

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Ekologická a evoluční biologie



Jan Fiedler

Proměny biomonitoringu tekoucích vod pomocí bentosu se zřetelem k rozsivkám

Changes in biological monitoring of running waters using benthos with respect to diatoms

Typ závěrečné práce:

Bakalářská práce

Školitelka: Mgr. Jana Kulichová, Ph.D.

Praha, 2022

Prohlášení

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

V Praze, 25. 4. 2022

Podpis:

Poděkování

Můj dík patří zejména školitelce Mgr. Janě Kulichové, Ph.D. za mnohé rady i podporu, které mi při psaní bakalářské práce poskytla.

Abstrakt

Tato práce je zaměřena na vývoj metodologického přístupu k biomonitoringu tekoucích vod pomocí bentických organismů od metod zaměřených na určování organismů pomocí jejich vnějšího vzhledu až k modernímu biomonitoringu založenému na determinaci organismů pomocí eDNA metabarcodingu. V práci jsou zmíněny také moderní metagenomické metody (genomika, transkriptomika, metabolomika a proteomika). Práce srovnává vývoj hodnocení ekologického stavu sladkovodních ekosystémů pomocí rozsivek a bezobratlých a popisuje shodné body metodologického vývoje obou. Dalším výstupem porovnání biomonitoringu pomocí dvou různých taxonomických skupin jsou informace o tom, které hydrochemické a geochemické faktory prostředí lze snadno monitorovat pomocí rozsivek a které pomocí makroskopických bezobratlých. Dále je v závěru zmíněna prognóza dalšího vývoje biomonitoringu v podobě syntézy tradičních metod na základě morfologické determinace druhů, biomonitoringu 2.0 (využívajícího eDNA metabarcoding) a metagenomických metod.

Klíčová slova:

autekologie, morfologicky definované druhy, sekvenování, biotický index, znečištění

Abstract

This work focuses on the development of a methodological approach to biomonitoring of running waters using benthic organisms. It discusses the development from methods focused on determining organisms by their external appearance to modern biomonitoring based on the determination of organisms by eDNA metabarcoding. Modern metagenomic methods (genomics, transcriptomics, metabolomics and proteomics) are also mentioned. This thesis compares the development of ecological status assessment of freshwater ecosystems using diatoms and invertebrates. It also describes the common points of their methodological development. Another outcome of the comparison is information on which hydrochemical and geochemical environmental factors can be easily monitored by diatoms and which by macroscopic invertebrates. Furthermore, a prognosis for the further development of biomonitoring is mentioned in the conclusion. It is formulated as a synthesis of traditional methods based on morphological species determination, biomonitoring 2.0 (using eDNA metabarcoding) and metagenomic methods..

Key words:

autecology, morphospecies, sequencing, biotic index, pollution

Obsah

Úvod	1
1 Tradiční metody biomonitoringu pomocí bentických organismů	3
1.1 Princip biomonitoringu	3
1.2 Faktory prostředí působící na bentos	6
1.3 Výhody a nevýhody rozsivek a bezobratlých v biomonitoringu	10
1.4 Vývoj metod biomonitoringu založených na morfologické determinaci taxonů	11
2 Moderní molekulární metody v biomonitoringu	15
2.1.1 Metabarcoding	15
2.1.1.1 Taxonomy-free metody v metabarcodingu	17
2.2 Metagenomické metody v biomonitoringu	19
2.2.1 Genomika a transkriptomika	19
2.2.2 Proteomika a metabolomika	20
Závěr	21
Seznam použité literatury	23

Úvod

V ekologii se jako biomonitoring označuje veškerá činnost spojená s hodnocením ekologického stavu a probíhajících změn v ekosystémech pomocí živých organismů (Bondaruk et al. 2015). Monitoring ekosystémů může probíhat i pomocí jiných než jen biologických metod, např. chemických (Wilhm and Dorris 1968). Biomonitoring využívá bioindikátory mající funkci monitorování chemických a fyzikálních změn, ekologických procesů a biodiverzity (Holt and Miller 2010). Může být podkladem pro komunikaci s institucemi, které zavádějí programy kontroly a monitorování kvality vody (Alba-Tercedor and Sánchez-Ortega 1988). V biomonitoringu stojatých vod a moří se téměř výlučně analyzuje plankton, v tekoucích vodách a mokřadech spíše bentos, jelikož tekoucí vody favorizují malé organismy s přisedlým způsobem života. U bentosu je sezónní variabilita společenstva obecně menší než u planktonu, což usnadňuje porovnávání společenstev mezi jednotlivými obdobími (Illyová et al. 2013).

K zavedení užívání biomonitoringu v praxi vedla dlouhá cesta. V první polovině 20. století (Karr 1991; Stevenson et al. 2010) se vědci většinou zaměřovali při ekologickém hodnocení kvality vodních ekosystémů (např. za účelem určení kvality vody pro potřeby zemědělství a přímé konzumace) pouze na přítomnost chemických kontaminantů. Charakter vodní bioty byl většinou ignorován (Karr 2006). Byly tedy používány zejména chemické metody analýzy polutantů. V současné době má hlavní význam v proměně vodních ekosystémů eutrofizace a toxické látky. Dříve se jednalo spíše o organické znečištění, jehož důležitost je spíše na ústupu (Summers 2006 cit. in Keiser and Shapiro 2019). K integraci biologických metod docházelo postupně už od začátku 20. století (Kolkwitz and Marsson 1902). K hodnocení stavu vnitrozemských vod jsou stále častěji (i na úkor jiných skupin bioindikátorů) používány rozsivky (Bacillariophyta) a bentičtí bezobratlí (z nich zejména komplex taxonů EPT: Ephemeroptera – jepice, Plecoptera – pošvatky, Trichoptera – chrostíci) (např. Resh 2008). Tyto organismy jsou pro tuto funkci obzvláště vhodné z několika důvodů, které jsou v této práci popsány (podkapitola 1.3).

Vysokokapacitní sekvenování se nabízí zhruba od roku 2010 jako moderní alternativa k tradičnímu určování bioindikátorů podle vnějšího vzhledu, která nevyžaduje úsilí školených odborníků při determinaci druhů. Jakousi nadstavbou pro DNA metabarcoding mohou být další molekulární metody (genomika, transkriptomika, metabolomika a proteomika), které

mohou mimo jiné potvrdit přítomnost stresoru v ekosystému pomocí detekce stresového metabolitu (podkapitola 2.2.2). V tomto případě nejsou už bioindikátory jednotlivé organismy, ale změny jejich fyziologie (Lee et al. 2006).

Tato práce je zaměřena na vývoj metodologického přístupu k hodnocení kvality vod pomocí bentických organismů. Jejím úkolem je srovnání vývoje biomonitoringu ekosystémů pomocí rozsivek a bezobratlých v tekoucích vodách a zhodnotit možnosti vzájemného obohacení informacemi mezi biomonitoringem rozsivek a zoobentosu. Dále si klade za cíl vytvořit na základě dostupných publikací prognózu, zdali je pravděpodobné, že budou v blízké budoucnosti zachovány tradiční postupy biomonitoringu, nebo již budou rutinně užívány pouze moderní metody high-throughput genetického screeningu třeba obohacené o metagenomické metody (genomika, transkriptomika, metabolomika a proteomika), případně jestli může dojít k adekvátní syntéze obou metod.

1 Tradiční metody biomonitoringu pomocí bentických organismů

1.1 Princip biomonitoringu

V první polovině 20. století byla využívána chemická analýza kvality vody, protože analyzovat jeden chemický polutant je relativně snadné, nicméně ve vodním prostředí se jich nachází s narůstajícím antropickým vlivem (obr. 2) mnoho a často v těžko detekovatelných koncentracích (Marvan and Sládečková 1978; Wilhm and Dorris 1968). Přesnějšího zachycení změn v ekosystému ale lze docílit použitím nejen chemických a fyzikálních, ale i biologických metod (Marvan and Sládečková 1978). Biologické metody, jako je biomonitoring, používají bioindikátory, tedy druhy nebo skupiny druhů, jejichž funkce v ekosystému, populace nebo fyziologický stav mohou odhalit úroveň degradace životního prostředí (Siddig et al. 2016). Bioindikátory jsou lepšími ukazateli „zdraví“ ekosystému než samotná chemická analýza kvality vody a podávají informace o environmentálních změnách způsobených stresory (podkapitola 1.2), protože odpověď organismů je komplexní reakce na více faktorů současně (Dixit et al. 1992; Pomfret et al. 2019) a biotické indexy (viz níže) navíc odrážejí jak momentální situaci, tak i to, co se dělo v ekosystému nějakou dobu před odběrem vzorku (Alba-Tercedor and Sánchez-Ortega 1988).

V ekologii se jako biomonitoring označuje veškerá činnost spojená s hodnocením ekologického stavu a probíhajících změn v ekosystémech, přičemž se hodnotí a sledují složky biodiverzity, typy přírodních stanovišť, populace a jednotlivé druhy (Bondaruk et al. 2015). Zastřešujícím konceptem biomonitoringu je přesvědčení, že absence, či naopak hojnost nějakého druhu (bioindikátoru) nebo společenstva druhů odráží charakter habitatu, kde lze konkrétní druhy nalézt. Pokud se daný druh v určitém ekosystému nachází, znamená to, že jedna nebo více proměnných prostředí je v limitu jeho tolerance. Dichotomie prezence/absence může být rozšířena o relativní abundanci druhu vůči jinému, biomasu nebo růst indikátorových organismů v odpovědi na stresy z prostředí (Dokulil 2003). Výsledky pozorování druhového složení jsou pak spárovány s ekologickou třídou kvality (např. Kolkwitz and Marsson 1908; Lange-Bertalot 1979; Apothéloz-Perret-Gentil et al. 2017).

Přístupy biomonitoringu využívající rozsivky a vodní bezobratlé se týkají různých organizačních úrovní (tj. suborganismální – molekulární metody v kap. 2, organismální – identifikace druhů v podkapitolách 1.1 a zejména 1.4, populační – podkapitola 1.4 a ekosystému – 1.4 – ekoregiony) (Bonada et al. 2006). Tyto metody budou dále postupně představeny.

Biomonitoring je postaven na přítomnosti organismů v různých typech habitatů, které mohou odrážet např. gradient znečištění (zkoumány jsou vzorky z čistých, mírně znečištěných a velmi znečištěných vod) (Kolkwitz and Marsson 1908). Diverzita bioindikátorů bývá vyšší v čistých tocích než např. v městských znečištěných vodách (Chen et al. 2016). Fyzikální, biologické a chemické faktory prostředí působí na konkrétní druhy různě. Indikátorové druhy jsou ty, kterým se daří pouze v úzkém rozmezí podmínek. Generalisté by tedy nebyli vhodnými indikátory ekologického stavu ekosystému (Holt and Miller 2010).

