



Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta životního prostředí

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta životního prostředí

Katedra ekologie

Zdravotní a kondiční znaky volně žijících ptáků jako indikátory stresu a kvality prostředí

Health and condition-related traits of free-living birds
as indicators of stress and environmental quality

Disertační práce

(komentovaný soubor publikovaných článků)

Autor: Ing. Petra Bauerová

Školitel: Ing. Jana Svobodová, Ph.D.

Konzultant: RNDr. Michal Vinkler, Ph.D.

Praha 2020

Prohlášení

Tímto prohlašuji, že jsem tuto disertační práci vypracovala sama, na základě výsledků své vlastní práce nebo spolupráce s kolegy uvedenými v publikovaných článcích. Dále jsem k vytvoření publikací a uceleného přehledu o dané problematice probírané v této práci použila další dosavadně dostupné literární zdroje, které jsou vždy řádně citovány.

V Praze dne 9.7.2020

.....

Předmluva a poděkování

Touha po rozluštění každé byt' nepatrné promile souvislostí v nekonečné množině komplexních a vzájemně provázaných přírodních procesů je droga, které podlehl asi každý badatel v oboru přírodních věd. Mě provázela celé mé studium a dovoluji si říct, že mě bude provázet i nadále celým mým životem, za což jsem a budu své *alma mater* vždy vděčná.

Během studia jsem měla možnost rozvíjet nejen své znalosti v oboru ekologie a ochrany přírody, ale také schopnosti naslouchat, vyhledávat a třídit informace a vytvářet si vlastní názory. V neposlední řadě mě studium a spolupráce s kolegy ve výzkumu naučily nebát se o věcech otevřeně diskutovat a nebát se vlastních chyb a omylů, jelikož i ty utvářejí důležité milníky při cestě za poznáním.

Zvláštní poděkování patří mé vedoucí práce Ing. Janě Svobodové, Ph.D. za její dlouholeté odborné vedení, spolupráci v terénu i v laboratoři, trpělivost, upřímnost a cenné rady a připomínky, které mi během studia předávala. Dále doc. Mgr. Janu Růžičkovi, Ph.D. za jeho podporu a rady při studiu a při psaní textů. Velké poděkování patří kolegům z katedry zoologie z Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy, jmenovitě RNDr. Michalu Vinklerovi, Ph.D., prof. doc. Mgr. Tomáši Albrechtovi, Ph.D., Mgr. Martinovi Těšickému, Mgr. Haně Velové, Mgr. Jitce Vinklerové a dalším za dlouholetou organizaci terénních prací, spolupráci při zpracování biologických vzorků a odborných výstupů. Děkuji Mgr. Jakubu Kreisingrovi, Ph.D. za jeho rady a pomoc při statistickém zpracování výsledků. Děkuji také Ing. Jiřímu Eliášovi, Ing. Petře Špatenkové, Martinovi Rychlému a Monice Dvořákové (studentům a absolventům) z Fakulty životního prostředí České zemědělské univerzity v Praze za pomoc v terénu či při dílčích zpracováních vzorků. Dále RNDr. Jakubovi Hraníčkoví, Ph.D. z PřF UK a RNDr. Stanislavu Musilovi, Ph.D. z AV ČR za chemickou analýzu těžkých kovů. V neposlední řadě děkuji svému zaměstnavateli Českému hydrometeorologickému ústavu za projevenou podporu a vstřícnost během doktorského studia a mé milované rodině, partnerovi a přátelům za jejich trpělivost, pochopení a nekonečnou podporu v práci i ve studiu.

Finanční podpora

Vlastní výzkum této disertační práce byl podpořen prostřednictvím Grantové Agentury České Republiky (GAČR, projekty č. P505/10/1871 a č. P506/15-11782S), Karlovy univerzity (projekty č. GAUK 44809, GAUK 1626218, PRIMUS/17/SCI/12 a SVV 260 434/2019), Fakulty životního prostředí České zemědělské univerzity v Praze (projekty č. IGA 20144268 a IGA 20154214) a Institutem analytické chemie Akademie věd ČR (výzkumný plán č. 68081715).

Abstrakt

Antropogenní znečištění prostředí vede ke kontaminaci tkání volně žijících živočichů různými toxickými prvky, jako jsou například těžké kovy, které mají potenciální dopad na jejich zdraví a celkovou kondici. V posledních letech jsou pro studium těchto efektů využívány různé druhy volně žijících ptáků, a to zejména v industriálních intenzivně znečištěných oblastech. Doposud ovšem neexistovaly studie, které by popisovaly širší geografickou či časovou variabilitu míry kontaminace těžkými kovy u volně žijících synantropních živočichů v různých městech. Stejně tak nebyly doposud dostatečně studovány potenciální přímé či nepřímé vlivy chronické subletální expozice ve městech na zdravotní, kondiční či reprodukční parametry těchto zvířat. Tato práce obsahuje výsledky dlouholetého monitoringu volně žijících městských populací sýkor koňader (*Parus major*) v České republice. Přestože analýza těžkých kovů ze vzorků krve i peří sýkor ukázala, že míra kontaminace zvířat se v různých městech liší, souvislost s úrovní prachového znečištění ovzduší ve městech nebyla prokázána. Dále bylo zjištěno, že i přesto, že žádné ze zvířat nevykazovalo známky akutní chronické otravy těžkými kovy, detekované subletální koncentrace kovů v krvi i peří souvisely s dílčími zdravotně závislými hematologickými znaky. U jedinců s nejvyššími koncentracemi kovů v krvi (v tomto případě pocházejících z industriálně zatíženého města Bohumín) byly zjištěny příznaky anemického onemocnění krve (nižší celkový počet erytrocytů a slabě zvýšené počty imaturních erytrocytů v krvi). Naměřené koncentrace kovů v peří pak signifikantně pozitivně korelovaly s tzv. indexem dlouhodobého stresu u ptáků (vyšší poměr heterofilů:lymfocytům (H/L) v krvi).

Dále byl v případě dlouholetého monitoringu pražské populace sýkor koňader, založeného na opakovaně odchycených jedincích mezi roky 2006 - 2018, zjištěn slabý nelineární vztah mezi věkem zvířat a kontaminací krve olovem (Pb). Nejvyšší koncentrace Pb v krvi sýkor byly naměřeny zejména u zvířat v mláděcím věku (1. rok života) a poté u několika málo zvířat v nejpokročilejším věku (7-letí). Významný projev celoživotní akumulace Pb v organismu na aktuální kontaminaci krve dospělých zvířat tedy nebyl potvrzen. U těchto opakovaně odchycených jedinců byl dále zjištěn pozitivní vztah mezi aktuálními koncentracemi Pb, kadmia (Cd) i zinku (Zn) v krvi a celkovým i diferenciálním počtem leukocytů zvířat. Zvýšená proliferace leukocytů může být v tomto případě jak projevem negativního vlivu neesenciálních prvků (Pb a Cd; tj.

zvýšená úmrtnost buněk v důsledku toxicity), tak případným projevem pozitivního efektu zvýšených koncentrací esenciálního Zn (tj. zvýšená míra imunitní obranyschopnosti).

U žádné ze studovaných městských populací sýkor nebyla v našem případě zaznamenána souvislost mezi kontaminací krve či peří těžkými kovy a parametry fyzické kondice (standardizovaná hmotnost a šířka růstových proužků rýdovacích per) či kvalitou ornamentů peří (sytost žlutého zbarvení břišního ornamentu, plocha černého břišního pruhu). Samotná kondiční či zdravotní závislost primárních a sekundárních pohlavních znaků sýkor se nám nepodařila prokázat ani ve vybraném vzorku samců v pražské populaci sýkor. Jediný signifikantní vztah se v tomto případě projevil mezi celkovou variabilitou délky spermií a H/L indexem v krvi, kdy samci s vyšší kvalitou spermií vykazovali zároveň vyšší hladinu dlouhodobého stresu. Tento výsledek naznačuje možnost fungování tzv. teorie kompromisu u těchto zvířat, tedy že existuje volba mezi investicí do reprodukce a do vlastního sebeudržování.

Jsem přesvědčena, že výsledky této práce mohou přispět k rozvoji nových poznatků nejen v oboru ekologie a ochrany synantropních druhů, ale také v oboru ekotoxikologie či ochrany lidského zdraví.

Klíčová slova: hematologie ptáků, rizikové prvky, anémie, znečištění prostředí, ornamenty peří

Abstract

Anthropogenic pollution in the environment leads to the contamination of wildlife tissues with various toxic elements, such as heavy metals, which have a potential impact on the health and overall condition of the animals. In recent years, various species of free-living birds have been used to study these effects, especially in heavily polluted industrial areas. However, so far there have been no studies describing the wider geographical or temporal variability of heavy metal contamination levels in free-living synanthropic animals in different cities. Similarly, the potential direct or indirect effects of chronic sublethal exposure in cities on the health, condition or reproductive parameters of these animals have not yet been sufficiently studied. This thesis contains the results of the long-term monitoring of free-living urban great tit (*Parus major*) populations in the Czech Republic. Although the analysis of heavy metals in blood and feather samples showed that the level of body contamination varies between birds from different cities, the association with the dust air pollution concentrations in cities has not been demonstrated here. Furthermore, it was found that although none of the animals showed signs of acute chronic heavy metal poisoning, the detected sublethal concentrations of metals in the blood and feathers were related to partial health-dependent haematological parameters. Symptoms of anaemic blood disease (lower total erythrocyte count and slightly increased numbers of immature erythrocytes in the blood) were found in individuals with the highest blood metal concentrations (in this case, individuals captured in the industrially burdened city of Bohumín). The level of the feather metal concentration was significantly positively correlated with the long-term stress index in birds (i.e. higher heterophile:lymphocyte (H/L) ratio in the blood).

In the case of long-term monitoring of the Prague great tit population, based on repeatedly captured individuals during the years 2006 - 2018, a weak non-linear relationship was found between the age of the animals and their blood lead (Pb) contamination. The highest Pb concentrations were measured mainly in the cohort of nestlings (1st year of age) and a small group of highly senescent birds (minimum known age of 7 years). Thus, the significant manifestation of lifetime accumulation of Pb in the organism on the current blood contamination levels in adult animals has not been confirmed. In these repeatedly captured individuals, a positive relationship was found between the blood Pb, cadmium (Cd) and zinc (Zn) concentrations and the total and differential leukocyte counts of the animals. Increased leukocyte proliferation in this

case can be explained by both the negative effect of non-essential elements (Pb and Cd; i.e. increased cell mortality due to toxicity) and the positive effect of increased concentrations of essential Zn (i.e. increased immunocompetence).

The association between heavy metal blood or feather contamination and physical condition parameters (standardised weight and width of the growth bars of the tail feathers) or the quality of feather ornaments (saturation of the yellow carotenoid-based breast feather ornament, area of the black melanin-pigmented breast stripe) was not detected in any of the studied urban tit populations. Furthermore, no health/condition dependence of the primary and secondary sexual traits of the great tits was proved in selected males in the Prague population. In this case, the only significant relationship was between the total variability of the sperm length and the H/L index in the blood, where males with a higher sperm quality also showed a higher level of long-term stress. This result suggests a possible trade-off between individual investment in reproduction and self-maintenance.

I am convinced that the results of this work can contribute to the development of current knowledge not only in the field of ecology and synanthropic species conservation, but also in the field of ecotoxicology or human health protection.

Keywords: avian haematology, risk elements, anaemic disease, environmental pollution, feather ornaments

Obsah

1	Úvod.....	11
2	Literární rešerše	14
2.1	Těžké kovy a jejich zdravotní rizika	14
2.2	Volně žijící ptáci jako bioindikátory kvality prostředí	19
2.3	Způsoby detekce míry kontaminace těžkými kovy u ptáků.....	21
2.4	Vliv těžkých kovů na různé kondiční znaky ptáků	25
2.5	Vliv těžkých kovů na hematologické parametry ptáků.....	28
2.6	Vliv těžkých kovů na reprodukci a hnízdní úspěšnost ptáků.....	32
2.7	Akumulace těžkých kovů v těle ptáků a její změny v souvislosti s věkem	34
3	Cíle a hypotézy vlastního výzkumu.....	38
4	Publikované články.....	40
4.1	Článek 1	41
4.2	Článek 2	51
4.3	Článek 3	59
5	Shrnutí nejdůležitějších výsledků a diskuze	70
5.1	<i>Souvislost městského znečištění ovzduší v ČR se zdravotně a kondičně závislými znaky volně žijících sýkor koňader (článek 1)</i>	<i>70</i>
5.2	<i>Kvalita ejakulátu volně žijících samců sýkor koňader v souvislosti s jejich hematologickými zdravotně závislými znaky a kvalitou ornamentů peří (článek 2)...</i>	<i>72</i>
5.3	<i>Změny koncentrací těžkých kovů v krvi během stárnutí volně žijících sýkor koňader a jejich dopady na zdravotní a kondiční parametry zvířat</i>	<i>73</i>
6	Závěry	76
7	Přehled literatury.....	78
8	Přílohy.....	95
8.1	Prohlášení o autorském příspěvku	95
8.2	Doplňující informace k článku 1	97

8.3	Doplňující informace k článku 2.....	109
8.4	Doplňující informace k článku 3.....	110

„Jed od léku odlišuje pouze podávané množství.“

Philippus Aureolus Theophrastu Paracelsus

1 Úvod

Kvalita prostředí může ovlivňovat celkovou kondici a zdraví lidí i zvířat. Jedním z měřitelných aspektů kvality prostředí s potenciálními přímými negativními zdravotními dopady je přítomnost různých toxických látek a prvků, jako jsou těžké kovy (Assi et al. 2016; Isaksson 2015; Mann et al. 2011). Pod pojem těžké kovy (jinak také rizikové prvky či stopové kovy) je v této práci obecně zahrnována skupina kovů a polokovů se specifickou hmotností prvku větší než 5 g/cm³ (ČHMÚ 2016; Järup 2003; WHO 2007). Podle mezinárodní Úmluvy o dálkovém přenosu látek znečišťujících ovzduší (Convention on Long Range Transboundary Air Pollution - CLRTAP) sem lze zařadit arsen (As), kadmium (Cd), chrom (Cr), měď (Cu), rtuť (Hg), nikl (Ni), olovo (Pb) a zinek (Zn). Ačkoliv některé tyto prvky se ve stopovém množství vyskytují v prostředí přirozeně (a fungují také jako biogenní prvky – viz kapitola 2.1), převážná část těžkých kovů do prostředí vstupuje zejména jako antropogenní emise ze spalovacích procesů (spalování fosilních paliv a výroba energie, výroba a zpracování železa, metalurgie neželezných kovů, spalovny odpadu, výroba cementu, výroba skla, spalování pohonných hmot v dopravě) prostřednictvím navázání se na prachové částice (particulate matter – PM; ČHMÚ 1998; Vouk et Piver 1983). Emise těžkých kovů v prostředí jsou tedy problémem zejména průmyslových oblastí a měst. Nebezpečnost těchto prvků a jejich sloučenin tkví především v jejich perzistenci, vysoké mobilitě, toxicitě a schopnosti akumulace v prostředí, včetně rostlinných pletiv a živočišných tkání (Burger 2002; Mann et al. 2011; Ping et al. 2009). Přestože celkové emise těžkých kovů do ovzduší byly za posledních 40 let v Evropě výrazně sníženy (ČHMÚ 2016; Nriagu 1996), monitoring těchto toxických látek v prostředí a výzkum jejich dopadů na živé organismy je stále vysoce důležitým a aktuálním tématem (Berglund et al. 2012; Eeva et al. 2012; Schröder et al. 2010; Sucharová et Suchara 2002).

Z různých případových studií u lidí vyplývá, že chronické expozice i relativně nízkým (subletálním) koncentracím těžkých kovů mohou vést k poruchám či až k postupnému selhávání důležitých orgánových soustav (oběhová, dýchací, trávicí, vylučovací či rozmnožovací; EEA 2013, 2015; Järup 2003; WHO 2007). Dále může

docházet ke změnám psychickým, jako jsou změny osobnosti a chování, poruchy spánku, chronický stres, deprese, a neurologickým, jako je snížení inteligence, narušení neurobehaviorálního vývoje, zpomalení růstu, aj. (sledováno zejména u dětí, ale také u některých dospělých jedinců; Koller et al. 2004; Liu et al. 2014; Tchounwou et al. 2012). Podobně byly některé tyto příznaky popsány také u různých druhů savců žijících v blízkosti průmyslových zdrojů znečištění. Příkladem mohou být zjištěné poruchy tvorby a funkčnosti pohlavních buněk u samců jelenů evropských (*Cervus elaphus*) žijících v okolí těžební lokality Pb (Castellanos et al. 2015) či poruchy krvetvorby u myšicí křovinných (*Apodemus sylvaticus*) odchycených poblíž bývalých Pb a Zn hutí (Tête et al. 2015). V případě ptáků byl zjištěn například zhoršený vývoj motorických a kognitivních dovedností u mláďat racků stříbřitých (*Larus argentatus*), kterým bylo po vylíhnutí experimentálně dodáváno Pb (intraperitoneální aplikace acetátu Pb; Burger 1998; Burger et Gochfeld 1994).

V posledních letech jsou pro bioindikaci a studium negativního dopadů těžkých kovů na zdraví, kondici či reprodukční úspěšnost živočichů čím dál častěji využívány různé druhy volně žijících ptáků, a to zejména v průmyslově intenzivně znečištěných lokalitách (Belskii et al. 2005; Eeva et Lehtikoinen 1996; Janssens et al. 2003; Migula et al. 2000; více viz kapitoly 2.2 až 2.7). Naopak úroveň kontaminace těžkými kovy u běžných synantropních živočichů žijících ve městech zůstává v tomto ohledu méně prozkoumána. Přestože některé studie na ptácích potvrdily, že populace žijící ve městě mají vyšší míru kontaminace peří, krve či orgánů různými těžkými kovy než ptáci žijící ve venkovských lokalitách či dále od města (Meillère et al. 2016; Roux et Marra 2007; Scheifler et al. 2006; Swaileh et Sansur 2006), potenciální efekt městského prostředí na různé parametry zdraví a kondice zvířat zatím nebyl dostatečně objasněn. Existují studie, které prokázaly, že ptáci ve městech trpěli vyšší mírou stresu (Meillère et al. 2016) či horší kondicí mláďat (Roux et Marra 2007) v souvislosti s kontaminací těžkými kovy. Doposud však nebylo studováno, jak se liší míra kontaminace tkání a zdravotní a kondiční stav zvířat žijících ve městech různé velikosti s různou mírou zatížení znečištěním ovzduší nebo jak se mění individuální kontaminace zvířat žijících ve městě během jejich života.

Tato práce se zabývá potenciálními dopady znečištění prostředí těžkými kovy na zdraví a kondici volně žijících ptáků. Úvodní část rešerše je věnována dosavadním poznatkům o zdravotních rizicích těžkých kovů získaným z klinických a experimentálních studií

u lidí a zvířat. Poté následuje souhrnná evidence korelativních i manipulativních studií zabývajících se přímými i nepřímými vlivy těžkých kovů na různé složky života volně žijících ptáků včetně zahrnutí výsledků vyplývajících z vlastního výzkumu. Příložené publikované články pak obsahují kompletní popis vlastního výzkumu zaměřeného na studium souvislostí mezi kvalitou prostředí, úrovní kontaminace vybraných tkání těžkými kovy a různými zdravotně-kondičními či pohlavními znaky u volně žijících městských populací sýkor koňader v České republice.

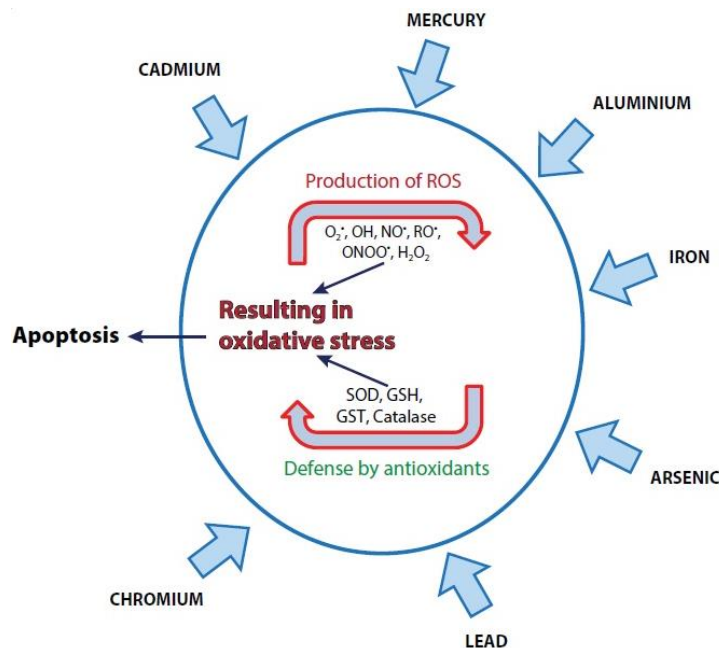
2 Literární rešerše

Následující literární rešerše má za cíl nejen podat ucelený přehled o studiích zabývajících se problematikou míry výskytu a efektu těžkých kovů ve volně žijících organismech, konkrétně ptácích, ale také kriticky zhodnotit dosavadní publikované výsledky a porovnat je (pokud možno) v kontextu s vlastním výzkumem.

2.1 Těžké kovy a jejich zdravotní rizika

Těžké kovy a jejich sloučeniny jsou do těla živočichů i lidí nejčastěji přijímány inhalací (vzduchem; absorbováno plicemi) či ingescí (ve vodě a v potravě; absorbováno gastrointestinálním traktem). Část skupiny těchto rizikových prvků tvoří tzv. esenciální kovy - Zn, Cu, Fe a Mg, které jsou v nízkých koncentracích potřebné pro správnou funkci organismu, jelikož se účastní oxidačně-redukčních reakcí a jsou součástí některých důležitých enzymů (Goyer et al. 2004; Järup 2003; Sharma et Agrawal 2005). Při vyšších koncentracích mají ovšem i tyto kovy toxické a karcinogenní účinky. Ostatní kovy, jako jsou například Pb, Cd, As a Hg, nejsou evidovány jako tělu prospěšné a mohou být velmi toxické již při relativně nízkých koncentracích (Goyer et al. 2004; Sharma et Agrawal 2005).

Po vstupu do organismu se těžké kovy váží většinou na proteiny, kde nahrazují původní esenciální kovy v jejich přirozených vazebných místech a způsobují tak selhání buněk, a nakonec otravu (Järup 2003). Tyto prvky mají také schopnost vytvářet vysoce reaktivní volné radikály (oxidativní stres), které vedou k dalšímu poškození buněk (Obr. č. 1), jako je vyčerpání enzymové aktivity, poškození lipidové dvojvrstvy a samotné DNA, či mohou vést ke vzniku různých karcinomů (Flora et al. 2008; Stohs et Bagchi 1995). Různé kovy mohou po vstupu do organismu zasahovat různé systémové a orgánové složky. Následující odstavce stručně popisují zdravotní rizika a mechanismy působení některých vybraných těžkých kovů.



Obr. č. 1. Vliv těžkých kovů na buňky a rovnováhu v produkci a odstraňování volných kyslíkových radikálů (ROS – Reactive Oxygen Species. Převzato z Jaishankar et al. (2014).

Olovo (Pb)

Absorbované Pb není rovnoměrně distribuováno v těle obratlovců. Nejprve nastává poměrně rychlý vstup do krve a měkkých tkání, poté následuje pomalá redistribuce do kostí a zubů. Naopak neabsorbovaná část kontaminace Pb je obvykle z těla vylučovaná močí a trusem (WHO 1995). Průměrná doba „životnosti“ Pb v krvi a jiných měkkých tkáních je okolo 26 - 36 dnů, zatímco v kostech je v řádech desítek let. Kostí, které akumulují Pb průběžně po celou délku života, mohou zároveň sloužit i jako endogenní zdroj tohoto rizikového prvku (Järup 2003; WHO 1995). Koncentrace Pb naměřené z krve tak mohou obsahovat kombinovanou informaci o celkové kontaminaci organismu, získanou jak z posledních několika dnů, tak za několik let (WHO 2007).

Je známo, že na retenci Pb v těle jsou daleko náchylnější mladí (děti/mláďata) než dospělí jedinci (vzhledem k vývoji orgánových soustav a kostí). U novorozenců olovo může pronikat méně vyvinutou hematoencefalitickou bariérou a může tak způsobovat poškození mozku a celkového vývoje centrální nervové soustavy (Järup 2003). V důsledku toho může docházet k pomalejšímu mentálnímu vývoji dětí, k jejich sníženému IQ či ke zvýšenému riziku vzniku sluchových a zrakových vad (Järup 2003; WHO 1995). Obdobně byla pozorována zhoršená schopnost učení a paměti u mladých

experimentálních potkanů a primátů exponovaných různými koncentracemi Pb (WHO 1995).

Poruchy rozmnožovací soustavy v důsledku působení Pb jsou popisovány jak u mužů, tak u samců různých obratlovců, kdy může docházet jak ke snížené produkci spermií, tak k jejich zhoršené funkčnosti či k morfologickým změnám (Assi et al. 2016; WHO 1995). Dále je pak známo, že může docházet k celkem snadnému přenosu Pb mezi matkou a plodem v době těhotenství, čímž může být negativně ovlivňován jeho růst a vývoj (WHO 1995). Obdobně je tomu i u ptáků, kdy samice mohou přenášet část své kontaminace do vajec. U lidí i u většiny experimentálních druhů zvířat (od myši až po primáty) bylo opakovaně potvrzeno, že kontaminace Pb způsobuje poruchy krvetvorby (projevy regenerativní anémie; Dumonceaux et Harrison 1994; WHO 1995). Dále může způsobovat poruchy funkce ledvin (WHO 1995). Mechanismy vlivu Pb na imunitní systém zatím nejsou známy. U experimentálních zvířat bylo pozorováno, že účinky Pb snižují celkovou odolnost a schopnost přežití v případě infikování různými bakteriálními či virovými onemocněními. Dále Pb může narušovat tvorbu protilátek a lymfoidní tkáň tenkého střeva. Vliv Pb na jednotlivé typy leukocytů zatím nebyl dostatečně popsán (WHO 1995, 2007).

Arsen (As)

Anorganický As patří do skupiny polokovů, nikoli kovů. Jedná se o silně toxický a karcinogenní prvek, který se ukládá především do kůže a kožních derivátů (vlasy, nehty, drápy, srst, peří; SZÚ 2017; WHO 2007), ale potenciálně může zasahovat i další orgánové soustavy (kardiovaskulární, nervovou, vylučovací, gastrointestinální i dýchací; Tchounwou et al. 2012). Průměrná doba „životnosti“ As v krvi je uváděna v řádech jednotek až desítek hodin (Lehmann et al. 2001).

Jedním z mechanismů toxických účinků As v organismu je narušení buněčného dýchání inhibicí různých mitochondriálních enzymů a odpojením oxidativní fosforylace. Dále se váže na sulfhydrylové skupiny proteinů a enzymů, kde často nahrazuje fosfor v různých biochemických reakcích (Tchounwou et al. 2012).

U lidí se chronická toxicita As projevuje nejčastěji různými vyrážkami, změnou pigmentace kůže až kožními lézemi. Při nižších koncentracích může docházet k onemocnění periferních cév, redukci množství erytrocytů (zvýšená hemolýza) a leukocytů (pozorováno i u myši; Sánchez-Virosta et al. 2015; Tchounwou et al. 2012).

Vyšší dlouhotrvající expozice mohou způsobovat rakovinu různých orgánů, jako jsou plíce, ledviny, močový měchýř a kůže (Jaishankar et al. 2014; Järup 2003; Sánchez-Virosta et al. 2015; WHO 2001b). U As je dále popsán genotoxický účinek, a to jak u lidí, tak u experimentálních zvířat, kdy může způsobovat poruchy DNA, chromozomální aberace či sesterské výměny chromatid (Sánchez-Virosta et al. 2015; Tchounwou et al. 2012).

Kadmium (Cd)

Kadmium je jedním z dalších velmi toxických kovů, který se nejvíce hromadí v ledvinách a dále zasahuje i kosti. Udávaná délka trvání „životnosti“ Cd v ledvinách je až desítky let, a může tak způsobovat četné poruchy funkce ledvin až jejich selhání (Faroon et al. 2012; Järup 2003).

Při ingestci Cd vstupuje nejprve do jater, kde se váže na metalothionein (protein bohatý na cystein), čímž způsobuje hepatotoxicitu. Posléze postupuje ledvin, v jejichž tkáni se postupně hromadí a způsobuje otravu i zde (Jaishankar et al. 2014). Při inhalaci (u lidí zejména v případě kuřáků různých tabákových výrobků) může dále docházet k různým poruchám dýchací soustavy až k rakovině plic (pozorováno jak u lidí, tak u pokusných myší; Faroon et al. 2012; Tchounwou et al. 2012; WHO 2007).

Kadmium dále negativně ovlivňuje metabolismus vápníku (Ca) a fosforu (P) v těle. Proto jsou v souvislosti s ním často pozorovány poruchy kostry, jako je bolest kostí, osteoporóza, zvýšená lámavost kostí, aj. (Järup 2003; WHO 2007). Mimoto v organismu často nahrazuje i železo (Fe), čímž negativně ovlivňuje krvetvorbu (snižuje koncentraci hemoglobinu a vzniká tak hemolytické anémie; Jaishankar et al. 2014). V této souvislosti je také uváděna větší náchylnost k retenci Cd u žen/samic, často trpících deficiencí Fe, zvláště pak v kombinaci s výhradně rostlinnou stravou (WHO 2007).

Přestože koncentrace Cd naměřené v krvi dobře korelují s koncentracemi naměřenými v moči, je známo, že v tomto případě krev odráží spíše nedávnou či aktuální expozici (například u kuřáků), zatímco moč lépe vystihuje celkovou dlouhodobou expozici organismu (Faroon et al. 2012; Tchounwou et al. 2012; WHO 2007).

Zinek (Zn)

Zinek je esenciální kov, který je součástí několika různých enzymů v těle a má mnoho důležitých fyziologických funkcí. Mimo jiné se významně podílí na metabolismu cukrů

(součástí inzulínu), procesu hojení, dělení a růstu buněk a odbourávání karbohydrátů v těle (Zargar et al. 2015). Jeho absorpce je řízena homeostatickými mechanismy, které zatím nejsou zcela objasněny, ale jsou převážně řízeny pankreatickou a střevní sekrecí (proteiny vázající kov - metalothionein a střevní bílkovina bohatá na cystein) a vylučováním stolice. Absorbovaný Zn se převážně ukládá do svalů, kostí, jater, slinivky, ledvin a jiných orgánů. Uváděná délka „životnosti“ zinku v těle je 4 až 50 dní u potkanů (v závislosti na aplikované dávce) a přibližně 280 dní u lidí (WHO 2001a).

Akutní otrava Zn způsobená inhalací vyvolala u experimentálních hlodavců respirační potíže, plicní edém a nadměrnou infiltraci leukocytů do plic. Akutní otrava orálním požitím pak způsobovala poruchy krvetvorby, histologické a funkční poruchy ledvin, poruchy jater a slinivky a zvýšené procento narozených mrtvých mláďat. Dále pak bylo pozorováno, že zvýšené koncentrace Zn v těle experimentálních zvířat souvisely se současnými sníženými hladinami ostatních esenciálních kovů, jako je Cu či Fe (WHO 2001a).

Měď (Cu)

Měď patří stejně jako Zn mezi esenciální kovy a slouží jako významný antioxidant. Dále je důležitou součástí řady kovových enzymů, které se podílí na tvorbě hemoglobinu, metabolismu sacharidů, biosyntéze katecholaminů, síťování kolagenu, elastinu a vlasového keratinu (ATSDR 2004). Při nadměrném množství může ovšem rovněž působit toxicky, jelikož přechody tohoto prvku mezi oxidovaným (Cu^{2+}) a redukovaným (Cu^+) stavem mohou vést k tvorbě superoxidových a hydroxylových radikálů v těle (ATSDR 2004; Tchounwou et al. 2012).

Měď je většinou vstřebávána v tenkém střevě, kde se při přebytečných koncentracích váže na protein metalothionein a je posléze vyloučen z těla. Nevyloučená Cu v této fázi může dále kolovat a hromadit se v játrech, ze kterých je obdobným způsobem (navázáním na metalothionein) postupně uvolňována do žluče a je vyloučena z těla. Přestože tyto homeostatické mechanismy brání organismus před vznikem otravy, expozice nadměrného množství Cu může prostřednictvím oxidativního narušení buněčných membrán a makromolekul způsobovat různé zdravotní potíže. Patří mezi ně poškození jater a ledvin, anémie, poruchy imunitního systému a poruchy vývoje plodu. Některé studie na experimentálních myších potvrzují, že nadměrná intoxikace Cu může poškozovat jak buněčnou, tak humorální složku imunity a může inhibovat růst embryí

i plodů (ATSDR 2004). Ptáci jsou podle dosavadních výsledků některých studií schopni tolerovat daleko vyšší koncentrace v organismu než různí savci. Díky tomu jsou případy evidence otravy Cu u ptáků velmi vzácné (Dumonceaux et Harrison 1994).

Přestože hodnoty letálních a subletálních dávek se zaznamenanými významnými fyziologickými změnami v organismu byly v několika studiích popsány jak u lidí, tak u různých experimentálních zvířat, rozmezí tolerance a toxicity prvku se zde velmi často výrazně liší. Rozdíly lze najít nejen vzhledem k živočišnému druhu (příklad u ptáků Tab. č. 1), ale i vzhledem k věku, pohlaví a v neposlední řadě způsobu kontaminace (inhalace/ingesce, systematicky aplikovaná/postupná; Dumonceaux et Harrison 1994; Järup 2003; Tchounwou et al. 2012; WHO 2007).

Při studiu expozice těžkých kovů u volně žijících druhů živočichů tak může docházet k překonávání deklarovaných prahových hodnot toxicity v organismu, a to i bez zaznamenání příznaků akutní otravy či smrti zvířete (Abbasi et al. 2015; Abdullah et al. 2015; Sánchez-Virosta et al. 2015). Dále je nutné zohlednit, že detekovaná míra kontaminace různými kovy může mít odlišné znaky expozice s různými typy analyzovaných tkání a biologických materiálů. Porovnatelnost výsledků různých experimentálních a eko-toxikologických studií tedy nemusí být mnohdy reálná.

Tab. č. 1. Předpokládané normální hodnoty Pb (v rámci tolerance organismu) v krvi u různých druhů ptáků. Souhrn z různých veterinárních studií. Převzato z (Dumonceaux et Harrison 1994).

Swan	6 µg/dl
Mallard	5 – 39 µg/dl
Canada Goose	10 – 37 µg/dl
Pigeon	17 – 81 µg/dl
Cockatiel	5 µg/dl
Most Psittaciformes	<20 µg/dl

2.2 Volně žijící ptáci jako bioindikátory kvality prostředí

Mezi dlouhodobě používané bioindikátory toxických látek v prostředí patří například houby (García et al. 1998; Lalotra et al. 2016), mechy (bryomonitoring; (Sabovljevi et al. 2009; Schröder et al. 2010; Sucharová et Suchara 2002)), vyšší cévnaté rostliny (např.

stromy; Nabais et al. 1999; Sæbø et al. 2015; Sawidis et al. 2011) či vodní mlži (Kraak et al. 1991; Rainbow et al. 2000; Strungaru et al. 2017). V posledních letech jsou pro tyto účely hojně užíváni i volně žijící ptáci (Furness et Greenwood 1993; Sánchez-Virosta et al. 2015). Odůvodněním vhodnosti takovéhoho využití ptáků může být zejména jejich výskyt v hojném počtu, dobře známá ekologie u většiny druhů, rychlý rozmnožovací cyklus a snadný způsob odběru různých vzorků pro analýzu znečišťujících látek, aniž by živočich musel být usmrcen (Anděl 2011). Nevýhodou využití ptáků jako bioindikátorů kvality prostředí mohou být jejich velké areály rozptylu (zejména u migrujících druhů) či například limitace v možném množství odebrané krve u některých malých druhů ptáků (pěvci).

Eko-toxikologické studie na ptácích lze rozdělit podle jejich zaměření. Některé výzkumy se zaměřují zejména na různé druhy dravců (Carneiro et al. 2015; Dauwe et al. 2003; Dietz et al. 2006; Sheffield 1997) a rybožravých vodních ptáků (Boncompagni et al. 2003; Borghesi et al. 2017; Zamani-Ahmadmahmoodi et al. 2010), a to s ohledem na možnost detekce bioakumulace těžkých kovů díky jejich poměrně vysokému postavení v potravním řetězci (více viz kapitola 2.7). Z těchto studií vyplývá, že mezidruhová variabilita v kontaminaci kovy u ptáků může být částečně vysvětlena jejich potravními preferencemi (Burger 2002; Carvalho et al. 2013). Nejvyšší kontaminace obecně dosahují karnivorní druhy, nižší omnivorní a hmyzožravé druhy a nejnižší pak semenožravé druhy ptáků (Abbasi et al. 2015).

Další početné výzkumy se věnují běžným terestriálním druhům (zejména různým druhům pěvců (Roux et Marra 2007) či holubů (Frantz et al. 2012)), jakožto bioindikátorům kvality prostředí na různých lokalitách. Detekce míry kontaminace u těchto druhů pak může strhávat větší pozornost veřejnosti, jelikož tyto druhy se běžně vyskytují v bezprostřední blízkosti člověka a lze z této míry tedy částečně vyvodit i zdravotní rizika z pohledu lidského zdraví (viz například novinový článek Tuček (2017) „Sýkorky sdělují, kde žijeme“ prezentující výsledky *článku 1*). Převážná většina dosavadních studií se v tomto případě ovšem zaměřuje spíše na kontaminaci těžkými kovy u zvířat žijících v bezprostřední blízkosti průmyslových zdrojů znečištění (kovové hutě a různé metalurgické závody). V této souvislosti bylo opakovaně pozorováno, že různé druhy volně žijících ptáků v industriálně kontaminovaných oblastech vykazují vyšší míry kontaminace kovy než jejich populace žijící v lesních biotopech mimo či dále od zdroje znečištění (například Belskii et Grebennikov 2014; Coeurdassier et al. 2012; Eeva et al. 2009; Geens et al. 2010; Migula et al. 2000). O něco menší počet studií se pak zabýval

kontaminací těžkými kovy ve městech. I v tomto případě bylo zjištěno, že městští ptáci jsou více zatíženi kontaminací různými kovy než ptáci žijící ve venkovských lokalitách či v lesích dále od města (Chatelain et al. 2017; Eens et al. 1999; Frantz et al. 2012; Meillère et al. 2016; Tansy et Roth 1970). V souvislosti se zvýšenou kontaminací těžkými kovy na různých lokalitách byla také v několika studiích popsána i snížená dostupnost vápníku (Ca) v prostředí, což bylo potvrzeno při analýzách trusu ptáků, jejich potravy či při analýzách půdy (Belskii et Grebennikov 2014; Espín et al. 2017; Ruiz et al. 2017). Tento jev ovšem může souviset jak se samotným deficitem Ca v prostředí, tak s vlastností těžkých kovů navázat se jak v organismu, tak v prostředí na místa pro něj nepůvodní a nahrazovat tak jiné prvky (jako je například Ca či P; WHO 2007). V našem případě výsledky monitoringu různých populací sýkor koňader v ČR ukázaly, že kontaminace krve i peří zvířat se v různých městech liší, avšak ne prokazatelně v souvislosti s úrovní znečištění ovzduší měst prachovými částicemi PM₁₀ (jakožto „nosičů“ těžkých kovů). Nejvyšší celkové koncentrace kovů v krvi byly nicméně naměřeny u několika samců pocházejících z průmyslově zatíženého města Bohumín (poblíž Ostravy), které v daném roce monitoringu zároveň vykazovalo nejvyšší průměrné roční znečištění ovzduší PM₁₀ částicemi (*článek 1*). Z těchto výsledků vyplývá, že významnou roli v kontaminaci zvířat bude hrát množství kovů již deponované v prostředí (nikoliv jen v ovzduší). Při dalším biomonitoringu by tedy měla být zohledněna i míra kontaminace těmito prvky v půdě či v potravě zvířat (jako například ve studiích (Eeva et al. 2005; Roux et Marra 2007).

2.3 Způsoby detekce míry kontaminace těžkými kovy u ptáků

Následující kapitola popisuje biologické vzorky u ptáků nejčastěji používané k vyhodnocení individuální míry kontaminace zvířat za předpokladu využití minimálně invazivních (nedestruktivních) metod.

Analýza vzorků krve

Krev je jedna z nejspolehlivějších biologických vzorků pro podchycení celkové kontaminace organismu těžkými kovy (Sánchez-Virosta et al. 2015; WHO 2007). Limitací je zde ovšem velikost zvířete. Zvláště u malých druhů ptáků je nutno zvážit možnost získání minimálního potřebného objemu vzorku krve pro analýzu těžkých kovů tak, aby zvíře nebylo odběrem nijak zásadně ohrožováno na zdraví (Campbell et Ellis

2007). Dle našich zkušeností je pro úspěšnou chemickou analýzu potřeba alespoň 5 μL krve (při ultrastopové analytické metodě hmotnostní spektrometrie ICP-MS). Potřebné množství je ovšem silně závislé na konkrétně zvolené metodě analýzy kovů (J. Hraníček *in verb*). Krev lze analyzovat buďto celou začerstva (použita ve většině případů studií; např. Carneiro et al. 2015; Evers et al. 1998; Geens et al. 2010) nebo odstředěnou zvlášť, tedy analyzovat krevní buňky (Coeurdassier et al. 2012) či krevní plazmu (Bailly et al. 2017; Bravo et al. 2005). Převážné množství těžkých kovů obsažených v krvi se ovšem váže na krevní buňky (pomocí enzymů), zatímco plazma obsahuje pouze cca 1 % celkové kontaminace krve (WHO 2007). Není tedy žádným překvapením, že koncentrace naměřené v samotných krevních buňkách silně korelují s koncentracemi naměřenými v celé krvi (Coeurdassier et al. 2012). Analýza obsahu těžkých kovů v krevních buňkách se ukázala jako vhodná metoda i v případě našeho výzkumu, jelikož uchování zbylé části vzorku krve (krevní plazmy) nám umožnilo testovat dále například antibakteriální aktivitu komplementu v plazmě (**článek 1**). Na rozdíl od peří kontaminace zvířete stanovená z odebraných vzorků krve vyjadřuje zejména velmi nedávnou a aktuální expozici zvířete, a může tedy posloužit jako dobrý indikátor kvality dané lokality v době odchytu (viz Tab. č. 2) nebo může odrážet přechodné či sezónní změny v expozici zvířat (Berglund et al. 2012; Geens et al. 2010; Pollack et al. 2017). Výsledky vlastního výzkumu zabývající se otázkou možnosti detekce akumulace vybraných těžkých kovů ze vzorků krve odebraných v různém věku života zvířat jsou dále popsány v kapitole 2.7.

Tab. č. 2. Průměrné koncentrace těžkých kovů ($\mu\text{g/g}$ mokré váhy \pm SE) v krvi sýkor koňader žijících v různé vzdálenosti od zdroje znečištění. UM = lokalita nejbližší hutím, do vzdálenosti 350 m, F8 = lokalita od 400 do 600 m vzdálenosti, F7 = ve vzdálenosti 2500 m, F4 = lokalita nejdále od zdroje, ve vzdálenosti 8500 m. Převzato z Geens et al. (2010).

	UM (n = 16)		F8 (n = 15)		F7 (n = 16)		F4 (n = 10)	
Cd	0.016 \pm 0.003	A	0.011 \pm 0.002	A	0.007 \pm 0.001	B	0.007 \pm 0.001	B
Co	0.35 \pm 0.08		0.25 \pm 0.05		0.25 \pm 0.04		0.23 \pm 0.07	
Cu	0.13 \pm 0.02		0.09 \pm 0.02		0.20 \pm 0.03		0.13 \pm 0.03	
Ni	0.11 \pm 0.03		0.14 \pm 0.03		0.13 \pm 0.05		0.18 \pm 0.03	
Pb	0.28 \pm 0.02	A	0.17 \pm 0.02	A	0.03 \pm 0.01	B	0.02 \pm 0.02	B
Zn	5.5 \pm 0.5		6.9 \pm 0.5		7.9 \pm 0.7		6.9 \pm 0.7	

Analýza vzorků peří

Další možnost jak zjistit míru kontaminace těžkými kovy u volně žijících ptáků, je analýza vzorků peří (Abdullah et al. 2015; Burger et Gochfeld 2000; Geens et al. 2010).

Depozice kovů do peří je u ptáků jedna z možností jak vytěsnit nadbytek toxických látek ze svého organismu (Abdullah et al. 2015; Malik et Zeb 2009). Jelikož tato depozice ovšem probíhá pouze v období růstu per (tj. během přepeřování po dobu cca po 3 týdnů; Borghesi et al. 2016, 2017; Burger et Gochfeld 1997), nelze obsah těžkých kovů v peří považovat za odraz aktuálního stavu zvířete, ale spíše jeho dlouhodobějšího hlediska. Koncentrace různých kovů naměřené v peří ptáků tedy nemusí korelovat s koncentracemi naměřenými v jejich krvi či jiných tkáních (Dauwe et al. 2005; Scheifler et al. 2006; **článek 1**). Chceme-li míru kontaminace peří použít jako relevantní údaj ke konkrétní lokalitě, je nutné toto načasování depozice zohlednit, a to obzvláště pokud se zabýváme migrujícími druhy ptáků. Tento fakt potvrzuje studie (Cooper et al. 2017), která porovnávala kontaminaci peří u dvou různých druhů (kardinálů červených *Cardinalis cardinalis* a tyranů chocholatých *Myiarchus crinitus*) hnízdících na stejné lokalitě. Zatímco průměrná kontaminace krve různými kovy byla u rezidentních kardinálů velice podobná jako u migrujících tyranů, kontaminace peří se mezi druhy výrazně lišila. Naopak v případě naší studie nebyla návaznost kontaminace těžkými kovy na odchyťovou lokalitu sýkor prokázána ani u krve ani u peří (**článek 1**). Dalším úskalím u analýzy vzorků peří může být externí znečištění kovy, které nastává i v době po ukončení růstu pera. Pokud je tedy cílem zpracování peří získat informaci pouze o vnitřní kontaminaci zvířete (z dlouhodobého hlediska), je nutné tyto vzorky důkladně opláchnout (Borghesi et al. 2016, 2017).

Na druhou stranu některé studie prokázaly, že míra kontaminace peří může částečně odrážet i míru dlouhodobé akumulace kovů v těle ptáků, jelikož pozitivně korelovala s koncentracemi naměřenými v různých orgánech (Dauwe et al. 2002; Kim et Koo 2008; Zamani-Ahmadm Mahmoodi et al. 2010; dále viz kapitola 2.7).

Analýza trusu

Míra kontaminace těžkými kovy u volně žijících ptáků může být hodnocena také z analýz trusu. Jedná se o neinvazivní a celkem spolehlivou metodu vzorkování často užívanou například u mláďat (Belskii et Grebennikov 2014; Eeva et al. 2009; Eeva et al. 2003; Ruiz et al. 2016) či u velkých dravců (Bravo et al. 2005). Podobně jako u peří či u vajec lze z koncentrací kovů v trusu zachytit pouze nadbytečnou část kontaminace vyloučenou organismem. Naměřené koncentrace kovů v trusu se tedy mohou lišit od koncentrací naměřených v krvi či v peří (Costa et al. 2012, 2014). Míra kontaminace trusu ovšem

na druhou stranu dobře odráží kvalitu a dostupnost potravy na dané lokalitě, zejména pak již jednou zmíněný deficit vápníku v prostředí (viz Tab. č. 3; (Belskii et Grebennikov 2014; Dauwe et al. 2004a; Eeva et Lehtikoinen 2004; Ruiz et al. 2017), či potravní preference u různých druhů ptáků (Bravo et al. 2005; Eeva et al. 2009).

Tab. č. 3. Průměrné koncentrace těžkých kovů a vápníku ($\mu\text{g/g}$ suché váhy \pm SE) v trusu mlád'at volně žijících lejsků černohlavých. Porovnání ze dvou odchytových lokalit: nejbližší ke zdroji znečištění (impact zone) a nejdále od zdroje znečištění (background zone). Převzato z Belskii et Grebennikov (2014).

Metal	Zone		Effect of zone ^a	
	Background	Impact	F	p
Cu	41.7 \pm 3.6	254.6 \pm 42.7	82.9	<0.001
Zn	424.9 \pm 44.8	777.7 \pm 92.9	11.1	0.004
Cd	6.4 \pm 0.7	23.8 \pm 3.6	34.9	<0.001
Pb	13.7 \pm 1.9	186.5 \pm 25.0	136.1	<0.001
Ca	3200.6 \pm 943.5	1758.2 \pm 479.6	2.7	0.12

^a One-way analysis of variance (ANOVA), metal concentrations were \log_{10} -transformed.

Analýza vajec

Jako vhodný biologický materiál k analýze těžkých kovů u ptáků mohou sloužit i jejich vejce. Přestože se v tomto případě jedná o jedinou zmíněnou destruktivní metodu vzorkování, je to jeden z mála způsobů, jak zjistit míru přenosu kontaminace ze samic na jejich mlád'ata. Samice mohou během tvorby vajec deponovat část vlastní kontaminace do vaječného obsahu i skořápek (Boncompagni et al. 2003; Hargitai et al. 2016; Zarrintab et Mirzaei 2017). Poměry ukládání kovů do různých složek vejce se ovšem mohou výrazně lišit (Tab. č. 4; Mora 2003). Obecně bývají ve vejcích detekovány nejvyšší koncentrace zejména Pb a Hg, které zde často nahrazují Ca (Lam et al. 2005; Ruuskanen et al. 2014; Scheuhammer 1987). Naopak As a Cd jsou ve vejcích většinou evidovány pouze ve velmi nízkých koncentracích (Burger et al. 1999; Tsipoura et al. 2011). Zvýšená intoxikace vajec těžkými kovy pak může negativně ovlivňovat jejich kvalitu, celkovou hnízdní úspěšnost i následnou schopnost přežití mlád'at (Burger 2002; Zarrintab et Mirzaei 2017; viz kapitola 2.6).

Tab. č. 4. Průměrné koncentrace kovů ($\mu\text{g/g}$ suché váhy \pm standardizovaná odchylka SD) ve vejcích a vaječných skořápkách, včetně poměru zastoupení kovů v těchto částech, u volně žijících tyranovců vrbových (*Empidonax traillii extimus*) a lesňáčků žlutoprstých (*Icteria virens*). Převzato z Mora (2003).

Element	Species					
	Yellow-breasted chat			Willow flycatcher		
	Egg	Eggshell	Eggshell/Egg	Egg	Eggshell	Eggshell/Egg
As	<0.5 ^a	2.1 \pm 0.4	8.4	<0.5	1.3 \pm 0.2	5.2
Ba	2.5 \pm 2	33.9 \pm 23	13.6	0.5 \pm 0.1	3.6 \pm 2.2	7.2
Cu	3.2 \pm 0.9	6.2 \pm 8	1.9	2.5 \pm 0.9	3.0 \pm 1.7	1.2
Mn	2.7 \pm 1.5	2.9 \pm 1.9	1.1	1.9 \pm 1.3	3.9 \pm 1.4	2.1
Ni	<0.5	4.1 \pm 3.6	16.4	<0.5	6.5 \pm 5.7	26
Pb	<0.5 ^b	0.6 \pm 0.7	2.4	<0.5	0.9 \pm 0.6	3.6
Se	3.0 \pm 0.8	0.5 ^c \pm 0.3	0.17	3.4 \pm 0.4	1.2 \pm 0.7	0.35
Sr	23.9 \pm 12.7	826 \pm 424	34.6	35.1 \pm 58	299 \pm 155	8.5
V	<0.5 ^d	5.2 \pm 1.3	20.8	<0.5	4.8 \pm 2.9	19.2
Zn	52.4 \pm 12.8	9.5 \pm 10	0.18	38.5 \pm 12.4	46.2 \pm 10.7	1.2

^a As was below detection limits in egg contents, except for 1 sample with 1.3 $\mu\text{g/g}$ dw. Used 0.5 the DL to calculate ratio.

^b Pb was not detected in egg contents of YBHCs or WIFLs. Used 0.5 DL to calculate ratio.

^c Se was detected above detection limits in 31% (8 of 26) of the eggshells.

^d Vanadium was found above detection limits in three YBCH egg contents. Used 0.5 DL to calculate ratio.

2.4 Vliv těžkých kovů na různé kondiční znaky ptáků

Negativní vliv kontaminace těžkými kovy na obecně užívané kondiční parametry ptáků spojené s nutriční, jako je standardizovaná hmotnost (hmotnost / délka tarsu), délka běháku (tarsus), délka křídla a délka ocasních per, byl pozorován zejména u mláďat vyrůstajících v blízkosti velkých zdrojů průmyslového znečištění (Eeva et al. 2009; Eeva et al. 1998; Eeva et Lehikoinen 2004; Koivula et al. 2011). Ve více kontaminovaných oblastech byla také zjištěna vyšší pravděpodobnost výskytu různých asymetrií a abnormalit růstu křídel a nohou u mláďat (pozorováno ve studii Eeva et Lehikoinen (1996) u lejsků černohlavých; v Eeva et al. (2000, 2003) a Janssens et al. (2003) u sýkor koňader). Ve většině případů takto oslabená mláďata brzy uhynou nebo se vzhledem k vysoké pravděpodobnosti predace nedožijí dospělého věku (Eeva et Lehikoinen 1996). U dospělých jedinců se negativní vliv kovů na morfologické kondiční znaky ve většině případů neprojevil (Dauwe et al. 2006; Eeva et al. 2009; Geens et al. 2009). V námi studovaných populacích městských sýkor koňader (pocházejících jak různých měst v ČR, tak pouze z Prahy) nebyla zaznamenána žádná signifikantní souvislost mezi kontaminací těžkými kovy a standardizovanou hmotností, délkou běháku či šířkou růstového proužku ocasních per u dospělců ani u mláďat (kontrolovány ve věku 15ti dní; *články 1 a 3*). Zvířata ve městech tedy pravděpodobně nedosahovala takové úrovně kontaminace kovy, která by významně limitovala jejich tělesnou hmotnost či růstový vývoj.

Dalšími parametry spíše fyziologické kondice zvířat, které mohou být v toxikologických studiích u volně žijících ptáků sledovány, jsou antioxidační kapacita krevní plazmy a oxidativní stres (Koivula et Eeva 2010). Zvýšený oxidativní stres byl zjištěn ve studii (Berglund et al. 2007) u mláďat lejsků černohlavých, která vyrůstala poblíž hutí sulfidových rud. Tato mláďata měla zvýšené antioxidační enzymy v krvi (glutathion reductázu a katalázu) a zároveň u nich byla zjištěna výrazná akumulace As, Cd, Hg, Pb, Fe a Zn v játrech. Obdobně byly ve studii Geens et al. (2009) naměřeny zvýšené koncentrace antioxidantů v krevní plazmě (tzv. Trolox ekvivalent antioxidační kapacity - TEAC, celkový protein, albumin a kyselina močová) u mláďat sýkor koňader pocházejících z okolí hutí neželezných kovů (Tab. č. 5). Detekce vlivů těžkých kovů na oxidativní stres může silně záviset na výběru biomarkerů měření. V některých případech se různé parametry oxidativního stresu mohou rozcházet (například v reakci na nedostatek Ca; Espín et al. 2017).

