

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

Studijní program: Biologie (B0511A030007)

Studijní obor: Obecná biologie B-BI (0511RA030007)



Kristýna Žáková

**Rozsivky ve forenzní vědě: výzkum nezaměřený na případy  
utonutí**

*Diatoms in forensic science: non-drowning research*

Bakalářská práce

Vedoucí práce: doc. Mgr. Jana Kulichová, Ph.D.

Praha, 2025

## **Prohlášení**

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

V Praze dne 29. dubna 2025

Kristýna Žáková

## Poděkování

Na tomto místě bych chtěla upřímně a ze srdce poděkovat své vedoucí práce, paní doc. Mgr. Janě Kulichové, Ph.D., za skvělé vedení, cenné rady, zpětnou vazbu a trpělivost, kterou se mnou měla během celé doby psaní. Velmi si vážím její podpory, ochoty mě nasměrovat správným směrem i v náročnějších životních chvílích a také jí děkuji za možnost věnovat se tématu, které je mou vášní a díky němuž jsem si mohla splnit svůj dlouholetý sen pracovat s forenzními vědami.

Mé poděkování patří také všem blízkým, kteří mi byli oporou a povzbuzovali mě, když jsem to nejvíce potřebovala. Ze srdce děkuji Báře, Julče a Niky za neutuchající motivaci a víru ve mně a Járovi za pomoc s *body doublingem*, díky kterému pro mě bylo psaní bakalářské práce splnitelnější a organizovanější.

Bez vás všech by tato práce nikdy nevznikla.

Děkuji!

## **Abstrakt**

Tato bakalářská práce se zaměřuje na využití rozsivek (*Bacillariophyta*) ve forenzní vědě, zejména mimo klasické případy utonutí (*diatom test*). Představuje principy forenzní botaniky a limnologie, metody extrakce rozsivek z různých typů materiálů (oděv, obuv, půda) a shrnuje jejich význam jako environmentálních stop v kriminalistickém vyšetřování. Rozsivky díky své ekologické specifitě, vysoké odolnosti a schopnosti přilnout k povrchům umožňují propojení osob či objektů s konkrétním vodním či suchozemským prostředím. Práce dále diskutuje experimentální studie zaměřené na perzistenci rozsivek na různých substrátech a představuje případové studie, které ilustrují jejich praktickou využitelnost při lokalizaci místa činu, rekonstrukci událostí a ověřování výpovědí. V závěru jsou shrnuty výhody, limity a potenciální směry dalšího rozvoje forenzní aplikace rozsivek.

**Klíčová slova:** forenzní botanika, forenzní limnologie, rozsivky, biomonitoring, environmentální stopy

## **Abstract**

This bachelor's thesis focuses on the use of diatoms (*Bacillariophyta*) in forensic science, particularly in applications beyond traditional drowning cases (*diatom test*). It introduces the principles of forensic botany and limnology, methods for diatom extraction from various types of materials (clothing, footwear, soil), and summarizes their significance as environmental traces in criminal investigations. Thanks to their ecological specificity, high durability, and ability to adhere to surfaces, diatoms enable the linking of individuals or objects to specific aquatic or terrestrial environments. This thesis further discusses experimental studies on the persistence of diatoms on different substrates and presents case studies illustrating their practical application in crime scene localization, crime reconstruction, and verifications of testimonies. In conclusion, the advantages, limitations, and potential directions for further development of forensic diatom applications are summarized.

**Keywords:** forensic botany, forensic limnology, diatoms, biomonitoring, environmental traces

# Obsah

<b>SEZNAM ZKRATEK .....</b>	<b>7</b>
<b>1 ÚVOD .....</b>	<b>9</b>
<b>2 FOREZNÍ BOTANIKA .....</b>	<b>11</b>
2.1 PŘÍPADOVÉ STUDIE .....	12
<b>3 FOREZNÍ LIMNOLOGIE .....</b>	<b>14</b>
3.1 BIOMONITORING .....	14
3.2 EPINEKROTICKÉ BIOFILMY .....	16
3.2 DIATOM TEST .....	17
3.2.1 L/D poměr rozsivek .....	19
<b>4 METODY EXTRAKCE ROZSIVEK .....</b>	<b>20</b>
4.1 CHEMICKÁ OXIDACE .....	20
4.1.1 HNO <sub>3</sub> -PCF nová metoda .....	21
4.2 ENZYMATICKÝ ROZKLAD .....	21
4.3 TEPELNÉ ZPRACOVÁNÍ (VYPALOVÁNÍ – ASHING) .....	22
4.4 MECHANICKÉ A FYZIKÁLNÍ METODY SEPARACE .....	22
4.4.1 Vakuová filtrace a membránová filtrace .....	22
4.4.2 Gradientová centrifugace .....	23
4.4.3 Mikrovlnný rozklad a kombinované přístupy .....	23
4.4.4 Mechanické oplachování (jet rinsing) a vodní lázeň .....	23
4.4.5 RECF metoda (Rinsing–Ethanol–Centrifugation–Filtration) .....	24
4.5 EXTRAKCE ROZSIVEK Z ODĚVU, OBUVI A PŮDY .....	25
4.5.1 Oděv .....	25
4.5.2 Obuv .....	25
4.5.3 Půda .....	25
<b>5 EXPERIMENTÁLNÍ APLIKACE ROZSIVEK VE FOREZNÍ PRAXI.....</b>	<b>26</b>
5.1 ROZSIVKY JAKO ENVIRONMENTÁLNÍ STOPY .....	26
5.2 CHARAKTERIZACE PROSTŘEDÍ A DATABÁZE ROZSIVEK .....	28
<b>6 ROZSIVKY JAKO FOREZNÍ STOPY .....</b>	<b>30</b>
6.1 URČENÍ DOBY PONOŘENÍ .....	30
6.2 ODHALENÍ PŘESUNU TĚLA .....	31
6.3 ROZSIVKY NA ODĚVU .....	31
6.4 PROPOJENÍ PODEZŘELÉHO S MÍSTEM ČINU .....	31
6.5 ROZSIVKY V PŮDĚ .....	31
6.6 REKONSTRUKCE MÍSTA UTONUTÍ .....	32
6.7 ROZSIVKY NA DOPRAVNÍM PROSTŘEDKU .....	32
<b>7 ZÁVĚR .....</b>	<b>33</b>
<b>8 SEZNAM LITERATURY .....</b>	<b>34</b>

# Seznam zkratek

<b>Zkratka</b>	<b>Význam</b>
<b>SEM</b>	Scanning Electron Microscopy (Skenovací elektronová mikroskopie)
<b>PMSI</b>	Postmortem Submersion Interval (Postmortální interval ponoření)
<b>L/D ratio</b>	Lung/Water Diatom Ratio (Poměr rozsivek v plicní tkáni a vodním vzorku)
<b>RECF</b>	Rinsing–Ethanol–Centrifugation–Filtration (Metoda oplachu, ethanolu, centrifugace a filtrace)
<b>WFD</b>	Water Framework Directive (Rámcová směrnice o vodách Evropské unie)
<b>eDNA</b>	Environmental DNA (Environmentální DNA)
<b>SHERPA</b>	SHapE Recognition, Processing and Analysis (Software pro analýzu tvaru rozsivek)
<b>SWGBot</b>	Scientific Working Group on Botany (vědecká pracovní skupina pro forezní botaniku)
<b>SWGDM</b>	Scientific Working Group on DNA Analysis Methods (vědecká pracovní skupina pro molekulární forezní analýzu)
<b>ENFSI</b>	European Network of Forensic Science Institutes (Evropská síť forezních vědeckých institutů)
<b>DNA</b>	Deoxyribonucleic Acid (Deoxyribonukleová kyselina – nositelka genetické informace)
<b>SOPs</b>	Standard Operating Procedures (Standardní operační postupy)
<b>PVC</b>	Polyvinylchlorid (druh syntetického plastu, např. používaného u obuvi)
<b>NGS</b>	Next-Generation Sequencing (Sekvenování nové generace – moderní metoda rychlého čtení sekvence DNA)
<b>18S rRNA</b>	18S ribosomal RNA (Malá ribozomální podjednotková RNA – genetický marker využívaný při určování druhů)
<b>rbcl</b>	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit gene (Gen pro velkou podjednotku Rubisca – další genetický marker pro druhovou identifikaci rostlin a řas)
<b>EPM</b>	Extracellular Polymeric Matrix (Extracelulární polymerní matrice – slizovitá hmota tvořící biofilmy)

**Zkratka Význam**

**SiO<sub>2</sub>·nH<sub>2</sub>O** Hydratovaný oxid křemičitý (chemické složení schránek rozsivek)

**HNO<sub>3</sub>** Dusičná kyselina (silná anorganická kyselina využívaná při chemickém rozkladu vzorků)

**HCl** Chlorovodíková kyselina (běžná laboratorní kyselina používaná pro odstranění minerálních příměsí)

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** Peroxid vodíku (oxidační činidlo využívané pro šetrný rozklad organické hmoty)

**USA** United States of America (Spojené státy americké)

**PCR** Polymerázová řetězová reakce (technika sloužící k amplifikaci DNA)

**HNO<sub>3</sub>-PCF** metoda extrakce rozsivek založená na trávení kyselinou dusičnou, vakuové filtraci a rozpouštění polykarbonátového filtru (PCF – polycarbonatefiltering)

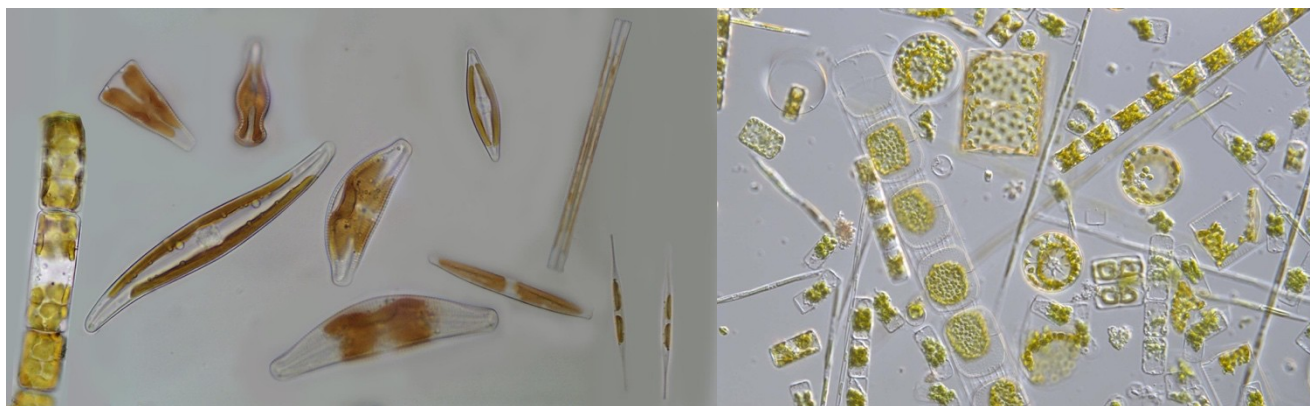
**CHCl<sub>3</sub>** Chloroform

# 1 Úvod

*Forenzní věda* představuje interdisciplinární obor zaměřený na aplikaci vědeckých metod při vyšetřování trestných činů (Saferstein 2011). Jednou z disciplín forenzní vědy je forenzní botanika, která využívá poznatky z biologie k analýze materiálu nalezeného na místě činu (Hall, Byrd 2012). Pojem *forenzní botanika* je poměrně široký, neboť zkoumaný biologický materiál může být různého rostlinného původu – od pylových zrn (palynologie), přes mechorosty (bryologie), lišejníky (lichenologie) a houby (mykologie), až po analýzu letokruhů stromů (dendrochronologie) či mikroskopických řas a sinic přítomných ve vodním prostředí (algologie). Jednotlivé vědy lze využít samostatně nebo v kombinaci, podle povahy případu. Forenzní botanika může přispět k objasnění klíčových otázek vyšetřování, například odlišit vraždu od nehody a sebevraždy (Coyle 2005, Bajerlein 2015), určit přibližný čas a místo smrti, nebo propojit podezřelého s konkrétním biotopem (Boyd 2006). Specifickým odvětvím forenzní vědy je *forenzní limnologie*, která využívá vodní mikroorganismy, především řasy, sinice a nálevníky v rámci vyšetřování trestných činů. Jejich ekologická specifita a odolnost vůči biotickým i abiotickým změnám prostředí z nich činí užitečné nástroje pro forenzní analýzu. Nález těchto mikroorganismů na důkazním materiálu (např. na těle, oděvu nebo obuvi) potvrzuje kontakt s konkrétním vodním prostředím (Scott et al. 2021).

