru, oktapólovou kolizní/reakční celu a kvadrupólový hmotnostní MS/MS analyzátor. Izotop ^{107}Ag byl měřen v reakčním režimu s O_2, přičemž se předpokládá, že Ag se kyslíkem neoxiduje, zatímco potenciálně interferující polyatomické kationty se posouvají v hmotnostním spektru o +16, případně +32 AMU. Přístroj byl kalibrován metodou externí kalibrace v rozmezí 0,002–2 µg/l Ag s využitím jednoprvkového standardu (10,00 ± 0,05 mg/l Ag, Analytika, ČR). Pro korekci vlivu matrice a driftu signálu v čase byla použita metoda interního standardu s využitím víceprvkového roztoku obsahujícího 100 µg/l Rh, In a Lu (ASTASOL-MIX, Analytika, ČR), který byl kontinuálně přiváděn do zmlžovače spolu se vzorky.

5 Výsledky

5.1 Signál analytu a potenciálních interferentů v modelové půdní matrici

Za účelem posouzení intenzity signálů analytu Ag a prekurzorů jeho potenciálních spektrálních interferentů byla provedena analýza hmotnostní spektra v rozsahu 88–130 AMU v režimech NoGas a O_2. Zvláštní pozornost byla věnována především hmotám 107 (analyt ^{107}Ag), 90 a 91 (izotopy Zr, prekurzory polyatomického kationtu $^{90}Zr^{16}O^{1}H^{+}$ a $^{91}Zr^{16}O^{+}$) a 89 (^{89}Y, prekurzor polyatomického kationtu $^{89}Y^{18}O^{+}$).

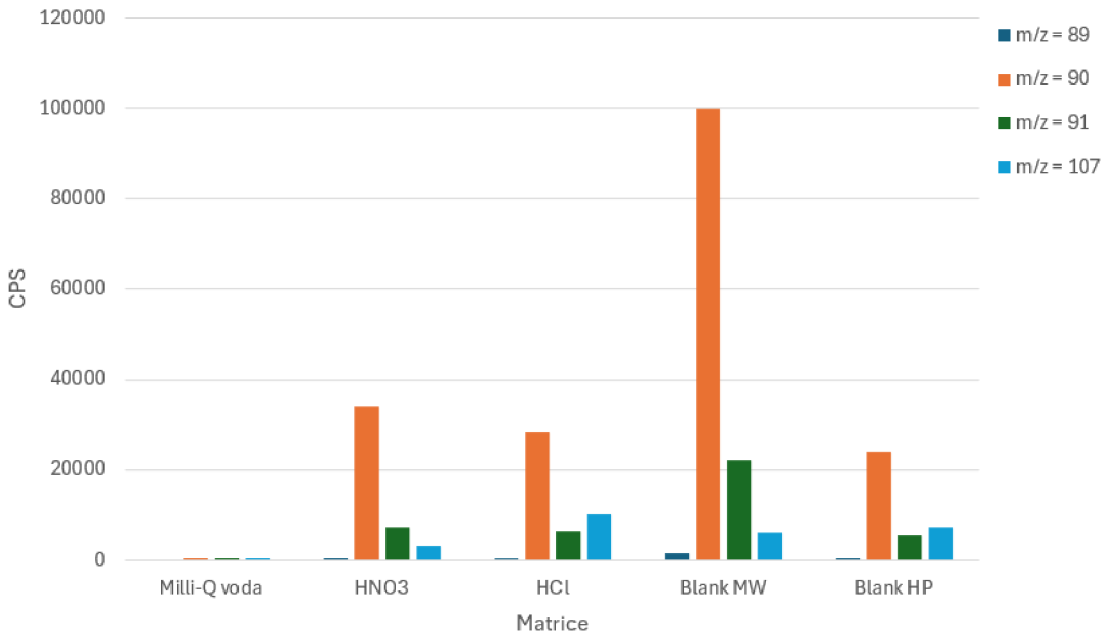
5.1.1 NoGas mód

Z výsledku získaných v režimu NoGas bylo provedeno posouzení signálu na třech vybraných hmotnostních poměrech: m/z = 107 (analyt Ag), m/z = 89 (prekurzor interferencí Y), m/z = 90, 91 (prekurzory interferencí Zr). Toto hodnocení zahrnovalo jak jednotlivá použitá činidla, tak procesní slepé vzorky (viz Graf 1). Režim NoGas byl v tomto kontextu využit k detekci přítomnosti prvků schopných vytvářet polyatomické interferenční ionty v prostředí plazmatu. Především se jedná o izotopy zirkonu (Zr) a yttria (Y). Zjištění přítomnosti v jednotlivých matricích je zásadní pro posouzení pravděpodobnosti vzniku interferencí. Tento přístup umožňuje předběžně identifikovat riziko spektrálních interferencí a informuje o nutnosti jejich eliminace při analýze reálných vzorků.

Analýza použitých čistých chemikálií ukázala zvýšenou intenzitu signálu m/z = 107 v kyselinách HNO_3 (3 042 CPS) a HCl (10 231 CPS), přičemž v použité ultračisté Milli-Q vodě byl detekovaný signál velmi nízký (23 CPS). Z těchto výsledků se lze domnívat, že hlavním zdrojem kontaminace byly použité kyseliny. Podobně byly zvýšené signály i v procedurálních slepých vzorcích (blank), připravených metodou mikrovlnného ohřevu (5888 CPS), tak metodou ohřevu na topné desce (7 243 CPS), což opět potvrzuje přítomnost Ag kontaminace v použitých kyselinách.

Co se týče potenciálních prekurzorů intereferenčních iontů, nejnižší hodnoty byly zaznamenány pro signál m/z = 89 (^{89}Y). V použitých kyselinách dosahovaly hodnoty pouze 260 CPS pro HNO_3 a 300 CPS pro HCl. V Milli-Q vodě byl signál dokonce zcela nulový (0 CPS). Procesní blanky dosahovaly hodnot 1 611 CPS (MW) a 240 CPS (HP). V případě m/z = 90 (^{90}Zr) a 91 (^{91}Zr) byly detekovány výrazně vyšší hodnoty. V HNO_3 dosahoval signál pro m/z = 90 hodnoty 33 996 CPS a pro m/z = 91 hodnoty 7 277 CPS. V HCl činily hodnoty signálu 28 449 CPS (m/z = 90) a 6 397 CPS (m/z = 91).

V Milli-Q vodě byl zaznamenán signál 23 CPS (m/z = 90) a 17 CPS (m/z = 91). Pro procedurální slepé vzorky byly tyto signály ještě výraznější. Vzorky připravené MW metodou vykazovaly hodnoty 99 964 CPS (m/z = 90) a 22 178 CPS (m/z = 91) a vzorky získané metodou HP 23 862 CPS (m/z = 90) a 5 462 CPS (m/z = 91).



Graf 1: Intenzita signálu (CPS) pro m/z = 89, 90, 91 a 107 v použitých činidlech, Milli-Q vodě a slepých vzorcích (režim NoGas)

Výsledky potvrzují přítomnost signálu jak analytu, tak prekurzorů možných interferencí ve všech sledovaných matricích, přičemž signály byly nejvyšší v čistých kyselinách a procedurálních slepých vzorcích. Tato data tvoří důležitý základ pro následné vyhodnocení přínosu reakčního režimu s kyslíkem při odstranění interferencí, které bude diskutováno v další části práce.

Pro zhodnocení vlivu různých extrakčních metod na intenzitu signálu stříbra (m/z = 107) a jeho možných prekurzorů interferentů (m/z = 89, 90 a 91) byla provedena analýza extraktů referenční půdní matrice (CRM) Metranal 01 extrahovaných jak mikrovlnnou (MW), tak klasickou extrakcí na topné desce (HP), přičemž byly využity tři různé kombinace extrakčních činidel: lučavka královská (AR), směs HCl:HNO_3 v poměru 1:1 a Leffortova lučavka (viz Graf 2).

V případě mikrovlnné extrakce (viz Tabulka 2) byly intenzity signálů stříbra (m/z = 107) ve všech třech variantách velmi podobné, pohybující se v rozmezí 532 894 – 548 184 CPS. Tyto hodnoty vykazují maximální rozdíly <5 %, což svědčí o podobné

účinnosti extrakce Ag z půdní matrice pomocí MW rozkladu. Naproti tomu signály interferenčních izotopů vykazovaly značné rozdíly a ve všech případech byly nejnižší hodnoty signálu zaznamenány v případě využití extrakční směsi HCl:HNO_3 (1:1). Pro izotop ^{89}Y činila nejvyšší hodnota detekována pomocí lučavky královské 4 491 305 CPS a následně byly naměřeny hodnoty o 7,2 % (Leffortova lučavka) a 17,4 % nižší (směs HCl:HNO_3 (1:1)). Pro izotop ^{90}Zr činila nejvyšší detekovaná hodnota 1 630 354 CPS pro Leffortovu lučavku a následné hodnoty vykazovaly pokles o 19,3 % (lučavka královská) a 28,4 % (směs HCl:HNO_3 (1:1)). Největší rozptyl hodnot byl zaznamenán pro izotop ^{91}Zr. Oproti nejvyšší hodnotě 584 971 CPS získané extrakcí Leffortovou lučavkou činily rozdíly 8,7% pokles v případě lučavky královské a nejnižší hodnota se lišila dokonce o 27,5 % (směs HCl:HNO_3 (1:1)). Tyto výsledky naznačují důležitost výběru kyselinového systému kvůli vyhlídkám na vznik interferujících iontů.

Tabulka 2: Intenzity signálu (CPS) m/z = 89, 90, 91 a 107 ve výluhu z referenčního půdního materiálu Metranal 01 získané metodou MW (režim NoGas)

Metoda MW (NoGas režim)	Exktrakční směs		
Izotop	Lučavka královská	HCl:HNO_3 (1:1)	Leffortova lučavka
	(CPS)	(CPS)	(CPS)
^{107}Ag	548 184	546 386	532 894
^{89}Y	4 491 305	3 709 971	4 166 996
^{90}Zr	1 366 193	1 167 969	1 630 254
^{91}Zr	501 381	423 848	584 971

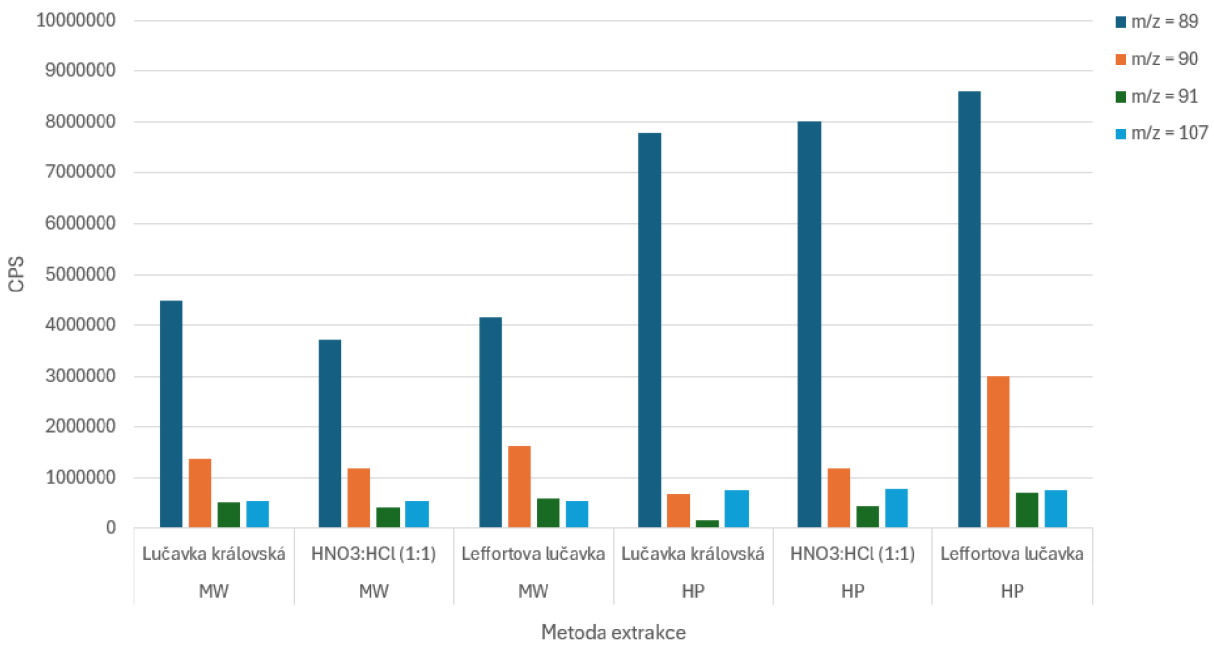
V případě extrakcí na topné desce (HP) (viz Tabulka 3) byly hodnoty pro poměr m/z =107 analytu ^{107}Ag rovněž konzistentní. Rozdíly zde činily <3 %, což svědčí o stabilní extrakční účinnosti napříč testovanými médii.