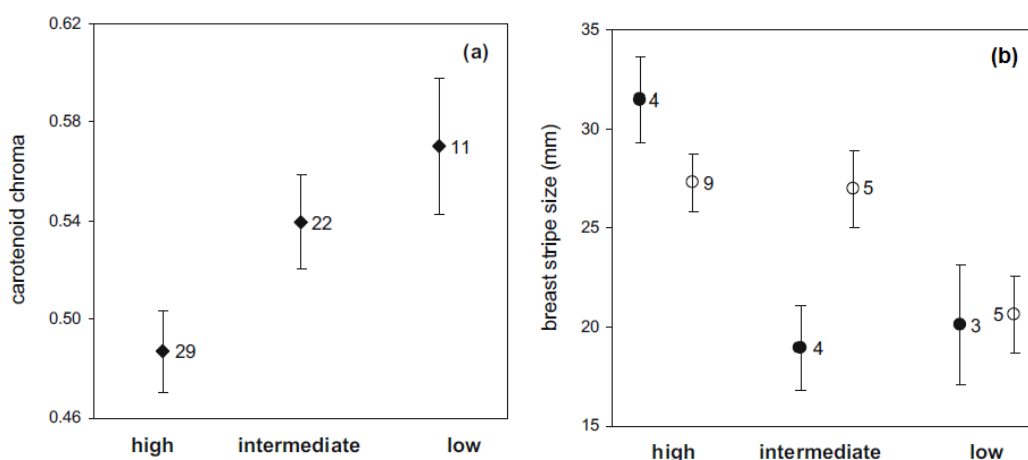
Významnými antioxidanty v krvi ptáků jsou i karotenoidy. Jedná se o neesenciální pigmenty, které se podílí jak na odstraňování volných radikálů z těla (Giraudeau et al. 2015; Møller et al. 2000), tak na zbarvení různých sekundárních pohlavních znaků ptáků (ornamenty peří, kůže či rohovitých kožních derivátů) účastnících se pohlavního výběru a jiné vizuální komunikace (Hill 2006; Peters et al. 2004). Kvalita karotenoidního zbarvení u ptáků tedy může signalizovat nejen potravní dostupnost karotenoidů v prostředí a celkovou kvalitu prostředí (Koivula et al. 2011), ale pravděpodobně i schopnost zvířete vypořádat se s případným oxidativním stresem (Geens et al. 2009; Møller et al. 2000; Olson et Owens 1998). Jelikož kontaminace těžkými kovy může zvyšovat oxidativní stres u zvířat, předpokládá se, že více exponovaná zvířata jsou nucena investovat více karotenoidů do antioxidačních procesů, což může vést naopak ke zhoršení kvality zbarvení karotenoidních ornamentů (horší sytost či jas zbarvení). To ukázali ve svých studiích např. Geens et al. (2009), Dauwe et Eens (2008) či Eeva et al. (1998), kde mláďata a dospělci sýkor koňader žijící poblíž industriálního zdroje znečištění vykazovali výrazně horší žluté zbarvení peří břišního ornamentu než jedinci žijící dále od zdroje znečištění (Obr. č. 2a). Vztah mezi kvalitou karotenoidního zbarvení peří a oxidativním stresem či antioxidační kapacitou jedinců se v těchto případech ovšem nepotvrdil (Geens et al. 2009; Koivula et al. 2011). Platnost teorie kompromisu (trade-off theory) mezi alokací karotenoidů do ornamentů a do antioxidace a sebeudržování organismu tak u ptáků stále není jasná (Giraudeau et al. 2015). Tuto teorii bohužel nejsme schopni potvrdit ani na základě vlastních pozorování, jelikož míra kontaminace krve ani

peří těžkými kovy nijak nesouvisela s kvalitou žlutého karotenoidního zbarvení peří u studovaných městských sýkor (**článek 1**). Na druhou stranu nejsme schopni podpořit ani platnost alternativní hypotézy o ornamentech jakožto spolehlivých vizuálních znacích individuální kvality a životaschopnosti samce (tj. viability indicator hypothesis - VIH; Andersson 1994; Hill 2011), tedy že kvalita karotenoidních ornamentů je pozitivně kondičně či zdravotně závislá, jelikož takovýto vztah nebyl prokázán ani u jedné z našich studií (**články 1 – 3**).

Znečištění těžkými kovy může potenciálně ovlivňovat i kvalitu melaninových ornamentů ptáků. Přestože melaniny jsou esenciální pigmenty (tělo si je dokáže vytvářet) a kvalita zbarvení je dána především geneticky (Norris 1993; Roulin et Dijkstra 2003), je známo, že může být dále ovlivňována hormony, potravní dostupností či schopností rezistence vůči parazitům (Griffith et al. 2006; McGraw 2008). Mimoto je také známo, že esenciální těžké kovy, jako Zn, Cu a Fe jsou nezbytné pro syntézu eumelaninových a feomelaninových pigmentů (McGraw 2003), a tudíž v tomto případě mohou kovy spíše podporovat kvalitu těchto ornamentů (McGraw 2007; Niecke et al. 2003). U volně žijících druhů ptáků byla tato závislost pozorována u sýkor koňader, kdy jedinci žijící v bezprostřední blízkosti měděných hutí měli větší břišní melaninový ornament než jedinci žijící dále od zdroje znečištění (Obr. č. 2b; Dauwe et Eens 2008). Efekt těžkých kovů na samotnou kvalitu zbarvení (sytnost či jas) melaninových ornamentů zatím nebyl příliš prokoumán (McGraw 2007). Dle mé evidence existují pouze dvě studie zabývající se touto tematikou (Chatelain et al. 2014, 2017). Práce Chatelain et al. (2017) popsala souvislost kontaminace peří Pb se zhoršenou jasností (brightness) iridiscentního peří na krku a současně se zhoršenou odrazivostí (reflektance) melaninového peří ve středních vlnových délkách u městských holubů (*Columba livia*). Naopak dodáním esenciálního Zn se odrazivost tohoto peří zlepšila v ultra-fialovém délkovém spektru. Žádná z dosavadních studií se zatím nezabývala případnými rozdíly ve vlivu těžkých kovů na kvalitu zbarvení eumelaninových a feomelaninových ornamentů peří. Vlastní výzkum v tomto případě nepotvrdil žádnou souvislost mezi kontaminací krve či peří sýkor esenciálními či neesenciálními kovy a kvalitou melaninového břišního ornamentu (vyjádřena velikostí plochy pruhu; **články 1 a 3**). Podobně jako u karotenoidních ornamentů se nám ani u melaninového břišního pruhu nepodařilo prokázat souvislost s kondičními parametry, parametry zdravotního stavu ani kvalitou samčích pohlavních buněk (**článek 2**).

Tab. č. 5. Průměrné koncentrace antioxidantů (průměr ± SE) v krvi mláďat sýkor koňader pocházejících z různě vzdálených lokalit od zdroje znečištění (UM = nejbliže, F4 = nejdále). Převzato z Geens et al. (2009).

	UM (0–350 m) (n = 60)	F8 (400–600 m) (n = 61)	F7 (2500 m) (n = 55)	F4 (8000 m) (n = 37)
Total protein (g/L)	40.2 ± 3.4 A	30.2 ± 0.9 B	33.9 ± 1.4 C	28.5 ± 4.1 C
Albumin (g/L)	13.3 ± 1.2 A	11.0 ± 0.2 B	10.6 ± 0.9 BC	9.2 ± 0.8 C
Triglyceride (mmol/L)	4.35 ± 0.23	4.41 ± 0.17	4.79 ± 0.44	4.14 ± 0.39
Uric acid (μmol/L)	1040 ± 78 A	1100 ± 57 A	802 ± 121 B	721 ± 53 B
Cholesterol (mmol/L)	3.94 ± 0.16	4.27 ± 0.11	4.44 ± 0.41	3.98 ± 0.33
TEAC (mmol Trolox equ./l)	2.82 ± 0.1 A	2.97 ± 0.07 A	2.3 ± 0.21 B	2.08 ± 0.22 B



Obr. č. 2. Průměrné hodnoty (± SE) (a) sytosti karotenoidního zbarvení (chroma) a (b) velikosti melaninového břišního pruhu u volně žijících sýkor koňader v závislosti na lokalitě jejich původu (high = lokalita nejvíce znečištěná těžkými kovy ve vzdálenosti do 0.5 km od zdroje, intermediate = středně znečištěná lokalita vzdálená 1 km od zdroje a low = nejméně znečištěná lokalita vzdálená 6 km od zdroje). V případě (a) jsou znázorněna obě pohlaví s kombinovaným věkem zvířat. V případě (b) jsou znázorněni pouze samci a to mladí do 1 roku (plné kolečko) a starší (prázdné kolečko). Převzato z Dauwe et Eens (2008).

2.5 Vliv těžkých kovů na hematologické parametry ptáků

S ohledem na možné projevy působení těžkých kovů na zdravotní stav je následující kapitola věnována různým hematologickým parametrům. Vyšetření krve je spolehlivá metoda analýzy individuálního zdravotního stavu, ke které stačí pouze velmi malé množství krve a není nijak zvlášť finančně ani postupově náročná (Campbell et Ellis 2007; Jones 2015). Je známo, že zejména neesenciální těžké kovy mohou

i při subletálních koncentracích způsobovat zvýšenou úmrtnost červených krvinek (erytrocytů), a tedy vznik hemolytické anémie (chudokrevnost projevující se zrychlenou krvetvorbou a neustálým vyplavováním nových nezralých buněk do oběhu; Campbell et Ellis 2007). Přesto byl tento parametr studován pouze v několika málo studiích zaměřených na volně žijící populace ptáků. Příznaky hemolytické anémie byly zjištěny například ve studii (Belskii et al. 2005), kde byla u mláďat lejsků černohlavých vyrůstajících v bezprostřední blízkosti měděných hutí zjištěna snížená koncentrace hemoglobinu a zvýšené poměrové zastoupení imaturních erytrocytů v krvi (Tab. č. 6). Obdobně byl detekován snížený objem hematokritu a celková koncentrace hemoglobinu u dospělých sýkor koňader žijících poblíž hutí neželezných kovů (Geens et al. 2010; Obr. č. 3). V některých studiích, které se zaměřovaly výhradně na celkový objem hematokritu, nebyl vliv těžkých kovů prokázán (Costa et al. 2014; Dauwe et al. 2006; Janssens et al. 2003). V těchto případech se ovšem může jednat o zkreslené výsledky v důsledku nedostatečně komplexního vyšetření krve. Jak je známo, celkový objem hematokritu není závislý pouze na počtu erytrocytů, ale i na jejich velikosti. Jelikož imaturní stadia erytrocytů jsou zpravidla objemnější než jejich zralá (maturní) stadia, je možné, že v případě jejich většího poměrového zastoupení v krvi (případ hemolytické anémie) se celkový objem hematokritu nemusí zásadně měnit či se může dokonce zvýšit (Carleton 2008; Dawson et Bortolotti 1997; Ewenson et al. 2001; Ots et al. 1998). Vyšetření diferenciálního počtu erytrocytů tedy může být pro přesnější identifikaci zdravotního stavu volně žijících zvířat stěžejní. Komplexní vyšetření krve bylo prováděno i během našeho výzkumu na sýkorách koňadrách. V souvislosti s vysokými koncentracemi těžkých kovů v krvi byly u několika jedinců pocházejících z nejvíce průmyslově zatíženého města detekovány snížené celkové počty erytrocytů a náznak zvýšeného zastoupení imaturních erytrocytů v krvi (**článek 1**).

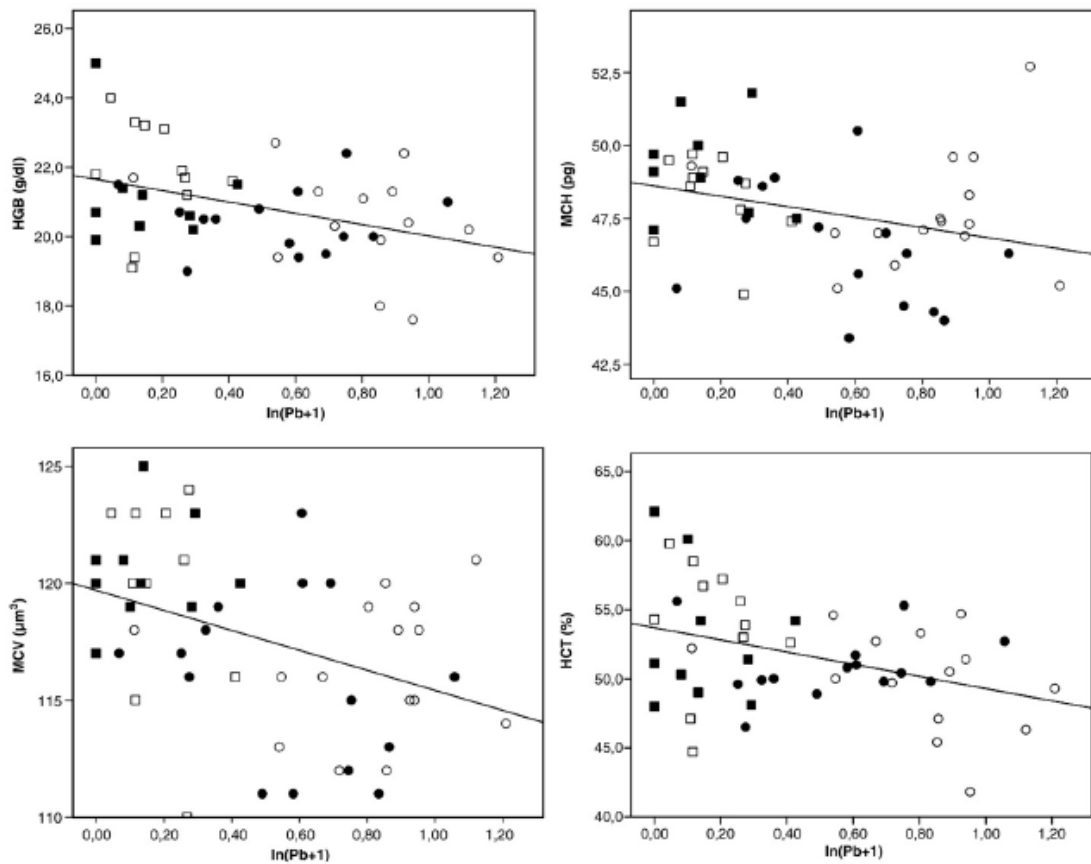
Působení toxických prvků se může projevat také na zvýšeném celkovém množství bílých krvinek (leukocytů) či na odchylkách v diferenciálních počtech různých leukocytů v krvi (Campbell et Ellis 2007). V tomto případě je sledován zejména poměr heterofilů/lymfocytům (H/L index), jakožto projev dlouhodobého stresu u ptáků (Davis 2005; Davis et al. 2008), či elevace počtu lymfocytů, heterofilů, bazofilů a eozinofilů naznačující probíhající zánět v těle (Campbell et Ellis 2007; Jones 2015; Sánchez-Virosta et al. 2015). Evidence efektu těžkých kovů na různé typy leukocytů je u volně žijících ptáků zatím nedostatečná. Studie (Belskii et al. 2005) se sice u mláďat lejsků zabývala analýzou diferenciálního počtu leukocytů, žádný z parametrů se ovšem nijak prokazatelně

nelišil mezi mláďaty pocházejícími z kontaminované či z referenční oblasti (Tab. č. 6). Podobně nebyl prokázán vliv průmyslového znečištění na celkový počet leukocytů či H/L poměr u mláďat sýkor koňader v Portugalsku (Costa et al. 2014). Naopak ve studii Eeva et Hasselquist (2005) zaznamenali snížený H/L poměr v krvi u dospělých lejsků černohlavých pocházejících z bezprostřední blízkosti měděných hutí. Tuto poměrně překvapivou závislost autoři vysvětlují elevací lymfocytů v důsledku imunitní odpovědi na antigen, který byl těmto samcům cíleně aplikován pro testování rychlosti jejich imunitní reakce. Samotný efekt znečištění lokality tedy mohl být touto manipulací zkreslen. Na druhou stranu v tomto případě ovšem bylo zjištěno, že samci pocházející z kontaminované oblasti měli silnější imunitní odpověď (nárůst počtu lymfocytů v krvi) na aplikovaný antigen než samci z kontrolní (nekontaminované oblasti). Přímá souvislost mezi subletální kontaminací těžkými kovy a počtem různých typů leukocytů nebyla zjištěna ani u hrdliček bělavokřídých (*Zenaida asiatica*) žijících v lokalitě dlouhodobě znečištěné persistentními organickými látkami a těžkými kovy (Lower Rio Grande Valley, USA; Fredricks et al. 2009). V případě vlastního pozorování jsme u sýkor pocházejících z různých měst v ČR zaznamenali pouze signifikantní pozitivní vztah mezi koncentracemi kovů v peří a H/L poměrem samců. Tento vztah lze vysvětlit pravděpodobným projevem dlouhodobého stresu v důsledku působení kovů (podobně jako u Meillère et al. (2016)). Zároveň byl ovšem také zjištěn slabý negativní vztah mezi aktuálními koncentracemi kovů v krvi samců a H/L poměrem. Tento vztah může být projevem toxického působení neesenciálních kovů na heterofily (naznačen snížený počet heterofilů u jedinců s nevyššími koncentracemi As v krvi; **článek 1**). Celkově tedy z našich výsledků vyplývá, že se aktuální úroveň kontaminace krve těžkými kovy může projevovat na počtu jednotlivých typů leukocytů v krvi ptáků, nicméně ne příliš jednoznačně v případě často používaného stresového H/L indexu. Zda kovy do určitých koncentrací způsobují elevaci leukocytů (v důsledku zvýšení imunitní obranyschopnosti) a od daných koncentrací naopak jejich výrazný úbytek (v důsledku nadměrné úmrtnosti buněk), je potřeba dále prozkoumat. Nejlépe pomocí experimentálně vedeného manipulativního výzkumu (řízená aplikace určitých dávek různých těžkých kovů).

Tab. č. 6. Vybrané krevní parametry mláďat lejsků černohlavých (*Ficedula hypoleuca*). Ptáci pocházeli z různě vzdálených lokalit od zdroje znečištění. Referenční zóna byla vzdálená více jak 15 km od zdroje, přechodová zóna (buffer) byla ve vzdálenosti 3 až 15 km a ohnisková zóna (impact) byla stanovena do 3 km od zdroje. Převzato z Belskii et al. (2005).

Parameter (%)	Zone		
	reference	buffer	impact
Hemoglobin, g/l	110.1 ± 1.9	101.1 ± 2.6*	97.9 ± 2.7*
<i>n</i>	55	52	45
Immature erythrocytes	9.1 ± 0.8	11.5 ± 0.8	16.9 ± 1.4
Leukocytes:			
Pseudoeosinophils	8.2 ± 1.2	4.5 ± 0.7	7.7 ± 1.3
Including:			
juvenile	0.5 ± 0.2	1.0 ± 0.3	0.8 ± 0.2
band	4.1 ± 0.6	1.9 ± 0.4	3.6 ± 0.6
segmented	3.6 ± 0.6	1.6 ± 0.3	3.3 ± 0.8
Eosinophils	3.8 ± 0.5	4.9 ± 0.7	5.4 ± 1.3
Basophils	11.2 ± 1.2	7.2 ± 0.8	10.3 ± 1.1
Monocytes	3.1 ± 0.6	3.5 ± 0.7	2.6 ± 0.4
Lymphocytes	73.7 ± 2.0	79.9 ± 1.8	74.0 ± 2.2
<i>n</i>	58	59	48

* Differences from the background parameters are significant at $p < 0.05$.



Obř. č. 3. Vztah kontaminace krve Pb (osa x) a různých krevních parametrů u sýkor koňader žijících v různých vzdálenostech od zdroje znečištění. HGB = koncentrace hemoglobinu (g/dl), MCH = průměrné množství hemoglobinu v erytrocytu (pg), MCV = střední objem erytrocytu

(μm^3), HCT = objem hematokritu (%). Lokality: UM (○) = neblíže ke zdroji, F8 (●) = F8 = lokalita od 400 do 600 m vzdálenosti, F7 (□) = ve vzdálenosti 2500 m, F4 (■) = lokalita nejdále od zdroje, ve vzdálenosti 8500 m. Převzato z Geens et al. (2010).

2.6 Vliv těžkých kovů na reprodukci a hnízdní úspěšnost ptáků

Reprodukční úspěšnost dospělců je dána mnoha faktory, především však kvalitou primárních pohlavních znaků. Několik klinických a laboratorních studií (u zvířat i u lidí) popsalo schopnost akumulace těžkých kovů (zejména Pb a Cd) v samčích varlatech a spermiích prostřednictvím navázání se na mnohočetné Ca^{2+} a draslíkové (K^{2+}) kanálky (de Angelis et al. 2017; Benoff et al. 2000; Dauwe et al. 2004b). Toxické účinky těchto kovů pak mohou mít za následek sníženou celkovou produkci spermií, jejich sníženou pohyblivost, krátkou životnost, horší akrozomální reakci či čtenější výskyt fragmentované DNA ve spermiích (pozorováno u lidí: ATSDR 2007, 2012; Benoff et al. 2000; Hernández-Ochoa et al. 2005; a u volně žijících jelenů: Castellanos et al. 2015; Reglero et al. 2009). Vliv nižších (subletálních) koncentrací na kvalitu spermií u volně žijících ptáků nebyl zatím dostatečně zkoumán, a není tedy známo, do jaké míry mohou tyto složky v prostředí ohrožovat celkovou reprodukční úspěšnost samců.

V Belgii studovali vliv znečištění prostředí kovy na počet spermií obsažených v perivitellinních membránách vaječných žloutků volně žijících sýkor modřinek (*Cyanistes caeruleus*). Nižší počet spermií v tomto případě byl zaznamenán u vajec pocházejících z bezprostřední blízkosti hutí neželezných kovů (Dauwe et al. 2004b). Vliv intoxikace Pb byl sledován i ve studii Vallverdú-Coll et al. (2016) u volně žijících orebicí rudých (*Alectoris rufa*). Přestože zvýšená kontaminace Pb měla negativní vliv na pohyblivost spermií a jejich akrozomální integritu, vliv na počet spermií či jejich životnost v tomto případě nebyl prokázán. Zároveň zde byl zjištěn pozitivní vztah kvality spermií samců s kvalitou jejich karotenoidních ornamentů a celkovým množstvím antioxidantů a karotenoidů v krvi. Samci s vyššími hladinami antioxidantů v krvi a lepším karotenoidním zbarvením tak mohli být schopni lépe odolávat vlivům oxidativního stresu způsobeného subletálními dávkami Pb na celkovou kvalitu spermií (Vallverdú-Coll et al. 2016). Tyto výsledky tedy podobně jako studie Peters et al. (2004) podporují případnou platnost hypotézy fenotypu spojeného s plodností (phenotype-linked fertility hypothesis – PFLH), tedy že exprese ornamentů peří samců může značit kvalitu pohlavních buněk

samců (Sheldon 1994). V případě vlastního výzkumu byl u městských samců sýkor koňader zjištěn negativní vztah mezi celkovou variabilitou v délce spermií a H/L poměrem v krvi. Samci s kvalitnějším ejakulátem (s nižší variabilitou v délce spermií) vykazovali vyšší hladinu dlouhodobého stresu v krvi než samci s horší kvalitou ejakulátu. Tyto výsledky naopak naznačují možný projev kompromisu mezi investicí do reprodukční schopnosti a vlastního sebeudržování (součástí tzv. „teorie konkurence spermií“ neboli sperm competition theory – SCT; Parker 1994). Tato teorie vychází z předpokladu, že existuje pouze omezené množství energie a zdrojů investovatelné do před-kopulačních a po-kopulačních znaků samců, což může vést k negativnímu vztahu mezi expresí ornamentů peří a kvalitou pohlavních buněk (Tomášek et al. 2017). Další souvislost kvality spermií samců s jejich standardizovanou hmotností či kvalitou karotenoidních a melaninových ornamentů peří v tomto případě nebyla prokázána (**článek 2**). Důvodem částečné nekonzistence výsledků v tomto směru může být variabilita mezi sledovanými parametry samčích pohlavních buněk (morfologie vs. motilita spermií). Pro budoucí výzkum by bylo přínosem experimentální ověření možnosti kontaminace spermií těžkými kovy (cílenou aplikací Pb či Cd) a následné sledování dopadů jak na morfologické, tak na funkční znaky spermií, či dále na kondiční a zdravotní znaky samců.

U volně žijících populací ptáků bylo dále několikrát zjištěno, že vliv těžkých kovů v průmyslově kontaminovaných lokalitách může mít významný negativní vliv na velikost snůšek, úspěšnost líhnutí a schopnost přežití mláďat (Belskii et al. 2005; Burger et Gochfeld 1997; Eeva et al. 2009; Eeva et Lehikoinen 1996, 2015; Migula et al. 2000; Ruuskanen et al. 2014). U ruských populací lejsků černohlavých žijících v různé vzdálenosti od měděných hutí bylo zjištěno, že průměrná velikost snůšky lejsků žijících nejbližší zdroji byla až 1.5krát nižší než snůšky lejsků žijících dále od zdroje (referenční populace; více jak 15 km od zdroje). Dále pak byla u této populace zjištěna 2krát nižší úspěšnost líhnutí i počet vyvedených mláďat na hnízdo a až 3.5krát vyšší mortalita vajec (Belskii et al. 2005). Snížená kvalita vajec a úspěšnost líhnutí může také souviset s deficitem vápníku v kontaminovaných oblastech i u samic samotných (Belskii et Grebennikov 2014; Eeva et Lehikoinen 2004). U volně žijících strak obecných (*Pica pica*) v Íránu bylo zjištěno, že blíže ke zdroji znečištění byly snůšky vajec sice větší než ve vzdálenějších oblastech, zároveň byla vejce ale objemově menší a vykazovala horší úspěšnost líhnutí (Zarrintab et Mirzaei 2017). Naopak v některých studiích nebyl vliv těžkých kovů na velikost vajec, tloušťku skořápek či celkovou hnízdní úspěšnost

prokázán (v blízkosti průmyslových zdrojů: Costa et al. 2014; Dauwe et al. 2004b; ve městě: Hargitai et al. 2016; na různých lokalitách v Evropě: Ruuskanen et al. 2014).

2.7 Akumulace těžkých kovů v těle ptáků a její změny v souvislosti s věkem

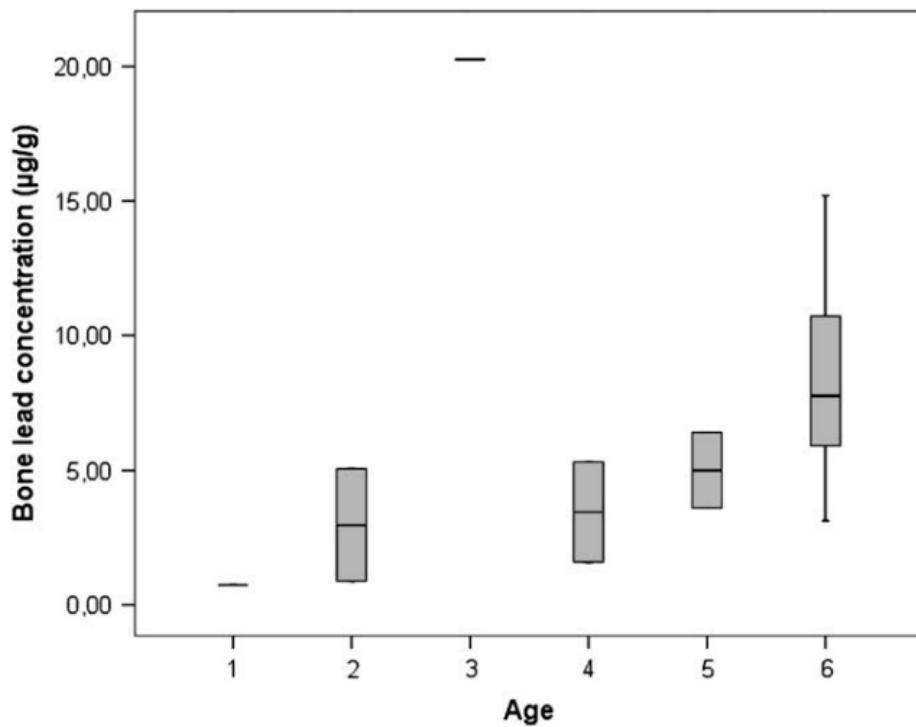
Je známo, že těžké kovy mají schopnost se akumulovat v těle živých organismů. Protože jsou tyto prvky do určité míry v prostředí přirozené, organismy jsou schopné tyto látky z těla různými způsoby vylučovat. Pokud jsou ovšem zvířata dlouhodobě vystavována vyšším koncentracím, než je přirozeně běžné, jejich organismus přestane být schopen se v dostatečné míře detoxikovat a dochází k postupné akumulaci kovů v dílčích tkáních (Mann et al. 2011). U ptáků je bioakumulace těžkých kovů (zde myšleno jako akumulace kovů v živočišných tkáních) nejčastěji sledována v souvislosti s postavením v potravním řetězci. Jak již bylo výše popsáno, největší množství těžkých kovů ve svém těle akumulují výhradně masožravé a mrchožravé druhy, až poté druhy hmyzožravé, všežravé či výhradně semenožravé (Abbasi et al. 2015; Berglund et al. 2011). Míra akumulace kovů v tělech ptáků může být dále mezidruhově i vnitrodruhově specifická (Berglund et al. 2011; Burger 2008; Roux et Marra 2007). U různých druhů mořských ptáků byly zaznamenány rozdíly v kontaminaci vajec těžkými kovy v souvislosti s potravními preferencemi druhu. Vyšší koncentrace vybraných kovů byly naměřeny u ptáků živících se většími rybami, nižší u těch živících se malými rybami či planktonem (Burger 2002). Přestože náš výzkum nebyl zaměřen na studium koncentrací těžkých kovů v potravním řetězci ptáků (jako např. u studie Fritsch et al. (2012)), naše výsledky ukázaly, že sýkory odchycené v hnízdní sezóně měly signifikantně vyšší aktuální koncentrace Cd a Zn v krvi než několik málo sýkor odchycených v zimě (**článek 3**). Domníváme se, že tento rozdíl lze vysvětlit právě změnami v potravním složení sýkor během roku. Na jaře a v létě se tento druh krmí převážně hmyzem a housenkami bohatými na obsah těžkých kovů, a naopak v zimě se živí výhradně semeny a rostlinnou potravou, která má zpravidla nižší obsah kovů (Eeva et Hasselquist 2005; Fritsch et al. 2012; Ping et al. 2009).

Míra akumulace různých těžkých kovů v organismu dále pochopitelně souvisí s individuální schopností dekontaminace organismu a s věkem zvířat (Furness 1993). Jak již bylo popsáno v kapitole 2.1, různé kovy mají různá místa navázání a depozice v organismu. Koncentrace kovů naměřené v organismu se tedy mohou výrazně lišit

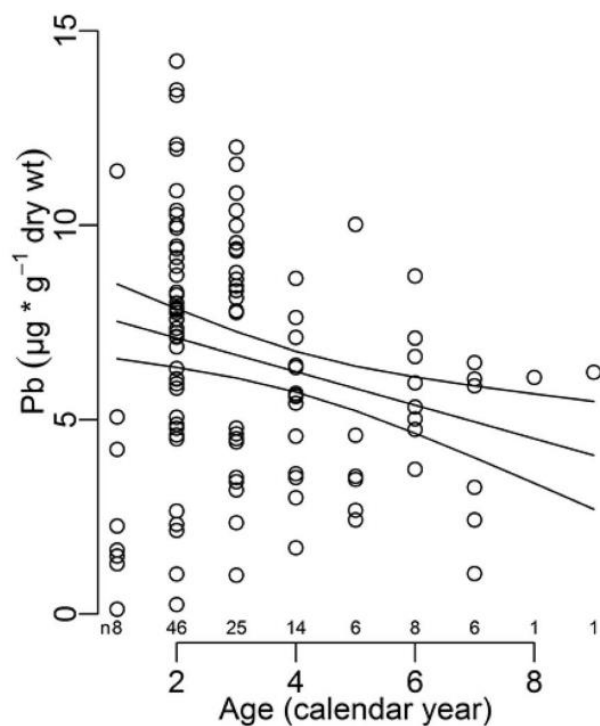
v závislosti na typu analyzované tkáně. Z různých studií na volně žijících ptácích bylo potvrzeno, že nejvyšší koncentrace Pb jsou nejčastěji naměřeny v kostech, zatímco například nejvyšší koncentrace Cd bývají naměřeny v ledvinách či játrech (Deng et al. 2007; García-Fernández et al. 1996; Janaydeh et al. 2018; Swaileh et Sansur 2006; Vanparys et al. 2008). Dále pak bylo popsáno, že koncentrace Pb naměřené v kostech supů mrchožravých (*Neophron percnopterus*) byly u starších zvířat signifikantně vyšší než u mladších (1 a 2 letí jedinci, Obr. č. 4; Gangoso et al. 2009). Několik dalších studií analyzujících různé vnitřní orgány se pak shodovalo na tom, že míra kontaminace neesenciálními kovy (nejčastěji Pb a Cd) byla výrazně nižší u mládřat než dospělých jedinců (Berglund et al. 2011; García-Fernández et al. 1996; Maedgen et al. 1982; Nam et al. 2004; Swaileh et Sansur 2006). Na druhou stranu existují i práce zabývající se studiem akumulace kovů v těle zvířat ze vzorků krve či peří volně žijících ptáků (viz korelace koncentrací kovů v různých orgánech s koncentracemi v peří či krvi v (Dauwe et al. 2002; García-Fernández et al. 1996; Thompson et al. 1991), které se ve svých výsledcích již tolik neshodují. Některé potvrzují vyšší kontaminaci kovy u dospělců než u mládřat (pozorováno v případě Pb v krvi u studií Fritsch et al. 2012, Van Wyk et al. 2001; či v případě Hg v peří u Evers et al. 1998, Thompson et al. 1991). Naopak jiné buďto nezaznamenaly žádný rozdíl mezi kontaminací mládřat a dospělců (Coourdassier et al. 2012; Janssens et al. 2001; Meillère et al. 2016), nebo dokonce mládřata vykazovala vyšší míru kontaminace kovy než dospělci (Fritsch et al. 2019; Nyholm 1994; Obr. č. 5). Toto potlačení rozdílů v kontaminaci krve či peří dospělců a mládřat je často vysvětlováno právě zvýšenou dostupností potravy bohaté na těžké kovy během hnízdní sezóny, a to jak u intenzivně krmených mládřat, tak u samotných dospělců (Eeva et al. 2005; Janssens et al. 2001; Nyholm 1994). Při zohledňování dosavadních výsledků je ovšem nutné zdůraznit, že naprostá většina výše zmíněných studií zabývajících se akumulací kovů s věkem u různých druhů volně žijících ptáků nezahrnovala opakované vzorkování jedinců (s výjimkou studie Evers et al. 1998). Proces akumulace kovů během života ptáků v různých stádiích jejich věku tedy doposud nebyl dostatečně obeznámen.

Výsledky vlastního pozorování, založené na opakovaných odchycích v pražské populaci sýkor koňader, ukázaly slabou věkovou nelineární závislost u kontaminace Pb v krvi zvířat (u Cd a Zn nikoliv). Nejvyšší koncentrace Pb byly naměřeny mláděcím věku a poté u několika nejstarších jedinců (ve věku 7 let). Po dodatečném zohlednění pouze dospělých zvířat (stáří 2 roky a výše) ovšem tento vztah mezi individuálním věkem a kontaminací krve Pb již nebyl statisticky průkazný. Z našich výsledků tedy vyplývá, že

hladiny kovů v krvi skutečně odrážely spíše aktuální dostupnost prvků v prostředí a byly pouze minimálně ovlivněny mírou celoživotní akumulace kovů v organismu (*článek 3*). Otázkou ovšem zůstává, jak by tomu bylo v případě zvířat pocházejících z výrazněji kontaminovaných oblastí.



Obr. č. 4. Koncentrace Pb v kostech různě starých supů mrchožravých pocházejících z ostrova Fuerteventura (Kanárské ostrovy). Převzato z Gangoso et al. (2009).



Obr. č. 5. Souvislost koncentrace Pb v peří (v $\mu\text{g/g}$ suché váhy) s věkem volně žijících kosů černých (*Turdus merula*) v městských parcích ve Štětíně (Polsko). Věk zvířat byl stanoven podle charakteristik peří a dle roku prvního okroužkování jedinců. Kontaminace těžkými kovy byla měřena u každého jedince pouze jednou (nikoliv opakovaně). Převzato z Fritsch et al. (2019).

3 Cíle a hypotézy vlastního výzkumu

Modelovým druhem pro vlastní výzkum byla sýkora koňadra (*Parus major*), celoevropsky rozšířený stálý synantropní druh, v České republice početně zastoupený v lesích všech typů (cca do 1200 m.n.m.) i v blízkosti lidských obydlí a městských částí (Šťastný et al. 2011).

Cílem výzkumu bylo popsat, **jak se liší míra kontaminace vybranými těžkými kovy v krvi a peří volně žijících sýkor koňader v různých městech v ČR.** Dále zjistit, **jaká je souvislost mezi individuální kontaminací krve či peří zvířat a jejich hematologickými zdravotně závislými a kondičními znaky.** V souvislosti s analýzou zdravotního stavu a kondice volně žijících sýkor byly také ověřovány dvě hypotézy: i) hypotéza „fenotypu spojeného s plodností“ (PFLH), a ii) teorie kompromisu (trade-off theory) mezi investicí do před-kopulačních a po-kopulačních samčích znaků (součástí tzv. teorie „konkurence spermií“ neboli SCT). Tedy **zda spolu mohou fenotypově plastické primární i sekundární pohlavní znaky samců (tj. kvalita spermií a kvalita ornamentů peří) ovlivnitelné faktory prostředí a individualitou jedince pozitivně souviset, a sloužit tak jako vizuální znak reprodukčního úspěchu pro samice (i).** Nebo **zda existuje určitá strategie kompromisu mezi investicí energie a látek do reprodukce a do „sebeudržování“ jedince (tj. kvalita spermií vs. zdraví či kvalita ornamentů peří; ii).** V neposlední řadě bylo cílem zjistit, **jak se mění koncentrace těžkých kovů v krvi městských volně žijících sýkor během jejich života, a zda může míra kontaminace krve odrážet schopnost akumulace kovů v těle zvířat během jejich stárnutí.** Na základě dosavadních poznatků shrnutých v literární rešerši byly stanoveny následující otázky (O) a hypotézy (H) vlastního výzkumu.

O1: *Jak se liší kontaminace krve a peří těžkými kovy u volně žijících sýkor koňader pocházejících z různých měst v ČR o různém znečištění prachovými částicemi (PM₁₀)?*

Míra kontaminace krve a peří sýkor těžkými kovy se v různých městech bude lišit. Koncentrace kovů naměřené v krvi budou pozitivně korelovat s průměrnými ročními koncentracemi PM₁₀ v ovzduší na odchyťových lokalitách (**H1a**). Naopak u peří se zjištění této souvislosti s lokalitou vzhledem k načasování depozice kovů neočekává (**H1b**). (*článek 1*)

O2: *Jak souvisí míra kontaminace těžkými kovy v krvi a peří těchto zvířat s různými zdravotně závislými hematologickými a kondičními znaky sýkor?*

U jedinců s vyšší kontaminací krve těžkými kovy se dá očekávat výskyt anemického nemocnění (snížené celkové počty erytrocytů, vyšší poměrové zastoupení imaturních erytrocytů) a zvýšených hladin leukocytů v krvi (vyšší absolutní počet leukocytů, vyšší poměr heterofilů : lymfocytům; **H2a**). Dále pak samci s vyššími koncentracemi kovů v krvi i peří budou vykazovat sníženou nutriční kondici (menší růstové proužky rýdovacích per; **H2b**) a horší karotenoidního zbarvení peří (nižší sytost žlutého zbarvení; **H2c**). S ohledem na podporující efekt těžkých kovů na melanogenezi je naopak očekáváno, že samci s vyšší kontaminací těžkými kovy budou vykazovat větší velikost melaninového ornamentu než samci s nižší kontaminací (**H2d**). (*článek 1*)

O3: *Jak souvisí individuální zdravotní stav a kondice samců volně žijících sýkor koňader s kvalitou jejich primárních a sekundárních pohlavních znaků?*

Dle VIH (viability indicator hypothesis) se dá očekávat, že samci v horším zdravotním a kondičním stavu budou zároveň vykazovat horší kvalitu karotenoidního či melaninového ornamentu (méně syté zbarvení žlutého břišního peří; menší plocha černého břišního pruhu; **H3a**) a také horší kvalitu spermií (horší morfologické parametry; dle PFLH; **H3b**) než samci v lepším zdravotním stavu a kondici.

Alternativně lze dle SCT předpokládat, že samci s vyšší kvalitou spermií budou naopak vykazovat horší expresi ornamentů peří (**H3c**) či budou v horším kondičním a zdravotním stavu (**H3d**). (*článek 2*)

O4: *Jak se mění míra kontaminace krve těžkými kovy v průběhu života volně žijících sýkor koňader?*

S ohledem na možnost částečné redistribuce Pb akumulovaného v kostech zpět do krevního oběhu očekáváme, že koncentrace Pb v krvi bude s věkem zvířat narůstat (**H4a**). U jiných kovů se zjištění pozitivního vztahu mezi koncentrací v krvi a věkem zvířat neočekává vzhledem k odlišným místům depozice v těle (**H4b**).

Dále lze očekávat, že se kontaminace krve kovy se bude lišit s ohledem na pohlaví jedinců, jelikož samice mohou v hnízdním období část své tělesné kontaminace snížit depozicí do vajec (**H4c**). (*článek 3*)

O5: *Jak se změny v kontaminaci krve těžkými kovy v průběhu života ptáků projevují na jejich zdravotně a kondičně závislých znacích?*

Potenciální zvýšení koncentrací těžkých kovů v krvi v průběhu života zvířat bude souviset se zhoršením zdravotního stavu (výskyt anemického onemocnění, vyšší H/L poměr a vyšší celkové počty leukocytů v krvi; **H5a**), horší nutriční kondicí (nižší standardizovaná hmotnost, **H5b**) či horší kvalitou karotenoidního ornamentu peří (**H5c**). Naopak zvýšení koncentrací vybraných kovů v krvi by mohlo podpořit expresi melaninového ornamentu peří (**H5d**). (*článek 3*)

4 Publikované články

Níže jsou uvedeny vědecké články publikované v recenzovaných časopisech, které představují jádro vlastního výzkumu této disertační práce. Prohlášení o autorském příspěvku a doplňující informace (supplementary material/supporting information) publikované spolu s těmito články jsou k dispozici v příloze na konci práce.

Článek 1

Bauerová P., Vinklerová J., Hraníček J., Čorba V., Vojtek L., Svobodová J., and Vinkler M. 2017. “Associations of urban environmental pollution with health-related physiological traits in a free-living bird species.” *Science of the Total Environment* 601–602:1556–65. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.05.276>

Článek 2

Svobodová J., **Bauerová P.**, Eliáš J., Velová H., Vinkler M., and Albrecht T. 2018. “Sperm variation in great tit males (*Parus major*) is linked to a haematological health-related trait, but not ornamentation.” *Journal of Ornithology* 159(3):815–22. <https://doi.org/10.1007/s10336-018-1559-7>

Článek 3

Bauerová P., Krajzingrová T., Těšický M., Velová H., Hraníček J., Musil S., Svobodová J., Albrecht T., and Vinkler M. 2020. “Longitudinally monitored lifetime changes in blood heavy metal concentrations and their health effects in urban birds.” *Science of the Total Environment* 723. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.138002>



Associations of urban environmental pollution with health-related physiological traits in a free-living bird species



Petra Bauerová^{a,b}, Jitka Vinklerová^a, Jakub Hraníček^c, Vojtěch Čorba^a, Libor Vojtek^d, Jana Svobodová^b, Michal Vinkler^{a,*}

^a Charles University, Faculty of Science, Department of Zoology, Viničná 7, 128 44 Prague 2, Czech Republic, EU

^b Czech University of Life Sciences Prague, Faculty of Environmental Sciences, Department of Ecology, Kamýcká 1176, 165 21 Prague 6, Czech Republic, EU

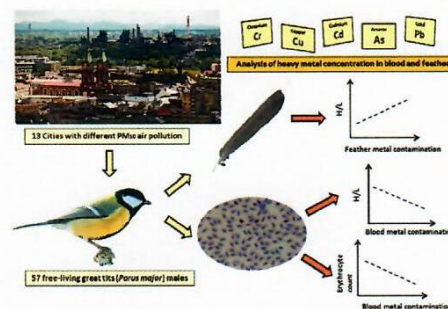
^c Charles University, Faculty of Science, Department of Analytical Chemistry, Hlavova 8, 128 43 Prague 2, Czech Republic, EU

^d Masaryk University, Faculty of Science, Department of Experimental Biology, Kotlářská 2, 611 37 Brno, Czech Republic, EU

HIGHLIGHTS

- Cities varying in air pollution can vary in organism heavy metal contamination.
- Across regions heavy metal contamination in the great tits was linked to health.
- Higher blood contamination was associated with lower H/L in blood.
- Increased blood contamination was related to decreased erythrocyte counts.
- Urban pollution may affect physiology of synanthropic free-living organisms.

GRAPHICAL ABSTRACT



ARTICLE INFO

Article history:

Received 17 January 2017

Received in revised form 30 May 2017

Accepted 30 May 2017

Available online xxx

Editor: D. Barcelo

Keywords:

Anthropogenic pollution

Anemia

Animal hematology

Hematopoiesis

PM10

Trace metals

ABSTRACT

Urban environmental pollution results in contamination of the tissues of synanthropic organisms by toxic trace elements with potential impacts on human health. Passerine birds may serve as convenient indicators of such contamination. In this study we investigated the effect of blood and plumage contamination with heavy metals (lead Pb, cadmium Cd, copper Cu, chromium Cr) and arsenic metalloid (As) on condition, health and ornamental colour in free-living great tit (*Parus major*) males from 13 cities across the Czech Republic (EU), mist netted during the early breeding season (April–May). Our results showed a significant association of heavy metal tissue contamination with immune function, namely leukocyte composition in the avian blood circulation. High heavy metal contamination in bird feathers was linked to a high heterophil/lymphocyte (H/L) ratio, indicating long-term stress in individuals inhabiting heavily polluted environments. In contrast, males with higher concentrations of heavy metals in blood had a lower H/L ratio, assumingly due to the direct toxicity of heavy metals in certain cell types. This is also supported by traits indicative of anaemia-like haemolytic conditions (decreased absolute erythrocyte count) and increased haematopoiesis (a tendency for increased frequencies of immature erythrocytes). We did not find any association of heavy metal contamination with the bacteriolytic activity of plasma complement, feather growth or ornamentation (black breast stripe area and yellow colouration). There was no significant relationship between heavy metal contamination in blood or feathers and PM₁₀ pollution at the study sites. Our correlational study is the first to show on a large geographic scale that despite strict European air pollution regulations and regular monitoring that have allowed general improvements in

* Corresponding author at: Department of Zoology, Faculty of Science, Charles University, Viničná 7, 128 44 Prague 2, Czech Republic, EU.
E-mail address: michal.vinkler@natur.cuni.cz (M. Vinkler).

atmospheric contamination, non-degradable heavy metals persistently contaminate animal blood and feathers in anthropogenic environments at levels that may have subclinical yet physiological effects with varied influence on health.

© 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Metals are released into urban environments through atmospheric particulate matter pollution (including $PM_{10} < 10 \mu m$ particles) and waste water, both commonly related to industrial production. Given the impacts of pollution on health of living organisms (Jarup, 2003; WHO, 2007) the potential environmental risks associated with industrial development must be considered. Heavy metals and metalloids (for simplicity considered as heavy metals in this article) are especially dangerous due to their persistence, high mobility and ability to accumulate in human and animal tissues (Mora, 2003; Walker et al., 2012). The world-wide understanding of the severity of this issue (WHO, 2000) has led most countries to establish measures reducing particulate matter and heavy metal emissions (WHO, 2006a; WHO, 2006b). In the Czech Republic the Clean Air Act No. 201/2012 Coll. (reflecting present EU directives) sets hygienic limits for PM_{10} air pollution and some metals (e.g., arsenic (As), cadmium (Cd), nickel (Ni) and lead (Pb); also EEA, 2015). For other metals (e.g. chromium (Cr), copper (Cu) and mercury (Hg)) no legal measures have yet been set, even though their ecological importance in the environment is significant.

It has been shown that simple contamination of the environment with heavy metals may not reliably reflect their absorption rates and physiological effects in living organisms (Scheifler et al., 2006). Therefore, biological indicators of such a relationship are needed to monitor environmental quality (Burger and Gochfeld, 2001). Avian tissue contamination has been frequently considered a valuable and cost-effective bioindicator of environmental pollution (Burger and Gochfeld, 2001). Unlike most other tissues such as lungs, kidneys or liver (Cui et al., 2016), feathers (Bianchi et al., 2008; Dauwe et al., 2002a; Dauwe et al., 2000; Markowski et al., 2013) and avian blood (Carneiro et al., 2015; Coeurdassier et al., 2012; Costa et al., 2014; Geens et al., 2010) may serve as non-destructive and easy-to-obtain biological materials for such monitoring. Heavy metal contamination in feathers is assumed to be representative of intra-annual exposure (Dauwe et al., 2002a). It has been documented that heavy metals deposited into tail feathers (rectrices) reflect the levels in key internal tissues resulting from long-term accumulation (Dauwe et al., 2002b). In contrast, blood is a transport medium and accumulation of heavy metals there is unlikely. Thus, blood contamination reflects immediate exposure (Geens et al., 2010; Scheifler et al., 2006), and there is typically no correlation between blood and feather heavy metal contents (Dauwe et al., 2005).

In wild animals, toxic metals may have direct measurable negative physiological effects even in low sublethal concentrations (Geens et al., 2010; Hawley et al., 2009; Janssens et al., 2003). Effects on bird physiology (Aggarwal et al., 2008), reproduction (Belskii et al., 2005; Eeva et al., 2009; Eeva and Lehikoinen, 2015), diet composition (Eeva et al., 1998; Geens et al., 2009) and nutritional condition (Blanco et al., 2004; Eeva et al., 1998) have been reported. Pb, Cd and Cu in particular have also been reported to directly alter antioxidant capacity (Geens et al., 2009), immunity and health in free-living birds (Blanco et al., 2004; Fair and Myers, 2002; Geens et al., 2010; Snoeijs et al., 2004). Heavy-metal-induced changes in haematological parameters associated with erythrocytes (haematocrit, erythrocyte count and haemoglobin content) reflect anaemia resulting from intoxication (Geens et al., 2010; Papanikolaou et al., 2005). Since health, antioxidant capacity as well as immune function can be related to avian ornament expression (Vinkler and Albrecht, 2010), several authors (e.g. Dauwe and Eens,

2008 and Eeva et al., 1998) have suggested the possibility of decreased carotenoid-based ornamentation in birds at heavily polluted sites. In contrast, melanin-based ornamentation was found to be increased in adult great tits from highly-polluted sites (Dauwe and Eens, 2008).

The heavy metal burden in birds is higher in cities than in the countryside (Hargitai et al., 2016), as has been confirmed in blackbirds (*Turdus merula*; Meillere et al., 2016; Scheifler et al., 2006), and great (*Parus major*) and blue tits (*Cyanistes caeruleus*; Eens et al., 1999). However, even cities themselves may differ markedly in their levels of heavy metal contamination (CHMI, 2009). It has been previously shown that amounts of heavy metals in great and blue tit tissues decrease with the distance from the source of pollution (Dauwe et al., 2002b). We may predict, therefore, that urban habitats differing in sources of pollution will also differ in their levels of contamination. However, no comparison of avian tissue heavy-metal contamination across a large-scale geographic area has yet been done to show the effects of varying pollution levels on animal health-related physiological traits.

In this study, we hypothesised that differences in avian heavy metal contamination in urban free-living populations would manifest in variation in their health-related traits. We predicted that birds from more polluted cities would show impaired condition and health compared to birds from cleaner cities. To test this hypothesis we compared heavy metal (As, Cu, Cd, Pb, and Cr) concentrations in the blood and feathers of 57 great tit males originating from 13 different city regions varying in air pollution. Contrary to most other studies dealing with this issue, we did not focus on any particular candidate source of environmental contamination, but rather performed a large-area survey, with study sites distributed all over the area of interest, in our case the territory of the Czech Republic, EU. Study localities were chosen according to their annual average concentrations of PM_{10} (ranging from $27 \mu g/m^3$, to $65 \mu g/m^3$, Fig. 1, (CHMI, 2010), for closer details see Table 1). We used principal component analysis (PCA) of heavy metal contamination to reveal general effects of all heavy metals on individual health- and condition-related traits, namely fat deposition index, ptilochronologically-measured feather growth rate, leukocyte and erythrocyte levels in blood circulation, differential leukocyte count, immature erythrocyte frequencies, complement activity in plasma, and carotenoid- and melanin-based ornamentation.

2. Methods and materials

2.1. Field procedures

During the early breeding season (April–May) 2010 great tit adult males ($N = 57$) attracted by a song record were mist netted during the morning hours at 13 different urban areas in the Czech Republic, EU (map, Fig. 1 and Supplement 2). These areas were selected based on their PM_{10} air pollution levels in the previous year (the annual average of year 2009; data from the Czech Hydrometeorological Institute, CHMI, 2010), comprising putatively highly polluted sites ($PM_{10} \geq 40 \mu g/m^3$, $n = 5$) as well as putatively lowly polluted sites ($PM_{10} < 40 \mu g/m^3$, $n = 8$), and reflecting the distribution of the most important urban centres in the Czech Republic (see Table 1 for additional details). The mist-netting sites were always located within a radius of 2 km from a CHMI automatic air pollution monitoring station (see Table 1 and Supplement 2 for a detailed description), always in the same habitat type (deciduous forest with no major roads or industrial buildings in their vicinity). In most locations the sample sizes of

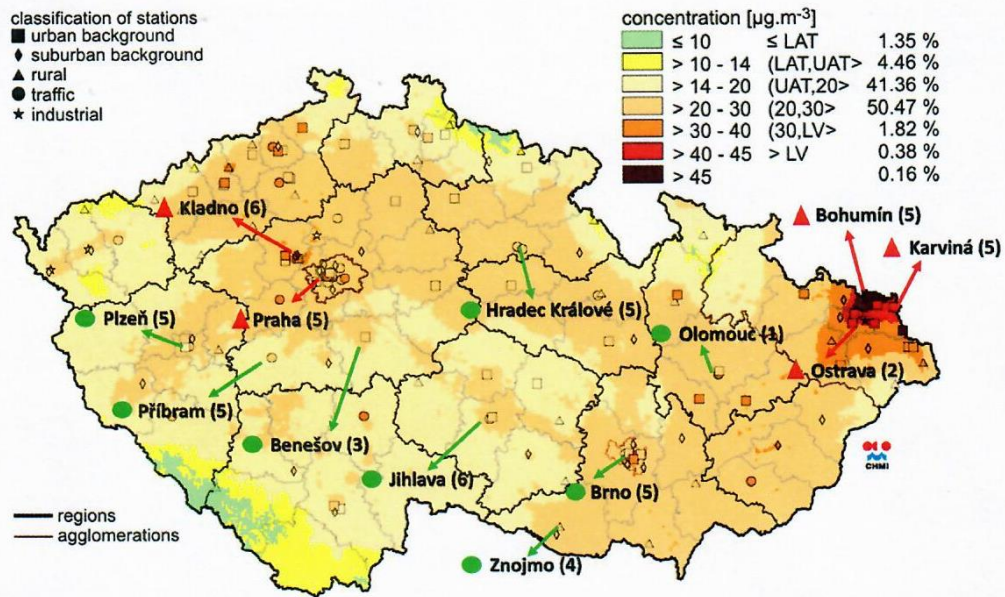


Fig. 1. Pollution distribution in the Czech Republic (annual average concentration of PM_{10} in year 2009). The geographical distribution of the cities where great tits were sampled in 2010 is indicated by red triangles (locations with $\text{PM}_{10} > 40 \mu\text{g}/\text{m}^3$) or green circles (locations with $\text{PM}_{10} \leq 40 \mu\text{g}/\text{m}^3$). Numbers of individuals mist-netted per location are given in parentheses. Classification of the measuring station is indicated by the symbol at the beginning of each arrow (legend included in the figure; map source CHMI, 2010). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

birds were $n \geq 4$ per site, except Benešov, Ostrava and Olomouc (see Fig. 1 or Table 1). Note that our selection of the study sites was highly limited by the available number of distinct regions in the Czech Republic with high levels of air pollution. In all birds, a blood sample (ca. $150 \mu\text{l}$) was taken from the brachial vein within 15 min of capture. Following haematological procedures included a blood smear preparation (ca. $5\text{--}10 \mu\text{l}$), dilution for absolute haematological counting ($15 \mu\text{l}$), microcapillary centrifugation and haematocrit measurement (ca. $130 \mu\text{l}$; see chapter 2.2 for details); plasma was frozen at -80°C while the pellet was stored in ethanol at -20°C . The ethanol-dried pellet was later used for analyses of the heavy metal content in the fixed blood cells (on average ca. 11 mg of dried blood; see Section 2.5). Then the birds were weighed with a digital scale (Pesola AG, Baar, Switzerland, type PPS200, accuracy 0.02 g) and their tarsus lengths (including the intertarsal joint) were measured with a digital calliper (Kinex, accuracy to 0.01 mm) as a general estimate of their size. The

age of the birds was estimated according to Jenni and Winkler (1994) and assigned to two categories: 1) birds in their second year of life and 2) older birds (for more details about the number of individuals in these age classes see Table 1). Then, standard digital images of breast ornaments were taken by an Epson Perfection V30 scanner (Seiko Epson Corporation, Japan; see Svobodová et al., 2013 for details), randomly taken samples of carotenoid and melanin-pigmented feathers were taken (ca. 20) and the second outermost rectrix from the left side (a homologous feather in all birds that molts after breeding, between August and October of the previous year, Jenni and Winkler, 1994) was collected for heavy metal analysis. A fat deposition index (hereafter termed fatness) was scored according to Pettersson and Hasselquist (1985). Finally, each individual was ringed with a standard steel ring of the Czech Bird Ringing Centre (National Museum Prague) and released within 30 min of capture. All birds were handled and measured by a single person (MV).