Nejpropracovanější oblastí forenzní limnologie je *forenzní diatomologie*, která se zaměřuje na analýzu rozsivek (*Bacillariophyta*) ve vzorcích z lidských tkání nebo z místa činu (Hu et al. 2013; Scott et al. 2021). Rozsivky jsou jednobuněčné řasy charakteristické dvoudílnou křemičitou buněčnou stěnou (*frustulou*). Zahrnují více než 100 000 popsanych druhů, přičemž odhady celkové diverzity přesahují až dva miliony (Mann et al. 1999; Malviya et al. 2016). Jejich *frustula* (schránka) je vysoce ornamentovaná, tvarově rozmanitá a dodává jim odolnost vůči vnějším vlivům prostředí a biologickému rozkladu. Schránky se dobře zachovávají i dlouho po smrti oběti, což zvyšuje šanci na jejich detekci v rámci forenzního vyšetřování (Hu et al. 2013). Rozsivky se hojně vyskytují ve sladkých a mořských vodách. Lze je však nalézt i v suchozemském prostředí, zejména ve vlhkých půdách a mokřadech, ale dosahují zde výrazně nižší abundance než ve vodě (Lund 1945, Zhang et al. 2020). Zatímco ve vodních ekosystémech může být identifikováno více než 30 rodů a 70 druhů rozsivek v jednom vzorku, půdní vzorky běžně obsahují jen 3–5 rodů a 7–16 druhů (Lund 1945, Zhang et al. 2020). Mořské druhy (např. *Thalassiosira*, *Chaetoceros*) dominují planktonu a sladkovodní druhy (např. *Navicula*, *Fragilaria*, *Gomphonema*) jsou běžné v bentických společenstvech, epifytonu nebo biofilmech (Round et al. 1990; Lang et al. 2016)). Rozdíly v druhovém složení (obr. 1) umožňují přesnější lokalizaci hledaného místa činu.

Tradičně se rozsivky ve forenzní vědě využívají pro určení smrti utonutím pomocí *diatom testu* (*rozsivkového testu*) (Kumar et al. 2012). V poslední době však roste zájem o využití rozsivek i mimo toto využití, lze je použít při analýze stop z oděvů, obuvi nebo dopravních prostředků. (Wanner 2018, Scott et al. 2021). Rozsivky jsou z forenzního hlediska cenné zejména proto, že tvoří ekologicky specifická společenstva, jejichž druhové složení a abundanci ovlivňuje řada faktorů, jako chemické vlastnosti vody (pH, salinita, koncentrace živin), intenzita světla, teplota, proudění vody, stupeň znečištění a charakter substrátu (Hu et al. 2013; Rimet et al. 2012). Pro příklad společenstvo z čistého potoka bude výrazně odlišné od společenstva z eutrofního rybníku. Díky těmto specifickým nárokům lze rozsivky využít jako efektivní bioindikátory prostředí (Kelly et al. 2009).



**Obr. 1 – Sladkovodní (vlevo) a mořské rozsivky (vpravo).** Zdroj: *Microscopy of Nature, Plymouth Marine Laboratory, Diatoms; Clayton, Michael W., University of Wisconsin*

Cílem této bakalářské práce je zhodnotit forenzní využití rozsivek nejen při diagnostice utonutí, ale i v širším kontextu kriminalistických aplikací. Práce se zaměřuje na shrnutí metod extrakce rozsivek z různých typů materiálů, analyzuje význam rozsivek jako environmentálních stop, diskutuje limity jejich forenzního využití a hodnotí potenciál budoucích metod včetně molekulárních a digitálních přístupů.

## 2 Forezní botanika

Forezní botanika je aplikovaná vědní disciplína, která využívá poznatky z botaniky k analýze rostlinného materiálu nalezeného na místě činu. Ačkoli bývá v kriminalistické praxi často opomíjena, může být zásadním nástrojem při rekonstrukci událostí, zejména v případech, kdy jiné důkazy chybí nebo jsou nejednoznačné (Coyle et al. 2005). Rostlinný materiál má v tomto kontextu výhodu, že je všudypřítomný a snadno přilne k oděvu, obuvi, vražedné zbrani nebo tělu, často i bez vědomí osoby (Coyle et al. 2005, Kasprzyk 2023) Tento *pasivní přenos* z něj činí cenný, přesto nenápadný důkazní materiál. Rostlinné stopy (obr. 2.) lze rozdělit na makroskopické, zahrnující celé rostliny nebo jejich větší části (větve, listy, semena či plody), a mikroskopické, mezi něž patří pylová zrna (palynomorfy), fragmenty rostlinných pletiv, nebo rozsivky (Kasprzyk 2023).



**Obr. 2. Rostlinné materiály (větve, listy, spory, pyl, pletiva, kůra a kmeny stromů, aj.) využívané ve forezní botanice (Kasprzyk 2023)**

Díky specifické morfologii lze rostlinné materiály často určit až na druhovou úroveň. To umožňuje využít ekologické informace o těchto druzích (např. areál rozšíření) k rekonstrukci pohybu podezřelé osoby či oběti, k propojení podezřelého s místem činu, nebo k určení způsobu a času smrti (Aquila et al. 2014). Při forenzním vyšetřování se často kombinují klasické metody analýzy (toxikologické testy, izotopová analýza nebo spektroskopie) s moderními molekulárními přístupy, jako je DNA analýza (Kasprzyk 2023), která je obzvláště užitečná pro vzorky s degradovanými nebo fragmentovanými schránkami (Ferri et al. 2009). Kombinací moderních a tradičních přístupů se výrazně zvyšuje přesnost a spolehlivost identifikace důkazního materiálu (Kasprzyk 2023).

Pro správné využití botanických důkazů v soudní praxi je klíčová pečlivá dokumentace místa činu, správný odběr a uchování vzorků, jejich následná morfologická nebo molekulární analýza, a úzká spolupráce mezi kriminalisty a botaniky (Aquila et al. 2014). Zároveň je nutné dodržovat forenzní standardy a metodická doporučení, například směrnice SWGDAM a ENFSI, které zdůrazňují důležitost validace metod, kontrolu kvality a správné vedení dokumentace. Tyto principy byly původně vyvinuté pro genetické analýzy, ale dají se plně aplikovat i na forenzní botaniku (ENFSI 2015).

V oblasti forenzní botaniky zatím neexistují jednotné globální standardy, proto odborníci doporučují dodržovat protokoly podobné těm používaným v molekulární biologii a ekologii (například správné značení vzorků, pečlivou kontrolu jeho stavu a možné kontaminace, vhodné je i využívání referenčních databází rostlinných druhů)(Ferri et al. 2009; Coyle et al. 2005). V rámci některých evropských zemí, například Velké Británie, se forenzní botanická analýza řídí interními standardními operačními postupy (SOPs) v rámci akreditovaných laboratoří (Hall, Byrd 2012).

Obecně platí, že pro minimalizaci rizika kontaminace je nutné používat sterilní nástroje, ochranné pomůcky, vzorky odděleně skladovat a správně je označovat (ENFSI 2020; SWGMAT 2000). Kvalitní forenzní praxe by se měla řídit také mezinárodními standardy ISO/IEC 17025, které stanovují požadavky pro forenzní laboratoře, včetně validace používaných metod, kalibrace přístrojů a zajištění sledovatelnosti pracovních postupů (ISO/IEC 2017). Dodržování těchto zásad je klíčové k tomu, aby výsledky botanických analýz byly v soudním řízení akceptovány jako spolehlivé, relevantní a vědecky podložené důkazy.

## 2.1 Případové studie

První systematické využití rostlinného materiálu v kriminalistice se objevilo na počátku 20. století. Průlomovým případem byl případ Bruna Hauptmanna z roku 1935, kde soudní botanik prokázal shodu mezi dřevem žebříku použitým při únosu dítěte a podlahou domu podezřelého (Lane et al. 1990). Tento případ ukázal, že i běžné rostlinné materiály mohou mít zásadní důkazní hodnotu.

Od té doby se forenzní botanika rozvíjela souběžně s dalšími specializovanými obory, jako je palynologie a dendrochronologie, a dnes využívá i moderní molekulární metody, například analýzu DNA a digitální databáze pro určování druhů (Ferri et al. 2009).

Botanické důkazy byly úspěšně využity v celé řadě případů. Jedním z nich je nález oběšeného muže v lese. Při ohledání těla byly na vnitřní straně zápěstí nalezeny stopy mechu, které odpovídaly mechu rostoucímu na větvi, na níž byla uvázána smyčka provazu. Přítomnost mechu na kůži naznačovala, že si provaz uvázal sám a při tom se otřel o větev, čímž se mech přenesl. Tento detail pomohl potvrdit, že šlo o sebevraždu, nikoliv o vraždu naaranžovanou jako sebevraždu (Coyle et al. 2005)\*. Další případ, známý jako případ Hoepplinger, se týkal násilné vraždy ženy. Manžel oběti tvrdil, že ji doma našel mrtvou. Po ohledání pozemku byla v jezírku za domem nalezena vražedná zbraň. Na oblečení manžela byl identifikován vodní rostlinný materiál, označovaný jako řasy, který odpovídal těm přítomným v jezírku. Botanické stopy tak propojily pachatele, zbraň i místo činu a pomohly usvědčit pachatele z vraždy (Coyle et al. 2005)\*. V jiném případě z Velké Británie sehrál klíčovou roli při vyšetřování vraždy specifický druh endemitého plevele. Jeho fragmenty byly nalezeny na podrážce boty podezřelého. Botanický expert navíc určil, že rostlinný materiál je čerstvý, což naznačovalo nedávný kontakt s místem činu. Tato důkazní stopa výrazně přispěla k usvědčení pachatele (Hall, Byrd 2012).

## 3 Forezní limnologie

V návaznosti na forezní botaniku, která využívá rostlinný materiál při vyšetřování trestných činů, se forezní limnologie specializuje na analýzu stop biologického původu pocházejících z vodního prostředí. Limnologie je obor ekologie, který se zabývá studiem fyzikálních, chemických a biologických vlastností vnitrozemských vodních ekosystémů, jako jsou jezera, řeky a mokřady. Zkoumá vztahy mezi organismy a jejich prostředím v rámci vodních systémů (Wetzel 2001).

Forezní limnologie zahrnuje několik přístupů, jejichž volba závisí na typu biologického materiálu a otázce, kterou je potřeba ve vyšetřování zodpovědět. Pokud je cílem určit místo ponoření nebo transport těla, využívá se *biomonitoring druhového složení* organismů v prostředí a jejich ekologických preferencí (viz 3.1). Pro odhad délky ponoření ostatků se zkoumá epinekrotický biofilm, který se vytváří na povrchu těla a mění se v čase podle podmínek (viz 3.2). V případech podezření na utonutí se nejčastěji aplikuje *rozsivkový test*, který sleduje přítomnost rozsivek ve vnitřních orgánech (viz 3.3).

