

**Univerzita Karlova**

**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Protistologie



**Bc. Alena Pilíková**

Detekce nízkých chronických koncentrací olova (Pb) pomocí změn ve  
struktúře morfologické plasticity experimentálních kultur krásivek

*Detection of low chronic Pb concentrations by changes in structure of morphological  
plasticity of experimental desmid strains*

Diplomová práce

Vedoucí práce: prof. RNDr. Jiří Neustupa, Ph.D.

Praha, 2022

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.

Praha 27.7.2022

Podpis \_\_\_\_\_  
Alena Pilíková

## **Poděkování**

Ráda bych poděkovala mému školiteli Jiřímu Neustupovi za rady a připomínky při vypracovávání mé práce a také za trpělivost a individuální lidský přístup při jeho vedení. Dále bych chtěla poděkovat své rodině, především manželovi, který mě ve studiu celou dobu podporoval a bez jehož ochotné pomoci by mé studium vůbec nebylo možné, a také našim dětem, které mě vždy s pochopením nechaly pracovat a připravovat se.

## Abstrakt

Olovo je pro organismy čistě toxicky působící těžký kov, který nemá žádnou známou biologickou funkci. Běžně je vázán v minerálech v zemské kůře a není tak pro organismy dostupný. Sekundárně se ale do prostředí dostává postupným uvolňováním ze sedimentu, kam se dostal v minulosti v souvislosti s historickým působením člověka hlavně v období po průmyslové revoluci. Za určitých podmínek, především v prostředí s nízkým pH, se pak stává ve vodních ekosystémech pro organismy dostupným. Zelené řasy patřící k rodu Desmidiáles se ukazují být k přítomnosti olova v prostředí citlivější než jiné organismy. Mohou reagovat již při nižších koncentracích, nicméně toxicita se často projevuje především na změnách v morfogenezi, a nikoli na životaschopnosti buněk. Na základě předešlé studie s druhem *Micrasterias compareana* jsem zjišťovala, jak se budou na gradientu nízkých chronických koncentrací olova chovat další vybrané druhy této fylogenetické skupiny. Zvolila jsem *Micrasterias radians* a *Euastrum humerosum* jako fylogeneticky bližší a vzdálenější druh. Testovala jsem citlivost a charakter změn v morfologii a souvislost mezi koncentrací a celkovou plasticitou populace pomocí metod biologické analýzy tvaru (geometrické morfometrie). Zajímalo mě, zda by některý z vybraných druhů mohl být vhodným bioindikátorem přítomnosti olova v prostředí, případně modelovým organismem pro další práce. Z výsledků bylo patrné, že na morfogenezi a plasticitu populací obou mnou vybraných druhů má působení různých koncentrací olova vliv, nicméně druhy se svou citlivostí a dynamikou změn liší. U druhu *E. humerosum* jsem pak detekovala výskyt tzv. „death zone“, tedy nejvýrazněji působící intermediární koncentrace toxinu v prostředí. Tento druh by také mohl být vhodným bioindikátorem olova v prostředí a modelovým organismem pro další výzkum.

**Klíčová slova:** olovo, bioindikace, znečištění prostředí, morfogeneze, modelový organismus, death zone, geometrická morfometrie, Desmidiáles, *Euastrum humerosum*, *Micrasterias radians*

## Abstract

The lead is a metal toxic for organisms and we don't know any biological function of it. It is bound as part of minerals in the earth's crust and it's not available for organisms. Secondly it flows in environment from the sediment, where did it get by human historical activity, mainly in period after industrial revolution. In some conditions, primarily in environment with the low pH, it becomes bioavailable for organisms in water ecosystems. The green algae belonging to Desmidiaceae are known to be sensitive to presence of lead ( $Pb^{2+}$ ) in environment in comparison to other organisms. They could react to lower lead concentration by changes in cellular shapes, not by the loss of their viability. Based on a previous study focused on *Micrasterias compereana* I studied the effects of low chronic lead concentration on two unrelated desmid taxa. I chose *Micrasterias radians* and *Euastrum humerosum* as more and less phylogenetically related species to the previously studied *M. compereana*. Using biological shape analysis I tested sensitivity of changes in plasticity and cellular morphology to varying concentrations of lead in the environment. I asked if some of the studied species could be suitable for bioindication of the presence of dissolved lead in the environment. The results of my work showed that there is some influence from the lead concentration in medium on the morphogenesis of the cells and the overall population plasticity, too. However, the reaction of individual species was considerably different with regard to their overall sensitivity and also the dynamics of the particular shape changes. The so-called „death zones“, i.e. the most toxic intermediate concentrations of the toxin in the environment, were detected in *E. humerosum*. This species could become a suitable bioindicator of the bioavailable lead in the freshwater aquatic environment and, at the same time, it could be a model organism for subsequent research.

**Keywords:** lead, bioindication, environment pollution, morphogenesis, model organism, death zone, geometric morphometry, Desmidiaceae, *Euastrum humerosum*, *Micrasterias radians*

# OBSAH

1	ÚVOD.....	7
1.1	Těžké kovy a jejich vliv na mikrořasy .....	7
1.1.1	Vliv fyzikálně chemických vlastností prostředí .....	7
1.1.2	Mechanismy toxicity těžkých kovů.....	8
1.1.3	Mechanismy ochrany řas před toxickými účinky těžkých kovů .....	9
1.2	Krásivky .....	10
1.2.1	Morfogeneze krásivek .....	11
1.3	Olovo a jeho vliv na krásivky.....	13
1.4	Studované druhy .....	15
1.4.1	<i>Micrasterias radians</i> .....	15
1.4.2	<i>Euastrum humerosum</i> .....	16
1.4.3	Pozice ve fylogenetickém stromě a vzájemné vztahy .....	17
1.5	Cíle práce.....	18
2	MATERIÁL A METODY.....	19
2.1	Použitý materiál.....	19
2.1.1	Kultivace .....	19
2.2	Postup získání dat.....	20
2.2.1	Geometrická morfometrika .....	21
2.3	Zpracování dat statistickými metodami.....	23
2.3.1	Isoperimetrický koeficient.....	23
2.3.2	T-test.....	23
2.3.3	Analýza hlavních komponent.....	24
2.3.4	Diskriminační kanonická analýza .....	24
3	VÝSLEDKY.....	26
3.1	Vliv koncentrace olova na isoperimetrický koeficient buněk .....	26
3.1.1	<i>Micrasterias radians</i> .....	26
3.1.2	<i>Euastrum humerosum</i> .....	27
3.2	Rekonstrukce tvaru pomocí tvarových mřížek.....	29
3.3	Celková tvarová plasticita .....	31
3.3.1	<i>Micrasterias radians</i> .....	31
3.3.2	<i>Euastrum humerosum</i> .....	33

3.4	Výsledky diskriminační analýzy .....	35
3.4.1	<i>Micrasterias radians</i> .....	35
3.4.2	<i>Euastrum humerosum</i> .....	36
4	DISKUZE .....	37
5	ZÁVĚR .....	41
6	POUŽITÁ LITERATURA .....	42

# 1 ÚVOD

## 1.1 Těžké kovy a jejich vliv na mikrořasy

Některé chemické prvky řadící se mezi těžké kovy (HMs, heavy metals, např. Pb, Cd, Cu, Al, Zn) mohou mít na řasové buňky toxické účinky. Toxicita daného prvku a její projevy závisí na druhu těžkého kovu, druhu exponovaného organismu a jeho fyziologii, chemické formě kovu, koncentraci kovu v prostředí a fyzikálně chemických vlastnostech prostředí, ve kterém k expozici dochází (Toumi et al., 2007; Ismail et al., 2002; Volland et al., 2014; Neustupa & Woodard, 2020; Rathnayake et al., 2021; Monteiro et al., 2011).

### 1.1.1 Vliv fyzikálně chemických vlastností prostředí

Na projev toxicity HMs může mít vliv například přítomnost chelačního činidla, které tak může činit HM pro organismus biologicky dostupnější, pokud k tomu má daný organismus předpoklady (Wenger et al., 2005). Například v přítomnosti huminové kyseliny (HA, humic acid) byla pozorována změna v kinetice příjmu olova (Pb), zatímco na chování mědi (Cu) a kadmia (Cd) vliv pozorován nebyl. HA tvořila s olovem a stěnou řasy (v tomto případě se jednalo o zelenou kokální řasu "*Chlorella*" (nověji *Parachlorella*) *keslerii*) ternární komplex a olovo tak zůstávalo na povrchu buňky a nedocházelo k internalizaci těžkého kovu v poměru, který byl očekáván (na rozdíl od Cu a Cd, kde přítomnost HA pozorovatelný vliv neměla) (Lamelas et al., 2009). Při řízených laboratorních experimentech se projevuje velký vliv na biologickou dostupnost kovů, a tím i na míru toxicity dané koncentrace HMs, například i kvůli složení kultivačního média. Rozdíly v růstových křivkách u různých HMs a různých druhů řas závisí mimo jiné přímo na zvoleném médiu a množství a druhu chelačního činidla (Rathnayake et al., 2021).

Hladina pH je dalším faktorem, který může mít vliv na toxicitu HMs. Například u sladkovodních zelených řas *Chlorella sp.* a *Pseudokirchneriella subcapitata* bylo pozorováno zvýšení toxicity způsobené chronickými úrovněmi  $\text{Cu}^{2+}$  iontů při zvýšení pH o řád na jednotku pH, což se projevovalo zpomalením růstu pozorované populace (De Schampelaere et al., 2005). Kyselost prostředí ovlivňuje kromě dostupnosti HMs jako takové, tak i množství vazebných míst na řasách, pro které se tak stávají těžké kovy biologicky dostupnějšími (Sibi, 2019).



Protože rychlost průběhu většiny chemických reakcí je závislá na teplotě, má teplota vliv i na speciaci kovových iontů a tím i na jejich biologickou dostupnost pro řasy. Vliv teploty je zřejmě druhově specifický a liší se zřejmě i dle jednotlivých zkoumaných HMs (Sibi. 2019).

### 1.1.2 Mechanismy toxicity těžkých kovů

Interakce mezi řasami a HMs obvykle zahrnují difúzi kovu z média na povrch řasy, vazbu kovu na povrch řasové buňky a následný příjem do buňky (Rathnayake et al., 2021). Způsoby, kterými se řasy vyrovnávají se stresem způsobeným působením těžkých kovů, nejsou většinou podrobně známy (Danouche et al., 2022). Často jsou uvažovány podobné mechanismy působení HMs na řasové buňky jako známe u rostlin, které ale kvůli rozdílům ve fyziologii, metabolismu a morfologii rostlin a řas nemusí být odpovídající (Bajguz, 2011). Řasy jsou k působení HMs často velmi citlivé, jak kvůli velkému poměru povrchu k objemu buňky (Malanchuk & Gruendling, 1973), tak kvůli množství různých pro ionty dostupných vazebných míst na vnější membráně (Rathnayake et al., 2021), které jsou vytvářeny přítomností různých polysacharidů, proteinů nebo lipidů na povrch buněčné stěny s funkčními skupinami, jako jsou amino, hydroxyl, karboxyl a sulfát (Rao et al., 2011).

Toxické účinky mohou být způsobeny různými mechanismy. Může docházet k blokování funkčních skupin biologicky důležitých molekul, přemístění nebo substituci esenciálních kovových iontů z biomolekul a funkčních buněčných jednotek nebo k zvýšené produkci reaktivních forem kyslíku (ROS), čímž HMs působí buňce oxidativní stres (Kaplan, 2013). Řasy mohou reagovat na těžké kovy indukci několika antioxidantů, včetně různých enzymů. Při vysokých chronických nebo akutních koncentracích HMs, dochází k poškození buněk kvůli vysokým hladinám ROS, se kterými se buňky již nedokážou vyrovnat (Pinto et al., 2003). Zvýšené úrovně ROS v buňce narušují několik životně důležitých funkcí buňky (způsobují peroxidaci lipidů, oxidaci proteinů a cukrů, poškození nukleových kyselin), což může vést k úpravě a inaktivaci enzymů, ale také k narušení buněk a integrity membrán organel (Danouche et al., 2022; Kaplan, 2013).

V rámci pozorování celé populace lze sledovat několik způsobů, jak se toxicita HMs projevuje. Při určité koncentraci vždy dochází k inhibici růstu populace a k zastavení procesů fixace CO<sub>2</sub> (León-vaz et al., 2021; Yan & Pan, 2002; Napan et al., 2015; Guanzon et al., 1994; Neustupa & Woodard, 2020; Volland et al., 2014; Malanchuk & Gruendling, 1973). Tato hraniční koncentrace se liší v závislosti na pozorovaném druhu, těžkém kovu a dalších výše uvedených proměnných. Například inhibiční koncentrace mědi při shodných

podmínkách u zelené řasy *Scenedesmus obliquus* byla stanovena na čtvrtinovou hodnotu oproti krásivce *Closterium lunula* (Yan & Pan, 2002). Naopak na olovo se ze studovaných řas ukázala nejcitlivější krásivka *Cosmarium botrytis*, u které docházelo k inhibici růstu populace již při třetinové koncentraci Pb oproti všem ostatním studovaným řasám. *C. botrytis* mělo mezi studovanými řasami největší poměr povrchu ku objemu, což by zvýšenou citlivost mohlo vysvětlovat (Malanchuk & Gruending, 1973).

U některých citlivějších řas jsou ovšem pozorovatelné změny již při nižších koncentracích HMů, aniž by došlo k zastavení růstu celé populace. V souvislosti s toxickými účinky HMů byly pozorovány různé změny v morfologii rozsivek a krásivek. Například u rozsivky *Asterionella japonica* docházelo při vystavení zvýšeného množství Cu ke zpomalení vstřebávání křemíku a síranů, což vedlo ke zvětšování buněk a častému pozorování dvou protoplastů uvnitř jedné frustuly, protože se snížila rychlost buněčného dělení, aniž by došlo ke zpomalení jiných metabolických procesů (Fisher et al., 1981). Specifické morfologické abnormality byly pozorovány i u jiných rozsivek. Byly dokonce specifické pro jednotlivé HM. Zatímco u rozsivek vystavených vyšší koncentraci Cu se projevovaly změny v morfologii *raphe*, po kontaktu s Zn a Pb docházelo ke změnám ve struktuře transapikálních rýžek a různým smíšeným deformitám jejich křemičité schránky (Pandey et al., 2014; Olenici et al., 2017; Gautam et al. 2017; Woodard & Neustupa, 2022). Morfologické malformace byly pozorovány také při krátkodobém i chronickém působení různých koncentrací Pb během morfogeneze krásivek rodu *Micrasterias* (Volland et al., 2014; Neustupa & Woodard, 2020) a o nich podrobněji pojednává podkapitola „Olovo a jeho vliv na krásivky“.