Table 1

Description of the sampling localities ($n_{\text{locality}} = 13$) of great tits from the Czech Republic, 2010 ($N = 57$). GPS = GPS coordinates, PM_{10} = annual average concentrations of PM_{10} (in $\mu\text{g}/\text{m}^3$), n = number of birds captured per locality with the number of individuals in each age class in brackets (1sty = birds in their 1st year of life, ad = older birds), $n\text{-inhab.}$ = number of city inhabitants, GDP = Gross Domestic Product (GDP in mil. CZK) given for the whole region (based on NUTS = Nomenclature of Units for Territorial Statistics). Localities are listed in order from the least polluted to the most polluted sites.

	GPS	PM_{10}	n (1 st y/ad)	$n\text{-inhab.}^a$	Region (NUTS)	GDP ^a
Pířbram	49°41'02.16"N, 14°01'19.18"E	27.22	5 (1/4)	34,068	Středočeský	380,158
Benešov	49°47'10.34"N, 14°41'51.06"E	27.64	3 (1/2)	16,343	Středočeský	380,158
Znojmo	48°51'27.24"N, 16°02'42.04"E	28.3	4 (1/3)	34,476	Jihomoravský	368,957
Olomouc	49°36'31.55"N, 17°15'26.74"E	28.46	1 (1/0)	100,233	Olomoucký	166,084
Plzeň	49°44'10.17"N, 13°25'01.82"E	29.86	5 (3/2)	168,808	Plzeňský	179,597
Hradec Králové	50°11'42.52"N, 15°52'11.66"E	31.02	5 (2/3)	94,318	Královehradecký	164,478
Jihlava	49°23'21.48"N, 15°36'12.03"E	34.77	6 (1/5)	51,154	Vysočina	140,204
Brno	49°11'48.09"N, 16°35'43.92"E	37.79	5 (5/0)	371,371	Jihomoravský	368,957
Praha	50°03'49.86"N, 14°24'09.79"E	43.12	5 (4/1)	1,257,158	Praha	920,879
Karviná	49°52'26.86"N, 18°33'36.74"E	46.57	5 (5/0)	60,679	Moravskoslezský	351,484
Kladno	50°10'37.76"N, 14°11'58.71"E	49.17	6 (5/1)	69,938	Středočeský	380,158
Ostrava	49°48'01.88"N, 18°20'22.62"E	56.1	2 (2/0)	303,609	Moravskoslezský	351,484
Bohumín	49°53'39.96"N, 18°22'11.17"E	64.83	5 (3/2)	22,631	Moravskoslezský	351,484

^a Data taken from the publicly available database of the Czech Statistical Office (CSO, 2017).

2.2. Haematological analysis

The haematological procedures followed the protocol previously published by Vinkler et al. (2010) and are described here only briefly. From each blood sample collected into a heparinised microcapillary, 15 µl of blood were transferred to 2985 µl of Natt and Herrick's solution and stored for several hours in a field refrigerator until the total red blood cell count (TRBC, i.e. number of erythrocytes per volume unit of blood), and the total white blood cell count (TWBC, i.e. number of leukocytes per volume unit of blood) was investigated using a Bürker's counting chamber (100 large squares for leukocytes were examined directly in the field and digital images of 20 rectangles were scanned for erythrocytes later in the lab using an automated counting system; Stepka, 2013). A blood smear was prepared from a blood droplet and the rest of the blood remaining in the microcapillary was centrifuged for 5 min at 11000 rpm (Nüve HN 075) to estimate haematocrit.

Blood smears (unfixed with methanol) were later stained in the lab with Wright-Giemsa Modified stain (product No. WG128, Sigma-Aldrich, St. Luis, MO, USA) and used to assess the differential leukocyte count and percentage of immature erythrocytes using a light microscope with 100× objective magnification (Olympus Corporation, Tokyo, Japan, type CX-31). The differential leukocyte count was based on a sample of ca. 120 leukocytes where five leukocyte categories were recognised: lymphocytes, monocytes, heterophils, basophils and eosinophils. We used heterophil and lymphocyte cell counts to calculate the heterophil:lymphocyte ratio (H/L), a commonly used indicator of long-term stress and health change (Davis et al., 2008). Given the very low frequency of eosinophils and monocytes (<2%), we excluded these leukocyte types from further analysis. The percentage of immature erythrocytes was estimated based on 5 photographed (Olympus, camera E-410) randomly chosen monolayer fields (ca. 2000–4000 cells). Copies of all images were transformed into a black and white 1 bit format and the total number of cells per image was automatically counted using the particle analyser in ImageJ software (Schneider et al., 2012). The original photographs were then used to manually count the immature erythrocytes in the images using the ImageJ cell counter. All cell counting was performed by one person only (smears, TRBC: PB, TWBC: MV) to minimise any potential variability among the measurements.

For measuring the antibacterial activity of the plasma complement (in part of the sample, $N = 22$, see below) we used the bioluminescence-based method (for more details see Buchtikova et al., 2011). The viability of bioluminescent *Escherichia coli* K12 (genetic modification pEGFP_{lux}ABCDEamp; Atosuo et al., 2013) was measured (continuously for approx. 3 h at 37 °C) in a Chameleon V plate luminometer (Hidex, Turku, Finland), where the intensity of the emitted light corresponds to bacterial viability over time. Subsequently, the required time for killing 50% of the bacteria volume was determined. A shorter time, therefore, implies higher plasma complement bactericidal activity. This analysis required a minimum volume of 25 µl of pure plasma; in our case only 22 samples met this criterion. However, even in this reduced dataset there were samples present from most of the studied localities ($n_{\text{locality}} = 9$; 4 localities with $\text{PM}_{10} < 40 \mu\text{g}/\text{m}^3$, 5 localities $\geq 40 \mu\text{g}/\text{m}^3$), and the number of individuals per locality were $n \geq 2$, except for Benešov and Plzeň ($n = 1$).

2.3. Ptilochronological analysis

To measure the differences between individual males in their nutritional condition over the moulting period, ptilochronological measurements of tail feather growth rates were performed according to Grubb (2006), with several modifications. The rectrices were scanned with a 50 mm scale using a scanner (Epson V30) in the grey scale reflex mode with 600dpi resolution. Digital images were adjusted in Corel Photo-Paint X3 (Corel Corporation, Ottawa, Canada) software by the function of Local Equalization (with parameters Width 100 and Height

100). Thereafter, the digital images were used to measure the total rectrix length and the mean width of the growth bars in ImageJ (Schindelin et al., 2015). To estimate the mean growth bar width, a segment of 10 growth bars with its centre located at 2/3 of the feather length was used.

2.4. Analysis of the feather ornamentation

Digital images of the great tit melanin breast ornaments (ventral side of the bird) were analysed using Adobe PHOTOSHOP CS.3 software version 10.0 (Adobe Systems, San Jose, CA, USA). First, all pictures were standardized in colouration according to a white, 50% grey and 100% black reference swatch (grey card GC 18 and colour & grey chart Q 14; Danes-Picta, Praha, Czech Republic) and rulers (1 mm = 8 pixels; Vinkler et al., 2012). Then, the area of the black melanin-pigmented breast stripe (further referred to as stripe area) was measured at 50 mm in length from the neck using the selection tool and area measuring function.

Saturation of the yellow carotenoid-based breast feather ornament (hereinafter termed yellow chroma) was measured using an Avaspec 2048 spectrometer with an Avalight XE light source (Avantes, Eerbeek, Netherlands) and the Avasoft 7.0 processing system (Avantes). In each individual we measured the colour of a layer of 10 sampled carotenoid-based feathers fixed on the surface of a slide with tape (according to Quesada and Senar, 2006) under standardized conditions (for details on the method, see Albrecht et al., 2009). To describe the inter-individual variation in colour we calculated the yellow chroma (difference between reflectance at 700 nm and reflectance at 450 nm, relative to reflectance at 700 nm; the interval for absorbance of carotenoid pigments is 450–700 nm) from the spectral data (Montgomerie, 2006).

2.5. Analysis of heavy metal content in blood and feathers

All tail feather samples were weighed with an accuracy ± 0.01 mg (Sartorius 2004 MP, Sartorius, USA; the dry feather mass ranged between 0.007 and 0.010 g). Although unwashed feathers exhibit ca. 40% external contamination with heavy metals (Scheifler et al., 2006), rinsing has been shown to be only partially effective for avoiding this contamination (Jaspers et al., 2004). Therefore, in this study we did not perform any rinsing in order to avoid potential artificial variation between samples due to variations in washing efficiency. The feathers were digested in 5 ml of 65% HNO_3 (Analpur, Analytika, Czech Republic) using a Digestion MDS-2000 microwave system with lined digestion vessels. Original solutions were transferred into 10 ml volumetric flasks and filled up to the mark with deionized water ($<0.1 \text{ mS cm}^{-1}$; Milli-QPLUS, Millipore, USA). Given the potential difficulties in ensuring valid wet weight data (variation in blood plasma content), we also tested dried blood samples. The dried blood samples were weighed (weight ranged between 0.001 and 0.031 g) and then dissolved in 1.5 mL of 65% HNO_3 in a 40 °C water bath. Original solutions were transferred into 10 ml volumetric flasks and filled up to the mark with deionized water. Afterwards, for both types of samples (blood and feathers) Electrothermal Atomization – Atomic Absorption Spectrometry (ETA-AAS) was used to determine Pb, Cd, Cu, and Cr contents (sampling volume 20 µl), and Hydride Generation – Atomic Absorption Spectrometry (HG-AAS) was used to determine As content (sampling volume 500 µl). ETA-AAS measurements were carried out using a Model ContraAA 700 high-resolution continuum source atomic absorption spectrometer (Analytic Jena AG, Jena, Germany), equipped with a transversely heated graphite tube. The ContraAA 700 with a xenon short-arc lamp was operated with a nominal power of 300 W in hot-spot mode. The analytical lines at 283.306, 228.802, 324.754 and 357.869 nm were used for Pb, Cd, Cu and Cr, respectively. The chemical modifiers $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ for Pb and Cd, $\text{Pd}/\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ for Cu and $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ for Cr were used. HG-AAS measurements were carried out using the atomic absorption spectrometer UNICAM 939 Solaar AA with deuterium

correction (Unicam, UK) with the optimized Vapor Generation Accessory VGA-76 (Varian Techtron, Australia). The spectrometer was operated using predefined optimal settings. The Varian Se hollow cathode lamp was operated at 196.0 nm with 0.5 nm spectral band passes. A lamp current of 10 mA was used. All reagents and modifiers used were of analytical reagent grade or higher purity. Working standards were prepared by diluting standard 1.000 g L⁻¹ stock solutions of As³⁺, Cd²⁺, Cr³⁺, Cu²⁺, and Pb²⁺ (Merck, Germany). All measurements were carried out in triplicates (results are presented as medians with relative standard deviations). Concentrations of individual metals were recalculated from micrograms per litre to micrograms per gram of dry blood samples or feathers samples, including all dilutions. Measured concentrations in all samples were for all elements higher than appropriate limits of detections, which are summarised with other analytical figures in Table S1. Measurement procedures included blank in each series of digestions, with concentration detected being always under the limit of detection for each element. The accuracy of the methods was verified using a sample spiked with Pb, Cd, Cu, Cr and As. The recovery range for these elements was between 93.2 and 102%. Certified material (IAEA-A-13 Animal Blood, Terrestrial Environment Laboratory, Vienna, Austria) was analysed for quality control. Recovered concentrations of the certified samples were within 8% of the certified values, which is an acceptable margin.

2.6. Statistical analysis

Data distribution in the selected response variables was tested using the Shapiro-Wilk normality test. Due to the non-Gaussian distribution of some of the haematological and condition-related traits we used the Spearman's rank correlation coefficient for testing correlations. For models involving the non-Gaussian response variable stripe area we used logarithmic transformation to achieve normality. Two variables (fatness and TWBC) followed a Poisson data distribution. The values of heavy metal content (dry weight) in blood and feathers were transformed to a normal distribution by a Box-Cox transformation (Osborne, 2010). Because concentrations of heavy metals in blood were intercorrelated and the same pattern was (to lesser extent) observed in feathers (see Table S2), as well as to reduce the metal exposure variables to a single value, we performed principal component analysis (PCA, Frantz et al., 2012; Koivula et al., 2011) separately for blood and for feather samples. The main (first) components (PC1B for blood and PC1F for feathers) were used for all subsequent analyses.

We first tested the association between annual average concentration of PM₁₀ air pollution and PC1B and PC1F, respectively, with the locations ($n = 13$) as random factors. The PC1B and PC1F were used as response variables in Generalised Linear Mixed Models (GLMMs) and tested against annual average PM₁₀ concentrations at the localities (as explanatory variables) using Analysis of Covariance (ANCOVA). Given the non-normal distribution of PC1B, a logarithmic transformation was

performed ($\log(x + 2)$). PC1F followed a normal distribution. For testing the relationship between selected health and condition-related traits (response variables: fatness, mean growth bar width, TWBC, H/L, TRBC, immature erythrocyte frequency, bacteriolytic activity of plasma complement, yellow chroma, and stripe area) and selected explanatory variables (body mass, tarsus length, age, PC1B and PC1F) we used GLMMs including locality as a variable with a random effect. Since the original data, however, showed a marked deviation of the most polluted locality (Bohumín) from other sites in the data set in the levels of environmental pollution (PM₁₀; Fig. 1, Table 1) as well in average blood contamination of the sampled individuals (Fig. S7, Table 2), in Supplement 1 we also show the results of analysis using untransformed heavy metal data without the random effect of locality (which blurs the effects of the outlying data points and localities). A minimum adequate model (MAM; model with all terms either significant, $p \leq 0.05$, or marginally non-significant, $p < 0.10$) was obtained through backward elimination of terms from the full model; i.e. we first fitted all the variables of interest in the full model to assess the model's residual deviance; next, based on the Akaike information criterion (AIC) we remove the least significant terms, and by using Analysis of Variance (ANOVA) F statistics we tested whether omitting this term caused a significant increase in the deviance - if not, the term was deleted and the model was further reduced in the same way until the model (MAM) only contained significant terms. Candidate models were compared based on the change in deviance with the accompanied change in degrees of freedom (ANOVA) using F statistics. The statistical analysis was performed using R software v. 3.1.3 (R Core Team, 2016).

3. Results

3.1. PM₁₀ air pollution at the sampling sites and blood and feather metal concentrations in the examined birds

For all blood and feather samples analysed in this study ($N = 57$), the concentrations of all selected heavy metals (As, Cu, Cd, Pb and Cr) were above the detection limit of the method adopted (summary statistics for individual locations are listed in Tables 2 and 3). In blood, the metal concentrations followed the order Cu > Pb > Cd > Cr > As, while in feather samples it was Cu > Pb > Cr > As > Cd. Blood and feather metal concentrations were mostly uncorrelated (the only three significant correlations detected out of the 25 pairs tested were found between Pb in blood and feathers, and Cd in feathers and Cu in blood and Cr in blood, but all with $R^2 < 0.1$; Table S2 in Supplement 1). In contrast, concentrations of individual heavy metals within blood (10 out of 10 correlations significant with $r \geq 0.40$, R^2 on average = 0.35) and within feather samples (4 out of 10 correlations significant with $r > 0.30$, R^2 on average = 0.19) were intercorrelated to each other (see Table S2 in Supplement 1). Therefore, we performed the PCA analysis, separately for blood and feathers (Table S3 in Supplement 1). The

Table 2

Average values of heavy metal concentrations ($\mu\text{g/g}$ dry weight) in blood per locality ($n_{\text{locality}} = 13$) in great tits from the Czech Republic, 2010 ($N = 57$). SD = standard deviation, n = number of birds captured per locality. Values for the most polluted locality (based on PM₁₀) are highlighted in bold.

Locality	n	Pb Mean \pm SD	Cd Mean \pm SD	Cu Mean \pm SD	Cr Mean \pm SD	As Mean \pm SD
Benešov	3	6.42 \pm 3.95	0.63 \pm 0.22	19.07 \pm 10.93	0.91 \pm 0.52	0.11 \pm 0.02
Bohumín	5	7.67 \pm 4.33	1.96 \pm 1.69	61.81 \pm 36.11	2.28 \pm 1.30	0.63 \pm 0.58
Brno	5	3.74 \pm 2.85	0.36 \pm 0.09	15.40 \pm 11.91	0.33 \pm 0.16	0.09 \pm 0.03
Hradec Králové	5	5.41 \pm 7.25	0.56 \pm 0.24	15.87 \pm 13.68	1.09 \pm 0.82	0.17 \pm 0.17
Jihlava	6	4.12 \pm 3.48	0.58 \pm 0.42	22.15 \pm 17.58	0.44 \pm 0.39	0.25 \pm 0.18
Karviná	5	1.79 \pm 0.92	0.93 \pm 0.67	29.73 \pm 18.81	0.58 \pm 0.34	0.13 \pm 0.09
Olomouc	1	2.04	0.80	27.02	0.42	0.20
Ostrava	2	5.09 \pm 6.99	0.54 \pm 0.22	23.01 \pm 21.34	1.21 \pm 0.87	0.13 \pm 0.07
Plzeň	5	5.72 \pm 3.14	0.48 \pm 0.13	17.96 \pm 12.82	0.95 \pm 0.46	0.17 \pm 0.18
Praha	5	4.76 \pm 1.08	0.54 \pm 0.16	10.20 \pm 4.81	0.33 \pm 0.21	0.11 \pm 0.06
Příbram	5	2.68 \pm 1.06	0.57 \pm 0.24	16.90 \pm 4.44	0.73 \pm 0.45	0.14 \pm 0.08
Kladno	6	5.35 \pm 3.70	0.47 \pm 0.16	7.91 \pm 9.00	0.40 \pm 0.40	0.09 \pm 0.02
Znojmo	4	4.04 \pm 2.16	0.68 \pm 0.34	23.70 \pm 11.34	0.36 \pm 0.06	0.15 \pm 0.04

Table 3

Average values of heavy metal concentrations ($\mu\text{g/g}$ dry weight) in feathers per location ($n_{\text{location}} = 13$) in great tits from the Czech Republic, 2010 ($N = 57$). SD = standard deviation, n = number of birds captured per location. Values for the most polluted locality (based on PM_{10}) are highlighted in bold.

Location	n	Pb Mean \pm SD	Cd Mean \pm SD	Cu Mean \pm SD	Cr Mean \pm SD	As Mean \pm SD
Benešov	3	6.60 \pm 0.70	0.26 \pm 0.06	40.04 \pm 18.34	6.63 \pm 4.46	1.51 \pm 0.09
Bohumín	5	7.11 \pm 2.38	0.51 \pm 0.07	24.17 \pm 11.15	6.59 \pm 4.72	1.25 \pm 0.29
Brno	5	6.07 \pm 7.33	0.04 \pm 0.03	24.13 \pm 19.13	3.07 \pm 1.09	0.91 \pm 0.48
Hradec Králové	5	10.48 \pm 7.94	0.42 \pm 0.37	12.92 \pm 2.86	3.89 \pm 1.11	0.69 \pm 0.38
Jihlava	6	4.58 \pm 2.77	0.36 \pm 0.27	8.57 \pm 3.75	3.78 \pm 1.36	0.77 \pm 0.19
Karviná	5	8.71 \pm 1.75	0.71 \pm 0.78	10.95 \pm 3.18	3.65 \pm 2.04	1.19 \pm 0.24
Olomouc	1	3.62	0.14	6.02	2.26	2.07
Ostrava	2	15.90 \pm 2.73	0.50 \pm 0.20	11.25 \pm 7.73	2.80 \pm 1.17	1.23 \pm 0.04
Pišeň	5	3.85 \pm 1.80	0.15 \pm 0.10	9.43 \pm 1.60	3.81 \pm 1.53	1.36 \pm 0.71
Praha	5	3.10 \pm 1.72	0.20 \pm 0.19	39.01 \pm 47.01	4.48 \pm 3.47	0.91 \pm 0.21
Příbram	5	26.21 \pm 21.91	0.59 \pm 0.18	31.36 \pm 11.55	6.42 \pm 5.09	1.16 \pm 0.39
Kladno	6	5.13 \pm 8.23	0.07 \pm 0.08	19.79 \pm 29.60	3.93 \pm 2.96	1.30 \pm 0.32
Znojmo	4	6.22 \pm 5.18	0.14 \pm 0.05	8.50 \pm 2.45	3.41 \pm 3.48	1.07 \pm 0.36

proportion of variation explained by PC1 and PC2 were 67.6% and 13.1% (blood) and 42.8% and 22.0% (feathers). Factor coordinates were all positive for PC1 and for blood ranged between 0.658 (Pb) to 0.914 (Cd; see Fig. S1) and for feathers 0.321 (As) to 0.794 (Pb; see Fig. S2). We did not find any relationship between PC1B or PC1F and annual average PM_{10} at the study sites (model 1: $p = 0.160$, model 2: $p = 0.684$; Table S4 in Supplement 1). Despite this lack of any clear general relationships, we found that the site with the highest PM_{10} (Bohumín) was also the site with the highest blood contamination levels in all individually analysed heavy metals examined in the great tits (Fig. S7; Tables 1 and 2; this trend was not detected for feathers, see Fig. S8; Table 3).

3.2. Effect of heavy metal contamination on condition-related traits

In our dataset the condition-related traits were only moderately intercorrelated, with two of 15 relationships significant: growth bar and tarsus length, and fatness and body mass (in both cases $R^2 > 0.15$; see Table S7 in Supplement 1). We did not find any significant associations between PC1B or PC1F and fatness or mean growth bar width ($p > 0.10$; see MAM 3 and MAM 4 in Table 4).

3.3. Effect of heavy metal contamination on haematological health-related traits

Summary statistics for all haematological health-related traits analysed are given in Table S8 in Supplement 1. Since haematocrit was significantly intercorrelated with TRBC ($p = 0.015$, $R^2 = 0.102$; Table S9 in Supplement 1), we retained only TRBC in further analyses (in all other pairs of haematological traits $p > 0.05$). No effect of PC1B or PC1F on TWBC was detected (MAM 5 in Table 4). In contrast to TWBC, the leukocyte differential count analysis revealed that the H/L

ratio is significantly related to both PC1B and PC1F (in both cases $p < 0.001$; note the contrasting slopes, Figs. 2, 3; MAM 6 in Table 4). Similar results were also obtained using analysis based on untransformed heavy metal data without the random effect of locality (Table S6, Figs. S3 and S4 in Supplement 1). Separate analyses including Pb and As instead of PC1B (Table S10) suggest a relationship between heterophil counts, and H/L and As contamination (Figs. S9 and S10). Furthermore, our results showed a significant decrease in TRBC with increasing PC1B ($p = 0.002$, MAM 7 in Table 4, Fig. 4). Again, analogous results were obtained using analysis based on untransformed heavy metal data without the random effect of locality (Table S6 and Fig. S5 in Supplement 1) and Pb data (Table S10; Fig. S11). This analysis (taking into account the effects of the outlying locality - Bohumín) also shows a link between increased PC1B and an increase in immature erythrocyte count ($p = 0.036$, MAM 8 in Table S6, Fig. S6), which, in contrast, remained undetected using the transformed heavy metal data in GLMM with locality as a random variable (MAM 8 in Table 4). We did not find any significant effect of PC1B or PC1F on plasma complement activity by any statistical approach adopted ($N = 22$, model 9 in Tables S4 and S5 in Supplement 1). For the blood parameters tested, body size (body mass or tarsus length), and the age of the birds were also important explanatory variables (Table 4).

3.4. Effect of heavy metal contamination on ornamental traits

The two ornamental traits analysed in this study (stripe area and yellow chroma) were not inter-correlated ($p > 0.70$; see Table S7 in Supplement 1). Neither of these two ornamental traits were associated with PC1B or PC1F (yellow chroma $p > 0.10$, model 10, Tables S4 and S5 in Supplement 1; stripe area $p > 0.10$, MAM 11 in Table 4 and Table S6).

Table 4

The Minimum adequate models (MAMs) based on great tit data from the Czech Republic, 2010 ($N = 57$). Locality used as a variable with random effect. Slope \pm standard error (SE) values are only provided for individual continuous variables. Significant effects of heavy metal contamination are highlighted in bold.

	Slope \pm SE	F	Df	p
MAM 3 Fatness ~ body mass	6.727 \pm 3.042	4.891	1/55	0.028
MAM 4 Growth bar width ~ tarsus length	0.063 \pm 0.031	4.483	1/55	0.044
MAM 5 TWBC ~ body mass	4.068 \pm 2.091	5.171	1/55	0.050
MAM 6 H/L ~ PC1B + PC1F + age + body mass		72.561	4/56	$\ll 0.001$
PC1B	-0.080 \pm 0.019	5.553	1/52	< 0.001
PC1F	0.112 \pm 0.025	20.801	1/52	< 0.001
Age		23.732	1/52	$\ll 0.001$
Body mass	-4.483 \pm 1.018	19.424	1/52	< 0.001
MAM 7 TRBC ~ PC1B + age		13.120	2/56	0.001
PC1B	-0.139 \pm 0.043	10.525	1/54	0.002
Age		3.577	1/54	0.078
MAM 8 Immature erythrocyte count ~ tarsus length	-0.959 \pm 0.528	3.298	1/55	0.069
MAM 11 Stripe-area ~ tarsus length	0.024 \pm 0.013	3.536	1/55	0.063

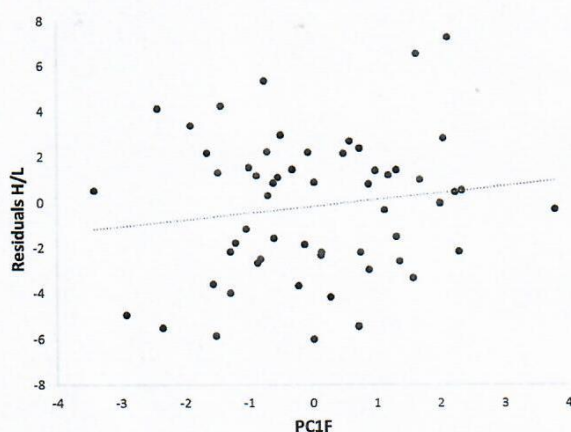


Fig. 2. Association between feather heavy metal contamination (PC1F) and heterophil/lymphocyte (H/L) ratio in urban great tits from the Czech Republic, 2010 ($N = 57$). On the Y axis, H/L ratio is shown as residuals from the MAM 6 (see in Table 4) excluding PC1F (X axis). Location used as a variable with random effect. $R^2 = 0.020$, $p < 0.001$.

4. Discussion

Although birds may serve as useful bioindicators of heavy metal pollution in anthropogenic environments, studies investigating large-scale geographic variation in heavy metal contamination of avian tissues are rare, and have so far focused only on eggshells (Ruuskanen et al., 2014). We performed a large-scale study examining associations between body condition and health-related physiological traits in great tits inhabiting urban areas with different levels of air pollution. To a certain extent, the blood and feather samples from all sites were contaminated with heavy metals, mainly with Cu and Pb (Cu being the only essential element of the metals analysed; Walker et al., 2012), but also with As, Cd and Cr in small amounts. Despite the generally low effects, the H/L ratio was significantly increased in birds suffering from higher feather heavy metal contamination (tested based on PC1F data), indicating their increased long-term stress. In contrast, increased blood heavy metal contamination (tested based on PC1B data) was significantly associated with a decreased H/L ratio, suggesting decreased heterophil counts in pollution-affected birds. In these birds, erythrocyte levels were also decreased and immature erythrocyte frequencies showed a tendency to be increased at the most polluted site (Bohumín),

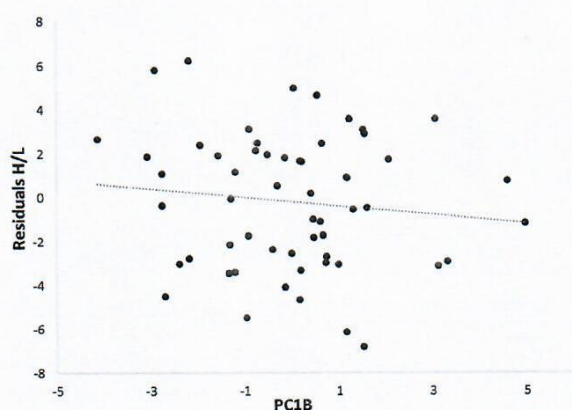


Fig. 3. Association between blood heavy metal contamination (PC1B) and heterophil/lymphocyte (H/L) ratio in urban great tits from the Czech Republic, 2010 ($N = 57$). On the Y axis, H/L ratio is shown as residuals from the MAM 6 (see in Table 4) excluding PC1B (X axis). Location used as a variable with random effect. $R^2 = 0.014$, $p < 0.001$.

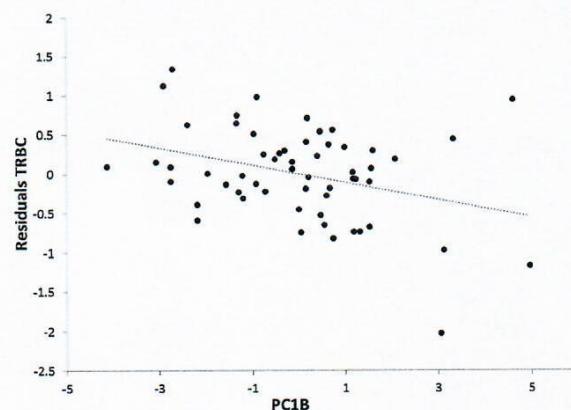


Fig. 4. Association between blood heavy metal contamination (PC1B) and total erythrocyte count (TRBC; cells $\times 10^6/\mu\text{l}$) in urban great tits from the Czech Republic, 2010 ($N = 57$). On the Y axis, TRBC is shown as residuals from MAM 7 (see Table 4) excluding PC1B (X axis). Location used as a variable with random effect. $R^2 = 0.118$, $p = 0.002$.

indicating anaemia-like haemolytic conditions and accelerated haematopoiesis. In contrast, we did not find any significant association between nutritional condition (fatness and mean growth bar width) and heavy metal contamination in blood or feathers. Similarly, the two ornamental traits analysed (stripe area and yellow chroma) were unrelated to heavy metal contamination.

In this study the subset of toxic heavy metals analysed (Pb, Cd, Cu, Cr, As) was similar to that in previous related studies (see e.g. Dauwe et al., 2002b; Eens et al., 1999). In general, the levels of heavy metal contamination were comparable to other studies on birds (Geens et al., 2010 on great tits; Meillere et al., 2016 on common blackbirds; Frantz et al., 2012 on pigeons *Columba livia*), although the dry weight values measured in this study are for methodological differences difficult to directly compare (the main aim of this study was to compare data from different localities sampled within this study). By far the highest levels of blood contamination within all heavy metals tested were detected in the samples from Bohumín, which was also the site where dust (PM_{10}) air pollution was the highest. The Bohumín site, located in the north-eastern part of the Czech Republic is a long-term strongly-polluted industrial locality (several iron works, steel works and metallurgical plants are located in the vicinity of the sampling site; CHMI, 2010). Similarly to Dauwe et al. (2005) and Scheifler et al. (2006), for most heavy metals we did not find any relationship between heavy metal content in blood and feathers. This difference may partially arise due to distinct contamination timing (virtually in all birds rectrices are changed during the post-breeding moult, Jenni and Winkler, 1994, while blood levels show the actual state at the time of sampling). However, the effect of exogenous contamination may be equally important. Although the feather tissue dies after the completion of feather growth (i.e. unable to actively accumulate heavy metals, apparently suggesting that the feathers contain information on heavy metal concentrations circulating in the blood at the time of moulting), heavy metal levels have been shown to further increase, possibly due to the deposition of dust and/or excretion of the uropygial gland (Jaspers et al., 2004; Scheifler et al., 2006). Therefore, heavy metal content in feathers reflects both endogenous and exogenous deposition, and blood and feather heavy metal concentrations may be considered distinct traits indicating different contamination features. While blood is a transport medium likely showing actual levels of heavy metal contamination, heavy metal concentrations in feathers reflect their general intra-annual accumulation since moulting (Dauwe et al., 2002b). In contrast to the lack of consistency between tissues, individual heavy metals within blood and within feathers were highly positively intercorrelated, suggesting that different heavy

metals were accumulated in both tissues in a similar way. It has been repeatedly shown that biolevels of various heavy metals tend to positively correlate one with each other (e.g. Eens et al., 1999; Frantz et al., 2012).

Our results demonstrate associations between the heavy metal load and health-related physiological traits in free-living birds in urban areas. In particular, it appears that cumulative heavy metal contamination (PC1F in our study) may increase long-term stress (indicated by increased blood H/L) in birds. This relationship was earlier reported by Eeva et al. (2005) in pied flycatchers (*Ficedula hypoleuca*), where H/L ratios of nestlings were higher in a copper-polluted area than in a control area. The authors also observed a strong negative association between the H/L ratios of nestlings and their fledging success, indicating a survival effect resulting from heavy metal pollution. A similar effect of pollution on stress in urban birds has been reported by Meillere et al. (2016) in common blackbirds, where corticosterone levels in both juvenile and adult feathers positively correlated with Cd and Pb contamination of the feathers.

In contrast to feather contamination, blood heavy metal content was significantly negatively associated with the H/L ratio. Again, this was mainly due to the effect of the most contaminated samples. This result suggests differences between long-term and short-term exposure effects. Although non-migratory, great tits are vagrant (birds breeding in the Czech Republic may move as far as to central France or central Italy during their post-breeding period, Cepák et al., 2008). Therefore, different levels of heavy metals may be accumulated by individual birds during the breeding and non-breeding seasons. We suggest that the actual levels of pollution (indicated by blood contamination with heavy metals) may decrease the numbers of heterophils in blood circulation, also decreasing H/L, which might be caused by increased heterophil mortality. This has been previously observed in fish (Palikova et al., 2015) in response to low-level As intoxication. Also in our study the association between H/L and heavy metals in blood appears to be driven by As (Fig. S9) and there is a tendency for total heterophil count to decrease in response to increasing As contamination (Fig. S10). Since heterophils are among those cells with fast turnover in the blood (Tak et al., 2013), they may suffer more than the longer-lived lymphocytes from short-term fluctuations in heavy-metal-induced toxicity. Given the low statistical effects of the associations (despite the statistical significance of the trends), both relationships (increased H/L due to long-term stress and decreased H/L due to actual pollution) may co-occur in urban tit populations.

The indicated negative effects of heavy metals on avian health are further supported by the anaemia-like symptoms we detected in birds suffering from high blood heavy metal content. In these birds the total erythrocyte levels were decreased in blood circulation, while there was also a tendency for increased frequencies of immature erythrocytes in the most contaminated individuals (see Fig. S6). Previous studies have documented that the concentration of heavy metals in blood is mostly associated with their content in erythrocytes (Coeurdassier et al., 2012). It has been shown in wintering great tits that blood Pb contamination is negatively associated with blood haemoglobin concentrations, haematocrit, mean corpuscular volume and mean corpuscular haemoglobin (Geens et al., 2010). Although Geens et al. (2010) did not observe any association directly with the total red blood cell count, in this study we found a significant negative relationship between heavy metal levels (mainly Pb, Fig. S11) and the absolute erythrocyte count, likely resulting from increased heavy-metal-induced erythrocyte mortality in birds with high blood contamination levels. This heavy metal-associated decrease in erythrocyte levels may be linked to the increased frequency of immature erythrocytes in the most contaminated individuals. An increased frequency of immature erythrocytes in avian blood circulation has been suggested to reflect increased haematopoiesis (Vinkler et al., 2010), which is frequently associated with anaemia induced by environmental pollution (Belskii et al.,

2005; Yamato et al., 1996). The large variation observed in the associations between feather/blood heavy metal contamination and haematological parameters suggests that other important factors (not tested in this study) are involved, and indirect environmental impacts of pollution (e.g. lower quality of available food sources) may also explain the relationships revealed (Eeva et al., 1998).

In contrast to other studies (Dauwe and Eens, 2008; Eeva et al., 1998; Geens et al., 2009) we did not find any association between heavy metal pollution and ornamental trait expression (yellow chroma or breast stripe area). Given their role in oxidative balance maintenance (Tomášek et al., 2016), carotenoids in particular were predicted to show a trade-off between ornamentation and prevention against the negative effects of urban oxidative challenges. Heavy metal pollution has been reported to reduce carotenoid-based colouration in great tits (Geens et al., 2009; Eeva et al., 1998), but only in some studies (Koivula et al., 2011). The absence of any such relationship in our study may result from the fact that we did not focus on any particular effect of a single major source of heavy metal pollution, but rather investigated heavy metal contamination across cities with no extreme levels of pollution. This inconsistency in results suggests that the effects of heavy metal contamination on external phenotypic traits (such as ornamentation) is not general, but remains limited only to the most extreme cases of environmental pollution.

Taken altogether, this correlational study contributes to an understanding of the relationships between environmental pollution and the biology of organisms living in anthropogenic environments. We show that despite general improvements in the level of atmospheric contamination, non-degradable heavy metals persistently contaminate animal tissues in urban areas at levels having subclinical yet physiological effects, namely on blood cell levels. This supports other findings showing impaired physiological performance in urban birds (Bailly et al., 2016). We believe that these results highlight the necessity for ongoing environmental concern in urban areas even today.

Funding sources

This study was supported by the Czech Science Foundation [grant numbers P505/10/1871, P502/12/P179 and P506/15-11782S]; the Grant Agency of Charles University [grant number GAUK 44809]; the Institutional Research Support [grant number SVV-260 434/2017]; the Operational Programme Research and Development for Innovation [grant number OP VaVpI CZ.1.05/4.1.00/16.0347] and by the Grant Agency of Faculty of Environmental Sciences at Czech University of Life Sciences Prague [grant numbers IGA 20144268 and IGA 20154241].

Ethical approval

This research was approved by the Ethical Committee of the Institute of Vertebrate Biology, Czech Academy of Sciences (Permit No. 107/2009) as part of project P505/10/1871 and was conducted in accordance with the current laws of the Czech Republic and the EU.

Conflicts of interest

The authors declare they have no actual or potential competing financial interests.

Acknowledgement

We are grateful to Martina Soudková and Hana Velová for their help with animal handling during the experiment, to Pavel Hyršl for his help with analysing the antibacterial activity of plasma complement in blood, to David Hardekopf for proofreading the manuscript and to five anonymous reviewers for their comments to earlier versions of the manuscript. The authors' contribution to this paper were as

follows: PB (30%) – haematological and ptilochronological analyses, statistical analysis and manuscript preparation, JV (10%) – field data collection, JH (10%) – heavy metal analysis, VČ (10%) – field data collection, LV (5%) – complement activity assay, JS (5%) – statistic leadership, MV (30%) – study design, field data collection and manuscript preparation. All authors contributed by their comments to the manuscript preparation.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found in the online version, at [10.1016/j.scitotenv.2017.05.276](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.05.276). These data include Supplement 1 containing additional Tables and Figures to the article and Supplement 2 with a Google map showing the geographical distribution of the study sites.

References

- Aggarwal, M., Narahariseti, S.B., Dandapat, S., Degen, G.H., Malik, J.K., 2008. Perturbations in immune responses induced by concurrent subchronic exposure to arsenic and endosulfan. *Toxicology* 251, 51–60.
- Albrecht, T., Winkler, M., Schnitzer, J., Polakova, R., Munclinger, P., Bryja, J., 2009. Extra-pair fertilizations contribute to selection on secondary male ornamentation in a socially monogamous passerine. *J. Evol. Biol.* 22, 2020–2030.
- Atosuo, J., Lehtinen, J., Vojtek, L., Lilius, E.M., 2013. *Escherichia coli* K-12 (pEGFP_{lux}ABCDEamp): a tool for analysis of bacterial killing by antibacterial agents and human complement activities on a real-time basis. *Luminescence* 28, 771–779.
- Bailly, J., Scheifler, R., Belvalette, M., Garnier, S., Boissier, E., Clement-Demange, V.A., et al., 2016. Negative impact of urban habitat on immunity in the great tit *Parus major*. *Oecologia* 182, 1053–1062.
- Belskii, E.A., Lugas'kova, N.V., Karfidova, A.A., 2005. Reproductive parameters of adult birds and morphophysiological characteristics of chicks in the pied flycatcher (*Ficedula hypoleuca* Pall.) in technologically polluted habitats. *Russ. J. Ecol.* 36, 329–335.
- Bianchi, N., Ancora, S., Di Fazio, N., Leonzio, C., 2008. Cadmium, lead, and mercury levels in feathers of small passerine birds: noninvasive sampling strategy. *Environ. Toxicol. Chem.* 27, 2064–2070.
- Blanco, G., Jimenez, B., Frias, O., Millan, J., Davila, J.A., 2004. Contamination with nonessential metals from a solid-waste incinerator correlates with nutritional and immunological stress in pre fledgling black kites (*Milvus migrans*). *Environ. Res.* 94, 94–101.
- Buchtikova, S., Simkova, A., Rohlenova, K., Flajshans, M., Lojek, A., Lilius, E.M., et al., 2011. The seasonal changes in innate immunity of the common carp (*Cyprinus carpio*). *Aquaculture* 318, 169–175.
- Burger, J., Gochfeld, M., 2001. On developing bioindicators for human and ecological health. *Environ. Monit. Assess.* 66, 23–46.
- Carneiro, M., Colaco, B., Brandao, R., Azorin, B., Nicolas, O., Colaco, J., et al., 2015. Assessment of the exposure to heavy metals in griffon vultures (*Gyps fulvus*) from the Iberian Peninsula. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 113, 295–301.
- Cepák, J., Klvaňa, P., Formánek, J., Horák, D., Jelínek, M., Schröpfer, L., et al., 2008. Czech and Slovak Bird Migration Atlas. Aventinum, Prague.
- CHMI, 2009. Air pollution in the Czech Republic in 2008. The Graphical Yearbook Czech Hydrometeorological Institute, Prague <http://portal.chmi.cz/files/portal/docs/uoco/isko/grafroc/groc/gr08cz/obsah.html>.
- CHMI, Czech Hydrometeorological Institute, 2010. Section for Air Quality Protection. Tabular Data Reports for Air Quality in Czech Republic for Year 2009. Czech Hydrometeorological Institute, Prague http://portal.chmi.cz/files/portal/docs/uoco/isko/tab_roc/2009_enh/eng/index_en.html.
- Coeurdassier, M., Fritsch, C., Faivre, B., Crini, N., Scheifler, R., 2012. Partitioning of Cd and Pb in the blood of European blackbirds (*Turdus merula*) from a smelter contaminated site and use for biomonitoring. *Chemosphere* 87, 1368–1373.
- Costa, R.A., Eeva, T., Eira, C., Vaqueiro, J., Medina, P., Vingada, J.V., 2014. Great tits breeding performance and mercury contamination from the paper and pulp industry in the west coast of Portugal. *Chem. Ecol.* 30, 206–215.
- CSO, 2017. Database of the Czech Statistical Office. <https://www.czso.cz/csu/czso/databases-registers>.
- Cui, J., Halbrook, R.S., Zang, S.Y., You, J., 2016. Use of homing pigeons as biomonitors of atmospheric metal concentrations in Beijing and Guangzhou, China. *Ecotoxicology* 25, 439–446.
- Dauwe, T., Eens, M., 2008. Melanin- and carotenoid-dependent signals of great tits (*Parus major*) relate differently to metal pollution. *Naturwissenschaften* 95, 969–973.
- Dauwe, T., Bervoets, L., Blust, R., Pinxten, R., Eens, M., 2000. Can excrement and feathers of nestling songbirds be used as biomonitors for heavy metal pollution? *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 39, 541–546.
- Dauwe, T., Bervoets, L., Blust, R., Eens, M., 2002a. Tissue levels of lead in experimentally exposed zebra finches (*Taeniopygia guttata*) with particular attention on the use of feathers as biomonitors. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 42, 88–92.
- Dauwe, T., Bervoets, L., Janssens, E., Pinxten, R., Blust, R., Eens, M., 2002b. Great and blue tit feathers as biomonitors for heavy metal pollution. *Ecol. Indic.* 1, 227–234.
- Dauwe, T., Janssens, E., Bervoets, L., Blust, R., Eens, M., 2005. Heavy-metal concentrations in female laying great tits (*Parus major*) and their clutches. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 49, 249–256.
- Davis, A.K., Maney, D.L., Maerz, J.C., 2008. The use of leukocyte profiles to measure stress in vertebrates: a review for ecologists. *Funct. Ecol.* 22, 760–772.
- EEA, 2015. Air Quality in Europe - 2015 Report. European Environment Agency, Copenhagen.
- Eens, M., Pinxten, R., Verheyen, R.F., Blust, R., Bervoets, L., 1999. Great and blue tits as indicators of heavy metal contamination in terrestrial ecosystems. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 44, 81–85.
- Eeva, T., Lehtikoinen, E., 2015. Long-term recovery of clutch size and egg shell quality of the pied flycatcher (*Ficedula hypoleuca*) in a metal polluted area. *Environ. Pollut.* 201, 26–33.
- Eeva, T., Lehtikoinen, E., Ronka, M., 1998. Air pollution fades the plumage of the Great Tit. *Funct. Ecol.* 12, 607–612.
- Eeva, T., Hasselquist, D., Langefors, X., Tummeleht, L., Nikinmaa, M., Ilmonen, P., 2005. Pollution related effects on immune function and stress in a free-living population of pied flycatcher *Ficedula hypoleuca*. *J. Avian Biol.* 36, 405–412.
- Eeva, T., Ahola, M., Lehtikoinen, E., 2009. Breeding performance of blue tits (*Cyanistes caeruleus*) and great tits (*Parus major*) in a heavy metal polluted area. *Environ. Pollut.* 157, 3126–3131.
- Fair, J.M., Myers, O.B., 2002. The ecological and physiological costs of lead shot and immunological challenge to developing western bluebirds. *Ecotoxicology* 11, 199–208.
- Frantz, A., Pottier, M.A., Karimi, B., Corbel, H., Aubry, E., Haussy, C., et al., 2012. Contrasting levels of heavy metals in the feathers of urban pigeons from close habitats suggest limited movements at a restricted scale. *Environ. Pollut.* 168, 23–28.
- Geens, A., Dauwe, T., Eens, M., 2009. Does anthropogenic metal pollution affect carotenoid colouration, antioxidative capacity and physiological condition of great tits (*Parus major*)? *Comp. Biochem. Physiol. C: Toxicol. Pharmacol.* 150, 155–163.
- Geens, A., Dauwe, T., Bervoets, L., Blust, R., Eens, M., 2010. Haematological status of wintering great tits (*Parus major*) along a metal pollution gradient. *Sci. Total Environ.* 408, 1174–1179.
- Grubb, T.C., 2006. Ptilochronology. Oxford University Press, New York.
- Hargital, R., Nagy, G., Nyiri, Z., Bervoets, L., Eke, Z., Eens, M., et al., 2016. Effects of breeding habitat (woodland versus urban) and metal pollution on the egg characteristics of great tits (*Parus major*). *Sci. Total Environ.* 544, 31–38.
- Hawley, D.M., Hallinger, K.K., Cristol, D.A., 2009. Compromised immune competence in free-living tree swallows exposed to mercury. *Ecotoxicology* 18, 499–503.
- Janssens, E., Dauwe, T., Pinxten, R., Eens, M., 2003. Breeding performance of great tits (*Parus major*) along a gradient of heavy metal pollution. *Environ. Toxicol. Chem.* 22, 1140–1145.
- Jarup, L., 2003. Hazards of heavy metal contamination. *Br. Med. Bull.* 68, 167–182.
- Jaspers, V., Dauwe, T., Pinxten, R., Bervoets, L., Blust, R., Eens, M., 2004. The importance of exogenous contamination on heavy metal levels in bird feathers. A field experiment with free-living great tits, *Parus major*. *J. Environ. Monit.* 6, 356–360.
- Jenni, L., Winkler, R., 1994. Moulting and Aging of European Passerines. Academic Press Limited, London.
- Koivula, M.J., Kanerva, M., Salminen, J.P., Nikinmaa, M., Eeva, T., 2011. Metal pollution indirectly increases oxidative stress in great tit (*Parus major*) nestlings. *Environ. Res.* 111, 362–370.
- Markowski, M., Kalinski, A., Skwarska, J., Wawrzyniak, J., Banbura, M., Markowski, J., et al., 2013. Avian feathers as bioindicators of the exposure to heavy metal contamination of food. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 91, 302–305.
- Meillère, A., Brischoux, F., Bustamante, P., Michaud, B., Parenteau, C., Marciau, C., et al., 2016. Corticosterone levels in relation to trace element contamination along an urbanization gradient in the common blackbird (*Turdus merula*). *Sci. Total Environ.* 566, 93–101.
- Montgomerie, R., 2006. Analyzing colors. In: Hill, G.E., McGraw, K.J. (Eds.), *Bird Coloration I: Mechanisms and Measurements*. Harvard University Press, Cambridge, pp. 90–147.
- Mora, M.A., 2003. Heavy metals and metalloids in egg contents and eggshells of passerine birds from Arizona. *Environ. Pollut.* 125, 393–400.
- Osborne, J.W., 2010. Improving your data transformations: applying the Box-Cox transformation. *Practical Assessment, Research and Evaluation*. 15.
- Palikova, M., Papezikova, I., Kopp, R., Mares, J., Markova, Z., Navratil, S., et al., 2015. Effect of arsenic and cyanobacterial co-exposure on pathological, haematological and immunological parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Neuroendocrinol. Lett.* 36, 57–63.
- Papanikolaou, N.C., Hatzidaki, E.G., Belivanis, S., Tzanakakis, G.N., Tsatsakis, A.M., 2005. Lead toxicity update. A brief review. *Med. Sci. Monit.* 11, RA329–RA336.
- Pettersson, J., Hasselquist, D., 1985. Fat deposition and migration capacity of Robins *Erithacus rebecula* and Goldcrests *Regulus regulus* at Ottenby, Sweden. *Ring. Migr.* 6, 66–76.
- Quesada, J., Senar, J.C., 2006. Comparing plumage colour measurements obtained directly from live birds and from collected feathers: the case of the great tit *Parus major*. *J. Avian Biol.* 37, 609–616.
- R Core Team, 2016. A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Ruuskanen, S., Laaksonen, T., Morales, J., Moreno, J., Mateo, R., Belskii, E., et al., 2014. Large-scale geographical variation in eggshell metal and calcium content in a passerine bird (*Ficedula hypoleuca*). *Environ. Sci. Pollut. Res.* 21, 3304–3317.
- Scheifler, R., Coeurdassier, M., Morilhat, C., Bernard, N., Faivre, B., Flicoteaux, P., et al., 2006. Lead concentrations in feathers and blood of common blackbirds (*Turdus merula*) and in earthworms inhabiting unpolluted and moderately polluted urban areas. *Sci. Total Environ.* 371, 197–205.
- Schindelin, J., Rueden, C.T., Hiner, M.C., Eliceiri, K.W., 2015. The ImageJ ecosystem: an open platform for biomedical image analysis. *Mol. Reprod. Dev.* 82, 518–529.
- Schneider, C.A., Rasband, W.S., Eliceiri, K.W., 2012. NIH image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat. Methods* 9, 671–675.

- Snoeijs, T., Dauwe, T., Pinxten, R., Vandesande, F., Eens, M., 2004. Heavy metal exposure affects the humoral immune response in a free-living small songbird, the great tit (*Parus major*). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 46, 399–404.
- Stepka, K., 2013. In: Kamarainen, J.K., Koskela, M. (Eds.), *Automated cell counting in burker chamber. Image Analysis, Scia 2013: 18th Scandinavian Conference*. 7944. Springer-Verlag, Berlin, Berlin, pp. 236–245.
- Svobodová, J., Gabrielová, B., Synek, P., Maršík, P., Vaněk, T., Albrecht, T., et al., 2013. The health signalling of ornamental traits in the Grey Partridge (*Perdix perdix*). *J. Ornithol.* 154, 717–725.
- Tak, T., Tesselaar, K., Pillay, J., Borghans, J.A.M., Koenderman, L., 2013. What's your age again? Determination of human neutrophil half-lives revisited. *J. Leukoc. Biol.* 94, 595–601.
- Tomášek, O., Gabrielová, B., Kačer, P., Maršík, P., Svobodová, J., Syslová, K., et al., 2016. Opposing effects of oxidative challenge and carotenoids on antioxidant status and condition-dependent sexual signalling. *Sci. Rep.* 6.
- Vinkler, M., Albrecht, T., 2010. Carotenoid maintenance handicap and the physiology of carotenoid-based signalisation of health. *Naturwissenschaften* 97, 19–28.
- Vinkler, M., Schnitzer, J., Munclinger, P., Votýpka, J., Albrecht, T., 2010. Haematological health assessment in a passerine with extremely high proportion of basophils in peripheral blood. *J. Ornithol.* 151, 841–849.
- Vinkler, M., Schnitzer, J., Munclinger, P., Albrecht, T., 2012. Phytohaemagglutinin skin-swelling test in scarlet rosefinch males: low-quality birds respond more strongly. *Anim. Behav.* 83, 17–23.
- Walker, C.H., Sibly, R.M., Hopkin, S.P., Peakall, D.B., 2012. *Principles of Ecotoxicology*. CRC Press, Boca Raton.
- WHO, 2000. *Air Quality Guidelines: Europe*. WHO Regional Office for Europe, Copenhagen.
- WHO, 2006a. *Health Risks of Particulate Matter From Long-range Transboundary Air Pollution*. WHO Regional Office for Europe, Copenhagen.
- WHO, 2006b. *WHO Air Quality Guidelines for Particulate Matter, Ozone, Nitrogen Dioxide and Sulfur Dioxide: Global Update 2005*. WHO Press, Geneva.
- WHO, 2007. *Health Risks of Heavy Metals From Long-range Transboundary Air Pollution*. WHO Regional Office for Europe, Copenhagen.
- Yamato, O., Goto, I., Maeda, Y., 1996. Hemolytic anemia in wild seaducks caused by marine oil pollution. *J. Wildl. Dis.* 32, 381–384.



Sperm variation in Great Tit males (*Parus major*) is linked to a haematological health-related trait, but not ornamentation

Jana Svobodová¹ · Petra Bauerová¹ · Jiří Eliáš¹ · Hana Velová² · Michal Vinkler² · Tomáš Albrecht^{2,3}Received: 20 July 2017 / Revised: 12 March 2018 / Accepted: 2 May 2018 / Published online: 17 May 2018
© Dt. Ornithologen-Gesellschaft e.V. 2018

Abstract

The phenotype-linked fertility hypothesis (PLFH) proposes that both sexual ornaments and sperm traits are phenotypically plastic and co-affected by environmental factors through individual condition, resulting in a positive correlation between ornament expression and functional fertility. Ornaments may then serve females in the identification of the most fertile males. Despite intense research on the relationship between sexual characters and male ejaculate quality, published results are not consistent with the PLFH. The aim of our study was to test if sperm morphology is associated with sexual ornamentation and several health/condition-dependent traits in Great Tit males (*Parus major*). We evaluated the association between sperm morphology and two types of ornaments, carotenoid- and melanin-based ventral feather coloration, to evaluate predictions of the PLFH. As surrogates for condition and health/stress status, we used standardized male weight and the peripheral blood heterophil to lymphocyte ratio (H/L). Also, we used the immature erythrocyte frequency as a trait linked to the rate of haematopoiesis, and presumably metabolism and pace of life. Our results support an association of sperm traits with health-related traits: the within-male variability in total sperm length was negatively related to the H/L ratio. This either suggests that birds maintaining low sperm variability may afford to invest more into heterophil production or, in contrast to the PLFH, there could be a trade-off between individual investment in reproduction (ejaculate quality) and the avoidance of long-term physiological stress. Contrary to the predictions of the PLFH we were unable to identify any parameter of sperm morphology associated with either body condition or the expression of male sexual traits. Thus, our study contributes to evidence rejecting the hypothesis of ornamental involvement in fertility selection, while giving weak support to the sperm competition theory.