Nejčastěji využívanými organismy ve forezní limnologii jsou rozsivky (Scott et al. 2021). Jejich odolná křemičitá schránka (*frustula*) je klíčová právě pro účely rozsivkového testu (Round et al. 1990; Hu et al. 2013). Ten je založený na principu - pokud oběť zaživa vdechne vodu obsahující rozsivky, mohou proniknout skrz stěny plicních sklípků do krevního oběhu a následně do vnitřních orgánů. Potvrzený nález rozsivek v těchto tkáních pak slouží jako podpůrný důkaz smrti utonutím (Kumar et al. 2012).

### 3.1 Biomonitoring

Biomonitoring je metoda, která dlouhodobě sleduje stav prostředí analýzou přítomnosti, početnosti a druhovým složením organismů v dané lokalitě (Baird et al. 2012). Ve vodních ekosystémech se biomonitoring využívá k hodnocení dlouhodobé kvality vody na základě tzv. *bioindikátorů* – organismů citlivých na změny prostředí (Baird et al. 2012). Na rozdíl od chemické analýzy vody, která poskytuje aktuální snímek stavu, biomonitoring zohledňuje i historické a kumulativní vlivy prostředí, což umožňuje komplexní hodnocení ekologické stability a míru antropogenního znečištění (Rimet 2012).

Rosivky patří mezi nejčastěji využívané *bioindikátory* v biomonitoringu vod, a to díky jejich ekologické specifitě, rychlé reakci na změny prostředí a přítomnosti druhů citlivých i tolerantních vůči znečištění. Jejich využití je pevně zakotveno i v evropské legislativě, konkrétně v Rámcové směrnici o vodách (*WFD – Water Framework Directive*), kde slouží k hodnocení ekologické kvality povrchových vod pomocí standardizovaných indexů (Kelly et al. 2009).

Metody biomonitoringu zahrnují jak tradiční mikroskopickou analýzu, tak moderní molekulární přístupy. *Klasická mikroskopická analýza* spočívá v odběru vzorků vody, sedimentu nebo biofilmů, jejich

fixaci a následném pozorování pod světelným či skenovacím elektronovým mikroskopem. Organismy, jako jsou rozsivky, se identifikují na základě morfologických znaků (tvar, ornamentace, velikost a symetrie frustuly)(Round et al. 1990). Tato metoda umožňuje nejen identifikaci jednotlivých druhů, ale také odhad jejich abundance, což je klíčové pro ekologickou interpretaci prostředí (Kelly et al. 2009).

*Moderní molekulární přístupy* využívají environmentální DNA (eDNA), která pochází z buněk živých i mrtvých organismů přítomných ve vzorcích vody, sedimentu nebo biofilmů. Tato DNA je extrahována a analyzována pomocí techniky *DNA metabarcodingu* (Leese et al. 2021). *Metabarcoding* kombinuje univerzální PCR amplifikaci specifických markerových genových sekvencí (např. 18S rRNA u eukaryot) s následným sekvenováním nové generace (NGS). Získaná data jsou následně porovnávána s referenčními genetickými databázemi za účelem taxonomické identifikace druhů přítomných ve vzorku (Giampaoli et al. 2014). Výhodou této metody je schopnost detekovat široké spektrum organismů včetně těch, které jsou mikroskopicky těžko rozlišitelné. eDNA analýza tak poskytuje komplexnější a citlivější obraz biologické diverzity prostředí, umožňuje sledování změn v ekosystému v reálném čase a zvyšuje pravděpodobnost odhalení vzácných či invazních druhů (Leese et al. 2021; Deiner et al. 2017).

V rámci forenzní limnologie má využití eDNA potenciál zejména tam, kde je tradiční identifikace rozsivek obtížná kvůli degradaci vzorků, malé velikosti fragmentů, nebo kontaminaci substrátu. Molekulární biomonitoring tak může významně zvýšit přesnost lokalizace místa činu, rekonstrukce pohybu těla nebo potvrzení kontaktu s konkrétním vodním biotopem.

Ve forenzní limnologii se ekologické preference jednotlivých druhů (získané biomonitoringem) uplatňují při lokalizaci místa utonutí, nebo při ověřování, zda bylo tělo přemístěno z jiné lokality (Rimet 2012). Důležitou roli hrají tzv. *referenční stanoviště*, tedy ekologicky stabilní a dobře zdokumentované lokality, jejichž složení společenstev organismů odráží podmínky prostředí. Biologické složení těchto lokalit slouží jako srovnávací základ při analýze vzorků z případových míst (Dahiya 2022).

Jedním z hlavních problémů je sezónní variabilita složení společenstev rozsivek, která komplikuje srovnávání vzorků odebraných v různých obdobích. V některých obdobích roku, zejména na jaře a na podzim, dochází k masivnímu růstu rozsivek a tvorbě vodních květů (tzv. *diatom blooms*), zatímco v jiných obdobích (např. v létě při vysokých teplotách) se jejich populace výrazně mění nebo snižují. To znamená, že stejná lokalita může v různých měsících obsahovat odlišné společenstvo, což komplikuje interpretaci důkazního materiálu.

Další výzvou je možná kontaminace vzorku při odběru a zpracování, která může vést k chybné interpretaci. Také samotná identifikace druhů je náročná, vyžaduje vysokou míru odborné znalosti a přístup ke kvalitní mikroskopické technice (Rimet 2012).

## 3. 2 Epinekrotické biofilmy

Kromě ekologických preferencí jednotlivých druhů lze ve forenzní limnologii využít i také sukcesní vývoj mikroorganismů v čase. Příkladem je studium *epinekrotických biofilmů*, které vznikají na povrchu těla po jeho ponoření do vodního prostředí. Tyto biofilmy tvořené bakteriemi, sinicemi, rozsivkami, houbami a zoobentosem, jsou obaleny slizovitou extracelulární polymerní maticí (EPM) (Balaguer et al. 2016). Jejich složení se mění v závislosti na čase a podmínkách prostředí, což umožňuje odhad *postmortálního intervalu ponoření (PMSI)* (Lang et al. 2016).

*Extracelulární polymerní matrix* (EPM) chrání mikroorganismy před nepříznivými podmínkami prostředí, zajišťuje jejich adhezi k povrchu těla a tím podporuje tvorbu stabilních biofilmů (Balaguer et al. 2016). Rozsivky hrají v těchto biofilmech významnou roli, zejména v pozdějších stádiích sukcese, kdy díky své ekologické toleranci a schopnosti přilnout k měnícímu se substrátu přispívají k charakteristickému vzhledu biofilmu.

Vývoj biofilmu probíhá sukcesivně (tab. 1) přičemž jednotlivé skupiny mikroorganismů kolonizují tělo v různých fázích rozkladu. Dynamiku této kolonizace ovlivňuje teplota, proudění vody, typ substrátu a sezónní změny. Výsledky studií Lang et al. (2016) a Zimmerman a Wallace (2008) ukazují, že sukcesní změny v biofilmech, včetně změn ve společenstvech rozsivek, lze využít jako doplňkový nástroj při odhadu PMSI. Přestože je využití epinekrotických biofilmů zatím převážně experimentální, představuje slibné rozšíření možností forenzní limnologie.

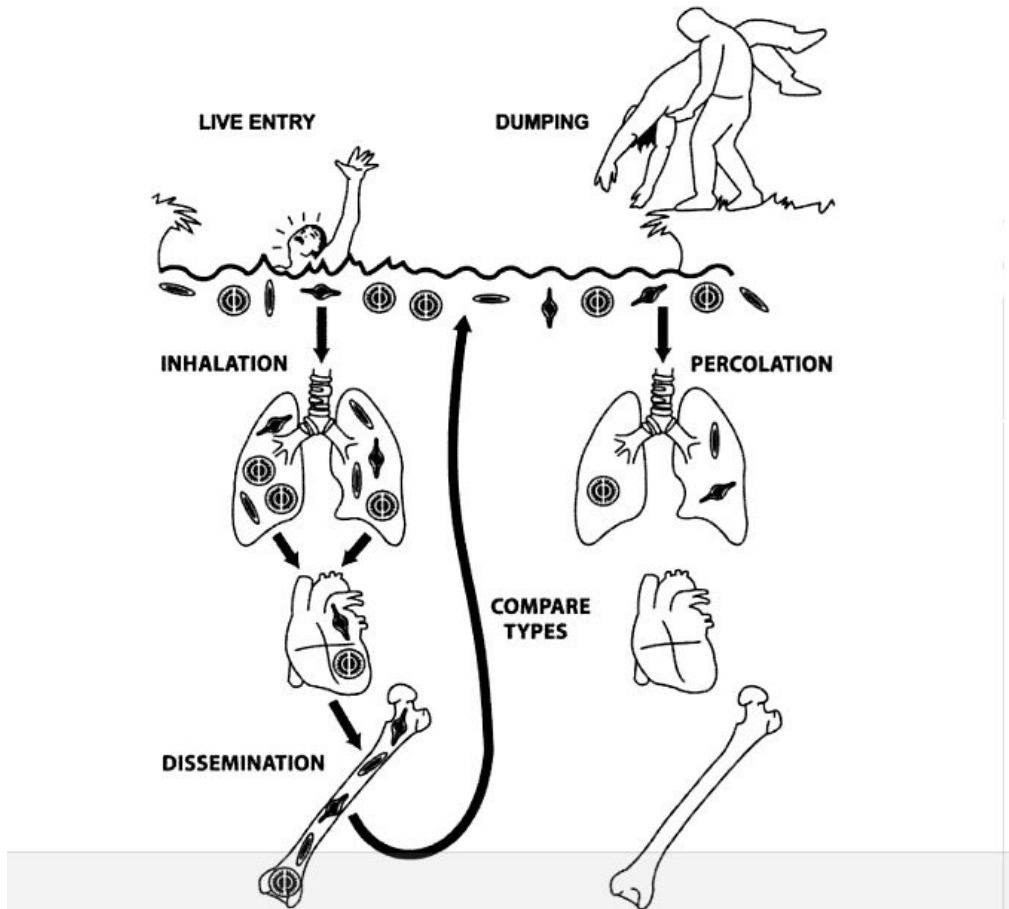
Budoucí výzkum se zaměřuje na propojení sukcesní analýzy s molekulárními přístupy, například DNA metabarcodingem biofilmů, což by mohlo dále zvýšit spolehlivost forenzního využití epinekrotických biofilmů při odhadu doby ponoření.

PMSI	Kolonizace organismy	Vzhled biofilmu
0–3 dny	Převládají zelené řasy ( <i>Cladophora</i> ) a rozsivky ( <i>Nitzschia</i> , <i>Navicula</i> , <i>Cocconeis</i> ).	Tenký, průhledný a málo strukturovaný.
3–7 dní	Dochází k nárůstu sinic ( <i>Oscillatoria</i> , <i>Pseudanabaena</i> ) a bakterií ( <i>Bacillus</i> , <i>Pseudomonas</i> ); objevují se větší rozsivky ( <i>Cymbella</i> , <i>Amphora</i> ).	Biofilm tmavne a vytváří slizovitou strukturu.
7–14 dní	Převládají rozsivky tolerantní k eutrofii ( <i>Nitzschia</i> ) a zelená řasa <i>Cladophora</i> ; prostředí se stává anaerobním a rozklad se zintenzivňuje.	Vícevrstvý, tmavý, výrazně zapáchající.
>14 dní	Dochází ke kolonizaci vodními houbami ( <i>Saprolegnia</i> , <i>Achlya</i> ) a anaerobními bakteriemi.	Hustý, opalescentní, intenzivně zapáchající, pokrývá celé tělo.

**Tabulka 1.** Vývoj epinekrotického biofilmu na těle ve vodním prostředí podle PMSI (upraveno podle Lang et al. 2016; doplněno o sukcesní změny rozsivkových společenstev podle Zimmerman & Wallace 2008).