Naopak hodnoty interferenčních signálů byly opět výrazně variabilní, zejména pro izotopy ^{90}Zr a ^{91}Zr. V obou případech činily rozdíly mezi nejvyšší hodnotou (2 994 422 CPS pro ^{90}Zr a 699 780 pro ^{91}Zr) a nejnižší hodnotou (688 500 CPS pro ^{91}Zr a 160 885 CPS pro ^{91}Zr) 77,1 %. Izotop 89Y již vykazoval o něco stabilnější výsledky. Nejvyšší intenzita signálu (8 595 129 CPS) byla zaznamenána u Leffortovy lučavky. Při extrakci směsí HCl:HNO_3 (1:1) byl zaznamenán pokles o 7 % a při extrakci lučavkou královskou pokles

o 9,5 %. Pro izotopy ^{90}Zr a ^{91}Zr je viditelný trend v poklesu intenzity signálu ve směru: Leffortova lučavka > směs $HCl:HNO_3$ > lučavka královská a pro izotop ^{89}Y naopak ve směru: lučavka královská > směs $HCl:HNO_3$ (1:1) > Leffortova lučavka.

Tabulka 3: Intenzity signálu (CPS) m/z = 89, 90, 91 a 107 ve výluhu z referenčního půdního materiálu Metranal 01 získané metodou HP (režim NoGas)

Metoda HP (NoGas režim)	Exktrakční směs		
Izotop	Lučavka královská	$HCl:HNO_3$ (1:1)	Leffortova lučavka
	(CPS)	(CPS)	(CPS)
^{107}Ag	768 611	781 217	761 848
^{89}Y	7 779 806	7 999 068	8 595 129
^{90}Zr	688 500	1 175 353	2 994 422
^{91}Zr	160 885	427 589	699 780



Graf 2: Intenzita signálu (CPS) pro m/z = 89, 90, 91 a 107 v referenčním půdním materiálu Metranal 01 získané metodami MW a HP (režimu NoGas)

Tyto výsledky potvrzují, že i při relativně konzistentním signálu analytu může docházet ke značným rozdílům v intenzitě signálu prekurzorů spektrálních interferencí v závislosti na

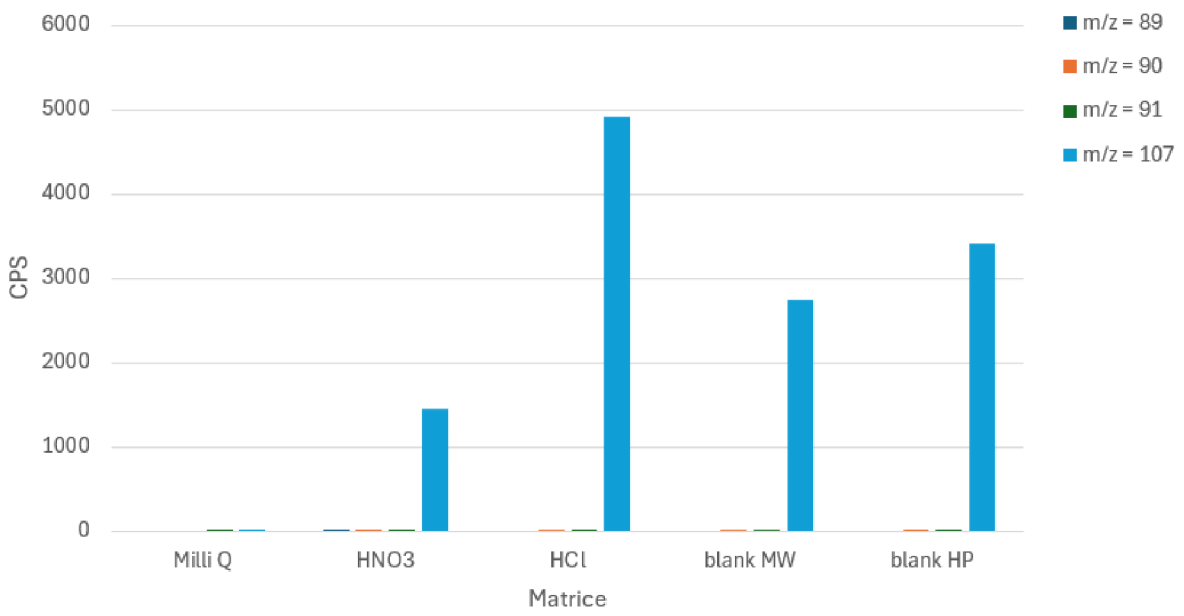
zvolené extrakční metodě a složení činidla. Tento fakt bude mít význam zejména při posuzování spektrální interference a při volbě vhodného režimu ICP-MS v následné části výzkumu zaměřené na reálné environmentální vzorky.

5.1.2 Reakční režim s kyslíkem

Za účelem monitorování signálů analytu ^{107}Ag a potenciálních interferentů (viz 5.1.1) byla v režimu O_2 opět provedena analýza hmotnostních poměrů m/z = 107 (analyt Ag), m/z = 89 (Y) a m/z = 90 a 91 (izotopy Zr) ve vzorcích použitých činidel tak v procesních slepých vzorcích (viz Graf 3) Cílem těchto měření bylo zhodnotit skutečné pozadí metody a posoudit možnou kontaminaci pocházející z použitých chemikálií či laboratorního prostředí.

V případě analytu stříbra m/z =107 byla nejnižší intenzita detekována v ultračisté Milli-Q vodě (13 CPS). Chemikálie analyzované bez ohřevu prokázaly zvýšené hodnoty, 1 444 CPS pro HNO_3 a 4 906 CPS pro HCl. Hodnoty slepých vzorků získané na základě metod MW a HP byly taktéž poměrně vysoké (2 739 CPS, resp. 3 418 CPS).

V případě možných prekurzorů spektrálních interferentů, pro všechny izotopy byly hodnoty velmi nízké, přičemž izotop ^{89}Y zaznamenal signál pouze u HNO_3 (3 CPS), pro ostatní vzorky nebyl signál detekován. Nulový signál pro izotop ^{90}Zr byl zaznamenán pouze v případě Milli-Q vody. Pro HNO_3 a procesní blank (HP) byly naměřeny hodnoty 10 CPS a pro HCl a procesní blank (HCl) hodnoty 23 CPS. Izotop ^{91}Zr vykazoval hodnoty v rozmezí 3 CPS pro HNO_3 až 23 CPS pro procesní blank (MW). V Milli-Q vodě byl pro tento izotop (^{91}Zr) detekován signál 7 CPS.



Graf 3: Intenzita signálu (CPS) pro m/z = 89, 90, 91 a 107 v použitých činidlech a slepých vzorcích (reakční režim s O_2)

Z výsledných dat lze poukázat na významnou redukci signálů potenciálních prekurzorů spektrálních interferencí ve slepých vzorcích a neexistence významných známek kontaminace na analyzovaných hmotnostních poměrech.

Také v případě reakčního režimu s O_2 byla pro zhodnocení vlivu různých extrakčních metod na intenzitu signálu analytu stříbra v přírodní matrici rovněž provedena analýza referenčního půdního materiálu (CRM) Metranal 01. Byly sledovány intenzity signálu analytu ^{107}Ag na hmotnostním poměru m/z = 107 a intenzity signálů možných prekurzorů interferenčních iontů ^{89}Y, ^{90}Zr a ^{91}Zr na hmotnostních poměrech m/z = 89, 90 a 9. Opět byly využity extrakční metody mikrovlnného ohřevu (MW) a ohřevu na topné desce (HP) v kombinaci se třemi extrakčními činidly: lučavka královská (AR), směs $HCl:HNO_3$ v poměru 1:1 a Leffortova lučavka (viz Graf 4).

Pro metodu MW (viz Tabulka 4) se signál stříbra (^{107}Ag) ve všech variantách pohyboval v rozmezí 246 287–262 213 CPS, přičemž nejvyšší hodnota byla zaznamenána u směsi $HCl:HNO_3$ (1:1). Rozdíly mezi jednotlivými směsmi nepřekročily 6,5 %, což potvrzuje dobrou stabilitu signálu analytu v případě metody MW v kyslíkovém režimu, a především porovnatelnost extrakční účinnosti.

Co se týče signálu potenciálních prekurzorů interferentů, nejvyšší intenzity signálů byly ve všech případech naměřeny pro lučavku královskou. Nejstabilnější výsledky byly zaznamenány u izotopu ^{89}Y. Nejvyšší hodnota (6 847 CPS) byla zaznamenána za použití

lučavky královské. Leffortova lučavka poskytla o 7,1 % nižší hodnoty a u směsi $HCl:HNO_3$ (1:1) byl zaznamenán pokles o 10,4 %. Pro izotop ^{90}Zr byly detekovány hodnoty v rozmezí 545-672 CPS, přičemž oproti nejvyšší hodnotě získané opět u lučavky královské (672 CPS) činil pokles 5,5 % pro Leffortovu lučavku a 18,9 % pro směs $HCl:HNO_3$ (1:1). Nejvyšší rozptyl výsledku byl zaznamenán pro izotop ^{91}Zr, kdy rozdíl mezi nejvyšší (3 205 CPS) a nejnižší (1 508 CPS) hodnotou činil 53 %. U tohoto izotopu navíc byl zaznamenán pokles inzenzity signálu v pořadí: lučavka královská > směs $HCl:HNO_3$ (1:1) > Leffortova lučavka což naznačuje provázanost míry extrakce s množstvím HCl v extrakční směsi.

Tabulka 4: Intenzity signálu (CPS) m/z = 89, 90, 91 a 107 v referenčním půdním materiálu Metranal 01 získané metodou MW (reakční režim s O_2)

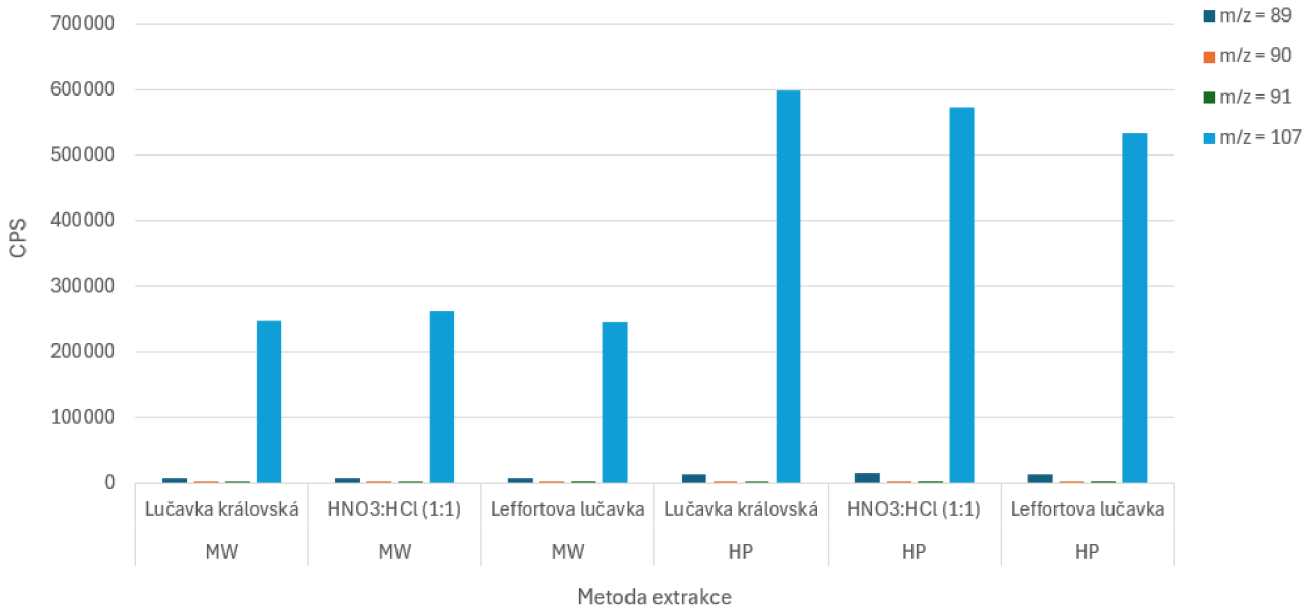
Metoda MW (reakční režim s O_2)	Exktrakční směs		
Izotop	Lučavka královská	$HCl:HNO_3$ (1:1)	Leffortova lučavka
	(CPS)	(CPS)	(CPS)
^{107}Ag	248 359	262 213	246 287
^{89}Y	6 847	6 135	6 358
^{90}Zr	672	545	635
^{91}Zr	3 205	2 443	1 508

V případě metody ohřevu na topné desce (HP) (viz Tabulka 5) byl nejvyšší signál (599 972 CPS) analytu ^{107}Ag detekován při využití lučavky královské. Pro směs $HCl:HNO_3$ (1:1) byl zaznamenán pokles o 4,8 %. V případě Leffortovy lučavky činil signál 533 975 CPS což značí pokles o 11 %.