### 1.1.3 Mechanismy ochrany řas před toxickými účinky těžkých kovů

Mezi různé mechanismy ochrany před působením těžkých kovů patří vyhýbání se HMům (například tvorba extracelulárních organických sloučenin, snižujících prostupnost membrán pro HMů, adsorpce kovových iontů na povrchu buněčné stěny) nebo tolerance HMů (mechanismus aktivní absorpce, kterým se řasy vypořádávají s kovy proniklými a nahromaděnými uvnitř buňky). Nejběžnější způsob vyrovnávání se s toxicitou kovů proniklých do buňky je u řas syntéza intracelulárních sloučenin (fytochelatinů, metalothioneinů) vázajících HMů a tvorba specifických buněčných kompartmentů (Volland et al., 2012; Rathnayake et al., 2021; Kaplan, 2013; Marella et al., 2020), případně zabudování sloučenin s HM do buněčné stěny, což během morfogeneze může způsobovat malformace (Andosch et al., 2015; Volland et al., 2014; Lamelas et al., 2005; Lamelas et al.,

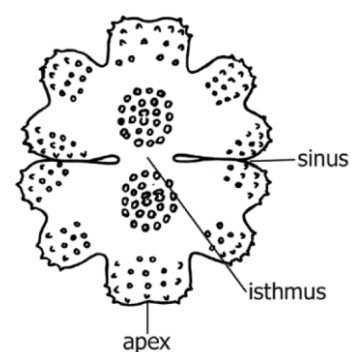
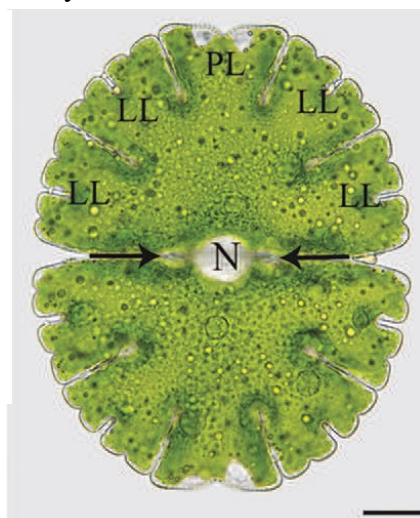
2009). Buňky se také musí v souvislosti s působením HMů vyrovnávat s vyšším oxidativním stresem, k čemuž využívají enzymatické i neenzymatické mechanismy a svou roli zde hrají také fytohormony (Danouche et al., 2022).

## 1.2 Krásivky

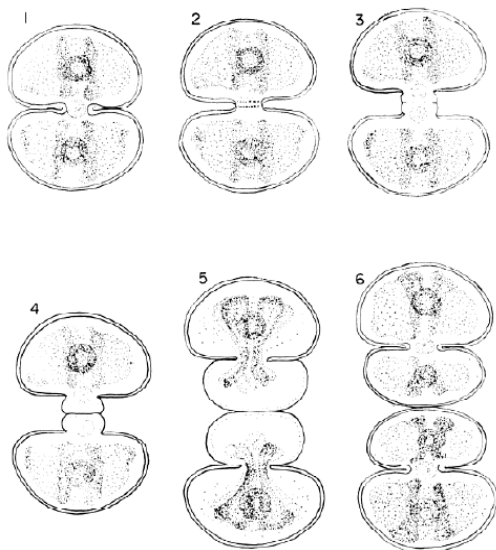
Krásivky (*Desmidiaceae*) (obr. 1.1, 1.2) jsou výlučně sladkovodní mikroskopické jednobuněčné řasy (Brook, 1981; Hall & McCourt, 2015), které výjimečně tvoří kolonie (Kalina & Váňa, 2005) nebo shluky obalené slizem, mající až milimetr v průměru (Hall & McCourt, 2015). Patří do skupiny *Zygnematophyceae* a jsou tak blízce příbuzné cévnatým rostlinám, které stejně jako krásivky patří mezi Streptophyta (Becker & Marin 2009; Gontcharov & Melkonian, 2008; Gitzendanner et al., 2018). Jedná se o relativně mladou, monofyletickou a komparativně rychle se vyvíjející skupinu (Gontcharov & Melkonian, 2011, Gontcharov & Melkonian, 2008; Hall et al., 2008) obsahující mnoho tvarově značně diverzifikovaných a tradičně na morfologii založených rodů (např. *Micrasterias*, *Euastrum*, *Staurastrum*, *Closterium*, *Penium*) (Coesel & Meesters, 2007; Kaštovský et al., 2018). Díky své rozmanité diverzitě, komplexní morfologii a velikosti buněk byly krásivky objevovány již v první polovině 19. století (Ralfs, 1848; Brook, 1981; Meindl, 1993).

Typickým poznávacím znakem krásivkových řas je, že mají buňky složené ze dvou symetrických polobuněk, které bývají oddělené zúžením (sinem) (u bazálních rodů chybí a oddělení polobuněk je tak nezřetelné), a spojené jsou plasmatickým můstkem (isthmem), ve kterém je uloženo jádro. Buňky mají dva rodově specifické a tvarově typické chloroplasty s pyrenoidy, přičemž každá z polobuněk má jeden chloroplast, který ji zcela vyplňuje a přizpůsobuje se tvaru buňky.

**Obrázek 1.1** Stavba buňky krásivky *Micrasterias denticulata*:  
 PL – polární lalok,  
 LL - laterální lalok,  
 N - jádro (Lütz-Meindl, 2016)



**Obrázek 1.2** Nákres významných morfologických znaků krásivek (Kaštovský et al., 2018)



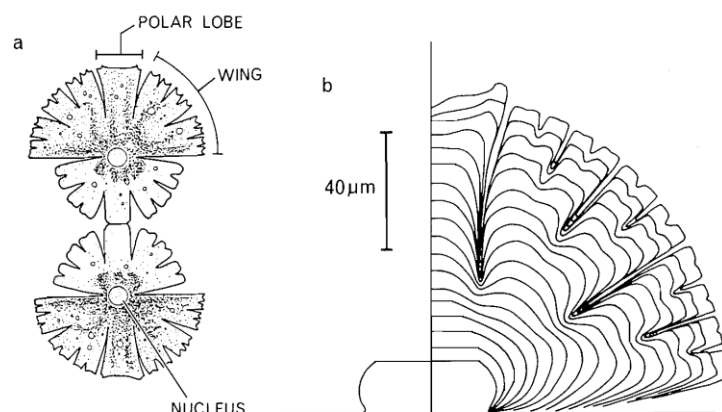
**Obrázek 1.3** Průběh dělení buněk u krásivek typu *Cosmarium* (Brook, 1981)

Průběh dělení buněk u krásivek typu *Cosmarium* (Brook, 1981) odolných stádií zygospor, nebo častěji nepohlavně dělením, kdy dojde k prodloužení isthmus, ve kterém se dělí jádro, a jeho následnému rozdělení. Každá z buněk si pak odnáší jednu polobuněk z buňky mateřské a druhou menší nově vzniklou polobuněk, z počátku pokrytou pouze tenkou hladkou primární buněčnou stěnou, kterou si postupně dotváří (Brook, 1981; Kalina & Váňa, 2005; Hall & McCourt, 2015) (obr. 1.3).

### 1.2.1 Morfogeneze krásivek

Díky velikosti buněk, nenáročnosti kultivace a blízké příbuznosti s vyššími rostlinami jsou krásivky využívány jako modelový organismus mimo jiné pro zkoumání morfogeneze, konkrétně pak zástupci rodu *Micrasterias*, pro jejich symetrii a pravidelnou členitost buněk (Brook, 1981; Lütz-Meindl, 2016). Morfogeneze je biologický proces, během něhož buňka získává svůj tvar a jejíž výsledek může být ovlivněn jak změnami v jádru, tak i faktory prostředí (Brook, 1981; Lütz-Meindl, 2016; Volland et al., 2014; Neustupa & Woodard, 2020; Kallio & Lehtonen, 1981; Selman, 1966; Meindl, 1993).

**Obrázek 1.4** Morfogeneze krásivky *Micrasterias rotata* a) pár polobuněk asi 3 hodiny po mitóze b) růstové profily okrajů zaznamenávané v desetiminutových intervalech (Lacallí & Harrison, 1987)



Dále mají dvouvrstvou buněčnou stěnu – primární (vnější) a sekundární (vnitřní) – s druhově specifickými póry a výběžky. Primární stěna je pružná a neobsahuje mikrofibrily, zatímco sekundární obsahuje svazky mikrofibril a póry na vylučování slizu. V životním cyklu krásivek úplně chybí bičíkatá stádia a při mitóze nemají ani centrioly (Kalina & Váňa, 2005).

Rozmnožují se buď pohlavně konjugací mezi dvěma heterotalickými buňkami za vzniku odolných stádií zygospor, nebo častěji nepohlavně dělením, kdy dojde k prodloužení

Každá plně vyvinutá polobuňka krásivek rodu *Micrasterias* má jeden polární lalok a čtyři hlavní laterální laloky, které se dále větví. *Micrasterias* se v kulturách dělí každé 3 nebo 4 dny a následuje růst nové polobuňky (Meindl, 1993). Mitóza je indikována ukládáním materiálu stěny, který tvoří pás kolem oblasti isthmu v rané profázi. Během telofáze z něj pak vrůstáním dovnitř vzniká přepážka primární stěny, která se vytvoří napříč buněčným isthmem a odděluje nově se tvořící polobuňky (Lacalli, 1976). Růst přepážky je zprostředkován fúzí plasmatické membrány a „přepážkových vesikulů“ produkovaných dyktiozomy, které se před a během mitózy hromadí v oblasti isthmu (Kiermayer, 1981). Tento proces trvá asi 15 minut (Lütz-Meindl, 2016) a je pro pozdější výsledek morfogeneze zásadní, protože fúze se děje vzorovaně a obsahuje tak první vzor budoucího tvaru buňky (Meindl, 1993; Holloway & Harrison, 1999). Přepážka je nejprve hladký jednouchý plát kruhového tvaru, který se brzy se vyklene do polokoule (Brook, 1981) a roste nejprve uniformě. Po určité době, charakteristické pro daný druh, se začnou tvořit první prohlubně a vznikne tak široký centrální výběžek, který se postupně prodlužuje a vyvine se v polární lalok. Postupně v přesně daných časových odstupech dochází symetricky k zastavení růstu v dalších místech primární stěny a vznikají tak laterální laloky, které se postupně protahují a opakovaně dichotomicky větví (obr. 1.4). Hloubka záhybu vždy odpovídá časovému úseku, kdy vznikl. Čím hlubší záhyb je, tím vznikl dříve (Brook, 1981; Kiermayer, 1981; Meindl, 1993).

Celý růst stěny polobuňky je zprostředkován výše zmíněnými vezikuly, které také dodávají plasmatickou membránu s rozetami celulózové syntetázy, díky nimž vznikají mikrofibrily ve stěně a prodloužení primární buněčné stěny tak přímo souvisí s prodloužením membrány. Narušení sekrece vezikulů pak vede k zastavení růstu buňky (Holloway & Harrison, 1999). V místech růstových špiček dochází k výskytu většího množství vezikulů a tím k vyšší akumulaci prekurzorů buněčné stěny (Meindl et al., 1992). Tvarování buňky je tak vlastně sérií opakovaných časoprostorových sekvencí zastavování růstu v určitých, symetricky uspořádaných bodech na periférii buňky (Lütz-Meindl, 2016).

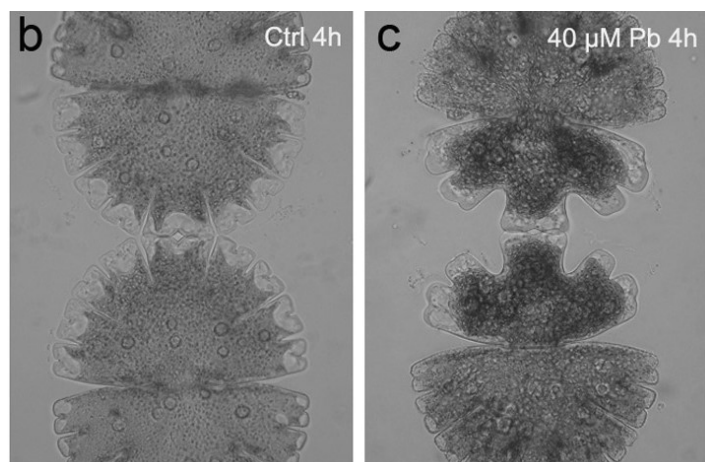
Po dokončení růstu a dotvoření tvaru polobuňky se pružná primární stěna pokrývá pevnější sekundární buněčnou stěnou (Meindl, 1993). Celý proces růstu a tvarování polobuňky trvá asi 4-6 hodin (Brook, 1981).

V počátečních fázích morfogeneze také dochází za pomoci cytoskeletálních částí k dočasné migraci jádra do nově vznikající části buňky, což umožní migraci nového chloroplastu a jeho expanzi v nově se tvořící polobuňce (Meindl, 1983).

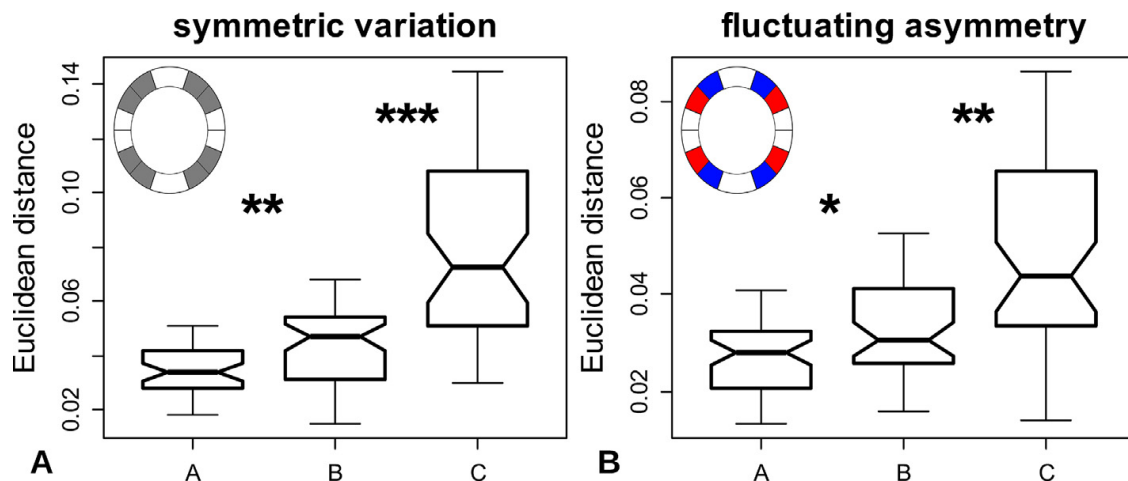
### 1.3 Olovo a jeho vliv na krásivky

Olovo (Pb) je kov, který není pro život nezbytný a pro většinu organismů je akutně toxický (Cullen & McAlister; 2017). Přirozeně se v zemské kůře vyskytuje hlavně ve formě chemicky velmi stabilního galenitu (PbS) (Lukeš & Mička, 1998) a je tak pro organismy nedostupný. V důsledku antropogenní činnosti, především v období po průmyslové revoluci, (Vile et al., 2000) došlo k narušení přirozených cyklů olova a sekundárně se tak stalo biologicky dostupnějším (Cullen & McAlister, 2017). Dnes je naprostá většina olova v biosféře antropogenního původu (průmysl, stavebnictví, doprava, těžba) (Vile et al., 2000). Imisní Pb je navázáno v sedimentech a postupným vymýváním, především v kyselém prostředí (například v rašeliništích), se uvolňuje jako biologicky aktivní iont  $Pb^{2+}$  (Novák et al., 2003; Lamelas et al., 2005).

Krásivky se zdají být citlivější k působení olova než jiné řasy, zřejmě kvůli svému velkému povrchu buněk v poměru k jejich objemu (Malanchuk & Gruending, 1973). Experimenty ukazují, že u nich může v důsledku vystavení olova v průběhu morfogeneze docházet k signifikantním změnám tvaru buněk (obr. 1.5) při koncentracích, které často nejsou bezprostředně letální (Volland et al., 2014; Neustupa & Woodard, 2020). Změna tvaru tak nejspíš souvisí s tím, že k tvorbě buněčné stěny vyvíjejících se polobuněk využívají pravděpodobně  $Pb^{2+}$  místo  $Ca^{2+}$  (Lütz-Meindl, 2016).