## 3.2 Diatom test

*Diatom test*, též *rozsivkový test* je jednou z nejdéle používaných a zároveň nejpropracovanějších metod forenzní limnologie, respektive *forenzní diatomologie* (Hu et al. 2013). Jeho hlavním cílem je potvrdit, zda došlo k úmrtí následkem utonutí. Poprvé byl využit na počátku 20. století, kdy Revenstorff (1904) prokázal přítomnost rozsivek v plicích oběti utonutí (Hu et al. 2013). Od té doby se *rozsivkový test* stal standardní metodou, obzvláště v případech, kdy je tělo v pokročilém stádiu rozkladu a jiné známky utonutí (např. pěna v dýchacích cestách) nejsou detekovatelné (Kumar et al. 2012). Při utonutí dochází k vdechnutí vody obsahující mimo jiné i rozsivky (Obr. 3). Tyto jednobuněčné řasy mohou proniknout skrze alveolární výstelku do krevního oběhu a následně do vnitřních orgánů – jater, ledvin, mozku, sleziny, a zejména do kostní dřene. Nález rozsivek ve femorální kostní dřeni je považován za nejspolehlivější důkaz *ante mortem* utonutí, protože tuto oblast není možné kontaminovat při posmrtném ponoření (Kumar et al. 2012; Scott 2021).



**Obr. 3. Rozdíl mezi utonutím zaživa (ante mortem) a posmrtným ponořením (post mortem).** Při utonutí zaživa (live entry) dochází k vdechnutí vody (inhalation) obsahující rozsivky, které se následně mohou dostat až do krevního oběhu a vnitřních orgánů. Naopak při posmrtném ponoření (dumping) se tento mechanismus neuplatní, protože je krevní oběh již zastaven, tudíž se rozsivky do orgánů nedostanou (Vinayak 2019).

Ačkoli rozsivkový test zůstává klíčovou metodou při diagnostice smrti utonutím, v praxi se ukázalo, že má i svá omezení. Kritika se zaměřuje zejména na riziko falešně pozitivních výsledků, možnost sekundární kontaminace a obtížnost interpretace nálezů, zvláště u značně rozložených těl (Piette a De Letter 2006; Lunetta et al. 2013). V reakci na tyto výzvy byla navržena kvantitativní metoda, které má zvýšit přesnost diagnostiky utonutí skrz výpočet poměru rozsivek v plicní tkáni a ve vodě (L/D poměr).

### 3.2.1 L/D poměr rozsivek

L/D poměr (lung/water diatom ratio) porovnává množství rozsivek v plicní tkáni s jejich koncentrací ve vodním prostředí, kde bylo tělo nalezeno. Princip spočívá v tom, že při aktivní inhalaci vody během utonutí dochází k vyšší koncentraci rozsivek v plicích než ve vodě ( $L/D > 1$ ), zatímco při pasivním ponoření po smrti bývá koncentrace stejná nebo nižší ( $L/D \leq 1$ ) (Zhao et al. 2016).

V nedávné studii Hagen et al. (2023) byla optimalizována metoda kvantifikace rozsivek pomocí skenovací elektronové mikroskopie (SEM). Autoři zjistili, že levý horní plicní lalok vykazuje nejnižší koncentraci rozsivek, a doporučili jej jako nejvhodnější místo pro odběr vzorku. Potvrdili také, že L/D poměr vyšší než 2 je silným indikátorem aktivního vdechnutí vody. Tato kvantitativní metoda vykazuje nižší náchylnost k falešně pozitivním výsledkům a je méně závislá na subjektivním posouzení než klasický rozsivkový test, i když vyžaduje kvalitní odběr a pokročilé analytické vybavení.

Výše popsané přístupy ukazují, že rozsivky hrají v rámci forenzní limnologie klíčovou roli jak při určování smrti utonutím, tak při lokalizaci místa činu a odhadu délky ponoření těla. Úspěšnost těchto metod je však podmíněna správným získáním a zpracováním biologického materiálu. Proto se následující kapitola zaměřuje na přehled technik extrakce rozsivek z různých typů substrátů, jejichž volba a provedení zásadně ovlivňují kvalitu výsledné analýzy.

## 4 Metody extrakce rozsivek

Úspěšná forenzní analýza rozsivek je podmíněna správnou volbou metod extrakce, které umožní zachovat jejich morfologické i genetické vlastnosti a minimalizovat riziko kontaminace. Rozsivky mají buněčnou stěnu tvořenou dvoudílnou křemičitou schránkou, nazývanou *frustula*, která je složena převážně z amorfního oxidu křemičitého ( $\text{SiO}_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ ) (Round et al. 1990). Schránky rozsivek se obvykle pohybují v rozmezí 10-200  $\mu\text{m}$ , i když některé drobné druhy dosahují velikosti pod 5  $\mu\text{m}$  a největší druhy mohou měřit až 500  $\mu\text{m}$  (Round et al. 1990). Jejich *frustula* je vysoce odolná vůči biologickému rozkladu a chemickému poškození, což umožňuje její dlouhodobou konzervaci i po smrti organismu. Právě díky této odolnosti lze rozsivky extrahovat z různých druhů materiálů i v pokročilých stádiích rozkladu (Hu et al. 2013). Přesto však mohou být některé jemné schránky poškozeny agresivními chemikáliemi. Například při použití koncentrovaných kyselin, jako je kyselina dusičná ( $\text{HNO}_3$ ), může dojít k poleptání povrchu schránek nebo dokonce k jejich destrukci (Bailet et al. 2019).

Tato kapitola shrnuje tradiční i moderní přístupy používané při izolaci schránek rozsivek z tělesných tkání obětí, oděvů, obuvi a půdy. Důraz je kladen na účinnost jednotlivých metod, šetrnost vůči schránkám a vhodnost pro následné morfologické nebo molekulární analýzy. Popsány jsou jak klasické chemické metody, tak fyzikální techniky a moderní přístupy využívající enzymatické či molekulární postupy.

### 4.1 Chemická oxidace

Tradiční metodou extrakce rozsivek je chemická oxidace, která využívá silné kyseliny, nejčastěji kyselinu dusičnou ( $\text{HNO}_3$ ) a chlorovodíkovou ( $\text{HCl}$ ), k rozkladu lidských měkkých tkání a organických nečistot (*detritu*). (Bailet et al. 2019; Bešta et al. 2025).

Postup chemické oxidace pomocí silných kyselin zpravidla zahrnuje umístění vzorku do laboratorní nádoby a zalití koncentrovanou kyselinou. Směs se zahřívá na mírném plameni nebo v digestoři, přičemž dochází k rozkladu organické hmoty. Délka zahřívání obvykle závisí na typu a množství vzorku materiálu, ale standardně se pohybuje kolem 30 až 60 minut (Lang et al. 2016). Po ochlazení se vzorek doplní kyselinou chlorovodíkovou za účelem odstranění nerozpustných minerálních příměsí, jako jsou uhličitany, které by mohly interferovat s mikroskopickou analýzou (Bailet et al. 2019). Výsledná směs se poté několikrát promyje destilovanou vodou nebo se provede vakuová filtrace, aby došlo k odstranění zbytků kyselin a získaly se čisté schránky vhodné k analýze.

Výhodou chemické oxidace je její účinnost a univerzálnost, protože se může použít pro různé typy materiálů a tkání. Nevýhodou je riziko poškození jemnějších schránek při příliš agresivním působení kyselin (Bailet et al. 2019; Lang et al. 2016). Přesto moderní studie ukazují, že při správném provedení lze chemickou oxidaci optimalizovat tak, aby se schránky zachovaly.

#### 4.1.1 HNO<sub>3</sub>-PCF metoda

Aby se minimalizovalo riziko poškození schránek při chemickém rozkladu a zároveň maximalizovala výtěžnost rozsivek, byla vyvinuta nová metoda známá jako metoda HNO<sub>3</sub>-PCF. Tato metoda kombinuje rozklad tkání pomocí 65% kyseliny dusičné (HNO<sub>3</sub>) s vakuovou filtrací přes polykarbonátový filtr (PCF) a následným rozpuštěním filtru na podložním sklíčku. Výsledkem je zachování neporušené morfologie a výrazné zvýšení počtu získaných schránek ve srovnání s tradičními metodami (Bešta et al. 2025).

Po chemickém rozložení vzorku v kyselině je suspenze filtrována přes membránu s póry o velikosti 1 μm. (Bešta et al. 2025). Rozsivky zůstanou zachyceny na PCF filtru, který je následně přenesen na podložní sklíčko, zahřátý a rozpuštěn pomocí chloroformu (CHCl<sub>3</sub>). Následně je možné provést přímou analýzu pomocí světelné mikroskopie (Bešta et al. 2025).

Ve srovnávacích experimentech dosáhla metoda HNO<sub>3</sub>-PCF téměř bezeztrátového získání schránek rozsivek a zároveň zachovala druhové složení rozsivkového společenstva. Výhodou této metody je nízká technická náročnost: postačuje vakuová filtrace, horká plotýnka a světelný mikroskop (Bešta et al. 2025).

Metoda byla úspěšně ověřena jak na experimentálních vzorcích z prasečích kadáverů, tak na reálných forenzních případech lidských utonutí, kde prokázala vyšší citlivost a spolehlivost ve srovnání s klasickou chemickou oxidací (Bešta et al. 2025).

Zavedením této metody se ukazuje, že při správné kombinaci postupů může být kyselina HNO<sub>3</sub> velmi účinným nástrojem forenzní diatomologie, aniž by vedla k poškození schránek rozsivek.

Přestože chemická oxidace sice zůstává standardní a vysoce účinnou metodou při analýze vzorků s vysokým podílem organické hmoty, není bez rizik. Moderní optimalizované přístupy, jako je HNO<sub>3</sub>-PCF výrazně zlepšují zachování schránek. Proto existují i šetrnější postupy, které eliminují použití silných kyselin a těmi jsou enzymatické metody.

## 4.2 Enzymatický rozklad

Enzymatické metody představují šetrnější alternativu chemické oxidace. Využívají specifické enzymy, nejčastěji *proteinázu K*, která selektivně hydrolyzuje bílkoviny a další organické složky, aniž by narušovala schránky rozsivek. (Hu et al. 2013; Giampaoli et al. 2014). Typický postup zahrnuje inkubaci vzorku v pufovaném roztoku obsahujícím *proteinázu K* (obvykle v koncentraci 20–50 μg/mL) při teplotě 55–65 °C po dobu 12–24 hodin (Giampaoli et al. 2014). Tento postup umožňuje účinné rozložení měkkých tkání a usnadňuje následnou separaci *frustul* pomocí centrifugace nebo filtrace. Tento přístup je vhodný zejména pro ostatky v pokročilém stádiu rozkladu a pro případy, kdy je žádoucí zachovat genetický materiál pro následné molekulární analýzy, například pro *DNA metabarcoding* (Hu et al. 2013; Giampaoli et al.

2014). Enzymatický rozklad rovněž snižuje riziko fragmentace schránek ve srovnání s chemickými metodami. Přestože je tato metoda časově náročnější a méně účinná u velmi znečištěných vzorků, stává se důležitou součástí moderní forenzní limnologie (Hu et al. 2013).

### 4.3 Tepelné zpracování (vypalování – ashing)

Metoda *ashingu* spočívá ve spalování vzorků při vysokých teplotách (450–550 °C), kdy dochází k odstranění organického materiálu a zachování pouze anorganických látek (Lang et al. 2015). Tento proces se běžně provádí v muflových pecích (*muffle furnace*), které umožňují přesné řízení teploty a rovnoměrné zahřívání vzorku. Vzorky, například kostní dřev, měkké tkáně nebo kontaminované půdní materiály, se umísťují do žárovzdorných kelímků a zahřívají se postupně na cílovou teplotu, aby se předešlo prudkému odpaření těkavých složek, které by mohlo narušit integritu křemičitých schránek. Pokud je teplota příliš vysoká nebo je ohřev příliš rychlý, může dojít k tepelné degradaci nebo fragmentaci jemnějších schránek, což snižuje kvalitu výsledné analýzy (Lang et al. 2015).