Pro potenciální prekurzory interferentů ^{89}Y a ^{91}Zr byl zaznamenán trend v poklesu signálu dle využitého extrakčního činidla následovně: lučavka královská > směs $HCl:HNO_3$ (1:1) > Leffortova lučavka, což naznačuje přímou souvislost s množstvím HCl v použité směsi a účinnosti extrakce. Pro izotop ^{90}Zr je trend opačný, intenzita signálu klesá v pořadí: Leffortova lučavka > směs $HCl:HNO_3$ (1:1) > lučavka královská. Co se týče rozdílů mezi jednotlivými hodnotami, největší rozptyl byl zaznamenán u izotopu ^{90}Zr, kde rozdíly oproti nejvyšší hodnotě získané Leffortovou lučavkou (1 225 CPS) činily 62,5 % (směs $HCl:HNO_3$ (1:1)) a 72 % (lučavka královská). Nejmenší rozptyl byl detekován pro izotop ^{89}Y, kdy intenzity signálu klesly nanejvýš o 9,1 %.

Tabulka 5: Intenzity signálu (CPS) m/z = 89, 90, 91 a 107 v referenčním půdním materiálu Metranal 01 získané metodou HP (reakční režim s O_2)

Metoda HP (reakční režim s O_2)	Exktrakční směs		
Izotop	Lučavka královská	$HCl:HNO_3$ (1:1)	Leffortova lučavka
	(CPS)	(CPS)	(CPS)
^{107}Ag	599 972	571 475	533 975
^{89}Y	13 407	13 854	12 547
^{90}Zr	343	459	1 225
^{91}Zr	3 385	2 023	1 411



Graf 4: Intenzita signálu (CPS) pro m/z = 89, 90, 91 a 107 ve výluhu z referenčního půdního materiálu Metranal 01 získané metodami MW a HP (reakční režim s O2)

Získané výsledky odhalují nejen variabilitu v efektivitě jednotlivých extrakčních směsí, ale rovněž jejich rozdílný vliv na výsledný signál analytu, a to ve vztahu k potenciálním spektrálním interferencím. Různé kombinace kyselin a extrakčních metod uvolňují z půdní matrice rozdílná množství doprovodných prvků, včetně prekurzorů interferenčních iontů

(Zr, Y). Míra extrakce těchto interferujících složek tak přímo souvisí s mírou pravděpodobnosti vzniku polyatomických iontů na hmotnostním spektru m/z = 107, což může negativně ovlivnit stanovení stříbra (Ag).

Klíčovým poznatkem je, že samotná činidla nepředstavují přímý zdroj spektrálních interferencí. Jejich schopnost uvolňovat rušivé prvky z pevné matrice však může být problematická, neboť v argonovém plazmatu mohou tyto prvky vstupovat do reakcí vedoucích k tvorbě iontů, které spektrálně interferují s cílovými analyty.

Měření v kyslíkovém režimu přináší analytický přínos zejména díky možnosti cílené eliminace vybraných spektrálních interferencí prostřednictvím řízených chemických reakcí, což vede ke zlepšení kvality signálu na m/z = 107. V analyzovaných vzorcích půdní matrice bylo pozorováno snížení signálů rušivých izotopů, což usnadnilo detekci stříbra (Ag) s menším vlivem spektrálního pozadí. Je však třeba zdůraznit, že nižší interferenční signály v O_2 režimu jsou očekávaným důsledkem samotného principu této techniky a samy o sobě nepředstavují jednoznačný důkaz o selektivitě. Přesto výsledky naznačují, že vhodná kombinace extrakčního postupu a kyslíkového režimu ICP-MS může přispět ke zlepšení spolehlivosti stanovení

5.2 Stanovení Ag v referenčním půdním materiálu

Na základě získaných intenzit signálu (CPS) bylo množství ^{107}Ag interpretováno v koncentračních jednotkách µg/l. Dále byla výsledná data přepočtena na mg/kg Ag v půdní matrici. Výpočty byly provedeny s ohledem na rozdílné navážky a ředění vzorků. Tímto způsobem bylo možné provést validní srovnání mezi extrakčními metodami – extrakce na topné desce (HP) a mikrovlnná extrakce (MW) z hlediska jejich schopnosti uvolnit stříbro z půdní matrice a v závislosti ke zvoleným extrakčním činidlům (lučavka královská, směs $HCl:HNO_3$ a Leffortova lučavka). Pro ověření správnosti stanovení byla provedena validace na základě certifikovaného referenčního materiálu Metranal 01 – říční sediment (Analytika s.r.o.). Tento materiál má deklarovaný obsah stříbra 2,50 mg/kg ± 0,32 mg/kg. Při práci s referenčním materiálem bylo nutné věnovat pozornost interpretaci hodnot, protože jeden ze sloupců tabulkových dat uváděl hodnoty získané za použití totálního rozkladu kyselinou fluorovodíkovou (HF). V našem případě byla použita kombinace kyseliny chlorovodíkové (HCl) a kyseliny dusičné (HNO_3).

Dle následujícího vzorce byl vypočten průměrný obsah Ag v referenčním půdním materiálu (Metranal 01):

$$Obsah\ Ag\ \left(\frac{mg}{kg}\right) = \frac{c(\frac{\mu g}{l})\cdot \mathrm{Vfinal(l)}}{m(g)}$$

c (µg/l) – koncentrace Ag získaná metodou ICP-MS

V_{final} (l) – finální objem ředění vzorku

m (g) – navážka vzorku

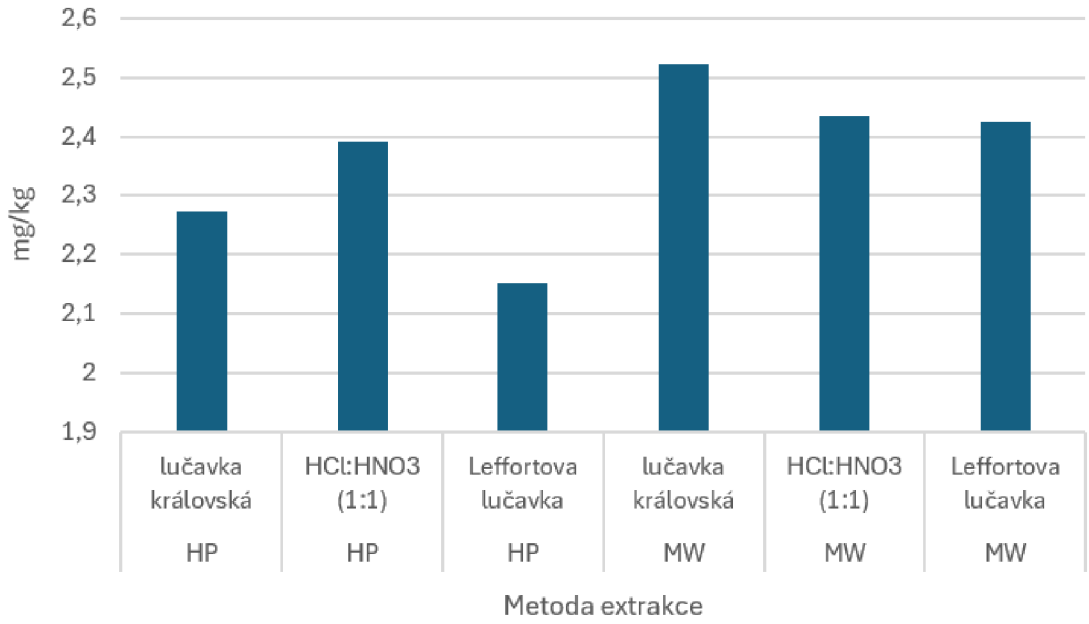
Pro metodu MW bylo uvažováno finální ředění vzorku 0,08 l a navážka činila 0,2 g půdní matrice. Pro metodu HP bylo uvažováno finální ředění 0,08 l a navážka o hmotnosti 0,5 g půdního materiálu.

Tabulka 6: Stanovené obsahy Ag v certifikovaném materiálu říčního sedimentu dle jednotlivých metod extrakce (reakční režim s O2) v porovnání s certifikovaným materiálem říčního sedimentu Metranal 01

Exktrakční metoda	Extrakční směs	Obsah Ag (mg/kg)	Výtěžnost (%)
HP	Lučavka královská	2,272	90,9
	$HCl:HNO_3$ (1:1)	2,39	95,6
	Leffortova lučavka	2,153	86,1
MW	Lučavka královská	2,523	100,9
	$HCl:HNO_3$ (1:1)	2,436	97,4
	Leffortova lučavka	2,424	96,9

Metoda extrakce mikrovlnným ohřevem (MW) vykázala poměrně stabilní výsledky. Koncentrace Ag se pohybovaly v rozmezí 2,424 – 2, 523 mg/kg, přičemž nejvyšší výtěžnost byla zaznamenána při využití lučavky královské (2,523 mg/kg). Směs $HCl:HNO_3$ (1:1) poskytla výtěžnost 2,436 mg/kg a Leffortova lučavka 2,424 mg/kg Ag.

Metoda extrakce na topné desce naopak poskytla o něco variabilnější hodnoty. Pro všechny extrakční činidla byly naměřeny nižší koncentrace Ag než u metody mikrovlnného ohřevu (MW). Pro Leffortovu lučavku byla opět naměřena nejnižší výtěžnost (2,153 mg/kg). Nejvyšší výtěžnost však v tomto případě poskytla směs $HCl:HNO_3$ (1:1) (2,39 mg/kg).



Graf 5: Stanovené obsahy Ag v certifikovaném materiálu říčního sedimentu dle jednotlivcích metod extrakce (reakční režim s O2)

Tabulka 6 a Graf 5 poskytují přehled stanovených koncentrací Ag v referenčním půdním vzorku. Z výsledků vyplývá, že metoda mikrovlnného rozkladu (MW) vykazovala mírně vyšší množství extrahovaného analytu a také relativně stabilní koncentrace Ag napříč všemi extrakčními činidly (2,424 – 2, 523 mg/kg). Metoda extrakce na topné desce (HP) vykazovala méně efektivní výtěžnost a zároveň menší konzistenci mezi jednotlivými extrakčními činidly v rozmezí 2,153 – 2,390 mg/kg. Tato data potvrzují, že metoda MW poskytne lepší výtěžnost i konzistentnější výsledky pro stanovení stopových koncentrací Ag v certifikovaném materiálu – říční sediment (Metranal 01).