Kvantitativně vyjádřitelné informace o kvalitě vody se tradičně získávaly sběrem vzorků a následně z biotických indexů taxonomických, mnohorozměrnou analýzou a analýzou celých společenstev bentosu (podkapitola 1.4) (Bellinger and Sigeo 2010a). Biotické indexy jsou měřítka struktury, funkce nebo jiných charakteristik biologických společenstev, která vykazují předvídatelnou reakci na antropogenní narušení (Bonada et al. 2006). Jde o stupnici, která je určena druhovou bohatostí nebo hojností jednotlivých druhů, a zejména jejich kvantifikovanou ekologickou preferencí, která vymezuje šíři jejich ekologické niky. Tyto proměnné jsou součástí indexů vycházejících z přímého pozorování bioindikátorů i v případě molekulární determinace celých společenstev pomocí environmentální eDNA (kap. 2) (Pawlowski et al. 2018).

Příkladem je trofický index pro rozsivky (TDI) vzniklý z potřeby podchytit míru eutrofizace vod, jelikož narůstá vtok živin z antropické produkce do biosféry. Na rozsivky má vliv koncentrace rozpuštěných forem fosforu a dusíku¹, která je při eutrofizaci zvýšena (Egge 1998). V původní formě zahrnuje TDI 86 druhů rozsivek, jež jsou snadno určitelné do druhu a jejichž rozmezí tolerance je dobře známé, a tudíž mají vysokou indikační hodnotu (Kelly and Whitton 1995). Manuál (Kelly et al. 2001) popisuje přesně kroky od sběru vzorků, jejich úpravy a identifikace až po výpočet indexu, u kterého je nejprve nutné vypočítat rovnici váženého průměru. To je suma abundancí jednoho druhu (počtu schránek), tolerance druhu ke znečištění (rozpětí 1 až 5) a indikační hodnoty (1 až 3) dělená sumou indikačních hodnot každého druhu. Výsledkem je vážená střední citlivost (WMS) (Sládeček 1986):

$$WMS = \frac{\sum_{j=1}^n a_j s_j}{\sum_{j=1}^n a_j}$$

TDI dává výsledné hodnoty v rozpětí od 1 do 100 a počítá se takto:

$$TDI = (WMS \times 25) - 25$$

Např. výsledná hodnota 74 označuje eutrofizované stanoviště.

Používá se i index trofie pro bentické bezobratlé (TSI-BI), do něhož se dosazují optima a rozmezí tolerance eutrofizace druhů (Chalar et al. 2011). Biotických indexů je tedy velmi mnoho, protože klima, geologie a lokální podmínky prostředí se liší mezi regiony a kontinenty (podkapitola 1.4 – Rottův index). Tyto podmínky jsou totiž hlavními faktory formujícími společenstva organismů. Biotický index (pro rozsivky i bezobratlé) vytvořený pro jedno prostředí nemusí poskytovat stejně přesné hodnocení ekologické kvality ekosystému, pokud je použit pro jiné prostředí (Stevenson 1997; Sandin and Hering 2004; Hering et al. 2006). Velké množství indexů lze rozdělit na: (a) zaměřené spíše na identifikaci indikátorů (indexy druhové bohatosti, abundance, mnohorozměrné analýzy společenstev – podkapitola 1.4) a (b) na autekologické preference druhů (týkající se jejich ekologických preferencí). Různé indexy byly vytvořeny pro různé typy znečištění/degradace habitatů, přičemž 56 % všech verzí indexů indikuje jak úroveň organického znečištění tak eutrofizaci. Dalšími typy indexů byly vytvořeny pro změny hydrologie/morfologie (zhoršení stavu vodních stanovišť,

¹ Rozhodující je i křemík, ale toho je v bentickém prostředí dostatek (Egge 1998).

změna průtoku, hydromorfologická degradace, změna břehových stanovišť, obr. 2) a pro další aspekty kvality vody (tj. acidifikace, těžké kovy, znečištění organickými sloučeninami) (Birk et al. 2012).

Pomocí indexů pro druhy z referenčních databází metabarcodingu (podkapitola 2.1) lze docílit rychlejšího a při dodržení správného postupu sekvenace i přesnějšího ohodnocení ekologického stavu. Porovnávání vzorků z jedné lokality, např. s časovým odstupem, totiž vyžaduje precizní determinaci bioindikátorů. Pro rychlé zachycení nepatrných změn (např. nepatrné snížení obsahu polutantu je včasným indikátorem zlepšování ekologického stavu), které mohou mít pro stav ekosystému výrazné následky, je proto vhodné používat kromě zavedených metod i moderní molekulární. Včasné zachycení změn intenzity působení stresoru je předností též metabolomiky (Ge et al. 2013; Yang et al. 2019). Standardizovaná hodnocení, která jsou založena na morfologické identifikaci organismů, zohledňují také početnosti druhů a probíhají ve vymezených obdobích (např. brzy na jaře u malých toků), aby bylo možné porovnávat výsledky mezi jednotlivými roky (Zizka et al. 2020).

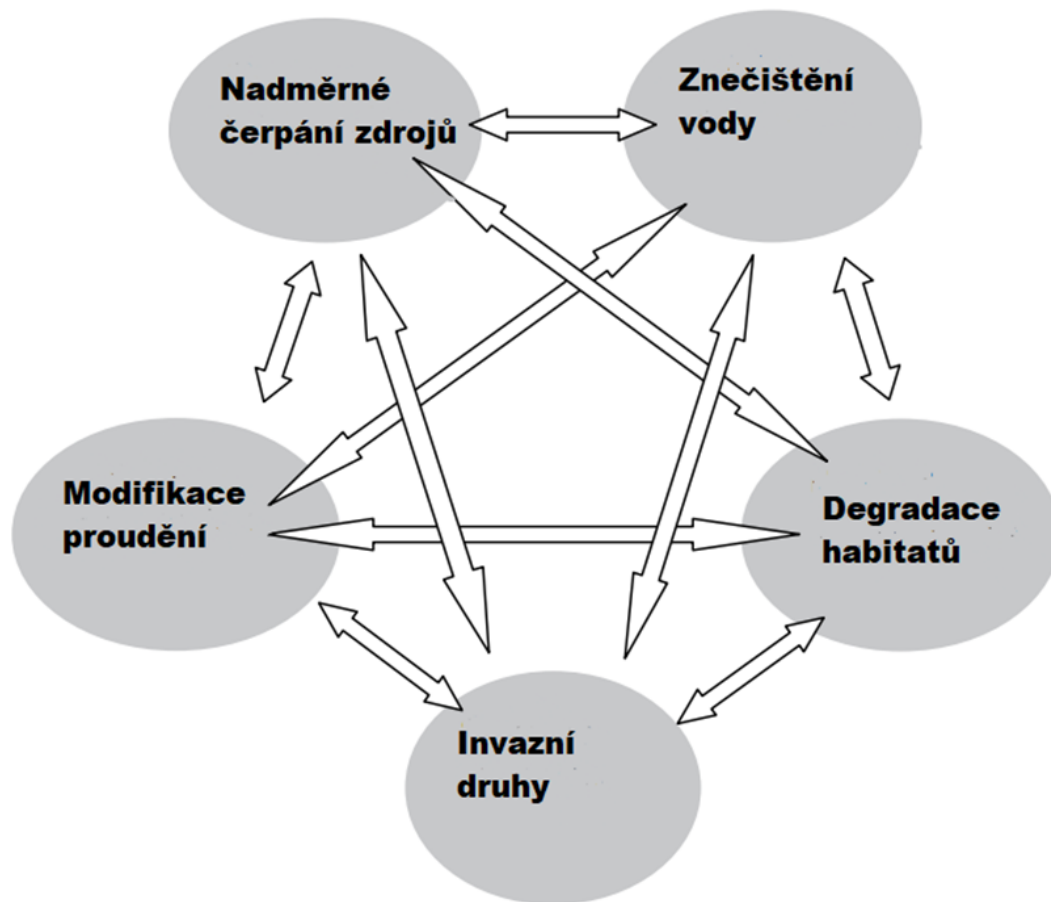
1.2 Faktory prostředí působící na bentos

V současné době má hlavní význam v proměně vodních ekosystémů eutrofizace a toxické látky. Dříve se jednalo spíše o organické znečištění, jehož důležitost je na ústupu, (např. příčinou zavedení mnoha čističek odpadních vod) (Summers 2006 cit. in Keiser and Shapiro 2019). Ekologický stav velkého množství ekosystémů je v poslední době navíc významně ohrožen dalšími faktory spojenými s lidskou činností, jako je např. nadměrné čerpání zdrojů, degradace habitatů a modifikace proudění (obr. 1, obr. 2), což má přímý vliv na fungování a skladbu společenstev organismů včetně rozsivek (Sonneman et al. 2001) a bezobratlých (Walsh et al. 2001). Na výše zmíněné a další faktory reaguje každá skupina bioindikátorů rozdílně:

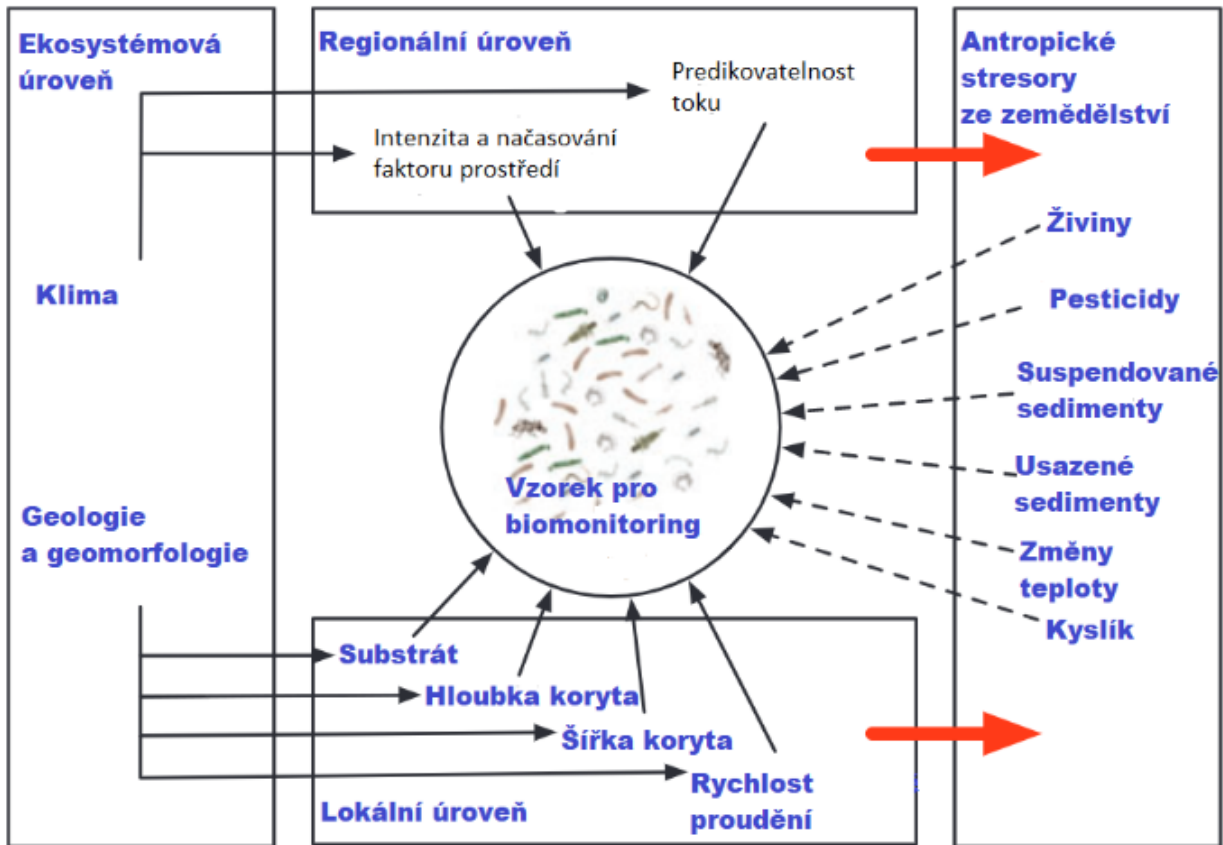
- (a) Rozsivky nejcitlivěji reagují na změnu koncentrace živin a rozpuštěného kyslíku; odpovídají také změnou druhového složení na poměrně nízké koncentrace pesticidů a těžkých kovů. Jako primární producenti zejména reagují na množství světla, též na změnu pH. Zatímco bentické rozsivky celkově na vyschnutí tolerantní nejsou, terestrické druhy jsou adaptované na nízkou vlhkost. Intenzita proudění, salinita, změna charakteru substrátu (např. tvrdé povrchy osidlují jiné rody než jemné sedimenty) nebo konduktivita také ovlivňují druhové složení rozsivek (Kelly et al.