Proto Lang et al. (2015) doporučují přizpůsobit parametry spalování konkrétnímu typu vzorku: například nižší teploty a delší doba žihání pro vzorky s jemnou strukturou.

Tepelné zpracování je zvláště vhodné pro kontaminované vzorky nebo vzorky s vysokým obsahem tuku, kde chemické a enzymatické metody selhávají. Vzorky po *ashingu* jsou následně analyzovány mikroskopicky za účelem identifikace přítomných rozsivek a hodnocení jejich morfologie.

### 4.4 Mechanické a fyzikální metody separace

Po odstranění organické hmoty chemickými, enzymatickými či tepelnými metodami je třeba izolovat a koncentrovat křemičité schránky rozsivek pro následnou mikroskopickou analýzu. K tomuto účelu se využívají mechanické a fyzikální metody separace, uvedené v následujících podkapitolách, které umožňují šetrné zachycení rozsivek ze zpracovaných vzorků.

#### 4.4.1 Vakuová filtrace a membránová filtrace

Vakuová filtrace využívá podtlak k průchodu vzorku přes jemnou membránu (obvykle nylonovou nebo acetátovou), která zachytí schránky rozsivek (Lang et al. 2016). Membránová filtrace je zvláště účinná při zpracování vzorků s nízkou koncentrací rozsivek, protože minimalizuje riziko ztráty materiálu. Tato metoda je vhodná jako závěrečný krok po chemickém nebo enzymatickém rozkladu a umožňuje efektivní přípravu vzorku pro následnou mikroskopickou analýzu (Lang et al. 2016). V případech, kdy je třeba oddělit rozsivky od jemných organických zbytků, se kromě filtrace uplatňuje také metoda gradientové centrifugace.

#### 4.4.2 Gradientová centrifugace

Gradientová centrifugace umožňuje separaci částic na základě jejich rozdílné hustoty. Křemičité schránky rozsivek mají vyšší hustotu než organické zbytky, což umožňuje jejich účinné oddělení (Hu et al. 2013). Výhodou gradientové centrifugace je šetrnost k schránkám a schopnost oddělit rozsivky i z velmi jemně rozložených vzorků. Nicméně studie Hu et al. (2013) upozorňuje, že opakovaná centrifugace může vést ke ztrátě 11–14 % rozsivek, proto je důležité optimalizovat počet cyklů a odstředivou sílu. Pro minimalizaci ztrát se doporučuje provádět maximálně 2–3 centrifugační cykly a používat relativně nízkou odstředivou sílu kolem  $1000\text{--}1500 \times g$  (Hu et al. 2012). Optimalizace těchto parametrů je klíčová pro zachování morfologické integrity *frustul*, zejména těch křehkých nebo fragmentovaných. Vedle těchto tradičních metod extrakce rozsivek se v posledních letech prosazují moderní metody, které kombinují rychlost a šetrnost k analyzovanému materiálu.

#### 4.4.3 Mikrovlnný rozklad a kombinované přístupy

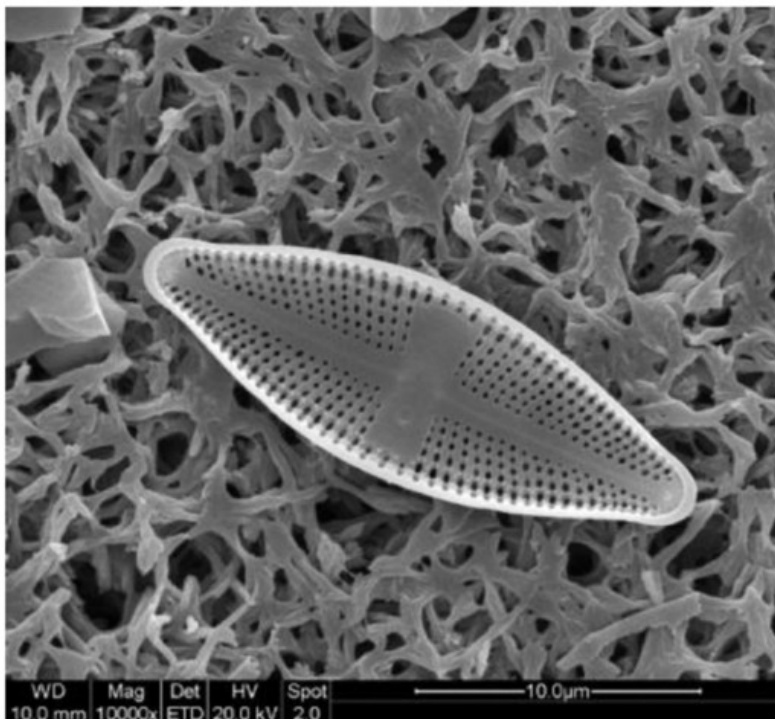
Mikrovlnný rozklad v kombinaci s vakuovou filtrací a SEM představuje moderní a efektivní metodu extrakce rozsivek (Hu et al. 2013). Mikrovlnné záření umožňuje rychlý a rovnoměrný rozklad organických látek, zatímco vakuová filtrace zachytí i drobné schránky. Hu et al. (2013) prokázali, že tato metoda dosahuje vyšší citlivosti než tradiční chemická oxidace, s pozitivními výsledky v 86,7 % případů, což představuje o 20 % vyšší úspěšnost. Rozsivky zachycené na povrchu filtračních membrán lze následně analyzovat pomocí skenovací elektronové mikroskopie (SEM) (Obr.4).

#### 4.4.4 Mechanické oplachování (*jet rinsing*) a vodní lázeň

Pro šetrné získání rozsivek ze svrchních materiálů, zejména z obuvi, se využívá oplach destilovanou vodou pod tlakem (*jet rinsing*) nebo ohřev vzorku ve vodní lázni (Levin et al. 2017). Při metodě *jet rinsing* je vzorek jemně oplachován proudem destilované vody tak, aby došlo k uvolnění částic z povrchu, aniž by došlo k mechanickému poškození schránek. Tento přístup je zvláště vhodný pro materiály s jemnou strukturou, například textilní nebo semišová obuv. *Vodní lázeň* se využívá u vzorků, které obsahují pevněji přichycené částice nebo vyšší množství organického materiálu. Vzorek je ponořen do teplé destilované vody (obvykle 40–60 °C) na dobu několika desítek minut až hodin, čímž se usnadní uvolnění rozsivek bez nutnosti použití chemikálií.

Obě metody mají společnou výhodu v tom, že minimalizují riziko poškození jemných křemičitých schránek a umožňují zachovat jejich morfologii pro následnou mikroskopickou analýzu. Jsou proto vhodné

zejména v případech, kdy je potřeba zachovat původní charakter důkazního materiálu, například při analýze obuvi, oděvů nebo jemných textilií (Levin et al. 2017).



**Obr. 4.** Skenovací elektronová mikrofotografie rozsivky rodu *Navicula* zachycené na pórovitém filtru při zvětšení 10 000×. Detailní pohled ukazuje morfologii frustuly a strukturu podkladového materiálu (upraveno podle Hu et al. 2013).

#### 4.4.5 RECF metoda (Rinsing–Ethanol–Centrifugation–Filtration)

RECF (*Rinsing–Ethanol–Centrifugation–Filtration*) je alternativní šetrná metoda extrakce rozsivek, která kombinuje mechaniko-chemické postupy s cílem minimalizovat poškození textilie i schránek. Postup zahrnuje čtyři hlavní kroky: oplachování vzorku destilovanou vodou, ošetření ethanolem, centrifugaci a závěrečnou filtraci. Nejprve je vzorek šetrně opláchnut, aby se odstranily volné částice a snížilo povrchové napětí. Následuje promytí ethanolem, které narušuje biologické nečistoty a uvolňuje rozsivky přichycené k vláknům. Uvolněné částice jsou následně separovány centrifugací a zachyceny filtrací přes jemnou membránu (Magni et al. 2020; Hu et al. 2013).

Výhodou RECF metody je omezené riziko fragmentace rozsivek a zachování integrity textilní struktury, což je důležité zejména při analýze forenzního materiálu, jako jsou jemné tkaniny oděvů (Magni et al. 2020; Hu et al. 2013). Tato metoda se doporučuje v případech, kdy je potřeba maximálně šetřit

analyzovaný substrát a zároveň zachovat kvalitní morfologii schránek pro následnou mikroskopickou analýzu.

## 4.5 Extrakce rozsivek z oděvu, obuvi a půdy

### 4.5.1 Oděv

Pro extrakci rozsivek z oděvů se nejčastěji používá oxidační činidlo – peroxid vodíku ( $H_2O_2$ ), který efektivně rozkládá organický materiál. Alternativou je RECF metoda (oplach ethanolem a centrifugace), která šetří strukturu tkaniny a minimalizuje fragmentaci rozsivek (Magni et al. 2020). Metoda vypalování je u textilií méně vhodná kvůli vyššímu riziku poškození jemných schránek.

Zachování rozsivek na textiliích je ovlivněno typem tkaniny, délkou expozice a podmínkami prostředí. Experimentální práce ukazují, že rozsivky mohou na oděvu přetrvávat i přes mechanické a chemické opotřebení, jako je praní či dlouhodobé působení přírodních jevů (vítr, déšť) (Flynn 2021).

### 4.5.2 Obuv

Extrakce rozsivek z obuvi se liší podle materiálu. Kromě peroxidu vodíku se uplatňuje také ohřev ve vodní lázni nebo mechanické oplachování destilovanou vodou (*jet rinsing*) (Levin et al. 2017). Při analýze se hodnotí nejen přítomnost rozsivek, ale také stupeň jejich fragmentace a druhové složení, které může napomoci určit původ vzorku.

### 4.5.3 Půda

Půdní vzorky vyžadují použití silných kyselin, zejména dusičné ( $HNO_3$ ), a následnou centrifugaci za účelem izolace schránek. Půda je složitější substrát kvůli nižší diverzitě rozsivek a časté fragmentaci schránek, což komplikuje spolehlivou identifikaci. Standardizované protokoly pro forenzní analýzu půdních rozsivek zatím chybí (Zhang et al. 2020; Lund 1945).

Výběr vhodné metody extrakce závisí na typu vzorku, jeho stavu a zamýšleném cíli analýzy. Zatímco tradiční chemické oxidace zůstávají standardem díky vysoké účinnosti, moderní přístupy jako mikrovlnný rozklad a vakuová filtrace nabízejí vyšší citlivost a možnost zachování genetického materiálu pro molekulární analýzy (Hu et al. 2013; Magni et al. 2020). Správná volba a kombinace postupů je klíčová pro zachování integrity materiálu a úspěšnou forenzní interpretaci. Následující kapitola se zaměřuje na praktické aplikace rozsivek při reálném vyšetřování.

## 5 Experimentální aplikace rozsivek ve forenzní praxi

Rozsivky se v kriminalistickém kontextu uplatňují nejen jako důkaz smrti utonutím, ale i jako environmentální stopy, které mohou prokázat kontakt s vodním nebo vlhkým prostředím. Jejich přítomnost na oděvu, obuvi nebo v půdě může pomoci lokalizovat místo činu, ověřit výpovědi podezřelých nebo potvrdit transport těla. Vysoká rezistence rozsivek vůči rozkladu a jejich ekologická specifita z nich činí cenný forenzní nástroj. Tato kapitola shrnuje experimentální studie, které dokumentují potenciál rozsivek jako environmentálních stop.