Z uvedených výsledků lze vyvodit, že metoda mikrovlnného rozkladu (MW) prokázala vyšší efektivitu při extrakci stříbra z půdního vzorku v porovnání s metodou ohřevu na topné desce (HP). Výsledky získané metodou MW vykazují vyšší koncentrace Ag, což naznačuje účinnější rozklad půdní matrice a lepší uvolnění stříbra do roztoku.

Pro všechny kombinace kyselin vykazovaly naměřené hodnoty velmi dobrou shodu s hodnotou referenčního materiálu (2,50 mg/kg ± 0,32 mg/kg). Nejvyšší obsah Ag (2,523 mg/kg) by stanoven při použití lučavky královské (AR).

Metoda ohřevu na topné desce (HP) poskytla mírně nižší hodnoty oproti metodě mikrovlnného rozkladu. Výsledné hodnoty jsou však stále ve souladu s nejistotou uvedenou pro obsah Ag v certifikovaném materiálu, přičemž největší obsah Ag byl zaznamenán pomocí kombinace kyselin HCl a HNO_3 v poměru 1:1.

Na základě těchto zjištění lze konstatovat, že metoda mikrovlnného rozkladu v kombinaci s lučavkou královskou poskytuje nejefektivnější stanovení stříbra v certifikovaném materiálu – říční sediment Metranal 01.

5.3 Stanovení obsahu Ag v modelových vzorcích včel

Pro stanovení Ag ve včelím homogenátu bylo potřeba validovat metodu a optimalizovat postup rozkladu biologické matrice. Byla hodnocena účinnost rozkladu pomocí dvou metod – mikrovlnný ohřev (MW) a klasický ohřev na topné desce (HP). Cílem tohoto kroku bylo ověřit přítomnost Ag v původních (neobohacených) včelích vzorcích a posoudit validitu použité metody pomocí testu výtěžnosti (tzv. recovery test) ze vzorků obohacených o známé množství analytu (Ag) (tzv. spiking).

V rámci validace metod pro stanovení Ag ve včelím homogenátu byl vypočítán limit detekce (LOD) analytických metod MW a HP dle následujícího vzorce:

$$LOD = \frac{LODi(\frac{\mu g}{l}) \cdot V(l)}{m(g)}$$

LOD_i (µg/l) – instrumentální limit detekce
V (l) – finální objem ředění vzorku
m (g) – navážka vzorku

Pro výpočet byl uvažován instrumentální detekční limit přístroje ICP-MS (LOD_i = 0,0008 µg/l). Pro metodu MW bylo počítáno s finálním objemem ředění vzorku 0,08 l a navážkou 0,125 g. Pro metodu HP bylo uvažováno finální ředění o objemu 0,025 l a navážka o hmotnosti 0,15 g. Výsledné hodnoty detekčního limitu metody činily 0,00051 µg/g (MW) a 0,00013 (HP) (viz Tabulka 7).

Tabulka 7: Stanovení LOD metod MW a HP

Metoda	MW	HP
Finální objem ředění (l)	0,08	0,025
Hmotnost vzorku (g)	0,125	0,15
LOD_i (µg/l)	0,0008	0,0008
LOD metody (µg/g)	0,00051	0,00013

Dle těchto výsledků vyplývá, že metoda HP poskytuje nižší detekční limit v porovnání s metodou HW. To znamená, že metoda HP je schopná detekovat nižší koncentrace analytu ve vzorku.

Výsledky analýz ukázaly neočekávaně vysoké koncentrace Ag ve vzorcích, které nebyly v souladu s předpokládanými hodnotami pro referenční vzorky. Tento nález nasvědčoval možné kontaminaci během přípravy vzorku. V úvodní fázi experimentu byly vzorky včel homogenizovány pomocí porcelánové třecí misky s tloučkem, což mělo za cíl zajistit rovnoměrné rozložení biologického materiálu a usnadnit následný rozklad. V průběhu experimetnu však vzniklo podezření na možné zavlečení kontaminantu během procesu homogenizace, konkrétně v důsledku abraze porcelánu při mechanickém tření. Technický porcelán je běžně vyráběn s příměsí ZrO_2, jehož podíl může činit 10-15% hmotnosti porcelánu. prvotní podezření padlo právě na abrazi porcelánu během intenzívního tření při homogenizaci včel. Je všeobecně známo, že technický porcelán obsahu vysoký podíl zirkonu ve formě ZrO_2 (až 10–15 % hmotnosti porcelánu). Kontrolní měření v mineralizátech homogenátů potvrdila tuto domněnku. V režimu skenů byl potvrzen výskyt extrémně silných signálů jednotlivých izotopů Zr. Velmi vysoké koncentrace Zr v mineralizátech zřejmě způsobily velmi intenzivní spektrální interference na m/z = 107, které nebylo možné efektivně odstranit s pomocí měření v O_2 režimu. Následně se při stanovení obsahu Ag v homogenátech projevilo závažné nadhodnocení obsahu skutečného obsahu Ag. Zároveň byla také zaznamenána poměrně vysoká variabilita výsledků mezi jednotlivými vzorky v rámci jednoho analytického postupu. Vysledovaná variabilita koncentrací stříbra v jednotlivých replikách může být také částečně přičítána heterogenitě analyzovaného materiálu. Přestože byl včelí vzorek před extrakcí rozmělněn na jemný homogenát, při manuálním dávkování do kádinek nebylo možné zajistit absolutní rovnoměrnost v zastoupení anatomických částí včel

v jednotlivých vzorcích. Vzhledem k rozdílnému obsahu stopových prvků v různých tkáních (např. končetiny, hlava, zadeček) je pravděpodobné, že v některých replikách převažovaly části s vyšší akumulací stříbra, zatímco v jiných byly zastoupeny převážně tkáně s nižším obsahem tohoto prvku. Tato mikroskopická nehomogenita tak mohla přispět k mírné variabilitě zjištěných výsledků.

Na základě těchto poznatků bylo přistoupeno k revizi pracovního postupu. Pro zajištění integrity dat a eliminaci vnějších zdrojů kontaminace byla proto v následující fázi experimentu zvolena alternativní strategie zpracování vzorků. Včely byly ponechány v celistvém stavu a podrobeny přímému rozkladu bez předchozí mechanické homogenizace. Tato úprava metodiky vedla k výraznému snížení pozadí a zajištění vyšší věrohodnosti výsledků v oblasti stanovení nízkých koncentrací stříbra v biologické matrici.

Jako nejúčinnější extrakční činidlo v úvodní fázi optimalizace metodiky pro stanovení stříbra vyhodnocena lučavka královská. Tato směs vykazovala velmi dobré výsledky z hlediska extrakční výtěžnosti. Následná detailní analýza však odhalila, že pro rozklad biologické matrice, konkrétně včelího tkáňového homogenátu, není tato směs zcela vhodná. Při jejím použití docházelo k neúplnému rozkladu organické složky, což mohlo vést k přetrvávání reziduálního biologického materiál, a tím k menší extrakční účinnosti a také nutnosti vzorky před vstupem do přístroje ICP-MS filtrovat z důvodu zamezení vstupu suspendovaných částic do zmlžovače (viz kapitola 4.4.1)

S ohledem na tato zjištění byla pro navazující experimenty, zaměřené na stanovení stříbra ve vzorcích včel ze stříbronosných lokalit, použita Leffortova lučavka. Díky vyššímu poměru kyseliny dusičné (HNO_3) vykazuje tato směs vyšší oxidační schopnost, což umožnilo dosažení úplnějšího rozkladu organické matrice. Kromě toho byla Leffortova lučavka ověřena také při práci s certifikovaným referenčním materiálem Metranal 01, kde při mikrovlnné extrakci vykázala výtěžnost 2,424 mg/kg Ag, což odpovídá 96,9 % (viz Tabulka 7) vzhledem k certifikované hodnotě 2,50 ± 0,32 mg/kg. Tato hodnota je srovnatelná s výtěžnostmi dosaženými při použití lučavky královské (2,523 mg/kg Ag) a potvrzuje, že Leffortova lučavka je nejen chemicky účinnější pro rozklad biologické matrice (včely), ale zároveň zajišťuje dostatečně efektivní extrakci analytu.

Na základě těchto výsledků byla jako optimální kombinace zvolen rozklad pomocí mikrovlnného ohřevu s použitím Leffortovy lučavky, která zajistila spolehlivý a reprodukovatelný rozklad včelí matrice.

Tabulka 8: stanovený obsah Ag (µg/g) ve včelím homogenátu

Typ vzorku	Obsah Ag (µg/g)	Průměrný obsah Ag (µg/g)	± směrodatná odchylka
včelí homogenát MW	3,436	6,182	2,687
	6,306		
	8,805		
včelí homogenát MW (spike)	8,969	10,331	1,798
	9,655		
	12,369		
včelí homogenát HP	0,175	2,134	1,704
	3,278		
	2,948		
včelí homogenát HP (spike)	2,072	4,273	1,919
	5,160		
	5,588		

Očekávaný obsah Ag při 100% výtěžnosti spiku byla pro MW metodu 0,8 µg/g a pro HP metodu 0,67 µg/g Ag

V rámci testu výtěžnosti pro ověření účinnosti extrakčních metod byly analýze podrobeny také vzorky včelího homogenátu obohacené (spikované) známým množstvím stříbra (0,1 µg). Nicméně výsledky tohoto validačního kroku nelze považovat za reprezentativní, neboť došlo k významnému ovlivnění výtěžnosti v důsledku kontaminace ZrO_2 pocházející z porcelánové třecí misky použité během homogenizace vzorků. Interpretace výsledků testu výtěžnosti tak nevede k relativním závěrům.

5.4 Stanovení obsahu Ag ve vzorcích včel z experimentálních lokalit

V závěrečné fázi experimentu bylo cílem stanovit koncentraci Ag ve včelích tělech, přičemž byly analyzovány vzorky včel pocházejících z lokalit, kde je předpokládaný geologický výskyt stříbra (Hluboš, Krsov, Jáchymov a Trhové Dušníky) a z referenčních lokalit (Louny, Sudovo Hlavno, Libčice nad Vltavou a Šlovice), kde se výskyt stříbra nepředpokládá. Tato analýza měla za cíl nejen ověřit přítomnost stříbra ve včelí tkáni či na jejím povrchu, ale také zhodnotit případné rozdíly v obsahu tohoto kovu mezi jednotlivými lokalitami.

Pro přípravu vzorků byl zvolen optimalizovaný rozkladový postup zahrnující mikrovlnnou extrakci v kombinaci s Leffortovou lučavkou ($HCl:HNO_3$ v poměru 1:3). Tato metoda byla v předchozích fázích výzkumu vyhodnocena jako nejvhodnější s ohledem na účinnost rozkladu organické matrice i výtěžnost analytu. Vzorky byly připraveny

a analyzovány metodou ICP-MS v O_2 módu, čímž bylo dosaženo vysoké přesnosti stanovení díky eliminaci spektrálních interferencí způsobených přítomností prvků, jako je Zr a Y.

Naměřené koncentrace stříbra byly vyjádřeny v jednotkách µg/l, následně byly dle předepsané metodiky přepočteny na µg/g vztažené k hmotnosti navážky včel a k finálnímu objemu výluhu (100 ml). Přepočet byl proveden dle vzorce:

$$Obsah\ Ag\ \left(\frac{\mu g}{g}\right) = \frac{c\left(\frac{\mu g}{l}\right) \cdot \mathrm{Vfinal(l)}}{m(g)}$$

c (µg/l) – koncentrace Ag získaná metodou ICP-MS

V_{final} (l) – finální objem ředění vzorku

m (g) – navážka vzorku

Téměř všechny vzorky z referenčních lokalit (viz Tabulka 9) vykazovaly hodnoty pod detekčním limitem přístroje ICP-MS (0,002 µg/l). Pro výpočty byly tyto hodnoty uvažovány jako detekční limit metody (0,0014 µg/g). Nejvyšší hodnota byla naměřená na lokalitě Šlovice, kde byl zjištěn obsah Ag ve vzorcích průměrně 0,0026 µg/g ± 0,0017 µg/g, přičemž nejvyšší naměřený obsah zde dosahoval hodnoty 0,0045 µg/g. V lokalitách Libčice nad Vltavou, Sudovo Hlavno i Louny byly zaznamenány obsahy Ag pod limitem metody (<0,0014 µg/g).