2001; Patrick 1973; Sandin and Hering 2004; Yang et al. 2019). Komplexní vliv jednotlivých faktorů na organismy obecně je naznačen v obr. 1 a 2.

- (b) Bentičtí bezobratlí, resp. jejich vývojová stádia žijící ve vodě (zejména u EPT taxonů, podkapitola 1.3), mají omezenou možnost opustit svá stanoviště, takže reagují zejména na změny morfologie říčního koryta (např. na výrazné změny hloubky a šířky koryta, změny substrátu a modifikace proudění popsané v obr. 2)(Hering et al. 2006). Podobně jako rozsivky reagují bezobratlí na změny obsahu rozpuštěného kyslíku. Rozpoznání druhů senzitivních k množství rozpuštěného kyslíku ve vodě tedy umožnilo badatelům využít bezobratlé pro saprobní index (podkapitola 1.4).



Obr. 1 Pět hlavních kategorií ohrožení biodiverzity sladkých vod a naznačení všech potenciálních interakcí mezi nimi. Změny životního prostředí probíhající v globálním měřítku, jako jsou depozice dusíku, oteplování a změny ve struktuře srážek a odtoku, se překrývají se všemi těmito kategoriemi ohrožení (podle Dudgeon et al. 2006).

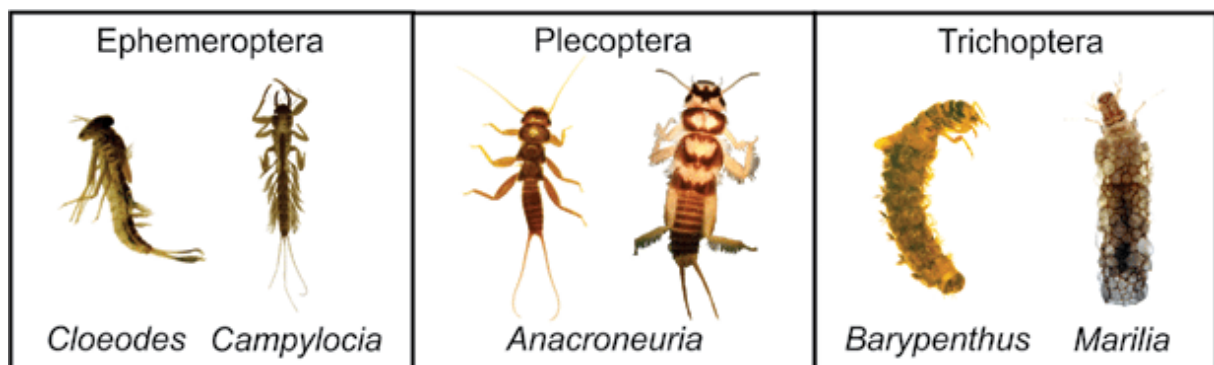


Obr. 2 Provázanost hydrochemických faktorů a faktorů environmentálních, které působí na vzorek, jenž je zkoumán biomonitoringem. Jedná se o znázornění spolupůsobících vlivů velkého, regionálního a lokálního měřítka provázaných se stresory ze zemědělství a jiné lidské činnosti (Baird and Hajibabaei 2012).

1.3 Výhody a nevýhody rozsivek a bezobratlých v biomonitoringu

Rozsivky (Bacillariophyta) jsou jednobuněčné i koloniální řasy, které se vyskytují téměř ve všech vodních biotopech jako volně žijící fotosyntetizující autotrofové, vzácněji pak heterotrofové nebo endosymbionti (Lee 2018) a mají mnohá praktická využití. Mohou pomoci identifikovat naleziště ropy (Stoermer and Smol 2004), mohou být zdrojem obnovitelné energie (Levitan et al. 2014), pomáhají ve forezních vědách (Verma 2013), poskytují data pro paleoekologii (např. Stone et al. 2011) a v neposlední řadě jsou vhodné pro biomonitoring ekologického stavu ekosystémů. Rozsivky mohou být izolovány z biofilmů nebo ze sedimentů. Tvoří nejvíc diverzifikovanou skupinu sladkovodních řas, což z nich dělá ideální bioindikační skupinu (Bellinger and Sigeo 2015a).

Využití v biomonitoringu mají též různé bezobratlí. V tekoucích vodách se používá zejména EPT komplex taxonů (Ephemeroptera, Plecoptera, Trichoptera) (Zizka et al. 2020), ale také např. *Chironomus tentans* (Lee et al. 2006) a měkkýši (López-Pedrouso et al. 2020). Podobně lze využívat také prokaryotní organizmy (Sagova-Mareckova et al. 2021) nebo ryby (Dalzochio and Gehlen 2016; Resh 2008).



Obr. 3 Příklady rodů z taxonů Ephemeroptera – jepice, Plecoptera – pošvatky a Trichoptera – chrostíci, které jsou často používány pro biomonitoring (Santos et al. 2014).

Rozsáhlý přehled předností spojených s užíváním rozsivek (Stevenson and Pangdong 2004) a bezobratlých (Resh 2008) lze shrnout ve třech bodech.

Zprv je jejich důležitost v ekosystémech (rozsivky jsou na základní trofické úrovni, bezobratlí jsou sekundární producenti). Jsou hlavními zástupci bentosu tekoucích vod (Fenoglio et al. 2020). Všudypřítomnost v bentosu a vysoká biologická rozmanitost jsou společné oběma skupinám (Resh 2008).

Zadruhé jsou dobrými indikátory ekologických podmínek, např. krátkodobých hydrologických disturbancí (změna charakteru substrátu atp., obr. 2) a rozsivky jsou přímo ovlivňovány fyzikálními a chemickými faktory (Stevenson and Bahls 1999). U obou skupin je k dispozici dostatek informací o šíři ekologické valence druhů (Resh 2008).

Zatřetí je snadné je pro biomonitring používat. Rozsivky lze poměrně snadno mikroskopicky identifikovat na druhovou úroveň. Podle taxonomických klíčů je lze určit podle jejich inertní křemičité schránky (Lowe 1974). To neplatí pro většinu ostatních skupin řas nebo vodních bezobratlých (i když u bezobratlých lze přibližně a často i přesně určit druhy už v terénu, jak je zmíněno níže). Snadný sběr a identifikace vzorků je tedy vlastností též bezobratlých (Resh 2008).

Výlučné výhody u bezobratlých jsou jejich dlouhá generační doba jako možnost zachycení změn, které se v ekosystému udály před delší dobou, možnost determinovat bezobratlé do druhu už na místě sběru bez mikroskopické techniky a též omezená možnost opustit stanoviště, čímž se stávají konkrétní druhy preciznějšími indikátory než rozsivky, které se snadno šíří na velké vzdálenosti. Brzy po narušení rozsivky rychle obnovují své početnosti, zatímco bezobratlým to trvá déle, takže poskytují informace i o tom, co se v ekosystému událo před delší dobou (Resh 2008).

1.4 Vývoj metod biomonitoringu založených na morfologické determinaci taxonů

Organismy tekoucích vod odrážejí změny v podmínkách prostředí, čehož si badatelé všimli již v polovině 19. století (Cohn 1853 cit. in Bellinger and Sigeo 2015a). Vývoj biomonitoringu má svůj počátek zhruba na začátku 20. století, kdy byl bakteriologický biomonitring záhy obohacen i o eukaryotické bioindikátory (Kolkwitz and Marsson 1902; Kolkwitz and Marsson 1908).

Stevenson and Pangdong (2004) zmiňují dva směry vývoje hodnocení ekologického stavu ekosystémů, z nichž první je založen na saprobním indexu a druhý na konceptu ekologické integrity:

- (1) Tento model nazvu modelem evropským, jelikož stál u zrodu biomonitoringových programů na evropském kontinentu. Jedná se o koncept, který integruje tzv. saprobitu, tj. děj v ekosystému, kdy se organické znečištění projevuje poklesem koncentrace

rozpuštěného kyslíku ve vodě². Čím více organických látek, tím méně kyslíku, ten se totiž při rozkladu organických látek spotřebovává (CMEA 1969 cit. in Tagliapietra et al. 2012; Sládeček 1986). Tento model byl historicky aplikován jako první a využíval řasy (Kolkwitz and Marsson 1908) i bezobratlé (Kolkwitz and Marsson 1909) a jejich fyziologickou toleranci k různé koncentraci rozpuštěného kyslíku pro identifikaci množství organických látek³. Ze vzorců pro výpočet saprobního indexu vycházejí i např. trofické indexy (TDI, podkapitola 1.1) a ve Francii vytvořený IPS (CEMAGREF 1987).

- (2) Biomonitoringové studie Ruth Patrickové (1973) se spoléhaly především na diverzitu rozsivek jako na obecný ukazatel stavu řeky (tj. ekologické = biotické integrity⁴), protože druhové složení společenstev se mění s ročním obdobím více než diverzita. Tyto studie vznikaly v 50. letech 20. století, ale používaly se i v modernějších studiích v USA, kde byly i inspirací pro vytvoření legislativního ukotvení biomonitoringu a vytvoření indexu biotické integrity, který používá rozsivky (a jiná protista), bezobratlé a ryby. Pro výpočet je třeba znát relativní abundance druhů a druhové složení společenstva (Karr 1991). Ten byl použit i pro bentické bezobratlé (Lunde and Resh 2012).