Keywords Carotenoid coloration · Melanin coloration · Condition-dependent sexual signalling · Haematology · Sperm flagellum · Sperm length

Zusammenfassung

Bei Kohlmeisenmännchen (*Parus major*) ist die Spermienvariabilität mit einem gesundheitsrelevanten hämatologischen Merkmal gekoppelt, nicht jedoch mit der Färbung.

Die Hypothese der phänotypgekoppelten Fertilität (Phenotype-linked Fertility Hypothesis; PLFH) besagt, dass sowohl die geschlechtstypische Färbung als auch die Spermienmerkmale phänotypisch plastisch sind und über die individuelle Körperkondition von Umweltfaktoren mitbeeinflusst werden, was zu einer positiven Korrelation zwischen äußerlicher Merkmalsausprägung und funktioneller Fertilität führt. Eine Schmuckfärbung kann dann den Weibchen dabei helfen, die fruchtbarsten Männchen zu erkennen. Trotz intensiver Erforschung der Zusammenhänge zwischen Geschlechtsmerkmalen und der Qualität der männlichen Ejakulate lassen sich die publizierten Ergebnisse nicht mit der PLFH in Einklang bringen. Ziel unserer Studie war es zu testen, ob die Spermienmorphologie bei Kohlmeisenmännchen (*Parus major*) mit der geschlechtstypischen Färbung und verschiedenen vom Gesundheitszustand beziehungsweise der Kondition abhängigen

Communicated by K. C. Klasing.

Electronic supplementary material The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s10336-018-1559-7>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

Extended author information available on the last page of the article

Merkmale in Verbindung steht. Um die Vorhersagen der PLFH zu überprüfen, betrachteten wir den Zusammenhang zwischen der Spermienmorphologie und zwei Typen der Schmuckfärbung, nämlich der carotinoid- beziehungsweise melaninbasierten Färbung des ventralen Gefieders. Stellvertretend für die Kondition und den Gesundheits-/Stress-Status verwendeten wir das standardisierte Körpergewicht der Männchen und deren H/L-Verhältnis (Heterophile Granulozyten/Lymphozyten) im peripheren Blut. Außerdem nutzten wir die Häufigkeit unreifer Erythrozyten als Merkmal für das Ausmaß der Blutneubildung sowie vermutlich für die Stoffwechselrate und das Lebenstempo. Unsere Ergebnisse sprechen für einen Zusammenhang zwischen Spermieeigenschaften und gesundheitsbezogenen Merkmalen: Die Variabilität der Spermien-Gesamtlänge bei einem Männchen stand jeweils in einer negativen Beziehung zum H/L-Verhältnis. Entweder bedeutet dies, dass es sich Vögel mit einer geringen Spermienvariabilität leisten können, mehr in die Produktion heterophiler Granulozyten zu investieren, oder es könnte sich—im Widerspruch zur PLFH—um einen Kompromiss zwischen der individuellen Investition in die Fortpflanzung (Qualität des Ejakulats) und der Vermeidung langfristigen physiologischen Stresses handeln. Im Gegensatz zu den Voraussagen der PLFH konnten wir keinen Parameter der Spermienmorphologie ausmachen, welcher entweder mit der Körperkondition oder der Ausprägung männlicher Geschlechtsmerkmale im Zusammenhang stünde. Somit liefert unsere Studie einen weiteren Beleg für eine Widerlegung der Hypothese von der Beteiligung der Schmuckfärbung an der Fertilitätsselektion und unterstützt dagegen leicht die Theorie der Spermienkonkurrenz (Sperm Competition Theory; SCT).

Introduction

Health and the expression of secondary sexual traits both depend on an individual's condition. Only individuals in superior condition may be able to maintain the high expression of secondary sexual traits and produce high-quality gametes [the viability indicator hypothesis (Andersson 1994; Hill 2011)]. For example, the phenotype-linked fertility hypothesis (PLFH) proposes that the expression of secondary sexual traits reflects a male's reproductive performance, including ejaculate quality (Sheldon 1994), because pre- and post-copulatory traits (ornamentation and gametes) may share condition dependence [e.g. are affected by the same type of stressors (Blount et al. 2001)]. By selecting highly ornamented males, females may increase their chances of being successfully fertilized or even of having their sons inherit high-quality ejaculates (Pizzari and Birkhead 2002; Pizzari et al. 2004), leading to the evolution of pre-copulatory signals of sperm quality. However, a recent meta-analysis using a wide array of taxa found little support for a positive association between the expression of condition-dependent sexual signals and ejaculate quality (Mautz et al. 2013). An alternative scenario, originally outlined as a part of the sperm competition theory (SCT) (Parker 1998), assumes that the total amount of energy invested into reproduction is limited, resulting in a trade-off between investments into pre-copulatory and post-copulatory traits, and hence to a negative relationship between sexual male ornamentation and sperm quality. In this case, investments into costly sexual ornaments may compromise ejaculate quality [e.g. the ability to cope with oxidative challenge (Tomášek et al. 2017)].

Carotenoid-based ornaments may reflect individual quality because carotenoids are obtained exclusively from the

diet and have been proposed to take part in anti-oxidative protection (Lozano 1994; von Schantz et al. 1999; Svensson and Wong 2011). In birds, carotenoids are responsible for the yellow to red coloration of skin derivatives (e.g. feathers, podotheca, rhamphotheca, etc.). Given the fact that carotenoids also occur in the testes and seminal fluid (Rowe and McGraw 2008; Rowe et al. 2012), they can directly influence sperm quality and quantity by quenching free radicals (von Schantz et al. 1999; Blount et al. 2001). For instance, their supplementation resulted in fewer sperm abnormalities in Zebra Finches (Tomášek et al. 2017). Although the PLFH may apply to carotenoid-based ornaments in birds (e.g. Helfenstein et al. 2010; Losdat et al. 2011), there might exist a trade-off between the use of carotenoids in maintaining either the high expression of sexual ornamentation or high sperm quality (Tomášek et al. 2017).

Recent studies have shown that similarly to carotenoid-based traits, melanin-based ornaments are frequently related to individual condition (Griffith et al. 2006; Guindre-Parker and Love 2014) and immune function (e.g. Gangoso et al. 2011; Jacquin et al. 2011). Therefore, the PLFH may apply to melanin ornaments as well. At present only a few studies have examined the relationship between sperm characteristics and melanin ornaments, and their results are inconsistent. For example, Calhim et al. (2009) found a positive relationship between sperm length and plumage blackness in Pied Flycatchers (*Ficedula hypoleuca*), whereas Lifjeld et al. (2012) found no such relationship in the same study population but with a much larger dataset. Similarly, Birkhead and Fletcher (1995) found no link between any sperm traits and melanin breast plumage area in Zebra Finches (*Taeniopygia guttata*).

Here we used Great Tits (*Parus major*) to evaluate the idea that sexually selected condition-dependent

ornamentation in males (carotenoid-based coloration of ventral feathers and the size of the melanin-based black stripe on the belly) reflects sperm phenotypes. Moreover, we evaluated possible links between sperm phenotypes and individual condition and health status. As general estimators of condition and health status we used standardized weight and two haematological parameters, the stress-linked peripheral blood heterophil to lymphocyte ratio (H/L) (Davis et al. 2008) and the immature erythrocyte frequency. The latter is positively linked to the rate of haematopoiesis, and presumably metabolism and the pace of life (Vinkler et al. 2010). Failures in spermatogenesis may lead to the production of morphologically diverse sperm including abnormal sperm cells (Opatová et al. 2016). We therefore calculated the coefficient of variation in sperm length for each ejaculate and tested this parameter with sexual ornamentation and condition estimates. Previous studies across passerine taxa have shown that increased sperm competition leads to longer sperm cells with a relatively longer midpiece (Kleven et al. 2009), and intra-specific analyses, based on experimental approach, have also demonstrated that longer sperm cells are faster and competitively superior than shorter sperm at least in some passerines (Bennison et al. 2015). We therefore assume that total sperm length and the midpiece/flagellum ratio may reflect ejaculate quality in our study species (also see Calhim et al. 2009; Mautz et al. 2013).

Methods

Field procedures

The study was carried out in the breeding seasons April–May 2011–2013, in a city forest in Prague (Czech Republic 50°8′10.591″N, 14°27′51.144″E, ~310 m a.s.l.). The forest was mainly dominated by oak (*Quercus* sp.), lime (*Tilia* sp.) and hornbeam (*Carpinus betulus*). Within the study area nest boxes were installed in a regular grid of 50 × 50 m on trees at a height of ~3 m. Nest boxes were regularly controlled during April to identify Great Tit breeding pairs. In total, 42 males were caught during the three breeding seasons with mist nets placed in front of their nest boxes.

Approximately 50 µl of blood was taken from the jugular vein of each individual, and a blood smear was prepared from a drop of blood. Then, body mass (measured by a Pesola PPS200, 200 g, $d=0.02$ g) and tarsus length (measured by a digital calliper, accuracy 0.01 mm; Kinex, Prague, Czech Republic) were recorded. Two feather ornaments were chosen for further analyses: the area of the melanin breast stripe and coloration of the yellow breast carotenoid. To assess the area of the melanin breast stripe, standard digital images of the breast were taken of each male with a Perfection V30 scanner (Seiko Epson, Nagano, Japan). All images

were taken in a standardised position in a mobile dark tent, with grey and colour standard reference swatches equipped with a ruler (a GC 18 grey card and Q 14 colour and grey chart; Danes-Picta, Prague). Feather samples from the upper part of the yellow breast ornament were collected for spectrometry analysis (see below). Ejaculates were obtained by a gentle cloacal massage and stored in 10% formalin solution (Albrecht et al. 2013). Finally, every male was tagged by an aluminium ring with a unique code of the Czech Bird Ringing Centre (N Museum Praha) and released immediately after sampling. No male underwent any repeated sampling throughout the entire experiment. The study was approved by the Ethical Committee of the Czech Academy of Sciences (041/2011) and was carried out in accordance with the current laws of the Czech Republic.

Measurements of ornamental traits

The digital images of the melanin breast stripe were analysed using Adobe PHOTOSHOP CS.4 software version 11.0 (Adobe Systems, San Jose, CA). First, the image scales were equalised according to the rulers. From these standardised images, areas of the ornaments were measured.

Coloration of the yellow breast ornament was measured by an AvaSpec 2048 spectrometer with an AvaLight-XE light source (Avantes, the Netherlands). Samples of each individual were randomly arranged into two sets from ten feathers and fixed on microscope slides with a black background (Quesada and Senar 2006). In addition, feather quills were fixed with a black sturdy paper inset to measure just the yellow part of feathers. The spectrophotometer probe was placed in a plastic extender holding the same light condition, angle (45°) and distance (4 mm) of the probe from a measured sample. To obtain reliable measurements, each feather set was rearranged and the whole process was repeated a total of four times for each set, i.e. eight measurements were taken for each male. The spectrometer was standardized against the darkroom and a WS-2 white standard after measuring samples representing each ten individuals. Yellow chroma, which reflects the amount of yellow carotenoids (lutein and zeaxanthin) in breast feathers in the Great Tit (Isaksson et al. 2008), was calculated as $R700 - R450$, divided by $R700$, ($R700$ is reflectance at 700 nm and $R450$ reflectance at 450 nm). In statistical analyses, the average values calculated from the eight measurements were used. The repeatability of yellow chroma measurements was $r=0.76$, $n=33$, $p=0.003$ (Lessels and Boag 1987).

Measurements of sperm traits

Sperm morphometric data were obtained using light microscopy (Olympus BX41, camera UI-1540-C; Olympus, Tokyo) under 400× magnification and image ImageJ software

version 1.49. Slides were prepared by spreading a drop (approximately 15 μl) of the fixed sperm sample on a clean microscope slide and air drying it. We measured (to the nearest 0.1 μm) the length of three sperm components: the head, midpiece (containing fused mitochondria) and tail (also see Opatová et al. 2016). For each sperm, the total length was then calculated as a sum of these three components. Twenty spermatozoa per male were measured to obtain a representative estimate of the male's mean sperm total length (e.g. Immler et al. 2008). Within-male variability in total sperm length (CV_{wm}) was calculated as the coefficient of variation [$\text{CV} = (\text{SD}/\text{mean}) \times 100$ (Sokal and Rohlf 1981; Liffield et al. 2010)]. The accuracy of sperm measurements was high ($r_{\text{head}} > 0.72$, $r_{\text{midpiece}} = 0.96$, $r_{\text{tail}} = 0.87$, $r_{\text{total}} = 0.96$, $n = 10$, all $p < 0.001$ for all measured components).

Haematological assays

To analyse the differential leukocyte count and frequency of immature erythrocytes, the air-dried blood smears were stained with Modified Wright-Giemsa Stain (product no. WG128; Sigma-Aldrich) and scanned with an Olympus BX-41 microscope under 1000 \times magnification to count the proportion of lymphocytes and heterophils within a sample of 110–140 leukocytes per smear (e.g. Vinkler et al. 2010). We found two individuals with extremely high H/L ratios (> 4) in our data set. Since individuals with an H/L ratio > 4 have also been found in other Great Tit populations (e.g. Ots and Hõrak 1996) these individuals were included in subsequent analyses. The differential count of immature erythrocytes was estimated in five randomly chosen monolayer fields photographed at 100 \times objective magnification (ca. 500–1000 cells). The photographs were used to manually count the immature erythrocytes in the images using ImageJ software. The repeatability of the estimate was $r = 0.89$, $n = 10$, $p = 0.05$.

Statistical analyses

We first performed Spearman's correlation between individual sperm traits. We found strong significant positive correlations between average total sperm length and all other sperm traits except sperm CV_{wm} (Table S1). Therefore, only average total sperm length, midpiece/flagellum ratio and sperm CV_{wm} were included in the analysis. There was no correlation between the expression of melanin-based and carotenoid-based ornaments ($r = 0.156$, $p = 0.322$). Standardized weight and haematological traits were also uncorrelated ($r_{\text{HL}} = -0.197$, $p = 0.211$; $r_{\text{imEry}} = -0.115$, $p = 0.468$). The relationships between sperm morphology, condition, ornaments and health status were analysed by using linear regression models (LM) in which either total sperm length, midpiece/flagellum ratio or sperm CV_{wm} were response variables (i.e. three LM models). The sperm

CV_{wm} was ln-transformed and logit transformation was used for the midpiece/flagellum ratio to obtain a normal distribution. The standardised weight, yellow chroma, area of the melanin ornament, H/L ratio, immature erythrocyte count, year and their meaningful two-way interactions (i.e. those between year, condition and haematological parameters, respectively) were included as explanatory variables. Similarly, relationships between ornaments and condition status were analysed by LM models. The yellow chroma and area of the melanin breast stripe were response variables and the standardised weight, H/L ratio, immature erythrocyte count, year and their meaningful two-way interactions were explanatory variables, resulting in two LM models. The significance ($p < 0.05$) of particular terms in the models was calculated based on the change in deviance between the full and reduced (null) models using the drop1 function. The statistic is reported for each corresponding step when terms were removed from the model (Crawley 2002). All analyses were performed in the software R.3.0.3 (R Development Core Team 2011).

Results

There were no associations between either the coloration of the yellow ornament (yellow chroma) or the melanin-based ornamentation and the selected condition-reflecting or haematological traits (Table 1).

Data on sperm trait variation (length differences in the sperm segments) are summarised in Table 2. Sperm morphological traits varied substantially in Great Tit males, but the most variable sperm characteristic was the within-male variation in total sperm length (CV_{wm}) and midpiece/flagellum ratio.

There was no association between the average total sperm length and either the condition or haematological traits (Table 3). Although there was substantial variation in the midpiece/flagellum ratio, no significant relationship was found between this sperm trait and the tested variables. There was, however, a significant relationship between the sperm CV_{wm} and H/L ratio (LM, estimate \pm SE = -0.135 ± 0.058 , $F_{1,40} = 5.487$, $p = 0.024$; Table 3). Males with higher CV_{wm} had a lower H/L ratio (Fig. 1). It should be noted that when two data points with high H/L ratios (> 4 ; Cook's $D > 1$) are removed from the dataset, the negative relationship between CV_{wm} and H/L is not significant (LM, estimate \pm SE = -0.128 ± 0.106 , $F_{1,40} = 1.204$, $p = 0.237$).

Discussion

In this study we evaluated the idea that condition-dependent carotenoid- and melanin-based feather ornamentation reflects sperm quality in Great Tits. Previous studies in this species have demonstrated that the ejaculates of more

Table 1 Results of linear models evaluating the association between male ornamentation and selected condition/haematological traits

	Yellow chroma			Breast strip		
	<i>df</i>	<i>F</i>	<i>p</i>	<i>df</i>	<i>F</i>	<i>p</i>
H/L	40	0.115	0.725	39	1.800	0.188
Immature erythrocytes	39	0.298	0.588	40	3.059	0.088
Year	37	1.687	0.199	36	0.593	0.588
Standardised weight	36	0.209	0.651	38	0.015	0.902
H/L × Year	34	1.127	0.336	34	0.123	0.884
Immature erythrocytes × Year	32	0.203	0.818	32	0.513	0.604
Standardised weight × Year	30	0.473	0.628	30	0.060	0.942

In addition to the peripheral blood heterophil to lymphocyte ratio (*H/L*), frequency of immature erythrocytes and standardized weight, year was also included in the analysis as a response (explanatory) variable. Statistics for particular explanatory variables were found using a backward stepwise procedure, and correspond to the step when each term was removed from the model ($n=42$)

Table 2 Variation in sperm characteristics among a sample of ten Great Tit males' ejaculates ($n=42$)

	Mean	SD	Median	Minimum	Maximum	CV
Head length (μm)	14.7	0.6	14.6	13.4	16.6	4.4
Midpiece length (μm)	59.2	2.4	59.6	52.6	64.3	4.1
Flagellum length (μm)	23.9	2.3	24.3	17.5	28.3	9.8
Total length (μm)	97.8	3.5	96.9	91.5	105.5	3.6
Midpiece/flagellum proportion	2.5	0.3	2.4	2.1	3.7	11.9
CV _{wm}	2.5	1.1	2.1	1.2	6.4	– ^a

CV Coefficient of variation, CV_{wm} within-male variation in sperm length

^aNot calculated

Table 3 Results of linear models, with the yellow chroma, breast stripe area, H/L ratio, frequency of immature erythrocytes, standardized weight and year as response variables to explain the variation in selected sperm traits

	Total sperm length			CV _{wm}			Midpiece/flagellum proportion		
	<i>df</i>	<i>F</i>	<i>p</i>	<i>df</i>	<i>F</i>	<i>p</i>	<i>df</i>	<i>F</i>	<i>p</i>
H/L	40	2.629	0.113	40	5.487	0.024	39	0.362	0.551
Yellow chroma	38	0.520	0.476	38	1.768	0.192	40	1.703	0.199
Breast strip	37	0.129	0.721	37	0.291	0.593	36	0.031	0.862
Immature erythrocytes	39	2.796	0.103	39	0.311	0.580	38	0.029	0.865
Year	34	2.318	0.114	34	0.948	0.398	34	1.410	0.258
Standardised weight	36	0.692	0.411	36	0.038	0.847	37	1.355	0.251
H/L × year	28	1.330	0.281	28	1.956	0.397	28	2.750	0.081
Yellow chroma × year	30	0.775	0.47	30	0.721	0.494	30	0.261	0.771
Breast strip × year	36	0.485	0.621	26	0.453	0.641	32	0.156	0.856
Immature erythrocytes × year	32	1.267	0.296	32	1.714	0.196	25	0.054	0.818
Standardised weight × year	25	<0.001	0.986	25	0.087	0.771	26	1.450	0.253

Statistics for particular explanatory variable were found using a backward stepwise procedure. All statistics correspond to the step when they were removed from the model ($n=42$). For other abbreviations, see Tables 1 and 2

colourful males are more resistant to oxidative stress, and hence that male carotenoid-based coloration indicates ejaculate quality measured as sperm velocity. In our study we focused on other sperm traits that potentially reflect ejaculate quality: the sperm length, midpiece/flagellum ratio and

within-male variation in sperm length. We found little support for an association between sperm traits and male ornaments or condition-dependent traits.

The SCT predicts a trade-off between sexual signals and ejaculate investment if resources available for allocation

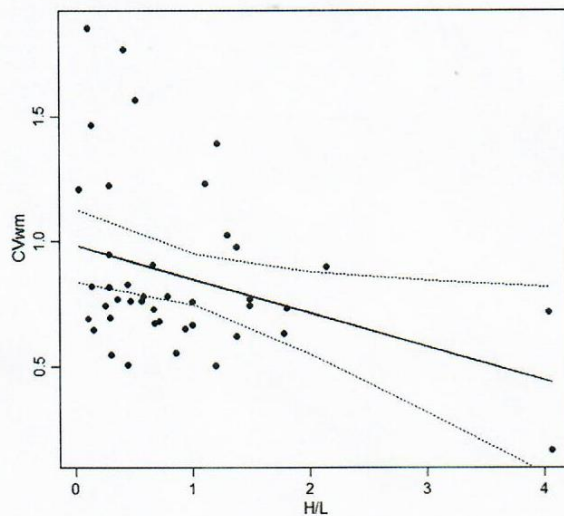


Fig. 1 Associations between the peripheral blood heterophil to lymphocyte ratio (H/L) and within-male variation in sperm length (CV_{wm}) in Great Tit males in 2011–2013 ($n=42$). The CV_{wm} is log transformed and *dashed lines* show the 95% confidence interval

to either trait are limited (Parker 1998). Interestingly, in accordance with this hypothesis we found that the within-male variability in sperm length [which may reflect variation in the size of the testicular seminiferous tubules (Aire 2007; Lüpold et al. 2009)] was negatively related to the H/L ratio, an indicator of general health and long-term stress (see e.g. Davis 2005; Davis et al. 2008). Alternatively, our findings could support the PLFH if males with enhanced H/L ratio were superior individuals defending nesting areas of high quality. Such males could be more stressed because they would be more involved in antagonistic interactions. However, since we found no correlation between the H/L ratio and standardised weight we are rather inclined to accept the SCT as a more likely explanation. The negative relationship between the within-male variability in sperm length and H/L ratio indicates that birds maintaining high ejaculate quality are not able to resist stress. Males that invest high energy into ejaculate quality may also not be able to invest into precopulatory signals of quality, such as carotenoid-based ornamentation (Tomášek et al. 2017). Similarly, immune activation of Great Tit males by lipopolysaccharide led to a reduction of sperm swimming velocity (Losdat et al. 2011) and males with enhanced H/L ratios produced longer spermatozoa in House Wrens (Cramer et al. 2012). The negative correlation between the H/L ratio and within-male variability in sperm length in our study may imply that the maintenance of proper spermatogenesis in Great Tit males, reflected by reduced within-ejaculate variation in sperm length, is only possible at some physiological costs reflected by an increased H/L ratio. Sperm competition in passerines

leads to a decrease in the sperm length variation within ejaculates (Kleven et al. 2008; Immler et al. 2008), possibly because selection favours optimal sperm length and acts against extremes. Male fertilization ability may to a large extent be determined by sperm numbers and hence the proportion of normal sperm in the ejaculate (Malo et al. 2005). Whether having less variable sperm is adaptive for Great Tits, a species with moderate levels of sperm competition (Griffith et al. 2002), remains unknown and requires further investigation. It should be noted that when two data points with extremely high H/L ratios (both >4) were removed from the model, the negative relationship between CV_{wm} and H/L was not significant. It is worth noting, however, that we investigated sperm and condition traits of males in a free-living population, where it is difficult to catch enough males with a sufficient range of H/L ratios. Apparently, for a stronger test of the SCT (i.e. of the negative relationships among sperm traits and different levels of long-term stress) one would need an experimental approach to increase variation in the H/L ratio among individuals.

In our study, sperm morphology did not relate to any measurements of secondary traits, either carotenoid- or melanin-based feather ornaments, and we thus were unable to confirm the PLFH in our data set. This is in accordance with some previous studies on other passerine species (e.g. Lifjeld et al. 2012; but see Calhim et al. 2009). However, in contrast to our results, Helfenstein et al. (2010) showed that Great Tit males with paler carotenoid ornament and increased workload had a higher level of oxidative damage in their ejaculate and a lower proportion of motile spermatozoa than brighter males. Similarly, Losdat et al. (2011) also confirmed that more colourful males in a free-living population of the same species produced sperm with greater swimming motility. One possible explanation for this discrepancy may lie in the different sperm traits investigated (motility versus morphology). However, although we did not directly measure sperm motility as an indicator of ejaculate quality (Pizzari et al. 2008), we measured the midpiece/flagellum ratio, which has been associated with sperm speed/motility in some other studies on passerines (e.g. Laskemoen et al. 2010). In addition, total sperm length itself seems to reflect sperm speed and male fertilization success in at least some passerines (Bennison et al. 2015). The discrepancy could also be explained by the fact that there was no association between ornaments and condition traits in our study. This is not surprising because ornament function may differ not only among species but also among populations of the same species (Griffith et al. 2006; Dunn et al. 2010), and signalling may be context dependent (Vergara et al. 2012a, b). Taken together, we find it unlikely that Great Tit females could estimate ejaculate quality based on the expression of a male's secondary features in our Great Tit population.

In conclusion, based on our correlative study our data seem to partly confirm the idea that within-male variability in sperm length is negatively related to the H/L ratio in male Great Tits, which could indicate a trade-off between individual investment in ejaculate quality and immune capacity. However, there was no association between sperm traits and male ornamentation. Since other phenotypic sperm traits were not associated with any measured immunological and haematological traits, support for the trade-off between ejaculate quality and immunity needs further study, ideally involving an experimental approach.


Acknowledgments We thank Martin Těšický, Jitka Vinklerová for their help with fieldwork, Veronika Górecká for sperm analysis and an anonymous referee for their helpful comments. This study was supported by the Czech Science Foundation (project no. P506/15-11782S), and the Internal Grant Agency of the Czech University of Life Sciences (project nos. IGA 20144268 and IGA 20154241).

References

- Aire TA (2007) Spermatogenesis and testicular cycles. In: Jamieson BGM (ed) Reproductive biology and phylogeny of birds, vol 6A. Science Publishers. Enfield, NH, pp 279–347
- Albrecht T, Kleven O, Kreisinger J, Laskemoen T, Omotoriogun TC, Ottosson U, Reif J, Sedláček O, Hořák D, Robertson RJ, Lifjeld JT (2013) Sperm competition in tropical versus temperate zone birds. *Proc R Soc B Biol Sci* 280:20122434
- Andersson M (1994) Sexual selection. Princeton University Press, Princeton
- Bennison C, Hemmings N, Slate J, Birkhead T (2015) Long sperm fertilize more eggs in a bird. *Proc R Soc B* 282:20141897
- Birkhead TR, Fletcher F (1995) Male phenotype and ejaculate quality in the Zebra Finch *Taeniopygia guttata*. *Proc R Soc Lond* 262:329–334
- Blount JD, Møller AP, Houston DC (2001) Antioxidants, showy males and sperm quality. *Ecol Lett* 4:393–396
- Calhim S, Lampe HM, Slagsvold T, Birkhead TR (2009) Selection on sperm morphology under relaxed sperm competition in a wild passerine bird. *Biol Lett* 5:58–61
- Cramer ERA, Laskemoen T, Kleven O, Lifjeld JT (2012) Sperm length variation in House Wrens *Troglodytes aedon*. *J Ornithol* 154:129–138
- Crawley MJ (2002) Statistical computing. Wiley, Chichester
- Davis AK (2005) Effect of handling time and repeated sampling on avian white blood cell counts. *J Field Ornithol* 76:334–338
- Davis AK, Maney DL, Maerz JC (2008) The use of leukocyte profiles to measure stress in vertebrates: a review for ecologists. *Funct Ecol* 22:760–772
- Dunn PO, Garvin JC, Whittingham LA, Freeman-Gallant CR, Hasselquist D (2010) Carotenoid and melanin-based ornaments signal similar aspects of male quality in two populations of the Common Yellowthroat. *Funct Ecol* 24:149–158
- Gangoso L, Grande JM, Ducrest A-L, Figuerola J, Bortolotti GR, Andre's JA, Roulin A (2011) MC1R-dependent, melanin-based colour polymorphism is associated with cell-mediated response in the Eleonora's Falcon. *J Evol Biol* 24:2055–2063
- Griffith SC, Owens IP, Thuman KA (2002) Extra pair paternity in birds: a review of interspecific variation and adaptive function. *Mol Ecol* 11:2195–2212
- Griffith SC, Parker TH, Olson VA (2006) Melanin-versus carotenoid-based sexual signals: is the difference really so black and red? *Anim Behav* 71:749–763
- Guindre-Parker S, Love OP (2014) Revisiting the condition-dependence of melanin-based plumage. *J Avian Biol* 45:29–33
- Helfenstein F, Losdat S, Møller AP, Blount JD, Richner H (2010) Sperm of colourful males are better protected against oxidative stress. *Ecol Lett* 13:213–222
- Hill GE (2011) Condition-dependent traits as signals of the functionality of vital cellular processes. *Ecol Lett* 14:625–634
- Immler S, Calhim S, Birkhead TR (2008) Increased postcopulatory sexual selection reduces the intramale variation in sperm design. *Evolution* 62:1538–1543
- Isaksson C, Ornborg J, Páger M, Andersson S (2008) Sex and age differences in reflectance and biochemistry of carotenoid-based colour variation in the Great Tit *Parus major*. *Biol J Linn Soc* 95:758–765
- Jacquín L, Lenouvel P, Haussy C, Ducatez S, Gasparini J (2011) Melanin-based coloration is related to parasite intensity and cellular immune response in an urban free living bird: the Feral Pigeon *Columba livia*. *J Avian Biol* 42:11–15
- Kleven O, Laskemoen T, Fossøy F, Robertson RJ, Lifjeld JT (2008) Intraspecific variation in sperm length is negatively related to sperm competition in passerine birds. *Evolution* 62:494–499
- Kleven O, Fossøy F, Laskemoen T, Robertson RJ, Rudolfsen G, Lifjeld JT (2009) Comparative evidence for the evolution of sperm swimming speed by sperm competition and female sperm storage duration in passerine birds. *Evolution* 63:2466–2473
- Laskemoen T, Laskemoen T, Kleven O, Fossøy F, Robertson R, Rudolfsen G, Lifjeld J (2010) Sperm quantity and quality effects on fertilization success in a highly promiscuous passerine, the Tree Swallow *Tachycineta bicolor*. *Behav Ecol Sociobiol* 64:1473–1483
- Lessels CN, Boag PT (1987) Unrepeatable repeatabilities: a common mistake. *Auk* 104:116–121
- Lifjeld JT, Laskemoen T, Kleven O, Albrecht T, Robertson RJ (2010) Sperm length variation as a predictor of extrapair paternity in passerine birds. *PLoS One* 5:1–8
- Lifjeld JT, Laskemoen T, Kleven O, Pedersen AT, Lampe HM, Rudolfsen G, Schmoll T, Slagsvold T (2012) No evidence for pre-copulatory sexual selection on sperm length in a passerine bird. *PLoS One* 7:1–5
- Losdat S, Richner H, Blount JD, Helfenstein F (2011) Immune activation reduces sperm quality in the Great Tit. *PLoS One* 6:1–10
- Lozano GA (1994) Carotenoids, parasites, and sexual selection. *Oikos* 70:309–311
- Lüpold S, Calhim S, Immler S, Birkhead TR (2009) Sperm morphology and sperm velocity in passerine birds S. *Proc Biol Sci* 276:1175–1181
- Malo AF, Garde JJ, Soler AJ, García AJ, Gomendio M, Roldan ER (2005) Male fertility in natural populations of Red Deer is determined by sperm velocity and the proportion of normal spermatozoa. *Biol Reprod* 72:822–829
- Mautz BS, Møller AP, Jennions MD (2013) Do male secondary sexual characters signal ejaculate quality? A meta-analysis. *Biol Rev Camb Philos Soc* 88:669–682
- Opatová P, Ihle M, Albrechtová J, Tomášek O, Kempnaers B, Forstmeier W, Albrecht T (2016) Inbreeding depression of sperm traits in the Zebra Finch *Taeniopygia guttata*. *Ecol Evol* 6:295–304
- Ots I, Hörak P (1996) Great Tits *Parus major* trade health for reproduction. *Proc R Soc Lond* 263:1443–1447
- Parker GA (1998) Sperm competition and the evolution of ejaculates: towards theory base. Sperm competition and sexual selection. Academic Press, San Diego

- Pizzari T, Birkhead TR (2002) The sexually-selected sperm hypothesis: sexbiased inheritance and sexual antagonism. *Biol Rev Camb Philos Soc* 77:183–209
- Pizzari T, Jensen P, Cornwallis CK (2004) A novel test of the phenotype-linked fertility hypothesis reveals independent components of fertility. *Proc R Soc Lond* 271:51–58
- Pizzari T, Worley K, Burke T, Froman DP (2008) Sperm competition dynamics: ejaculate fertilising efficiency changes differentially with time. *BMC Evol Biol* 8:332
- Quesada J, Senar JC (2006) Comparing plumage colour measurements obtained directly from live birds and from collected feathers: the case of the Great Tit *Parus major*. *J Avian Biol* 37:609–616
- R Development Core Team (2011) R: a language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna
- Rowe M, McGraw KJ (2008) Carotenoids in the seminal fluid of wild birds: interspecific variation in Fairy-wrens. *Condor* 110:694–700
- Rowe M, Tourville EA, McGraw KJ (2012) Carotenoids in bird testes: links to body carotenoid supplies, plumage coloration, body mass and testes mass in House Finches (*Carpodacus mexicanus*). *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 163:285–291
- Sheldon BC (1994) Male phenotype, fertility, and the pursuit of extra-pair copulations by female birds. *Proc R Soc Lond* 257:25–30
- Sokal RR, Rohlf FJ (1981) *Biometry*. Freeman, New York
- Svensson PA, Wong BBM (2011) Carotenoid-based signals in behavioural ecology: a review. *Behaviour* 148:131–189
- Tomášek O, Albrechtová J, Němcová M, Opatová P, Albrecht T (2017) Trade-off between carotenoid-based sexual ornamentation and sperm resistance to oxidative challenge. *Proc Soc Lond*. <https://doi.org/10.1098/rspb.2016.2444>
- Vergara P, Martinez-Padilla J, Mougeot F, Leckie F, Redpath SM (2012a) The condition dependence of a secondary sexual trait is stronger under high parasite infection level. *Behav Ecol* 23:502–511
- Vergara P, Martinez-Padilla J, Mougeot F, Leckie F, Redpath SM (2012b) Environmental conditions influence Red Grouse ornamentation at a population level. *Behav Ecol* 23:502–511
- Vinkler M, Schnitzer J, Munclinger P, Votýpka J, Albrecht T (2010) Haematological health assessment in a passerine with extremely high proportion of basophils in peripheral blood. *J Ornithol* 151:841–849
- von Schantz T, Bensch S, Grahn M, Hasselquist D, Wittzell H (1999) Good genes, oxidative stress and condition-dependent sexual signals. *Proc R Soc Lond* 266:1–12

Affiliations

Jana Svobodová¹  · Petra Bauerová¹ · Jiří Eliáš¹ · Hana Velová² · Michal Vinkler² · Tomáš Albrecht^{2,3}

✉ Jana Svobodová
svobodovajana@fzp.czu.cz

¹ Department of Ecology, Faculty of Environmental Sciences, Czech University of Life Sciences Prague, Kamýcká 1176, Prague 6 165 21, Czech Republic

² Department of Zoology, Faculty of Science, Charles University, Viničná 7, Prague 128 44, Czech Republic

³ Institute of Vertebrate Biology, v.v.i, Czech Academy of Sciences, Květná 8, Brno 603 65, Czech Republic



Contents lists available at ScienceDirect

Science of the Total Environment

journal homepage: www.elsevier.com/locate/scitotenv

Longitudinally monitored lifetime changes in blood heavy metal concentrations and their health effects in urban birds

Petra Bauerová^{a,e,*}, Tereza Krajzingrová^b, Martin Těšický^b, Hana Velová^b, Jakub Hraníček^c, Stanislav Musil^d, Jana Svobodová^a, Tomáš Albrecht^{b,f}, Michal Vinkler^b

^a Czech University of Life Sciences Prague, Faculty of Environmental Sciences, Department of Ecology, Kamýcká 1176, 165 21 Prague 6, Czech Republic

^b Charles University, Faculty of Science, Department of Zoology, Viničná 7, 128 44 Prague 2, Czech Republic

^c Charles University, Faculty of Science, Department of Analytical Chemistry, Hlavova 8, 128 43 Prague 2, Czech Republic

^d Institute of Analytical Chemistry of the Czech Academy of Sciences, Department of Trace Element Analysis, Veveří 97, 602 00 Brno, Czech Republic

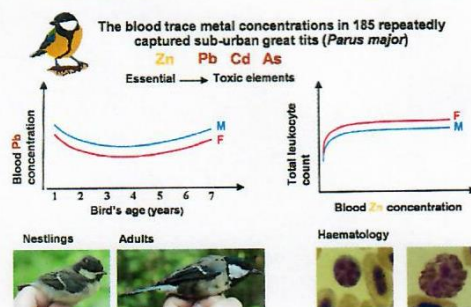
^e Czech Hydrometeorological Institute, Division of Air Quality, Tušimice Observatory, Tušimice 6, Kadaň 432 01, Czech Republic

^f Institute of Vertebrate Biology, Academy of Sciences of the Czech Republic, v.v.i., Květná 8, 603 65 Brno, Czech Republic

HIGHLIGHTS

- Unknown precise age may preclude interpretation of avian biomonitoring data.
- Great tit nestlings showed higher Pb blood levels than adults.
- Blood heavy metal concentrations were not linked to the erythrocyte counts.
- Total leukocyte count increased with increasing Pb, Cd and Zn blood concentrations.
- Precise age data are not necessary for blood heavy metal biomonitoring in adults.

GRAPHICAL ABSTRACT



ARTICLE INFO

Article history:

Received 9 January 2020

Received in revised form 10 March 2020

Accepted 15 March 2020

Available online 16 March 2020

Editor: Henner Hollert

Keywords:

Hematology
White blood cells
Ecotoxicology
Risk elements
Urbanisation
Senescence

ABSTRACT

Urban heavy metal pollution can impair the health of humans and other organisms inhabiting cities. While birds are suggested as one of the appropriate bioindicators for essential and non-essential trace element monitoring, the process of particular elements' accumulation in blood and its possible adverse health effects during ageing of individuals remain unexplored. We have investigated lifetime changes in blood lead (Pb), cadmium (Cd), arsenic (As) and zinc (Zn) concentrations and searched for links to health-related traits in sub-urban free-living great tit (*Parus major*) population monitored over a long period of time. The blood As concentrations were under the limit of detection in most samples. The blood Pb levels showed a non-linear relationship to individuals age, where the highest Pb concentrations were measured in nestlings and in a very small group of highly senescent birds (over 7 years old), while no clear trend was observed for the majority of the adult age stages. No age-related patterns were found for blood Cd or Zn concentrations. The positive relationship between date of capture and blood Cd and Zn levels may reflect seasonal changes in diet composition. We did not reveal any anaemia-like conditions (decreased total erythrocyte count or increased immature erythrocyte count) in relation to blood heavy metal concentrations in the investigated birds. Total leukocyte counts, heterophil/lymphocyte (H/L) ratio and total heterophil and lymphocyte counts increased with increasing Pb, Cd and Zn concentrations in

* Corresponding author at: Department of Ecology, Faculty of Environmental Sciences, Czech University of Life Sciences Prague, Kamýcká 1176, 165 21 Prague 6, Czech Republic.
E-mail address: petra.bauerova@chmi.cz (P. Bauerová).

blood. This study demonstrates the suitability of avian blood for actual heavy metal spatial and temporal biomonitoring even in situations when the precise age of the individuals remains unknown.

© 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Globally, various animal species colonise urban habitats where they face novel environmental threats (Francis and Chadwick, 2012; Isaksson, 2015). Among these, anthropogenic heavy metal pollution has received special attention due to its possible toxic effects on humans and wildlife and non-biodegradable nature (in this study we define heavy metals as elements with specific density $>5 \mu\text{g}/\text{m}^3$, including essential trace elements and metalloids; Assi et al., 2016; Jaishankar et al., 2014; Järup, 2003; WHO, 2007). Although intensive research in avian ecotoxicology has focused especially on industrial or post-industrial environments (Berglund et al., 2012; Dauwe et al., 2006; Fritsch et al., 2012; Migula et al., 2000), growing attention is also being paid to urban habitats lacking any particular point source of heavy metal pollution (Bailly et al., 2017; Bauerová et al., 2017; Frantz et al., 2012; Roux and Marra, 2007; Scheiffler et al., 2006). Once released by combustion processes, heavy metals most often contaminate the bodies of living organisms through the food chain (Mann et al., 2011), resulting in only slow improvement of heavy metal biocontamination (i.e. contamination of animal biota, here specifically of avian biota) after significant emissions decrease (Berglund et al., 2012; Berglund and Nyholm, 2011; Eeva and Lehtikoinen, 2015).

Some of these elements, including zinc (Zn), copper (Cu) and iron (Fe), play important roles in animal metabolism and therefore are, at low concentrations, essential (Goyer et al., 2004; Sharma and Agrawal, 2005). However, if accumulated at higher concentrations they may have toxic effects (Sharma and Agrawal, 2005; Tchounwou et al., 2012). By contrast, non-essential heavy metals such as lead (Pb), cadmium (Cd) and arsenic (As) have been proven to be highly toxic, with detrimental effects observed even in very low doses (Goyer et al., 2004; Järup, 2003). After entering the organism, toxic heavy metals replace the original essential metals and cause metabolic failures (Jan et al., 2015; Järup, 2003; Tchounwou et al., 2012). In addition, these elements have the ability to generate free radicals that increase oxidative stress, thus damage to the cellular structures (Flora et al., 2008; Jaishankar et al., 2014; Stohs and Bagchi, 1995).

Evidence from humans- and laboratory-animals studies suggests that individual heavy metals interfere with distinct physiological pathways. Pb enters the bloodstream and soft tissues rapidly and is slowly redistributed into the bones later (WHO, 1995). By contrast, Cd, which is one of the most toxic metals detectable in human bodies, rapidly enters the liver where it binds to metallothionein (replacing essential Zn) causing hepatotoxicity (Jaishankar et al., 2014; Järup, 2003). Eventually, Cd accumulates mostly in the kidneys, although partial accumulation in the bones (similar to Pb) is also known (Burger, 2008). Highly toxic metalloid As is deposited primarily in the skin and skin derivatives (in birds' claws, feathers and beaks; WHO, 2007), while interfering with most organ systems (cardiovascular, nervous, gastrointestinal and respiratory; Tchounwou et al., 2012). Finally, Zn is essential in a large number of different metalloproteins (Zargar et al., 2015). Absorbed Zn is stored in the muscles, bones, liver, pancreas, kidneys and other organs and excessive Zn is typically excreted in the faeces (WHO, 2001). Assessment of trace element concentrations in most tissues does not allow to estimate the period of time over which the elements were accumulated and differentiation of current contamination from the past one. In mobile organisms this impairs relating information on element concentration with the locality of exposure. Blood could serve as a tissue for recent contamination estimate.

Since in the modern globalised world the human diet is typically devoid of most of its local specificity, human-orientated research cannot

bring much understanding to the spatial and temporal patterns in heavy metal contamination of different biological systems. Therefore, the use of appropriate bioindicators (i.e. indicators of biota contamination, not necessarily proportionally reflecting abiotic environment) is essential. Environmental quality assessment studies have adopted several different bioindicators for different trophic levels, such as mosses and higher plants (Nickel et al., 2018; Sawidis et al., 2011), small mammals (Tête et al., 2015; Wijnhoven et al., 2007) and free-living birds (Chatelain et al., 2014; Eens et al., 1999; Frantz et al., 2012; Scheiffler et al., 2006). Especially the avian models have proven particularly useful thanks to their omnipresence and frequently generalist foraging strategies (Burger and Gochfeld, 2004; Furness, 1993; Pollack et al., 2017). Urban environmental pollution can affect the overall health and welfare of free-living birds both clinically and sub-clinically (Bailly et al., 2016; Bauerová et al., 2017; McClelland et al., 2019; Meillère et al., 2016). While there are several studies focusing on particular physiological effects of different heavy metals in wild birds (e.g. Fair and Ricklefs, 2002; Ferreyra et al., 2015; Holladay et al., 2012; Koivula and Eeva, 2010), the effect of lifetime changes in blood heavy metal concentrations on health-related traits remains mostly neglected in birds. From the perspective of haematology one of the most frequently observed health symptoms of sub-lethal doses of toxic elements is anaemia resulting from increased erythrocyte mortality. Furthermore increased total white blood cell counts (TWBC), often accompanied by increased heterophils (heterophilia) or decreased lymphocytes (lymphopenia; together causing increased H/L ratio) indicating possible acute or chronic toxicosis, long-term stress or inflammation (Campbell and Ellis, 2007; Jones, 2015).

The practical use of avian bioindicators may be confounded by the effects of individual traits associated with heavy metal contamination. While age-independent heavy metal contamination in avian blood can be predicted, given the role of blood as a transportation medium interconnecting tissues (WHO, 1995), without relevant evidence this presumption is unjustified. Haematopoiesis in the bone marrow could serve as an endogenous source of some heavy metals, such as Pb or Cd. Thus, the blood Pb and Cd levels could indicate both current and long-term exposure (WHO, 1995). As described in humans (Flora et al., 2012) bones can contribute around 40–70% of Pb released into blood in adults. However, the degree of redistribution depends on several factors, including also individual age and these processes are presently unknown in birds. Since in the field birds cannot be often precisely aged based on plumage characteristics (Svensson, 1984), age effects may bias the monitoring results. Dealing with this issue by non-longitudinal comparing broad categories of juveniles (either collected during the nesting period or during their 1st year of age) and adults (over the 1st year of age; Berglund et al., 2011; Carvalho et al., 2013; Coeurdassier et al., 2012; Fritsch et al., 2012; Janssens et al., 2001; Meillère et al., 2016; Van Wyk et al., 2001) most studies adopt an only too general age classification that is unable to cover ontogenetic changes in adults. Surprisingly, almost nothing is presently known about the process of heavy metals accumulation in free-living birds throughout their lifetime. Although named as one of the pitfalls of current research (Fritsch et al., 2019), this drawback partially reflects the fact that internal organs cannot be repeatedly sampled from the same individuals, precluding for many tissues (except blood and feathers) longitudinal studies.

Using unique long-term (2006–2018) monitoring data on repeatedly captured free-living great tits (*Parus major*; a common species used for pollutant biomonitoring; Bauerová et al., 2017; Berglund et al., 2011; Eeva et al., 2003) we have tested two main hypotheses:

1) the hypothesis of increasing heavy metal concentrations in blood during the life of an animal and 2) the hypothesis of negative effect of this contamination on health. To the first hypothesis we had two alternative predictions: i) based on the bi-directional exchange of some metals between tissues and blood, accumulation of selected heavy metals (the toxic elements Pb and Cd, unlike As and the essential Zn) throughout the life can be monitored in blood, or ii) in blood that is a transportation medium no accumulation occurs allowing the use of blood for measuring the actual biocontamination levels. To the second hypothesis we predicted to observe associations between the lifetime changes in heavy metal blood concentrations and health-related haematological traits.

2. Materials and methods

2.1. Field procedures

During the years 2006–2018 the total number of 374 blood samples from 185 repeatedly captured birds were collected within a nest-box-breeding study population of free-living great tits inhabiting a suburban forest fragment of Čimický háj and Ďáblický háj in Prague (50°8′7.186″ N, 14°27′57.422″ E, Czech Republic, EU; birds were re-captured minimally two times, on average three times, maximally five times; for a histogram of re-capturing frequencies see Fig. S1, for the number of samples in particular years see Fig. S2 in the electronic supplementary material (ESM)). The dendrological composition of the forest that is being managed in an environmentally-friendly manner under a Forest Stewardship Council (FSC) certificate – a mostly natural representation of deciduous trees is supplemented locally with coniferous species. The forest area is situated in the vicinity of a small military airport, Kbely, from which complete information was available on total daily precipitation, average temperatures, humidity and sunshine duration. Birds capturing and blood sampling was performed mostly during the early breeding season (April–May); only 7 samples (from 4 repeatedly captured animals) were collected during the winter season (January–February). The nests were checked regularly to estimate the breeding onset (in total 265 nest boxes were installed within the study area), the nestlings were ringed and sampled at the age of 15 days in the nest boxes, while the adults were mist netted in their breeding territory. The minimum known age of the birds was determined and controlled according to inter-annual monitoring (the nestlings are further referred to as birds in their 1st year of age, the minimum age of the adults at their first capture was assessed on the basis of plumage traits as either the 2nd year or older; Svensson, 1984). For a histogram of age classes with sex-specific distribution see Fig. S3 in ESM. In all of the birds a blood sample (100–150 µL) was taken from the jugular vein using a heparinised syringe within 15 min after the capture. Then, the birds were weighed with digital scales (accuracy 0.02 g; Pesola AG, Baar, Switzerland, type PPS200) and their tarsus lengths were measured with a digital calliper (accuracy to 0.01 mm; Kinex, Prague, Czech Republic) to estimate size-standardised weight (calculated as weight/tarsus length; hereafter called as body mass). Each firstly captured individual was ringed with a standard steel ring of the Czech Bird Ringing Centre (National Museum, Prague). Finally, all birds were released within 30 min after capture. A small part of each collected blood sample was used immediately for haematological analysis and the rest was stored in a microtube with 96% ethanol and later deep frozen (−80 °C) for subsequent heavy metal analysis.

2.2. Haematological analysis

The haematological analysis was performed using methodology previously described elsewhere (Bauerová et al., 2017; Svobodová et al., 2018; Vinkler et al., 2010). In brief, 15 µL of blood was diluted in 2985 µL of Natt and Herrick's solution, stored in a cooling bag and analysed the same day for the total red blood cell count (TRBC) and total white

blood cell count (TWBC) under a light microscope with 40× objective magnification (Olympus Corporation, Tokyo, Japan, type CX-31). Using a Bürker's counting chamber we manually quantified the leukocytes in 100 large squares (in a total representation of 10 mm³ of blood diluted 1:200) to calculate the TWBC. The TRBC was based on the quantification of erythrocytes in two digital images of 6 squares (representation of 0.048 mm³ of diluted blood) in automated counting software (Štěpka, 2013).

Two blood smears were prepared for the differential leukocyte and erythrocyte analysis. Unfixed dried blood smears were stained with Wright-Giemsa Modified stain (product no. WG128, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and analysed under a microscope with a 100× objective magnification. The frequencies of lymphocytes, heterophils, basophils, eosinophils and monocytes were counted in a total sample of approximately 120 leukocytes. Since heterophils and lymphocytes were the most abundant leukocyte types, the H/L ratio was calculated as a measure of long-term physiological stress (Davis et al., 2008). The total lymphocyte count (TLC) and the total heterophil count (THC) were determined by recalculating the cell-type frequencies to the TWBC. The immature erythrocyte count (IEC) was determined as a frequency of immature red blood cells (%) obtained from 5 digital images of randomly chosen monolayer fields (a sample of approximately 2000–4000 cells). For all individuals the particular procedures were always performed only by a single person to ensure minimum variation over the measurements.

2.3. Analysis of heavy metal content in dried blood

Before analysis, all whole blood samples were first dried and weighed on analytical scales (accuracy to 0.01 mg; Sartorius, Goettingen, Germany, type R160P). The weight of the samples ranged between 0.5 and 17.0 mg. In glass vials, the samples were mixed with 0.5 mL of concentrated nitric acid (HNO₃, Merck, Suprapur, Germany), 0.2 mL of 30% hydrogen peroxide (H₂O₂, p.a., Analytika, Czech Republic) and 0.3 mL of deionised water (DIW, <0.2 µS/cm, Ultrapur, Watrex, USA) and digested in a microwave digestion system, UltraWAVE (Milestone, Sorisole, Italy). A three-step programme recommended by the manufacturer was followed in this order: 5-min ramp to a temperature of 150 °C (800 W), 10-min ramp to 170 °C (1500 W) and 10-min ramp to 190 °C (1500 W). The initial pressure inside the digestion chamber was 30 bar. After digestion, the solutions were quantitatively transferred into 15 mL polypropylene vials and diluted to 5 mL volume before analysis.

Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (ICP-MS) measurements were carried out using an Agilent 7700× inductively coupled plasma mass spectrometer equipped with a MicroMist concentric nebulizer, High Matrix Interface and ASX-500 autosampler (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Zn and As were measured at *m/z* 66 and 75, respectively, in a helium collision mode (4.1 mL min^{−1} He) in a collision cell. Cd and Pb were measured at *m/z* 111 and 206 + 207 + 208, respectively, in a no gas mode. Prior to nebulization, the sample/standard was on-line mixed with a solution containing 100 µg/L germanium (Ge), 50 µg/L yttrium (Y), 20 µg/L rhodium (Rh) and 10 µg/L bismuth (Bi) in 1% HNO₃, which were used as internal standards to correct for sensitivity drifts. Element quantification was performed using a matrix matched six-point external calibration. The results were processed using Agilent Mass Hunter software.

The measured concentrations of heavy metals are presented in µg/g dry weight. The accuracy of determination was verified by the measurement of two certified reference materials: Seronorm™ Trace Elements Whole Blood 210205 L-2 (LOT 1406264; Labmark, Prague, Czech Republic) and IAEA-A-13 Trace Elements in Freeze Dried Animal Blood (International Atomic Energy Agency, Vienna, Austria). All the determined values in Seronorm™ agreed well with the certified values (Table S1 in ESM). For IAEA-A-13, there is only a certified value for Zn and an information value for Pb: both these values agreed well with

the determined values (Table S1). These results suggest good accuracy of the employed methodology for the analysis of metals in dried blood samples in great tits. The limits of detection (LOD) for Zn, Cd, Pb and As were controlled by the digestion blanks. Numerically, the limits corresponded to 8 ng for Zn, 0.008 ng for Cd, 0.1 ng for Pb and 0.15 ng for As in the liquid samples (5 mL). As the amounts of the dried blood sample taken for digestion and analysis differed significantly (0.5–17 mg), the LOD in µg/g of dried sample had to be recalculated for each sample using a sample-specific dilution factor. The dilution factors (volume of the sample taken for ICP-MS analysis/sample weight taken for digestion) were in the range of 300–10000. The measurement error determined as the average coefficient of variation (standard deviation of 5 measured replicates relative to the sample mean) estimated in a subsample of 59 individuals was <2.17% for Zn, 3.37% for Cd and 6.16% for Pb.

2.4. Statistical analysis

All statistical procedures were conducted in R software 3.5.1 (R Development Core Team, 2018). Gaussian data distributions of the selected response variables were checked using the Shapiro-Wilk normality test. Given the non-Gaussian distribution of all heavy metal concentrations and most haematological parameters, the Spearman's rank correlation coefficient was used for testing correlations. To achieve model residual normality, the logarithmic transformation was applied to the response variables before model testing (except for the IEC, where the Box-Cox transformation with lambda = -0.10 was used instead).