**Obrázek 1.5** Srovnání tvaru buňky *Micrasterias denticulata* po 4 hodinách morfogeneze; b – kontrolní skupina, c – 40 $\mu$ M Pb (Volland et al., 2014)



**Obrázek 1.6** Vliv nízkých chronických koncentrací olova na plasticitu *M. compereana*; A – kontrolní skupina, B - 2.59 µg.l<sup>-1</sup>, C – 129,5 µg.l<sup>-1</sup> (Neustupa & Woodard, 2020)

Například ve studii „Neustupa & Woodard 2020“ analyzovali pomocí metod geometrické morfometrie vliv nízkých chronických úrovní olova na morfogenezi krásivky *Micrasterias compereana*. Zaměřili se jak na celkovou plasticitu populace, tak i na asymetrii v rámci jednotlivých buněk v závislosti na koncentraci olova při kultivaci v médiu. Analýzy poukázaly na existenci jasného vztahu mezi množstvím variací v tvaru buňky a také tvarovou variabilitou buněk v populaci a chronickou expozicí Pb kultivovaných populací (obr. 1.6). Dokonce byly pozorovány měřitelné a typově jednotné změny tvaru již při koncentracích, které jsou opakovaně hlášené z různých sladkovodních systémů, typických historickým průmyslově způsobeným vysokým znečištěním atmosféry Pb. *M. compereana* proto byla navržena jako možný adept vhodný k bioindikaci přítomnosti olova v dystrofických sladkovodních biotopech, jako jsou rašeliniště a kyselá slatiniště (Neustupa & Woodard, 2020).

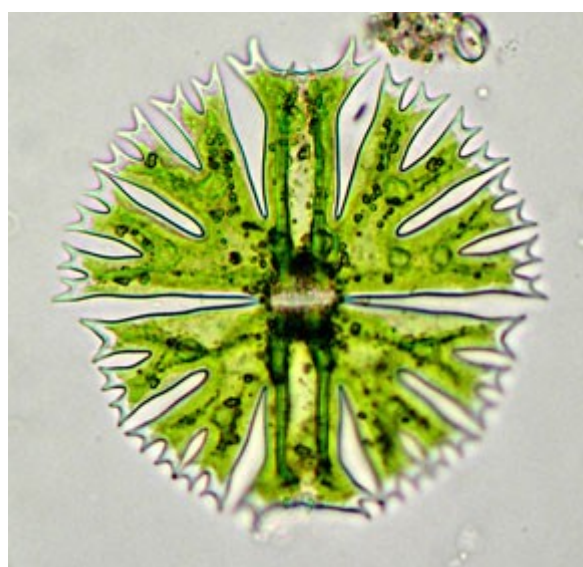
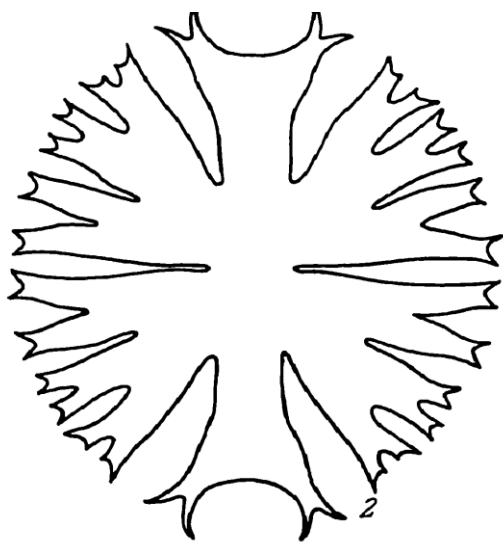
## 1.4 Studované druhy

### 1.4.1 *Micrasterias radians*

*Micrasterias radians* var. *bogoriensis* (obr. 2.1) bylo popsáno roku 1908 Charlesem Jeanem Bernardem v práci „*Protococcacées et desmidiées d'eau douce, récoltées à Java*“ jako *E. crux-melitensis* var. *bogoriense*. Buňky mají obecně okrouhlý tvar, který je 1,1–1,25krát delší než širší, přičemž někdy se délka může šířce rovnat. Na každé polobuňce je pět laloků, které jsou odděleny 4 hlubokými a širokými rýhami dosahujícími nebo dokonce přesahujícími polovinu polobuňky. Bazální i laterální laloky jsou rozděleny rýhami téměř tak hlubokými jako jsou rýhy hlavní mezi samotným bazálním a laterálním lalokem a jsou větveny až do třetího řádu. Laterální laloky jsou vyvinuté, na bázi poněkud oteklé, se dvěma silnými trny na konci. Apikální laloky jsou často velmi dlouhé se zakřivenými hřbety, na jejichž koncích jsou většinou zakřivené koncové trny. Apex se prohloubil téměř půlkruhově. Sinus je široce rozevřený. V rámci rodu *Micrasterias* se jedná o středně velký druh. Délka buněk je 125-146 $\mu$  a šířka 110-120 $\mu$  (Bernard, 1908; Krieger, 1939).

Rozšíření je pravděpodobně tropické nížinné (Neustupa et al., 2010), záznamy výskytu jsou z jihovýchodní a jihozápadní Asie, Afriky a Jižní Ameriky (Neustupa et al., 2010; Kadiri 2002; De-Lamonica-Freire & Heckman, 1996; Guiry & Guiry, 2022).

**Obrázek 2.1** *Micrasterias radians* var. *Bogoriensis* – perokresba (Krieger, 1939), fotografie (van Geest, 2022)

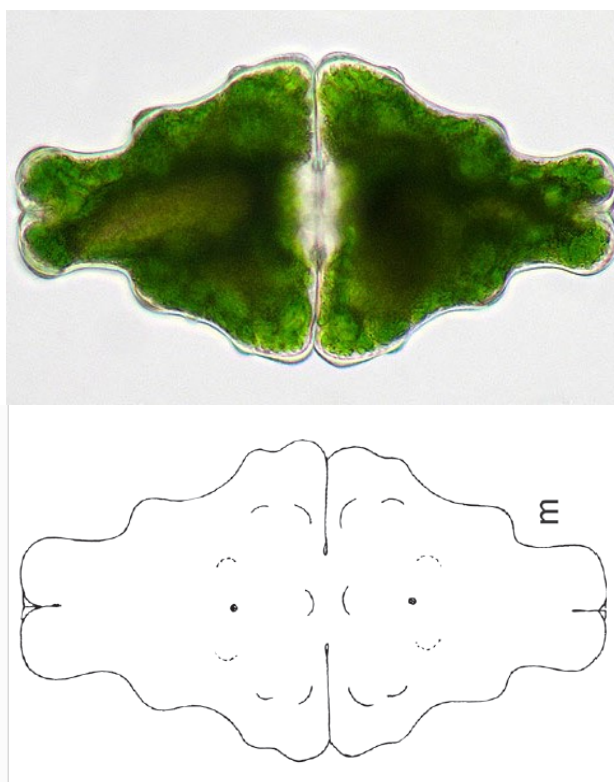




### 1.4.2 *Euastrum humerosum*

*E. humerosum* (obr. 2.2) bylo popsáno v roce 1848 v díle „British desmids“ od Johna Ralfse, který ho původně na základě velikosti považoval za součást druhu *E. affine* (Ralfs, 1848) a který je dnes znám jako *E. humerosum* var. *affine* (Guiry & Guiry, 2022). Vyznačuje se polobuňkami s pyramidálním tvarem v hrubém obrysu a s pěti laloky, mezi kterými jsou široce rozevřené mělké zářezy. Laterální laloky, které se nacházejí těsně nad polovinou polobuňky, jsou úzké a zaoblené, mohou být i kuželovité a směřují šikmo vzhůru. Bazální laloky jsou široce zaoblené a zvlněné (víceméně zdvojené). Apikální laloky jsou vůči apexu rozšířené velmi málo nebo vůbec. Apexy jsou zkrácené zaoblené s hlubokým uzavřeným středovým zářezem a se ztlustlinami buněčné stěny v ústí zářezu. Buněčná stěna na bázi polobuňky má tři výrazné vypoukliny, laterální jsou často zdvojené, uprostřed polobuňky se nachází další dvě vypoukliny, které jsou zpravidla menší a mezi nimiž je většinou centrální pór připomínající prohlubeň. Občas může být další vypouklina v obou laterálních lalocích. Buňky jsou přibližně 1,5-2,1krát delší než širší a obvykle 120-140  $\mu\text{m}$  dlouhé a 65-75  $\mu\text{m}$  široké (Kaštovský et al., 2018; Coesel & Meesters, 2007).

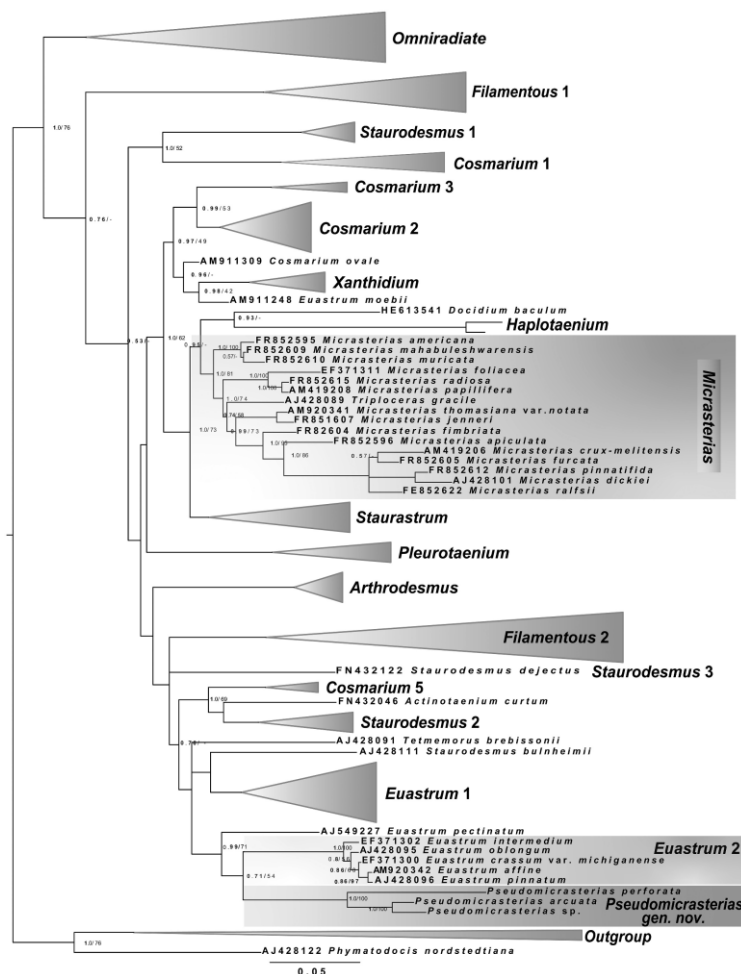
Jedná se o acidofilní druh, vyskytující se u nás v bentosu oligotrofních až oligomezotrofních mokřadních lokalit, většinou s rašeliníkem. Nálezy jsou časté z různých míst severní polokoule (Evropa, Severní Amerika, Japonsko) (Coesel & Meesters, 2007; Kaštovský et al., 2018; Guiry & Guiry, 2022).



**Obrázek 2.2** *Euastrum humerosum* perokresba (Kaštovský et al., 2018), fotografie (van Geest, 2022)

### 1.4.3 Pozice ve fylogenetickém stromě a vzájemné vztahy

*M. radians* var. *bogoriensis* je součástí druhového komplexu *M. crux-melitensis*/*M. radians*. Dle analýzy sekvence jaderné ITS2 a chloroplastové intronu *trnG<sup>unc</sup>* se druh *M. radians* dělí na dva pseudokryptické druhy *M. radians* var. *evoluta* z Afriky a *M. radians* var. *bogoriensis* z Asie, přičemž *M. radians* var. *bogoriensis* je sesterskou k *M. crux-melitensis* z Evropy a severní Ameriky (Neustupa et al., 2010). Společně patří v rámci rodu *Micrasterias* do cladu A (Škaloud et al., 2011). Je to tedy druh relativně vzdáleně příbuzný k *M. compereana*, na němž byla morfologická plasticita v závislosti na chronické nízké koncentraci olova v minulosti studována (Neustupa & Woodard, 2020) a který spadá spolu s *M. rotata* či *M. fimbriata* do cladu C (Škaloud et al., 2011; Neustupa et al., 2014). Naproti tomu *E. humerosum* patří na základě srovnání sekvencí 18S ribosomální DNA (Neustupa et al., 2010) a porovnání morfologických znaků do skupiny tzv. velkých euaster („core *Euastrum*“), a to společně s *E. affine*, *E. oblongum* a *E. pinnatum* (Gontcharov & Melkonian, 2011). Oba druhy vytipované pro výzkum v rámci mé práce jsou tedy fylogeneticky relativně vzdálené. Zatímco druhy rodu *Micrasterias* tvoří sesterskou skupinu



s rodem *Stauroastrum*, rod *Euastrum* je součástí velké bohatě se větvící skupiny a obě větve jsou hluboce oddělené v rámci celého krásivkového fylogenetického stromu (Gontcharov & Melkonian, 2011; Araújo et al., 2022).

Obrázek 2.3 fylogenetický strom založený na setu SSU rDNA, rbcL a psaA sekvencí (Araújo et al., 2022)

## 1.5 Cíle práce

Přítomnost biologicky aktivního olova v biosféře může v důsledku potravní pyramid a následné bioakumulace ohrožovat celé ekosystémy a zdraví člověka (Arunakumara & Zhang, 2008; Cullen & McAlister, 2017). Je proto důležité mít k dispozici dostupné spolehlivé metody monitoringu zvýšených koncentrací olova v prostředí. Jako bioindikátory se mikrořasy již dnes využívají. Dostupné jsou například práce o působení těžkých kovů na tvar konkrétních druhů rozsivek, které se dají využít k biomonitoringu znečištění HM (Marella et al., 2020; Gautam et al. 2017; Fisher et al., 1981; Woodard & Neustupa, 2022; Olenici et al., 2017; Pandey et al., 2014). Ne ve všech lokalitách se ovšem modelové druhy rozsivek, u nichž byly popsány změny morfologie frustul, nacházejí, a je proto žádoucí identifikovat i další organismy, které by se k tomuto biomonitoringu daly využít. Krásivky se díky své citlivosti na těžké kovy obecně (Malanchuk & Gruendling, 1973) a působením olova na morfogenezi a následnou snadno pozorovatelnou změnu tvaru (Volland et al., 2014; Neustupa & Woodard, 2020) zdají být vhodnými kandidáty na další organismy použitelné k biomonitoringu. V mé práci jsem chtěla pomocí řízeného laboratorního experimentu a metod geometrické morfometriky zjistit, zda a jakým způsobem budou na vystavení nízkých chronických úrovní olova reagovat některé další běžné druhy krásivek a zda by tak mohly být vhodné k použití biomonitoringu olova v prostředí. Zjišťovala jsem, zda plasticita buněk krásivek *Euastrum humerosum* a *Micrasterias radians* signifikantně souvisí s úrovní kontaminace prostředí rozpuštěným olovem ( $Pb^{2+}$ ).