V současnosti převládá v USA koncept (2) (Beck and Hatch 2009). Shodným bodem vývoje metrik v Evropě a v USA je fakt, že legislativní nástroje na mezinárodní úrovni urychlily vývoj metod biomonitoringu ve snaze vytvořit vhodné programy hodnocení ekologického stavu vod, a tudíž udržet biologickou integritu zdrojů vody. V USA se jednalo o Federální zákon o kontrole znečištění vody (1971). V Evropě je pak biomonitoring právně ukotven směrnicí 2000/60/EC (European Union 2000), též známou jako Water Framework Directive (WFD). WFD dává legislativní motivaci k získávání dat o fyzikálních, chemických a biologických parametrech vodních ekosystémů, a tedy podává celostní přehled o ekologickém stavu vodních ekosystémů. V Evropě se používá vedle konceptu saprobity

² Saprobity je souhrn všech metabolických procesů, které jsou protikladem primární produkce. Je to tedy souhrn všech procesů, které jsou doprovázeny ztrátou potenciální energie. Její úroveň lze zjistit jak metabolicko-dynamickým (chemickým a fyzikálním) měřením, tak analýzou živých společenstev (CMEA 1969).

³ Organické látky mohou být zapojeny zpět do biochemických cyklů při vypouštění do sladkých vod, protože ústředním konceptem saprobity byla schopnost vod samočištění při dostatečném naředění organických polutantů.

⁴ Biologická integrita je schopnost vodního ekosystému podporovat a udržovat společenstvo organismů, které má srovnatelné druhové složení, rozmanitost a funkční organizaci s přírodními stanovišti na daném území (Karr and Dudley 1981).

i ekologická integrita, dokonce i v ČR (např. pro hodnocení ekologického stavu tekoucích vod na Křivoklátsku v publikaci Růžičková and Benešová 1996). V rámci WFD došlo tedy k obohacení o americký koncept.

Pod vlivem WFD vzniklo mnoho nových precizních indexů, které zahrnovaly lokální diverzitu a charakter vodních ekosystémů v členských státech (podkapitola 1.1). Podle WFD mají být vodní ekosystémy Evropy ohodnoceny jedním ze 4 statutů: „vysoký“, „dobrý“, „přiměřený“, „špatný“ (orig. high, good, fair, poor) (Naddeo et al. 2005). Speciální indexy pro jednotlivé státy berou v potaz jejich specifické regionální podmínky. Příkladem může být Rottův trofický index a Rottův saprobní index (Rott et al. 2003), jež vycházejí ze specifických podmínek rakouských toků nebo Sládečkův index znečištění (Sládeček 1986) vytvořený pro střední Evropu, který byl i předlohou pro výše zmíněnou váženou střední citlivost (WMS) v TDI (Kelly and Whitton 1995).

Na základě ekologických preferencí a abundancí druhů vzniklo mnoho regionálně specifických indexů, jenže ani ty nemohly zahrnout všechny proměnné prostředí (zejména rozdíly teploty a proudění mezi jednotlivými regiony) (Bonada et al. 2006). Proto jako další bod vývoje biomonitoringu pomocí rozsivek a bentických bezobratlých vznikly mnohorozměrné analýzy, které poskytují statistické vyhodnocení vztahů mezi mnoha proměnnými. Např. ve studii z Bolívie autoři odhalili autoři, že tamní rozsivky slaných jezer více odpovídají na změny v druhy iontů obsažené ve vodě než na salinitu, pH, hloubku, teplotu nebo nadmořskou výšku, což byly další proměnné mnohorozměrné analýzy, které byly zohledněny (Servant-Vildary and Roux 1990). Vzhledem k tomu, že lze posuzovat více proměnných současně a kvantifikovat jejich význam, je možné z dat získat více informací než jednorozměrnými statistikami. V ekologii začali vědci tuto metodu používat v 80. letech minulého století (James and McCulloch 1990).

V USA se uplatnila mnohorozměrná analýza (Bahls et al. 2008) a koncept ekoregionů, který byl použit i v evropských studiích (Soininen et al. 2004). Ekoregiony jsou oblasti s podobnou geologií, klimatem, vegetací a dalšími faktory, které ovlivňují vodu a vodní společenstva. Tvoří rámec pro management ekologické kvality vod (Bryce et al. 1999). V Evropě ekoregiony fungují na úrovni států (opět např. Rottův index Rott et al. 2003), jedná se tedy opět o spojení americké a evropské větve biomonitoringových metod.

V biomonitoringu se uplatnily metody, které zohledňují projevy organismů od suborganizmační až po ekosystémovou úroveň. Suborganizmační metody založené na biomarkerech budou popsány v kapitole o molekulárních metodách. Pozoruhodné metody u bezobratlých, při kterých jsou porovnávána procentuální zastoupení jednotlivých tzv. functional feeding groups, jsou příkladem biomonitoringu na úrovni společenstva. Principem je dělení bezobratlých na skupiny podle způsobu získávání potravy a typu potravy (dělení na: „scrapers“ („grazers“), „shredders“, „collectors“ („gatherers“), „filterers“, a „predators“) (Wallace and Webster 1996). V rámci hodnocení ekologické kvality ekosystému je porovnávána absolutní nebo relativní početnost zástupců jednotlivých skupin. Tyto metody měří nejen citlivost druhů na nějaký stresor (např. vyšší koncentrace živin, vyšší koncentrace kadmia a acidifikace v publikaci Rawer-Jost et al. 2000), ale i jeho roli v ekosystému. Dokonce se tento koncept používá v kombinaci s dalšími proměnnými v mnohorozměrné analýze (např. pro EPT taxony a jejich odpověď na jemnozrnné sedimenty dna v publikaci Akamagwuna and Odume 2020). Souvisí to s konceptem říčního kontinua. Tzn. s měnicí se zónou toku se mění i typická společenstva, protože se podél toku mění zdroje potravy a jejich dostupnost (Vannote et al. 1980). Tento přístup ale zohledňuje jen ty antropické stresory, které souvisejí se změnou dostupnosti potravy pro bezobratlé (např. intenzivnější zemědělská činnost a větší množství opadu listů do říčního systému) (Bonada et al. 2006). U rozsivek se používá obdobná metoda na úrovni tří tzv. ekologických gild (1 – relativně rychle se pohybující druhy, 2 – druhy žijící blízko vrstvy substrátu a 3 – druhy pohybující se na povrchu biofilmu). V kontaminovaných lokalitách narůstá abundance pohyblivých druhů (gilda 3) na úkor ostatních dvou gild (Marcel et al. 2017).

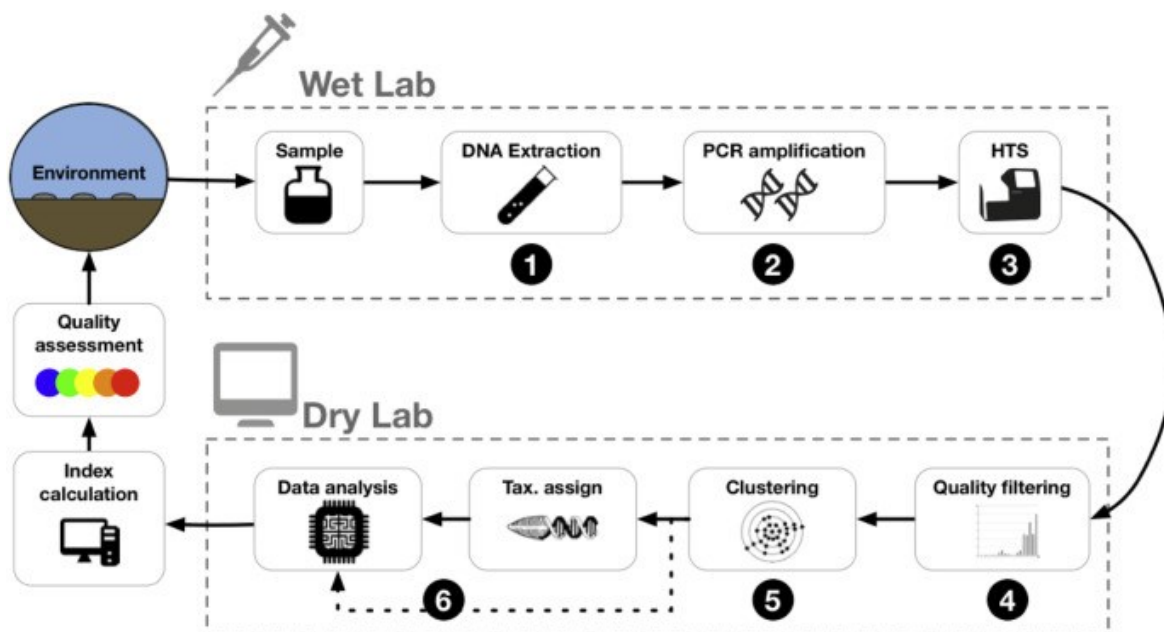
Unikátní taxonomy-free metoda (více v podkapitole 2.1.1), která se nepoužívá u rozsivek, založená na pozorování ekologických a biologických znaků je používána i u společenstev vodních bezobratlých. Hodnocené znaky musejí být obecné z hlediska geografického použití, specifické z hlediska identifikace stresorů, spolehlivé a odvozené z pevných teoretických ekologických konceptů. Jsou jimi znaky **biologické** např. životní cyklus, fyziologické a behaviorální charakteristiky – maximální velikost těla, délka života, potravní a reprodukční strategie, mobilita atd. a **ekologické** (tolerance k měnicímu se pH a měnicí se teplotě, tolerance k organickému znečištění atd.) (Menezes et al. 2010). Tyto znaky jsou pak spolu s abundancí a dalšími proměnnými druhu dosazeny do příslušných indexů (Bonada et al. 2006).

2 Moderní molekulární metody v biomonitoringu

2.1.1 Metabarcoding

Po roce 2010 byly navrženy moderní metody sekvenace DNA umožňující rutinní získávání údajů o organismech bez jejich kultivace. Souviselo to s vynálezem sekvenování nové generace (NGS) (Wooley et al. 2010). Jednou z těchto metod je genetické vysokokapacitní sekvenování, užívání zejména v DNA metabarcodingu. Přináší potenciální výhody oproti tradičním přístupům, jako jsou nižší náklady, menší časová náročnost a vyšší taxonomické rozlišení. Zizka et al. (2020) popisují schopnost metabarcodingových dat o přítomnosti/nepřítomnosti druhů spolehlivě posoudit složení společenstev bezobratlých v tocích a odvodit environmentální (přírodní nebo antropogenní) dopady. Metabarcoding se používá též u rozsivek a je snaha zpřístupnit jej pro rutinní biomonitoring, tzv. biomonitoring 2.0 (Rimet et al. 2019; Apothéloz-Perret-Gentil et al. 2021).

Postup metabarcodingu je naznačen v obr. 4. Probíhá v pěti krocích: (1) izoluje se environmentální DNA ze vzorku, (2) následuje PCR amplifikace markerového genu zaměřeného na analyzované společenstvo (rozsivky/bezobratlí) a následně (3) vysokokapacitní sekvenování (HTS) získaných amplifikovaných genů. Sekvenční data se poté filtrují (4), aby se snížil počet chyb sekvenování, a identické sekvence se dereplikují, aby se získaly individuální sekvenční jednotky (ISU). Jednotky ISU se shlukují (5) do molekulárních operačních taxonomických jednotek (OTU) a pro biomonitoring je nejdůležitější bod (6), kdy jsou sekvence na základě podobnosti přiřazeny k OTU a OTU jsou následně identifikovány do druhů. Molekulárně určené druhy jsou využity pro výpočet biotického indexu, který vypovídá o kvalitě vody (Pawlowski et al. 2018). Konkrétní sekvence jsou poté empiricky přiřazovány k úrovni citlivosti/tolerance na stresor (quality assessment v obr. 4). Pro vzácné druhy je často k dispozici méně údajů o jejich toleranci (Birk et al. 2012).