Despite intercorrelation, particular metals were tested separately in models regarding their different effects on body metabolism (Jaishankar et al., 2014; Järup, 2003; Tchounwou et al., 2012). The possible accumulation of heavy metals in the blood during the life of free-living birds was tested through analysis of deviance of the generalised linear mixed models (GLMMs, R package lme4; Bates et al., 2015), where concentrations of Pb/Cd/Zn in the blood were used as response variables and the age of the individuals (centred, in linear and quadratic form), sex, body mass, tarsus length and the date of capture converted to the Julian calendar (further referred to as the date) were as explanatory variables (fixed terms). The year of capture and individual ID were used in all the models as a variable with a random intercept effect, while age was used as a random slope effect within ID (age|ID) to allow for inter-individual variation in age-related changes (for full GLMMs models, see Table S2 in ESM). The Satterthwaite approximation method was used for F- and p-value estimation (R package lmerTest; Kuznetsova et al., 2017). For testing the relationship between lifetime changes of metal concentrations and particular haematological traits, the GLMMs were used with TRBC, IEC, TWBC, H/L, TLC and THC, respectively, serving as response variables and the age, sex, age:sex interaction, log transformed blood Pb/Cd/Zn concentrations, body mass, tarsus length and average air temperature 7 days before capturing (further referred to as the temperature) used as explanatory variables. Of the meteorological data available we used only the temperature (a potential stress factor linked to haematological traits) because of its statistically significant correlation with all other parameters, such as average air humidity ($r = -0.41$, $p < 0.01$), total precipitation ($r = 0.21$, $p < 0.01$) and average sunshine duration ($r = 0.66$, $p < 0.01$). The year of capture and individual ID were again used as variables with a random intercept effect, age was used as a random slope variable within ID (Table S2 in ESM).

Minimum adequate models (MAMs; here defined as models with all fixed terms significant at the level of $p \leq 0.05$ or with marginally insignificant terms at the level of $p < 0.10$) were selected by backward elimination of non-significant terms from the full models. All the steps of backward elimination in the models were verified by changes of deviance with an accompanied change in degrees of freedom (ANOVA) and Akaike information criterion (AIC) by using F statistics. Slopes and

standard errors (SE) were calculated for all continuous variables within the MAMs. The figures were made using the R package visreg (Breheny and Burchett, 2017).

3. Results

The measured blood Pb, Cd and Zn concentrations were above the detection limit of the method adopted in most of the samples (3% below the LOD for Pb, 0.22% for Cd and 0.46% for Zn). Conversely, As was predominantly non-measurable (75% of the samples below the LOD), therefore it was excluded from further analyses. The concentrations of measurable heavy metals were in the following order: Zn > Pb > Cd (summary statistics in Table 1) and were significantly positively correlated with each other (see Table 2).

3.1. Changes in blood heavy metal concentrations related to age

We found only moderate evidence of heavy metal concentration changes in the blood during the individual lifetime. In the case of Pb, our results indicated a significant sex-specific quadratic relationship between the blood Pb concentrations and age (MAM 1 in Table 3, Fig. 1), where males had higher blood Pb levels than females and where in both cases the highest concentrations were measured in nestlings and in the oldest individuals. However, this relationship was no longer significant when the age category of nestlings (age = 1) was excluded from the tested dataset (see MAM 1a in Table S3 and Fig. S4 in ESM). Exclusion of highly senescent individuals (age = 7) did not change the trend significance (see MAM 1b in Table S3 and Fig. S5 in ESM). In the cases of blood Cd and Zn concentrations we did not detect any such associations (only a significant positive relationship with the date of capture was observed; MAM 2 and MAM 3 in Table 3, Figs. S6 and S7 in ESM).

3.2. Associations between blood heavy metal concentrations and haematological parameters

The summary statistics of all the haematological parameters analysed in this study and their correlations are listed in Table S4 and Table S5, respectively (both in ESM). Our results showed no relationship between blood Pb, Cd or Zn concentrations and TRBC or IEC in the

Table 1
Summary statistics of heavy metal concentrations (µg/g dry weight) in the blood of free-living re-captured great tits at different ages.

Heavy metal	Age	N _{obs} ^a	Mean ± SD	Range	CV ^b
Zn	1	72	185.69 ± 213.35	23.37–792.01	114.90
Cd	1	72	0.04 ± 0.06	0.00–0.39	158.67
Pb	1	67	1.47 ± 1.72	0.02–7.86	117.11
Zn	2	118	600.25 ± 892.72	11.59–4203.59	148.72
Cd	2	118	0.06 ± 0.08	0.00–0.36	134.45
Pb	2	114	1.44 ± 1.71	0.04–6.49	118.14
Zn	3	123	459.65 ± 659.91	11.54–3057.00	143.57
Cd	3	124	0.07 ± 0.09	0.00–0.47	129.33
Pb	3	123	1.28 ± 1.43	0.02–6.70	112.09
Zn	4	75	661.40 ± 674.28	17.36–2808.08	101.95
Cd	4	75	0.09 ± 0.11	0.00–0.47	116.10
Pb	4	73	2.10 ± 1.85	0.04–7.70	87.75
Zn	5	34	718.25 ± 965.67	19.72–4545.31	134.45
Cd	5	34	0.10 ± 0.11	0.01–0.39	114.04
Pb	5	34	1.48 ± 1.34	0.06–4.73	90.53
Zn	6	11	257.58 ± 419.61	15.68–1396.72	162.91
Cd	6	12	0.04 ± 0.07	0.01–0.244	176.12
Pb	6	12	1.83 ± 2.26	0.04–6.59	123.87
Zn	7	3	846.40 ± 353.98	599.47–1251.94	41.82
Cd	7	3	0.13 ± 0.10	0.012–0.20	79.28
Pb	7	3	4.30 ± 2.65	1.29–6.26	61.61

N_{totObs} = 416 (number of total observations), N_{ind} = 177 (number of individuals).

^a N_{obs} = number of observations.

^b CV = coefficient of variation.

Table 2
Correlation matrix of heavy metal concentrations in blood.^a

Variable	Pb	Cd	Zn
Pb	1.00		
Cd	0.74	1.00	
Zn	0.79	0.64	1.00

^a Spearman correlation coefficients (r_s) are shown, values highlighted in bold are statistically significant at $p = 0.05$ level. $N_{\text{samples}} = 416$.

peripheral blood of tits (MAMs 4–9 in Table 3, Figs. S8–S13 in ESM). On the contrary, a significantly positive relationship between blood concentrations of all heavy metals and TWBC was detected. The strongest positive trend was detected in the case of blood Zn levels (slope = 0.146, $p < 0.001$; MAM 10 in Table 3, Fig. 2), then in blood Cd levels (slope = 0.101, $p = 0.003$; MAM 11 in Table 3; Fig. S15 in ESM) and the weakest trend was found in the case of blood Pb levels (slope = 0.089, $p = 0.017$; MAM 12 in Table 3; Fig. S14 in ESM). The differential leukocyte count analysis showed the H/L ratio to be only marginally insignificantly associated with the blood Cd concentrations (slope = 0.095, $p = 0.068$; MAM 14 in Table 3; Fig. S17 in ESM), while in the case of blood Pb and Zn concentrations there was none relationship ($p = 0.36$ and 0.17 , Figs. S16 and S18 in ESM, respectively). Furthermore, our results have shown slightly (yet significantly) increased THC for individuals with higher blood Cd and Zn concentrations (slope = 0.133, $p = 0.008$, MAM 17; slope = 0.153, $p = 0.003$, MAM 18, both in Table 3; Figs. S20 and S21 in ESM). Also, the increased TLC levels were significantly linked to the higher blood Pb and Zn concentrations (slope = 0.092, $p = 0.034$, MAM 19; slope = 0.117, $p = 0.011$, MAM 21 in Table 3; Figs. S22 and S24 in ESM). The relationship between the blood Cd concentrations and TLC was marginally insignificant ($p = 0.084$, MAM 20 in Table 3; Fig. S23 in ESM). An overview of the relationships between all analysed metals and individual haematological parameters is shown in Table 4.

4. Discussion

Although several studies have already confirmed that free-living birds can serve as useful bioindicators of environmental quality (Bauerová et al., 2017; Evers et al., 1998; Hargitai et al., 2016; Ruuskanen et al., 2014), the process of accumulation of different heavy metals during the avian lifetime has remained mostly unknown. Furthermore, the age-related effects of heavy metal concentration changes on individual health status have not yet been studied. In this correlative study we benefitted from the long-term ringing and longitudinal sampling effort in our free-living urban great tit population. The determination of the minimum age of each individual and statistical controlling for inter-annual variation allowed us to investigate the lifetime changes in blood heavy metal concentrations (Pb, Cd, As and Zn) and their associations with particular health-related haematological parameters.

Consistently with our previous study (Bauerová et al., 2017), the measured concentrations of heavy metals decreased in our samples from the essential Zn to Pb to the highly toxic Cd and As. This trend may not reflect only the environmental contamination patterns, but also bioaccumulation-associated heavy metal turnovers. We assume that a very short biological half-life of As in the blood (in humans, only from units to tens of hours; Lehmann et al., 2001) could be one of the reasons which prevented us from finding a reliable (measurable) levels of blood As contamination. The time dynamics and organ-specific deposition also need to be considered when interpreting our other findings. While a biological half-life of Pb in the blood is reported at about 1 month, in the bones (which remained unstudied in our research) it spans decades (in humans; Järup, 2003). The same is also true for Cd accumulation in the kidneys (Burger, 2008; Faroon et al., 2012). Although in this study we lack the holistic insight for a

comparison of different tissues, because this approach would not allow repeated measures within the same individuals, the use of blood appear relevant for longitudinal biomonitoring from the perspective of practical application: firstly, blood is an easily accessible biological material frequently used for both metal biomonitoring and health assessment based on haematological and biochemical traits (Bailly et al., 2017; Bauerová et al., 2017; Coeurdassier et al., 2012; Fair and Ricklefs, 2002; Ferreyra et al., 2015); secondly, blood is the transport medium that allows to detect current contamination with heavy metals regardless of their later site of deposition (García-Fernández et al., 1996; Van Wyk et al., 2001); and thirdly, both Pb and Cd are also deposited in the bones (Deng et al., 2007; García-Fernández et al., 1996; Janaydeh et al., 2018), from where, through haematopoiesis these trace elements can be partly redistributed back into the bloodstream.

Although it is known that essential elements such as Ca or Zn can protect the body against the absorption of toxic metals (Pb or Cd; Chatelain et al., 2016; Goyer et al., 2004; Hogstad, 1996) we have not confirmed this sort of negative relationship in birds' blood. Similarly to some other studies in free-living birds, we have revealed only significantly positive correlations between Zn and Pb or Cd concentrations (Dauwe et al., 2002; Fritsch et al., 2012; Janssens et al., 2001; Migula et al., 2000).

Contrasting to our prediction on lifetime bioaccumulation of heavy metals detectable in blood, our results show only weak and non-linear age effect in blood heavy metal concentrations (significant in the case of Pb, but not in Cd or Zn). This relationship is apparently driven by the mild peaks in the cohort of nestlings (1st year of age) and highly senescent individuals (minimum known age of 7 years). Notably, if the nestling category was excluded from the dataset, the relationship between blood Pb concentrations and age would become insignificant. Thus, our results suggest only a very weak lifetime accumulation tendency for Pb in the blood of adult individuals living in an urban non-industrial environment. Since great tits represent omnivorous species feeding their nestlings with insects (Cramp et al., 1993), the bimodal pattern can be explained by increased intake through a metal-rich diet (namely caterpillars, spiders or beetles; Fritsch et al., 2012; Heikens et al., 2001) in nestlings on one hand (Eeva et al., 2005; Janssens et al., 2001), and by the impaired detoxification metabolism in aged individuals on the other. Furthermore, our results also suggest that Pb may be decontaminated from the blood of young individuals, while it can later accumulate in the bodies (possibly in bones) to get increasingly redistributed back into the bloodstream of the senescent ones. Here it is appropriate to highlight that given the low re-capture rate in nestlings the age recorded was the minimum-known age (i.e. some individuals might have been actually older than the recorded age, provided that they were captured the first time as full-grown adults). Although methodologically suboptimal, this shortcoming results from the biology of the studied species and could not be prevented. Since age was in this study controlled for the individual identity in the re-capture data, this should not bias our results. Although several non-longitudinal studies in free-living birds reported higher blood Pb concentrations in adults than in nestlings (Fritsch et al., 2012; Van Wyk et al., 2001), differential heavy metal retention or detoxification within differently aged adults has not been described before for Pb. The only study (according to our knowledge) focused on repeatedly measured adult individuals in free-living birds was Evers et al. (1998), which reported similar lack of relationship in case of blood Hg contamination and age in adult re-captured common loons (*Gavia immer*).

Contrary to Pb, we have not found any relationship between blood Cd or Zn concentrations and the age or sex of the individuals. The lack of an age-related pattern of Cd in the blood was also observed in other non-longitudinal studies on free-living birds (Coeurdassier et al., 2012; Fritsch et al., 2012), while in the case of Zn, the age-related pattern in blood concentrations was not expected since Zn is an essential element regulated by the homeostatic system (WHO, 2001; Zargar et al., 2015). This corresponds to our second prediction that blood as a

Table 3
Minimum adequate models (MAMs) obtained for the dataset of re-captured great tits.

Minimum adequate model ^a	Slope ± SE	F	Df	p	N _{obs} ^b /N _{ind} ^c
MAM 1 Pb ~ age + age ² + sex		20.72	3/415	<0.001	416/177
Age	-0.054 ± 0.037	2.15	1/412	0.144	
Age ²	0.077 ± 0.020	15.22	1/412	<0.001	
Sex		4.98	1/412	0.026	
MAM 2 Cd ~ date	0.032 ± 0.004	57.13	1/410	<<0.001	412/175
MAM 3 Zn ~ date	0.031 ± 0.003	84.47	1/410	<<0.001	412/175
MAM 4 TRBC ~ age + temperature		7.61	2/262	0.022	263/114
Age	-0.019 ± 0.009	4.31	1/260	0.040	
Temperature	0.010 ± 0.005	4.19	1/260	0.042	
MAM 5 TRBC ~ age + temperature		7.57	2/261	0.023	262/112
Age	-0.018 ± 0.009	4.00	1/259	0.048	
Temperature	0.011 ± 0.005	4.33	1/259	0.039	
MAM 6 TRBC ~ age + temperature		8.31	2/266	0.016	267/115
Age	-0.019 ± 0.009	4.21	1/264	0.042	
Temperature	0.011 ± 0.005	5.08	1/264	0.025	
MAM 7 IEC ~ body mass	0.585 ± 0.325	3.24	1/317	0.073	319/138
MAM 8 IEC ~ body mass	0.640 ± 0.316	4.11	1/326	0.044	327/140
MAM 9 IEC ~ age + body mass		6.79	2/330	0.034	331/143
Age	-0.026 ± 0.015	2.92	1/328	0.092	
Body mass	0.642 ± 0.313	4.20	1/328	0.041	
MAM 10 TWBC ~ sex + Pb + body mass + temperature		22.85	4/294	<0.001	295/128
Sex		8.45	1/290	0.005	
Pb	0.089 ± 0.034	7.04	1/290	0.017	
Body mass	1.604 ± 0.695	5.33	1/290	0.022	
Temperature	0.040 ± 0.015	7.28	1/290	0.008	
MAM 11 TWBC ~ sex + Cd + body mass + temperature		27.22	4/298	<<0.001	299/128
Sex		5.94	1/294	0.016	
Cd	0.101 ± 0.032	9.84	1/294	0.003	
Body mass	1.281 ± 0.644	3.96	1/294	0.048	
Temperature	0.044 ± 0.015	9.35	1/294	0.003	
MAM 12 TWBC ~ sex + Zn + body mass + temperature		35.98	4/300	<<0.001	301/130
Sex		6.34	1/296	0.013	
Zn	0.146 ± 0.018	63.46	1/296	<0.001	
Body mass	1.627 ± 0.670	5.89	1/296	0.016	
Temperature	0.047 ± 0.012	15.27	1/296	<0.001	
MAM 13H/L ~ age + sex + temperature		32.95	3/327	<<0.001	328/141
Age	0.145 ± 0.041	12.42	1/324	0.001	
Sex		14.31	1/324	<0.001	
Temperature	-0.071 ± 0.021	11.45	1/324	0.001	
MAM 14H/L ~ age + Cd + sex + temperature		37.71	4/330	<<0.001	331/141
Age	0.159 ± 0.042	14.59	1/326	<0.001	
Cd	0.095 ± 0.052	3.39	1/326	0.068	
Sex		13.83	1/326	<0.001	
Temperature	-0.077 ± 0.021	12.86	1/326	<0.001	
MAM 15H/L ~ age + sex + temperature		35.45	3/331	<<0.001	332/144
Age	0.159 ± 0.041	15.22	1/328	<0.001	
Sex		14.04	1/328	<0.001	
Temperature	-0.073 ± 0.021	12.23	1/328	0.001	
MAM 16 THC ~ sex + body mass		19.57	2/293	<<0.001	294/127
Sex		12.49	1/291	<0.001	
Body mass	3.186 ± 1.044	9.31	1/291	0.003	
MAM 17 THC ~ sex + Cd + body mass		24.86	3/296	<<0.001	297/127
Sex		9.81	1/293	0.002	
Cd	0.133 ± 0.049	7.25	1/293	0.008	
Body mass	3.025 ± 1.012	8.94	1/293	0.003	
MAM 18 THC ~ sex + Zn + body mass		29.40	3/301	<<0.001	302/130
Sex		11.72	1/298	<0.001	
Zn	0.153 ± 0.044	11.87	1/298	0.003	
Body mass	3.001 ± 1.012	8.78	1/298	0.003	
MAM 19 TLC ~ age + Pb + temperature		23.95	3/293	<<0.001	294/127
Age	-0.094 ± 0.036	7.01	1/290	0.010	
Pb	0.092 ± 0.040	5.23	1/290	0.034	
Temperature	0.067 ± 0.018	14.53	1/290	<0.001	
MAM 20 TLC ~ age + Cd + temperature		25.06	3/296	<<0.001	297/127

Table 3 (continued)

Minimum adequate model ^a	Slope ± SE	F	Df	p	N _{obs} ^b /N _{ind} ^c
Age	-0.075 ± 0.034	4.69	1/293	0.033	
Cd	0.068 ± 0.038	3.09	1/293	0.084	
Temperature	0.075 ± 0.017	18.77	1/293	<<0.001	
MAM 21 TLC ~ age + Zn + temperature		27.16	3/301	<<0.001	302/130
Age	-0.084 ± 0.034	5.95	1/298	0.017	
Zn	0.117 ± 0.033	13.04	1/298	0.011	
Temperature	0.068 ± 0.016	17.27	1/298	<0.001	

^a The year and individual ID were used as variables with a random intercept effect, the age of the individuals was used as a random slope within the ID (Age|ID). Slope ± SE values are only provided for continuous variables. Significant and marginally non-significant effects of heavy metal concentrations in the blood are highlighted in bold. Pb/Cd/Zn = heavy metal blood concentration (µg/g dry weight), date = day of capture, temperature = average air temperature 7 days before capturing, TRBC = total red blood cell count [cells × 10¹²L], IEC = immature erythrocyte count [%], TWBC = total white blood cell count [cells × 10⁹L], H/L = heterophil/lymphocyte ratio, THC = total heterophil count [cells × 10⁹L], TLC = total lymphocyte count [cells × 10⁹L].

^b N_{obs} = number of observations.

^c N_{ind} = number of individuals.

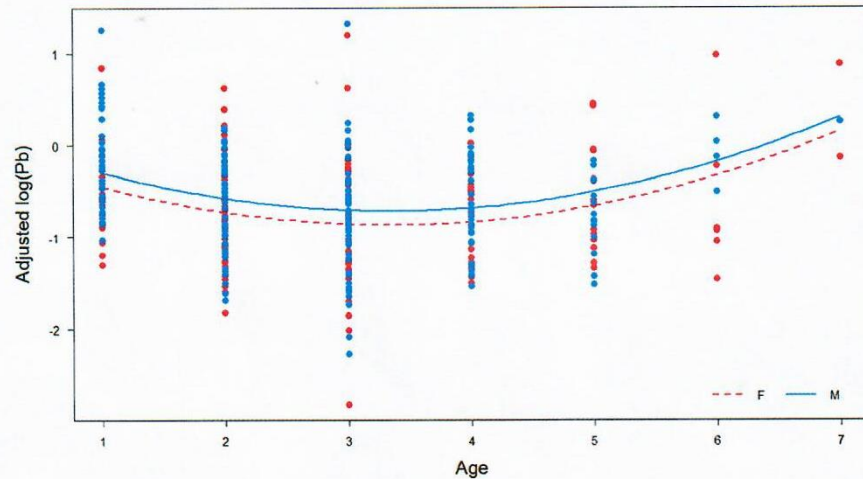


Fig. 1. The relationship between blood Pb concentration and age of great tit males (M, in blue) and females (F, in red; $N_{ind} = 177$, $N_{obs} = 416$). Blood Pb concentrations are shown on the y axis as adjusted value controlled for all significant effects of fixed variables in the MAM 1 model (Table 3), i.e. model residuals not including the random effects (done in R by package visreg; Breheny and Burchett, 2017).

transportation medium is not involved in accumulation of heavy metals, which allows use of blood for actual trace element biomonitoring. The only significant effect in the case of Cd and Zn blood concentrations was the date of capture: great tits mist netted in spring (during the breeding season) had significantly higher levels of Cd and Zn blood concentrations than the tits mist netted in winter. Although we are aware that we did not have sufficient sample of birds captured in winter ($n = 7$), we assume that these seasonal differences in blood Cd and Zn concentrations could reflect the changes in the tits' diet composition. While during the breeding season and summer this species is primarily fed on metal-rich insects, during the winter up to 90% of their diet consists of plant material and various seeds, which often have lower levels of heavy metal contamination (Eeva and Hasselquist, 2005; Fritsch et al., 2012; Ping et al., 2009). This highlights the need for accounting the seasonal effects in the biomonitoring studies.

Interestingly, contrary to our predictions based on our previous study in the same species (Bauerová et al., 2017), we found no anaemia-like conditions (decreased TRBC or increased IEC) in the

individuals suffering from higher heavy metal contamination. This may be explained by much lower Pb and Cd blood levels detected in the present study that, unlike others, did not focus on industrial sites (Belskii et al., 2005; Geens et al., 2010). Despite this lack of a relationship to erythrocyte-associated haematological traits, in all of the investigated heavy metals we showed a significant positive trend with the absolute leukocyte numbers (TWBC). Apparently, both major leukocyte types increased with the higher metal levels, but the trend was slightly stronger for heterophils. This result is surprising, because toxic (Pb and Cd) and essential (Zn) elements showed the same trend and also because this trend was evidently not reflecting the increased H/L ratio indicating long-term stress (although there was a marginally non-significant tendency in this direction for Cd). Since the strongest relationship was detected with Zn, we suggest that this trend may be driven by a possible positive effect of the increased levels of this essential element on leukocyte proliferation (Chatelain et al., 2016). However, because a similar pattern was also observed for non-essential Cd and Pb, we cannot rule out even the alternative explanation through the negative health effects

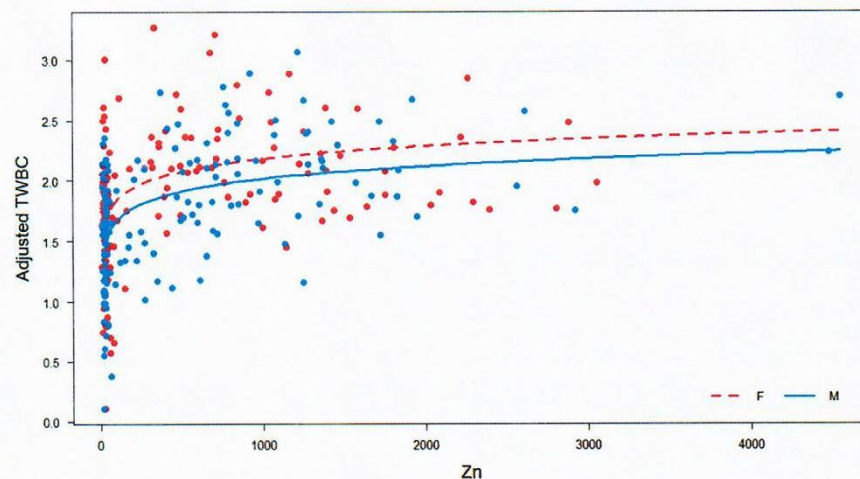


Fig. 2. Relationship between TWBC and blood Zn concentration ($\mu\text{g/g}$ dry weight) of great tits, males (M, in blue) and females (F, in red; $N_{ind} = 130$, $N_{obs} = 301$). The TWBC is shown on the y axis as adjusted value controlled for all significant effects of fixed variables from MAM 12 (Table 3), i.e. including body mass and air temperature, but not including the random effects (done in R by package visreg; Breheny and Burchett, 2017).

Table 4

The summary table of slopes for the relationships^a between blood heavy metal concentrations and particular haematological parameters.

Variable	Pb	Cd	Zn
TRBC	0 (MAM 4)	0 (MAM 5)	0 (MAM 6)
IEC	0 (MAM 7)	0 (MAM 8)	0 (MAM 9)
TWBC	+ (MAM 10)	+ (MAM 11)	+ (MAM 12)
H/L	0 (MAM 13)	+ (MAM 14)	0 (MAM 15)
THC	0 (MAM 16)	+ (MAM 17)	+ (MAM 18)
TLC	+ (MAM 19)	+ (MAM 20)	+ (MAM 21)

^a (0) = no relationship, (+) = significant (bold) or marginally non-significant (italics) positive relationship. The reference to the particular MAMs in Table 3 is provided in brackets.

of toxic heavy metal peripheral blood contamination inducing leukocyte proliferation (Dumoncaux and Harrison, 1994; Jones, 2015). There are only a few studies focusing on associations between heavy metal body contamination and blood levels of different leukocyte types in wild birds (Bauerová et al., 2017; Fredricks et al., 2009). In the case of the TWBC neither of them showed a significant relationship with heavy metal blood content and in Bauerová et al. (2017) we revealed only negative effect of blood heavy metal contamination on the H/L ratio.

The results of this long-term monitoring field study can help to clarify the role of individual age in blood heavy metal contamination in free-living animals and the associations between lifetime contamination changes and the actual health-related condition. Taken altogether, we found only moderate evidence for nestling-driven age effect on Pb blood contamination with no clear trend observable in adults. No significant age-related trend was found in the cases of Cd and Zn. Thus, our research justifies the increasing preference for use of adult birds with unknown precise age for reliable indication of actual blood contamination levels during biomonitoring. These results are not biased by the effect of lifetime accumulation in body tissues and its possible redistribution back into the blood stream.

Funding sources

This study was supported through the Czech Science Foundation (Projects Nos. P505/10/1871 and P506/15-11782S), Charles University (Projects Nos. GAUK 44809, GAUK 1626218, PRIMUS/17/SCI/12 and UNCE 204069), the Institutional Research Support (SVV 260 434/2019), the Institute of Analytical Chemistry of the Czech Academy of Sciences (Institutional Research Plan No. 68081715), and through the Grant Agency of the Faculty of Environmental Sciences at the Czech University of Life Sciences Prague (Projects Nos. IGA 20144268 and IGA 20154214). Computing and data storage facilities were provided by the National Grid Infrastructure MetaCentrum (project CESNET LM2015042).

Ethical approval

This research was approved by the Ethics Committees of the Institute of Vertebrate Biology, Czech Academy of Sciences and Charles University, Faculty of Science (Permits Nos. 107/2009, 09/2015 and 22003/ENV/16-1009/630/16) and was conducted in accordance with the current laws of the Czech Republic and the EU.

CRediT authorship contribution statement

Petra Bauerová: Methodology, Investigation, Formal analysis, Writing - original draft, Writing - review & editing. **Tereza Kražingrová**: Investigation, Formal analysis, Writing - review & editing. **Martin Těšický**: Investigation, Writing - review & editing. **Hana Velová**: Investigation, Writing - review & editing. **Jakub Hrančák**: Formal analysis, Writing - review & editing. **Stanislav Musil**: Formal analysis, Writing - review & editing. **Jana Svobodová**: Investigation, Methodology, Writing

- review & editing. **Tomáš Albrecht**: Investigation, Writing - review & editing. **Michal Vinkler**: Methodology, Investigation, Writing - original draft, Writing - review & editing.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgement

We are grateful to Hana Mrkvičková, Alena Skálová, Ondřej Št'oviček, Viktorie Tothová, Ivana Vonková, Pavel Pipek, Kateřina Kotasová, Hana Pinkasová, Lucie Schmieďová, Daniel Divín and Jitka Vinklerová for their help with the field data collection, to Martin Rychlý and Jiří Eliáš for their help with haematological analysis, to Jakub Kreisinger for help with statistical analysis, to Erin Naillon for the language correction of the manuscript and to six anonymous reviewers for their comments to earlier versions of the manuscript.

Appendix A. Supplementary data

The electronic supplementary material (ESM) contains results from full generalised linear mixed models, and all other supplementary tables and figures (5 tables and 24 figures). Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.138002>.

References

- Assi, M.A., Hezme, M.N.M., Haron, A.W., Sabri, M.Y., Rajion, M.A., 2016. The detrimental effects of lead on human and animal health. *Vet. World* 9, 660–671. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2016.660-671>.
- Bailly, J., Scheifler, R., Berthe, S., Clément-Demange, V.A., Leblond, M., Pasteur, B., Faivre, B., 2016. From eggs to fledging: negative impact of urban habitat on reproduction in two tit species. *J. Ornithol.* 157, 377–392. <https://doi.org/10.1007/s10336-015-1293-3>.
- Bailly, J., Faivre, B., Bernard, N., Sage, M., Crini, N., Driget, V., Garnier, S., Rieffel, D., Scheifler, R., 2017. Multi-element analysis of blood samples in a passerine species: excesses and deficiencies of trace elements in an urbanization study. *Front. Ecol. Evol.* 5. <https://doi.org/10.3389/fevo.2017.00006>.
- Bates, D., Mächler, M., Bolker, B.M., Walker, S.C., 2015. Fitting linear mixed-effects models using lme4. *J. Stat. Softw.* <https://doi.org/10.18637/jss.v067.i01>.
- Bauerová, P., Vinklerová, J., Hrančák, J., Čorba, V., Vojtek, L., Svobodová, J., Vinkler, M., 2017. Associations of urban environmental pollution with health-related physiological traits in a free-living bird species. *Sci. Total Environ.* 601–602, 1556–1565. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.05.276>.
- Belskii, E.A., Lugas'kova, N.V., Karfidova, A.A., 2005. Reproductive parameters of adult birds and morphophysiological characteristics of chicks in the pied flycatcher (*Ficedula hypoleuca* Pall.) in technogenically polluted habitats. *Russ. J. Ecol.* 36, 329–335. <https://doi.org/10.1007/s11184-005-0080-4>.
- Berglund, Å.M.M., Nyholm, N.E.I., 2011. Slow improvements of metal exposure, health- and breeding conditions of pied flycatchers (*Ficedula hypoleuca*) after decreased industrial heavy metal emissions. *Sci. Total Environ.* 409, 4326–4334. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2011.07.004>.
- Berglund, Å.M.M., Koivula, M.J., Eeva, T., 2011. Species- and age-related variation in metal exposure and accumulation of two passerine bird species. *Environ. Pollut.* 159, 2368–2374. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2011.07.001>.
- Berglund, Å.M.M., Ráinio, M.J., Eeva, T., 2012. Decreased metal accumulation in passerines as a result of reduced emissions. *Environ. Toxicol. Chem.* 31, 1317–1323. <https://doi.org/10.1002/etc.1814>.
- Breheny, P., Burchett, W., 2017. Visualization of regression models using visreg. *R. J.* 9, 56–71. <https://doi.org/10.32614/RJ-2017-046>.
- Burger, J., 2008. Assessment and management of risk to wildlife from cadmium. *Sci. Total Environ.* 389, 37–45. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2007.08.037>.
- Burger, J., Gochfeld, M., 2004. Metal levels in eggs of common terns (*Sterna hirundo*) in New Jersey: temporal trends from 1971 to 2002. *Environ. Res.* 94, 336–343. [https://doi.org/10.1016/S0013-9351\(03\)00081-1](https://doi.org/10.1016/S0013-9351(03)00081-1).
- Campbell, T.W., Ellis, C., 2007. *Avian and Exotic Animal Hematology and Cytology*. 3rd ed. Blackwell, Ames.
- Carvalho, P.C., Bugoni, L., McGill, R.A.R., Bianchini, A., 2013. Metal and selenium concentrations in blood and feathers of petrels of the genus *Procellaria*. *Environ. Toxicol. Chem.* 32, 1641–1648. <https://doi.org/10.1002/etc.2204>.
- Chatelain, M., Gasparini, J., Jacquin, L., Frantz, A., 2014. The adaptive function of melanin-based plumage coloration to trace metals. *Biol. Lett.* 10, 20140164. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2014.0164>.

- Chatelain, M., Gasparini, J., Frantz, M., 2016. Trace metals, melanin-based pigmentation and their interaction influence immune parameters in feral pigeons (*Columba livia*). *Ecotoxicology* 25, 521–529. <https://doi.org/10.1007/s10646-016-1610-5>.
- Coeurdassier, M., Fritsch, C., Faivre, B., Crini, N., Scheifler, R., 2012. Partitioning of Cd and Pb in the blood of European blackbirds (*Turdus merula*) from a smelter contaminated site and use for biomonitoring. *Chemosphere* 87, 1368–1373. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.02.031>.
- Cramp, S., Perrins, C.M., Brooks, D.J., 1993. The birds of western Palearctic - volume VII: flycatchers to shrikes. In: Cramp, Stanley, Brooks, D.J. (Eds.), *Handbook of the Birds of Europe, the Middle East and North Africa*. Oxford University Press, p. 577.
- Dauwe, T., Bervoets, L., Janssens, E., Pinxten, R., Blust, R., Eens, M., 2002. Great and blue tit feathers as biomonitors for heavy metal pollution. *Ecol. Indic.* 1, 227–234.
- Dauwe, T., Janssens, E., Eens, M., 2006. Effects of heavy metal exposure on the condition and health of adult great tits (*Parus major*). *Environ. Pollut.* 140, 71–78. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2005.06.024>.
- Davis, A.K., Maney, D.L., Maerz, J.C., 2008. The use of leukocyte profiles to measure stress in vertebrates: a review for ecologists. *Funct. Ecol.* 22, 760–772. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2435.2008.01467.x>.
- Deng, H., Zhang, Z., Chang, C., Wang, Y., 2007. Trace metal concentration in great tit (*Parus major*) and greenfinch (*Carduelis sinica*) at the Western Mountains of Beijing, China. *Environ. Pollut.* 148, 620–626. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2006.11.012>.
- Dumonceanu, G., Harrison, G.J., 1994. *Toxins*. In: Ritchie, B.V., Harrison, G.J., Harrison, L.R. (Eds.), *Avian Medicine: Principles and Application*. Wingers Publishing, Inc, Lake Worth, Florida, pp. 1030–1049.
- Eens, M., Pinxten, R., Verheyen, R.F., Blust, R., Bervoets, L., 1999. Great and blue tits as indicators of heavy metal contamination in terrestrial ecosystems. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 44, 81–85. <https://doi.org/10.1006/eesa.1999.1828>.
- Eeva, T., Hasselquist, D., 2005. Pollution related effects on immune function and stress in a free-living population of pied flycatcher *Ficedula hypoleuca*. *J. Avian Biol.* 36, 405–412. <https://doi.org/10.1111/j.0908-8857.2005.03449.x>.
- Eeva, T., Lehikoinen, E., 2015. Long-term recovery of clutch size and egg shell quality of the pied flycatcher (*Ficedula hypoleuca*) in a metal polluted area. *Environ. Pollut.* 201, 26–33. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2015.02.027>.
- Eeva, T., Lehikoinen, E., Nikimaa, M., 2003. Pollution-induced nutritional stress in birds: an experimental study of direct and indirect effects. *Ecol. Appl.* 13, 1242–1249. [https://doi.org/10.1890/1051-0761\(2003\)13\[1242:PI-NS\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1890/1051-0761(2003)13[1242:PI-NS]2.0.CO;2).
- Eeva, T., Rytölä, M., Riihimäki, J., 2005. Pollution-related changes in diets of two insectivorous passerines. *Oecologia* 145, 629–639. <https://doi.org/10.1007/s00442-005-0145-x>.
- Evers, D.C., Kaplan, J.D., Meyer, M.W., Reaman, P.S., Braselton, W.E., Major, A., Burgess, N., Scheuhammer, A.M., 1998. Geographic trend in mercury measured in common loon feathers and blood. *Environ. Toxicol. Chem.* 17, 173. [https://doi.org/10.1897/1551-5028\(1998\)017<0173:GTMMI>2.3.CO;2](https://doi.org/10.1897/1551-5028(1998)017<0173:GTMMI>2.3.CO;2).
- Fair, J.M., Ricklefs, R.E., 2002. Physiological, growth, and immune responses of Japanese quail chicks to the multiple stressors of immunological challenge and lead shot. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 42, 77–87. <https://doi.org/10.1007/s002440010294>.
- Faroon, O., Ashizawa, A., Wright, S., et al., 2012. *Toxicological Profile for Cadmium*. Public Health Statement.
- Ferreira, H., Beldomenico, P.M., Marchese, K., Romano, M., Caselli, A., Correa, A.I., Uhart, M., 2015. Lead exposure affects health indices in free-ranging ducks in Argentina. *Ecotoxicology* 24, 735–745. <https://doi.org/10.1007/s10646-015-1419-7>.
- Flora, S.J., Mittal, M., Mehta, A., 2008. Heavy metal induced oxidative stress & its possible reversal by chelation therapy. *Indian J. Med. Res.* 128, 501–523.
- Flora, G., Gupta, D., Tiwari, A., 2012. Toxicity of lead: a review with recent updates. *Interdiscip. Toxicol.* 5, 47–58. <https://doi.org/10.2478/v10102-012-0009-2>.
- Francis, R.A., Chadwick, M.A., 2012. What makes a species synurbic? *Appl. Geogr.* 32, 514–521. <https://doi.org/10.1016/j.apgeog.2011.06.013>.
- Frantz, A., Pottier, M.A., Karimi, B., Corbel, H., Aubry, E., Haussy, C., Gasparini, J., Castrec-Rouelle, M., 2012. Contrasting levels of heavy metals in the feathers of urban pigeons from close habitats suggest limited movements at a restricted scale. *Environ. Pollut.* 168, 23–28. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2012.04.003>.
- Fredricks, T.B., Fedynich, A.M., Bunn, S., Ford, L., 2009. Environmental contaminants in white-winged doves (*Zenaidura macroura*) from the Lower Rio Grande Valley of Texas, USA. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 57, 387–396.
- Fritsch, C., Coeurdassier, M., Faivre, B., Baurand, P., Giraudoux, P., Brink, N.W., Van Den Scheifler, R., 2012. Influence of landscape composition and diversity on contaminant flux in terrestrial food webs: a case study of trace metal transfer to European blackbirds *Turdus merula*. *Sci. Total Environ.* 432, 275–287. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.06.004>.
- Fritsch, C., Jankowiak, E., Wysocki, D., 2019. Exposure to Pb impairs breeding success and is associated with longer lifespan in urban European blackbirds. *Sci. Rep.* 9, 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-36463-4>.
- Furness, R.W., 1993. Birds as monitors of pollutants. In: Furness, R.W., Greenwood, J.J.D. (Eds.), *Birds as Monitors of Environmental Change*. Springer, Dordrecht, pp. 86–143. https://doi.org/10.1007/978-94-015-1322-7_3.
- García-Fernández, A.J., Sánchez-García, J.A., Gómez-Zapata, M., Luna, A., 1996. Distribution of cadmium in blood and tissues of wild birds. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 30, 252–258. <https://doi.org/10.1007/s002449900034>.
- Geens, A., Dauwe, T., Bervoets, L., Blust, R., Eens, M., 2010. Haematological status of wintering great tits (*Parus major*) along a metal pollution gradient. *Sci. Total Environ.* 408, 1174–1179. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2009.11.029>.
- Goyer, R., Golub, M., Choudhury, H., Hughes, M., Kenyon, E., Stifelman, M., 2004. *Issue Paper on the Human Health Effects of Metals*. U.S. EPA, Washington.
- Hargitai, R., Nagy, G., Nyiri, Z., Bervoets, L., Eke, Z., Eens, M., Török, J., 2016. Effects of breeding habitat (woodland versus urban) and metal pollution on the egg characteristics of great tits (*Parus major*). *Sci. Total Environ.* 544, 31–38. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.11.116>.
- Heikens, A., Peijnenburg, W.J.G.M., Hendriks, A.J., 2001. Bioaccumulation of heavy metals in terrestrial invertebrates. *Environ. Pollut.* 113, 385–393. [https://doi.org/10.1016/S0269-7491\(00\)00179-2](https://doi.org/10.1016/S0269-7491(00)00179-2).
- Hogstad, O., 1996. Accumulation of cadmium, copper and zinc in the liver of some passerine species wintering in Central Norway. *Sci. Total Environ.* 183, 187–194. [https://doi.org/10.1016/0048-9697\(95\)05060-4](https://doi.org/10.1016/0048-9697(95)05060-4).
- Holladay, S.D., Kerr, R., Holladay, J.P., Meldrum, B., Williams, S.M., Gogal Jr., R.M., 2012. Persistent increase of blood lead level and suppression of δ -ALAD activity in Northern bobwhite quail orally dosed with even a single 2-mm spent lead shot. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 63, 421–428. <https://doi.org/10.1007/s00244-012-9772-5>.
- Isaksson, C., 2015. Urbanization, oxidative stress and inflammation: a question of evolving, acclimatizing or coping with urban environmental stress. *Funct. Ecol.* 29, 913–923. <https://doi.org/10.1111/1365-2435.12477>.
- Jaishankar, M., Tseten, T., Anbalagan, N., Mathew, B.B., Beeregowda, K.N., 2014. Toxicity, mechanism and health effects of some heavy metals. *Interdiscip. Toxicol.* 7, 60–72. <https://doi.org/10.2478/intox-2014-0009>.
- Jan, A.T., Azam, M., Siddiqui, K., Ali, A., Choi, I., Haq, Q.M.R., 2015. Heavy metals and human health: mechanistic insight into toxicity and counter defense system of antioxidants. *Int. J. Mol. Sci.* 16, 29592–29630. <https://doi.org/10.3390/ijms161226183>.
- Janaydeh, M., Ismail, A., Omar, H., Zulkifli, S.Z., Bejo, M.H., Aziz, N.A.A., 2018. Relationship between Pb and Cd accumulations in house crow, their habitat, and food content from Klang area, Peninsular Malaysia. *Environ. Monit. Assess.* 190, 1–15. <https://doi.org/10.1007/s10661-017-6416-2>.
- Janssens, E., Dauwe, T., Bervoets, L., Eens, M., 2001. Heavy metals and selenium in feathers of great tits (*Parus major*) along a pollution gradient. *Environ. Toxicol. Chem.* 20, 2815–2820. <https://doi.org/10.1002/etc.562020121>.
- Järup, L., 2003. Hazards of heavy metal contamination. *Br. Med. Bull.* 68, 167–182. <https://doi.org/10.1093/bmb/ldg032>.
- Jones, M.P., 2015. Avian hematology. *Clin. Lab. Med.* 35, 649–659. <https://doi.org/10.1016/j.cll.2015.05.013>.
- Koivula, M.J., Eeva, T., 2010. Metal-related oxidative stress in birds. *Environ. Pollut.* 158, 2359–2370. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2010.03.013>.
- Kuznetsova, A., Brockhoff, P.B., Christensen, R.H.B., 2017. lmerTest package: tests in linear mixed effects models. *J. Stat. Softw.* <https://doi.org/10.18637/jss.v082.i13>.
- Lehmann, B., Ebeling, E., Alsen-Hinrichs, C., 2001. Kinetics of arsenic in human blood after ingestion of fish. *Gesundheitswesen* 63, 42–48. <https://doi.org/10.1055/s-2001-10456>.
- Mann, R.M., Vijver, M.G., Peijnenburg, W.J.G.M., 2011. Metals and metalloids in terrestrial systems: bioaccumulation, biomagnification and subsequent adverse effects. In: Sánchez-Bayo, F., van den Brink, P.J., Mann, Reinien M. (Eds.), *Ecological Impacts of Toxic Chemicals*. Bentham Science Publishers, Sharjah, pp. 43–62. <https://doi.org/10.1016/B978-1-60805-121-2-10043>.
- McClelland, S.C., Durães Ribeiro, R., Mielke, H.W., Finkelstein, M.E., Gonzales, C.R., Jones, J.A., Komdeur, J., Deryberry, E., Saltzberg, E.B., Karubian, J., 2019. Sub-lethal exposure to lead is associated with heightened aggression in an urban songbird. *Sci. Total Environ.* 654, 593–603. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.11.145>.
- Meillère, A., Brischoux, F., Bustamante, P., Michaud, B., Parenteau, C., Marciau, C., Angelier, F., 2016. Corticosterone levels in relation to trace element contamination along an urbanization gradient in the common blackbird (*Turdus merula*). *Sci. Total Environ.* 566–567, 93–101. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.05.014>.
- Migula, P., Augustyniak, M., Kowalczyk, K., 2000. Heavy metals, resting metabolism rates and breeding parameters in two populations of black-headed gull *Larus ridibundus* from the industrially polluted areas of Upper Silesia, Poland. *Acta Ornithol.* 35, 159–172. <https://doi.org/10.3161/068.035.0209>.
- Nickel, S., Schröder, W., Schmalzfuss, R., Saathoff, M., Harmens, H., Mills, G., Frontasyeva, M.V., Barandovski, L., Blum, O., Carballoira, A., de Temmerman, L., Dunayev, A.M., Ene, A., Fagerli, H., Godzik, B., Ilyin, I., Jonkers, S., Jeran, Z., Lazo, P., Leblond, S., Liiv, S., Mankovska, B., Núñez-Olivera, E., Piispanen, J., Poikolainen, J., Popescu, I.V., Qarri, F., Santamaría, J.M., Schaap, M., Skudnik, M., Špirić, Z., Staflov, T., Steinnes, E., Stihl, C., Suchara, I., Uggerud, H.T., Zechmeister, H.G., 2018. Modelling spatial patterns of correlations between concentrations of heavy metals in mosses and atmospheric deposition in 2010 across Europe. *Environ. Sci. Eur.* 30, 1–17. <https://doi.org/10.1186/s12302-018-0183-8>.
- Ping, Z., Huiling, Z., Wensheng, S., 2009. Biotransfer of heavy metals along a soil-plant-insect-chicken food chain: field study. *J. Environ. Sci.* 21, 849–853.
- Pollack, L., Ondrasek, N.R., Calisi, R., 2017. Urban health and ecology: the promise of an avian biomonitoring tool. *Curr. Zool.* 63, 205–212. <https://doi.org/10.1093/cz/zox011>.
- R Development Core Team, 2018. *R: A Language and Environment for Statistical Computing*.
- Roux, K.E., Marra, P.P., 2007. The presence and impact of environmental lead in passerine birds along an urban to rural land use gradient. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 53, 261–268. <https://doi.org/10.1007/s00244-006-0174-4>.
- Ruuskanen, S., Laaksonen, T., Morales, J., Moreno, J., Mateo, R., Belskii, E., Bushuev, A., Järvinen, A., Kerimov, A., Krams, I., Morosinotto, C., Mänd, R., Orell, M., Qvarnström, A., Slater, F., Tilgar, V., Visser, M.E., Winkel, W., Zang, H., Eeva, T., 2014. Large-scale geographical variation in eggshell metal and calcium content in a passerine bird (*Ficedula hypoleuca*). *Environ. Sci. Pollut. Res.* 21, 3304–3317. <https://doi.org/10.1007/s11356-013-2299-0>.
- Sawidis, T., Breuste, J., Mitrovic, M., Pavlovic, P., Tsigaridas, K., 2011. Trees as bioindicator of heavy metal pollution in three European cities. *Environ. Pollut.* 159, 3560–3570. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2011.08.008>.
- Scheifler, R., Coeurdassier, M., Morilhat, C., Bernard, N., Faivre, B., Flicoteaux, P., Giraudoux, P., Noël, M., Pottier, P., Rieffel, D., de Vaulfleur, A., Badot, P.M., 2006. Lead concentrations in feathers and blood of common blackbirds (*Turdus merula*) and in earthworms inhabiting unpolluted and moderately polluted urban areas. *Sci. Total Environ.* 371, 197–205. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2006.09.011>.

- Sharma, R.K., Agrawal, M., 2005. Biological effects of heavy metals: an overview. *J. Environ. Biol.* 26, 301–313.
- Štěpka, K., 2013. Automated cell counting in burker chamber. In: Kämäräinen, J.K., Koskela, M. (Eds.), *Image Analysis. SCIA 2013*. Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-38886-6_23.
- Stohs, S.J., Bagchi, D., 1995. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radic. Biol. Med.* 18, 321–336. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(94\)00159-H](https://doi.org/10.1016/0891-5849(94)00159-H).
- Svensson, L., 1984. *Identification Guide to European Passerines*. British Trust for Ornithology, Stockholm.
- Svobodová, J., Bauerová, P., Eliáš, J., Velová, H., Vinkler, M., Albrecht, T., 2018. Sperm variation in great tit males (*Parus major*) is linked to a haematological health-related trait, but not ornamentation. *J. Ornithol.* 159, 815–822. <https://doi.org/10.1007/s10336-018-1559-7>.
- Tchounwou, P.B., Yedjou, C.G., Patilola, A.K., Sutton, D.J., 2012. Heavy metal toxicity and the environment. In: Luch, A. (Ed.), *Molecular, Clinical and Environmental Toxicology*. Springer, Basel, pp. 133–164.
- Tête, N., Afonso, E., Bouguerra, G., Scheifler, R., 2015. Blood parameters as biomarkers of cadmium and lead exposure and effects in wild wood mice (*Apodemus sylvaticus*) living along a pollution gradient. *Chemosphere* 138, 940–946. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.12.031>.
- Van Wyk, E., Van Der Bank, F.H., Verdoorn, G.H., Hofmann, D., 2001. Selected mineral and heavy metal concentrations in blood and tissues of vultures in different regions of South Africa. *South African J. Anim. Sci.* 31, 57–63. <https://doi.org/10.4314/sajas.v31i2.3831>.
- Vinkler, M., Schnitzer, J., Munclinger, P., Votýpka, J., Albrecht, T., 2010. Haematological health assessment in a passerine with extremely high proportion of basophils in peripheral blood. *J. Ornithol.* 151, 841–849. <https://doi.org/10.1007/s10336-010-0521-0>.
- WHO, 1995. *Environmental Health Criteria 165: Inorganic Lead*. World Health Organisation, Geneva.
- WHO, 2001. *Environmental Health Criteria 221: Zinc*. World Health Organisation, Geneva.
- WHO, 2007. *Health Risks of Heavy Metals from Long-Range Transboundary Air Pollution*. World Health Organisation, Europe. Germany.
- Wijnhoven, S., Leuven, R.S.E.W., Van Der Velde, G., Jungheim, G., Koelemij, E.J., De Vries, F.T., Eijssackers, H.J.P., Smits, A.J.M., 2007. Heavy-metal concentrations in small mammals from a diffusely polluted floodplain: importance of species- and location-specific characteristics. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 52, 603–613. <https://doi.org/10.1007/s00244-006-0124-1>.
- Zargar, S.M., Mahajan, R., Farhat, S., Nazir, M., Ahmad, R.M., Salgotra, R.K., Mallick, S.A., 2015. Understanding the role of iron and zinc in animals and crop plants from genomics perspective. *Curr. Trends Biotechnol. Pharm.* 9, 182–196.

5 Shrnutí nejdůležitějších výsledků a diskuze

Díky dlouholetému monitoringu volně žijících městských populací sýkor koňader v hnízdním období včetně kolekce a analýz velkého množství biologického materiálu nám bylo umožněno studovat souvislosti mezi kvalitou prostředí zvířat, jejich zdravotním stavem a fyzickou či reprodukční kondicí. Přestože sýkora koňadra je během svého života částečně potulná nebo i tažná (Šťastný et al. 2011), naše zkušenost prokázala poměrně uspokojivou návratnost na hnízdní lokalitu v době sezóny (i s ohledem na neznalost míry úbytku jedinců v důsledku predace v mimo-hnízdním období). Jsme tedy přesvědčeni, že se jedná o vhodný modelový druh pro výzkum tohoto typu. Dále je důležité zmínit, že k účelům tohoto výzkumu nedocházelo k záměrnému usmrcování zvířat a byly použity výhradně minimálně invazivní metody odběru biologických vzorků (schváleno etickou komisí Institutu biologie obratlovců AV ČR – povolení č. 107/2009, a provedeno v souladu s českou i evropskou legislativou).

5.1 Souvislost městského znečištění ovzduší v ČR se zdravotně a kondičně závislými znaky volně žijících sýkor koňader (článek 1)

Tato studie byla dle našich znalostí jedna z prvních, která se v širším geografickém měřítku zabývala výzkumem souvislosti mezi kontaminací tkáňových struktur ptáků různými těžkými kovy (Pb, Cd, Cu, Cr a As) a úrovní znečištění ovzduší částicemi PM₁₀ v lokalitě původu (57 samců sýkor koňader odchylených v 13 různých městech v ČR).

Výsledky ukázaly, že míra kontaminace krve ani peří sýkor nijak významně nesouvisela s úrovní znečištění ovzduší prachovými částicemi (PM₁₀) ve městech jejich odchytu. I přesto byly ovšem nejvyšší koncentrace těžkých kovů naměřeny v krvi několika jedinců sýkor (n = 3) pocházejících z Bohumína, kde byla v roce monitoringu zaznamenána nejvyšší průměrná roční koncentrace PM₁₀ v ovzduší (intenzivní produkce těžkého průmyslu a metalurgie; ČHMÚ 2010). Zkreslení vztahu u ostatních lokalit bylo pravděpodobně zapříčiněno nezahrnutím jiných cest expozice kovů než právě z ovzduší (ingesce prostřednictvím vody a potravy).

Dále nebyla zjištěna žádná korelace mezi koncentracemi kovů naměřenými v krvi a v peří sýkor (podobně jako v Dauwe et al. 2006 nebo Scheifler et al. 2006). Tyto rozdíly pravděpodobně vyplývají z odlišného načasování depozice kovů do těchto tkáňových struktur. Zatímco krev je transportní médium, které odráží převážně aktuální či nedávnou

kontaminaci, peří odráží dlouhodobější meziroční kontaminaci zvířete (Dauwe et al. 2002). Na druhou stranu byla zjištěna významná pozitivní korelace koncentrací jednotlivých kovů v rámci analyzovaných tkání (podobně jako v Eens et al. 1999 či Frantz et al. 2012), což vedlo k vytvoření dvou proměnných vyjadřujících celkovou míru kontaminace peří (značeno jako PC1F) a celkovou míru kontaminace krve (PC1B; vytvořeny prostřednictvím analýzy hlavních komponent). Vyšší míra kontaminace peří (PC1F) pak dále signifikantně souvisela s vyššími hladinami H/L v krvi sýkor. Tento vztah naznačuje zvýšený dlouhodobý stres u zvířat s chronickým zatížením těžkými kovy (dříve reportováno také u Eeva et Hasselquist 2005 nebo Meillère et al. 2016). Současně byl ovšem také zjištěn negativní vztah mezi hladinami H/L v krvi a aktuální úrovní kontaminace krve těžkými kovy (PC1B) v době odchytu. Tyto protichůdné výsledky pravděpodobně odrážejí odlišný efekt kovů deponovaných v hnízdním a mimo-hnízdním období. V případě kontaminace krve lze zjištěný negativní vztah vůči H/L indexu vysvětlit možným rychlejším úbytkem heterofilů v důsledku přímého toxického účinku kovů na tyto leukocyty (ověřováno dodatečnou analýzou zvláště pro nejvíce toxický As; více viz doplňující informace k článku 1 v příloze). Tuto myšlenku ovšem nelze dostatečně podpořit dosavadní literaturou, jelikož chybí studie, které by se tímto tématem u ptáků zabývaly (zaznamenáno pouze u ryb ve studii Palikova et al. 2015).

Potenciální negativní účinky těžkých kovů na zdraví zvířat (i při nižších non-letálních koncentracích) byly dále podpořeny zjištěnými příznaky anemického onemocnění v souvislosti se zvýšenou mírou kontaminace krve sýkor. Samci s vyššími koncentracemi kovů v krvi měli signifikantně snížené celkové počty erytrocytů současně s náznakem zvýšeného poměru zastoupení nezralých (imaturních) erytrocytů v krvi (podobně jako u Belskii et al. 2005). S ohledem na velkou variabilitu pozorovanou ve vztazích mezi kontaminací krve či peří sýkor a různými zdravotně závislými hematologickými parametry je nutné zmínit, že nepopíráme možnost spolupůsobení dalších přímých i nepřímých faktorů prostředí nezahrnutých v této studii (například kvalita potravy; Eeva et al. 1998).