Tato práce volně navazuje na dříve publikovanou studii Neustupa & Woodard 2020, kde autoři studovali vliv nízkých chronických koncentrací olova na morfologickou plasticitu buněk krásivky *Micrasterias compereana* a identifikovali změny v symetrii buněk typické pro různé koncentrace. Mým cílem je tedy ověřit, zda jsou změny v plasticitě populací způsobené chronickým působením nízkých koncentrací olova obecně sdíleny i některými dalšími druhy a rody v řádu *Desmidiiales*, či zda se jedná o variabilní fenomén s druhově specifickými typickými projevy u jednotlivých taxonů a linií.

## 2 MATERIÁL A METODY

### 2.1 Použitý materiál

V mé práci jsem pak použila klonální kulturu CAUP K502 *E. humerosum* ze sbírky Culture Collection of Algae of Charles University (CAUP) (Škaloud, 2019), který byl izolován J. Neustupou v roce 2006 z epipelonu rybníka u Hory Svatého Šebestiána v Krušných Horách v České republice a klonální kulturu *Micrasterias radiant* var. *bogoriensis* SVCK 389 ze sbírky „Microalgae and Zygnematophyceae Collection Hamburg“ (MZCH), která byla izolována v roce 1993 K. Handkem v Kuchingu na Borneu (Schwartzenberg et al., 2013).

#### 2.1.1 Kultivace

Pro kultivační experimenty jsem si připravila Erlenmeyerovy baňky o objemu 150 ml a do nich po 50 ml sterilního kapalného média DY-V (Andersen, 2005) obohaceného o danou koncentraci dusičnanu olovnatého ( $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ ), který posloužil jako zdroj pro biologicky aktivní  $\text{Pb}^{2+}$  ionty. Důležitou vlastností média DY-V v kontextu mé práce je, že poskytuje fosfor (P) v organické podobě ( $\beta$ -glycerolfosfát) spíše než jako anorganický iont  $\text{PO}_4^{3-}$ , který by se vysrážel s volnými ionty  $\text{Pb}^{2+}$  do nerozpustného fosforečnanu olovnatého  $\text{Pb}_3(\text{PO}_4)_2$ , což by buňkám zabránilo v přístupu k volným  $\text{Pb}^{2+}$  iontům (De Schampelaere et al., 2014). Nejprve jsem si stanovila čtyři hladiny kontaminace a později, s přihlédnutím k průběžným výsledkům, jsem přidala další dvě (vyšší) úrovně pro *E. humerosum* a jednu úroveň pro *M. radians*.

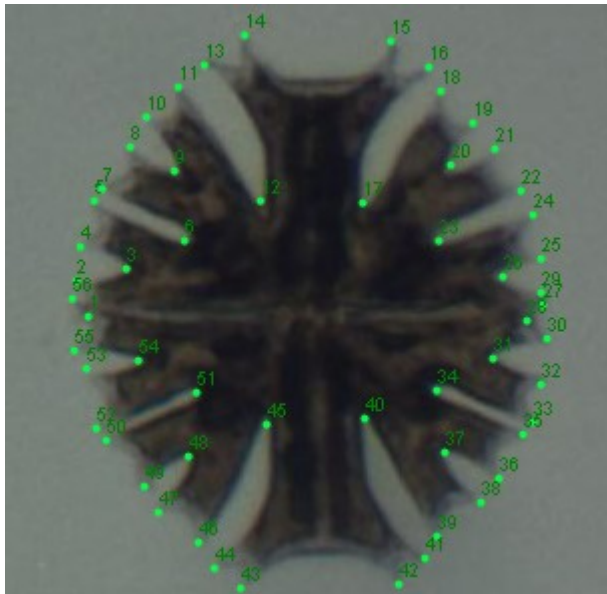
Přidáním příslušného množství  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  jsem vytvořila úrovně F ( $4\mu\text{M}$ ), E ( $2\mu\text{M}$ ), D ( $1\mu\text{M}$ ), C ( $0.2\mu\text{M}$ ), B ( $0.02\mu\text{M}$ ) a kontrolní skupinu A bez přidaného olova. Tyto úrovně byly zvoleny s ohledem na několik dříve publikovaných prací, které se zabývaly znečištěním sladkovodního prostředí olovem a ukázaly, že koncentrace olova mezi úrovněmi B a D se může trvale vyskytovat na různých sladkovodních stanovištích v regionech s historicky vysokým antropogenním znečištěním olova v atmosféře (Douben, 1989; Rothwell et al. 2007; Rothwell et al., 2007b) a zároveň odpovídají koncentracím, při kterých již byly pozorovány teratogenní změny u *M. compereana*. Hladiny E a F jsou pak záměrně nižší než hodnoty, při kterých již buňky *M. compereana* signifikantně nerostly (Neustupa & Woodard, 2020). Stabilní přístup k biologicky aktivním volným  $\text{Pb}^{2+}$  iontům byl zajištěn přítomností chelačního činidla kyselinou ethylendiamintetraoctovou (EDTA). Většina z nich tak byla

v médiu vázána jako  $\text{Pb-EDTA}^{2-}$  a postupně uvolňována do média podle fyzikálně-chemických rovnovážných zákonů, čímž bylo zajištěno stálé prostředí s konstantní koncentrací pro buňky dostupných  $\text{Pb}^{2+}$  iontů (Neustupa & Woodard, 2020).

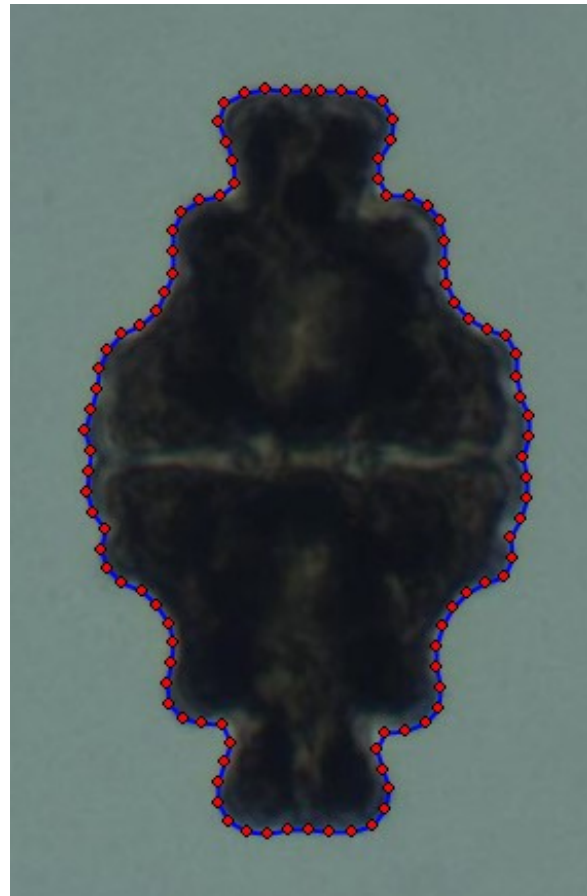
Následně jsem pomocí mikropipety přidala do každé z Erlenmeyerových baněk inokulum s několika málo desítkami buněk (<50) z vybrané kultury. Pro každou z koncentrací olova a každý kmen jsem naočkovala dvě paralelní baňky. Použila jsem k tomu kultivované krásivkové kmeny ze sbírek na PřF UK v Praze (CAUP) (Škaloud, 2019) a univerzitě v Hamburgu (MZCH) (Schwartzenberg et al., 2013): *M. radians* MZCH-SCVK 389 (Neustupa et al., 2010) a *E. humerosum* CAUP K502 (Neustupa & Škaloud, 2007). Naočkované exponované kultury byly udržovány při 24 °C a osvětlení  $40\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  pomocí 18W studených zářivek (Philips TLD 18 W33) v režimu světlo: tma (L: D) 12:12h a kultivovány po dobu 30 dní. Nakonec jsem materiál zafixovala Lugolovým roztokem (Křísa & Prášil, 1994).

## 2.2 Postup získání dat

Ve světelném mikroskopu Leica DM2500 jsem náhodně vybrala a pomocí mikrofotografického zařízení Bresser MikroCam 5.0 MP při zvětšení 200x vyfotografovala 30 dospělých buněk z každé úrovně koncentrace  $\text{Pb}^{2+}$  iontů pro oba studované kmeny. Poté jsem v programu Photoshop 7.0 fotografie beze změny velikosti nebo jiné úpravy obrázku ořízla a natočila tak, aby všechny buňky měly isthmus ve vodorovné poloze. Dále jsem tvary všech buněk digitalizovala pomocí umístění dvoj-dimensionálních bodů (landmarků) v programu TpsDig2 ver. 2.31 (Rohlf, 2015), abych je mezi sebou mohla porovnávat. U *M. radians* jsem pomocí funkce *digite\_landmark* umísťovala od externího růžku levého kvadrantu horní polobuňky po celém obrysu celkem 56 strukturálně odpovídajících bodů na špičky jednotlivých buněčných laloků i mezi ně (obr. 2.1) (Neustupa & Woodard, 2020). Pro *E. humerosum* jsem postupovala poněkud odlišně. Dva pevné body jsem umístila uprostřed polárního laloku horní polobuňky a pomocí poloautomatické funkce *draw\_background\_curve* jsem umístila postupně další landmarky po obrysu celé buňky tak, aby vzniklá křivka vždy co nejvíce odpovídala tvaru buňky. Poté jsem pomocí funkce *resample\_curve* a možnosti *by\_lenght* umístila celkem 100 equidistantních landmarků. (obr. 2.2) (Woodard & Neustupa 2022). Digitalizaci každé buňky jsem u obou druhů provedla dvakrát, nejprve po směru (CW) a poté protisměru (CCW) hodinových ručiček, abych



**Obrázek 2.1** umístění 56 strukturálně odpovídajících bodů na špičkách jednotlivých laloků a mezi nimi u *Microsterias radians* var. *bogoriensis*



**Obrázek 2.2** equidistantní landmarky s křivkou u *Euastrum humerosum*

kompensovala možnost chyby při umísťování landmarků na buněčný obrys. Souřadnice landmarků proti směru hodinových ručiček byly poté přeznačeny tak, aby odpovídaly štítkům z první digitalizace, pomocí programu R, ver. 4.1.2.(R Core Team, 2020). Takto vzniklá primární data jsou uložena v elektronické podobě ve studijním informačním systému UK.

### 2.2.1 Geometrická morfometrika

Geometrická morfometrika je analytická metoda založená na porovnávání tvarů, přičemž tvarem je zde v geometrickém pojetí myšlena veškerá geometrická informace o konfiguraci bodů ve dvou nebo třírozměrném prostoru, která zůstane, když se z ní odstraní velikost, poloha

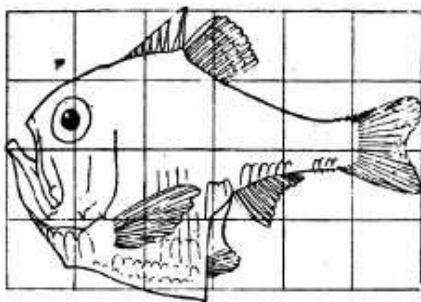


Fig. 517. *Argyropelecus Olfersi*.

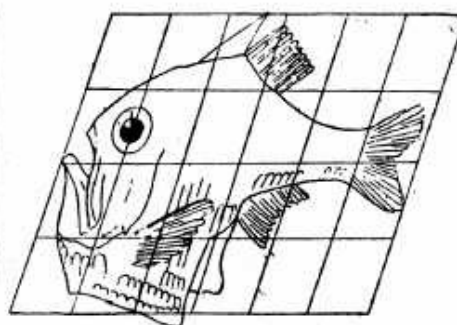


Fig. 518. *Sternoptyx diaphana*.

a rotace (Kendall, 1977). V roce 1917

**Obrázek 2.3** příklad transformační mřížky z knihy "On Growth and Form" (Thompson, 1917)

jako jeden z prvních základy pro tuto metodu položil ve své práci "On Growth and Form" D'Arcy Thompson. Přišel s myšlenkou transformačních mřížek (obr. 2.3), kde jeden objekt je transformován nebo pokriven do jiného. Rozdíly ve tvaru mezi objekty je pak možné popsat z hlediska rozdílu v deformačních mřížkách, které objekty zobrazují (Thompson, 1917). K většímu rozmachu této metody však došlo až v 90. letech 20. století, a to zejména v souvislosti se vznikem nových statistických a analytických metod (Adams et al., 2004; Rohlf & Bookstein 1990; Bookstein, 1992).

Jedním ze způsobů, jak lze samotný tvar popsat, je umístění konečného počtu bodů po obrysu či v rámci anatomické struktury objektu. Tyto body (landmarky) jsou vždy voleny tak, aby byly homologické mezi jednotlivými analyzovanými objekty (Stegmann & Gomez, 2002; Zelditch et al., 2004). Poté je nutné matematickými metodami odstranit veškerou netvarovou variabilitu uvnitř sebraných dat, tedy rozdíly v odlišné pozici, rotaci a velikosti jednotlivých konfigurací tak, aby bylo možné objekty statisticky porovnávat a geometrickou variabilitu graficky znázornit (Adams et al., 2004). K tomu jsem ve své práci použila metodu proktustovské superimpozice (Generalized Procrustes Analysis GPA, v některé literatuře jako Generalized least squares GLS) (Rohlf & Slice, 1990). Metoda zahrnuje vycentrování každé konfigurační matice (kompletní souřadnice landmarků v prostoru) vypočítáním jejího centroidu (souřadnice bodů nyní vyjadřují jejich odchylku od centroidu), škálování na centroidovou velikost a otáčení matic tak, aby mezi jednotlivými homologickými landmarky byla co nejmenší prokrustovská vzdálenost (Zelditch et al, 2004).

GPA jsem provedla pomocí programu R, ver. 4.1.2. (R Core Team, 2020) a v následném kroku jsem zprůměrovala CW i CCW landmarky tak, abych dostala vždy jednu sadu souřadnic landmarků pro každý objekt, která co nejpřesněji bude reprezentovat tvar dané buňky. Z těchto souřadnic jsem také vypočítala isoperimetrický koeficient (Osserman, 1978) pro každou buňku. Vznikly tak vždy dva datové soubory o 30 objektech pro každou jednu koncentraci a druh.

Takto upravené souřadnice, jež obsahují informaci o striktně tvarových rozdílech mezi objekty, jsem poté analyzovala pomocí mnohorozměrných statistických metod.

## 2.3 Zpracování dat statistickými metodami

Analýzy zkoumající korelace mezi různými úrovněmi chronických koncentrací olova a charakterem změn ve struktuře tvarové plasticity řas *E. humerosum* a *M. radians* jsem prováděla v programu PAST, ver 4.04 (Hammer et al., 2001). U hodnot isoperimetrického koeficientu mě kromě obecných statistických hodnot jako je medián a průměr také zajímalo, zda je rozdíl mezi jednotlivými skupinami v závislosti na dané koncentraci signifikantní, k čemuž jsem využila dvouskupinových t-testů. Dále jsem pak použila metodu PCA k ilustraci konkrétních rozdílů mezi tvary a trendy v tvarové plasticitě a MANOVA-CVA ke zjištění odlišitelnosti skupin objektů.

### 2.3.1 Isoperimetrický koeficient

Pro danou uzavřenou křivku, v případě mojí práce obrys každého digitalizovaného objektu, je isoperimetrický kvocient  $Q$  definován jako poměr její plochy a plochy kružnice se stejným obvodem (Kremer & Weisstein, 2022).

$$Q = \frac{4\pi A}{L^2}$$

Je vlastně měřítkem „kruhovosti“ dvou-dimensionálního objektu, přičemž čím více se objekt tvarem blíží kružnici, tím víc se hodnota  $Q$  blíží jedné (Croft et al., 1991).