Tabulka 9: Stanovený obsah Ag ve včelích vzorcích z referenčních lokalit

Lokalita	Pruměrný obsah Ag (µg/g)	± Směrodatná odchylka SD (µg/g)
Šlovice	0,0026	0,0017
Louny	<0,0014	
Sudovo Hlavno	<0,0014	
Libčice nad Vltvou	<0,0014	

Naměřené hodnoty ve včelách ze stříbronosných lokalit (viz Tabulka 10) přesvědčivě přesáhly stanovený detekční limit metody (LOD = 0,0014 µg/g) a prokázaly tak schopnost navržené metodiky identifikovat stříbro ve včelách i při nízkých koncentracích. Nejvyšší

obsah Ag byla zaznamenána ve vzorcích z lokality Jáchymov. Průměrně zde bylo naměřeno 0,0168 ± 0,0145 µg/g Ag), což odpovídá téměř čtyřnásobku hodnoty zaznamenané v nejzatíženější referenční lokalitě. Mezi jednotlivými vzorky z této lokality však byla zjištěna velká variabilita. Směrodatná odchylka zde byla vypočítána na ± 0,0145 µg/g Ag s tím, že rozsahy hodnot se pohybují v rozmezí 0,0038 – 0,0326 µg/g. Tato skutečnost mohla být způsobena nerovnoměrným výskytem Ag spjatým s historickou těžbou Ag či tzv. nugget efektem, což je nerovnoměrně rozložení cílového prvku (Ag) ve vzorku – v jednom vzorku mohlo být zastoupeny včely s větším obsahem Ag než ve vzorku druhém. Naopak nejnižší obsah Ag byl nalezen v obci Hluboš na Příbramsku (0,0081 ± 0,0021 µg/g). Zbylé dvě stříbronosné lokality o oblasti Příbramska (Krsov a Trhové Dušníky) vykazovaly velmi podobný obsah Ag (0,0109 ± 0,0022 µg/g, resp. 0,0104 ± 0,0056 µg/g).

Tabulka 10: Stanovený obsah Ag ve včelích vzorcích ze stříbronosných lokalit

Lokalita	Pruměrný obsah Ag (µg/g)	± Směrodatná odchylka SD (µg/g)
Hluboš	0,0081	0,0021
Krsov	0,0109	0,0022
Jáchymov	0,0168	0,0146
Trhové Dušníky	0,0104	0,0056

Tyto poznatky potvrzují potenciál využití včel jako biomonitorů přítomnosti stříbra v prostředí, a to jak z hlediska environmentálního monitoringu, tak i v oblasti geochemického průzkumu ložisek drahých kovů. Zároveň podtrhují význam výběru vhodné analytické metodiky včetně správné přípravy vzorku a režimu ICP-MS pro dosažení spolehlivých a reprezentativních výsledků.

6 Diskuze

Cílem této diplomové práce bylo ověřit možnost stanovení stříbra (Ag) ve včelím těle pomocí rutinního postupu kombinující mineralizaci vzorku a techniku ICP-MS a využití tak včely medonosné (*Apis mellifera)* jako nástroje biomonitoringu environmentální zátěže, zejména v oblastech s historickým výskytem těžby stříbra. Práce zároveň zkoumala možnost uplatnění včely medonosné jako screeningového organismu umožňujícího na základě stanoveného obsahu Ag rozlišit lokality s předpokládaným geologickým výskytem Ag od lokalit bez anomálního výskytu Ag.

Vývoj finální metodiky stanovení stříbra (Ag) ve včelím homogenátu probíhal postupně a byl výsledkem několika experimentálních kroků, které vedly k optimalizaci jak rozkladového postupu, tak samotného instrumentálního stanovení. Původní metodika zahrnovala homogenizaci vzorků pomocí porcelánové třecí misky s tloučkem. Tato technika však vedla k významné kontaminaci zirkonem (Zr) v důsledku abraze technického porcelánu obsahujícího ZrO_2. Kontaminace zirkonem se výrazně projevila ve spektrálních skenech, a to především zvýšenými signály na hmotách 90 a 91, což vedlo k falešně pozitivnímu nárůstu signálu analytu Ag na m/z = 107. Tento problém nebylo možné dostatečně eliminovat ani pomocí reakčního režimu s kyslíkem. Z tohoto důvodu bylo rozhodnuto od homogenizace upustit a analyzovat celé včely, čímž došlo k výraznému snížení interferencí a zkreslení výsledků. Zároveň byla pozorována zvýšená variabilita výsledků v rámci opakovaných měření včelích vzorků z téže lokality. Tato odchylka může být částečně přisuzována heterogenitě samotného biologického materiálu – včelám. Při manuálním zpracování vzorku, kdy dochází k rozdrcení těla včely do formy prášku, nelze zajistit absolutně rovnoměrné zastoupení všech tělních částí (např. hlava, hruď, končetiny, zažívací trakt). Je pravděpodobné, že určité části těla mohou vykazovat rozdílnou míru akumulace stopových prvků. Navíc stříbro se podle literatury (Zhelyazkova 2012; Salvaggio et al. 2017; Gekière et al. 2023; Zavrtnik et al 2024) ukládá zejména v tukovém tělese, hemolymfě a trávicím traktu, jejichž přítomnost ve výsledné navážce nelze standardizovat bez pokročilejší homogenizační techniky.

Paralelně s tím probíhala optimalizace extrakčního činidla a způsobu rozkladu. Zatímco původní experimenty naznačovaly, že nejvyšší výtěžnosti Ag lze dosáhnout pomocí lučavky královské ($HCl:HNO_3$; 3:1), podrobnější pozorování ukázala, že tato směs nebyla schopna efektivně rozložit organickou složku včelího těla. Po rozkladu zůstávaly v roztoku nerozpuštěné kapénky a částice organického materiálu, pravděpodobně voskovitého původu.

Naproti tomu Leffortova lučavka ($HCl:HNO_3$; 1:3) vykázala lepší oxidační účinnost díky vyššímu obsahu kyseliny dusičné, což vedlo k úplnějšímu rozkladu biologické matrice. Účinnost této směsi byla ověřena při analýze certifikovaného referenčního materiálu Metranal 01 (říční sediment), kde byla u mikrovlnného rozkladu s Leffortovou lučavkou dosažena výtěžnost 96,9 %, což potvrzuje validitu tohoto přístupu i pro složité environmentální matrice. Volba mikrovlnného rozkladu (MW) oproti klasickému ohřevu na topné desce (HP) byla i přes nižší detekční limit metody (0,00051µg/g), učiněna na základě jeho vyšší účinnosti, reprodukovatelnosti. U vzorků analyzovaných metodou MW s Leffortovou lučavkou bylo dosaženo stabilních výtěžností a nižší mezi-replikační variability než u metody HP a z těchto důvodů byla tato kombinace zvolena jako finální rozkladová metodika.

Z instrumentálního hlediska bylo ke stanovení obsahu Ag použito zařízení ICP-MS v reakčním režimu s O_2. Tato konfigurace umožnila účinnou eliminaci spektrálních interferencí způsobených ionty Zr a Y. Účinnost využití O_2 jako reakčního plynu podpořila i studie od Guo et al. (2011), kde byly úspěšně eliminovány spektrální interference způsobené Zr při stanovení koncentrace Ag v půdní matrici.

V rámci této studie byly použity relativně nízké navážky vzorku (~ 0,15 g) v kombinaci s vyšším stupněm ředění, což se negativně promítlo do výsledné koncentrace stříbra v extraktech a následně ovlivnilo dosažitelný detekční limit metody. Pro další zlepšení LOD metody by bylo vhodné navýšit hmotnost navážky, redukovat objem ředění a optimalizovat přístrojové podmínky měření.

Kromě metodologických aspektů je třeba zohlednit i vlivy biologické variability. Včely z experimentálních lokalit byly analyzovány v celku, bez homogenizace, čímž se eliminovalo riziko kontaminace, avšak zároveň vznikla variabilita mezi jednotlivými replikami. Tento jev lze přičíst tzv. nugget efektu, tedy přítomnosti kontaminující částice pouze u jednoho nebo několika jedinců v rámci vzorku. Vzhledem k malé navážce (přibližně 125 mg) může mít tento efekt zásadní dopad na výsledný obsah stříbra ve vzorku.

Výsledky analýz včelích těl z referenčních lokalit (Louny, Libčice, Šlovice a Sudovo Hlavno) vykazovaly nízké hodnoty obsahu Ag, přičemž 3 ze 4 analyzovaných vzorků poskytly hodnoty pod detekčním limitem zvolené metody (LOD < 0,0014 ug/g), což odpovídá očekávání na základě geologického zázemí těchto lokalit. Výjimkou byla referenční lokalita Šlovice, kde byl naměřen průměrný obsah Ag 0,0026 ± 0,0017 ug/g.

Naopak ve vzorcích ze stříbronosných lokalit (Hluboš, Krsov, Trhové Dušníky, Jáchymov) historicky spojených s těžební činností byly zjištěny vyšší obsahy Ag, přičemž všechny vzorky přesahovaly detekční limit metody LOD (0,0014 ug/g) Bylo tak prokázáno,

že v oblastech se známým výskytem stříbronosných rud dochází k přirozenému přenosu Ag do biologických složek prostředí a že včely skutečně akumulují detekovatelné množství stříbra, a to i v případě, kdy se nejedná o přímý zdroj expozice. Nejvyšší koncentrace byly naměřeny ve vzorcích z lokality Jáchymov, kde byl průměrný obsah Ag stanoven na 0,0168 ± 0,0146 µg/g. Tato lokalita zároveň poskytla nejvyšší obsah Ag ve vzorku vůbec, avšak také s největším rozptylem (0,0038 – 0,0326 µg/g). Vzorky z lokality Trhové Dušníky vykazovaly druhý nejvyšší obsah Ag (0,0104 ± 0,0056 µg/g). Nejnižší obsah Ag byl stanoven ve včelách ze stříbronosné lokality byl stanoven ve vzorku z lokality Hluboš, kde se hodnoty pohybovaly v rozmezí 0,0063 – 0,0104 µg/g Ag, což je stále nad limitem detekce metody (0,0014 ug/g).

Významné rozdíly v bioakumulaci stříbra mezi jednotlivými stanovišti podporují koncept (Lambert et al. 2012; Girotti et al. 2020) o využití včel jako environmentálních senzorů, schopných reflektovat lokální zatížení prostředí těžkými kovy, ať už prostřednictvím příjmu kontaminantů z potravy (pyl, nektar) nebo prostřednictvím kontaktu s prachem a aerosoly při jejím sběru. Vzhledem k tomu, že Ag není pro včely esenciálním prvkem a jeho biologická akumulace je limitovaná, je pravděpodobné, že detekované množství reflektuje spíše tuto pasivní expozici prostřednictvím externí kontaminace.

V literatuře (Purcell & Peters; Luoma 2008; McGillicuddy et al. 2017) se stříbro řadí mezi tzv. emerging contaminants – látky, jejichž toxikologický profil není v plném rozsahu znám, avšak jejich antropogenní emise do prostředí narůstají (např. prostřednictvím nanotechnologií) a z environmentálního hlediska je proto důležité upozornit, že ani nízké koncentrace Ag nemusí být biologicky neutrální. Včely vystavené subletálním koncentracím kovů mohou vykazovat změny v chování, poruchy paměti a orientace, nebo narušení střevní mikroflóry, jak potvrzují některé současné studie (Monchanin 2021). Vzhledem k tomu, že včely z testovaných lokalit nebyly vystaveny přímé kontaminaci nebo aplikaci Ag (např. v zemědělství), je pravděpodobné, že detekované množství pochází z historické zátěže a remobilizace stříbra v půdě, atmosféře nebo vegetaci.