Obr. 4 Postup metabarcodingu v pěti krocích (Pawlowski et al. 2018).

Nejčastěji používaný molekulární marker je u bezobratlých úsek pro podjednotku I mitochondriální cytochrom c oxidázy (mtDNA COI) (Hebert et al. 2003). Používá se i pro výše zmíněnou skupinu taxonů EPT, a tudíž i při biomonitoringu (Zhou et al. 2009). Vnitřní transkribovaná oblast 2 (ITS2) jaderné ribozomální DNA je dalším barcodem pro bezobratlé (Pawlowski et al. 2018), protože má řadu výhodných vlastností, jako je dostupnost konzervovaných oblastí cenných při designu univerzálních primerů, snadná amplifikace, a dostatečná variabilita vnitřních úseků nutná pro rozlišení i blízce příbuzných druhů (Yao et al. 2010).

mtDNA COI (Hansher et al. 2011) a ITS2 (Evans et al. 2007) byly testovány jako barcodey pro rozsivky, ale ukázalo se bohužel, že se nejedná o vhodné oblasti z hlediska efektivity využití. Specifické primery pro plastidový gen *rbcL* (různé úseky genu pro ribulosa-1,5-bisfosfát-karboxylázu/oxygenázu), jehož produkt je rozhodující pro fixaci uhlíku u fotosyntetizujících organismů, jsou zvláště užitečné pro rozlišení druhových rozdílů u rozsivek (Kermarrec et al. 2014). Pro určení rozsivek na vyšší taxonomické úrovni je vhodný gen pro V4 úsek 18S rDNA (Guo et al. 2015). V4 úsek je často používán pro rozsivky, jelikož je nejvariabilnější částí 1800 bp dlouhého úseku 18S rDNA. Pro rozsivky je nejvhodnější pro určení taxonů kombinace obou genů (Keck et al. 2016; Zimmermann et al. 2015).

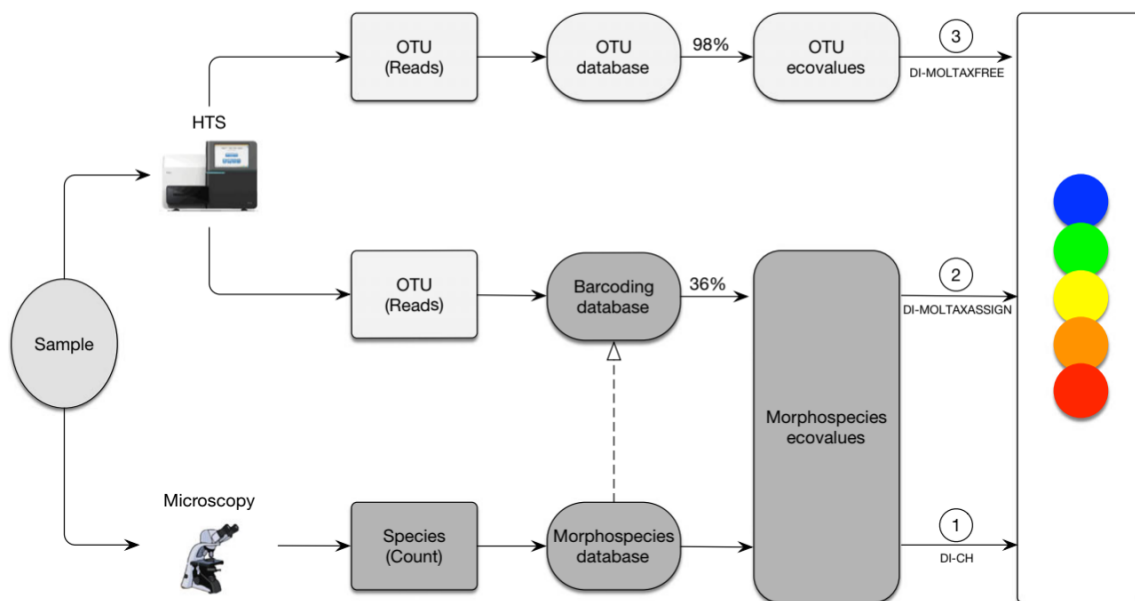
Na základě studií porovnávajících morfologický a molekulární přístup k určování druhů (např. Pawlowski et al. 2018; Serrana et al. 2019) lze vyvodit následující závěry. Nevýhodou metabarcodingu jako molekulárního přístupu může být nekompletní počet taxonů ve vzorku (undersampling), v jehož důsledku sekvenování nemusí odhalit vzácné druhy přítomné na lokalitě (např. Serrana et al. 2019). Pokud je ale použit reprezentativní vzorek a primery jsou správně zvolené, je metabarcoding úspěšnou konkurencí morfologickým metodám. V několika publikacích je však též uvedeno, že molekulární a morfologické analýzy společenstev a podle nich provedené analýzy ekologického stavu ekosystémů si odporují. Proto je vhodné zachovat obě metody, případně některý z přístupů zdokonalit (Kelly et al. 2017). U bezobratlých se od sebe mohou stádia životního cyklu výrazně lišit, což může zesložitovat jejich morfotaxonomickou identifikaci. Molekulární metody obecně vykazují tu výhodu, že odhalí přítomnost jedince v jakémkoliv jeho ontogenetickém stádiu, a dokonce i vzorky eDNA z poškozených buněk/tkání, které by bylo složité identifikovat. To platí i pro rozsivky, protože je sekvenována extracelulární DNA z poškozených buněk (Mächler et al. 2021; Pawlowski et al. 2018).

2.1.1.1 Taxonomy-free metody v metabarcodingu

Nevýhodou užití metabarcodingu jako biomonitoringové metody, jež přiřazuje sekvencím jména na základě morfologicky definovaných druhů, je neúplnost genetické databáze, nedostatečné rozlišení fylogenetických markerů a kryptická diverzita, která zesložituje kalibraci indexů, protože může dojít k nesprávnému přiřazení konkrétní nalezené sekvence k morfologicky určenému druhu (Yu et al. 2012). Jako alternativu lze použít tzv. taxonomy-free index bez identifikace do druhů. Taxonomy-free index také generuje OTU (obr. 5, přístup 3 – MOLTAXFREE) (Clare et al. 2016), ale těmto jednotkám není přiřazen taxonomický název. Empiricky a vhodnou kalibrací jsou OTU přiřazeny k ekologickým hodnotám určujícím ekologický stav ekosystému (obr. 5, OTU-ecovalues). Taxonomické přiřazení tedy není nutné, a dokonce jsou podle Apothéloz-Perret-Gentil et al. (2017) pro výpočet indexů lépe využitelné OTU nepřijížené taxonomicky k morfologicky určeným druhům. Např. protože je výhodné, že při taxonomy-free přístupu u rozsivek lze použít pro výpočet biotických indexů až 95 % OTU oproti zhruba 35 % sekvencí, které bylo možné určit do druhů morfologicky určených, které se používají jako bioindikátory.

Hlavními omezeními taxonomy-free metody je nutnost komplexního spárování výsledných OTU s ekologickými třídami kvality. Nicméně kalibrovat složení společenstev na

úrovně narušení ekosystému (znečištěním atp.) je nutné i při použití tradičních metod. Dále se též jako nevýhoda uvádí neúplné zastoupení organismů žijících na dané lokalitě (undersampling), ale to je nevýhoda spojená též s tradičními metodami. Dekády zdokonalování mikroskopické analýzy rozsivek ale způsobily, že tradiční indexy jsou zatím dokonalejší (Apothéloz-Perret-Gentil et al. 2017; Mächler et al. 2021). Oproti tomu u běžně se vyskytujících morfologicky definovaných druhů, se kterými byla spárována jejich ekologická tolerance, je už většinou dlouhou dobu známá ekologická preference. Metabarcoding obecně navíc není spolehlivým zdrojem informací o abundanci jednotlivých druhů (Blaxter 2004; Pawlowski et al. 2018), přestože byly navrženy pokusy, kdy se pro výpočet abundancí využily počty sekvencí jednoho druhu vztažené k počtům sekvencí jiného (Apothéloz-Perret-Gentil et al. 2017).

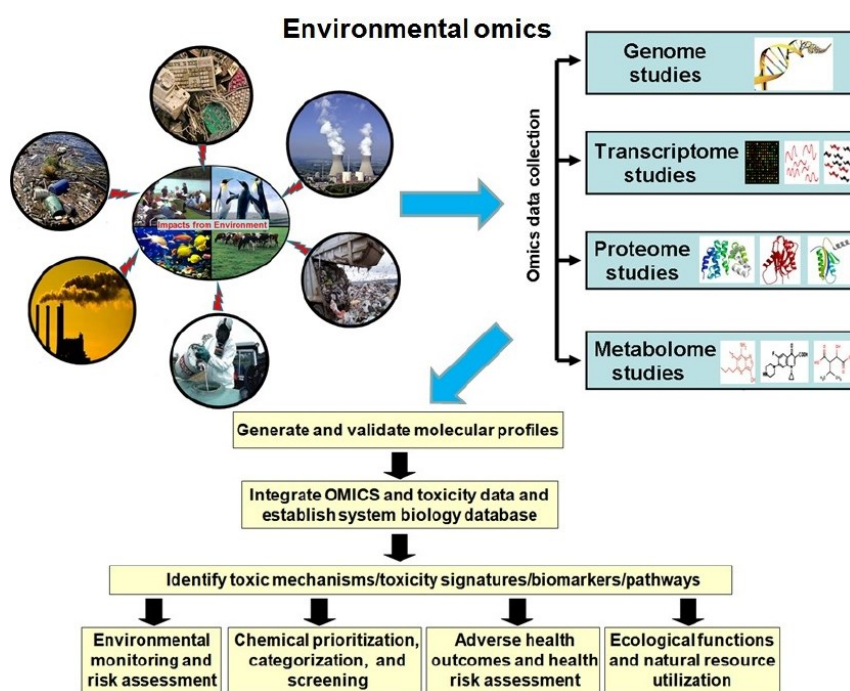


Obr. 5 Popis postupu biomonitoringu, který zobrazuje jak tradiční metody založené na determinaci druhů podle morfologie, tak moderní metody využívající eDNA ze vzorku. Všechny tři přístupy nám poskytnou informace pro hodnocení ekologického stavu ekosystému (Apothéloz-Perret-Gentil et al. 2017).