### 2.3.2 T-test

T-test (Studentův test) je parametrický test na střední hodnotu vzorku neboli porovnání průměrů dvou vzorků (Dodge, 2008). V programu PAST, ver 4.04 (Hammer et al., 2001) je T-test pod záložkou „*Two sample test*“ a já jsem pracovala s hodnotou „*Monte Carlo permutation test*“, což je neparametrický ekvivalent T-testu testující předpoklad, že je-li nulová hypotéza platná, tak mají testované vzorky stejné průměrné hodnoty (Hammer, 2022). Jelikož jsem porovnávala několik na sobě nezávislých hodnot a prováděla jsem test opakovaně, snížila jsem hranici signifikance pomocí Bonferroniho korekce, abych zabránila získání falešně signifikantních výsledků (Weisstein, 2022). Chtěla jsem tak zjistit pravděpodobnost, s jakou může být pozorovaný rozdíl v průměrných hodnotách náhodný.



### 2.3.3 Analýza hlavních komponent

Analýza hlavních komponent (Principal component analysis, PCA) patří mezi ordinační metody. Jejich cílem je redukovat dimensionalitu dat tak, aby došlo k co nejmenší ztrátě informace (Palmer, 2022). PCA nahrazuje původní soubor pozorovaných proměnných souborem nových hypotetických komplexních proměnných (principal components, PCs), které jsou lineárními kombinacemi původních proměnných a které jsou na sobě vzájemně nezávislé. (Zelditch et al., 2004). Geometricky je pak PCA znázorňována jako rigidní rotace původní datové matice a může být definována jako projekce vzorků do nové sady os, takže největší variabilita je znázorňována podél první osy (PC1), největší variabilita nekorelující s první osou se promítá na osu druhou (PC2), největší variabilita nekorelující s první a druhou osou se promítá na osu třetí (PC3) atd. (Palmer, 2022). V grafu jsou pak tyto osy na sebe vždy kolmé a vzniká tak jakási mapa objektů, v tomto případě v dvojrozměrném prostoru, která pomocí vzdálenosti znázorňuje podobnost mezi jednotlivými objekty v závislosti na vybrané ose (PC). Čím jsou si dané objekty ve škále variability znaku podobnější, tím jsou v prostoru znázorněny blíže k sobě.

V rámci geometrické morfometriky je jako specifická varianta PCA používána metoda relativních deformací (Relative warps analysis, RWA) (Hammer, 2022; Zelditch et al., 2004; Bookstein, 1992). Relative warps jsou hlavní složkové vektory v daném prostoru a používají se k popisu hlavních trendů ve změnách tvaru mezi jednotlivými objekty ve vzorku jako deformace tvaru znázorněná na mřížce (Rohlf, 1993) a vycházejí z metody ohebných plátů (thin plate spline) (Bookstein, 1989). Díky nim je možné graficky znázornit objekt nacházející se kdekoli na kterékoliv PC vynásobením původních proměnných tvaru koeficientem PC a jejich sčítáním (Zelditch et al., 2004). V programu PAST, ver 4.04 k tomuto účelu slouží funkce „*PCA of 2D landmarks (relative warps)\_Deformations*“ (Hammer, 2022; Hammer et al., 2001).

### 2.3.4 Diskriminační kanonická analýza

Smyslem diskriminační kanonické analýzy (Canonical variates analysis, CVA) je co nejvíce zjednodušit popis rozdílů mezi skupinami a testovat jejich signifikanci. Stejně jako PCA vytváří nový souřadnicový systém (the canonical variates, CVs) a určuje hodnotu na těchto osách pro každý jednotlivý objekt. CVs jsou stejně jako PCs lineárními kombinacemi původních proměnných a jsou na sebe kolmé. Zatímco PCA se používá k popisu rozdílů mezi jednotlivci, CVA se používá k popisu rozdílů mezi průměry skupin (Zelditch et al., 2004).

Říká nám tedy, zda a do jaké míry je možné odlišit stanovené skupiny objektů na základě znaků, které máme k dispozici. V programu PAST, ver 4.04 (Hammer et al., 2001) je CVA pod funkcí „*Discriminant analysis*“ (Hammer, 2022).

K analýze signifikance rozdílů průměrných tvarů v jednotlivých skupinách jsem použila permutační mnohorozměrnou analýzu variance (permutational multivariate analysis of variance, permutational MANOVA) (Chatfield & Collins, 1980), v mém konkrétním případě opět s aplikováním Bonferroniho korekce. Součástí výpočtu analýzy rozptylu MANOVA je také výpočet hodnoty Wilksovy  $\lambda$  (lambda) (Hammer, 2022). Jedná se o jeden ze základních možných statistických testů k testování platnosti nulové hypotézy absence vztahu mezi nezávislým faktorem a mnohorozměrným souborem reprezentujícím závislou proměnnou (Carey, 1998). Hodnota lambda je mírou procentuálního rozptylu v závislých proměnných, který není vysvětlitelný rozdíly v úrovních nezávislé proměnné. Hodnota nula znamená, že neexistuje žádný rozptyl nevysvětlený nezávislou proměnnou. Tedy čím více se hodnota blíží nule, tím více daná proměnná přispívá k modelu (Glen, 2022).

### 3 VÝSLEDKY

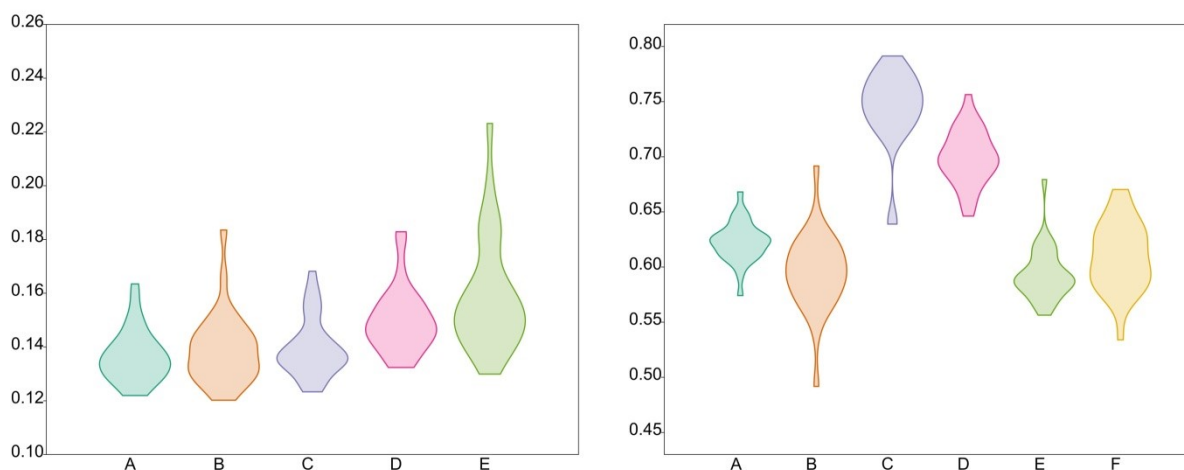
#### 3.1 Vliv koncentrace olova na isoperimetrický koeficient buněk

S pomocí příslušného skriptu jsem v programu R, ver. 4.1.2.(R Core Team, 2020) z landmarků vyznačených tvarů vypočítala isoperimetrické koeficienty pro jednotlivé vybrané buňky. Poté jsem porovnávala průměry a mediány jednotlivých skupin v rámci druhu, jejich konfidenční intervaly s konfidenční hladinou stanovenou na 95 % a pro ověření signifikance jsem ještě provedla T-test s Monte Carlo permutací a Bonferroniho korekcí pozorovaných p-hodnot pro vícenásobná srovnávání.

##### 3.1.1 *Micrasterias radians*

*Micrasterias radians* je druh s velmi komplexní, členitou a složitou morfologií, čemuž odpovídaly i výsledky tohoto výpočtu a isoperimetrický koeficient byl obecně velmi nízký (tab. 1.1). U kontrolní skupiny A byl průměr isoperimetrického koeficientu 0,137 a medián 0,135. U první testované koncentrace (úroveň B) byly průměr i medián o malinko vyšší než u kontrolní skupiny. Průměr byl 0,139 a medián 0,138, nicméně skupiny se v konfidenčním intervalu, kdy konfidenční hladina byla stanovena na 95 %, překrývaly, a i následný T-test potvrdil, že se nejedná o signifikantní rozdíl. Pro úroveň C byl vypočítaný průměr 0,140 a medián 0,137. Konfidenční interval se opět překrýval s těmi z úrovně s nižší koncentrací olova ( $Pb^{2+}$ ) v médiu a T-test potvrdil, že mezi skupinami žádný signifikantní rozdíl v jejich isoperimetrickém koeficientu není. Skupina D, pro kterou bylo v médiu použito pětinašobné množství rozpuštěného olova než u skupiny C a padesátinašobné oproti skupině B, již

**Obrázek 3.1** isoperimetrický koeficient v závislosti na množství  $Pb(NO_3)_2$  v živném médiu; A – kontrolní skupina, B – 0,02  $\mu M$ , C – 0,2  $\mu M$ , D - 1  $\mu M$ , E - 2  $\mu M$ , F - 4  $\mu M$ ; vlevo *M. radians*; vpravo *E. humerosum*



vykázala větší rozdíly ve výsledku. Průměr isoperimetrického koeficientu vyšel 0,150 a medián 0,143 a 95% konfidenční interval se již s žádnou s předchozích skupin nepřekrýval. I následný kontrolní T-test s Monte Carlo permutací a Bonferroniho korekcí, kdy jako signifikantní byla uvažována korigovaná hladina  $p < 0,005$ , ukázal vysokou míru signifikance rozdílu při porovnání se všemi přechozími skupinami (tab. 1.2). Úroveň E poté měla průměr 0,159 a medián 0,154, přičemž konfidenční interval se částečně překrýval s intervalem zjištěným u úrovně D a rozdíl nebyl signifikantní. Je tak možné pozorovat dvě složené signifikantně rozdílné skupiny (skupina složená z buněk v úrovni A, B, C a skupina složená z buněk v úrovni D, E), což je patrné i v grafu (obr. 3.1).

### 3.1.2 *Euastrum humerosum*

*Euastrum humerosum* je druhem morfologicky mnohem méně členitým než *M. radians* a může svým tvarem trochu připomínat bonbónek nebo dvě základnami k sobě spojené stupňovité pyramidky (obr. 2.2). Hodnoty isoperimetrického koeficientu tak byly výrazně vyšší (tab. 2.1) než v případně předchozího druhu. Kontrolní skupina A měla průměr 0,623 a medián 0,624. U tohoto druhu měla již nejnižší úroveň koncentrace olova v médiu signifikantní vliv na změnu isoperimetrického koeficientu buněk v populaci. Pro úroveň B došlo k poklesu průměru (0,596) i mediánu (0,596). Konfidenční interval hodnot se s konfidenčním intervalem kontrolní skupiny nepřekrýval a T-test potvrdil vysokou míru signifikance rozdílu mezi oběma skupinami. V úrovni C došlo naopak k výraznému zvýšení hodnot isoperimetrického koeficientu i nad hodnoty u kontrolní skupiny (graf 1). Průměr byl vypočítán na 0,745 a medián na 0,750. Konfidenční intervaly skupin se nepřekrývaly a výsledek T-testu opět potvrdil signifikanci rozdílu mezi skupinami. U buněk kultivovaných v úrovni D také došlo k výraznému navýšení hodnot isoperimetrického koeficientu proti hodnotám z kontrolní skupiny. Byl to průměr hodnot 0,699 oproti průměru 0,623 u kontrolní skupiny a medián 0,697 oproti 0,624 u kontrolní skupiny. Na rozdíl od hodnot zjištěných u úrovně C však došlo k signifikantnímu poklesu. T-test i porovnání konfidenčních intervalů ukazuje, že se jedná o dvě odlišitelné skupiny dle koncentrace olova použité při kultivaci v médiu. U zbývajících dvou skupin (úrovně E a F) je patrný další pokles hodnot (tab. 2.1), ale skupiny již jen na základně isoperimetrického koeficientu nejde signifikantně odlišit od sebe vzájemně ani od populace buněk z úrovně B. Nicméně liší se ve svém vztahu ke kontrolní skupině, kde hodnoty úrovně E jsou odlišitelné a hodnoty úrovně F nikoliv (tab. 2.2).

**Tabulka 1.1** Isoperimetrický koeficient vypočítaný s pomocí landmarků u buněk *Micrasterias radians* dle úrovně koncentrace Pb2+

úroveň	průměr	95% CI	medián	95% CI
A	0.137	[0.133,0.140]	0.135	[0.130,0.139]
B	0.139	[0.134,0.144]	0.138	[0.134,0.144]
C	0.140	[0.136,0.144]	0.137	[0.133,0.139]
D	0.150	[0.145,0.154]	0.148	[0.143,0.151]
E	0.159	[0.151,0.166]	0.154	[0.146,0.161]

**Tabulka 2.1** Isoperimetrický koeficient vypočítaný s pomocí landmarků u buněk *Euastrum humerosum* dle úrovně koncentrace Pb2+

úroveň	průměr	95% CI	medián	95% CI
A	0.623	[0.616,0.629]	0.624	[0.620,0.632]
B	0.596	[0.584,0.608]	0.596	[0.584,0.608]
C	0.745	[0.733,0.758]	0.750	[0.739,0.761]
D	0.699	[0.691,0.708]	0.697	[0.687,0.702]
E	0.594	[0.585,0.602]	0.589	[0.581,0.592]
F	0.610	[0.599,0.621]	0.610	[0.590,0.628]

**Tabulka 1.2** Výsledky T-testu isoperimetrických koeficientů s Monte Carlo permutací a Bonferroniho korekcí u buněk *Micrasterias radians*,  $p < 0,005$

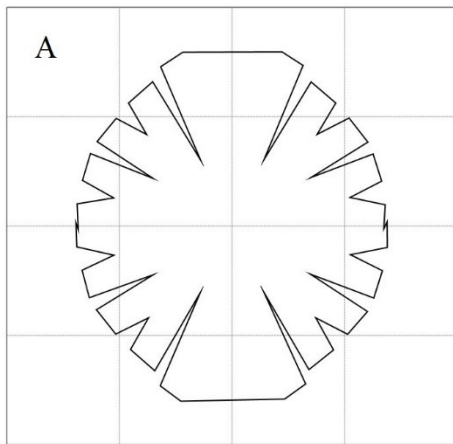
průměr IQ	úroveň	A	B	C	D	E
0,137	A	x	0,3992	0,259	0,0001	0,0001
0,139	B	0,3992	x	0,8764	0,0026	0,0002
0,140	C	0,259	0,8764	x	0,0017	0,0001
0,150	D	0,0001	0,0026	0,0017	x	0,0392
0,159	E	0,0001	0,0002	0,0001	0,0392	x

**Tabulka 2.2** Výsledky T-testu isoperimetrických koeficientů s Monte Carlo permutací a Bonferroniho korekcí u buněk *Euastrum humerosum*,  $p < 0,003333$