Je nutné zmínit, že odběry probíhaly v letních měsících, kdy je vegetační kryt dobře vyvinutý, což může omezovat přenos prachových částic a tím i snižovat množství částic Ag, které by se mohly zachytit na povrchu včel. Suché a prašné období může akumulaci Ag částic na tělech včel usnadnit. Na druhou stranu lze očekávat vyšší míru expozice prostřednictvím květového nektaru a pylu, což rovněž může reflektovat zvýšený obsah Ag ve včelím těle. Vliv těchto faktorů však nebyl v této práci kvantifikován a představuje potenciální oblast pro další výzkum. Pro další výzkum se nabízí také možnost rozšíření sledovaných prvků o další toxické

i esenciální kovy. Vzhledem k výše zmíněnému nugget efektu se pro zvýšení statistické robustnosti dat dopručuje také zvýšit počet analyzovaných včel na vzorek.

Dle výsledků výše zmíněnch lze konstatovat, že byly potvrzeny hypotézy o možnosti stanovení obsahu Ag ve včelách pomocí rutinního postupu kombinující mineralizaci vzorku a techniku ICP-MS a také využití stanoveného obsahu Ag ve včelím těle k odlišení stříbronosné lokality od lokality bez anomálního výskytu Ag.

7 Závěr

Předložená diplomová práce se zabývala možností využití včely medonosné (*Apis mellifera*) jako bioindikátoru přítomnosti stříbra (Ag) v životním prostředí, a to se zvláštním zaměřením na oblasti se známou historickou těžbou stříbronosných rud. Cílem bylo nejen ověřit, zda lze metodou ICP-MS spolehlivě detekovat stopová množství stříbra ve včelím těle, ale rovněž zhodnotit rozdíly mezi stříbronosnými lokalitami a referenčními územími bez anomálního výskytu Ag.

V rámci práce byla optimalizována metodika rozkladu biologické matrice, přičemž byl zvolen mikrovlnný rozklad (MW) v kombinaci s Leffortovou lučavkou jako nejvhodnější přístup jak z hlediska výtěžnosti stanovení stříbra, tak z hlediska účinnosti mineralizace organické složky. Dále bylo zjištěno, že homogenizace včel v porcelánové třecí misce vedla ke kontaminaci zirkonem (Zr) a ke vzniku výrazných spektrálních interferencí na m/z = 107, které znemožňovaly přesné stanovení Ag. Z tohoto důvodu byla zvolena alternativní strategie, při níž byly vzorky analyzovány celistvé bez předchozí homogenizace, čímž došlo k minimalizaci kontaminace a zajištění reprodukovatelnějších výsledků.

Výsledky analýz potvrdily detekovatelný obsah Ag i ve vzorcích z referenčních lokalit (Šlovice, Louny, Libčice a Sudovo Hlavno), avšak ve výrazně nižších koncentracích než ve vzorcích z oblastí s historickou těžbou stříbra (Jáchymov, Trhové Dušníky, Hluboš a Krsov). To potvrzuje hypotézu, že stříbro přítomné v prostředí může být včelami akumulováno v množství dostatečném pro jeho analytické stanovení, a že včela medonosná může být využita jako praktický screeningový organismus pro detekci stopového množství Ag v prostředí.

Práce rovněž ukazuje, že u velmi malých biologických vzorků je třeba počítat s výskytem nugget efektu a vysokou variabilitou mezi replikami, což může ovlivnit interpretaci výsledků. Do budoucna je vhodné uvažovat o navýšení počtu jedinců ve vzorku, rozšíření studií o další sledované prvky, využití pokročilejší homogenizační techniky a případném zkoumání vlivu environmentálních faktorů.

Závěrem lze konstatovat, že stanovení obsahu stříbra ve včelím těle metodou ICP-MS je technicky proveditelné a efektivní. Tato práce přispívá k prohloubení současných znalostí o využití včel jako biomonitorů a potvrzuje jejich potenciál v oblasti geochemického průzkumu a environmentálního monitoringu ušlechtilých kovů. Vzhledem k narůstajícím požadavkům na šetrné metody průzkumu, představuje tento přístup vhodnou alternativu ke konvenčním metodám geologické prospekce.

8 Literatura

Agboola O, Babatunde DE, Isaac Fayomi OS, Sadiku ER, Popoola P, Moropeng L, Yahaya A, Mamudu AO. 2020. A review on the impact of mining operation: Monitoring, assessment and management. Results in Engineering (e100181). Dostupné z: doi:10.1016/j.rineng.2020.100181

Amalgam. 1999. Mineralienatlas. Dostupné z: https://www.mineralienatlas.de/lexikon/index.php/MineralData?mineral=Amalgam.

Asati A, Pichhode M, Nikhil K. 2016. Effect of heavy metals on plants: an overview. International Journal of Application or Innovation in Engineering & Management **5:**56-66.

Asgari K, Huang Q, Khoshdast H, Hassanzadeh A. 2022. A Review on Bioflotation of Coal and Minerals: Classification, Mechanisms, Challenges, and Future Perspectives. Mineral Processing and Extractive Metallurgy Review **45**:46-76. Dostupné z: https://doi.org/https://doi.org/10.1080/08827508.2022.2121919.

Balaram V. 2021. Strategies to overcome interferences in elemental and isotopic geochemical analysis by quadrupole inductively coupled plasma mass spectrometry: A critical evaluation of the recent developments. Rapid Communications in Mass Spectrometry (e9065). Dostupné z: doi:10.1002/rcm.9065

Balcaen L, Bolea-Fernandez E, Resano M, Vanhaecke F. 2015. Inductively coupled plasma – Tandem mass spectrometry (ICP-MS/MS): A powerful and universal tool for the interference-free determination of (ultra)trace elements – A tutorial review. Analytica Chimica Acta **894**: 7–19. Dostupné z: doi:10.1016/j.aca.2015.08.053

Bargańska Ż, Ślebioda M, Namieśnik J. 2016. Honey bees and their products: Bioindicators of environmental contamination. Critical Reviews in Environmental Science and Technology **46**:235–248. Dostupné z: doi:10.1080/10643389.2015.1078220

Barillo DJ, Marx ED. 2014. Silver in medicine: A brief history BC 335 to present. Burns **40**:3-8. Dostupné z: doi:10.1016/j.burns.2014.09.009

Bates CR, Scott G, Tobin M, Thompson R. 2007. Weighing the costs and benefits of reduced sampling resolution in biomonitoring studies: Perspectives from the temperate rocky intertidal. Biological Conservation **137**:617–625. Dostupné z: doi:10.1016/j.biocon.2007.03.019

Borovička J, Kotrba P, Gryndler M, Mihaljevič M, Řanda Z, Rohovec J, Cajthaml T, Stijve T, Dunn CE. 2010. Bioaccumulation of silver in ectomycorrhizal and saprobic macrofungi from pristine and polluted areas. Science of The Total Environment **408**: 2733–2744. Dostupné z: doi:10.1016/j.scitotenv.2010.02.031

Boyle, RW. 1968. The geochemistry of silver and its deposits. Geological survey of Canada - Department of energy, mines and resources, Kanada.

Branding, DA, Cross HE. 1972. Colonial Silver Mining: Mexico and Peru. Hispanic American Historical Review **52**: 545–579. Dostupné z: doi:10.1215/00182168-52.4.545

Bromenshenk JJ, Carlson SR, Simpson JC, Thomas JM.1985. Pollution Monitoring of Puget Sound with Honey Bees. Science **227**:632-634. Dostupné z: doi: 10.1126/science.227.4687.632

Brown K. 2017. Mercury and Silver Mining in the Colonial Atlantic. Oxford Research Encyclopedia of Latin American History. Oxford University Press. Dostupné z: doi:10.1093/acrefore/9780199366439.013.394

Cairns J. 2005. Biomonitoring: the crucial link between natural systems and society. Mankind quarterly **3**:289-308.

Calla-Choque D, Nava-Alonso F, Fuentes-Aceituno JC. 2016. Acid decomposition and thiourea leaching of silver from hazardous jarosite residues: Effect of some cations on the stability of the thiourea system. Journal of Hazardous Materials **317**:440–448. Dostupné z: doi:10.1016/j.jhazmat.2016.05.085

Castro SH, Sánchez M. 2003. Environmental viewpoint on small-scale copper, gold and silver mining in Chile. Journal of Cleaner Production **11**:207–213. Dostupné z: doi:10.1016/S0959-6526(02)00040-9

Cecchi, G, Marescotti P, Di Piazza S, Zotti M. 2017. Native fungi as metal remediators: Silver myco-accumulation from metal contaminated waste-rock dumps (Libiola Mine, Italy). Journal of Environmental Science and Health, Part B **52**:191–195. Dostupné z: doi:10.1080/03601234.2017.1261549

Celli G, Maccagnani B. 2003. Honey bees as bioindicators of environmental pollution. Bulletin of Insectology **56:**137-139.

Conti ME, Astolfi ML, Mele G, Ristorini M, Vitiello G, Massimi L, Canepari S, Finoia MG. 2022. Performance of bees and beehive products as indicators of elemental tracers of atmospheric pollution in sites of the Rome province (Italy). Ecological Indicators (e109061). Dostupné z: doi:10.1016/j.ecolind.2022.109061

Conti ME, Tudino MB, Finoia MG, Simone C, Stripeikis J. 2019. Performance of two Patagonian molluscs as trace metal biomonitors: The overlap bioaccumulation index (OBI) as an integrative tool for the management of marine ecosystems. Ecological Indicators **101**: 749–758. Dostupné z: doi:10.1016/j.ecolind.2019.01.060

Couvillon MJ, Ratnieks FLW. 2015. Environmental consultancy: dancing bee bioindicators to evaluate landscape “health”. Frontiers in Ecology and Evolution **3**: 1–8. Dostupné z: doi:10.3389/fevo.2015.00044

Cunningham SA, Crane MJ, Evans MJ, Hingee KL, Lindenmayer DB. 2022. Density of invasive western honey bee (Apis mellifera) colonies in fragmented woodlands indicates potential for large impacts on native species. Scientific Reports (e3603). Dostupné z: doi:10.1038/s41598-022-07635-0

Dauwe T, Lieven B, Ellen J, Rianne P, Ronny B, Marcel E. 2002. Great and blue tit feathers as biomonitors for heavy metal pollution. Ecological Indicators **1**:227–234. Dostupné z: doi:10.1016/S1470-160X(02)00008-0

Deschênes G, Rajala J, Pratt AR, Guo H, Fulton M, Mortazavi S. 2011. Advances in the cyanidation of silver. Mining, Metallurgy & Exploration **28**:37–42. Dostupné z: doi:10.1007/BF03402323

Drongová L, Tomková V, Vlček J, Raclavský M. 2006. Možnosti využití strusek po redukci kovonosných odpadů. Acta Metallurgia Slovaca **12:**85-89.

Dudka S, Adriano DC. 1997. Environmental Impacts of Metal Ore Mining and Processing: A Review. Journal of Environmental Quality **26**:590–602. Dostupné z: doi:10.2134/jeq1997.00472425002600030003x

Duffy JE. 2003. Biodiversity loss, trophic skew and ecosystem functioning. Ecology Letters **6**:680–687. Dostupné z: doi:10.1046/j.1461-0248.2003.00494.x

Dufy JE. 2003. Biodiversity loss, trophic skew and ecosystem functioning. Ecology Letters. **6**:680–687. Dostupné z: doi:10.1046/j.1461-0248.2003.00494.x

Duru, NU. Effects of Reduced Sulfur Species on the Recovery of Gold and Silver by Cyanide Leaching [DSc Thesis]. University of Nevada, Reno, USA.

Favas PJC, Pratas J, Rordrigues N, D'souza R, Varun M, Paul MS. 2018. Metal(loid) accumulation in aquatic plants of a mining area: Potential for water quality biomonitoring and biogeochemical prospecting. Chemosphere 194:158–170. Dostupné z: doi:10.1016/j.chemosphere.2017.11.139

Felming CA. 2005. Cyanide recovery. Developments in Mineral Processing. Elsevier **15**:703–727. Dostupné z: doi:10.1016/S0167-4528(05)15029-7

Fleming. CA. 2005. Cyanide recovery. Developments in Mineral Processing. Elsevier **15**:703–727. Dostupné z: doi:10.1016/S0167-4528(05)15029-7

Forbes P B C, Van Der Wat L, Kroukamp ME. 2015. Biomonitors. Comprehensive Analytical Chemistry. Elsevier **70**:53-108. Dostupné z: doi:10.1016/bs.coac.