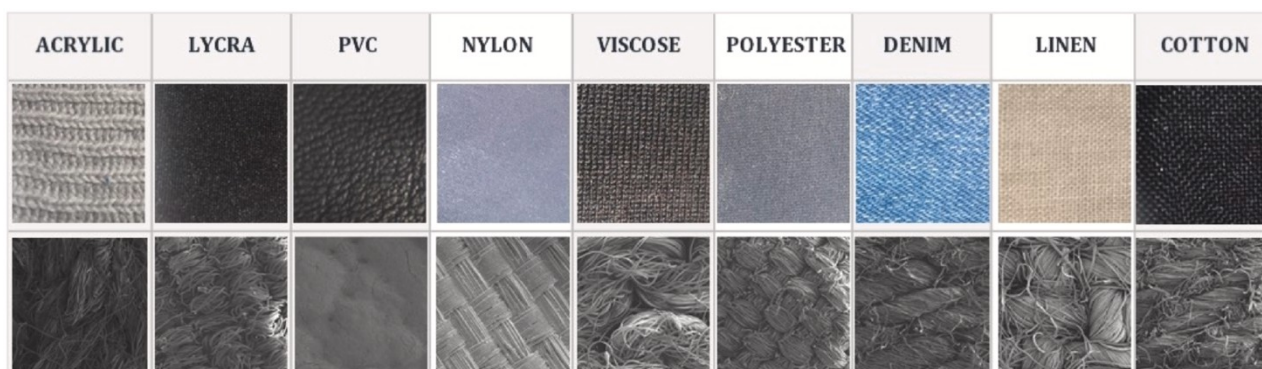
### 5.1 Rozsivky jako environmentální stopy

Rozsivky mohou být zachyceny na různých typech substrátu, včetně oděvu, obuvi a půdy. Mezi faktory, které ovlivňují perzistenci rozsivek patří typ materiálu, délka expozice, podmínky počasí a sezónnost. Typ materiálu ovlivňuje, jak dobře se rozsivky přichytí a udrží. Hrubé a porézní povrchy (např. plátno, syntetický semiš) zachycují více rozsivek než hladké materiály (např. guma, polyuretan) (Scott et al. 2021). Délka expozice určuje, kolik rozsivek zůstane zachováno v čase, přičemž největší úbytek dochází během prvních hodin po kontaktu s vodním prostředím. Stav počasí, jako déšť, vítr nebo silné sluneční záření ovlivňuje retenci rozsivek (Levin et al. 2017). Sezónní změny ovlivňují jak množství rozsivek v prostředí, tak podmínky zachování. Na jaře a v létě je například vyšší pravděpodobnost kontaminace díky vyšší produkci rozsivek a příznivějším podmínkám pro jejich přežití.

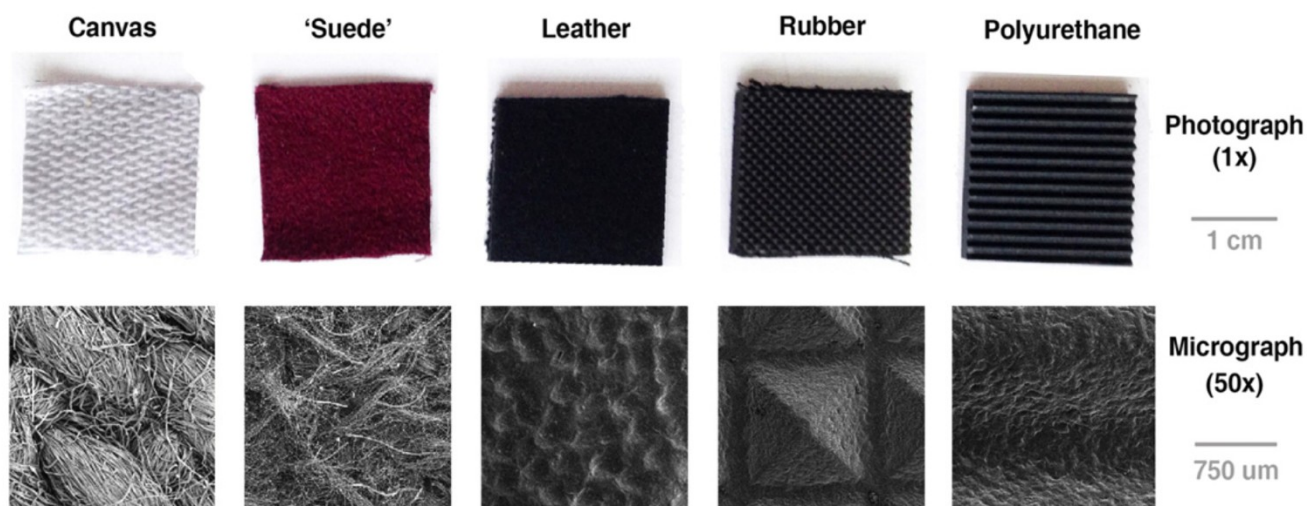
V experimentální studii Scott et al. (2021) byla testována perzistence rozsivek na devíti typech textilií po přímém kontaktu s řekou a následném nošení po dobu 30 dní. Testované textilie zahrnovaly bavlnu, viskózu, akryl, nylon, polyester, denim, PVC, lycru a len (obr. 5). Byla analyzována hustota rozsivek na  $\text{cm}^2$ , a to v pravidelných intervalech (0,5 h, 1 h, 2 h, 4 h, 8 h, 16 h, 24 h, 48 h, 168 h, 336 h a 720 h). Největší zachované množství schránek bylo zjištěno u akrylu a viskózy, nejmenší u nylonu a polyesteru. Druhá bohatost rozsivek zůstala i po měsíci vysoká, u akrylu bylo detekováno až 50 druhů.

Podobné závěry přinesla i studie Levin et al. (2017) zaměřená na perzistenci rozsivek na pěti typech svrchního materiálu obuvi (obr. 4): plátno, kůže, syntetický semiš, guma a polyuretan. Obuv byla ponořena do sladkovodní nádrže na 3 minuty a následně nošena po dobu 7 dní. Nejvyšší zachycení bylo pozorováno u tkaných materiálů, zatímco hladké povrchy, jako je guma a polyuretan, vykazovaly nižší retenci. Po 30 sekundách bylo na plátně detekováno více než 600 rozsivek na  $\text{cm}^2$ , po třech minutách pak průměrně 2 511 rozsivek na  $\text{cm}^2$ . U polyuretanu bylo zachyceno pouze 15 rozsivek/ $\text{cm}^2$ . Menší schránky ( $<200 \mu\text{m}^2$ )

přetrvávaly na obuvi nejdéle. Délka expozice je klíčová, největší úbytek rozsivek nastává do 8 hodin od kontaktu (až 75 %), poté se proces zpomaluje a stabilizuje.



**Obr. 5.** Snímky devíti typů textilních materiálů oděvu při zvětšení  $1\times$  a  $50\times$  pomocí skenovací elektronové mikroskopie (převzato z Scott et al. 2021).



**Obr. 6.** Snímky pěti typů materiálů obuvi zachycených při zvětšení  $1\times$  a  $50\times$  pomocí skenovací elektronové mikroskopie (převzato z Levin et al. 2017).

Rozsivky se dají mimo oděv a obuv detekovat i v půdě (Lund et al. 1945, Zhang et al. 2020). Půdní společenstva rozsivek jsou obvykle tvořena ekologicky tolerantními rody, které se dobře adaptují na suchá a kolísající prostředí. Typickými zástupci jsou například rody *Luticola*, *Hantzschia* a *Pinnularia* (Zhang et al. 2020). Tyto rozsivky jsou schopny přežít v extrémních podmínkách, jako je vysoká mineralizace

substrátu, omezená dostupnost vody a výrazné teplotní výkyvy. Přesto je využití půdních rozsivek omezeno nízkou druhovou diverzitou, fragmentací schránek a rizikem sekundárního přenosu (Zhang et al. 2020).

*Sekundární přenos* označuje nepřímý přesun rozsivek na analyzovaný materiál, například přes kontaminovaný povrch, objekt nebo osobu, a nikoli přímým vystavením vodnímu prostředí. Tento jev může nastat například při chůzi po kontaminované mokré půdě či manipulaci s kontaminovaným oděvem. Při forenzní interpretaci je proto nezbytné pečlivě zvažovat možnost sekundárního přenosu.

Forenzní využití rozsivek v půdě bylo dále podrobněji prozkoumáno v experimentální studii Guo et al. (2021), kde byla kombinována analýza pylu a rozsivek pro účely forenzního určování původu půdních vzorků. Autoři odebrali vzorky půdy z několika různých lokalit a testovali schopnost rozlišit je na základě složení mikrofosilií. Studie ukázala, že i když rozsivky v půdních vzorcích vykazují nižší diverzitu než ve vodním prostředí, jejich druhové složení bylo dostatečně odlišné mezi lokalitami, aby umožnilo jejich využití při forenzním určování původu půdy (Flynn 2021).

Ve studii Lund (1945) bylo analyzováno 66 půdních stanovišť v Anglii, kde bylo v půdních vzorcích nalezeno pouze 3–5 rodů a 7–15 druhů rozsivek, zatímco vodní vzorky obsahovaly přes 30 rodů a 70 druhů. Podobné výsledky přinesla i studie Zhang et al. (2020) z Číny. Ačkoli mohou půdní rozsivky v některých případech sloužit jako doplňkový bioindikátor ekologické charakteristiky stanoviště, jejich forenzní využitelnost je omezená. Důvody zahrnují nízkou druhovou diverzitu, častou fragmentaci schránek a možnost sekundárního přenosu nebo pasivním přenosu větrem. Perspektivnější se proto jeví využití *DNA metabarcodingu* zaměřeného na bakteriální společenstva, která vykazují větší druhovou pestrost a ekologickou stabilitu.

Z metodického hlediska je analýza rozsivek v půdě komplikovanější než u vodních vzorků. Chybí standardizované protokoly pro odběr, extrakci a analýzu rozsivek na místě činu. Proto je forenzní využití půdních rozsivek v současnosti považováno spíše za experimentální oblast.

## 5.2 Charakterizace prostředí a databáze rozsivek

Přesná identifikace druhů rozsivek je zásadní pro forenzní analýzu, protože umožňuje odhadnout typ prostředí, ze kterého vzorek pochází. Na základě druhového složení a morfologie schránek lze rozlišit typ vodního biotopu, například eutrofní rybník, horský potok nebo brakickou vodu (Kloster et al. 2017). Jedním z nástrojů podporujících tuto analýzu je SHERPA (SHapE Recognition, Processing and Analysis) německý software pro automatizovanou analýzu morfologie rozsivek. Sherpa umožňuje automatizovanou analýzu mikrofotografií rozsivek pomocí segmentace obrazu a porovnání jejich tvaru s databází více než 500 referenčních šablon. Na rozdíl od klasického mikroskopického hodnocení dokáže software přiřadit i poškozené nebo fragmentované schránky k určitému rodu, což je obrovská výhoda zejména při práci s degradovaným důkazním materiálem (Kloster et al 2017, Kloster et al. 2018). Je však třeba zdůraznit, že

pro digitální analýzu musí být připraveny trvalé preparáty obsahující pouze křemičité schránky, bez protoplastů.

Při určování druhů rozsivek existují zásadní rozdíly mezi morfologickým a molekulárním přístupem. Zatímco SHERPA pracuje s obrazovými daty založenými na morfologii, molekulární databáze využívají sekvence genů, například *18S rRNA* nebo *rbcl* (Bramburger et al. 2020). Molekulární přístupy umožňují detekci kryptických druhů, které jsou morfologicky nerozlišitelné, a představují důležitý doplněk k morfologické analýze (Bogusz et al. 2023). Využití molekulárních metod bylo demonstrováno například ve studii Zhang et al. (2023), kde byla mikrobiální DNA z podrážek obuvi úspěšně přiřazena k typům půdy. I když se jednalo o analýzu bakteriální DNA, princip kombinace ekologických a genetických informací je aplikovatelný i na rozsivky.

Při forenzní interpretaci je nutné zohlednit i stav zachování schránek. Fragmentované schránky rozsivek mohou být použity jako důkazní materiál, zejména pokud je možné je spolehlivě identifikovat a přiřadit k ekologickému kontextu místa nálezu. Moderní nástroje, jako je SHERPA, umožňují přiřazení i poškozených schránek na úroveň rodu (Kloster et al. 2017). Přesto je třeba být obezřetný, neboť fragmenty mají vyšší riziko sekundárního přenosu a jejich interpretace vyžaduje komplexní přístup a porovnání s referenčními vzorky (Zhang et al. 2020; Beres et al. 2017).