2.2 Metagenomické metody v biomonitoringu

2.2.1 Genomika a transkriptomika

Nadstavbou nad dnes už poměrně často používanou metodu metabarcodingu jsou molekulární metody nepřímé analýzy ekologického stavu ekosystému. Hodnotí stav ekosystému pomocí určitých chemických látek biogenního původu (biomarkerů), které se tak stávají „bioindikátory“ fyziologického stavu organismů, jenž je např. zhoršen přítomností stresoru v podobě polutantu. Genomika a transkriptomika mohou posloužit jako nástroj pro detekci např. stresových biomarkerů u živočichů při chemickém znečištění (McLean 2013). Chemické polutanty v prostředí mohou způsobovat zrychlení genové exprese specifických mRNA ve vzorku z prostředí. Porovnávána je genová exprese ve vzorku z čisté referenční lokality a ze znečištěné. Je vhodné doplňovat genomickou/transkriptomickou analýzu také o proteomiku a metabolomiku, jelikož změny proteinů a metabolitů v rámci buněk nemusejí být detekovatelné pouze studiem mRNA v prostředí. Genomika, transkriptomika, proteomika a metabolomika jsou v biomonitoringu souhrnně označovány jako tzv. environmental OMICS (obr. 6) (Ge et al. 2013).



Obr. 6 Čtyři metagenomické metody (environmental OMICS) a jejich užití v biomonitoringu (Ge et al. 2013).

2.2.2 Proteomika a metabolomika

Environmentální metabolomika zkoumá soubor metabolitů v pozorovaném prostředí (metabolom) a je nadmnožinou proteomiky, jelikož se nesespecializuje pouze na proteiny. Environmentální metabolom a proteiny odrážejí opět jako v případě transkriptomiky (tam ale na úrovni transkriptomu – souboru RNA) nějaký typ fyziologického stresu a nepřímo i narušení ekosystému (např. narušení přítomností nějakého polutantu). Metabolomika poskytuje včasné varování a diagnostické posouzení změn ekologického stavu vodního ekosystému. U rozsivek je biomarkerem zvýšené koncentrace zinku a mědi specifické zvýšení koncentrace chlorofylu *c* (Gonçalves et al. 2019; Pomfret et al. 2019). Proteomika tedy detekuje látky biogenního původu (tzv. biomarkery, v tomto případě proteinového původu) a má využití při biomonitoringu bezobratlých (např. Dowling and Sheehan 2006). Tento přístup může identifikovat složení, strukturu a aktivitu proteinů. Stejně tak může detekovat metabolické dráhy toxicity polutantů a nové biomarkery, a to nejen u stávajících modelových bioindikačních organismů (pro které již byly definovány molekulární biomarkery environmentálního stresu), ale také u nemodelových bioindikačních organismů s vysoce odlišným fylogenetickým pozadím. Nejsou totiž druhově specifické (Lemos et al. 2010).

Kontaminanty mohou způsobit změnu genové exprese a následně tvorbu specifických látek v buňkách organismů. Imunologické testy založené na protilátkách proti specifickým stresovým proteinům mají dobrý potenciál pro monitorování životního prostředí, protože akumulaci zvoleného biomarkeru lze kvantifikovat přímými metodami (např. se zjistí jeho koncentrace ve vodě, případně pouze presence/absence). Separace proteinů s následným western blotem (tj. analytická technika sloužící k detekci specifického proteinu ve směsi s dalšími proteiny) je nejčastěji používaná pro sledování exprese HSP70 (heat-shock protein 70) ve vodních organismech (Dyer et al. 1993). HSP70 je látka (proteinový chaperon) produkovaná řadou organismů jako odpověď na stres různého původu (nejen na tepelný stres, podle něhož dostal název) (Mayer and Bukau 2005). Přítomnost HSP ve vodním prostředí indikuje, že organismy syntetizovaly řadu proteinů ve snaze chránit své buňky před chemickým znečištěním (z látek jako např. bisfenol A, chlorid kadmennatý, dusičnan olovnatý, dichroman draselný atp.). Různé HSP jsou konzervované napříč eukaryoty. Kromě HSP je zjišťována též přítomnost např. hemoglobinu, která u bezobratlých ukazuje jejich schopnost přežít v podmínkách, kdy je málo rozpuštěného kyslíku ve vodě, což opět indikuje přítomnost stresoru (Bergtrom et al. 1976). Autoři Lee et al. (2006) zvolili pro analýzu

přítomnosti HSP70 a hemoglobinu *Chironomus tentans*, jelikož Chironomidae jsou nejpočetnější skupina bezobratlého bentosu, a tudíž je vhodné proteomicky analyzovat jejich odpověď na stres i v environmentálním biomonitoringu. Molekulární/biochemické indikátory mohou poskytnout včasnou indikaci environmentálního stresu vodních společenstev. Výhodou této metody je rychlejší zachycení změn v ekosystému, než kdyby byly použity celé organismy jako indikátory, jelikož ty odpovídají na změny pomaleji (Lee et al. 2006; Pomfret et al. 2019).

Závěr

Antropogenním vlivům a jejich dopadům na ekosystémy včetně ekosystémů tekoucích vod se věnuje stále více pozornosti. Narůstající intenzita znečištění a degradace vodních zdrojů a vodních ekosystémů byla od druhé poloviny 20. století motivací pro další vývoj biomonitoringových metod, které tyto faktory (zejména organické a anorganické znečištění a acidifikaci) mohou dobře identifikovat a predikovat. První tradiční metodou byl koncept saprobity, který indikoval dříve běžné organické znečištění vod. Následoval koncept biotické integrity soustředící se na vysokou diverzitu jako hlavní důkaz „zdraví“ vodního ekosystému (Sládeček 1986; Stevenson and Pangdong 2004).

Po vzniku metod na základě saprobity a biotické integrity se indexy zdokonalovaly a vznikaly i indexy regionálně specifické pro jednotlivé státy a indexy nového typu, např. trofické pro rozsivky (Kelly and Whitton 1995) a pro bezobratlé (Chalar et al. 2011). V biomonitoringu obou bentických skupin se též uplatnily mnohazměrné analýzy, které poskytly statistické metody pro studium společných vztahů proměnných v datech, která jsou ve vzájemné korelaci. Lze tvrdit, že vývoj tradičních metod byl u bentických bezobratlých a rozsivek podobný, přestože každá skupina reaguje na některé faktory prostředí rozdílně (rozsivky jako primární producenti zejména na živiny/pesticidy a bezobratlí na změnu morfologie koryta a na fyzikální vlastnosti toku) (Patrick 1973; Hering et al. 2006). Podobně se např. vyvinul biomonitoring na úrovni společenstev rozsivek (tzv. ekologické gildy) (Marcel et al. 2017) i bezobratlých (tzv. functional feeding groups) (Bonada et al. 2006). Důvodem podobnosti metod mohl být vznik legislativních opatření na mezinárodní úrovni (např. European Union 2000 – Rámcová směrnice o vodě zahrnuje biomonitoring pomocí obou skupin) za účelem zákonem stanovených cílů v ochraně vodních ekosystémů.

V rámci tradičních metod bez využití sekvenace u bezobratlých vznikaly i taxonomy-free metody na principu integrace biologických (životní cyklus, fyziologické a behaviorální charakteristiky – maximální velikost těla, délka života, potravní a reprodukční strategie, mobilita atd.) a ekologických znaků (tolerance k měnícímu se pH a měnící se teplotě, tolerance k organickému znečištění) (Menezes et al. 2010).

V éře sekvenování nové generace zhruba po roce 2010 vznikly metody jako metabarcoding, při jehož integraci do biomonitoringu zprvu prošly metody zacílené na obě tyto skupiny organismů opět podobným vývojem. Metody se ovšem liší některými používanými markerovými geny. Např. geny pro podjednotky *rbcL* jsou použitelné z těchto dvou skupin jen u rozsivek, protože produkt tohoto genu se účastní fotosyntézy. Jiné markerové geny jsou používány pro konkrétní skupiny organismů pro jejich účinnost při determinaci specifických taxonů (COI a ITS2 – bezobratlí, 18S a *rbcL* u rozsivek, s menší účinností lze použít i ITS2) (např. Hamsher et al. 2011). Časově i finančně náročné taxonomické určení bioindikátorů lze obejít přímým spárováním molekulárních operačních taxonomických jednotek s třídami ekologické kvality ekosystémů (jedna z tzv. molecular taxonomy-free metod). Kalibrace je však náročná a další problém těchto metod je sběr nedostatečně obsáhlých vzorků. Tyto nevýhody jsou spojené též s metodami na základě morfologického určování druhů (Pawlowski et al. 2018).

Rutinní používání omických metod u bezobratlých je u rozsivek zřídka, přestože mají mnoho výhod a mohly by diatomologický biomonitoring obohatit. Velmi důležitou výhodou je včasnost určení degradace prostředí v podobě přítomnosti nějakého polutantu (např. bisfenol A, dnes všudypřítomný). Bylo by vhodné tuto větev výzkumu obohatit hlubším zkoumáním metabolomu rozsivek, při kterém by mohly být nalezeny doposud neznámé specifické biomarkery. U rozsivek však již bylo popsáno, že chlorofyl *c* působí jako metabolomický biomarker stresu z těžkých kovů (Gonçalves et al. 2019).

Metody založené pouze na analýze nukleových kyselin (genomika a transkriptomika) v prostředí nezachytí některé změny proteinů a metabolitů v buňce. Je proto výhodné používat je v kombinaci s proteomikou a metabolomikou (Ge et al. 2013). Dle mého názoru by tedy bylo vhodné použít genomické metody pro snazší determinaci výskytu sladkovodních rozsivek, které mají bioindikační potenciál. Sekvenace a následné použití metagenomických metod by tedy mohly napomoci k hlubšímu porozumění např. metabolických drah reagujících na stres ze znečištění u sladkovodních rozsivek.

Svébytnou metodou, která by mohla plně nahradit metody založené na určování druhů podle jejich morfologie, je metabarcoding v rámci konceptu biomonitoringu 2.0 (Pawlowski et al. 2018), přestože byly publikovány práce, které uvádějí, že molekulární a morfologické analýzy společenstev a podle nich provedené analýzy ekologického stavu ekosystémů si odporují (např. Kelly et al. 2017). Proto je vhodné zachovat obě metody, případně některý z přístupů zdokonalit. Metagenomické metody by tento koncept mohly doplňovat, stejně jako se biologický monitoring často doplňuje s toxikologickým a chemickým monitoringem, ani jedna metoda plně nenahrazuje druhou.