Fraser KS, Walton RH, Wells JA. 1991. Processing of refractory gold ores. Minerals Engineering **4**:1029–1041. Dostupné z: doi:10.1016/0892-6875(91)90081-6

Frati L, Brunialti G. 2023. Recent Trends and Future Challenges for Lichen Biomonitoring in Forests. Forests **14**:647-648. Dostupné z: doi:10.3390/f14030647

Gajger IT, Kosanović M, Oreščanin V, Kos S, Bilandžić N. 2019. Mineral Content in Honeybee Wax Combs as a Measurement of the Impact of Environmental Factors. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology **103**:697–703. Dostupné z: doi:10.1007/s00128-019-02713-y

Garibaldi LA et al. 2013 Wild pollinators enhance fruit set of crops regardless of honey bee abundance. Science **339**:1608–1611. Dostupné z: doi:10.1126/science.1230200

Gekière A, Vanderplanck M, Michez D. 2023. Trace metals with heavy consequences on bees: A comprehensive review. Science of The Total Environment (e165084). Dostupné z: doi:10.1016/j.scitotenv.2023.165084

Geologický klub. 2015. Historie těžby nerostných surovin. Základní škola Staré město u Uherského hradiště.

Giglio A, Ammendola A, Battistella S, Naccarato A, Pallavicini A, Simeon E, Tagarelli A, Giulianini PG. 2017. Apis mellifera ligustica, Spinola 1806 as bioindicator for detecting environmental contamination: a preliminary study of heavy metal pollution in Trieste, Italy. Environmental Science and Pollution Research **24**:659–665. Dostupné z: doi:10.1007/s11356-016-7862-z

Girotti S, Ghini S, Ferri E, Bolelli L, Colombo R, Serra G, Porrini C, Sangiorgi S. 2020. Bioindicators and biomonitoring: honeybees and hive products as pollution impact assessment tools for the Mediterranean area. Euro-Mediterranean Journal for Environmental Integration **5**:62. Dostupné z: doi:10.1007/s41207-020-00204-9

Goessler W, Kuehnelt D, Schlagenhaufen C, Slejkovec Z, Irgolic KJ. 1998. Arsenobetaine and other arsenic compounds in the National Research Council of Canada Certified Reference Materials DORM 1 and DORM 2. Journal of Analytical Atomic Spectrometry **13**:183–187. Dostupné z: doi:10.1039/a705634f

Greenwood NN, Earnshaw A. 1997. Chemistry of the elements. 2nd ed. Oxford Auckland Boston.

Guerrero – Guintero SJ. 2016. The history of silver refining in New Spain, 16c to 18c: back to the basics. History and Technology **32**:1–31. Dostupné z: doi:10.1080/07341512.2016.1191864

Guo W, Hu S, Zhang J, Zhang H. 2011. Elimination of oxide interferences and determination of ultra-trace silver in soils by ICP-MS with ion–molecule reactions. Science of The Total Environment **409**:2981–2986. Dostupné z: doi:10.1016/j.scitotenv.2011.04.011

Haghighizadeh A, Rajabi O, Nezarat A, Hajyani Z, Haghmohammadi M, Hedayatikhah S, Asl SD, Aghababai Beni A. 2024. Comprehensive analysis of heavy metal soil contamination in mining Environments: Impacts, monitoring Techniques, and remediation strategies. Arabian Journal of Chemistry. (e105777). Dostupné z: doi:10.1016/j.arabjc.2024.105777

Holt EA, Miller SW. 2011. Bioindicators: Using Organisms to Measure Environmental Impacts. Nature Education Knowledge **2**:8

Hossain R, et al. 2022. Propolis: An update on its chemistry and pharmacological applications. Chinese Medicine **17**:100. Dostupné z: doi:10.1186/s13020-022-00651-2

Hristov P, Shumkova R, Palova, N Neov B. 2021. Honey bee colony losses: Why are honey bees disappearing? Sociobiology (e5851). Dostupné z: doi:10.13102/sociobiology.v68i1.5851

Hung KJ, Kingston JM, Albrecht M, Holway DA, Kohn JR. 2018. The worldwide importance of honey bees as pollinators in natural habitats. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences **285:**1870. Dostupné z: doi:10.1098/rspb.2017.2140

Hyk W, Kitka K. 2017. Highly efficient and selective leaching of silver from electronic scrap in the base-activated persulfate – ammonia system. Waste Management **60**:601–608. Dostupné z: doi:10.1016/j.wasman.2016.12.038

Chamberlain PG, Pojar MG. 1984. Gold and Silver Leaching Practices in the United States. U.S. Department of the Interior, Bureau of Mines.

Jakubec K, Bendl J. 1996. ICP-MS a možnosti jejího využití v analýze vzorků ze životního. Polutanty v ekosystému. **1**:65-82.

Janes N, Playle RC. 1995. Modeling silver binding to gills of rainbow trout (Oncorhynchus mykiss). Environmental Toxicology and Chemistry **14**:1847–1858. Dostupné z: doi:10.1002/etc.5620141106

Jannetto PJ, Cowl CT. 2023. Elementary Overview of Heavy Metals. Clinical Chemistry **69:**336–349. Dostupné z: doi:10.1093/clinchem/hvad022

Jing-Ying L, Xiu-Li X, Wen-Quan L. 2012. Thiourea leaching gold and silver from the printed circuit boards of waste mobile phones. Waste Management **32**:1209–1212. Dostupné z: doi:10.1016/j.wasman.2012.01.026

Johnson CA. 2015. The fate of cyanide in leach wastes at gold mines: An environmental perspective. Applied Geochemistry **57**:194–205. Dostupné z: doi:10.1016/j.apgeochem.2014.05.023

KalinitchenkoI, Wang X, Sturman B. 2008. Simple and Effective Control of Spectral Overlap Interferences in ICP-MS. Special Issues-10-01-2008.

Kast K, Kilchenmann V, Charrière JD. 2021. Long-term monitoring of lipophilic acaricide residues in commercial SWISS beeswax. Pest Management Science **77**:4026–4033. Dostupné z: doi:10.1002/ps.6427

Kirk RE, Othmer DF, Mann CA. 1949. Encyclopedia of Chemical Technology. Vol. II. The Journal of Physical Chemistry **53**:591-591.

Kovář L. 2015. Využití bakterie *Acidithiobacillus ferrooxidans* při flotaci kovonosných odpadů s obsahem stříbra. Diplomová práce. Ostrava: Vysoká škola Báňská – Technická univerzita Ostrava.

Křížková S, Adam V, Kizek R. 2009. Fytotoxicita stříbrných iontů. Chemické listy **103**:559-568.

Kubečka J. 2016. Získávání Ag – koncentrátu z odpadních materiálů pomocí flotace [MSc. Thesis]. Vysoká škola báňská – Technická univerzita Ostrava Hornicko-geologická fakulta. Ostrava

Kutscher D, Nelms S, Lofthouse S, Ducos S. 2017. Effective Removal of Isobaric Interferences on Strontium and Lead Using Triple-Quadrupole ICP-MS **32:**38–41.

Lacerda LD, Salomons W. 1998. Mercury from Gold and Silver Mining: A Chemical Time Bomb?. Berlin Heidelberg: Springer. Environmental Science. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-642-58793-1

Lacerda LD. 1997. Global mercury emissions from gold and silver mining. Water, Air, & Soil Pollution **97**:209–221. Dostupné z: doi:10.1007/BF02407459

Lacrda LD, Salomons W. 1998. Mercury from Gold and Silver Mining: A Chemical Time Bomb? Environmental Science **1**:1–27. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-642-58793-1

Lambert O, Piroux M, Puyo S, Thorin C, Larhantec M, Delbac F, Pouliquen H. 2012. Bees, honey and pollen as sentinels for lead environmental contamination. Environ. Pollut. **170**: 254–259

Larrabure G, Rodríguez-reyes JCF. 2021. A review on the negative impact of different elements during cyanidation of gold and silver from refractory ores and strategies to optimize the leaching process. Minerals Engineering (e107194). Dostupné z: doi:10.1016/j.mineng.2021.107194

Lazim ZM , Salmiati S, Marpongahtun M, Arman NZ, Mohd Haniffah MR, Azman S, Yong EL, Salim MR. 2023. Distribution of Silver (Ag) and Silver Nanoparticles (AgNPs) in Aquatic Environment. Water (e1349). Dostupné z: doi:10.3390/w15071349

Lei C, Yan B, Chen T, Wang XL, Xiao XM. 2018. Silver leaching and recovery of valuable metals from magnetic tailings using chloride leaching. Journal of Cleaner Production **181**:408–415. Dostupné z: doi:10.1016/j.jclepro.2018.01.243

Li Z, Zhou L, Tan F. 2006. Influence of sample pre-treatment on the determination of trace silver and cadmium in geological and environmental samples by quadrupole inductively coupled plasma mass spectrometry. Microchimica Acta **156**:263–269. Dostupné z: doi:10.1007/s00604-006-0642-6

Litocheb J, Černý P, Sekora J, Šreinová B, Korba M. 2012. Ložiska a výskyty nerostných surovin na území brdských Hřebenů a v jejich okolí (střední Čechy). Bulletin mineralogicko-petrologického oddělení Národního muzea v Praze. Praha: Národní muzeum. **20**:129-176.

Loula M, Kaňa A, Mestek O. 2019. Non-spectral interferences in single-particle ICP-MS analysis: An underestimated phenomenon. Talanta **202**:565–571. Dostupné z: doi:10.1016/j.talanta.2019.04.073

Luoma SN. 2008. Silver nanotechnologies and the environment. The project on emerging nanotechnologies report **15**:12–13.

Mair KS, Irrgeher J, Haluza D. 2023. Elucidating the Role of Honey Bees as Biomonitors in Environmental Health Research. Insects **14**: 874. Dostupné z: doi:10.3390/insects14110874

Majer J. 2004. Rudné hornictví v Čechách, na Moravě a ve Slezsku: obrazy z dějin těžby a zpracování. Libri. Praha.

Marcoccia D, Tzanetou EN, Pietropaoli M, Roessink I, Van der Steen J, Cuva C, Formato G, Kasiotis KM. 2024. Biomonitoring of particulate matter and volatile organic compounds using honey bees and their products. A contemporary overview. Science of The Total Environment (e177391). Dostupné z: doi:10.1016/j.scitotenv.2024.177391

Markert BA, Breure AM, Zechmeister HG. 2003. Bioindicators and biomonitors. Principles, Concepts and Applications. Trace Metals and Other Contaminants in the Environment **6:** 15–25

Markner-Jäger B. 2008. Mineralogy II. Technical English for Geosciences. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-540-68616-3_15

Mat M. 2019. Stříbrná (Ag) ruda | Minerály, vznik, výskyt, ložiska. Geology Science. Dostupné z: https://cs.geologyscience.com/rudn%C3%A9miner%C3%A1ly/st%C5%99%C3%ADbrn%C3%A1-ruda/

McGillicuddy E, Murray I, Kavanagh S, Morrison L, Fogarty A, Cormican M, Dockery P, M. Prendergast M, Rowan N, Morris D. 2017. Silver nanoparticles in the environment: Sources, detection and ecotoxicology. Science of The Total Environment **575**:231–246. Dostupné z: doi:10.1016/j.scitotenv.2016.10.041

Mihaljevič M, Strnad L, Šebek O. 2004. Využití hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem v geochemii. Chemické listy **98:**123-130.