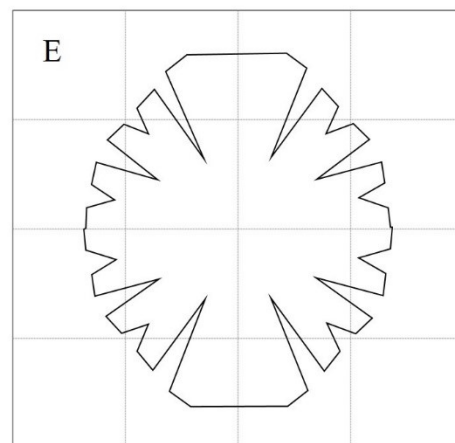
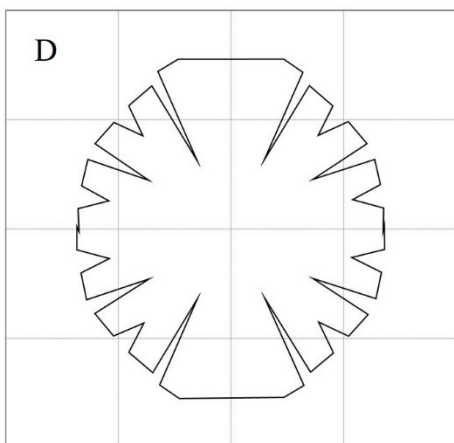
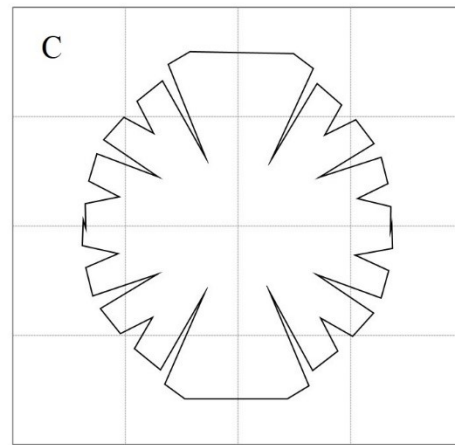
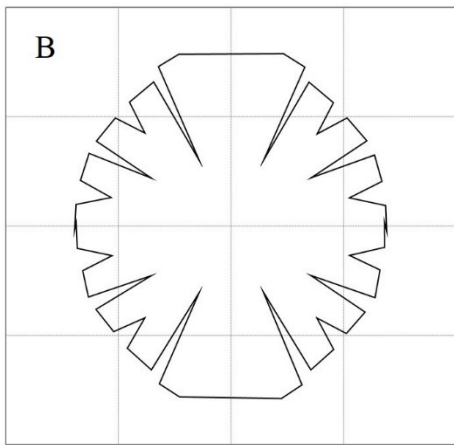
průměr IQ	úroveň	A	B	C	D	E	F
0,62268	A	x	0,0002	0,0001	0,0001	0,0001	0,0574
0,59567	B	0,0002	x	0,0001	0,0001	0,8038	0,1052
0,7446	C	0,0001	0,0001	x	0,0001	0,0001	0,0001
0,69932	D	0,0001	0,0001	0,0001	x	0,0001	0,0001
0,5937	E	0,0001	0,8038	0,0001	0,0001	x	0,0265
0,60996	F	0,0574	0,1052	0,0001	0,0001	0,0265	x

### 3.2 Rekonstrukce tvaru pomocí tvarových mřížek

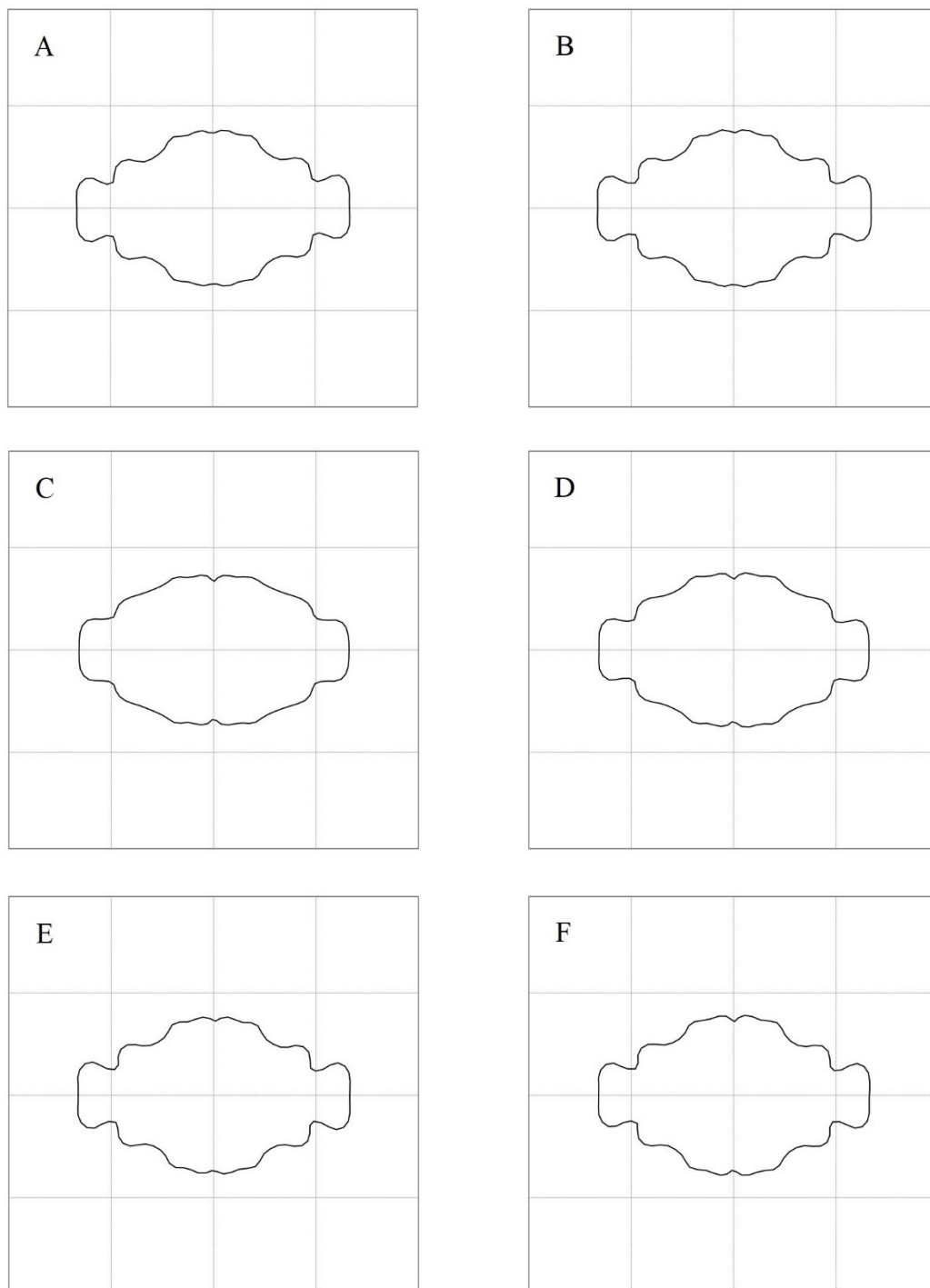
Obrázky 3.2 a 3.3 ukazují modely ideálního průměrného zástupce dle druhu za každou skupinu. U *M. radians* není až na zástupce skupiny E zřetelně viditelný žádný rozdíl, u něj jsou pak jen mírně otevřenější záhyby mezi laloky než u ostatních. *E. humerosum* oproti tomu v úrovni C a D nabývá zcela zřetelně očima pozorovatelný odlišný tvar, než mají zástupci ostatních skupin.



**Obrázek 3.2** ideální průměrný tvar *M. radians* dle skupiny; A – kontrolní skupina, B – 0,02  $\mu\text{M}$ , C – 0,2  $\mu\text{M}$ , D - 1  $\mu\text{M}$ , E - 2  $\mu\text{M}$



**Obrázek 3.3** ideální průměrný tvar *E. humerosum* dle skupiny; A – kontrolní skupina, B – 0,02  $\mu\text{M}$ , C – 0,2  $\mu\text{M}$ , D – 1  $\mu\text{M}$ , E – 2  $\mu\text{M}$ , F – 4  $\mu\text{M}$



### 3.3 Celková tvarová plasticita

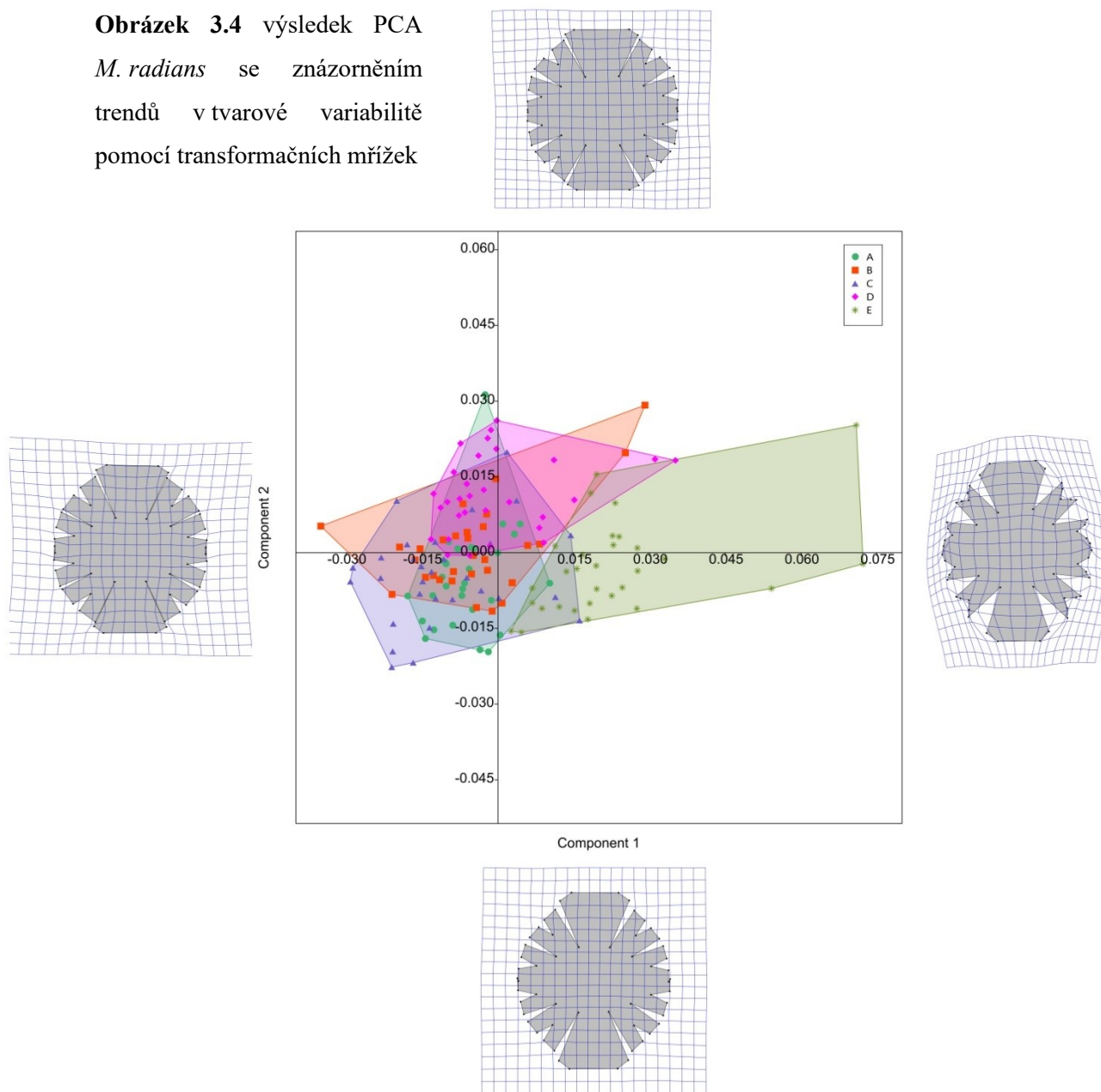
#### 3.3.1 *Micrasterias radians*

Na ordinačním diagramu prvních dvou os PCA (obr. 3.4) je znázorněna tvarová variabilita druhu *M. radians* podle první (63,81 %) a druhé (17,39 %) osy. Pomocí transformačních mřížek jsou pak znázorněny tvarové trendy, kdy první osa představuje změnu v otevřenosti záhybů mezi laloky. V záporných hodnotách na ní leží buňky s uzavřenými záhyby a mohutnými laloky a v kladných hodnotách zástupci se záhyby otevřenějšími a laloky užšími až v extrému se záhyby výrazně široce otevřenými a laloky s až redukováným členěním (obr. 3.5). Na ose druhé je nejvýraznější změnou délka polárního laloku v poměru k lalokům ostatním, kdy v záporných hodnotách je apikální lalok protáhlejší a v kladných zkrácený a celá buňka tak může působit poněkud zploštělým dojmem.

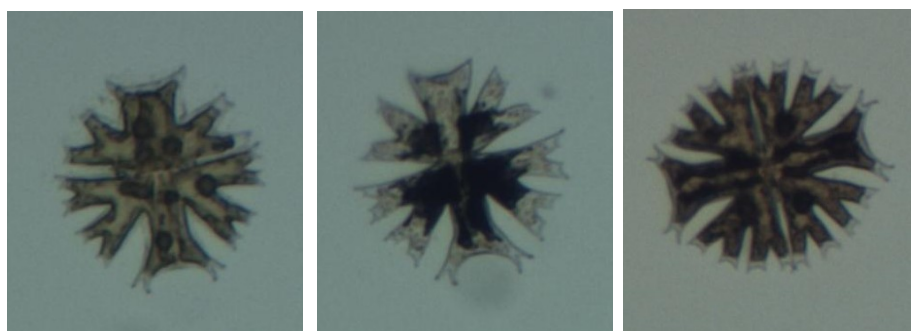
Poloha jednotlivých buněk v ordinačním prostoru (obr. 3.4) potvrzuje, že celá skupina studovaných buněk je relativně uniformní a dle tvaru až na jednu skupinu téměř neodlišitelná, což lze vyčíst z výrazného vzájemného překryvu jednotlivých skupin. Pouze skupina E leží poněkud stranou s drobným překryvem s ostatními skupinami tam, kde jsou na první ose jejich zástupci nabývající extrémně kladných hodnot, které představují prakticky deformaci buněk a již na první pohled viditelnou změnu. Tyto zřídka viditelné deformace se ve skupinách s nižší koncentrací olova v médiu nevyskytovaly vůbec. Nicméně se zvyšující se koncentrací olova v médiu jsou z grafu patrní jedinci dosahující obecně právě na první ose variability extrémních hodnot v rámci vlastní skupiny, a tedy její větší celková vnitroskupinová variabilita. Kontrolní skupina vytváří v grafu poměrně kompaktní shluk až na jednoho zástupce, který leží velmi osamoceně v kladných hodnotách druhé osy.