## 6 Rozsivky jako forenzní stopy

V předchozí kapitole byly představeny experimentální aplikace rozsivek ve forenzní analýze, zaměřené na jejich perzistenci na textiliích, obuvi a v půdě. Následující kapitola přináší konkrétní případové studie, které ilustrují praktické využití rozsivek jako environmetnálních stop při vyšetřování různých typů kriminálních případů. Tyto případy ukazují, že se rozsivky dají s úspěchem aplikovat nejen v případech utonutí, ale i při rekonstrukci událostí, ověřování hypotéz a spojování osob s místem činu.

### 6.1 Určení doby ponoření

Neznámý muž, označovaný jako D. B. Cooper, spáchal v roce 1971 jeden z nejznámějších únosů letadla v historii Spojených států. Dne 24. listopadu nastoupil na let z Portlandu do Seattlu a během letu oznámil letušce, že má bombu, přičemž požadoval 200 000 dolarů, čtyři padáky a natankování letadla. Po splnění požadavků vyskočil s výkupným z letadla někde mezi Seattlem a Reno. Od té doby je jeho osud neznámý (Federal Bureau of Investigation, 2025).

Dne 10. února 1980, téměř devět let po činu, byl na břehu řeky Columbia nalezen svazek bankovek v hodnotě přibližně 6 000 USD, jejichž sériová čísla odpovídala výkupnému (Kaye & Meltzer, 2020). Tento nález vyvolal otázky ohledně toho, kdy a jak se peníze dostaly na místo nálezu.

V roce 2009 byla provedena podrobná forenzní analýza nalezeného materiálu, přičemž klíčovou roli hrála analýza rozsivek (Buergin, 2020). Vědci porovnali rozsivková společenstva na Cooperových bankovkách s kontrolními bankovkami, které byly ponořeny do řeky Columbia v listopadu a březnu. Analýza pomocí SEM ukázala, že zatímco kontrolní vzorky obsahovaly zimní druhy, na Cooperových bankovkách dominovaly druhy charakteristické pro jarní a letní období, zejména *Asterionella* a *Fragilaria*. To naznačilo, že peníze byly ponořeny do vody v květnu až červnu, nikoliv v listopadu 1971. Dále byl testován průnik rozsivek do svazku bankovek. Výsledky ukázaly, že rozsivky pronikají pouze několik milimetrů od okraje a v centrálních vrstvách chybí. Nález intaktní rozsivky rodu *Fragilaria* mezi dvěma bankovkami naznačoval, že kontaminace rozsivkami nastala během volného kontaktu bankovek s vodou, nikoliv při pozdějším pohřbení. Simulace ukázala, že svázaný svazek bankovek po ponoření do vody vějířovitě expandoval, což umožnilo rozsivkám dostat se i do středových částí balíku. Doplnková prvková analýza rozdílů v obsahu sodíku a vápníku mezi Cooperovými bankovkami a kontrolními vzorky dále podpořila závěr, že ponoření proběhlo v jiném období než v listopadu (Kaye & Meltzer, 2020).

Výsledky analýz ukázaly, že bankovky byly vystaveny vodnímu prostředí až během jarních nebo letních měsíců, tedy několik měsíců po samotném únosu. Tato zjištění zásadně ovlivnilo interpretaci případu, protože vyvrátila původní hypotézy o tom, že peníze byly okamžitě po činu ukryty nebo pohřbeny.

## 6.2 Odhalení přesunu těla

V roce 2020 byl v Argentině nalezen mrtvý muž, Facundo Astudillo Castro, ve vodním kanálu poblíž města Bahía Blanca. Tělo bylo v pokročilém stádiu rozkladu a standardní forenzní metody neposkytly jednoznačný závěr o příčině smrti. Podle dostupných mediálních a oficiálních zpráv byla provedena analýza rozsivek v kostní dřeni oběti, přičemž druhové složení rozsivek nalezených v těle se výrazně lišilo od složení rozsivek odebraných z kanálu, kde bylo tělo nalezeno (Facundo Astudillo Castro případ, 2020). Tento nesoulad naznačoval, že k úmrtí nedošlo na místě nálezu a že tělo bylo pravděpodobně přemístěno po smrti. Analýza rozsivek tak poskytla významný podpůrný důkaz ve vyšetřování okolností smrti.

## 6.3 Rozsivky na oděvu

V sérii šesti případových studií v Allahabadu v Indii bylo zkoumáno využití rozsivek při vyšetřování úmrtí ve vodním prostředí (Nidhi et al., 2017). Analýza probíhala jak na biologických vzorcích (plicní tkáň, kostní dřev), tak na oděvu obětí. U jedné oběti byly rozsivky nalezeny pouze na oděvu, ale ne v tělesných tkáních, což naznačilo, že tělo bylo do vody umístěno až po smrti (*tzv. body dumping*). U jiné oběti byla nalezena shoda druhového složení rozsivek v plicích, kostní dřev i na oděvu, což podpořilo hypotézu, že k utonutí došlo skutečně na místě nálezu. Tato studie ukázala, že analýza rozsivek z oděvu může být cenným doplňkem klasického rozsivkového testu, zejména v případech pokročilého rozkladu těl.

## 6.4 Propojení podezřelého s místem činu

V roce 1996 byla v řece Hudson (USA) nalezena oběť, u níž pitva prokázala zdrógování a *ante-mortem* strangulace. Analýza rozsivek v kostní dřev oběti odhalila druhy, které odpovídaly druhům nalezeným na místě činu. Rozsivky byly dále nalezeny na peněžence a obuvi podezřelého, přičemž druhové složení odpovídalo rozsivkám z místa nálezu těla, což pomohlo propojit podezřelého s místem činu (citováno podle Phys.org 2016).

## 6.5 Rozsivky v půdě

Guo et al. (2021) popsali případ, kdy byla analýza rozsivek a pylu využita k propojení podezřelého s místem činu v provincii Hunan v Číně. Půdní vzorky odebrané z místa činu a oděvu podezřelého

obsahovaly shodné společenstvo rozsivek, což přispělo k přiznání podezřelého. Studie ukázala význam využití mikroskopických stop v soudním vyšetřování (Guo et al. 2021).

## 6.6 Rekonstrukce místa utonutí

Horton et al. (2006) vyvinuli kvantitativní metodu rekonstrukce místa utonutí založenou na analýze druhového složení a abundance rozsivek nalezených v plicní tkáni a na oděvu obětí. Metoda spočívala v porovnávání rozsivkových společenstev získaných z biologických a textilních vzorků se společenstvy odebranými z různých lokalit v okolí nalezení těla. Analýzou druhové diverzity, ekologických preferencí a množství rozsivek bylo možné zpřesnit určení, v jakém typu vodního prostředí (např. řeka, jezero, bažina) k utonutí pravděpodobně došlo.

Díky tomu bylo možné nejen potvrdit přítomnost rozsivek charakteristických pro dané prostředí, ale také odhalit případné nesrovnalosti, které by mohly naznačovat sekundární přesun těla. Metoda prokázala vysokou přesnost při přiřazování vzorků k původním lokalitám a stala se významným doplňkem ke klasickému rozsivkovému testu, zejména v případech, kdy bylo potřeba rekonstruovat pohyb těla oběti nebo ověřit verzi událostí předloženou vyšetřovanými osobami (Horton et al. 2006).

## 6.7 Rozsivky na dopravním prostředku

Podle popularizačního článku Forensic Access (2023) byla analýza rozsivek využita při vyšetřování, kdy bylo třeba prokázat souvislost vozidla s místem činu v lese ve Velké Británii. Rozsivky nalezené na vozidle odpovídaly společenstvu v půdě na místě činu, což významně podpořilo důkazní hodnotu vzorku (Forensic Access 2023).

Představené případové studie ukazují široké spektrum možností využití rozsivek ve forenzní praxi. Analýza rozsivek umožňuje nejen určování přítomnosti vody, ale také odhadování času kontaktu, detekci sekundárního přesunu těla a spojování podezřelých s místem činu. Výsledky potvrzují význam rozsivek jako spolehlivého forenzního nástroje i mimo klasické případy utonutí.

## 7 Závěr

Cílem této bakalářské práce bylo analyzovat možnosti využití rozsivek ve forenzní vědě nejen při diagnostice smrti utonutím, ale také v širším kontextu kriminalistických aplikací. Byly představeny principy forenzní limnologie, možnosti využití rozsivkového testu, metody extrakce rozsivek z různých substrátů a přehled experimentálních studií, které dokumentují využitelnost rozsivek jako environmentálních stop.

Rozsivky se v kriminalistickém kontextu ukázaly jako spolehlivý forenzní nástroj díky své ekologické specifitě, schopnosti adheze k povrchům a odolnosti vůči rozkladu. *Rozsivkový test*, přestože je tradiční metodou pro stanovení smrti utonutím, je doplňován moderními přístupy, jako je kvantitativní analýza (L/D poměru) nebo využití SEM, které zvyšují přesnost výsledků.

Experimentální studie dále prokázaly, že rozsivky mohou sloužit jako důkazní materiál i na oděvu, obuvi nebo v půdě, a to i po delším časovém intervalu od kontaktu s vodním prostředím. Práce rovněž ukázala na limity současných metod, zejména riziko sekundárního přenosu, sezónní variabilitu společenstev a absenci standardizovaných postupů pro některé typy vzorků.

Významným směrem budoucího vývoje je digitalizace a automatizace analýzy rozsivek, reprezentovaná například softwarem SHERPA, a tvorba rozsáhlých databází ekologických společenstev. Tyto kroky mohou významně zvýšit přesnost a spolehlivost forenzního využití rozsivek. Přestože nové přístupy k forenzní analýze rozsivek, jako je automatizovaná morfologická klasifikace pomocí softwaru SHERPA (Kloster et al. 2017) nebo aplikace molekulárních metod (Zhang et al. 2020), představují významný pokrok, odborná komunita upozorňuje na určitá omezení těchto metod. Software SHERPA byl oceněn za inovaci v oblasti digitální analýzy, avšak jeho schopnost přesně identifikovat fragmentované schránky je omezená a jeho funkčnost závisí na kvalitě vstupních obrazových dat. Podobně studie Zhang et al. (2020) byla chválena za využití DNA metod v kriminalistice, ale recenze zdůrazňují potřebu standardizace protokolů a upozorňují na riziko sekundárního přenosu biologického materiálu, což může ovlivnit forenzní interpretaci. Béres et al. (2017) rovněž zdůrazňují, že i při použití rozsivek jako environmentálních stop je nutná obezřetnost, zejména při hodnocení kontaminace a fragmentace schránek. Tyto poznatky ukazují, že ačkoli forenzní diatomologie nabízí slibné možnosti, její aplikace v praxi vyžaduje pečlivou metodologii a komplexní interpretaci výsledků.

## 8 Seznam literatury

Aquila, I., Ausania, F., Ricci, P., Ricci, S., & Sacco, M. A. (2014). The role of forensic botany in crime scene investigation: Case report and review of literature. *Egyptian Journal of Forensic Sciences*, 4(4), 165–170.

Baird, D. J., & Hajibabaei, M. (2012). Biomonitoring 2.0: A new paradigm in ecosystem assessment made possible by next-generation DNA sequencing. *Molecular Ecology*, 21(8), 2039–2044.

Baillet, B., Bouchez, A., Franc, A., Frigerio, J.-M., Keck, F., Karjalainen, S.-M., Rimet, F., Schneider, S., & Kahler, M. (2019). Molecular versus morphological data for benthic diatoms biomonitoring in Northern Europe freshwater and consequences for ecological status. *Biodiversity Data Journal*, 7, e32354. <https://doi.org/10.3897/BDJ.7.e32354>

Bajerlein, D. (2015). The use of plants in forensic investigations: A current state of knowledge and possible applications in investigative practice. *Problems of Forensic Sciences*, 101, 313–325.