Seznam použité literatury

- Akamagwuna FC, Odume ON (2020) Ephemeroptera, Plecoptera and Trichoptera (EPT) functional feeding group responses to fine grain sediment stress in a river in the Eastern Cape, South Africa. *Environmental Monitoring and Assessment* 192:214. <https://doi.org/10.1007/s10661-020-8187-4>
- Alba-Tercedor J, Sánchez-Ortega A (1988) Um método rápido y simplex para evaluar la calidad de las aguas corrientes basado. *Limnetica* 4:51–56
- Apothéloz-Perret-Gentil L, Bouchez A, Cordier T, et al (2021) Monitoring the ecological status of rivers with diatom eDNA metabarcoding: A comparison of taxonomic markers and analytical approaches for the inference of a molecular diatom index. *Molecular Ecology* 30:2959–2968. <https://doi.org/10.1111/mec.15646>
- Apothéloz-Perret-Gentil L, Cordonier A, Straub F, et al (2017) Taxonomy-free molecular diatom index for high-throughput eDNA biomonitoring. *Molecular Ecology Resources* 17:1231–1242. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12668>
- Bahls L, Teply M, Sada de Suplee R, Suplee MW (2008) Diatom biocriteria development and water quality assessment in Montana: A brief history and status report. *Diatom Research* 23:533–540. <https://doi.org/10.1080/0269249X.2008.9705775>
- Baird DJ, Hajibabaei M (2012) Biomonitoring 2.0: a new paradigm in ecosystem assessment made possible by next-generation DNA sequencing. *Molecular Ecology* 21:2039–2044. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2012.05519.x>
- Beck MW, Hatch LK (2009) A review of research on the development of lake indices of biotic integrity. *Environmental Reviews* 17:21–44. <https://doi.org/10.1139/A09-001>
- Bellinger EG, Sigeo DC (2010a) Freshwater algae. In: Bellinger EG, Sigeo DC (eds) *Freshwater algae: Identification, enumeration and use as bioindicators*, 2nd edn. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK, p 41
- Bellinger EG, Sigeo DC (2010b) Freshwater Algae. In: Bellinger EG, Sigeo DC (eds) *Freshwater algae: Identification, enumeration and use as bioindicators*, 2nd edn. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK, pp 101–109
- Bergtrom G, Laufer H, Rogers R (1976) Fat body: a site of hemoglobin synthesis in *Chironomus thummi* (Diptera). *Journal of Cell Biology* 69:264–274. <https://doi.org/10.1083/jcb.69.2.264>
- Birk S, Bonne W, Borja A, et al (2012) Three hundred ways to assess Europe's surface waters: An almost complete overview of biological methods to implement the Water framework directive. *Ecological Indicators* 18:31–41. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2011.10.009>

- Blaxter ML (2004) The promise of a DNA taxonomy. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B: Biological Sciences* 359:669–679. <https://doi.org/10.1098/rstb.2003.1447>
- Bonada N, Prat N, Resh VH, Statzner B (2006) Developments in aquatic insect biomonitoring: A comparative analysis of recent approaches. *Annual Review of Entomology* 51:495–523. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.51.110104.151124>
- Bondaruk J, Janson E, Wysocka M, Chałupnik S (2015) Identification of hazards for water environment in the Upper Silesian Coal Basin caused by the discharge of salt mine water containing particularly harmful substances and radionuclides. *Journal of Sustainable Mining* 14:. <https://doi.org/10.1016/j.jsm.2016.01.001>
- Bryce SA, Omernik JM, Larsen DP (1999) Environmental review: Ecoregions: A geographic framework to guide risk characterization and ecosystem management. *Environmental Practice* 1:141–155. <https://doi.org/10.1017/S146604660000582>
- CEMAGREF (1987) Etude des methods biologique quantitatives d’appréciation de la qualite des eaux. In: Coste M (ed) Rapport Division Qualite des Eaux Lyon. Agence de l’Eau Rhone, p 28
- Chalar G, Arocena R, Pacheco JP, Fabián D (2011) Trophic assessment of streams in Uruguay: A trophic state index for benthic invertebrates (TSI-BI). *Ecological Indicators* 11:362–369. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2010.06.004>
- Chen X, Zhou W, Pickett STA, et al (2016) Diatoms are better indicators of urban stream conditions: A case study in Beijing, China. *Ecological Indicators* 60:265–274. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2015.06.039>
- Clare EL, Chain FJJ, Littlefair JE, Cristescu ME (2016) The effects of parameter choice on defining molecular operational taxonomic units and resulting ecological analyses of metabarcoding data. *Genome* 59:981–990. <https://doi.org/10.1139/gen-2015-0184>
- CMEA (Council for Mutual Economic Assistance) (1969) Symposium on questions of saprobity. CMEA, Moscow
- Cohn F (1853) Über lebende Organismen im Trinkwasser. *Zeitschrift klin Med* 4:229–237
- Dalzochio T, Gehlen G (2016) Confounding factors in biomonitoring using fish. *Ecotoxicology and Environmental Contamination* 11:53–61. <https://doi.org/10.5132/eec.2016.01.08>
- Dixit SS, Smol JP, Kingston JC, Charles DF (1992) Diatoms: powerful indicators of environmental change. *Environmental Science & Technology* 26:22–33. <https://doi.org/10.1021/es00025a002>
- Dokulil MT (2003) Algae as ecological bio-indicators. In: Markert BA, Breure AM, Zeichmeister HG (eds) Trace metals and other contaminants in the environment. Elsevier, pp 285–327
- Dowling VA, Sheehan D (2006) Proteomics as a route to identification of toxicity targets in environmental toxicology. *Proteomics* 6:5597–5604. <https://doi.org/10.1002/pmic.200600274>
- Dudgeon D, Arthington AH, Gessner MO, et al (2006) Freshwater biodiversity: importance, threats, status and conservation challenges. *Biological Reviews* 81:163. <https://doi.org/10.1017/S1464793105006950>
- Dyer SD, Brooks GL, Dickson KL, et al (1993) Synthesis and accumulation of stress proteins in tissues of arsenite-exposed fathead minnows (*Pimephales promelas*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 12:913–924. <https://doi.org/10.1002/etc.5620120516>
- Egge JK (1998) Are diatoms poor competitors at low phosphate concentrations? *Journal of Marine Systems* 16:191–198. [https://doi.org/10.1016/S0924-7963\(97\)00113-9](https://doi.org/10.1016/S0924-7963(97)00113-9)
- European Union (2000) Directive 2000/60/EC of the European Parliament and of the Council of 23 October 2000 establishing a framework for community action in the field of water policy

- Evans KM, Wortley AH, Mann DG (2007) An assessment of potential diatom “barcode” genes (*cox1*, *rbcL*, 18S and ITS rDNA) and their effectiveness in determining relationships in *Sellaphora* (Bacillariophyta). *Protist* 158:349–364. <https://doi.org/10.1016/j.protis.2007.04.001>
- Fenoglio S, de Figueroa JMT, Doretto A, et al (2020) Aquatic insects and benthic diatoms: A history of biotic relationships in freshwater ecosystems. *Water (Switzerland)* 12:1–14. <https://doi.org/10.3390/w12102934>
- Ge Y, Wang D-Z, Chiu J-F, et al (2013) Environmental OMICS: Current status and future directions. *Journal of Integrated OMICS* 3:1–14. <https://doi.org/10.5584/jiomics.v3i2.141>
- Gonçalves S, Almeida SFP, Figueira E, Kahlert M (2019) Valve teratologies and Chl *c* in the freshwater diatom *Tabellaria flocculosa* as biomarkers for metal contamination. *Ecological Indicators* 101:476–485. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2019.01.032>
- Guo L, Sui Z, Zhang S, et al (2015) Comparison of potential diatom ‘barcode’ genes (the 18S rRNA gene and ITS, COI, *rbcL*) and their effectiveness in discriminating and determining species taxonomy in the Bacillariophyta. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 65:1369–1380. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.000076>
- Hamsher SE, Evans KM, Mann DG, et al (2011) Barcoding diatoms: exploring alternatives to COI-5P. *Protist* 162:405–422. <https://doi.org/10.1016/j.protis.2010.09.005>
- Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, deWaard JR (2003) Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London Series B: Biological Sciences* 270:313–321. <https://doi.org/10.1098/rspb.2002.2218>
- Hering D, Johnson RK, Kramm S, et al (2006) Assessment of European streams with diatoms, macrophytes, macroinvertebrates and fish: a comparative metric-based analysis of organism response to stress. *Freshwater Biology* 51:1757–1785. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2427.2006.01610.x>
- Holt EA, Miller SW (2010) Bioindicators: Using organisms to measure environmental impacts. *Nature Education Knowledge* 2:1–10
- Illyová M, Hindák F, Hindáková A, et al (2013) Seasonal succession of the plankton and microbenthos in a hypertrophic shallow water reservoir at Modra (W Slovakia). *Journal of Environmental Protection* 04:36–44. <https://doi.org/10.4236/jep.2013.411A005>
- James FC, McCulloch CE (1990) Multivariate analysis in ecology and systematics: Panacea or Pandora’s box? *Annual Review of Ecology and Systematics* 21:129–166. <https://doi.org/10.1146/annurev.es.21.110190.001021>
- Karr JR (1991) Biological integrity: a long-neglected aspect of water resource management. *Ecological Applications* 1:66–84. <https://doi.org/10.2307/1941848>
- Karr JR (2006) Seven foundations of biological monitoring and assessment. *Biologia Ambientale* 20:7–18
- Karr JR, Dudley DR (1981) Ecological perspective on water quality goals. *Environmental Management* 5:55–68. <https://doi.org/10.1007/BF01866609>
- Keck F, Rimet F, Franc A, Bouchez A (2016) Phylogenetic signal in diatom ecology: perspectives for aquatic ecosystems biomonitoring. *Ecological Applications* 26:861–872. <https://doi.org/10.1890/14-1966>
- Keiser DA, Shapiro JS (2019) US water pollution regulation over the past half century: burning waters to crystal springs? *The Journal of Economic Perspectives* 33:51–75
- Kelly MG, Adams C, Graves C (2001) *The trophic diatom index: a user’s manual; revised edition*
- Kelly MG, Whitton BA (1995) The trophic diatom index: a new index for monitoring eutrophication in rivers. *Journal of Applied Phycology* 7:433–444. <https://doi.org/10.1007/BF00003802>