Mishra S, Panda S, Akcil A, Dembele S. 2023. Biotechnological Avenues in Mineral Processing: Fundamentals, Applications and Advances in Bioleaching and Bio-beneficiation. Mineral Processing and Extractive Metallurgy Review **44**:22–51. Dostupné z: doi:10.1080/08827508.2021.1998043

Mitrano DM, Barber A, Bednar A, Westerhoff P, Higgins CP, Ranville JF. 2012. Silver nanoparticle characterization using single particle ICP-MS (SP-ICP-MS) and asymmetrical flow field flow fractionation ICP-MS (AF4-ICP-MS). Journal of Analytical Atomic Spectrometry **27**:1131-1142. Dostupné z: doi:10.1039/c2ja30021d

Monchanin C. 2021. Impacts of metallic pollutants on honey bees: from the colony to the brain [MSc. Thesis]. Animal biology. Université Paul Sabatier – Toulouse III, Macquarie University, Sydney.

Monchanin, C, Drujont E, Le Roux G, Lösel PD, Barron AB, Devaud JM, Elger A, Lihoreau M. 2024. Environmental exposure to metallic pollution impairs honey bee brain development and cognition. Journal of Hazardous Materials (e133218). Dostupné z: doi:10.1016/j.jhazmat.2023.133218

Nakazawa T, Suzuki D, Sakuma H, Furuta N. 2014. Comparison of signal enhancement by co-existing carbon and by co-existing bromine in inductively coupled plasma mass spectrometry. J. Anal. At. Spectrom **29**:1299–1305. Dostupné z: doi:10.1039/C4JA00059E

Nriagu JO. 1994. Mercury pollution from the past mining of gold and silver in the Americas. Science of The Total Environment **149**:167–181. Dostupné z: doi:10.1016/0048-9697(94)90177-5

Öncel MS, İnce M, Bayramoğlu M. 2005. Leaching of silver from solid waste using ultrasound assisted thiourea method. Ultrasonics Sonochemistry **12**:237–242. Dostupné z: doi:10.1016/j.ultsonch.2003.10.007

Otradovcová M. 2010. Strukturální charakteristiky rostlin pod vlivem těžkých kovů [BSc Thesis]. Univerzita Karlova v Praze, Praha

Otruba V. 2015. Hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem, sborník 8. kurz ICP-MS/OES. Spektroskopická společnost Jana Marka Marci.

Pálenský P, Starý J, Novák J, Kavina P, Petáková Z. 2011. Význam, rozmanitost a ochrana nerostných zdrojů v krajině Čr. Acta Pruhoniciana **98**:9-16.

Papa G et al. 2022. The Honey Bee Apis mellifera: An Insect at the Interface between Human and Ecosystem Health. Biology **11**:233. Dostupné z: doi:10.3390/biology11020233

Pauliš P, Kopecký S. 2012. Minerály stříbra a jejich lokality v České republice. Kutná Hora: Kuttna.

Perugini M, Manera M, Grotta L, Abete MC, Tarasco R, Amorena M. 2011. Heavy Metal (Hg, Cr, Cd, and Pb) Contamination in Urban Areas and Wildlife Reserves: Honeybees as Bioindicators. Biological Trace Element Research **140**:170–176. Dostupné z: doi:10.1007/s12011-010-8688-z

Pick D, Leiterer M, Einax JW. 2010. Reduction of polyatomic interferences in biological material using dynamic reaction cell ICP-MS. Microchemical Journal **95**:315–319. Dostupné z: doi:10.1016/j.microc.2010.01.008

Pluháček T, Maier V. 2020. Hmotnostní spektrometrie sindukčně vázaným plazmatem – analýza jediné buňky. Chemické listy **114**:239-243.

Porrini C, Sabatini AG, Girotti S, Ghini S, Medrzycki P, Grillenzoni F, Bortolotti L, Gattavecchia E, Celli G. 2003. Honey bees and bee products as monitors of the environmental contamination. Apiacta **38**:63-70.

Purcell TW, Peteres JJ. 1998. Sources of silver in the environment. Environmental Toxicology and Chemistry **17**:539–546. Dostupné z: doi:10.1002/etc.5620170404

Pyle GG, Plomp RD, Zink L, Klemish JL. 2022. Invertebrate metal accumulation and toxicity from sediments affected by the Mount Polley mine disaster. Environmental Science and Pollution Research. 29:70380–70395. Dostupné z: doi:10.1007/s11356-022-20677-1

Ragnarsdóttir KV, Sverdrup HU, Koc D. 2012. Assessing Long Term Sustainability of Global Supply of Natural Resources and Materials. University of Iceland. Reykjavik. Dostupné z: doi:10.5772/28118

Ranville MA, a Flegal AR. 2005. Silver in the North Pacific Ocean. Geochemistry, Geophysics, Geosystems. **6**. Dostupné z: doi:10.1029/2004GC000770

Roubal J. 2006. Příbram a její okolí jako cíl geologických vycházek [MSc. Thesis]. Univerzita Karlova v Praze, Praha

Rudnick RL, Gao S. 2014. Composition of the Continental Crust. Treatise on Geochemistry. Elsevier s.1–51. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-08-095975-7.00301-6

Salvaggio et al. 2017. Morphostructural and immunohistochemical study on the role of metallothionein in the detoxification of heavy metals in Apis mellifera L. Microscopy Research and Technique **80**:1215–1220. Dostupné z: doi:10.1002/jemt.22919

Sejkora J, Kouřmiský J. 2005. Atlas minerálů České a Slovenské republiky. Praha: Academia.

Silver Amalgam Group. 1993. Mindat. Dostupné také z: https://www.mindat.org/min-35460.html.

Singovszka E, Balintova M, Junakova N. 2020. The impact of heavy metals in water from abandoned mine on human health. SN Applied Sciences **2**:934. Dostupné z: doi:10.1007/s42452-020-2731-2

Smith DR, Fickett FR. 1995. Low-Temperature Properties of Silver. Journal of Research of the National Institute of Standards and Technology **100**:119–171. Dostupné z: doi:10.6028/jres.100.012

Starý J, Sitenský I, Mašek D, Gabriel Z, Němec M, Hodková T, Vaněček M, Novák J, Kavina P. 2022. Surovinové zdroje České republiky – nerostné suroviny. Česká geologická služba. Praha.

Strode S, Jaeglé L, Selin NE. 2009. Impact of mercury emissions from historic gold and silver mining: Global modeling. Atmospheric Environment **43**:2012–2017. Dostupné z: doi:10.1016/j.atmosenv.2009.01.006

Svatoňová H. 2013. The Current State of the Uranium Mining Areas and Prison Camps in Jáchymov Landscape. Geografické informácie **17**:93–103. Dostupné z: doi:10.17846/GI.2013.17.1.93-103

Syed S. 2016. Silver recovery aqueous techniques from diverse sources: Hydrometallurgy in recycling. Waste Management **50**:234–256. Dostupné z: doi:10.1016/j.wasman.2016.02.006

Škácha P, Horák J, Plášil J. 2014. Minerály a rudní nálomy na žíle Geister v západní části Jáchymovského rudního revíru (Česká republika). Bulletin mineralogicko-petrologického oddělení Národního muzea v Praze. Praha: Národní muzeum **22**:202-214.

Škácha P, Sejkora J, Knížek F, Slepička V, Litochleb J, Jebavá I. 2012. Výskyty unikátního monometalického stříbrného zrudnění na žíle H14F3 mezi 7. a 9. patrem šachty č. 21 Háje, příbramský uran-polymetalický revír (Česká republika). Bulletin mineralogicko-petrologického oddělení Národního muzea v Praze. Praha: Národní muzeum **20**:230-254.

Talarska P, Boruczkowski M, Żurawski J. 2021. Current Knowledge of Silver and Gold Nanoparticles in Laboratory Research—Application, Toxicity, Cellular Uptake. Nanomaterials **11**:2454. Dostupné z: doi:10.3390/nano11092454

Tang J, Xiong L, Wang S, Wang J, Liu L, Li J, Yuan F, Xi T. 2009. Distribution, Translocation and Accumulation of Silver Nanoparticles in Rats. Journal of Nanoscience and Nanotechnology **9**:4924–4932. Dostupné z: doi:10.1166/jnn.2009.1269

Thomas R, 2008. Practical Guide to ICP-MS: A Tutorial for Beginners, Second Edition. CRC Press. Dostupné z: doi:10.1201/9781420067873

Thomas R. 2001. A Beginner's Guide to ICP-MS. Spectroscopy **1**:1-75.

Tchounwou PB, Yedjou CG, Patlolla AK, Sutton DJ. 2012. Heavy Metal Toxicity and the Environment. Molecular, Clinical and Environmental Toxicology. Experientia Supplementum **101**:133–164. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-7643-8340-4_6

Toth T, Kopernicka M, Sabo R, Kopernicka T. 2016. The Evaluation of Mercury in Honey Bees and their Products from Eastern Slovakia. Scientific Papers Animal Science And Biotechnologies **49**:257–257.

Vapur, H., O. Bayat, Mordogan H, Poole C. 2005. Effects of stripping parameters on cyanide recovery in silver leaching operations. Hydrometallurgy **77**:279–286. Dostupné z: doi:10.1016/j.hydromet.2005.01.002

Vojáček T. 2018. Stříbro a jeho investiční potenciál [BSc. Thesis]. Masarykova univerzita Brno. Brno.

Vorel P. 2000. Od pražského groše ke koruně české: průvodce dějinami peněz v českých zemích. Rybka Publ. Praha.

Využití stříbra. 2015. Česká mincovna. Dostupné z: https://ceskamincovna.cz/blog-2646/vyuziti-stribra_2085/

Wagner M, Hendy LI, Lai B. 2022. Characterizing Ag uptake and storage in the marine diatom Thalassiosira pseudonana: Implications for Ag biogeochemical cycling. Marine Chemistry (e104175). Dostupné z: doi:10.1016/j.marchem.2022.104175

Wood CM. 2011. Silver. In: Fish Physiology. Elsevier **31**:1–65. Dostupné z: doi:10.1016/S1546-5098(11)31023-0

World Silver Survey 2024. 2024. The Silver Institute. Dostupné z: https://silverinstitute.org/all-world-silver-surveys/

Xie F, Dreisinger DB. 2007. Leaching of silver sulfide with ferricyanide–cyanide solution. Hydrometallurgy **88**:98–108. Dostupné z: doi:10.1016/j.hydromet.2007.03.008

Xue Z, Feng Y, Li H, Zhu Z, Xu C, Ju J, Yang Y. 2023. A comprehensive review on progresses of coal and minerals bioflotation in presence of microorganisms. Journal of Environmental Chemical Engineering. (e111182). Dostupné z: doi:10.1016/j.jece.2023.111182

Yin X, Xia L, Sun L, Luo H, Wang Y. 2008. Animal excrement: A potential biomonitor of heavy metal contamination in the marine environment. Science of The Total Environment **399**:179–185. Dostupné z: doi:10.1016/j.scitotenv.2008.03.005

Yu S, Yin Y, Liu J. 2013. Silver nanoparticles in the environment. Environmental Science: Processes Impacts **15**:78–92. Dostupné z: doi:10.1039/C2EM30595J

Zarić NM, Brodschneider R, Goessler W. 2022. Honey bees as biomonitors – Variability in the elemental composition of individual bees. Environmental Research (e112237). Dostupné z: doi:10.1016/j.envres.2021.112237

Závada J. 2018. Chemické metody zpracování nerostných surovin a odpadů [MSc. Thesis]. Vysoká škola báňská – Technická univerzita Ostrava Hornicko-geologická fakulta.

Zavrtnik S, Loborec J, Kapelj S, Grčić I. 2024. Environmental Biomonitoring of Heavy and Toxic Metals Using Honeybees and Their Products—An Overview of Previous Research. Sustainability (e8526). Dostupné z: doi:10.3390/su16198526

Zhelyazkova H. 2012. Honeybees - Bioindicators for environmental quality. Bulgarian Journal of Agricultural Science **18**:435–442.

Zhou Q, Zhang J, Fu J, Shi J, Jiang G. 2008. Biomonitoring: An appealing tool for assessment of metal pollution in the aquatic ecosystem. Analytica Chimica Acta **606**:135–150. Dostupné z: doi:10.1016/j.aca.2007.11.018

Zimák J. 2005. Systematická mineralogie. Univerzita Palackého, Olomouc