Balaguer, C., Guasch, H., & Romani, A. (2016). *Aquatic biofilms: Ecology, water quality and wastewater treatment*. Caister Academic Press.

Béres, V., Török, P., Kókai, Z., Lukács, Á., T-Krasznai, E., Tóthmérész, B., & Bácsi, I. (2017). Ecological background of diatom functional groups: Comparability of classification systems. *Ecological Indicators*, 82, 183–188.

Bešta, T., Hamrová, H., Tomášek, P., Dohnalová, P., Markvartová, J., Hauer, T., Švejdová, T., Zubíčková, K., Zagatová, I., Lefnar, R., Tomášková, E., Čapková, K., Kaštovský, J. (2025). HNO<sub>3</sub>-PCF: A new lossless light microscopy method for forensic diatom drowning analysis. *Forensic Science International*, 370, 112449. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2025.112449>

Bogusz, M., Bogusz, I., & Źelazna-Wieczorek, J. (2023). The possibilities and limitations of comparative diatomaceous analysis for confirming or excluding the site of an incident – Case studies. *Forensic Science International*, 348, 111592. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2023.111592>

Boyd, A. E. (2006). Plants & perpetrators: Forensic investigation in the botany classroom. *The American Biology Teacher*, 68(9), 145–150. [https://doi.org/10.1662/0002-7685\(2006\)68\[145:PPFIIT\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1662/0002-7685(2006)68[145:PPFIIT]2.0.CO;2)

Bramburger, A. J., Hamilton, P. B., Haffner, G. D., & Hehanussa, P. E. (2020). Variable niche breadth in benthic diatoms: Implications of ecological specialization and generalization for community structure. *Journal of Great Lakes Research*, 46(6), 1131–1139.

Buergin, J. (2020). Diatoms and D. B. Cooper's money: Revisiting forensic diatomology. *Forensic Science International*, 313, 110-122.

Clayton, M. W. (n.d.). Diatoms. University of Wisconsin Digital Collections. Retrieved from <https://search.library.wisc.edu/>

Coyle, H. M., Ladd, C., Palmbach, T., & Lee, H. C. (2005)\*. The green revolution: botanical contributions to forensic science. *Croatian Medical Journal*, 46(4), 606–612. (sekundární citace)

Dahiya, R. (2022). Forensic Diatomology: An overlooked tool in forensic investigations. *Forensic Science International*, 335, 111-134.

Deiner, K., Bik, H. M., Mächler, E., Seymour, M., Lacoursière-Roussel, A., Altermatt, F., Creer, S., Bista, I., Lodge, D. M., de Vere, N., Pfrender, M. E., & Bernatchez, L. (2017). Environmental DNA metabarcoding: Transforming how we survey animal and plant communities. *Molecular Ecology*, 26(21), 5872–5895.

ENFSI (European Network of Forensic Science Institutes). (2015). Best Practice Manual for the Forensic Examination of Biological Evidence.

ENFSI (European Network of Forensic Science Institutes). (2020). Guidelines for quality assurance in forensic laboratories.

Federal Bureau of Investigation. (2025). D. B. Cooper Hijacking. Převzato 20.února 2025 z <https://www.fbi.gov/history/famous-cases/db-cooper-hijacking>.

Ferri, G., Alù, M., Corradini, B., & Beduschi, G. (2009). Forensic botany: Species identification of botanical trace evidence using a multigene barcoding approach. *International Journal of Legal Medicine*, 123(5), 395–401.

Flynn, A. (2021). The persistence of diatoms on clothing after submersion in water: Implications for forensic investigations. *Forensic Science International: Reports*, 3, 100207.

Forensic Access. (2023). How forensic diatomology aids in crime scene investigations. Retrieved from <https://www.forensic-access.co.uk>. (sekundární zdroj)

Giampaoli, S., Berti, A., Valeriani, F., Gianfranceschi, G., Piccolella, A., Buggiotti, L., & Romano Spica, V. (2014). Molecular identification of microbial species in tap water by 16S rRNA sequencing: A first step towards a monitoring and surveillance model. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 217(2-3), 293–298.

Guo, J., Wang, L., & Hu, Y. (2021). Application of diatom and pollen analysis in forensic soil provenance cases. *Forensic Science International*, 323, 110984.

Hagen, D., Pittner, S., Zhao, J., Obermayer, A., Stoiber, W., Steinbacher, P., Monticelli, F. C., & Gotsmy, W. (2023). Validation and optimization of the diatom L/D ratio as a diagnostic marker for drowning. *International Journal of Legal Medicine*, 137, 939–948. <https://doi.org/10.1007/s00414-023-02970-x>

- Hall, D. W., & Byrd, J. H. (2012). *Forensic Botany: A Practical Guide*. Wiley-Blackwell.
- Hu, S., Liu, C., Wen, J., Dai, W., Wang, S., Su, H., & Zhao, J. (2013). Detection of diatoms in water and tissues by combination of microwave digestion, vacuum filtration and scanning electron microscopy. *Forensic Science International*, 226, e48–e51. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2013.01.010>
- Horton, B. P., Boreham, S., & Hillier, C. (2006). The development and application of a diatom-based quantitative reconstruction technique in forensic science. *Journal of Forensic Sciences*, 51(3), 643–650
- ISO/IEC (International Organization for Standardization/International Electrotechnical Commission). (2017). *ISO/IEC 17025: General requirements for the competence of testing and calibration laboratories*.
- Kasprzyk, I. (2023). Forensic botany: Who?, How?, Where?, When? *Science & Justice*, 63(2), 123–130. <https://doi.org/10.1016/j.scijus.2023.01.002>
- Kaye, T. G., & Meltzer, M. (2020). Diatoms constrain forensic burial timelines: case study with DB Cooper money. *Scientific Reports*, 10, 13036. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-70015-z>
- Kelly, M. G., Juggins, S., Guthrie, R., Pritchard, S., Jamieson, J., Rippey, B., Hirst, H., & Yallop, M. (2009). Assessment of ecological status in UK rivers using diatoms. *Freshwater Biology*, 54(2), 403–422.
- Kloster, M., Esper, O., Kauer, G., & Beszteri, B. (2017). Large-Scale Permanent Slide Imaging and Image Analysis for Diatom Morphometrics. *Applied Sciences*, 7(4), 330.
- Kloster, M., Esper, O., Kauer, G., & Beszteri, B. (2018). Shape-based diatom taxonomy: New perspectives using imaging flow cytometry and machine learning. *Frontiers in Marine Science*, 5, 346.
- Kumar, A., Tewari, P., Sharma, A., & Chauhan, P. (2012). Diatom test: Its utility in diagnosis of death due to drowning. *Journal of Indian Academy of Forensic Medicine*, 34(4), 308–310.
- Lane, D., Reiber, C., & McDowell, R. (1990). Forensic botany: Using plants to aid the criminal investigation process. *Forensic Science Review*, 2(1), 40–47.
- Lang, J., Weis, R., & Zehner, R. (2015). Extraction and preparation of diatoms for forensic analysis: A review. *Forensic Science International*, 249, 186–195.
- Lang, J., Ludes, B., & Van de Voorde, W. (2016). Development of a standardized method for epinecrotic biofilm sampling for forensic applications. *Forensic Science International*, 266, 337–342.
- Leese, F., Altermatt, F., Bouchez, A., Ekrem, T., Hering, D., Meissner, K., Mergen, P., Pawlowski, J., Piggott, J. J., Rimet, F., Steinke, D., Taberlet, P., Weigand, A., & Zimmermann, J. (2021). Why we need

sustainable networks bridging countries, disciplines, cultures and generations for aquatic biomonitoring 2.0: A perspective derived from the DNAqua-Net COST Action. *Metabarcoding and Metagenomics*, 5, e68584.

Levin, E. A., Morgan, R. M., Scott, K. R., & Jones, V. J. (2017). The transfer of diatoms from freshwater to footwear materials: An experimental study assessing transfer, persistence, and extraction methods for forensic reconstruction. *Science and Justice*, 57(5), 349–360.

Lund, J. W. G. (1945). Observations on soil algae. I. The ecology, size and taxonomy of British soil diatoms. *New Phytologist*, 44(2), 196–219.

Magni, P. A., Mohan, M., Vadiveloo, A., & Moheimani, N. R. (2020). Transferability of Australian diatoms to clothing: Assessment of several extraction methods on different fabric types under laboratory conditions. *Forensic Science International*, 312, 110297. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2020.110297>

Malviya, S., Scalco, E., Audic, S., Vincent, F., Veluchamy, A., Poulain, J., Wincker, P., Iudicone, D., de Vargas, C., & Bowler, C. (2016). Insights into global diatom distribution and diversity in the world's ocean. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(11), E1516–E1525.

Mann, D. G., Round, F. E., & Crawford, R. M. (1999). Diatoms: Morphology and biology of the genera. In *The Diatoms: Applications for the Environmental and Earth Sciences* (pp. 1–21). Cambridge University Press.

Microscopy of Nature, Plymouth Marine Laboratory. (n.d.). Diatoms. Převezato z <https://www.pml.ac.uk>

Nidhi, R., Tripathi, C. B., & Choudhary, R. (2017). Forensic Diatomology: A study to find the use of diatoms for the diagnosis of death by drowning. *Journal of Indian Academy of Forensic Medicine*, 39(3), 309–312.

Phys.org. (2016). Diatoms help to solve crime mysteries. Převezato 24.března z <https://phys.org/news/2016-03-diatoms-crime-mysteries.html>.

Piette, M. H. A., & De Letter, E. A. (2006). Drowning: Still a difficult autopsy diagnosis. *Forensic Science International*, 163(1-2), 1–9.

Plymouth Marine Laboratory. (n.d.). Diatoms. převezato 29.dubna 2025, from <https://www.pml.ac.uk>

Rimet, F., Bouchez, A., & Montuelle, B. (2012). Diatom-dominated biofilms as bioindicators of river pollution: Changes in the composition along gradients of pollution in the Loire River, France. *Aquatic Microbial Ecology*, 67(2), 133–147.

Round, F. E., Crawford, R. M., & Mann, D. G. (1990). *The Diatoms: Biology and Morphology of the Genera*. Cambridge University Press.

- Saferstein, R. (2011). *Criminalistics: An Introduction to Forensic Science* (10th ed.). Pearson.
- Scott, K. R. (2021). Diatoms in forensic science: Applications and challenges. *Forensic Science International*, 323, 110-125.
- SWGMAAT (Scientific Working Group for Materials Analysis). (2000). Guidelines for the forensic analysis of glass evidence.
- Vinayak, C. G. (2019). Forensic diatomology: A study on drowning cases. *Journal of Forensic Sciences and Criminal Investigation*, 13(4), 555869.
- Wanner, G. (2018). Diatoms as evidence in forensic science: A new approach. *Forensic Science International*, 291, e19–e21.
- Wetzel, R. G. (2001). *Limnology: Lake and River Ecosystems*. 3rd ed. Academic Press.
- Zhang, Y., Li, H., He, Y., Zhao, S., & Wang, Q. (2020). Diatom diversity in soils: An overlooked component of terrestrial biodiversity. *Soil Biology and Biochemistry*, 151, 108043.
- Zhang, Z., Xu, J., & Chen, J. (2023). Characterizing footwear microbiome for forensic soil source tracking. *Forensic Science International: Genetics*, 65, 102873.
- Zhao, Y., Li, L., Qin, Y., Xu, X., & Hu, Y. (2016). Application of lung/water ratio of diatoms in the diagnosis of drowning. *Forensic Science International*, 266, 422–427.
- Zimmerman, J., & Wallace, J. R. (2008). Succession of algal communities on decomposing bodies in aquatic environments: Forensic applications. *Journal of Forensic Sciences*, 53(2), 397–403.