**Obrázek 3.4** výsledek PCA *M. radians* se znázorněním trendů v tvarové variabilitě pomocí transformačních mřížek



**Obrázek 3.5** malformace buněk *M. radians* ve skupině E ve srovnání s buňkou z kontrolní skupiny (vpravo)

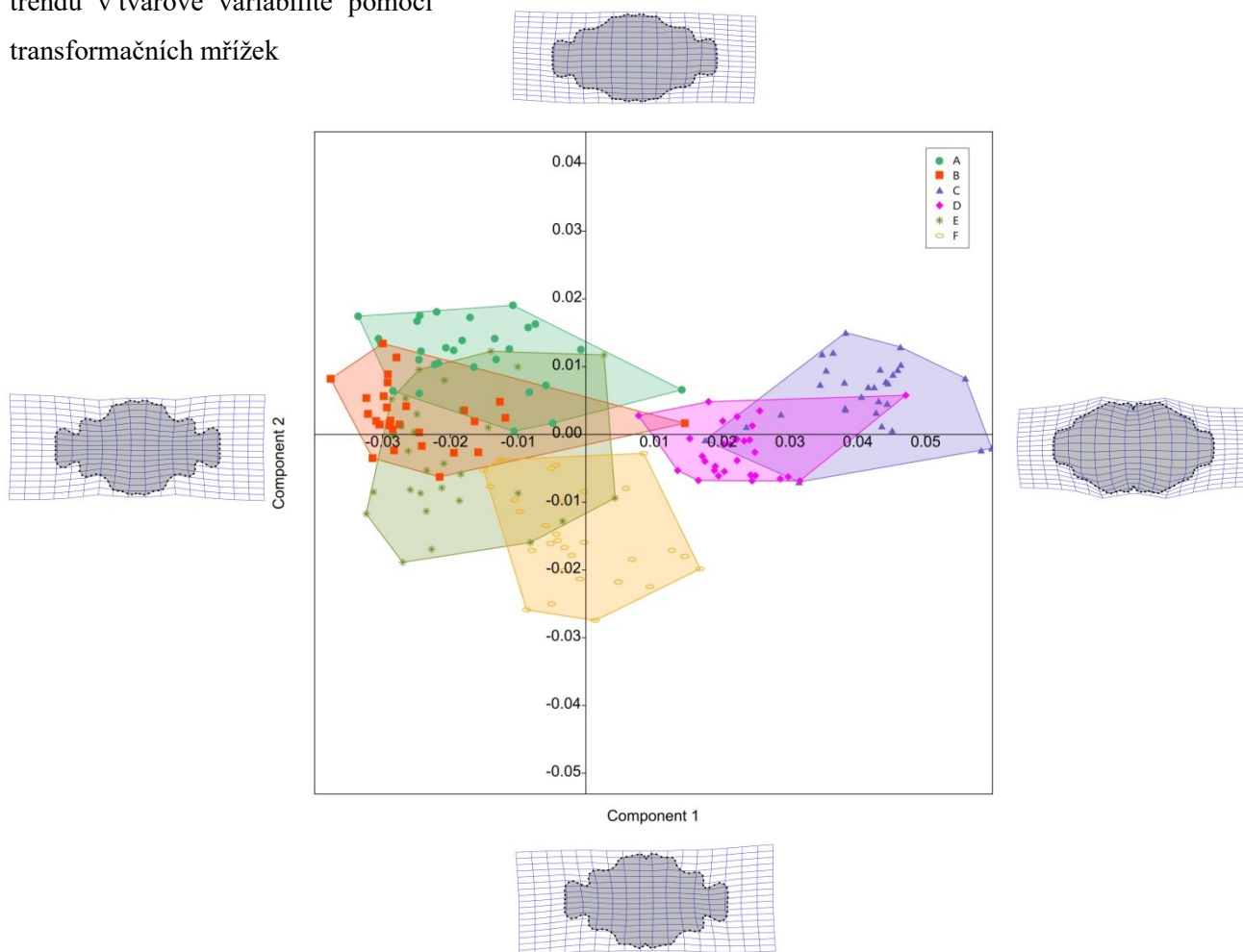


### 3.3.2 *Euastrum humerosum*

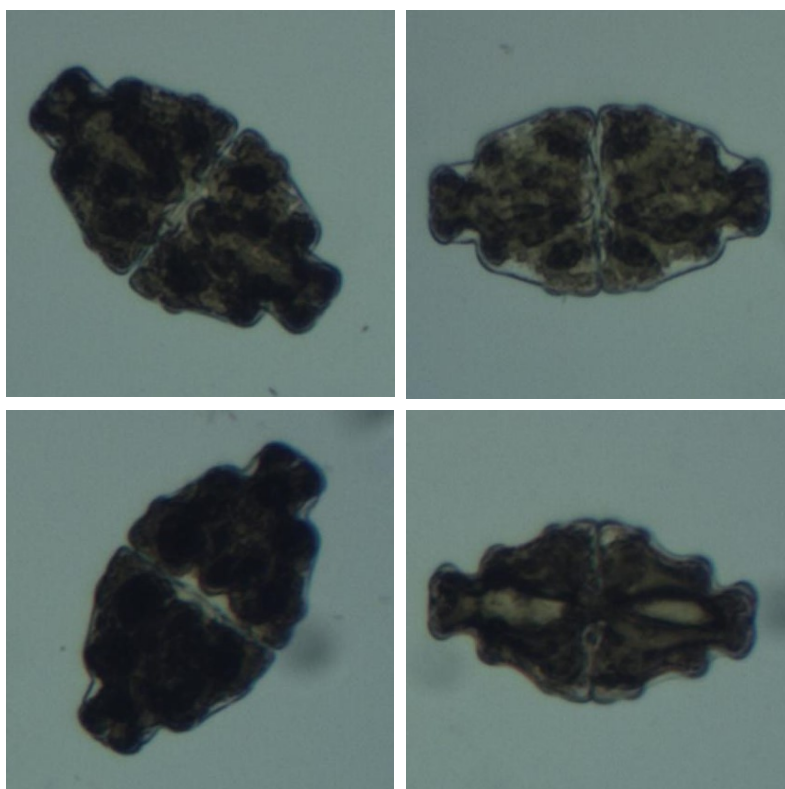
Tvarová variabilita mezi skupinami buněk druhu *Euastrum humerosum* byla výrazně vyšší (obr. 3.6). Ordinační diagram ukazuje variabilitu na první (84,15 %) a druhé (9,94 %) ose a opět jsou zde pomocí transformačních mřížek znázorněny tvarové trendy. Na první ose jde o vykrojenost laloků. V záporných hodnotách jsou buňky zřetelně strukturovanější, zatímco v kladných hodnotách první osy je trend buněčnou stěnu zcela rovnat a jakékoliv prohlubně jsou prakticky anulovány. Na druhé ose je pak trend poněkud podobný, jen méně výrazný.

Z grafu jsou patrné dvě poměrně dobře oddělené skupiny na první ose a to A, B, E a F jako jedna skupina převažující v záporných hodnotách a obsahující tak buňky spíše vykrojenější. Druhá skupina sestávající z úrovní C a D naopak leží v hodnotách kladných a tomu odpovídá tvarový trend zarovnávaní prohlubní a zakulacování buněk (obr. 3.6). V rámci první skupiny pak jsou na první ose výrazné překryvy, nicméně skupina C a D jsou z větší části nepřekrývající se a překryv je způsoben pouze několika jedinci s extrémními hodnotami v rámci vlastní skupiny. Především buňky ze skupiny C mají velmi charakteristický tvar (obr. 3.7) na první pohled snadno odlišitelný od buněk z kontrolní skupiny. Na ose druhé je pak variabilnější první skupina. F jako jediná poměrně výrazně vybočuje od všech ostatních skupin směrem k záporným hodnotám. Skupina E se mírně překrývá s kontrolní skupinou a skupina B leží na přechodu mezi nimi a má tak z obou stran překryv se skupinou A i E.

**Obrázek 3.6** výsledek PCA pro *E. humerosum* se znázorněním trendů v tvarové variabilitě pomocí transformačních mřížek



**Obrázek 3.7** příklady náhodných buněk *E. humerosum* ze skupiny C ve srovnání s buňkou z kontrolní skupiny (vpravo dole)



### 3.4 Výsledky diskriminační analýzy

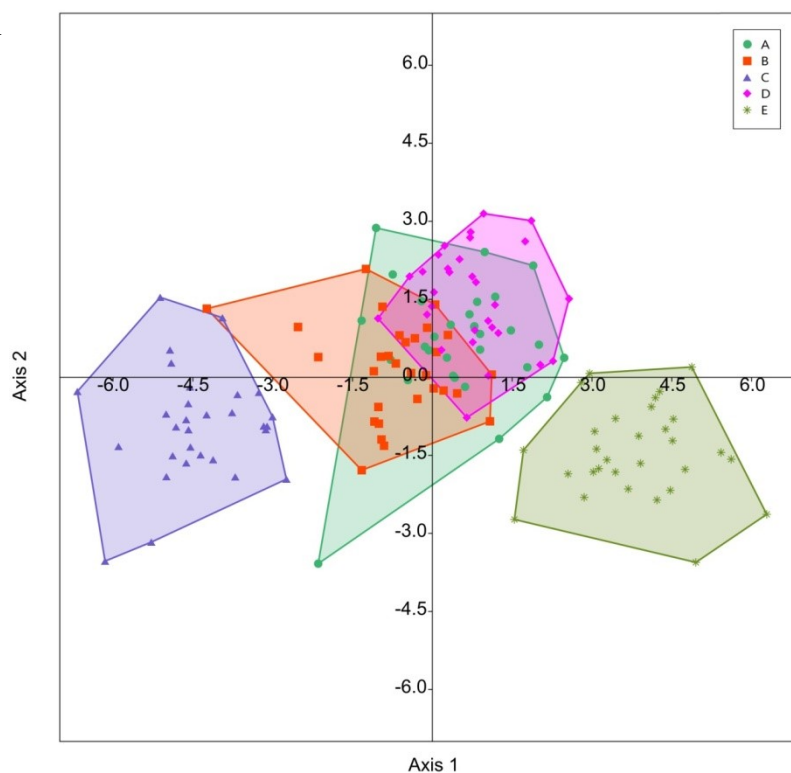
#### 3.4.1 *Micrasterias radians*

Statistické porovnání průměrů tvarů daných skupin opět ukázalo trendy z předchozích analýz. CVA pro *Micrasterias radians* vyjadřuje na první ose 79,23 % a na druhé 12,92 % variability (obr. 3.8). Kontrolní skupina A a skupiny B a D se vzájemně překrývají ve středu grafu. Samotné B a D jsou nicméně odlišitelné. V grafu sice k nějakému překryvu skupin dochází, ale dle výsledků výpočtu mnohorozměrné analýzy variance (MANOVA), která testovala signifikanci rozdílů mezi jednotlivými skupinami, jsou signifikantně odlišitelné (tab 1.3). Skupina C leží v záporných hodnotách první osy a skupina E v hodnotách kladných. Odlišitelnost posledně zmíněných dvou skupin je patrná jak z grafu, tak z tabulky výsledků MANOVA testu.

**Tabulka 1.3** Výsledky analýzy rozptylu MANOVA pro *M. radians* s Bonferroniho korekcí, Wilksova lambda 0,02964

úroveň	A	B	C	D	E
A	x	0,058407	2,64E-11	0,080393	5,24E-08
B	0,058407	x	7,48E-08	0,013623	4,29E-10
C	2,64E-11	7,48E-08	x	2,49E-12	8,71E-18
D	0,080393	0,013623	2,49E-12	x	1,80E-08
E	5,24E-08	4,29E-10	8,71E-18	1,80E-08	x

**Obrázek 3.8** výsledek CVA pro *M. radians*



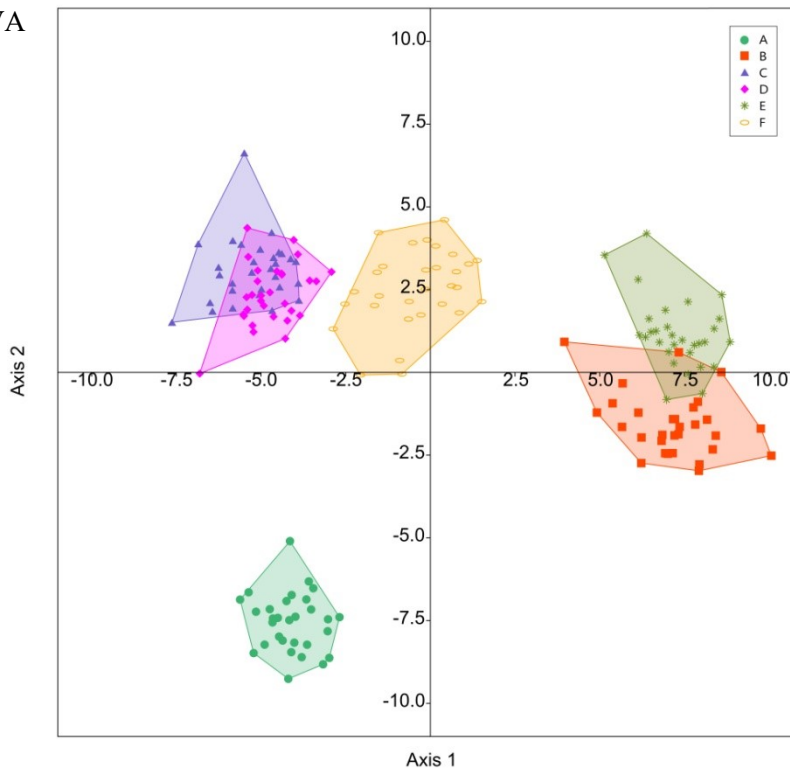
### 3.4.2 *Euastrum humerosum*

Výsledky CVA/MANOVA u *E. humerosum* ukazují, že se průměrné tvary všech skupin od sebe vzájemně signifikantně liší (tab. 1.4). Osy v grafu (obr. 3.9) vysvětlují celkem 90,3 % variability mezi skupinami. První osa vyjadřuje 61,04 % a druhá osa 29,26 %. Kontrolní skupina pak leží zcela osamoceně v levém dolním kvadrantu grafu. Dále je dobře vyčleněna skupina F, zatímco skupiny C a D tvoří shluk v levém horním kvadrantu a skupiny B a E v kvadrantu pravém horním.

**Tabulka 1.4** Výsledky analýzy rozptylu MANOVA pro *E. humerosum* s Bonferroniho korekcí, Wilksova lambda 0,0002841

úroveň	A	B	C	D	E	F
A	x	8,16E-25	1,84E-22	1,36E-20	1,52E-26	1,59E-22
B	8,16E-25	x	2,40E-25	1,86E-24	2,67E-05	7,28E-21
C	1,84E-22	2,40E-25	x	1,11E-05	6,64E-25	1,53E-17
D	1,36E-20	1,86E-24	1,11E-05	x	8,81E-24	2,96E-12
E	1,52E-26	2,67E-05	6,64E-25	8,81E-24	x	1,53E-18
F	1,59E-22	7,28E-21	1,53E-17	2,96E-12	1,53E-18	x

**Obrázek 3.9** výsledek CVA pro *E. humerosum*



## 4 DISKUZE

Z výsledků měření vyplývá, že oba studované druhy signifikantně reagovaly na vystavení nízké chronické koncentrace olova změnami ve své morfogenezi. U obou došlo k redukcí plochy povrchu snížením komplexity buněk, nicméně každý z druhů se ukázal být citlivý k jiné úrovni kontaminace ionty  $Pb^{2+}$  v prostředí a rovněž dynamika pozorované změny se různila. U druhu *M. radians* byly změny v morfologii buněk vyvíjejících se v různých koncentracích  $Pb^{2+}$  spíše pozvolnější a až při vyšších koncentracích se projevila především vyšší plasticita dotčených skupin, zejména kvůli přítomnosti několika extrémně malformovaných buněk v nejvyšší použité koncentraci, což bylo ovšem očekávatelné na základě předchozích studií u příbuzného druhu *M. rotata* (Neustupa & Woodard, 2020).

Naopak výsledky morfometrických analýz u *E. humerosum* byly relativně velmi překvapivé. Buňky v nižších koncentracích reagovaly velmi citlivě, změny tvaru byly plošně v celé populaci uniformní a zřetelné na první pohled. Při vyšších koncentracích se však buňky vracely zdánlivě zpět k morfologii typické pro populace rostoucí v prostředí bez kontaminace olovem a rozdíl mezi okrajovými skupinami již nebyl bez použití metod geometrické morfometrie prakticky patrný. Navíc nedošlo ani ke zvýšení plasticity těchto skupin ve srovnání s kontrolní populací.