- Kelly RP, Closek CJ, O'Donnell JL, et al (2017) Genetic and manual survey methods yield different and complementary views of an ecosystem. *Front Mar Sci* 3: <https://doi.org/10.3389/fmars.2016.00283>
- Kermarrec L, Franc A, Rimet F, et al (2014) A next-generation sequencing approach to river biomonitoring using benthic diatoms. *Freshwater Science* 33:349–363. <https://doi.org/10.1086/675079>
- Kolkwitz R, Marsson M (1902) Grundsätze für die biologische Beurteilung des Wassers nach seiner Flora und Fauna. *Abwässerbeseitigung* 1:33–72
- Kolkwitz R, Marsson M (1908) Ökologie der pflanzliche Saprobien. *Berichte der Deutsche Botanische Gesellschaften* 26:505–519
- Kolkwitz R, Marsson M (1909) Ökologie der tierischen Saprobien. *Beiträge zur Lehre von der biologischen Gewässerbeurteilung. Internationale Revue der gesamten Hydrobiologie und Hydrographie* 2:126–152. <https://doi.org/10.1002/iroh.19090020108>
- Lange-Bertalot H (1979) Pollution tolerance of diatoms as a criterion for water quality estimation. *Nova Hedwigia* 64:285–304
- Lee RE (2018) Heterokontophyta, Bacillariophyceae. In: Lee ER (ed) *Phycology*, 5th edn. Cambridge University Press, New York, p 355
- Lee S-M, Lee S-B, Park C-H, Choi J (2006) Expression of heat shock protein and hemoglobin genes in *Chironomus tentans* (Diptera, Chironomidae) larvae exposed to various environmental pollutants: A potential biomarker of freshwater monitoring. *Chemosphere* 65:1074–1081. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.02.042>
- Lemos MFL, Soares AMVM, Correia AC, Esteves AC (2010) Proteins in ecotoxicology - How, why and why not? *Proteomics* 10:873–887. <https://doi.org/10.1002/pmic.200900470>
- Levitan O, Dinamarca J, Hochman G, Falkowski PG (2014) Diatoms: a fossil fuel of the future. *Trends in Biotechnology* 32:117–124. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2014.01.004>
- López-Pedrouso M, Varela Z, Franco D, et al (2020) Can proteomics contribute to biomonitoring of aquatic pollution? A critical review. *Environmental Pollution* 267:115473. <https://doi.org/10.1016/J.ENVPOL.2020.115473>
- Lowe RR (1974) Environmental requirements and pollution tolerance of freshwater diatoms. In: Lowe RR (ed) 5th edn. National Environmental Research Center, Office of Research and Development, U.S. Environmental Protection Agency, Cincinnati, Ohio, pp 3–3
- Lunde KB, Resh VH (2012) Development and validation of a macroinvertebrate index of biotic integrity (IBI) for assessing urban impacts to Northern California freshwater wetlands. *Environmental Monitoring and Assessment* 184:3653–3674. <https://doi.org/10.1007/s10661-011-2214-4>
- Mächler E, Walser J, Altermatt F (2021) Decision-making and best practices for taxonomy-free environmental DNA metabarcoding in biomonitoring using Hill numbers. *Molecular Ecology* 30:3326–3339. <https://doi.org/10.1111/mec.15725>
- Marcel R, Berthon V, Castets V, et al (2017) Modelling diatom life forms and ecological guilds for river biomonitoring. *Knowledge & Management of Aquatic Ecosystems* 1. <https://doi.org/10.1051/kmae/2016033>
- Marvan P, Sládečková A (1978) Akost vody. In: Marvan P, Sládečková A (eds) *Sladkovodné riasy*, 1st edn. Slovenské pedagogické nakladateľstvo, Bratislava, pp 105–110
- Mayer MP, Bukau B (2005) Hsp70 chaperones: Cellular functions and molecular mechanism. *Cellular and Molecular Life Sciences* 62:670–684. <https://doi.org/10.1007/s00018-004-4464-6>
- McLean TI (2013) “Eco-omics”: A review of the application of genomics, transcriptomics, and proteomics for the study of the ecology of harmful algae. *Microbial Ecology* 65:901–915. <https://doi.org/10.1007/s00248-013-0220-5>

- Menezes S, Baird DJ, Soares AMVM (2010) Beyond taxonomy: A review of macroinvertebrate trait-based community descriptors as tools for freshwater biomonitoring. *Journal of Applied Ecology* 47:711–719
- Naddeo V, Zarra T, Belgiorno V (2005) European procedures to river quality assessment. Salerno. Department of civil engineering
- Patrick R (1973) Use of algae, especially diatoms, in the assessment of water quality. In: *Biological methods for the assessment of water quality*, 1st edn. American Society for Testing and Materials, pp 76–95
- Pawlowski J, Kelly-Quinn M, Altermatt F, et al (2018) The future of biotic indices in the ecogenomic era: Integrating (e)DNA metabarcoding in biological assessment of aquatic ecosystems. *Science of The Total Environment* 637–638:1295–1310. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.05.002>
- Pomfret SM, Brua RB, Izral NM, Yates AG (2019) Metabolomics for biomonitoring: an evaluation of the metabolome as an indicator of aquatic ecosystem health. *Environmental Reviews* 1–10. <https://doi.org/10.1139/er-2019-0003>
- Rawer-Jost C, Böhmer J, Blank J, Rahmann H (2000) Macroinvertebrate functional feeding group methods in ecological assessment. *Hydrobiologia* 422:225–232. <https://doi.org/10.1023/A:1017078401734>
- Resh VH (2008) Which group is best? Attributes of different biological assemblages used in freshwater biomonitoring programs. *Environmental Monitoring and Assessment* 138:131–138. <https://doi.org/10.1007/s10661-007-9749-4>
- Rimet F, Gusev E, Kahlert M, et al (2019) Diat.barcode, an open-access curated barcode library for diatoms. *Scientific Reports* 9:15116. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-51500-6>
- Rott E, Pipp E, Pfister P (2003) Diatom methods developed for river quality assessment in Austria and a cross-check against numerical trophic indication methods used in Europe. *Algological Studies/Archiv für Hydrobiologie, Supplement Volumes* 110:91–115. <https://doi.org/10.1127/1864-1318/2003/0110-0091>
- Růžičková J, Benešová L (1996) Benthic macroinvertebrates as indicators of biological integrity in lotic freshwater ecosystems of large-scale protected areas in the Czech Republic: preliminary results. *Silva Gabreta* 1:165–168
- Sagova-Mareckova M, Boenigk J, Bouchez A, et al (2021) Expanding ecological assessment by integrating microorganisms into routine freshwater biomonitoring. *Water Research* 191:116767. <https://doi.org/10.1016/J.WATRES.2020.116767>
- Sandin L, Hering D (2004) Comparing macroinvertebrate indices to detect organic pollution across Europe: a contribution to the EC Water Framework Directive intercalibration. *Hydrobiologia* 516:55–68. <https://doi.org/10.1023/B:HYDR.0000025258.63416.11>
- Santos H de A e, Cunha SF, Silva ITC e, et al (2014) Stream sedimentological analyses based on the use of rapid evaluation protocols. In: Callisto M, Hughes RM, de Magalhães Lopes J, de Castro MA (eds) *Ecological Conditions in Hydropower Basins*. CEMIG
- Serrana JM, Miyake Y, Gamboa M, Watanabe K (2019) Comparison of DNA metabarcoding and morphological identification for stream macroinvertebrate biodiversity assessment and monitoring. *Ecological Indicators* 101:963–972. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2019.02.008>
- Servant-Vildary S, Roux M (1990) Multivariate analysis of diatoms and water chemistry in Bolivian saline lakes. In: Comín FA, Northcote TG (eds) *Saline Lakes*. Springer Netherlands, Dordrecht, p 267
- Siddig AAH, Ellison AM, Ochs A, et al (2016) How do ecologists select and use indicator species to monitor ecological change? Insights from 14 years of publication in *Ecological Indicators*. *Ecological Indicators* 60:223–230. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2015.06.036>

- Sládeček V (1986) Diatoms as indicators of organic pollution. *Acta Hydrochimica et Hydrobiologica* 14:555–566. <https://doi.org/10.1002/aheh.19860140519>
- Soininen J, Paavola R, Muotka T (2004) Benthic diatom communities in boreal streams: community structure in relation to environmental and spatial gradients. *Ecography* 27:330–342. <https://doi.org/10.1111/j.0906-7590.2004.03749.x>
- Sonneman JA, Walsh CJ, Breen PF, Sharpe AK (2001) Effects of urbanization on streams of the Melbourne region, Victoria, Australia. II. Benthic diatom communities. *Freshwater Biology* 46:553–565. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2427.2001.00689.x>
- Stevenson RJ (1997) Scale-dependent determinants and consequences of benthic algal heterogeneity. *J North Am Benthol Soc* 16:248–262. <https://doi.org/10.2307/1468255>
- Stevenson RJ, Bahls LL (1999) Periphyton protocols. In: Barbour MT, Gerritsen J, Snyder BD, Stribling JB (eds) *Rapid bioassessment protocols for use in streams and wadeable rivers: periphyton, benthic macroinvertebrates and fish*, 2nd edn. U.S. Environmental Protection Agency; Office of Water, Washington, D. C, pp 1–23
- Stevenson RJ, Pan Y, van Dam H (2010) Assessing environmental conditions in rivers and streams with diatoms. In: Smol JP, Stoermer EF (eds) *The diatoms applications for the environmental and earth sciences*, 2nd edn. Cambridge, New York, p 59
- Stevenson RJ, Pangdong Y (2004) *The diatoms: Applications for the environmental and earth sciences*, 1st edn. Cambridge University Press, New York
- Stoermer EF, Smol JP (2004) *The diatoms: Applications for the environmental and earth sciences*, 1st edn. Cambridge University Press, New York
- Stone JR, Westover KS, Cohen AS (2011) Late Pleistocene paleohydrography and diatom paleoecology of the central basin of Lake Malawi, Africa. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 303:51–70. <https://doi.org/10.1016/j.palaeo.2010.01.012>
- Summers G (2006) Unlikely environmentalists: Congress and clean water, 1945–1972. *History: Reviews of New Books* 35:26–27. <https://doi.org/10.1080/03612759.2006.10526987>
- Tagliapietra D, Sigovini M, Magni P (2012) Saprobity: a unified view of benthic succession models for coastal lagoons. *Hydrobiologia* 686:15–28. <https://doi.org/10.1007/s10750-012-1001-8>
- Vannote RL, Minshall GW, Cummins KW, et al (1980) The river continuum concept. *Canadian journal of fisheries and aquatic sciences* 37:130–137. <https://doi.org/10.1139/f80-017>
- Verma K (2013) Role of diatoms in the world of forensic science. *Journal of Forensic Research* 04: <https://doi.org/10.4172/2157-7145.1000181>
- Wallace JB, Webster JR (1996) The role of macroinvertebrates in stream ecosystem function. *Annual Review of Entomology* 41:115–139. <https://doi.org/10.1146/annurev.en.41.010196.000555>
- Walsh CJ, Sharpe AK, Breen PF, Sonneman JA (2001) Effects of urbanization on streams of the Melbourne region, Victoria, Australia. I. Benthic macroinvertebrate communities. *Freshwater Biology* 46:535–551. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2427.2001.00690.x>
- Wilhm JL, Dorris TC (1968) Biological parameters for water quality criteria. *BioScience* 18:477–481. <https://doi.org/10.2307/1294272>
- Wooley JC, Godzik A, Friedberg I (2010) A primer on metagenomics. *PLoS Computational Biology* 6:e1000667. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1000667>
- Yang J, Wang F, Lv J, et al (2019) Responses of freshwater algal cell density to hydrochemical variables in an urban aquatic ecosystem, northern China. *Environmental Monitoring and Assessment* 191: <https://doi.org/10.1007/s10661-018-7177-2>

- Yao H, Song J, Liu C, et al (2010) Use of ITS2 region as the universal DNA barcode for plants and animals. *PLoS ONE* 5:e13102. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0013102>
- Yu DW, Ji Y, Emerson BC, et al (2012) Biodiversity soup: metabarcoding of arthropods for rapid biodiversity assessment and biomonitoring. *Methods in Ecology and Evolution* 3:613–623. <https://doi.org/10.1111/j.2041-210X.2012.00198.x>
- Zhou X, Adamowicz SJ, Jacobus LM, et al (2009) Towards a comprehensive barcode library for arctic life - Ephemeroptera, Plecoptera, and Trichoptera of Churchill, Manitoba, Canada. *Frontiers in Zoology* 6:30. <https://doi.org/10.1186/1742-9994-6-30>
- Zimmermann J, Glöckner G, Jahn R, et al (2015) Metabarcoding vs. morphological identification to assess diatom diversity in environmental studies. *Molecular Ecology Resources* 15:526–542. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12336>
- Zizka VMA, Geiger MF, Leese F (2020) DNA metabarcoding of stream invertebrates reveals spatio-temporal variation but consistent status class assessments in a natural and urban river. *Ecological Indicators* 115:. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2020.106383>