V případě analýzy sekundárních pohlavních znaků jsme v této studii nezaznamenali žádnou souvislost mezi kontaminací krve či peří těžkými kovy a kvalitou karotenoidního či melaninového ornamentu peří samců (na rozdíl od studií Dauwe et Eens 2008, Eeva et al. 1998 a Geens et al. 2009 zaměřených na industriálně silně zatížené lokality). Teorie nutnosti větší potřeby alokace látek a energie do vlastního sebeudržování

než do kvality před-kopulačních vizuálních pohlavních znaků u více kontaminovaných jedinců se tedy v případě těchto městských populací sýkor koňader nepotvrdila.

Celkově lze shrnout, že tato korelativní studie přispívá k pochopení vztahů mezi znečištěním životního prostředí a biologií organismů žijících v antropogenním prostředí. Výsledky ukazují, že i přes celkové zlepšení úrovně atmosférického znečištění biologicky neodbouratelnými těžkými kovy, se tyto prvky dále trvale vyskytují a hromadí v těle organismů. Dále že i relativně nízké koncentrace těchto prvků v těle mohou způsobovat subklinické fyziologické změny na úrovni krevních buněk, které se účastní homeostáze a důležitých imunitních procesů.

5.2 Kvalita ejakulátu volně žijících samců sýkor koňader v souvislosti s jejich hematologickými zdravotně závislými znaky a kvalitou ornamentů peří (článek 2)

S ohledem na inkonzistenci výsledků v dosavadní literatuře byla tato studie zaměřena na ověření platnosti tzv. hypotézy „fenotypu spojeného s plodností“ (PLFH), a to na volně žijící pražské populaci sýkor koňader. Tato hypotéza říká, že sekundární pohlavní znaky (tedy karotenoidní a melaninové ornamenty peří) jsou kondičně a zdravotně závislé a mohou tak sloužit jako vizuální znak individuální kvality samce a kvality jeho spermií (Mautz, Møller, and Jennions 2013). Kvalita spermií byla v tomto případě odvozena z vybraných morfologických parametrů (celková délka spermie, poměr délky hlavičky:bičíku spermie a variabilita v celkové délce spermií v rámci 1 jedince), které v minulosti korelovaly s funkčními znaky jako je motilita spermií, rychlost pohybu či úspěšnost oplodnění (Bennison et al. 2015; Laskemoen et al. 2010). Vyšší variabilita v celkové délce spermií v rámci ejakulátu pak může naznačovat poruchy spermatogeneze a větší riziko výskytu abnormálních spermatických buněk (Opatová et al. 2016).

Z výsledků hematologického vyšetření a analýzy morfologických znaků spermií byla zjištěna negativní souvislost mezi individuální variabilitou v délce spermií a hladinou H/L v krvi samců (indikátor stresu u ptáků; Davis 2005; Davis et al. 2008). Tedy že samci s vyšší kvalitou ejakulátu (nižší variabilita v délce spermií) měli vyšší hladinu indikátoru dlouhodobému stresu. Dle PFLH lze tento vztah vysvětlit tak, že se jednalo o excelentní jedince, kteří obhajovali vysoce kvalitní hnízdní oblast, a mohli tak být intenzivněji vystavováni antagonistickým interakcím v populaci (přirozeně zvýšené hladiny stresových hormonů). Alternativně a s ohledem na další výsledky spíše

pravděpodobněji lze tento vztah vysvětlit pomocí teorie kompromisu (součástí „teorie konkurence spermií“ – SCT; Tomášek et al. 2017), tedy že samci s vyšší kvalitou ejakulátu byli vzhledem k omezené míře investice zdrojů současně v horším zdravotním stavu a hůře odolávali stresu. Další souvislost mezi H/L indexem a standardizovanou hmotností samců (znak fyzické kondice) nebyla zjištěna.

Na rozdíl od studií Helfenstein et al. (2010) či Losdat et al. (2011), které zaznamenaly pozitivní vztah mezi kvalitou karotenoidního ornamentu peří a kvalitou spermií samců sýkor koňader (v souladu s PLFH), jsme v této studii neprokázali žádnou vzájemnou souvislost mezi sekundárními a primárními pohlavními znaky samců. Na základě těchto výsledků tedy nelze potvrdit platnost PFLH. Bohužel nelze ani nijak významně podpořit případnou teorii SCT (jako u studie Calhim et al. 2009). Kvalita ornamentů peří dále nesouvisela s vybranými kondičními ani hematologickými parametry samců.

Celkově se v této korelativní studii nepodařilo potvrdit ani jednu z nastíněných hypotéz. Zmíněnou inkonzistenci výsledků studií zabývajících se kondiční závislostí sekundárních pohlavních znaků lze vysvětlit částečně jednak sledováním odlišných parametrů (ať už pohlavních buněk, zdraví či ornamentů peří), tak pravděpodobnou odlišností funkce ornamentů peří nejen mezi různými druhy, ale také mezi různými populacemi v rámci stejného druhu (Griffith et al. 2006; Vergara et al. 2012a, 2012b). Pro podporu nastíněné teorie o kompromisu mezi udržováním kvality ejakulátu a vlastní imunokompetence je zapotřebí dalšího výzkumu, ideálně zahrnujícím postupy manipulativního experimentu.

5.3 Změny koncentrací těžkých kovů v krvi během stárnutí volně žijících sýkor koňader a jejich dopady na zdravotní a kondiční parametry zvířat

(článek 3)

Přestože různé druhy volně žijících druhů ptáků se ukázaly být vhodným indikátorem kvality prostředí (Bauerová et al. 2017; Evers et al. 1998; Hargitai et al. 2016; Ruuskanen et al. 2014), proces akumulace těžkých kovů během života jednotlivců zůstal převážně neobjasněn. Důvodem toho je zejména fakt, že různé orgány a vnitřní tkáně jakožto primární místa akumulace kovů se nedají opakovaně měřit v rámci stejných jedinců. Přestože krev je obecně považována za transportní medium, které odráží zejména aktuální expozice zvířete, existuje možnost částečné redistribuce kovů akumulovaných v místech

depozice zpět do krevního oběhu. Konkrétní projevy tohoto procesu však zatím nebyly dostatečně popsány. Tato práce se díky dlouholetému monitoringu volně žijících pražských sýkor koňader (probíhajícímu mezi lety 2006 až 2018) zabývala jako jedna z prvních změnami koncentrací těžkých kovů (Pb, Cd, As a Zn) v krvi v souvislosti s věkem u opakovaně odchycených zvířat (analyzováno 374 vzorků krve ze 185 opakovaně odchycených jedinců; z toho 72 jedinců bylo vzorkováno od mláděcího věku). Dále se zabývala otázkou, jak se změny koncentrace kovů v krvi sýkor projevují na jejich zdravotních a kondičních parametrech. Jelikož stáří jedinců lze v terénu stanovit pouze na kategorii mladší nebo starší než 1 rok (juvenilové v 1. roce života vs. starší dospělci; Berglund et al. 2011; Janssens et al. 2001) na základě daných charakteristik peří (Svensson 1984), domníváme se, že skutečný věk může zkreslovat informaci o míře kontaminace těžkými kovy při biomonitringových studiích.

Naše predikce o možnosti detekce míry celoživotní akumulace vybraných těžkých kovů z krevních vzorků se v této studii nepotvrdila. Výsledky ukázaly pouze slabý (byť statisticky signifikantní) nelineární vztah mezi koncentracemi Pb v krvi zvířat a jejich věkem, kdy vyšších koncentrací dosahovali jedinci v mláděcím (tedy v prvním roce života) a v nejstarším věku (maximum známého věku 7 let). Zvýšené koncentrace Pb v krvi mláďat lze vysvětlit možným zvýšeným příjmem v potravě, jelikož mláďata jsou po vylíhnutí rodiči intenzivně krmena housenkami a různými druhy hmyzu bohatými na obsah těžkých kovů (Fritsch et al. 2012; Heikens et al. 2001). Zvýšené koncentrace Pb v krvi u nejstarších jedinců pak mohou naznačovat sníženou schopnost detoxikace organismu v pokročilém věku zvířat. Mimoto mohou být tyto výsledky také odrazem schopnosti dekontaminace krve u mladých jedinců prostřednictvím depozice Pb do kostí během růstu, s následnou možností zvýšené míry redistribuce tohoto prvku zpět do krevního oběhu u starých jedinců.

U ostatních kovů (Cd ani Zn) koncentrace v krvi sýkor nijak významně nesouvisely s jejich věkem. V případě Cd nebyla souvislost kontaminace krve s věkem popsána ani kohortových studií Coeurdassier et al. (2012) a Fritsch et al. (2012). V případě koncentrací Zn v krvi nebylo zjištění vztahu s věkem zvířat očekáváno, jelikož tento esenciální prvek je regulován homeostatickým systémem organismu (Zargar et al. 2015). Koncentrace Cd i Zn v krvi nicméně signifikantně pozitivně souvisely s datem odchytu jedinců, kdy jedinci odchycení na jaře (během hnízdní sezóny) vykazovali výrazně vyšší koncentrace než jedinci odchycení v zimě (v případě této studie pouze 7 jedinců). Tyto výsledky mohou být opět odrazem změn v potravních preferencích sýkor

během roku. Zatímco během hnízdní sezóny se tyto ptáci živí převážně hmyzem, během zimy jejich potravu tvoří z 90 % rostlinná složka a zrniny, které mají často nižší obsah kovů než hmyz (Eeva et Hasselquist 2005; Fritsch et al. 2012; Ping et al. 2009). Tyto sezónní změny v kontaminaci krve ptáků by tedy měly být zohledněny v případě studií zabývajících se biomonitoringem na různých lokalitách.

Na rozdíl od naší předchozí studie Bauerová et al. (2017) nebyly v případě populace pražských sýkor u žádného zvířete detekovány náznaky anemického onemocnění krve v souvislosti s kontaminací kovy. Koncentrace Pb, Cd ani Zn v krvi tedy nijak nesouvisely s celkovým počtem erytrocytů ani s procentuálním zastoupením imaturních erytrocytů. Tento výsledek lze vysvětlit obecně nižšími koncentracemi Pb a Cd v krvi než u sýkor v naší předchozí studii nebo v jiných studiích soustředěných na industriálně zatížené lokality (Belskii et al. 2005; Geens et al. 2010). Naopak u celkového počtu leukocytů byl zjištěn signifikantní pozitivní vztah s koncentracemi všech testovaných kovů v krvi (Pb, Cd i Zn). Podobný vztah byl poté zjištěn i u celkového počtu heterofilů a lymfocytů. Zvýšené počty obou těchto typů leukocytů v souvislosti s koncentracemi kovů v krvi zároveň vysvětlují nesignifikantní projev u často sledovaného H/L indexu v krvi sýkor (tzv. indexu dlouhodobého stresu; Jones 2015). Jelikož nejsilnější vztah byl ve všech případech detekován u Zn, je možné, že se jedná o výsledek pozitivního účinku tohoto esenciálního prvku na zvýšenou tvorbu leukocytů jakožto podporu imunitní obranyschopnosti organismu (Chatelain et al. 2016). Nicméně s ohledem na to, že bylo dosaženo obdobných vztahů i u neesenciálních kovů (Pb a Cd), nelze vyloučit ani možnost zvýšené tvorby leukocytů v důsledku toxického působení kovů v krevním oběhu. Tyto výsledky lze dále porovnat pouze s dvěma dostupnými studiemi zabývajících se těžkými kovy u ptáků, a to s naší předchozí studií Bauerová et al. (2017) a studií Fredricks et al. (2009). Studie Fredricks et al. (2009) neprokázala žádný signifikantní vztah mezi počtem celkových či dílčích leukocytů v krvi a koncentrací kovů v játrech. Studie Bauerová et al. (2017) prokázala negativní vztah mezi koncentrací kovů v krvi a poměrem H/L, s naznačením sníženého počtu heterofilů v souvislosti s vyššími koncentracemi As. Tyto poněkud protichůdné výsledky lze pravděpodobně vysvětlit rozdílnou mírou kontaminace u studovaných zvířat. Mimoto, že v této studii byl As u převážné většiny vzorků neměřitelný (75% vzorků pod limitem detekce), je možné, že chronické nízké koncentrace kovů se projevují zvýšenou tvorbou leukocytů a až vyšší koncentrace (neznámé hladiny) se projevují úbytkem v důsledku přímého toxického účinku na tyto buňky.

Celkově vzato tato studie prokázala pouze slabou nelineární závislost mezi individuálním věkem zvířat a koncentrací Pb v jejich krvi (vztah založen zejména na vyšších koncentracích u mláďat a několika málo nejstarších jedinců). Nutno podotknout, že po dodatečném odstranění mláďat z testovaného datasetu tento vztah ovšem zanikl. Lze tedy tvrdit, že koncentrace těžkých kovů v krvi různě starých dospělců nejsou ovlivněny mírou jejich celoživotní akumulace těchto prvků, a tudíž znalost přesného věku zvířete není nezbytná v případě použití vzorků krve pro biomonitoring kovů ve vybraných lokalitách.

6 Závěry

Tato disertační práce je uceleným přehledem o potenciálních rizicích akumulace těžkých kovů v prostředí a živých organismech. I přes pravidelný monitoring a celosvětovou snahu o redukci emisí se tyto prvky stále vyskytují v tělech organismů, a to v koncentracích, které se často neprojevují akutní otravou, ale pouze částečnými fyziologickými změnami na úrovni buněk i celého organismu. Tyto změny pak mohou dále ovlivňovat kvalitu života zvířat, obzvláště v kombinaci s dalšími rizikovými faktory jako jsou kvalita potravy, vliv parazitů, stres aj. Během studia volně žijících městských populací sýkor koňader bylo za použití korelativních metod pozorováno, že ve většině vybraných měst v ČR zvířata netrpěla anemickým onemocněním krve (s výjimkou několika jedinců pocházejících z průmyslového Bohumína) či zhoršenou fyzickou kondicí v souvislosti s kontaminací těžkými kovy. Na druhou stranu byl zjištěn negativní vztah mezi H/L poměrem a kontaminací krve sýkor, který naznačoval možný projev toxického působení těžkých kovů na vybrané typy leukocytů (úbytek heterofilů). Dlouhodobý monitoring samotné pražské populace sýkor pak naopak ukázal pozitivní vztah mezi koncentracemi esenciálních i neesenciálních kovů naměřených v krvi jedinců a celkovým i dílčím počtem leukocytů. Není ovšem jasné, zda je zvýšená proliferace lymfocytů a heterofilů znakem dobré imunitní obranyschopnosti zvířat, či je projevem chronického zánětu nebo reakce na zvýšenou úmrtnost těchto buněk v souvislosti s toxickým působením neesenciálních kovů (Pb, Cd, As). Ve studovaných populacích dále nebyla zjištěna prokazatelná souvislost mezi kondičními či zdravotními znaky a kvalitou ornamentů peří či kvalitou pohlavních buněk. S ohledem na velkou variabilitu v naměřených datech lze potvrdit, že schopnost vypořádat se toxickými látkami v těle

i následná souvislost mezi individuální kondicí a zdravím zvířete s kvalitou primárních a sekundárních pohlavních znaků je nejen mezidruhově, ale i silně vnitrodruhově specifická vlastnost (rozdíly na úrovni jedinců). Nicméně s ohledem na povahu výzkumu nelze samozřejmě vyloučit možné spolupůsobení dalších faktorů, které nebyly v rámci vlastních analýz zohledněny (potravní dostupnost, míra parazitace, investice do reprodukce a hnízdní úspěšnosti, genetické predispozice, aj.).

Přestože tato práce není založena na kauzálních vztazích prokázaných řízeným experimentem, jsem přesvědčena, že její výsledky pomohou přispět k dalšímu rozvoji poznatků o souvislostech mezi kvalitou prostředí a kvalitou života volně žijících zvířat. Pro podporu zjištěných vztahů je zapotřebí dalších studií jak v přirozených populacích ptáků, tak případně v experimentálně vedených skupinách. Pro možnost ověření přímého efektu těžkých kovů na zdraví a další kondiční či reprodukční znaky ptáků bude nezbytné provést řízenou aplikaci různých dávek těžkých kovů (jak neesenciálních, tak esenciálních) na dostatečném počtu jedinců. Jednak by bylo vhodné otestovat efekt injekčně aplikovaných roztoků kovů (Pb, Cd, Zn a čistého kontrolního roztoku) na skupiny čerstvě vylíhlých mládat (stáří 7 až 15 dní; 1 skupina o alespoň 10-ti jedincích). S následným otestováním jejich kondičního, zdravotního a behaviorálního vývoje. Dále pak ve 3 skupinách dospělých jedinců (skupina alespoň o 20 jedincích, s vyváženým zastoupením pohlaví; 4. skupina kontrolní) nutričně aplikovat obdobné kovy a sledovat změny v koncentracích kovů v krvi, v kondičních a zdravotních parametrech a pohlavních znacích (efekt na morfologii a funkční znaky samčích pohlavních buňek).

Pro budoucí biomonitoring pomocí volně žijících populací ptáků je dále žádoucí zvažovat zařazení odběru a chemické analýzy vzorků potravy, rostlin a půdy pro kontrolu návaznosti na kontaminaci různých složek prostředí. V této souvislosti je například plánováno otestovat geografickou variabilitu v kontaminaci sýkor koňader těžkými kovy v rámci Evropy. Byla navázána spolupráce s několika zahraničními institucemi zabývajícími se ekologií a monitoringem tohoto druhu. Za roky 2018 a 2019 nám byly poskytnuty vzorky krve dospělých zvířat, půdy a listů z několika desítek lokalit v Evropě (s různých zařazením - městské, venkovské, zemědělské, industriálně kontaminované). Vzorky budou analyzovány jednotnou metodou ve stejné laboratoři. Studie tedy umožní nejen testovat návaznost mezi individuální kontaminací zvířat a jejich lokalit, ale i mapovat rozdíly v rámci různých evropských populací sýkor koňader.

7 Přehled literatury

- Abbasi, N.A., Jaspers, V.L.B., Chaudhry, M.J.I., Ali, S. et Malik, R.N., 2015. “Influence of taxa, trophic level, and location on bioaccumulation of toxic metals in bird’s feathers: A preliminary biomonitoring study using multiple bird species from Pakistan.” *Chemosphere* 120:527–37.
- Abdullah, M., Fasola, M., Muhammad, A., Malik, S.A., Bostan, N., Bokhari, H., Kamran, M.A., Shafqat, M.N., Alamdar, A., Khan, M., Ali, N. et Eqani, S.A.M.A.S., 2015. “Avian feathers as a non-destructive bio-monitoring tool of trace metals signatures: A case study from severely contaminated areas.” *Chemosphere* 119:553–61.
- Anděl, P., 2011. *Ekotoxikologie, Bioindikace a Biomonitoring*. Liberec: Evernia s.r.o.
- Andersson, M., 1994. *Sexual Selection*. Princeton: Princeton University Press.
- de Angelis, C., Galdiero, M., Pivonello, C., Salzano, C., Gianfrilli, D., Piscitelli, P., Lenzi, A., Colao, A. et Pivonello, R., 2017. “The environment and male reproduction: The effect of cadmium exposure on reproductive functions and its implication in fertility.” *Reproductive Toxicology* 73:105–27.
- Assi, M.A., Hezmee, M.N.M., Haron, A.W., Sabri, M.Y. et Rajion, M.A., 2016. “The detrimental effects of lead on human and animal health.” *Veterinary World* 9(6):660–71.
- ATSDR. 2004. “Toxicological Profile for Copper.” *U.S Public Health Service, Agency for Toxic Substances and Disease Registry* (September):121–89.
- ATSDR. 2007. “Toxicological Profile for Lead.” *Report of Agency for Toxic Substances and Disease Registry, U.S. Department of Health and Human Services* (August):1–523.
- ATSDR. 2012. “Toxicological Profile for Chromium.” *Report of Agency for Toxic Substances and Disease Registry, U.S. Department of Health and Human Services* (September).
- Bailly, J., Faivre, B., Bernard, N., Sage, M., Crini, N., Driget, V., Garnier, S., Rieffel, D., et Scheifler, R., 2017. “Multi-element analysis of blood samples in a passerine species: Excesses and deficiencies of trace elements in an urbanization study.” *Frontiers in Ecology and Evolution* 5(6).
- Bauerová, P., Vinklerová, J., Hraníček, J., Čorba, V., Vojtek, L., Svobodová, J. et Vinkler, M., 2017. “Associations of urban environmental pollution with health-

- related physiological traits in a free-living bird species.” *Science of the Total Environment* 601–602:1556–65.
- Belskii, E.A., Lugas’kova, N.V. et Karfidova, A.A., 2005. “Reproductive parameters of adult birds and morphophysiological characteristics of chicks in the pied flycatcher (*Ficedula hypoleuca* Pall.) in technogenically polluted habitats.” *Russian Journal of Ecology* 36(5):329–35.
- Belskii, E.A. et Grebennikov, M., 2014. “Snail consumption and breeding performance of pied flycatchers (*Ficedula hypoleuca*) along a pollution gradient in the Middle Urals, Russia.” *Science of the Total Environment* 490:114–20.
- Bennison, C., Hemmings, N., Slate, J. et Birkhead, T., 2015. “Long sperm fertilize more eggs in a bird.” *Proceedings of the Royal Society B* 282:20141897.
- Benoff, S., Jacob, A. et Hurley, I.R., 2000. “Male Infertility and environmental exposure to lead and cadmium.” *Human Reproduction Update* 6(2):107–21.
- Berglund, Å.M.M., Sturve, J., Förlin, L. et Nyholm, N.E.I., 2007. “Oxidative stress in pied flycatcher (*Ficedula hypoleuca*) nestlings from metal contaminated environments in Northern Sweden.” *Environmental Research* 105(3):330–39.
- Berglund, Å.M.M., Koivula, M.J. et Eeva, T., 2011. “Species- and age-related variation in metal exposure and accumulation of two passerine bird species.” *Environmental Pollution* 159(10):2368–74.
- Berglund, Å.M.M., Rainio, M.J. et Eeva, T., 2012. “Decreased metal accumulation in passerines as a result of reduced emissions.” *Environmental Toxicology and Chemistry* 31(6):1317–23.
- Boncompagni, E., Muhammad, A., Jabeen, R., Orvini, E., Gandini, C., Sanpera, C., Ruiz, X. et Fasola M., 2003. “Egrets as monitors of trace-metal contamination in wetlands of Pakistan.” *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 45(3):399–406.
- Borghesi, F., Dinelli, E., Migani, F., Béchet, A., Rendón-Martos, M., Amat, J.A., Sommer, S. et Gillingham, M.A.F., 2017. “Assessing environmental pollution in birds : A new methodological approach for interpreting bioaccumulation of trace elements in feather shafts using geochemical sediment data.” *Methods in Ecology and Evolution* 8(1):96–108.
- Borghesi, F., Migani, F., Andreotti, A., Baccetti, N., Bianchi, N., Birke, M. et Dinelli, E., 2016. “Metals and trace elements in feathers: a geochemical approach to avoid misinterpretation of analytical responses.” *Science of the Total Environment*

- 544(February):476–94.
- Bravo, A., Colina, M., Azuero, S. et Salas, A.R., 2005. “Heavy metal levels in plasma and fecal material samples of the black vulture (*Coragyps atratus*).” *Revista Científica de La Facultad de Ciencias Veterinarias de La Universidad Del Zulia* 15(4):319–25.
- Burger, J. et Gochfeld, M., 1997. “Risk, mercury levels, and birds: relating adverse laboratory effects to field biomonitoring.” *Environmental Research* 75(2):160–72.
- Burger, J., Woolfenden, G.E. et Gochfeld, M., 1999. “Metal concentrations in the eggs of endangered Florida scrub-jays from Central Florida.” *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 37(3):385–88.
- Burger, J., 1998. “Effects of lead on sibling recognition in young herring gulls.” *Toxicological Sciences* 43(2):155–60.
- Burger, J., 2002. “Food chain differences affect heavy metals in bird eggs in Barnegat Bay, New Jersey.” *Environmental Research Section A* 90:33–39.
- Burger, J., 2008. “Assessment and management of risk to wildlife from cadmium.” *Science of the Total Environment* 389(1):37–45.
- Burger, J. et Gochfeld, M., 1994. “Behavioral impairments of lead-injected young herring gulls in nature.” *Toxicological Sciences* 23(4):553–61.
- Burger, J. et Gochfeld, M., 2000. “Metal levels in feathers of 12 species of seabirds from Midway Atoll in the Northern Pacific Ocean.” *Science of the Total Environment* 257(1):37–52.
- Calhim, S., Lampe, H.M., Slagsvold, T. et Birkhead, T.R., 2009. “Selection on sperm morphology under relaxed sperm competition in a wild passerine bird.” *Biology Letters* 5(1):58–61.
- Campbell, T.W. et Ellis, C., 2007. *Avian and Exotic Animal Hematology and Cytology*. 3rd ed. edited by T. W. Campbell and C. Ellis. Ames: Blackwell.
- Carleton, R.E., 2008. “Ectoparasites affect hemoglobin and percentages of immature erythrocytes but not hematocrit in nestling eastern bluebirds.” *The Wilson Journal of Ornithology* 120(3):565–68.
- Carneiro, M., Colaço, B., Brandão, R., Azorín, B., Nicolas, O., Colaço, J., Pires, M.J., Agustí, S., Casas-Díaz, E., Lavin, S. et Oliveira, P.A., 2015. “Assessment of the exposure to heavy metals in griffon vultures (*Gyps fulvus*) from the Iberian Peninsula.” *Ecotoxicology and Environmental Safety* 113:295–301.
- Carvalho, P.C., Bugoni, L., Mcgill, R.A.R. et Bianchini, A., 2013. “Metal and selenium

- concentrations in blood and feathers of petrels of the genus *Procellaria*.” *Environmental Toxicology and Chemistry* 32(7):1641–48.
- Castellanos, P., del Olmo, E., Fernández-Santos, M.R., Rodríguez-Estival, J., Garde, J.J. Mateo, R., 2015. “Increased chromatin fragmentation and reduced acrosome integrity in spermatozoa of red deer from lead polluted sites.” *Science of the Total Environment* 505:32–38.
- Chatelain, M., Gasparini, J. et Frantz, M., 2016. “Trace metals, melanin-based pigmentation and their interaction influence immune parameters in feral pigeons (*Columba livia*).” *Ecotoxicology* 25(3):521–29.
- Chatelain, M., Gasparini, J., Jacquin, L. et Frantz, A., 2014. “The adaptive function of melanin-based plumage coloration to trace metals.” *Biology Letters* 10(3):20140164.
- Chatelain, M., Pessato, A., Frantz, A., Gasparini, J. et Leclaire, S., 2017. “Do trace metals influence visual signals? Effects of trace metals on iridescent and melanic feather colouration in the feral pigeon.” *Oikos* 126(11):1542–53.
- ČHMÚ. 1998. “Imise Těžkých Kovů Obsažených v Prašném Aerosolu.” *Český Hydrometeorologický Ústav, Grafická Ročenka 1998*.
- ČHMÚ. 2010. “Tabelární Přehled Znečištění Ovzduší Za Rok 2009.” *Český Hydrometeorologický Ústav, Tabelární Přehled Za Rok 2009*. Retrieved March 25, 2020 (http://portal.chmi.cz/files/portal/docs/uoco/isko/tab_roc/2009_enh/cze/index_cz.html).
- ČHMÚ. 2016. “Znečištění Ovzduší Těžkými Kovy v Roce 2016.” *Český Hydrometeorologický Ústav, Grafická Ročenka 2016*.
- Coeurdassier, M., Fritsch, C., Faivre, B., Crini, N. et Scheifler, R., 2012. “Partitioning of Cd and Pb in the blood of european blackbirds (*Turdus merula*) from a smelter contaminated site and use for biomonitoring.” *Chemosphere* 87(11):1368–73.
- Cooper, Z., Bringolf, R., Cooper, R., Loftis, K., Bryan, A.L. et Martin, J.A., 2017. “Heavy metal bioaccumulation in two passerines with differing migration strategies.” *Science of the Total Environment* 592:25–32.
- Costa, R.A., Eeva, T., Eira, C., Vaqueiro, J., Medina, P. et Vingada, J.V., 2014. “Great tits breeding performance and mercury contamination from paper and pulp industry in the West Coast of Portugal.” *Chemistry and Ecology* 30(3):206–15.
- Costa, R.A., Eeva, T., Eira, C., Vaqueiro, J. et Vingada, J.V., 2012. “Assessing heavy

- metal pollution using great tits (*Parus major*): Feathers and excrements from nestlings and adults.” *Environmental Monitoring and Assessment* 185(6):5339–44.
- Dauwe, T., Bervoets, L., Pinxten, R., Blust, R. et Eens M., 2003. “Variation of heavy metals within and among feathers of birds of prey: Effects of molt and external contamination.” *Environmental Pollution* 124(3):429–36.
- Dauwe, T., Janssens, E., Bervoets, L., Blust, R. et Eens, M., 2004a. “Relationships between metal concentrations in great tit nestlings and their environment and food.” *Environmental Pollution* 131(3):373–80.
- Dauwe, T., Janssens, E., Bervoets, L., Blust, R. et Eens, M., 2005. “Heavy-metal concentrations in female laying great tits (*Parus major*) and their clutches.” *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 49:249–56.
- Dauwe, T., Janssens, E., Kempenaers, B. et Eens, M., 2004b. “The effect of heavy metal exposure on egg size, eggshell thickness and the number of spermatozoa in blue tit *Parus caeruleus* eggs.” *Environmental Pollution* 129:125–29.
- Dauwe, T., Bervoets, L., Janssens, E., Pinxten, R., Blust, R. et Eens, M., 2002. “Great and blue tit feathers as biomonitors for heavy metal pollution.” *Ecological Indicators* 1(4):227–34.
- Dauwe, T. et Eens, M., 2008. “Melanin- and carotenoid-dependent signals of great tits (*Parus major*) relate differently to metal pollution.” *Naturwissenschaften* 95:969–73.
- Dauwe, T., Janssens, E. et Eens, M., 2006. “Effects of heavy metal exposure on the condition and health of adult great tits (*Parus major*).” *Environmental Pollution* 140(1):71–78.
- Davis, A.K., Maney, D.L. et Maerz, J.C., 2008. “The use of leukocyte profiles to measure stress in vertebrates : A review for ecologists.” *Functional Ecology* 22:760–72.
- Davis, A.K., 2005. “Effect of handling time and repeated sampling on avian white blood cell counts.” *Journal of Field Ornithology* 76(4):334–38.
- Dawson, R.D. et Bortolotti, G.R., 1997. “Are Avian hematocrits indicative of condition? American kestrels as a model.” *Journal of Wildlife Management* 61(4):1297–1306.
- Deng, H., Zhang, Z., Chang, C. et Wang, Y., 2007. “Trace metal concentration in great tit (*Parus major*) and greenfinch (*Carduelis sinica*) at the Western Mountains of Beijing, China.” *Environmental Pollution* 148(2):620–26.

- Dietz, R., Riget, F.F., Boertmann, D., Sonne, C., Olsen, M.T., Fjeldsa, J., Falk, K., Kirkegaard, M., Egevang, C., Asmund, G., Wille, F. et Møller, S., 2006. "Time trends of mercury in feathers of West Greenland birds of prey during 1851-2003." *Environmental Science and Technology* 40(19):5911–16.
- Dumonceaux, G. et Harrison, G. J., 1994. "Toxins." Pp. 1030–49 in *Avian Medicine: Principles and Application*, edited by B.V. Ritchie, G.J. Harrison, and L.R. Harrison. Lake Worth, Florida: Wingers Publishing, Inc.
- EEA. 2013. *Every Breath We Take, Improving Air Quality in Europe*. Luxemburg.
- EEA. 2015. *Air Quality in Europe - 2015 Report*. Luxemburg: Publications Office of the EU.
- Eens, M., Pinxten, R., Verheyen, R.F., Blust, R. et Bervoets, L., 1999. "Great and blue tits as indicators of heavy metal contamination in terrestrial ecosystems." *Ecotoxicology and Environmental Safety* 44(1):81–85.
- Eeva, T., Ahola, M. et Lehikoinen, E., 2009. "Breeding performance of blue tits (*Cyanistes caeruleus*) and great tits (*Parus major*) in a heavy metal polluted area." *Environmental Pollution* 157(11):3126–31.
- Eeva, T. et Lehikoinen, E., 2004. "Rich calcium availability diminishes heavy metal toxicity in pied flycatcher." *Functional Ecology* 18(4):548–53.
- Eeva, T., Lehikoinen, E. et Rönkä, M., 1998. "Air pollution fades the plumage of the great tit." *Functional Ecology* 12(4):607–12.
- Eeva, T., Ryömä, M. et Riihimäki, J., 2005. "Pollution-related changes in diets of two insectivorous passerines." *Oecologia* 145(4):629–39.
- Eeva, T., Tanhuanpää, S., Råbergh, C., Airaksinen, S., Nikinmaa, M. et Lehikoinen, E., 2000. "Biomarkers and fluctuating asymmetry as indicators of pollution-induced stress in two hole-nesting passerines." *Functional Ecology* 14(2):235–43.
- Eeva, T., Belskii, E., Gilyazov, A.S. et Kozlov, M.V., 2012. "Pollution impacts on bird population density and species diversity at four non-ferrous smelter sites." *Biological Conservation* 150(1):33–41.
- Eeva, T. et Hasselquist, D., 2005. "Pollution related effects on immune function and stress in a free-living population of pied flycatcher *Ficedula hypoleuca*." *Journal of Avian Biology* 36:405–12.
- Eeva, T. et Lehikoinen, E., 1996. "Growth and mortality of nestling great tits (*Parus major*) and pied flycatchers (*Ficedula hypoleuca*) in a heavy metal pollution gradient." *Oecologia* 108(november):631–39.

- Eeva, T. et Lehtikoinen, E., 2015. "Long-term recovery of clutch size and egg shell quality of the pied flycatcher (*Ficedula hypoleuca*) in a metal polluted area." *Environmental Pollution* 201:26–33.
- Eeva, T., Lehtikoinen, E. et Nikinmaa, M., 2003. "Pollution-induced nutritional stress in birds: An experimental study of direct and indirect effects." *Ecological Applications* 13(5):1242–49.
- Espín, S., Ruiz, S., Sánchez-Virosta, P., Lilley, T. et Eeva, T., 2017. "Oxidative status in relation to metal pollution and calcium availability in pied flycatcher nestlings – A calcium manipulation experiment." *Environmental Pollution* 229:448–58.
- Evers, D.C., Kaplan, J.D., Meyer, M.W., Reaman, P.S., Braselton, W.E., Major, A., Burgess, N. et Scheuhammer, A.M., 1998. "Geographic trend in mercury measured in common loon feathers and blood." *Environmental Toxicology and Chemistry* 17(2):173.
- Ewenson, E.L., Zann, R.A. et Flannery, G.R., 2001. "Body condition and immune response in wild zebra finches: Effects of capture, confinement and captive-rearing." *Naturwissenschaften* 88(9):391–94.
- Faroon, O., Ashizawa, A., Wright, S. et al. 2012. ATSDR. *Toxicological Profile for Cadmium*.
- Flora, S.J., Mittal, M. et Mehta, A., 2008. "Heavy metal induced oxidative stress & its possible reversal by chelation therapy." *Indian Journal of Medical Research* 128(October):501–23.
- Frantz, A., Pottier, M.A., Karimi, B., Corbel, H., Aubry, E., Haussy, C., Gasparini, J. et Castrec-Rouelle, M., 2012. "Contrasting levels of heavy metals in the feathers of urban pigeons from close habitats suggest limited movements at a restricted scale." *Environmental Pollution* 168:23–28.
- Fredricks, T.B., Fedynich, A.M., Benn, S. et Ford, L., 2009. "Environmental contaminants in white-winged doves (*Zenaida asiatica asiatica*) from the Lower Rio Grande Valley of Texas, USA." *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 57(2):387–96.
- Fritsch, C., Coeurdassier, M., Faivre, B., Baurand, P.E., Giraudoux, P., Van Den Brink, N.W. et Scheifler, R., 2012. "Influence of landscape composition and diversity on contaminant flux in terrestrial food webs: A case study of trace metal transfer to european blackbirds *Turdus merula*." *Science of the Total Environment* 432:275–87.

- Fritsch, C., Jankowiak, L. et Wysocki, D., 2019. "Exposure to pb impairs breeding success and is associated with longer lifespan in urban european blackbirds." *Scientific Reports* 9(1):1–11.
- Furness, R.W. 1993. "Birds as Monitors of Pollutants." Pp. 86–143 in *Birds as Monitors of Environmental Change*, edited by R. W. Furness and J. J. D. Greenwood. Dordrecht: Springer.
- Furness, R.W. et Greenwood, J.J., 1993. "Birds as Monitors of Pollutants." Pp. 86–143 in *Birds as monitors of environmental change*.
- Gangoso, L., Álvarez-Lloret, P., Rodríguez-Navarro, A.A.B., Mateo, R., Hiraldo, F. et Donazar, J.A., 2009. "Long-term effects of lead poisoning on bone mineralization in vultures exposed to ammunition sources." *Environmental Pollution* 157(2):569–74.
- García-Fernández, A.J., Sanchez-Garcia, J A., Gomez-Zapata, M. et Luna, A., 1996. "Distribution of cadmium in blood and tissues of wild birds." *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 30(2):252–58.
- García, M.A., Alonso, J., Fernández, M.I. et Melgar, M J., 1998. "Lead content in edible wild mushrooms in northwest spain as indicator of environmental contamination." *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 34(4):330–35.
- Geens, A., Dauwe, T., Bervoets, L., Blust, R. et Eens, M., 2010. "Haematological status of wintering great tits (*Parus major*) along a metal pollution gradient." *Science of the Total Environment* 408(5):1174–79.
- Geens, A., Dauwe, T. et Eens, M., 2009. "Does anthropogenic metal pollution affect carotenoid colouration, antioxidative capacity and physiological condition of great tits (*Parus major*)?" *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology* 150(2):155–63.
- Giraudeau, M., Chavez, A., Toomey, M.B. et McGraw, K.J., 2015. "Effects of carotenoid supplementation and oxidative challenges on physiological parameters and carotenoid-based coloration in an urbanization context." *Behavioral Ecology and Sociobiology* 69(6):957–70.
- Goyer, R., Golub, M., Choudhury, H., Hughes, M., Kenyon, E. et Stifelman, M., 2004. *Issue Paper on the Human Health Effects of Metals*. Washington.
- Griffith, S.C., Parker, T.H. et Olson, V.A., 2006. "Melanin- versus carotenoid-based sexual signals: Is the difference really so black and red?" *Animal Behaviour*

71(4):749–63.

- Hargitai, R., Nagy, G., Nyiri, Z., Bervoets, L., Eke, Z., Eens, M. et Török, J., 2016. “Effects of breeding habitat (woodland versus urban) and metal pollution on the egg characteristics of great tits (*Parus major*).” *Science of the Total Environment* 544(February):31–38.
- Heikens, A., Peijnenburg, W.J.G.M. et Hendriks, A. J., 2001. “Bioaccumulation of heavy metals in terrestrial invertebrates.” *Environmental Pollution* 113(3):385–93.
- Helfenstein, F., Losdat, S., Møller, A.P., Blount, J.D. et Richner, H., 2010. “Sperm of colourful males are better protected against oxidative stress.” *Ecology Letters* 13(2):213–22.
- Hernández-Ochoa, I., García-Vargas, G., López-Carrillo, L., Rubio-Andrade, M., Morán-Martínez, J., Cebrián, M.E. et Quintanilla-Vega, B., 2005. “Low lead environmental exposure alters semen quality and sperm chromatin condensation in Northern Mexico.” *Reproductive Toxicology* 20(2):221–28.
- Hill, G.E., 2006. “Female Mate Choice for Ornamental Coloration.” *Bird Coloration Volume II. Function and Evolution* 137–200.
- Hill, G.E., 2011. “Condition- dependent traits as signals of the functionality of vital cellular processes.” *Ecology Letters* 14:625–34.
- Isaksson, C., 2015. “Urbanization, oxidative stress and inflammation: A question of evolving, acclimatizing or coping with urban environmental stress.” *Functional Ecology* 29(7):913–23.
- Jaishankar, M., Tseten, T., Anbalagan, N., Mathew, B.B. et Beeregowda, K.N., 2014. “Toxicity, mechanism and health effects of some heavy metals.” *Interdisciplinary Toxicology* 7(2):60–72.
- Janaydeh, M., Ismail, A., Omar, H., Zulkifli, S.Z., Bejo, M.H. et Aziz, N.A.A., 2018. “Relationship between Pb and Cd accumulations in house crow, their habitat, and food content from Klang Area, Peninsular Malaysia.” *Environmental Monitoring and Assessment* 190(47):1–15.
- Janssens, E., Dauwe, T., Bervoets, L. et Eens, M., 2001. “Heavy metals and selenium in feathers of great tits (*Parus major*) along a pollution gradient.” *Environmental Toxicology and Chemistry* 20(12):2815–20.
- Janssens, E., Dauwe, T., Pinxten, R., Bervoets, L., Blust, R. et Eens, M., 2003. “Effects of heavy metal exposure on the condition and health of nestlings of the great tit (*Parus major*), a small songbird species.” *Environmental Pollution* 126(2):267–74.

- Järup, L., 2003. "Hazards of heavy metal contamination." *British Medical Bulletin* 68:167–82.
- Jones, M.P., 2015. "Avian hematology." *Clinics in Laboratory Medicine* 35(3):649–59.
- Kim, J. et Koo, T.H., 2008. "Heavy metal concentrations in feathers of Korean shorebirds." *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 55(1):122–28.
- Koivula, M.J. et Eeva, T., 2010. "Metal-related oxidative stress in birds." *Environmental Pollution* 158(7):2359–70.
- Koivula, M.J., Kanerva, M., Salminen, J.P., Nikinmaa, M. et Eeva, T., 2011. "Metal pollution indirectly increases oxidative stress in great tit (*Parus major*) nestlings." *Environmental Research* 111(3):362–70.
- Koller, K., Brown, T., Spurgeon, A. et Levy, L., 2004. "Recent developments in low-level lead exposure and intellectual impairment in children." *Environmental Health Perspectives* 112(9):987–94.
- Kraak, M.H.S., Scholten, M.C.T., Peeters, W.H.M. et de Kock, W.C., 1991. "Biomonitoring of heavy-metals in the Western-European rivers Rhine and Meuse using the fresh-water mussel *Dreissena-polymorpha*." *Environmental Pollution* 74(2):101–14.
- Lalotra, P., Gupta, D., Yangdol, R., Sharma, Y.P., et Gupta, S.K., 2016. "Bioaccumulation of heavy metals in the sporocarps of some wild mushrooms." *Current Research in Environmental & Applied Mycology* 6(3):159–65.
- Lam, J.C.W., Tanabe, S., Lam, M.H.W. et Lam, P.K.S., 2005. "Risk to breeding success of waterbirds by contaminants in hong kong: evidence from trace elements in eggs." Pp. 481–90 in *Environmental Pollution*. Vol. 135.
- Laskemoen, T., Kleven, O., Fossøy, F., Robertson, R.J., Rudolfson, G. et Lifjeld, J.T., 2010. "Sperm quantity and quality effects on fertilization success in a highly promiscuous passerine, the tree swallow *Tachycineta bicolor*." *Behavioral Ecology and Sociobiology* 64:1473–1483.
- Lehmann, B., Ebeling, E. et Alsen-Hinrichs, C., 2001. "Kinetics of arsenic in human blood after ingestion of fish." *Gesundheitswesen* 63(1):42–48.
- Liu, J., Liu, X., Wang, W., McCauley, L., Pinto-Martin, J., Wang, Y., Li, L., Yan, C. et Rogan, W.J., 2014. "Blood lead concentrations and children's behavioral and emotional problems: A cohort study." *JAMA Pediatrics* 168(8):737–45.
- Losdat, S., Richner, H., Blount, J.D. et Helfenstein, F., 2011. "Immune activation

- reduces sperm quality in the great tit.” *PLoS ONE* 6(7):e22221.
- Maedgen, J.L., Hacker, C.S., Schroder, G.D. et Weir, F.W., 1982. “Bioaccumulation of lead and cadmium in the Royal tern and sandwich tern.” *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 11(1):99–102.
- Malik, R.N. et Zeb, N., 2009. “Assessment of environmental contamination using feathers of *Bubulcus ibis* L., as a biomonitor of heavy metal pollution, Pakistan.” *Ecotoxicology* 18(5):522–36.
- Mann, R.M., Vijver, M.G. et Peijnenburg, W.J.G.M., 2011. “Metals and Metalloids in Terrestrial Systems: Bioaccumulation, Biomagnification and Subsequent Adverse Effects.” Pp. 43–62 in *Ecological Impacts of Toxic Chemicals*, edited by F. Sánchez-Bayo, P.J. van den Brink, and R.M. Mann. Sharjah: Bentham Science Publishers.
- Mautz, B.S., Møller, A.P. et Jennions, M.D., 2013. “Do male secondary sexual characters signal ejaculate quality? A Meta-Analysis.” *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society* 88(3):669– 682.
- McGraw, K.J., 2003. “Melanins, metals, and mate quality.” *Oikos* 102(2):402–6.
- McGraw, K.J., 2007. “Dietary mineral content influences the expression of melanin-based ornamental coloration.” *Behavioral Ecology* 18(1):137–42.
- McGraw, K.J., 2008. “An update on the honesty of melanin-based color signals in birds.” *Pigment Cell and Melanoma Research* 21(2):133–38.
- Meillère, A., Brischoux, F., Bustamante, P., Michaud, B., Parenteau, C., Marciau, C. et Angelier, F., 2016. “Corticosterone levels in relation to trace element contamination along an urbanization gradient in the common blackbird (*Turdus merula*).” *Science of The Total Environment* 566–567:93–101.
- Migula, P., Augustyniak, M. et Kowalczyk, K., 2000. “Heavy metals, resting metabolism rates and breeding parameters in two populations of black-headed gull *Larus ridibundus* from the industrially polluted areas of Upper Silesia, Poland.” *Acta Ornithologica* 35(2):159–72.
- Møller, A.P., Biard, C., Blount, J.D., Houston, D.C., Ninni, P., Saino, N. et Surai, P.F., 2000. “Carotenoid-dependent signals: indicators of foraging efficiency, immunocompetence or detoxification ability?” *Avian and Poultry Biology Reviews* 11(3):137–59.
- Mora, M.A., 2003. “Heavy metals and metalloids in egg contents and eggshells of passerine birds from Arizona.” *Environmental Pollution* 125(3):393–400.

- Nabais, C., Freitas, H. et Hagemeyer, J., 1999. “Dendroanalysis: a tool for biomonitoring environmental pollution?” *Science of the Total Environment* 232: 33–37.
- Nam, D.H., Lee, D.P. et Koo, T.H., 2004. “Factors causing variations of lead and cadmium accumulation of feral pigeons (*Columba livia*).” *Environmental Monitoring and Assessment* 95:23–35.
- Niecke, M., Rothlaender, S. et Roulin, A., 2003. “Why do melanin ornaments signal individual quality? Insights from metal element analysis of barn owl feathers.” *Oecologia* 137(1):153–58.
- Norris, K., 1993. “Heritable variation in a plumage indicator of viability in male great tits *Parus major*.” *Nature* 362(6420):537–39.
- Nriagu, J.O., 1996. “A history of global metal pollution.” *Science* 272(5259):223–24.
- Nyholm, N.E.I., 1994. “Heavy Metal Tissue Levels, Impact on Breeding and Nestling Development in Natural Populations of Pied Flycatcher (*Aves*) in the Pollution Gradient from a Smelter.” Pp. 373–82 in *Ecotoxicology of Soil Organisms*, edited by M.H. Donker, H. Eijsackers, et F. Heimbach. Boca Raton, Florida: CRS Press, Inc.
- Olson, V.A. et Owens, I.P.F., 1998. “Costly sexual signals: are carotenoids rare, risky or required?” *Trends in Ecology and Evolution* 13(12):510–14.
- Opatová, P., Ihle, M., Albrechtová, J., Tomášek, O., Kempnaers, B., Forstmeier, W. et Albrecht, T., 2016. “Inbreeding depression of sperm traits in the zebra finch *Taeniopygia guttata*.” *Ecology and Evolution* 6(1):295–304.
- Ots, I., Murumägi, A. et Hõrak, P., 1998. “Haematological health state indices of reproducing great tits: Methodology and sources of natural variation.” *Functional Ecology* 12(4):700–707.
- Palikova, M., Papezikova, I., Kopp, R., Mares, J., Markova, Z., Navratil, S., Adamovsky, O., Kohoutek, J., Navratil, L. et Blaha, L., 2015. “Effect of arsenic and cyanobacterial co-exposure on pathological, haematological and immunological parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*).” *Neuro Endocrinology Letters* 36(Suppl. 1):57–63.
- Parker, G.A., 1994. “Sperm Competition and the Evolution of Ejaculates: Towards a Theory Base.” Pp. 3–54 in *Sperm Competition and Sexual Selection*, edited by T. Birkhead et A. Møller. San Diego: Academic Press.
- Peters, A., Denk, A.G., Delhey, K. et Kempnaers, B., 2004. “Carotenoid-based bill

- colour as an indicator of immunocompetence and sperm performance in male mallards.” *Journal of Evolutionary Biology* 17(5):1111–20.
- Ping, Z., Huiling, Z. et Wensheng, S., 2009. “Biotransfer of heavy metals along a soil-plant-insect-chicken food chain: Field study.” *Journal of Environmental Sciences* 21:849–53.
- Pollack, L., Ondrasek, N.R. et Calisi, R., 2017. “Urban health and ecology: The promise of an avian biomonitoring tool.” *Current Zoology* 63(2):205–12.
- Rainbow, P.S., Wolowicz, M., Fialkowski, W., Smith, B.D. et Sokolowski, A., 2000. “Biomonitoring of trace metals in the gulf of Gdansk, using mussels (*Mytilus trossulus*) and barnacles (*Balanus improvisus*).” *Water Research* 34(6):1823–29.
- Reglero, M.M., Taggart, M.A., Castellanos, P. et Mateo, R., 2009. “Reduced sperm quality in relation to oxidative stress in red deer from a lead mining area.” *Environmental Pollution* 157(8–9):2209–15.
- Roulin, A. et Dijkstra, C., 2003. “Genetic and environmental components of variation in eumelanin and pheomelanin sex-traits in the barn owl.” *Heredity* 90(5):359–64.
- Roux, K.E. et Marra, P.P., 2007. “The presence and impact of environmental lead in passerine birds along an urban to rural land use gradient.” *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 53(2):261–68.
- Ruiz, S.R., Espín, S., Rainio, M., Ruuskanen, S., Salminen, J.P., Lilley, T.M. et Eeva, T., 2016. “Effects of dietary lead exposure on vitamin levels in great tit nestlings - An experimental manipulation.” *Environmental Pollution* 213:688–97.
- Ruiz, S.R., Espín, S., Sánchez-Virosta, P., Salminen, J.P., Lilley, T.M. et Eeva, T., 2017. “Vitamin profiles in two free-living passerine birds under a metal pollution gradient – A calcium supplementation experiment.” *Ecotoxicology and Environmental Safety* 138(August):242–52.
- Ruuskanen, S., Laaksonen, T., Morales, J., Moreno, J., Mateo, R., Belskii, E., Bushuev, A., Järvinen, A., Kerimov, A., Krams, I., Morosinotto, C., Mänd, R., Orell, M., Qvarnström, A., Slater, F., Tilgar, V., Visser, M.E., Winkel, W., Zang, H. et Eeva, T., 2014. “Large-scale geographical variation in eggshell metal and calcium content in a passerine bird (*Ficedula hypoleuca*).” *Environmental Science and Pollution Research* 21(5):3304–17.
- Sabovljevi, M., Vukojevi, V., Sabovljevi, A. et Vujii, M., 2009. “Deposition of heavy metals (Pb, Sr and Zn) in the county of Obrenovac (Serbia) using mosses as bioindicators.” *Journal of Ecology and The Natural Environment* 1(6):147–55.

- Sæbø, A., Hanslin, H.M., Torp, T., Lierhagen, S., Gawronska, H., Dzierzanowski, K. et al., 2015. "Chemical composition of vegetation along urbanisation gradients in two European cities." *Environmental Pollution* 198:116–25.
- Sánchez-Virosta, P., Espín, S., García-Fernández, A.J. et al., 2015. "A review on exposure and effects of arsenic in passerine birds." *Science of the Total Environment* 512–513:506–25.
- Sawidis, T., Breuste, J., Mitrovic, M., Pavlovic, P. et al., 2011. "Trees as bioindicator of heavy metal pollution in three European cities." *Environmental Pollution* 159(12):3560–70.
- Scheifler, R., Cœurassier, M., Morilhat, C., Bernard, N., Faivre, B., Flicoteaux, P., Giraudoux, P., Noël, M., Piotte, P., Rieffel, D., de Vaufleury, A. et al., 2006. "Lead concentrations in feathers and blood of common blackbirds (*Turdus merula*) and in earthworms inhabiting unpolluted and moderately polluted urban areas." *Science of the Total Environment* 371(1–3):197–205.
- Scheuhammer, A. M. 1987. "The Chronic Toxicity of Aluminium, Cadmium, Mercury, and Lead in Birds: A Review." *Environmental Pollution* 46(4):263–95.
- Schröder, W., Holy, M., Pesch, R., Harmens, H., Ilyin, I., Steinnes, E., Alber, R., Aleksiyenak, Y., Blum, O., Coşkun, M., Dam, M., de Temmerman, L., Frolova, M., Frontasyeva, M., Miqueo, L.G., Grodzińska, K., Jeran, Z., Korzekwa, S., Krmar, M., Kubin, E., Kvietkus, K., Leblond, S., Liiv, S., Magnússon, S., Maňkiovská, B., Piispanen, J., Rühling, Å., Santamaria, J., Spiric, Z., Suchara, I., Thöni, L., Urumov, V., Yurukova, L. et al., 2010. "Are cadmium, lead and mercury concentrations in mosses across Europe primarily determined by atmospheric deposition of these metals?" *Journal of Soils and Sediments* 10:1572–84.
- Sharma, R.K. et al., 2005. "Biological effects of heavy metals: An overview." *Journal of Environmental Biology* 26(2):301–13.
- Sheffield, S., 1997. "Owls as biomonitors of environmental contamination." *United States Department of Agriculture Forest Service General Technical Report NC* (February):383–98.
- Sheldon, B.C., 1994. "Male phenotype, fertility, and the pursuit of extra-pair copulations by female birds." *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 257(1348):25–30.
- Šťastný, K., Hudec, K. et al., 2011. *Fauna ČR - Ptáci 3/II*. 2. vydání. edited by K.

- Šťastný and K. Hudec. Praha: Academia.
- Stohs, S.J. et Bagchi, D., 1995. "Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions." *Free Radical Biology and Medicine* 18(2):321–36.
- Strungaru, S.A., Nicoara, M., Teodosiu, C., Micu, D. et Plavan, G., 2017. "Toxic metals biomonitoring based on prey-predator interactions and environmental forensics techniques: A Study at the Romanian-Ukraine cross border of the Black Sea." *Marine Pollution Bulletin* 124(1):321–30.
- Sucharová, J. et Suchara, I., 2002. "Současná úroveň atmosférické depozice prvků na území ČR a její trendy zjišťované analýzami mechu jako bioindikátoru." *Ochrana Ovzduší* 14(6):24–28.
- Svensson, L., 1984. *Identification Guide to European Passerines*. edited by L. Svensson. Stockholm: British Trust for Ornithology.
- Swaleh, K.M. et Sansur, R., 2006. "Monitoring urban heavy metal pollution using the house sparrow (*Passer domesticus*)." *Journal of Environmental Monitoring* 8(1):209–13.
- SZÚ. 2017. *Zdravotní Důsledky a Rizika Znečištění Ovzduší - Odborná Zpráva Za Rok 2016*. Praha.
- Tansy, M.F. et Roth, R.P., 1970. "Pigeons: A new role in air pollution." *Journal of the Air Pollution Control Association* 20(5):307–9.
- Tchounwou, P.B., Yedjou, C.G., Patlolla, A.K. et Sutton, D.J., 2012. "Heavy Metal Toxicity and the Environment." Pp. 133–64 in *Molecular, Clinical and Environmental Toxicology*. edited by A. Luch. Basel: Springer.
- Tête, N., Afonso, E., Bouguerra, G. et Scheifler, R., 2015. "Blood parameters as biomarkers of cadmium and lead exposure and effects in wild wood mice (*Apodemus sylvaticus*) living along a pollution gradient." *Chemosphere* 138:940–46.
- Thompson, D.R., Hamer, K.C. et Furness, R.W., 1991. "Mercury accumulation in great skuas *Catharacta skua* of known age and sex, and its effects upon breeding and survival." *The Journal of Applied Ecology* 28(2):672–84.
- Tomášek, O., Albrechtová, J., Němcová, M., Opatova, P. et Albrecht, T., 2017. "Trade-off between carotenoid-based sexual ornamentation and sperm resistance to oxidative challenge." *Proceedings of the Royal Society of London B* 284:20162444.
- Tsipoura, N., Burger, J., Newhouse, M., Jeitner, C., Gochfeld, M. et Mizrahi, D., 2011.

- “Lead, mercury, cadmium, chromium, and arsenic levels in eggs, feathers, and tissues of Canada geese of the New Jersey meadowlands.” *Environmental Research* 111(6):775–84.
- Tuček, J., 2017. “Sýkorky sdělují, kde žijeme.” *Lidové Noviny, Orientace Věda*, July 22.
- Vallverdú-Coll, N., Mougeot, F., Ortiz-Santaliestra, M.E., Castaño, C., Santiago-Moreno, J. et Mateo, R., 2016. “Effects of lead exposure on sperm quality and reproductive success in an avian model.” *Environmental Science & Technology* 50(22):12484–92.
- Vanparys, C., Dauwe, T., Van Campenhout, K., Bervoets, L., De Coen, W., Blust, R. et Eens, M., 2008. “Metallothioneins (MTs) and δ -aminolevulinic acid dehydratase (ALAd) as biomarkers of metal pollution in great tits (*Parus major*) along a pollution gradient.” *Science of the Total Environment* 401(1–3):184–93.
- Vergara, P., Mougeot, F., Martínez-Padilla, J., Leckie, F. et Redpath, S.M., 2012a. “The condition dependence of a secondary sexual trait is stronger under high parasite infection level.” *Behavioral Ecology* 23(3):502–11.
- Vergara, P., Redpath, S.M., Martínez-Padilla, J. et Mougeot, F., 2012b. “Environmental conditions influence red grouse ornamentation at a population level.” *Biological Journal of the Linnean Society* 107:788–98.
- Vouk, V.B. et Piver, W.T., 1983. “Metallic elements in fossil fuel combustion products: amounts and form of emissions and evaluation of carcinogenicity and mutagenicity.” *Environmental Health Perspectives* 47:201–25.
- WHO. 1995. *Environmental Health Criteria 165: Inorganic Lead*. Geneva.
- WHO. 2001a. *Environmental Health Criteria 221: Zinc*. Geneva.
- WHO. 2001b. “Environmental Health Criteria 224: Arsenic and Arsenic Compounds.” *United Nations Environment Programme* 70.
- WHO. 2007. *Health Risks of Heavy Metals from Long-Range Transboundary Air Pollution*. Germany.
- Van Wyk, E., Van Der Bank, F.H., Verdoorn, G.H. et Hofmann, D., 2001. “Selected mineral and heavy metal concentrations in blood and tissues of vultures in different regions of South Africa.” *South African Journal of Animal Sciences* 31(2):57–63.
- Zamani-Ahmadmahmoodi, R., Esmaili-Sari, A., Savabieasfahani, M. et Bahramifar, N., 2010. “Cattle egret (*Bubulcus ibis*) and little egret (*Egretta garzetta*) as monitors of mercury contamination in Shadegan wetlands of South-Western Iran.”

Environmental Monitoring and Assessment 166(1–4):371–77.

- Zargar, S.M., Mahajan, R., Farhat, S., Nazir, M., Ahmad, R.M., Salgotra, R.K. et Mallick, S.A., 2015. “Understanding the role of iron and zinc in animals and crop plants from genomics perspective.” *Current Trends in Biotechnology and Pharmacy* 9(2):182–96.
- Zarrintab, M. et Mirzaei, R., 2017. “Stress induced by heavy metals on breeding of magpie (*Pica pica*) from Central Iran.” *Ecotoxicology and Environmental Safety* 143(May):28–37.

8 Přílohy

8.1 Prohlášení o autorském příspěvku

Článek 1

Bauerová P., Vinklerová J., Hraníček J., Čorba V., Vojtek L., Svobodová J., and Vinkler M. 2017. “Associations of urban environmental pollution with health-related physiological traits in a free-living bird species.” *Science of the Total Environment* 601–602:1556–65. *IF 4.986 (k roku 2017)*:

PB - krevní rozbor a analýza vzorků peří (ptilochronologie a ornamenty peří), statistické zpracování dat příprava manuskriptu, **JV** - sběr dat v terénu, **JH** - analýza těžkých kovů, **VČ** - sběr dat v terénu, **LV** - test aktivity komplementu krevní plazmy, **JS** - metodika statistického zpracování dat, **MV** - design studie, sběr dat v terénu a příprava manuskriptu. Všichni autoři přispěli svými komentáři během přípravy manuskriptu.

Článek 2

Svobodová J., **Bauerová P.**, Eliáš J., Velová H., Vinkler M., and Albrecht T. 2018. “Sperm variation in great tit males (*Parus major*) is linked to a haematological health-related trait, but not ornamentation.” *Journal of Ornithology* 159(3):815–22. *IF 1.496 (k roku 2018)*:

JS - design studie, sběr dat v terénu, metodika analýzy vzorků spermií, příprava manuskriptu, **PB** - sběr dat v terénu, krevní rozbor, **JE** - sběr dat v terénu, analýza ornamentů peří, **HV** - sběr dat v terénu, **MV** - sběr dat v terénu, design studie, **TA** - sběr dat v terénu, metodika analýzy vzorků spermií, příprava manuskriptu. Všichni autoři přispěli svými komentáři během přípravy manuskriptu.

Článek 3

Bauerová P., Krajzingrová T., Těšický M., Velová H., Hraníček J., Musil S., Svobodová J., Albrecht T., and Vinkler M. 2020. “Longitudinally monitored lifetime changes in blood heavy metal concentrations and their health effects in urban birds.” *Science of the Total Environment* 723. *IF 6.551 (k roku 2019)*:

PB - design studie, sběr dat v terénu, krevní rozbor, statistické zpracování dat a příprava manuskriptu, **TK** - sběr dat v terénu, krevní rozbor, **MT** - sběr dat v terénu, **HV** - sběr dat v terénu, **JH** - analýza těžkých kovů, **SM** - analýza těžkých kovů, **JS** - design studie a sběr dat v terénu, **TA** - sběr dat v terénu, **MV** - design studie, sběr dat v terénu a příprava manuskriptu. Všichni autoři přispěli svými komentáři během přípravy manuskriptu.

8.2 Doplnující informace k článku 1

Title: Association of urban environmental pollution with health-related physiological traits in a free-living bird species

Authors: Petra Bauerová, Jitka Vinklerová, Jakub Hraníček, Vojtěch Čorba, Libor Vojtek, Jana Svobodová and Michal Vinkler

1. Tables

Table S1. Analytical figures of merit for Pb, Cd, Cu, Cr and As determination. Based on great tit data from the Czech Republic, 2010. LOD = Limit of detection, LOQ = limit of quantification, d.w. = dry weight.

	Pb	Cd	Cu	Cr	As
LOD (3σ) ($\mu\text{g/g d.w.}$)	0.032	0.0038	0.065	0.029	0.021
LOQ (10σ) ($\mu\text{g/g d.w.}$)	0.10	0.013	0.22	0.094	0.070
Sensitivity ($10^{-3} \text{ l } \mu\text{g}^{-1}$)	12.6	147	15.3	21.4	101
Repeatability (%)	2.89	1.92	1.15	1.04	4.73
Correlation coefficient	0.9995	0.9815	0.9998	0.9995	0.9936
Linear range up to ($\mu\text{g l}^{-1}$)	100	10	100	100	100

Table S2. Correlation matrix of heavy metal concentrations ($\mu\text{g/g}$ dry weight) in blood and feathers with PC1F/PC1B (first scores from principal component analysis, PCA, for feather/blood metal contamination; used in further statistical analysis) and PC2F/PC2B (second scores from PCA for feather/blood metal contamination); great tit data from the Czech Republic, 2010 ($N = 57$). Pearson correlation coefficients (r) are shown, values highlighted in bold are statistically significant at $p = 0.05$ level.

Variable	Feathers							Blood							
	Pb	Cd	Cu	Cr	As	PC1F	PC2F	Pb	Cd	Cu	Cr	As	PC1B	PC2B	
Pb	1.00														
Cd	0.60	1.00													
Cu	0.32	0.19	1.00												
Cr	0.31	0.21	0.53	1.00											
As	0.21	0.00	0.07	0.21	1.00										
PC1F	0.79	0.66	0.68	0.71	0.32	1.00									
PC2F	-0.36	-0.64	0.35	0.44	0.49	0.00	1.00								
Pb	-0.31	-0.22	0.05	-0.07	0.14	-0.17	0.28	1.00							
Cd	0.04	0.20	0.15	0.06	0.15	0.16	0.00	0.50	1.00						
Cu	0.15	0.31	0.13	-0.03	0.11	0.20	-0.15	0.45	0.73	1.00					
Cr	0.19	0.30	0.25	0.22	0.11	0.33	-0.02	0.40	0.67	0.63	1.00				
As	0.00	0.11	0.02	0.15	0.18	0.12	0.09	0.47	0.80	0.68	0.53	1.00			
PC1B	0.04	0.19	0.15	0.08	0.17	0.17	0.03	0.66	0.91	0.86	0.79	0.86	1.00		
PC2B	-0.46	-0.47	-0.09	-0.18	0.04	-0.40	0.35	0.75	-0.12	-0.16	-0.24	-0.07	0.00	1.00	

Table S3. Principal component analysis (PCA) of heavy metal concentrations ($\mu\text{g/g}$ dry weight) in blood and feathers of great tits from the Czech Republic, 2010 ($N = 57$). Eigenvalues and proportion of variance for each component (PC1 – PC5) are shown. Factor coordinates of metals from correlation matrix for first 3 components are listed. Eigenvalue = SD^2 .

Sample	Variable	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5
Blood	Eigenvalue	3.377	0.656	0.481	0.312	0.174
	Proportion of variance %	67.547	13.115	9.624	6.23	3.484
	Pb	0.658	0.745	0.109		
	Cd	0.914	-0.116	-0.126		
	Cu	0.863	-0.156	-0.027		
	Cr	0.791	-0.241	0.532		
	As	0.861	-0.069	-0.411		
Feathers	Eigenvalue	2.142	1.099	0.954	0.462	0.343
	Proportion of variance %	42.842	21.983	19.073	9.248	6.854

Pb	0.794	-0.362	0.222
Cd	0.660	-0.642	0.069
Cu	0.682	0.351	-0.461
Cr	0.713	0.443	-0.229
As	0.321	0.486	0.797

Table S4. Full Generalised Linear Mixed Models (GLMMs) tested in the dataset of great tits from the Czech Republic, 2010 (N = 57). Locality was used as variable with a random effect. PC1F / PC1B = feather / blood heavy metal contamination, TWBC = Total White Blood Cell count, H/L = Heterophil/Lymphocyte ratio, TRBC = Total Red Blood Cell count.

Full model	F	Df	p
model 1 PC1B ~ PM10	1.973	1/11	0.160
model 2 PC1F ~ PM10	0.166	1/11	0.684
model 3 Fatness ~ PC1B + PC1F + age + body mass + tarsus length	7.854	5/56	0.165
model 4 Growth bar width ~ PC1B + PC1F + age + body mass + tarsus length	8.511	5/56	0.130
model 5 TWBC ~ PC1B + PC1F + age + body mass + tarsus length	5.270	5/56	0.384
model 6 H/L ~ PC1B + PC1F + age + body mass + tarsus length	72.570	5/56	<<0.001
model 7 TRBC ~ PC1B + PC1F + age + body mass + tarsus length	13.784	5/56	0.017
model 8 Immature erythrocyte count ~ PC1B + PC1F + age + body mass + tarsus length	5.131	5/56	0.400
model 9 Plasma complement activity ~ PC1B + PC1F + age + body mass + tarsus length	3.704	5/21	0.593
model 10 Yellow-chroma ~ PC1B + PC1F + age + body mass + tarsus length	4.329	5/56	0.503
model 11 Stripe-area ~ PC1B + PC1F + age + body mass + tarsus length	5.188	5/56	0.393

Table S5. Full Generalised Linear Models (GLMs) tested in untransformed heavy metal data and without locality as random effect on the great tit data from the Czech Republic, 2010 (N = 57). PC1F / PC1B = feather / blood heavy metal contamination, TWBC = Total White Blood Cell count, H/L = Heterophil/Lymphocyte ratio, TRBC = Total Red Blood Cell count.

Full model	F	Df	p
model 1 PC1B average per location ~ PM10	1.69	1/11	0.220
model 2 PC1F average per location ~ PM10	0.18	1/11	0.680
model 3 Fatness ~ PC1B + PC1F + age + body mass + tarsus length	1.89	51/56	0.093
model 4 Growth bar width ~ PC1B + PC1F + age + body mass + tarsus length	2.41	51/56	0.049
model 5 TWBC ~ PC1B + PC1F + age + body mass + tarsus length	1.62	51/56	0.151
model 6 H/L ~ PC1B + PC1F + age + body mass + tarsus length	19.22	51/56	<<0.001
model 7 TRBC ~ PC1B + PC1F + age + body mass + tarsus length	2.48	51/56	0.044
model 8 Immature erythrocyte count ~ PC1B + PC1F + age + body mass + tarsus length	2.74	51/56	0.029
model 9 Plasma complement activity ~ PC1B + PC1F + age + body mass + tarsus length	0.33	16/21	0.889
model 10 Yellow chroma ~ PC1B + PC1F + age + body mass + tarsus length	0.64	51/56	0.669
model 11 Stripe-area ~ PC1B + PC1F + age + body mass + tarsus length	1.08	51/57	0.384

Table S6. Minimum adequate models (MAMs) obtained on untransformed heavy metal data and without locality as random effect in the great tit dataset from the Czech Republic, 2010 (N = 57). Slope \pm SE values are only provided for continuous variables. Significant and marginally non-significant effects of heavy metal contamination are highlighted in bold. PC1F / PC1B = feather / blood heavy metal contamination, TWBC = Total White Blood Cell count, H/L = Heterophil/Lymphocyte ratio, TRBC = Total Red Blood Cell count.

Minimum adequate model	Slope \pm SE	F	Df	p	
MAM 3 Fatness ~ PC1B + body mass		4.24	2/56	0.014	
PC1B	-0.136 \pm 0.081	3.63	1/54	0.057	
body mass	6.637 \pm 3.112	4.53	1/54	0.033	
MAM 4 Growth bar width ~ PC1F + tarsus length		3.38	2/56	0.041	
PC1F	0.021 \pm 0.012	3.19	1/54	0.080	
tarsus length	0.054 \pm 0.029	3.49	1/54	0.067	
MAM 5 TWBC ~ body mass		4.827 \pm 1.735	7.69	1/55	0.006
MAM 6 H/L ~ PC1B + PC1F + age + body mass		23.63	4/56	<<0.001	
PC1B	-0.059 \pm 0.016	14.20	1/52	<0.001	
PC1F	0.145 \pm 0.019	55.41	1/52	<<0.001	
Age		4.55	1/52	0.033	
body mass	-4.750 \pm 0.854	31.16	1/52	<<0.001	
MAM 7 TRBC ~ PC1B + age		6.02	2/56	0.004	
PC1B	-0.086 \pm 0.042	4.29	1/54	0.043	
Age		6.08	1/54	0.017	
MAM 8 Immature erythrocyte count ~ PC1B + age + tarsus length		3.74	3/56	0.016	
PC1B	0.439 \pm 0.204	4.62	1/53	0.036	
Age		3.23	1/53	0.078	
tarsus length	-1.613 \pm 0.691	5.40	1/53	0.024	
MAM 11 Stripe-area ~ tarsus length		0.022 \pm 0.012	3.24	1/55	0.078

Table S7. Correlation matrix of all condition-related traits measured in great tits from the Czech Republic, 2010 (N = 57). Spearman correlation coefficient (r_s) was calculated. Highlighted values are significant at the $p = 0.05$ level.

Variable	Tarsus length	Growth bar	Body mass	Fatness	Stripe area	Yellow chroma
Tarsus length	1.00					
Growth bar	0.33	1.00				
Body mass	0.03	0.05	1.00			
Fatness	-0.12	-0.09	0.34	1.00		
Stripe area	0.23	0.03	0.02	0.03	1.00	
Yellow chroma	-0.01	0.12	0.07	-0.04	0.04	1.00

Table S8. Summary statistics for the haematological traits analysed in great tits from the Czech Republic, 2010 (N = 57). SD = standard deviation. TWBC = Total White Blood Cell count, H/L = Heterophil/Lymphocyte ratio, TRBC = Total Red Blood Cell count.

Variable	Range	Mean \pm SD	Median
TWBC ($\times 10^3$ cells/ μ l)	1.00 - 12.00	5.00 \pm 2.85	5.00
Lymphocytes (%)	29.31 - 87.07	57.36 \pm 14.72	58.47
Immature leukocytes (%)	0.00 - 5.97	0.53 \pm 1.17	0.00
Heterophils (%)	3.05 - 58.05	22.86 \pm 12.11	21.21
H/L ratio	0.04 - 1.98	0.48 \pm 0.38	0.35
Basophils (%)	1.56 - 33.81	11.77 \pm 7.41	10.17
Eosinophils (%)	0.00 - 16.55	3.63 \pm 2.98	2.87
Monocytes (%)	0.00 - 9.38	3.85 \pm 2.25	3.92
Haematocrit (%)	41.44 - 54.42	49.26 \pm 2.77	49.37
TRBC ($\times 10^6$ cells/ μ l)	2.05 - 5.92	4.38 \pm 0.64	4.43
Immature erythrocytes (%)	2.57 - 15.62	8.70 \pm 3.07	9.23
Plasma complement activity (s)*	2819.00 - 7752.00	3884.30 \pm 1219.60	3593.50

*For plasma complement activity N = 22.

Table S9. Correlation matrix of haematological traits measured in great tits from the Czech Republic, 2010 (N = 57). Spearman correlation coefficient (r_s) was calculated. Highlighted values are significant at the $p = 0.05$ level. TWBC = Total White Blood Cell count, H/L = Heterophil/Lymphocyte ratio, TRBC = Total Red Blood Cell count.

Variable	TWBC	H/L ratio	Basophil s	Haematocrit t	TRBC	Immat. Eryth
TWBC	1.00					
H/L ratio	-0.10	1.00				
Basophils	-0.23	0.18	1.00			
Haematocrit	0.02	0.15	0.05	1.00		
TRBC	0.01	0.00	0.10	0.32	1.00	
Immature Erythrocytes	-0.06	-0.14	0.17	-0.04	0.26*	1.00

* $p = 0.055$

Table S10. Associations between studied haematological traits and levels of arsenic and lead blood contamination (AsB and PbB) in great tits from the Czech Republic, 2010 (N = 57). Full GLMM models (with locality as random variable) in which H/L, THC (Total Heterophil Count [cells $\times 10^9$ L]), TLC (Total Lymphocyte Count [cells $\times 10^9$ L]), TRBC and IEC (Immature Erythrocyte Count) were tested against feather and blood levels of As / Pb contamination (contaminationF, contaminationB) together with other explanatory variables (age, body mass and tarsus length). THC and TLC were calculated from the % proportion of heterophils and lymphocytes in blood and TWBC (THC = TWBC*(heterophil % proportion /100); TLC = TWBC*(lymphocyte % proportion /100)). Individual significance for As contamination in blood (p(AsB)) and Pb contamination in blood (p(PbB)) are listed, significant or marginally non-significant effects are in bold (for closer description of these effects see legends to Fig. S9, Fig. S10, and Fig. S11).

Model	p (AsB)	p (PbB)
H/L ~ contaminationF + contaminationB + age + body mass + tarsus length	<<0.001	> 0.50
THC ~ contaminationF + contaminationB + age + body mass + tarsus length	0.10	> 0.50
TLC ~ contaminationF + contaminationB + age + body mass + tarsus length	> 0.50	> 0.50
TRBC ~ contaminationF + contaminationB + age + body mass + tarsus length	> 0.15	0.01
IEC ~ contaminationF + contaminationB + age + body mass + tarsus length	> 0.50	> 0.50

2. Figures

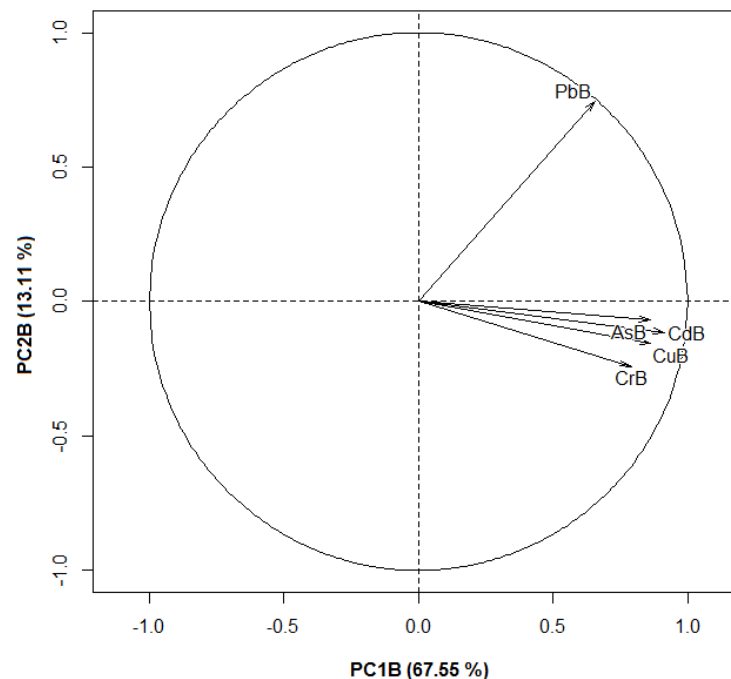


Fig. S1. Principal component analysis (PCA) of blood heavy metal concentrations in urban great tits from the Czech Republic, 2010 (N = 57). The first two components (PC1B and PC2B) are displayed with proportion of variance explained given in brackets.

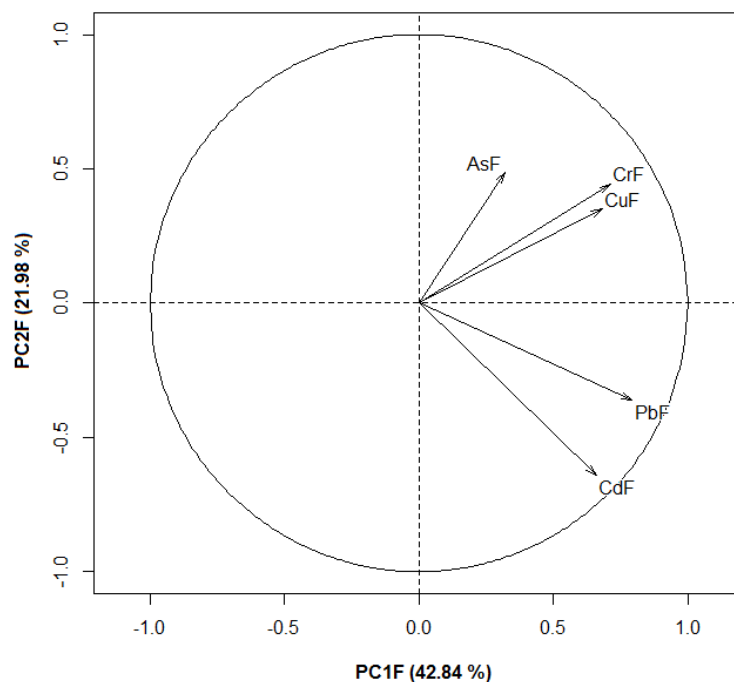


Fig. S2. Principal component analysis (PCA) of feather heavy metal concentrations in urban great tits from the Czech Republic, 2010 (N = 57). The first two components (PC1F and PC2F) are displayed with proportion of variance explained given in brackets.

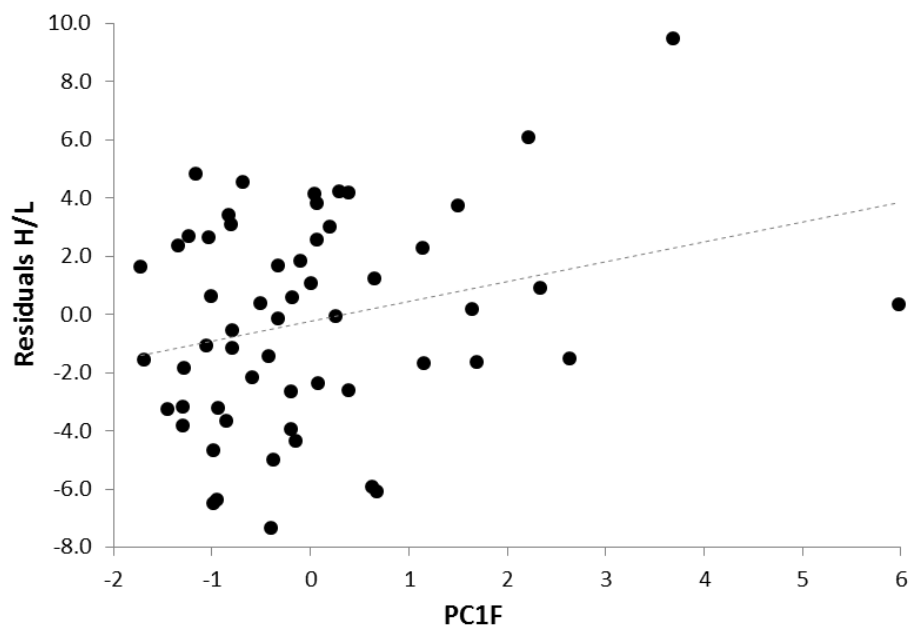


Fig. S3. Association between feather heavy metal contamination (PC1F) and heterophil/lymphocyte ratio (H/L ratio) in urban great tits from the Czech Republic, 2010 (N = 57). On the Y axis, H/L ratio is shown as residuals from the MAM 6 (GLM without transformation of heavy metals and locality as variable with random effect; see Table S6) excluding PC1F, which is on the axis X. $R^2 = 0.070$, $p \ll 0.001$.

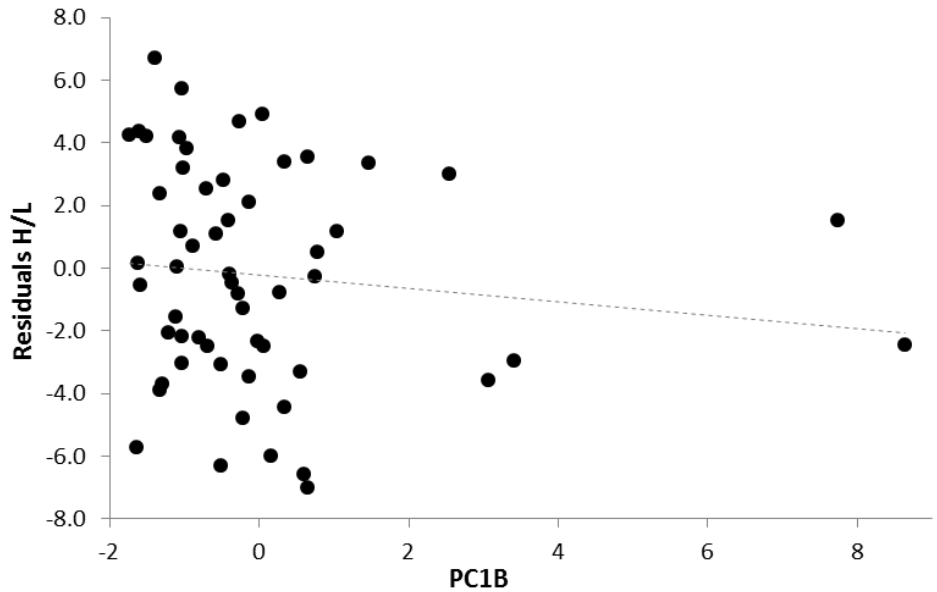


Fig. S4. Association between blood heavy metal contamination (PC1B) and heterophil/lymphocyte ratio (H/L ratio) in urban great tits from the Czech Republic, 2010 (N = 57). On the Y axis, H/L ratio is shown as residuals from the MAM 6 model (GLM without transformation of heavy metals and locality as variable with random effect; see Table S6) excluding PC1B, which is on the axis X. $R^2 = 0.014$, $p < 0.001$.

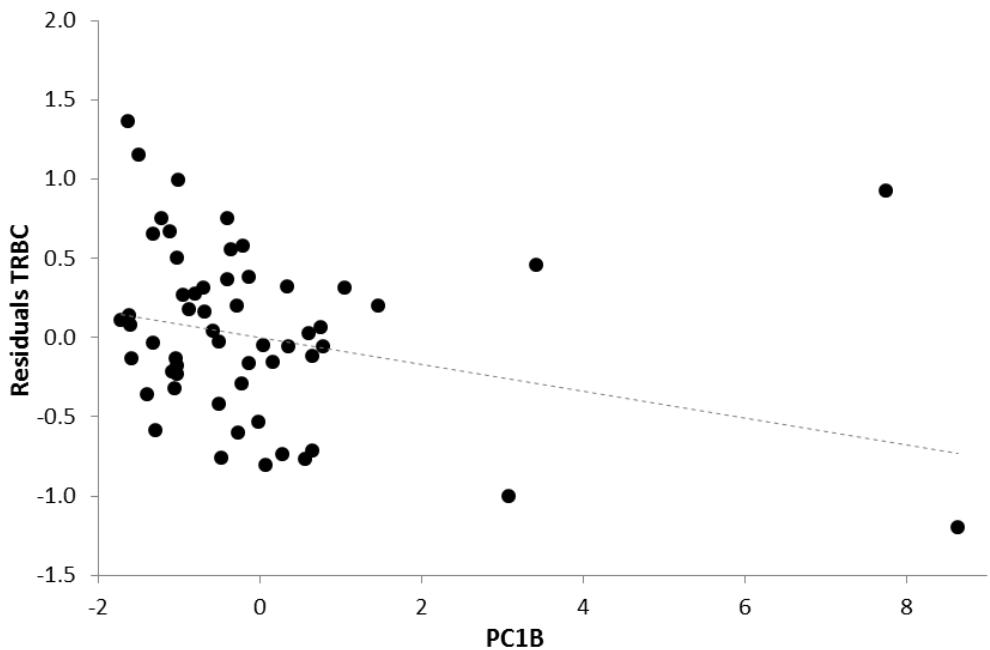


Fig. S5. Association between blood heavy metal contamination (PC1B) and total erythrocyte count (TRBC; cells $\times 10^6/\mu\text{L}$) in urban great tits from the Czech Republic, 2010 (N = 57). On the Y axis TRBC is shown as residuals from MAM 7 (GLM without transformation of heavy metals and locality as variable with random effect; see Table S6) excluding PC1B, which is on the axis X. $R^2 = 0.072$, $p = 0.043$.

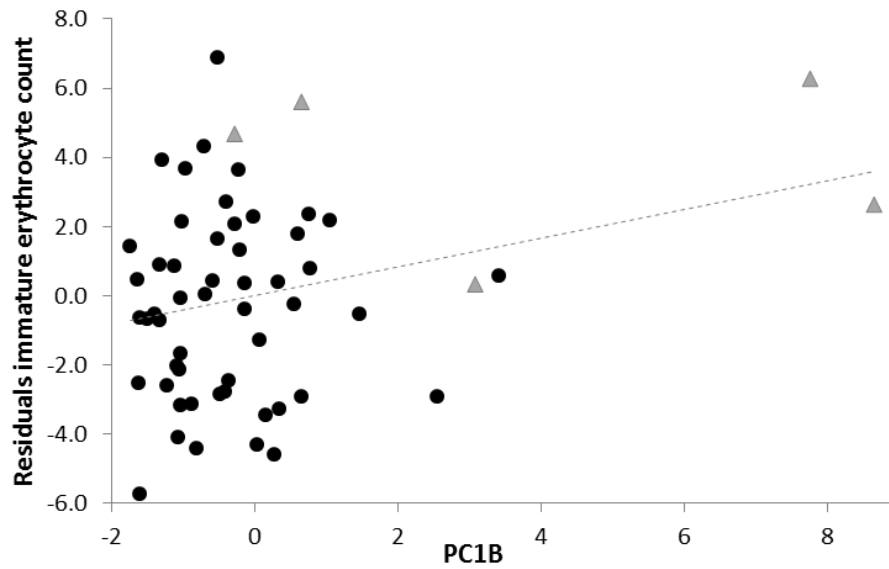


Fig. S6. Association between blood heavy metal contamination (PC1B) and immature erythrocyte count in urban great tits from the Czech Republic, 2010 (N = 57). Grey triangles indicate individuals from the most polluted site (Bohumín, n = 5). Immature erythrocyte count is shown as residuals from MAM 8 (GLM model without transformation of heavy metals and locality as variable with random effect; see Table S6) excluding PC1B, which is on the axis X. $R^2 = 0.076$, $p = 0.036$.

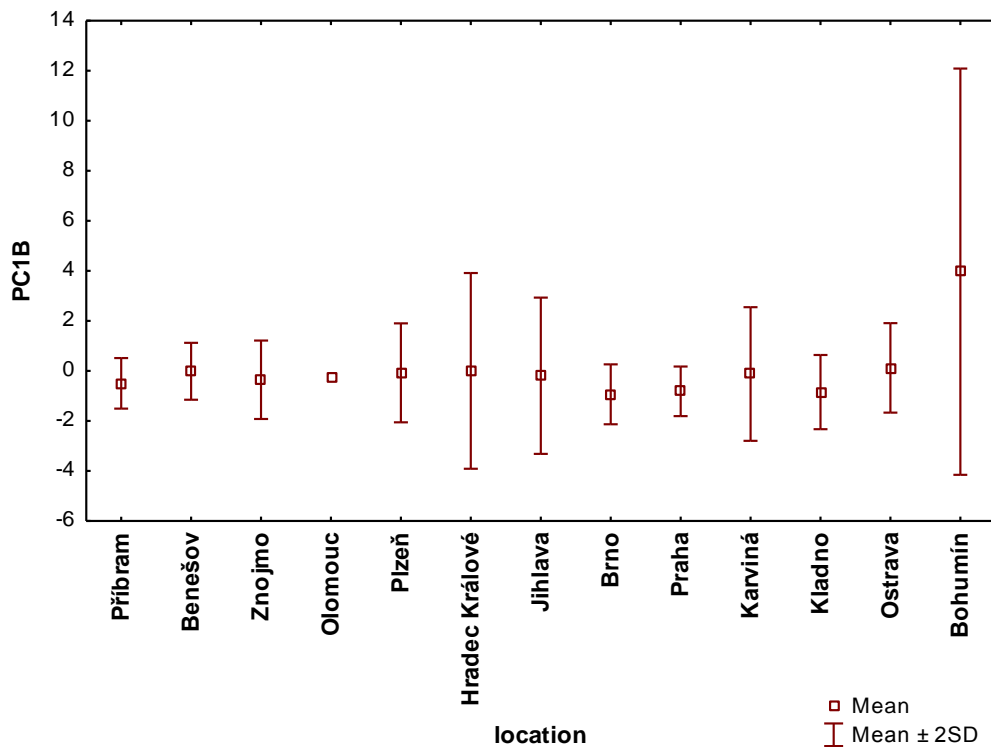


Fig S7. Differences between studied localities ($n_{locality} = 13$) in heavy metal blood contamination (PC1B, without previous transformation of heavy metal data). Great tits dataset from the Czech Republic, 2010 (N = 57). Mean values and mean values $\pm 2 \times$

standard deviation are showed in the graph. On X axis the localities are ordered according to the rising PM₁₀ pollution from the left to the right.

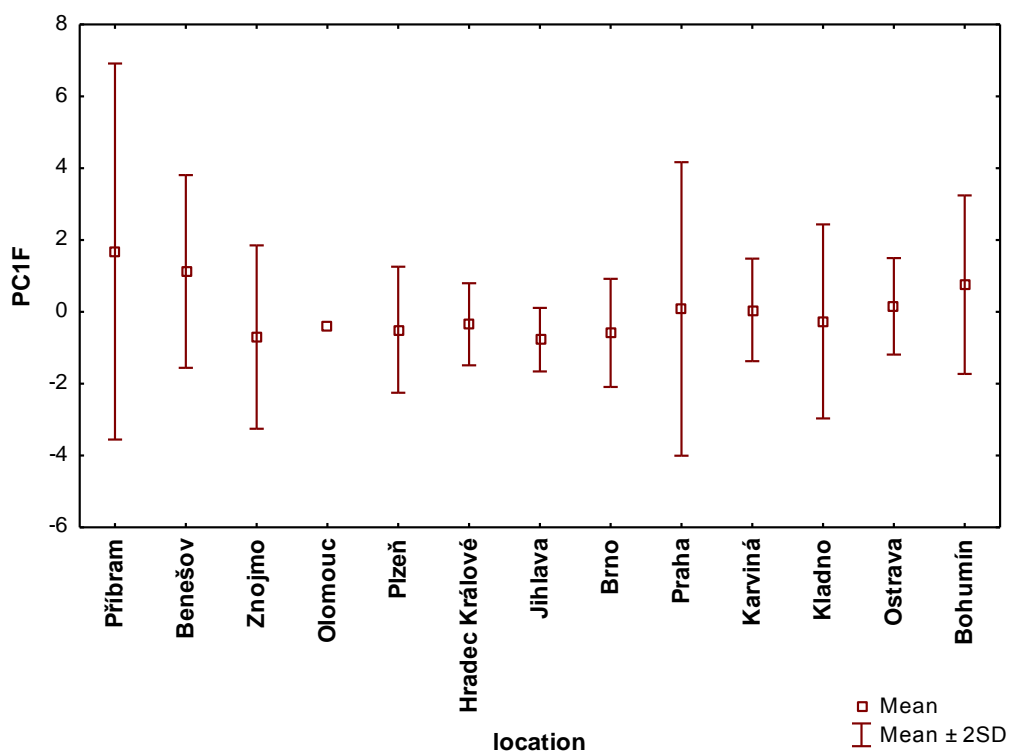


Fig. S8. Differences between studied localities ($n_{\text{locality}} = 13$) in heavy metal feather contamination (PC1F, without previous transformation of heavy metal data). Great tits dataset from the Czech Republic, 2010 ($N = 57$). Mean values and mean values $\pm 2 \times$ standard deviation are showed in the graph. On X axis the localities are ordered according to the rising PM₁₀ pollution from the left to the right.

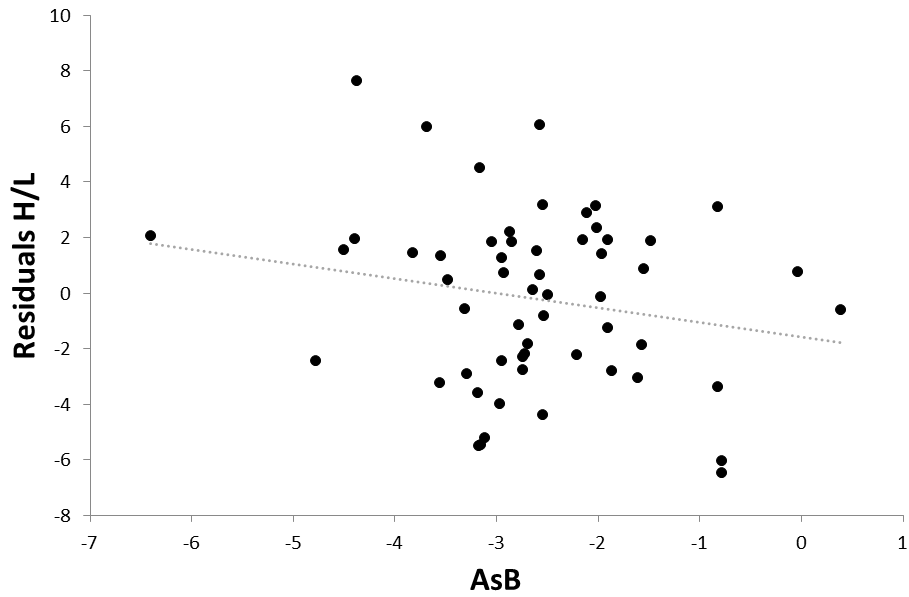


Fig. S9. Association between As blood contamination levels (AsB) and heterophil/lymphocyte ratio (H/L ratio) in urban great tits from the Czech Republic, 2010 (N = 57). On the Y axis, H/L ratio is shown as residuals from the MAM ($H/L \sim AsB + age + mass$; $p < 0.001$, for full model see Table S10) excluding AsB, which is on the axis X. Locality was added as a variable with a random effect. For AsB: slope \pm SE = -0.207 ± 0.032 , $F = 15.84$, $Df = 2/56$, $R^2 = 0.040$, $p < 0.001$.

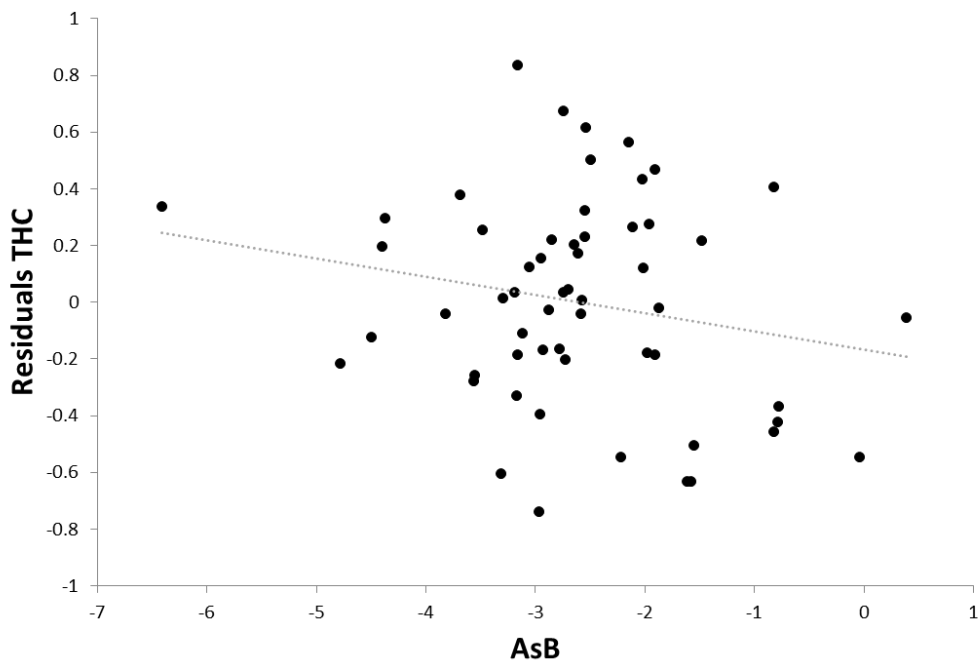


Fig. S10. Association between As blood contamination levels (AsB) and total heterophil count (THC [$cells \times 10^9/L$]) in urban great tits from the Czech Republic, 2010 (N = 57). On the Y axis, THC is shown as residuals from the MAM ($THC \sim AsB + mass$; $p = 0.046$, for full model see Table S10) excluding AsB, which is on the axis X. Locality was added

as a variable with a random effect. For AsB: slope \pm SE = -0.069 ± 0.043 , F= 3.58, Df = 3/56, $R^2 = 0.042$, p = 0.104.

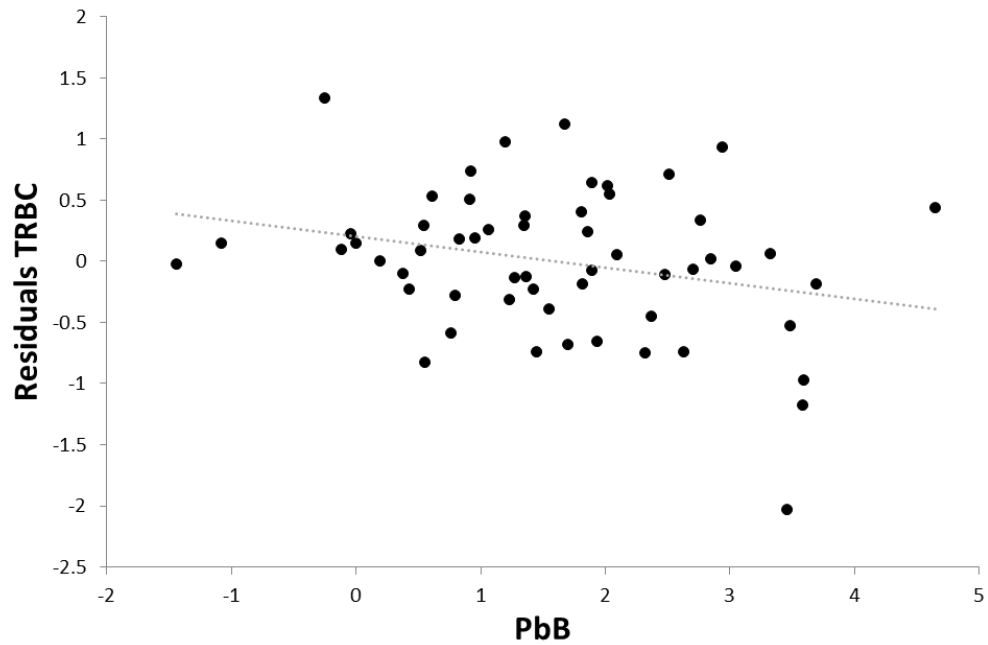


Fig. S11. Association between Pb blood contamination levels (PbB) and total red blood cell count (TRBC) in urban great tits from the Czech Republic, 2010 (N = 57). On the Y axis, TRBC is shown as residuals from the MAM ($TRBC \sim PbB + age$; p = 0.008, for full model see Table S10) excluding PbB, which is on the axis X. Locality was added as a variable with a random effect. For PbB: slope \pm SE = -0.136 ± 0.065 , F= 7.72, Df = 2/56, $R^2 = 0.071$, p = 0.008.

8.3 Doplnující informace k článku 2

Title: Sperm variation in Great Tit males (*Parus major*) is linked to a haematological health-related trait, but not ornamentation

Authors: Jana Svobodová, Petra Bauerová, Jiří Eliáš, Hana Velová, Michal Vinkler and Tomáš Albrecht

Table S1. Correlation matrix of all individual sperm traits. Spearman correlation coefficients (r_s) are shown.

	Head	Midpiece	Flagellum	Total sperm length	CVwm	Midpiece/flagellum proportion
Head		-0.020	0.390	0.330	0.030	-0.413
Midpiece	0.893		0.020	0.650	-0.090	0.265
Flagellum	0.009	0.923		0.690	0.050	-0.851
Total sperm length	0.033	0.000	0.000		-0.080	-0.318
CVwm	0.834	0.545	0.775	0.599		-0.100
Midpiece/flagellum proportion	0.021	0.008	0.000	0.030	0.542	

8.4 Doplnující informace k článku 3

Title: Longitudinally monitored lifetime changes in blood heavy metal concentrations and their health effects in urban birds

Authors: Petra Bauerová, Tereza Krajcingrová, Martin Těšický, Hana Velová, Jakub Hraníček, Stanislav Musil, Jana Svobodová, Tomáš Albrecht and Michal Vinkler

Number of pages / tables / figures: 19 / 5 / 24

1. Supplementary Tables

Table S1. Contents of metals in two certified reference materials (CRMs) determined by ICP-MS after microwave acid digestion. These materials served as positive controls and standards for the measurement method.

CRM	Determined ($\mu\text{g/l}$)				Certified ($\mu\text{g/l}$)			
	Zn	Cd	Pb	As	Zn	Cd	Pb	As
Seronorm L-2 1406264	7 640 \pm 100	5.18 \pm 0.21	329 \pm 6.00	13.80 \pm 0.10	7 100 \pm 1400	5.01 \pm 1.01	337 \pm 68	14.10 \pm 2.80
	Determined (dry weight) ($\mu\text{g/g}$)				Certified (dry weight) ($\mu\text{g/g}$)			
	Zn	Cd	Pb	As	Zn	Cd	Pb	As
IAEA-A- 13	13.50 \pm 1.30	0.0026 \pm 0.0005	0.18 \pm 0.01	0.015 \pm 0.003	13 \pm 1	– ^a	0.18 ^b	– ^a

^a not certified, ^b information value

Table S2. Full Generalised Linear Mixed Models (GLMMs) tested in the great tit study.

Full model ^a	F	Df	p	N _{obs} ^b /N _{ind} ^c
model 1 Pb ~ age + age ² + sex + body mass + tarsus length + date	14.554	6/373	0.024	374/160
model 2 Cd ~ age + age ² + sex + body mass + tarsus length + date	21.232	6/373	0.002	374/160
model 3 Zn ~ age + age ² + sex + body mass + tarsus length + date	27.922	6/373	<<0.001	374/160
model 4 TRBC ~ age*sex + Pb + body mass + tarsus length + temperature	11.160	7/262	0.132	263/114
model 5 TRBC ~ age*sex + Cd + body mass + tarsus length + temperature	11.849	7/261	0.106	262/112
model 6 TRBC ~ age*sex + Zn + body mass + tarsus length + temperature	11.986	7/266	0.101	267/115
model 7 IEC ~ age*sex + Pb + body mass + tarsus length + temperature	10.014	7/318	0.189	319/138
model 8 IEC ~ age*sex + Cd + body mass + tarsus length + temperature	10.795	7/326	0.148	327/140
model 9 IEC ~ age*sex + Zn + body mass + tarsus length + temperature	11.203	7/330	0.130	331/143
model 10 TWBC ~ age*sex + Pb + body mass + tarsus length + temperature	24.369	7/294	0.001	295/128
model 11 TWBC ~ age*sex + Cd + body mass + tarsus length + temperature	29.454	7/298	<0.001	299/128
model 12 TWBC ~ age*sex + Zn + body mass + tarsus length + temperature	37.625	7/300	<<0.001	301/130
model 13 H/L ~ age*sex + Pb + body mass + tarsus length + temperature	35.790	7/327	<<0.001	328/141
model 14 H/L ~ age*sex + Cd + body mass + tarsus length + temperature	39.912	7/330	<<0.001	331/141
model 15 H/L ~ age*sex + Zn + body mass + tarsus length + temperature	38.208	7/331	<<0.001	332/144
model 16 THC ~ age*sex + Pb + body mass + tarsus length + temperature	24.594	7/293	0.001	294/127
model 17 THC ~ age*sex + Cd + body mass + tarsus length + temperature	31.289	7/296	<<0.001	297/127
model 18 THC ~ age*sex + Zn + body mass + tarsus length + temperature	33.296	7/301	<<0.001	302/130
model 19 TLC ~ age*sex + Pb + body mass + tarsus length + temperature	26.674	7/293	<0.001	294/127
model 20 TLC ~ age*sex + Cd + body mass + tarsus length + temperature	27.532	7/296	<0.001	297/127
model 21 TLC ~ age*sex + Zn + body mass + tarsus length + temperature	30.476	7/301	<<0.001	302/130

^aThe year and individual ID were used as variables with a random intercept effect, the age of the individuals was used as random slope within the ID (Age|ID). Slope ± SE values are only provided for continuous variables. Significant and marginally non-significant effects of heavy metal concentrations in the blood are highlighted in bold. Pb/Cd/Zn = heavy metal blood concentration [µg/g dry weight], date = day of capture, temperature = average air temperature 7 days before capturing, TRBC = total red blood cell count [cells × 10¹²L], IEC = immature erythrocyte count [%], TWBC = total white blood cell count [cells × 10⁹L], H/L = heterophil/lymphocyte ratio, THC = total heterophil count [cells × 10⁹L], TLC = total lymphocyte count [cells × 10⁹L], ^bN_{obs} = number of observations, ^cN_{ind} = number of individuals.

Table S3. Minimum adequate model (MAM) obtained for the dataset of re-captured great tits excluding nestling age cohort (MAM 1a) or the oldest age cohort (7 years old individuals; MAM 1b).

Minimum adequate model	Slope \pm SE	F	Df	P	$N_{\text{obs}}/N_{\text{ind}}$
MAM 1a Pb ~ age + age ²		3.64	2/306	0.162	307/132
age	-0.024 \pm 0.056	0.19	1/304	0.665	
age ²	0.053 \pm 0.030	3.27	1/304	0.072	
MAM 1b Pb ~ age + age ² + sex		16.88	3/410	<0.001	411/174
age	-0.050 \pm 0.192	1.72	1/407	0.192	
age²	0.076 \pm 0.022	12.34	1/407	0.001	
sex		6.32	1/407	0.012	

Table S4. Summary statistics to the haematological parameters analysed in blood of the free-living re-captured great tits.^a

Variable	N	Range	Mean \pm SD	Median
TRBC ($\times 10^6$ cells/ μ L)	345	2.31 - 8.98	4.49 \pm 0.82	4.55
IEC (%)	390	2.16 - 29.79	8.81 \pm 3.69	8.27
TWBC ($\times 10^3$ cells/ μ L)	362	1.00 - 43.50	7.52 \pm 4.78	6.50
H/L ratio	392	0.00 - 7.67	1.18 \pm 1.12	0.83
TBC ($\times 10^3$ cells/ μ L)	361	0.00 - 4.65	0.79 \pm 0.61	0.64
THC ($\times 10^3$ cells/ μ L)	361	0.13 - 20.44	2.90 \pm 2.59	2.16
TLC ($\times 10^3$ cells/ μ L)	361	0.20 - 20.74	3.18 \pm 2.52	2.59
Basophils (%)	392	0.00 - 37.21	16.64 \pm 6.85	10.27
Heterophils (%)	392	0.00 - 80.16	36.49 \pm 16.43	34.46
Lymphocytes (%)	392	9.38 - 88.10	43.39 \pm 16.27	42.75
Eosinophils (%)	387	0.00 - 22.90	4.99 \pm 4.19	3.70
Monocytes (%)	392	0.00 - 13.49	3.53 \pm 2.39	3.14

^aTRBC = total red blood cell count, IEC = immature erythrocyte count, TWBC = total white blood cell count, H/L = heterophil/lymphocyte ratio, THC = total heterophil count, TLC = total lymphocyte count. N = number of valid observations, SD = standard deviation.

Table S5. Correlation matrix of analysed haematological parameters.^a

Variable	TRBC	IEC	TWBC	TLC	THC	HL
TRBC	1.00					
IEC	-0.06	1.00				
TWBC	0.10	-0.03	1.00			
TLC	0.01	-0.06	0.76	1.00		
THC	0.14	0.04	0.79	0.30	1.00	
HL	0.08	0.09	0.16	-0.44	0.68	1.00

^aSpearman correlation coefficients (r_s) are shown, values highlighted in bold are statistically significant at $p = 0.05$ level. TRBC = total red blood cell count, IEC = immature erythrocyte count, TWBC = total white blood cell count, H/L = heterophil/lymphocyte ratio, THC = total heterophil count, TLC = total lymphocyte count. Number of samples differed from $N_{\min} = 338$ to $N_{\max} = 392$.

2. Supplementary Figures

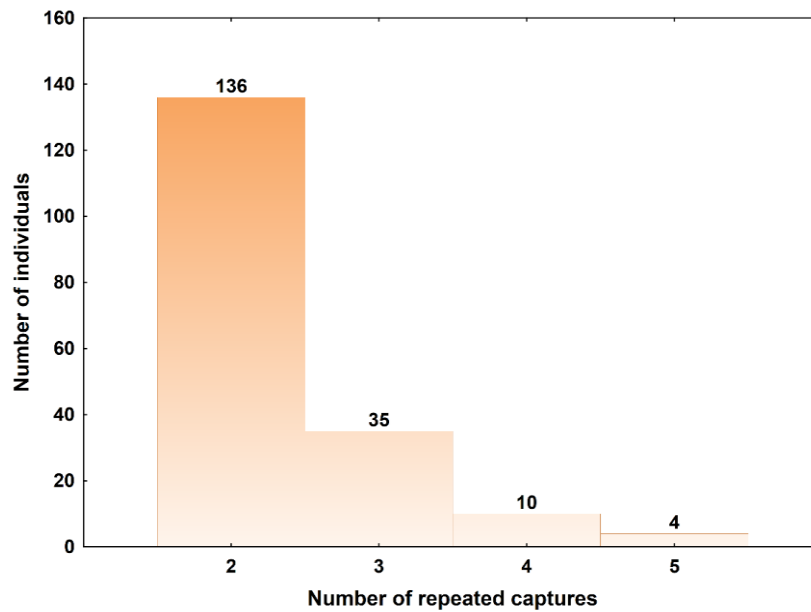


Fig. S1. Histogram of number of repeated captures in great tits dataset ($N_{\text{TotInd}} = 185$).

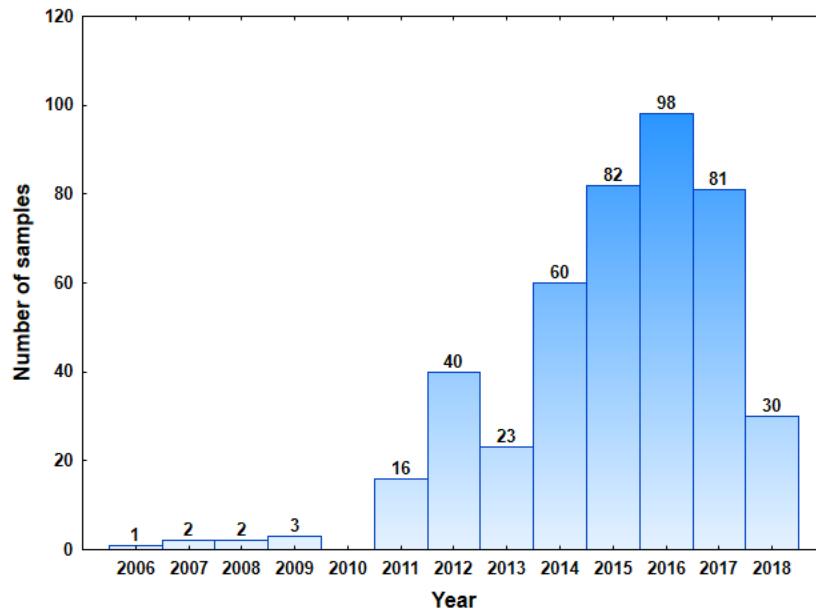


Fig. S2. Histogram of number of samples analysed in particular years ($N_{\text{TotSamples}} = 438$, $N_{\text{RecaptureSamples}} = 374$).

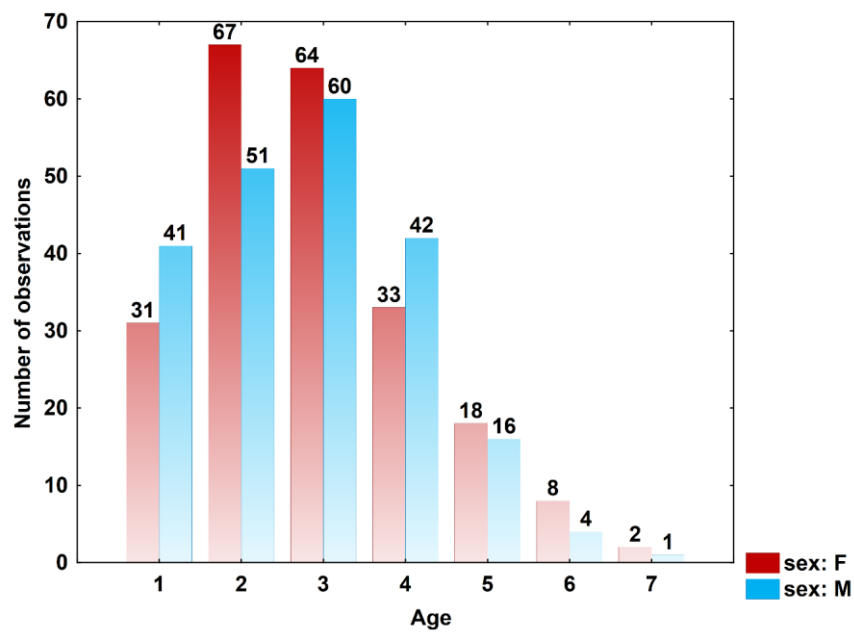


Fig. S3. Histogram of observation numbers in each minimal age category with indication of sex in the data set of re-captured urban great tits sampled between years 2006 - 2018 ($N_{\text{TotalObs}} = 438$, $N_{\text{RecaptureObs}} = 374$).

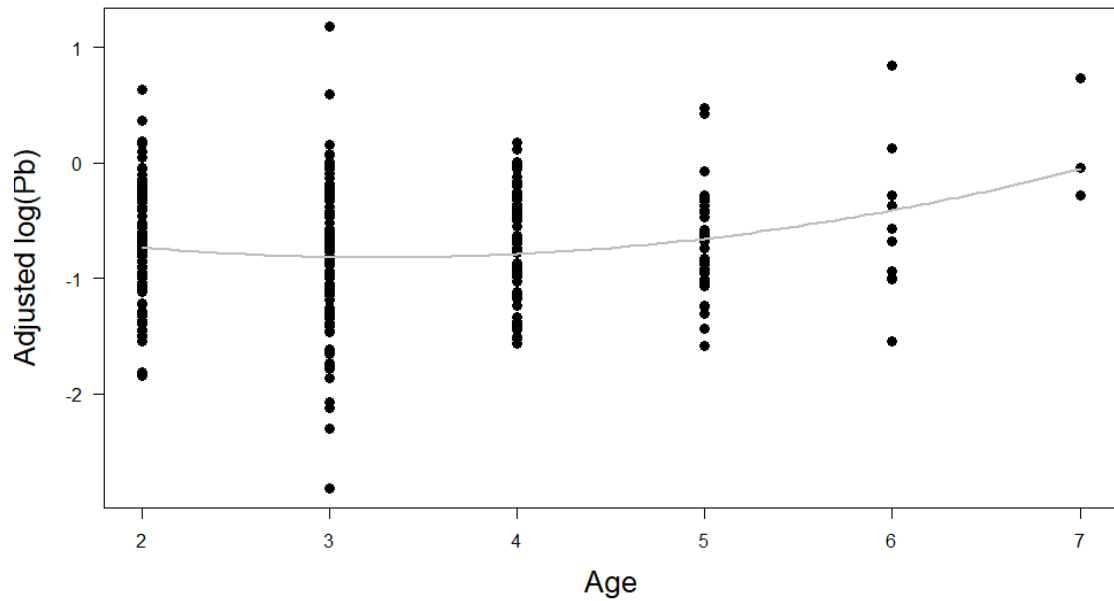


Fig. S4. Lack of relationship between blood Pb concentrations and age of great tits after elimination of nestlings (only age ≥ 2 ; $N_{\text{ind}} = 132$, $N_{\text{obs}} = 307$). Blood Pb concentrations are shown on the y axis as adjusted value controlled for all significant effects of fixed variables in the MAM 1a model (Table S3), i.e. model residuals not including the random effects (done in R by package visreg; Breheny and Burchett, 2017).

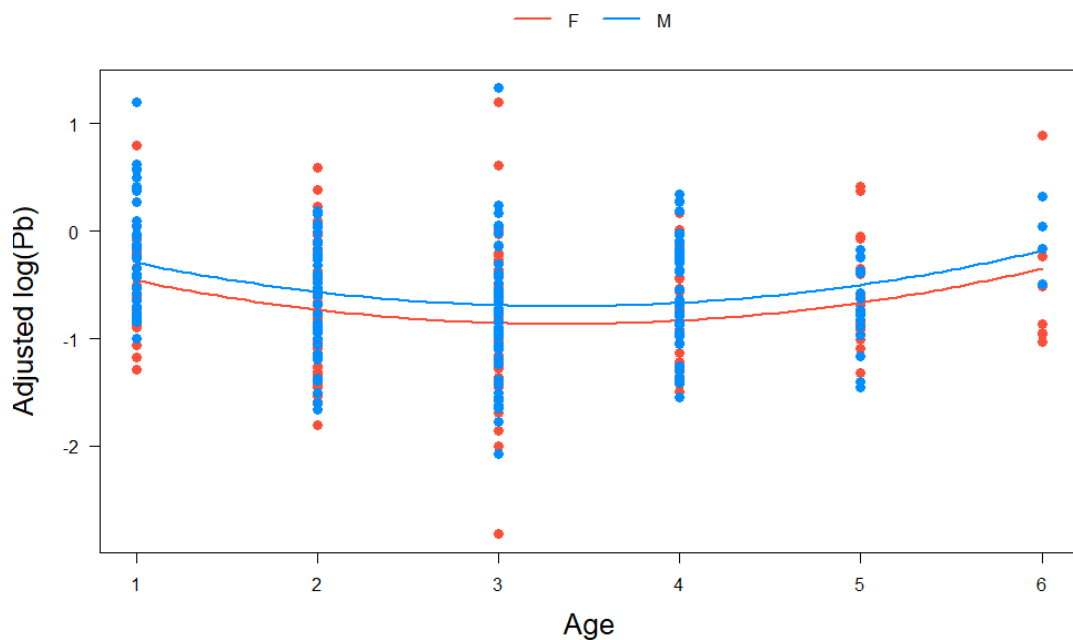


Fig. S5. The relationship between blood Pb concentrations and age of great tit males (M, in blue) and females (F, in red; $N_{\text{ind}} = 174$, $N_{\text{obs}} = 411$). Blood Pb concentrations are shown on the y axis on the y axis as adjusted value controlled for all significant effects of

fixed variables from the MAM 1b (Table S3), i.e. model residuals not including the random effects (done in R by package visreg; Breheny and Burchett, 2017).

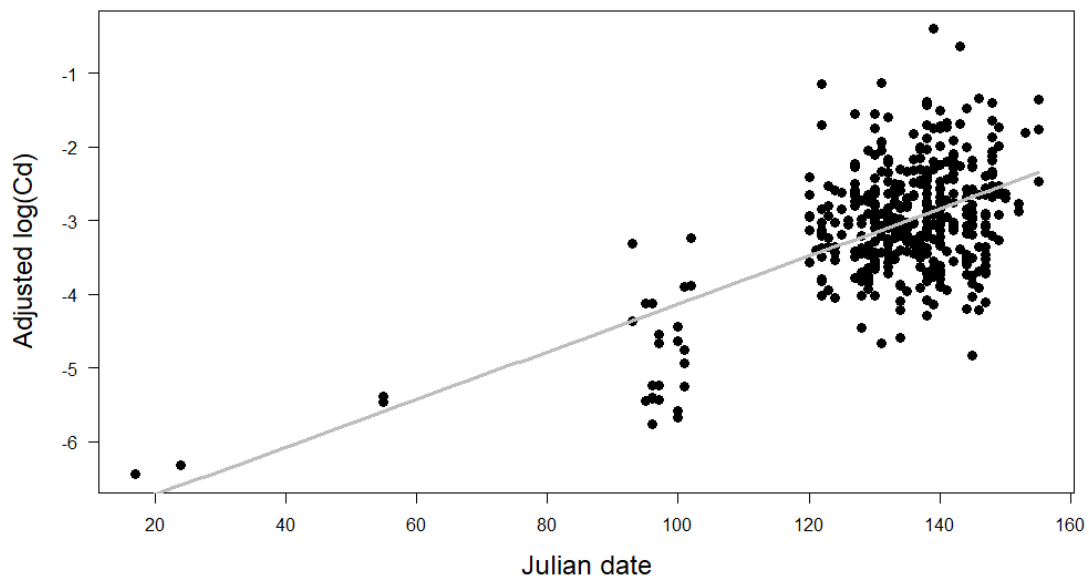


Fig. S6. Relationship between blood Cd concentration and capture date (starting from 1st January in the particular calendar year) in urban great tits. The blood Cd concentrations are shown on the y as adjusted value controlled for all significant effects of fixed variables from MAM 2 (Table 2), i.e. model residuals not including the random effects (done in R by package visreg; Breheny and Burchett, 2017).

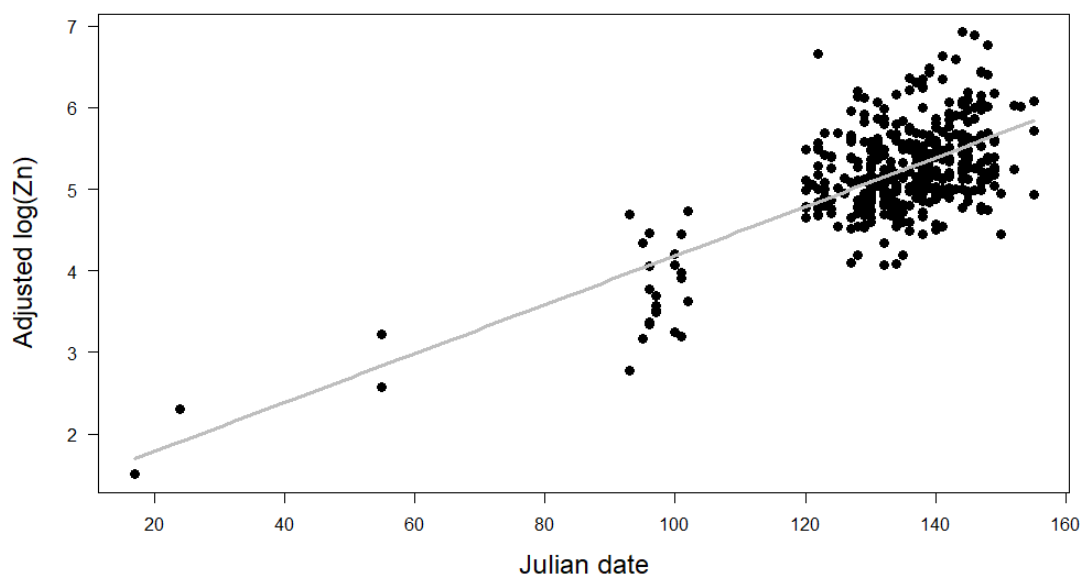


Fig. S7. Relationship between blood Zn concentration and capture date (starting from 1st January in the particular calendar year) in urban great tits. The blood Zn concentrations are shown on the y as adjusted value controlled for all significant effects of fixed variables

from MAM 3 (Table 2), i.e. model residuals not including the random effects (done in R by package visreg; Breheny and Burchett, 2017).

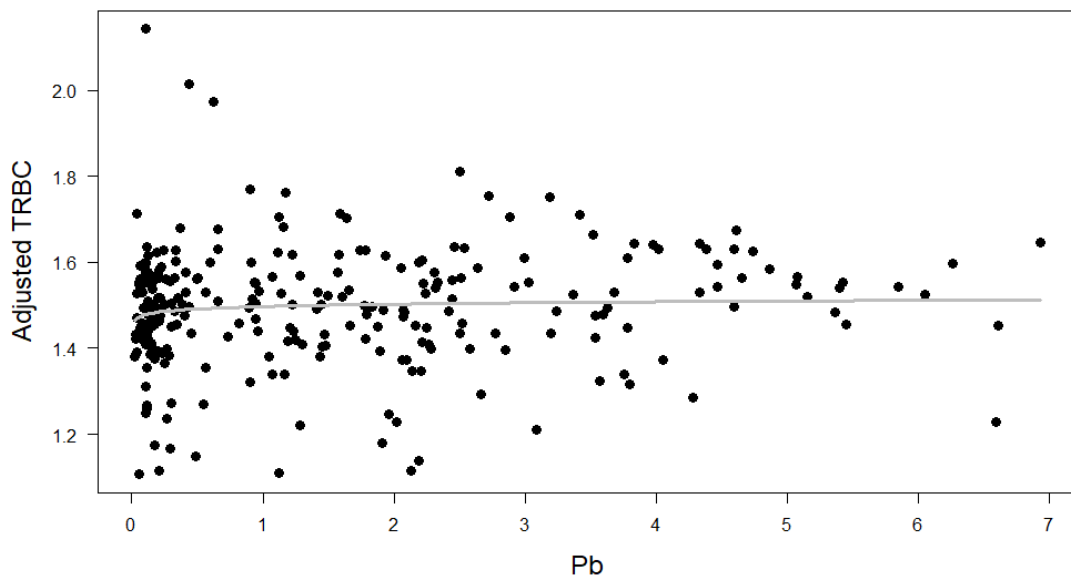


Fig. S8. Lack of relationship between TRBC and blood Pb concentrations in urban great tits. The TRBC is shown on the y as adjusted value controlled for all significant effects of fixed variables from MAM 4 (Table 2), i.e. including age and air temperature, but not including the random effects (done in R by package visreg; Breheny and Burchett, 2017).

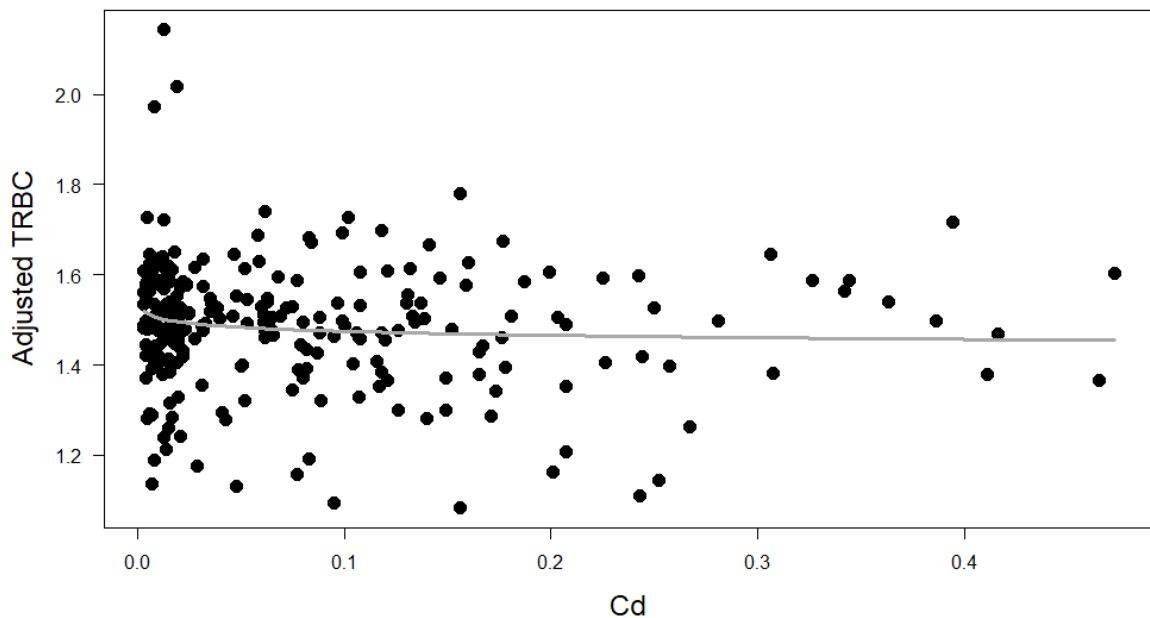


Fig. S9. Lack of relationship between TRBC and blood Cd concentrations in urban great tits. The TRBC is shown on the y as adjusted value controlled for all significant effects

of fixed variables from MAM 5 (Table 2), i.e. including age and air temperature, but not including the random effects (done in R by package visreg; Breheny and Burchett, 2017).

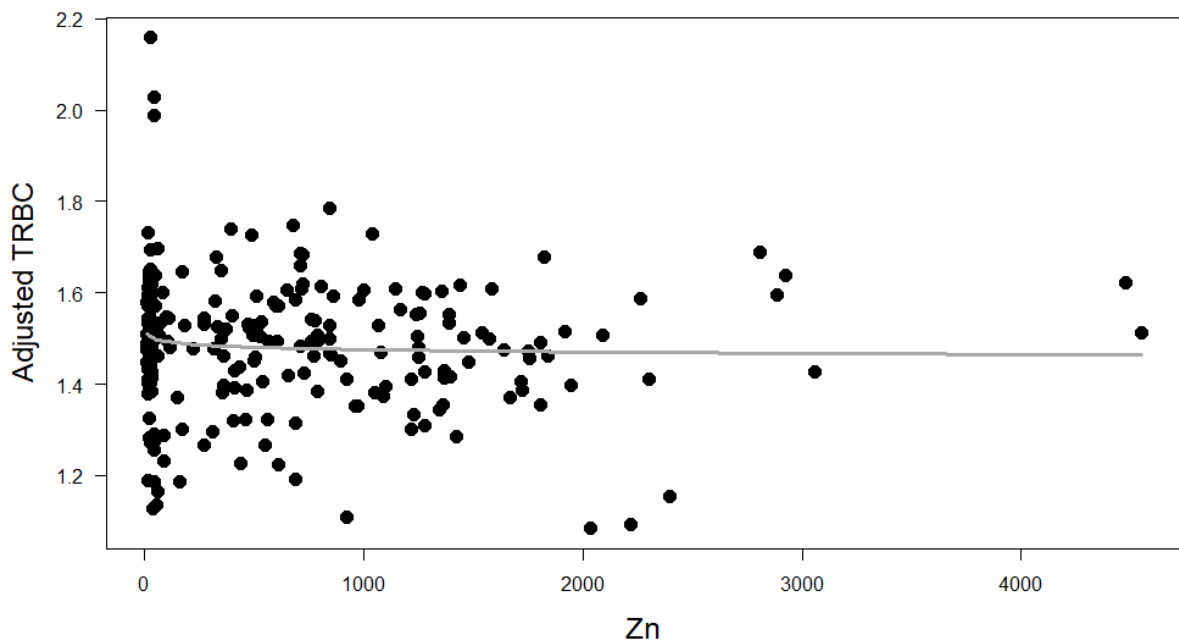


Fig. S10. Lack of relationship between TRBC and blood Zn concentrations in urban great tits. The TRBC is shown on the y as adjusted value controlled for all significant effects of fixed variables from MAM 6 (Table 2), i.e. including age and air temperature, but not including the random effects (done in R by package visreg; Breheny and Burchett, 2017).

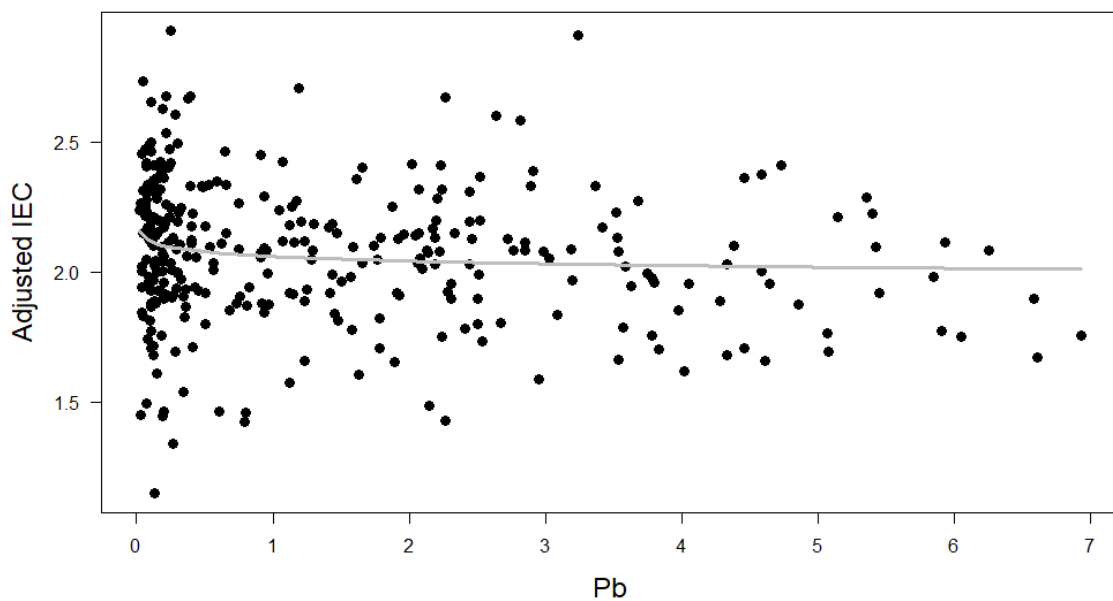


Fig. S11. Lack of relationship between IEC and blood Pb concentrations in urban great tits. The IEC is shown on the y as adjusted value controlled for all significant effects of

fixed variables from MAM 7 (Table 2), i.e. including body mass, but not including the random effects (done in R by package visreg; Breheny and Burchett, 2017).

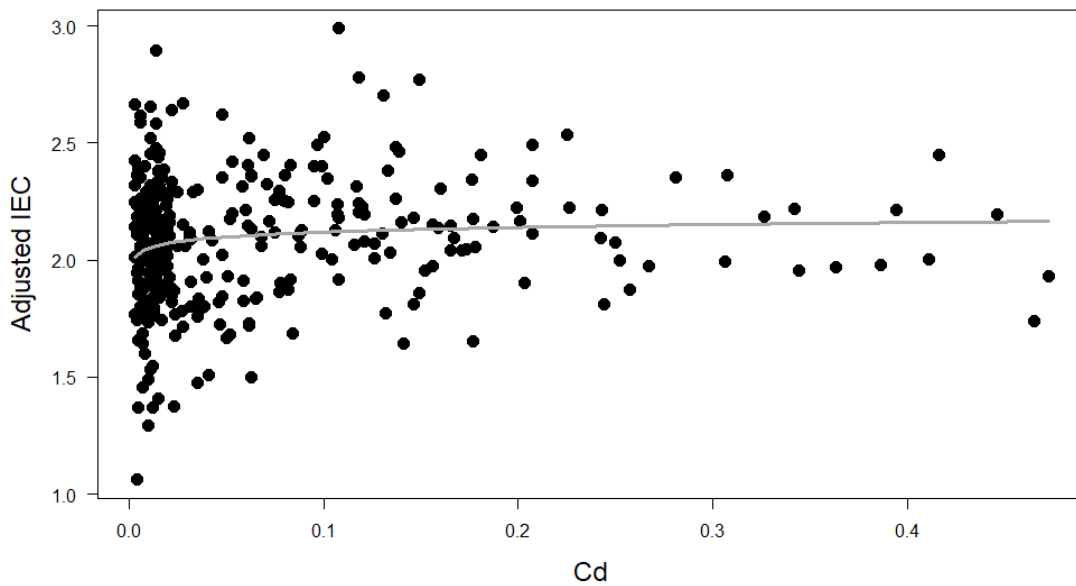


Fig. S12. Lack of relationship between IEC and blood Cd concentrations in urban great tits. The IEC is shown on the y as adjusted value controlled for all significant effects of fixed variables from MAM 8 (Table 2), i.e. including body mass, but not including the random effects (done in R by package visreg; Breheny and Burchett, 2017).

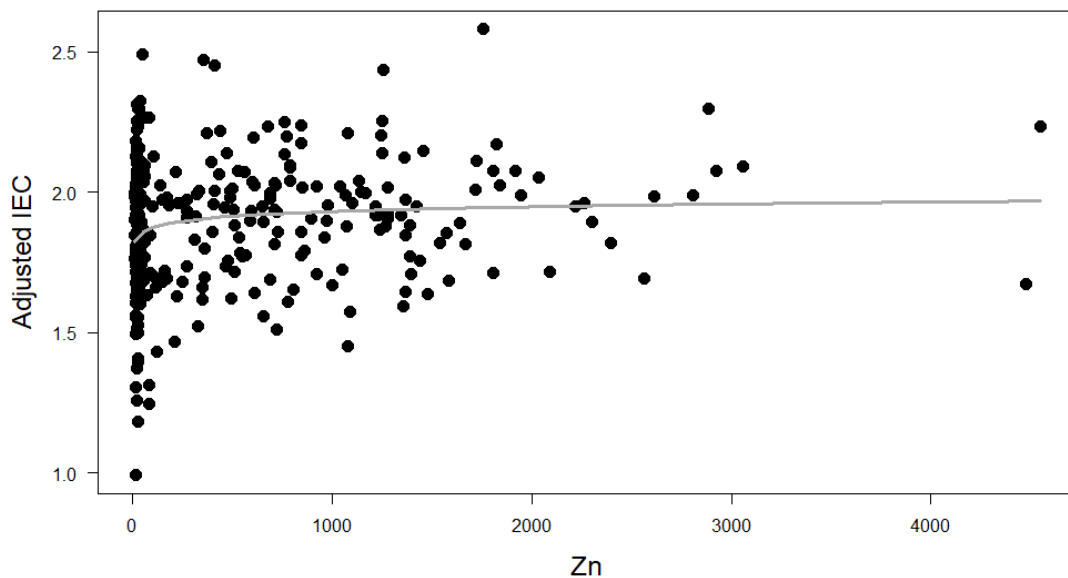


Fig. S13. Lack of relationship between IEC and blood Zn concentrations in urban great tits. The IEC is shown on the y as adjusted value controlled for all significant effects of fixed variables from MAM 9 (Table 2), i.e. including body mass, but not including the random effects (done in R by package visreg; Breheny and Burchett, 2017).

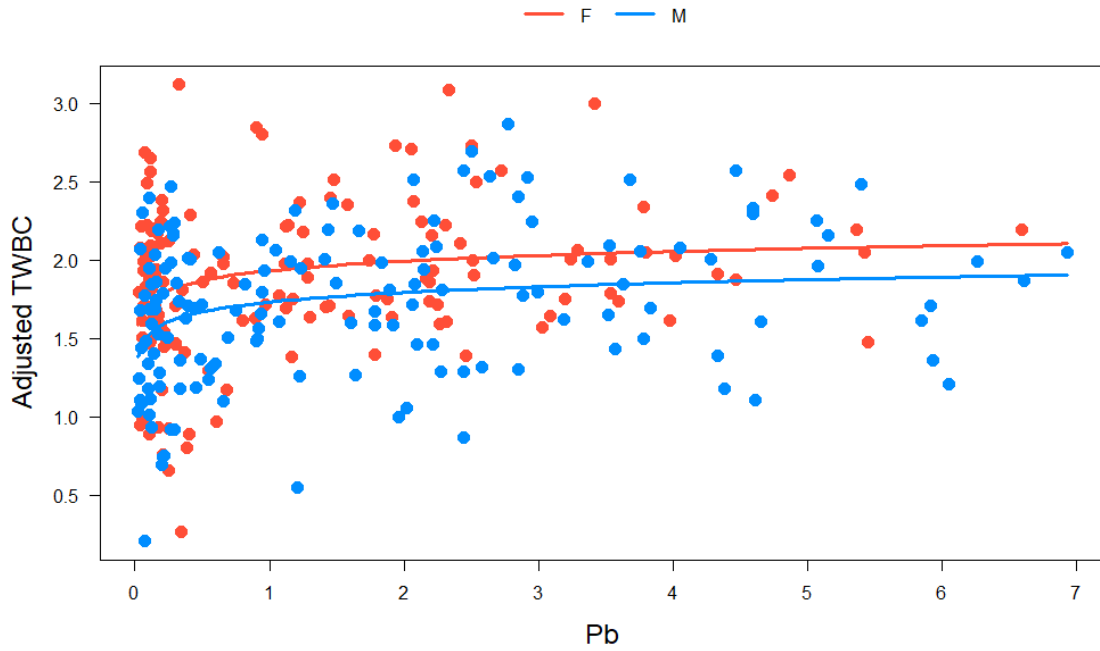


Fig. S14. Relationship between TWBC and blood Pb concentrations in urban great tits. The TWBC is shown on the y as adjusted value controlled for all significant effects of fixed variables from MAM 10 (Table 2), i.e. including body mass and air temperature, but not including the random effects (done in R by package visreg; Breheny and Burchett, 2017).

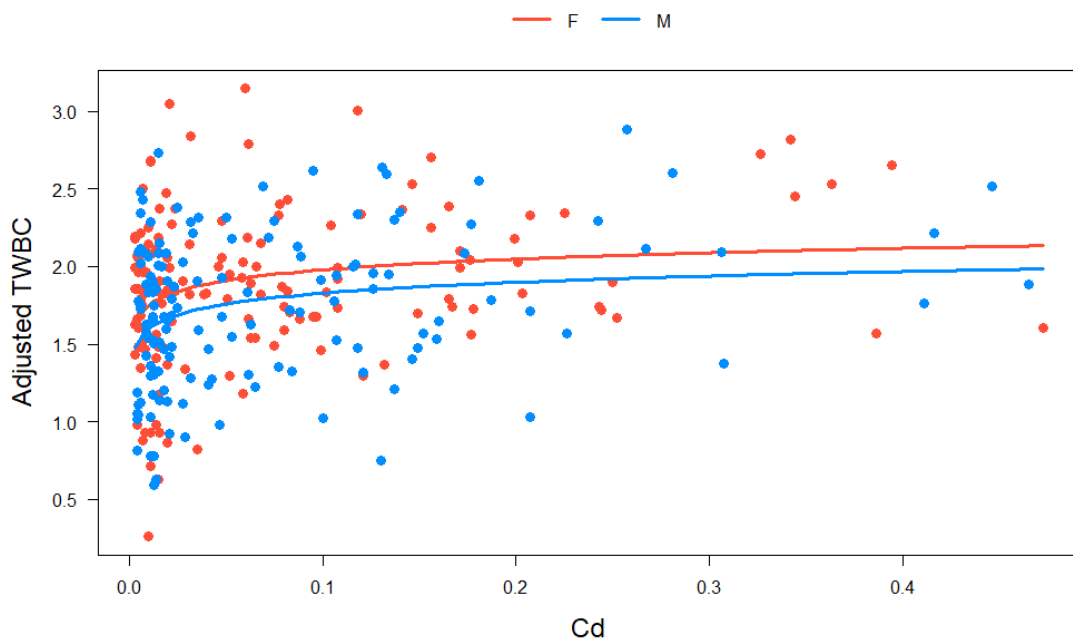


Fig. S15. Relationship between TWBC and blood Cd concentrations in urban great tits. The TWBC is shown on the y as adjusted value controlled for all significant effects of fixed variables from MAM 11 (Table 2), i.e. including body mass and air temperature, but not including the random effects (done in R by package visreg; Breheny and Burchett, 2017).

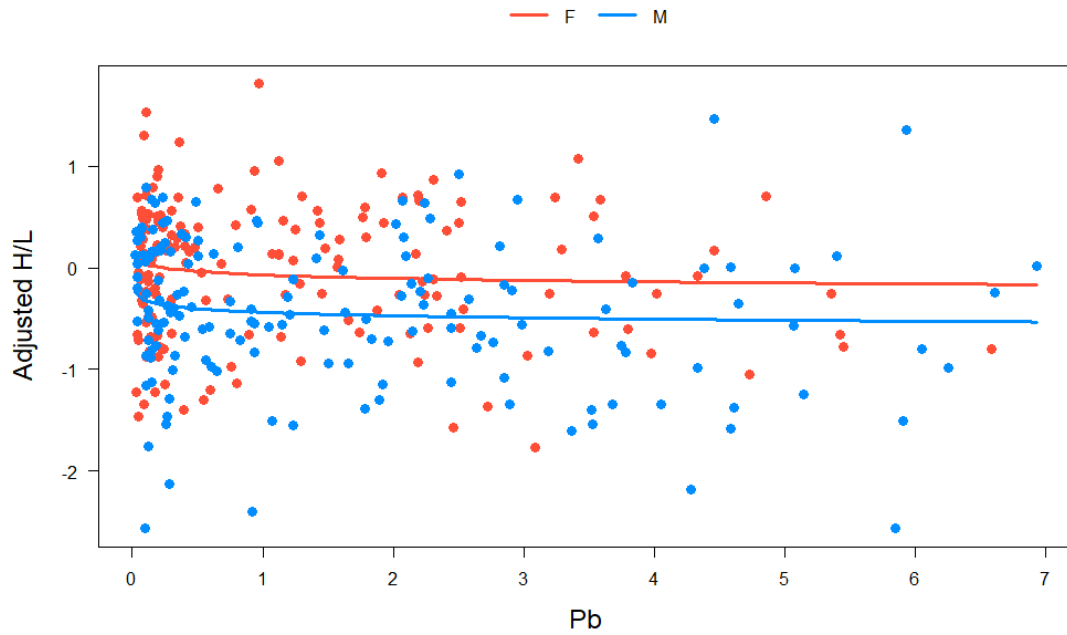


Fig. S16. Lack of relationship between H/L ratio and blood Pb concentrations in urban great tits. The H/L ratio is shown on the y as adjusted value controlled for all significant effects of fixed variables from MAM 13 (Table 2), i.e. including age and air temperature, but not including the random effects (done in R by package visreg; Breheny and Burchett, 2017).

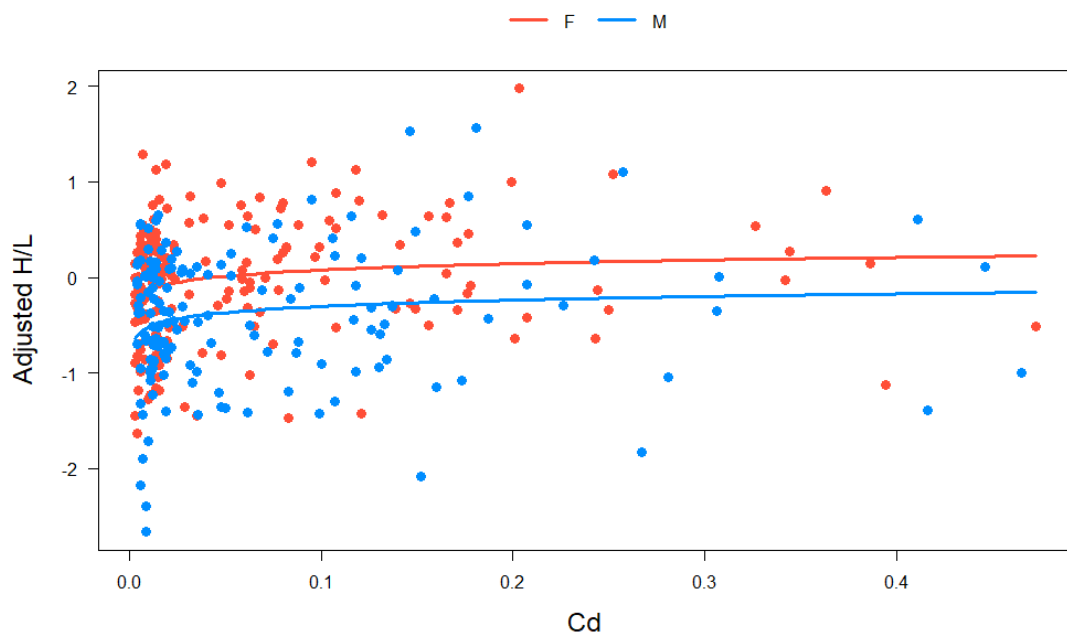


Fig. S17. Marginally non-significant relationship between H/L ratio and blood Cd concentrations in urban great tits. The H/L ratio is shown on the y as adjusted value controlled for all significant effects of fixed variables from MAM 14 (Table 2), i.e. including age and air temperature, but not including the random effects (done in R by package visreg; Breheny and Burchett, 2017).

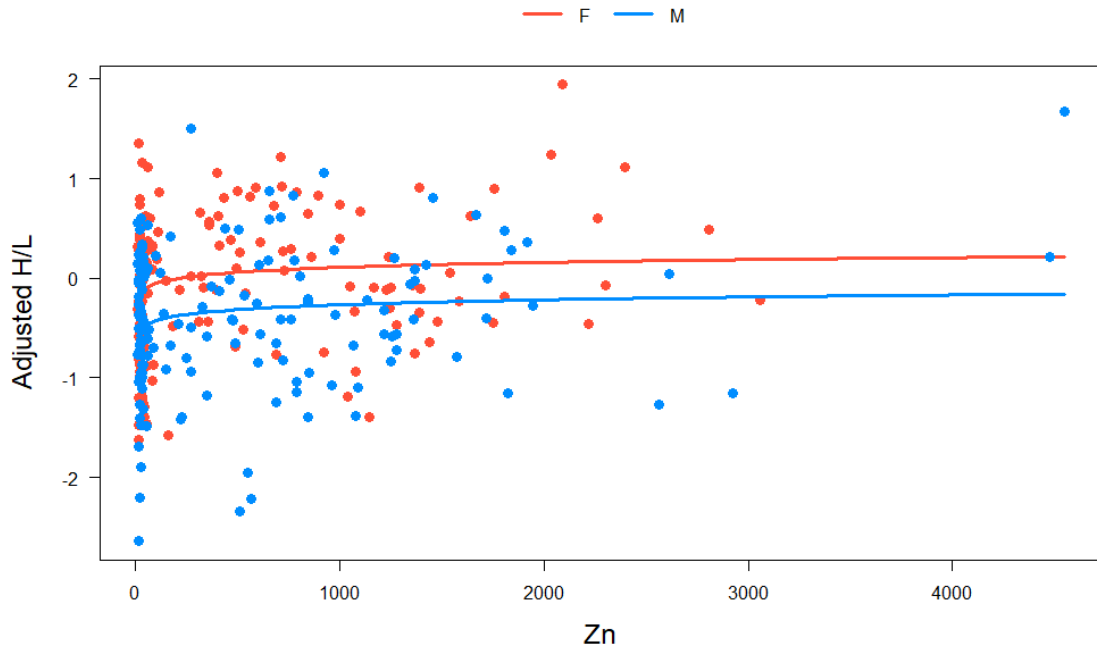


Fig. S18. Lack of relationship between H/L ratio and blood Zn concentrations in urban great tits. The H/L ratio is shown on the y as adjusted value controlled for all significant effects of fixed variables from MAM 15 (Table 2), i.e. including age and air temperature, but not including the random effects (done in R by package visreg; Breheny and Burchett, 2017).

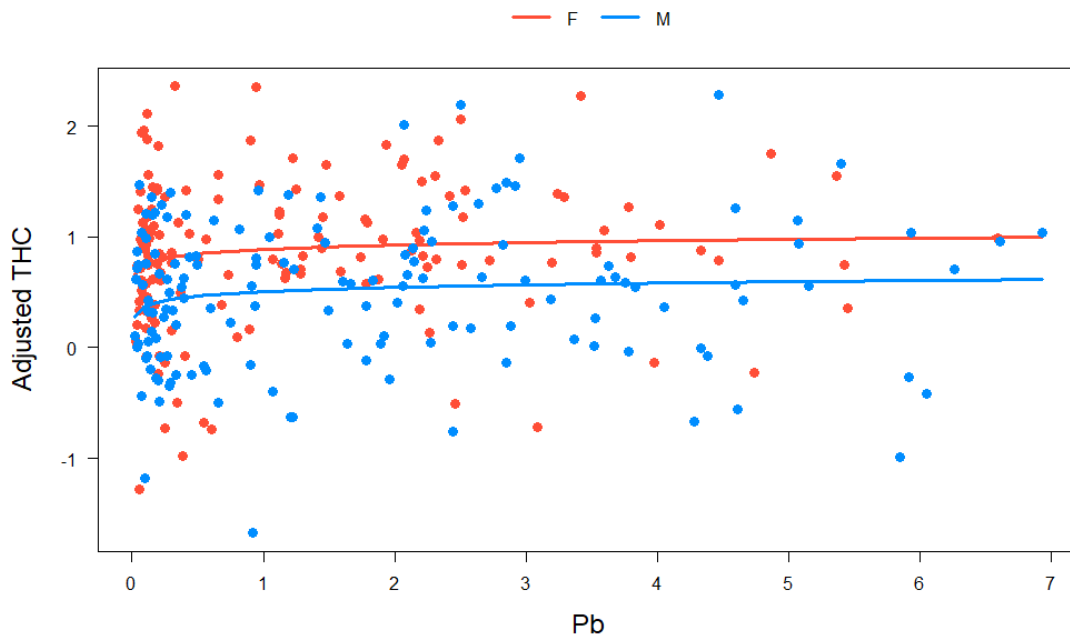


Fig. S19. Lack of relationship between THC and blood Pb concentrations in urban great tits. The THC is shown on the y as adjusted value controlled for all significant effects of fixed variables from MAM 16 (Table 2), i.e. including body mass, but not including the random effects (done in R by package visreg; Breheny and Burchett, 2017).

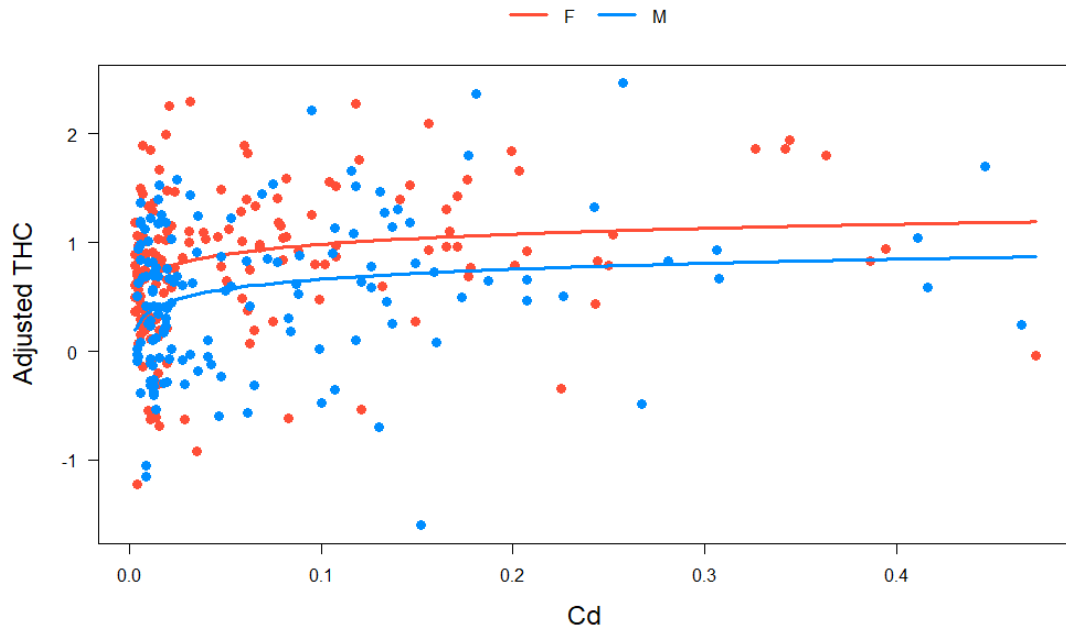


Fig. S20. Relationship between THC and blood Cd concentrations in urban great tits. The THC is shown on the y as adjusted value controlled for all significant effects of fixed variables from MAM 17 (Table 2), i.e. including body mass, but not including the random effects (done in R by package visreg; Breheny and Burchett, 2017).

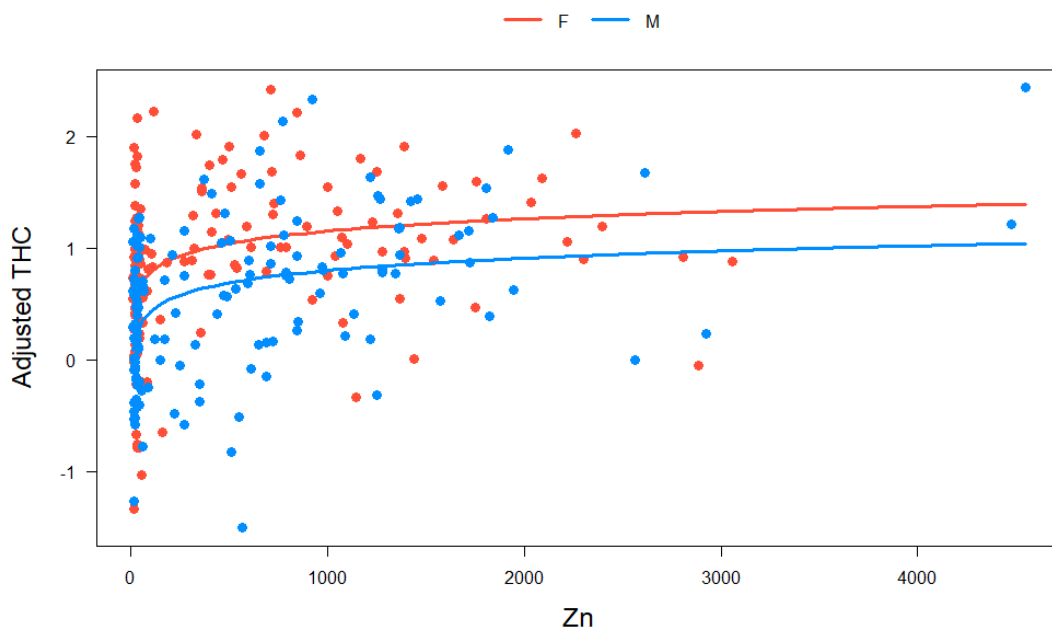


Fig. S21. Relationship between THC and blood Zn concentrations in urban great tits. The THC is shown on the y as adjusted value controlled for all significant effects of fixed variables from MAM 18 (Table 2), i.e. including body mass, but not including the random effects (done in R by package visreg; Breheny and Burchett, 2017).

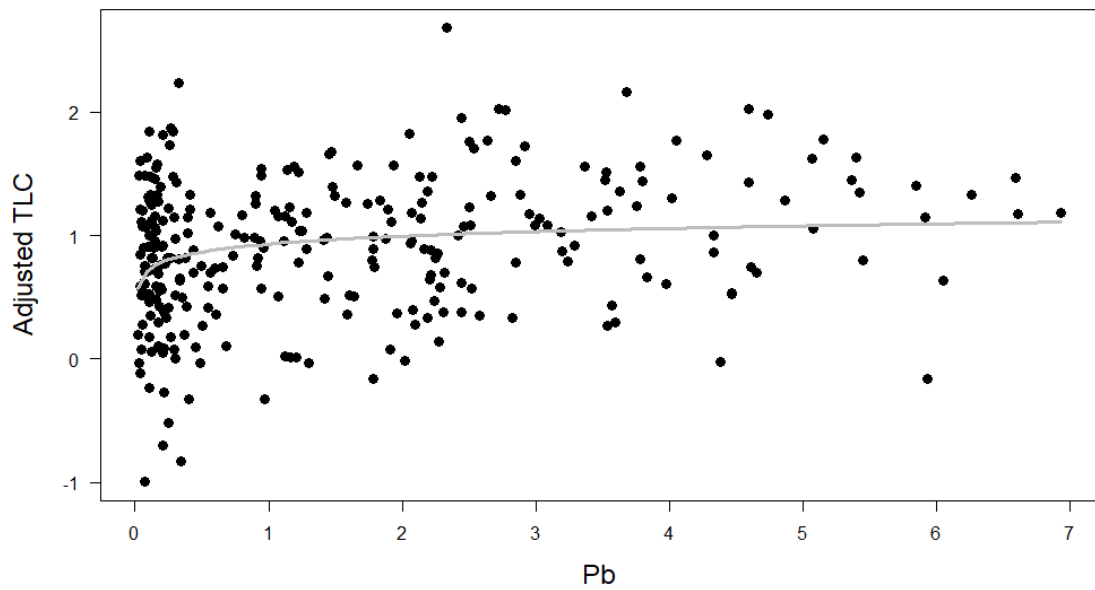


Fig. S22. Relationship between TLC and blood Pb concentrations in urban great tits. The TLC is shown on the y as adjusted value controlled for all significant effects of fixed variables from MAM 19 (Table 2), i.e. including age and air temperature, but not including the random effects (done in R by package visreg; Breheny and Burchett, 2017).

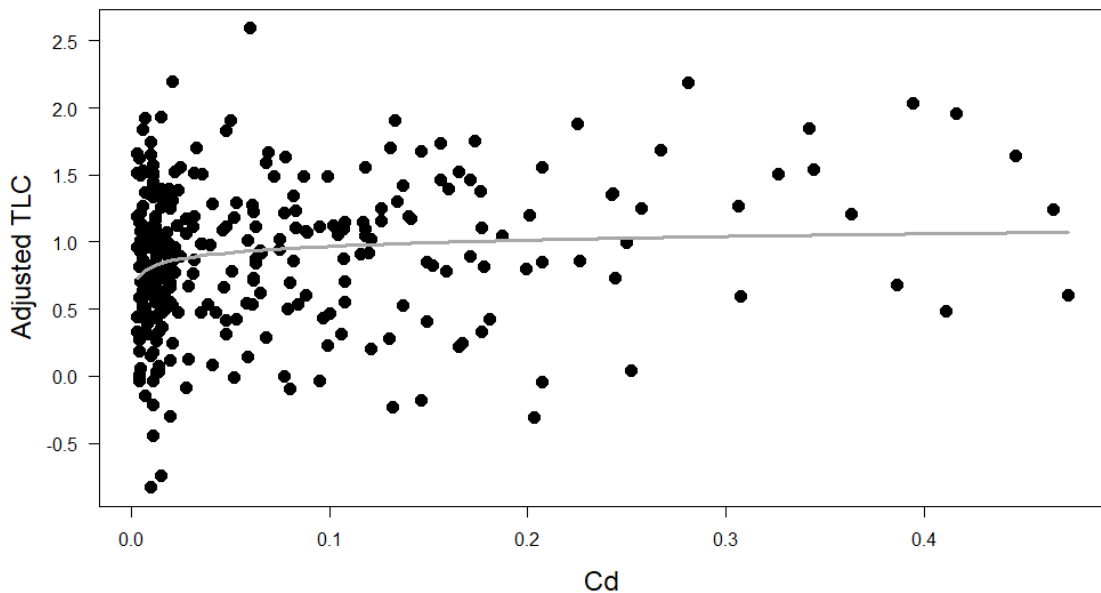


Fig. S23. Marginally non-significant relationship between TLC and blood Cd concentrations in urban great tits. The TLC is shown on the y as adjusted value controlled for all significant effects of fixed variables from MAM 20 (Table 2), i.e. including age

and air temperature, but not including the random effects (done in R by package visreg; Breheny and Burchett, 2017).

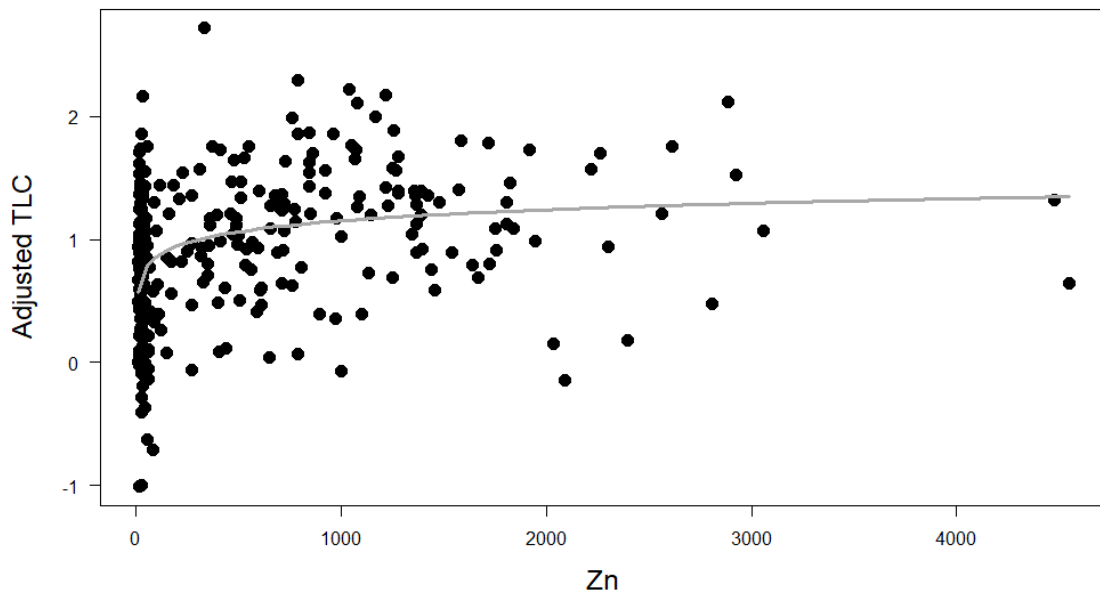


Fig. S24. Relationship between TLC and blood Zn concentrations in urban great tits. The TLC is shown on the y as adjusted value controlled for all significant effects of fixed variables from MAM 21 (Table 2), i.e. including age and air temperature, but not including the random effects (done in R by package visreg; Breheny and Burchett, 2017).