Rozdíl v chování jednotlivých druhů by mohl být způsoben relativně větší fylogenetickou vzdáleností mezi druhy, nicméně zatímco se zástupci rodu *Micrasterias* byly v minulosti prováděny různé studie týkající se toxického vlivu těžkých kovů na buněčnou strukturu a morfologii (Andosch et al., 2012; Volland et al., 2011; Volland et al., 2012; Volland et al., 2014; Neustupa & Woodard, 2020), tak rod *Euastrum* v tomto ohledu nebyl zatím příliš studován a je tedy otázkou, zda se jedná o výjimečnou reakci pouze jednoho druhu, či by se podobné změny v morfogenezi a jejich dynamika mohly vyskytovat i u jiných zástupců této linie.

Je nicméně pozoruhodné, že podobnou dynamiku citlivosti na různé koncentrace olova v prostředí, jakou jsem pozorovala u *E. humerosum*, popsal u některých desmídií ve vztahu k různým těžkým kovům již v roce 1955 Walter Url (Url, 1955). Buňky vybraných druhů kultivoval na gradientu koncentrací různých těžkých kovů (Zn, Mn, V, Cr, Cu). U některých kovů (např. Cr a V) docházelo ve středních koncentracích gradientu k zastavení růstu a odumření populace, zatímco ve vyšších koncentracích populace rostly dále. Tento fenomén byl popsán pomocí interpretačního rámce tzv. „death zones“. Efekt by mohl být způsoben

solemi těžkých kovů, které vytvoří nevratně koagulovanou ochrannou vrstvu na povrchu cytoplasmy vyvíjející se buňky, která by alespoň po určitou významně dlouhou dobu mohla bránit vstupu těchto solí do buňky, případně by se tím snížila dostupnost těžkého kovu v roztoku, protože by byl pevně navázán na povrchu buňky (Brook, 1981). Olovo do buněk krásivek neproniká, ale pravděpodobně nahrazuje pektin vázaný  $\text{Ca}^{2+}$  v primárních stěnách vyvíjejících se polobuněk (Lütz-Meindl, 2016), což by v případě jeho navázání do nějaké nerozpustné vrstvy nebylo možné a buňka by tak mohla být nepříznivému vlivu působení těžkého kovu uchráněna.

Pro toxicitu olova je zásadní právě jeho biologická dostupnost pro živé buňky. Obvykle je však v přírodě většina iontů  $\text{Pb}^{2+}$  vázána na různé organické látky, v mokřadních biotopech typicky na huminové kyseliny, které se v takových lokalitách v hojné míře vyskytují (De Schampelaere et al., 2014; Lamelas et al., 2009). V mojí práci jsem tuto skutečnost nasimulovala přítomností EDTA, která působí jako chelatační činidlo a olovnaté ionty se tak uvolňovaly postupně, podobně jako se to děje mimo laboratorní podmínky. I takto chelatované ionty mají vliv na růst buněk, protože vytváří ternární komplexy na povrchu stěn buněk (Lamelas et al., 2005; Lamelas et al., 2009) a citlivost dané buňky k působení olova je pak dána i dostupností a počtem volných vazebných míst na svém povrchu (Lamelas et al., 2005).

Je zároveň představitelné, že by rozdíl v dynamice změn v morfogenezi mohl být dán i samotným významným rozdílem v komplexitě tvarů studovaných druhů spíše než jejich fylogenetickou vzdáleností. Pokud by tomu tak bylo, daly by se do budoucna vytipovat další druhy, případně rody, které by mohly vykazovat obdobné vlastnosti jako *E. humerosum* a které by mohly být vhodné k dalšímu zkoumání tohoto jevu zvaného v literatuře jako „death zones“.

*E. humerosum* se dle pozorování zdá být vhodným kandidátem k bioindikaci určitých koncentrací olova v prostředí přímo v terénu bez nutnosti měření a dalšího statistického zpracování v laboratoři. Úrovně koncentrací, při kterých byla pozorována na první pohled patrná změna tvaru, odpovídají  $25,9 \mu\text{g.l}^{-1}$  a  $129,5 \mu\text{g.l}^{-1}$  celkového olova v médiu, což je více než je povolený limit pro pitnou vodu, který je v ČR stanoven na  $10 \mu\text{g.l}^{-1}$  dle vyhlášky č. 252/2004 Sb. (www.mvcr.cz) a zároveň i několikanásobně více, než bylo běžně naměřeno v místech s lodní dopravou (Byrd & Perona, 1980), případně v potocích odvodňujících rašelinná stanoviště v regionech zasažených atmosférickými imisemi olovnatých iontů

z průmyslové produkce (Rothwell et al., 2007b). Nejedná se tedy o reakci na běžnou míru znečištění, ale na výraznější, byť i dočasnou kontaminaci prostředí olovem. Při nalezení buněk příslušného tvaru by se tak dalo říci, že v prostředí pravděpodobně došlo k nějaké nežádoucí události, která musela vést k většímu zatížení daného habitatu. K takovému nárazovému zvýšení koncentrace olova v povrchových vodách může docházet například kvůli vymývání vázaného olova z rašeliny během bouřek nebo jeho uvolnění po požáru rašeliny, pokud sledovaná povrchová voda rašelině odvodňuje (Rothwell et al., 2005; Rothwell et al., 2007a). To samé by se dalo říci i při nalezení silně malformovaných buněk *M. radians*, nicméně tento druh je k působení olova méně citlivý, takže by to poukazovalo na vyšší koncentraci olova v prostředí a výrazné malformace nebyly v mojí práci pozorované příliš často, takže tento druh pro přímou bioindikaci podle mých zjištění vhodný spíše není. Naproti tomu *E. humerosum*, u něhož byly pozorované změny uniformní a postupovaly většinou pozorované populace, je také relativně hojný, až predikovatelný druh v kyselých minerotrofních mokřadech (Coesel & Meesters, 2007; Kaštovský et al., 2008), což jeho potenciál jako modelového druhu vhodného k bioindikaci ještě zvyšuje.

Obecně jsou změny v morfologii buněk jednobuněčných řas dobrým indikátorem při biomonitoringu znečištění prostředí vodních ekosystémů. Typicky mají tyto organismy krátké generační cykly, díky čemuž může dojít ke změně v populaci rychle v reálném čase, což se pak projeví právě třeba během morfogeneze změnou tvaru a přítomností různých malformací (Falasco et al., 2009; Volland et al., 2014; Olenici et al., 2017; Neustupa & Woodard, 2020). Často také mají buňky s pevnou buněčnou stěnou, případně jsou ohraničeny obalem z anorganických látek, což umožňuje jejich měření pomocí metod geometrické morfometriky a tím snadnější studování vztahu mezi tvarovou plasticitou a vybranou ekologickou proměnou (Neustupa & Woodard, 2020). Zvláštní pozornost je pak věnována především různým druhům rozsivek. Díky jejich velikosti, širokému rozšíření, pevné křemičité schránce a mechanismu rozmnožování, jsou změny v morfologii jejich schránek v souvislosti s různými ekologickými proměnnými studovány již od konce 19. století a na základě těchto prací byly vytipováni někteří modeloví zástupci vhodní k bioindikaci přítomnosti konkrétních těžkých kovů při biomonitoringu (Falasco et al., 2009; Falasco et al., 2009b; Cerisier et al., 2018; Woodard & Neustupa, 2022). Nevýhodou rozsivek jako okamžitého bioindikátoru přítomnosti těžkých kovů v prostředí může být skutečnost, že při nepohlavním rozmnožování samotným mechanismem procesu dochází k zesilování pozorovaného signálu v každé další nepohlavní generaci (Woodard & Neustupa, 2022).



Různé skupiny mikrořas se tak mohou při znalosti jejich výhod a nevýhod plynoucích z jejich biologie při biomonitoringu vhodně doplňovat. Má tedy smysl hledat další modelové organismy i v jiných řasových skupinách.

## 5 ZÁVĚR

Má práce v zásadě potvrdila předchozí publikované výzkumy na různých desmidiálních modelových druzích. Jejich buňky jsou citlivé k přítomnosti a působení rozpuštěného olova v prostředí, nicméně v rozličné míře dle studovaného krásivkového druhu. Citlivost se projevuje změnami v morfogenezi a může být viditelná pouhým okem na první pohled, díky čemuž mohou být někteří zástupci skupiny vhodnými kandidáty k okamžité bioindikaci olova v prostředí. Dále jsem ukázala, že fenomén takzvaných „*death zones*“, jehož existence u desmidiálních zelených řas v souvislosti s těžkými kovy není zatím příliš dobře prozkoumána, se alespoň u druhu *Euastrum humerosum* projevuje i v případě toxického působení iontů  $Pb^{2+}$ , což by mohlo být využito jako východisko k dalšímu bádání v tomto směru.

## 6 POUŽITÁ LITERATURA

ADAMS, D. C., F. J. ROHLF & D. E. SLICE (2004). Geometric morphometrics: Ten years of progress following the 'revolution'. *Italian Journal of Zoology*. 71(1), 5-16.

ANDERSEN, R. A., (2005). *Algal Culturing Techniques*. Elsevier Acad Press, London.

ANDOSCH, A., M. J. AFFENZELLER, C. LÜTZ & U. LÜTZ-MEINDL (2012). A freshwater green alga under cadmium stress: Ameliorating calcium effects on ultrastructure and photosynthesis in the unicellular model *Micrasterias*. *Journal of Plant Physiology*. 169(15), 1489-1500.

ANDOSCH, A., M. HÖFTBERGER, C. LÜTZ & U. LÜTZ-MEINDL (2015). Subcellular sequestration and impact of heavy metals on the ultrastructure and physiology of the multicellular freshwater alga *Desmidium swartzii*. *International Journal of Molecular Sciences*. 16(12), 10389-10410.

DE ARAÚJO, C. B., C. E. DE MATTOS BICUDO, T. G. DA SILVA, J. ŠTASTNÝ, K. TRUMHOVÁ & P. ŠKALOUD (2022). Hidden generic diversity in desmids: description of *Pseudomicrasterias* gen. nov. (Desmidiaceae, Zygnematophyceae). *Phycologia*. 61(3), 227-240.

ARUNAKUMARA, K. K. I. U. & X. ZHANG (2008). Heavy metal bioaccumulation and toxicity with special reference to microalgae. *Journal of Ocean University of China online*. 7(1), 60-64.

BAJGUZ, A. (2011). Suppression of *Chlorella vulgaris* growth by cadmium, lead, and copper stress and its restoration by endogenous brassinolide. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 60(3), 406-416.

BECKER, B. & B. MARIN (2009). Streptophyte algae and the origin of embryophytes. *Annals of Botany*. 103(7), 999-1004.

BERNARD, CH. (1908). *Protococcacées et desmidiées d'eau douce, récoltées à Java et décrites*. Landsdrukkerij.

BOOKSTEIN, F.L. (1989). Principal warps: thin-plate splines and the decomposition of deformations. *IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence*. 11(6), 567-585.

- BOOKSTEIN, F. L. (1992). *Morphometric Tools for Landmark Data*. Cambridge University Press.
- BROOK, A. J. (1981). *The Biology of Desmids*. Blackwell Sci, Oxford.
- BYRD, J. E. & M. J. PERONA (1980). The temporal variations of lead concentration in a freshwater lake. *Water Air Soil Pollut.* 13, 207–220.
- CAREY, G. (1998). *Multivariate Analysis of Variance (MANOVA): I. Theory*. Academic Press, Boston.
- CERISIER, A., J. VEDRENNE, I. LAVOIE & S. MORIN (2018). Assessing the severity of diatom deformities using geometric morphometry. *Botany Letters*. 166(1), 32-40.
- COESEL, P.F.M., & J. MEESTERS (2007). *Desmids of the lowlands*. KNNV Publ, Zeist.
- CROFT, H. T., K. J. FALCONER & R. K. GUY (1991). *Unsolved Problems in Geometry*. Springer, New York.
- CULLEN, J. T. & J. MCALISTER (2017). 2. Biogeochemistry of lead. Its release to the environment and chemical speciation. In SIGEL, A., S. Helmut & R.K.O. SIGEL, ed. *Lead – Its Effects on Environment and Health*. De Gruyter, 2017-4-10, s. 21-48.
- DANOUCHE, M., N. EL GHATCHOULI & H. ARROUSSI (2022). Overview of the management of heavy metals toxicity by microalgae. *Journal of Applied Phycology*. 34(1), 475-488.
- DE SCHAMPHELAERE, K. A. C., J. L. STAUBER, K. L. WILDE, S. J. MARKICH, P. L. BROWN, N. M. FRANKLIN, N. M. CREIGHTON a C. R. JANSSEN (2005). Toward a biotic ligand model for freshwater green algae: Surface-bound and internal copper are better predictors of toxicity than free Cu<sup>2+</sup>-ion activity when pH is varied. *Environmental Science & Technology*. 39(7), 2067-2072.
- DE SCHAMPHELAERE, K. A. C., C. NYS & C.R. JANSSEN (2014). Toxicity of lead (Pb) to freshwater green algae: Development and validation of a bioavailability model and inter-species sensitivity comparison. *Aquatic Toxicology*. 155, 348-359.

- DE-LAMONICA-FREIRE, E.M., & C.W. HECKMAN (1996). The seasonal succession of biotic communities in wetlands of the tropical wet-and-dry Climatic Zone: III. The algal communities in the Pantanal of Mato Grosso, Brazil, with a comprehensive list of the known species and revision of two desmid taxa. *Internationale Revue der gesamten Hydrobiologie*. 81(2): 253-280.
- DODGE, Y. (2008). *The Concise Encyclopedia of Statistics*. Springer, New York.
- DOUBEN, P. E. T. (1989). Changes in concentration of lead and cadmium in water from three rivers in Derbyshire. *Environmental Pollution*. 61(3), 211-226.
- FALASCO, E., F. BONA, G. BADINO, L. HOFFMANN & L. ECTOR (2009). Diatom teratological forms and environmental alterations: a review. *Hydrobiologia*. 623(1), 1-35.
- FALASCO, E, F BONA, M GINEPRO, D HLÚBIKOVÁ, L HOFFMANN & L ECTOR (2009b). Morphological abnormalities of diatom silica walls in relation to heavy metal contamination and artificial growth conditions. *Water SA*. 35(5), 595-605.
- FISHER, N. S., G. J. JONES & D. M. NELSON (1981). Effects of copper and zinc on growth, morphology, and metabolism of *Asterionella japonica* (Cleve) 1. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 51(1), 37-56.
- GAUTAM, S., L. K. PANDEY, V. VINAYAK & A. ARYA (2017). Morphological and physiological alterations in the diatom *Gomphonema pseudoaugur* due to heavy metal stress. *Ecological Indicators*. 72, 67-76.
- GITZENDANNER, M. A., P. S. SOLTIS, G. K.-S. WONG, B. R. RUHFEL & D. E. SOLTIS, (2018). Plastid phylogenomic analysis of green plants: A billion years of evolutionary history. *American Journal of Botany*. 105(3), 291-301.
- GLEN, S., (2022). "Wilks' Lambda: Simple Definition". *StatisticsHowTo.com: Elementary Statistics for the rest of us!* [online]. [cit. 2022-03-12] Dostupné z: <https://www.statisticshowto.com/wilks-lambda/>
- GONTCHAROV, A. A. & M. MELKONIAN (2008). In search of monophyletic taxa in the family Desmidiaceae (Zygnematophyceae, Viridiplantae): the genus *Cosmarium*. *American Journal of Botany*. 95(9), 1079-1095.

GONTCHAROV, A. A. & M. MELKONIAN (2011). A study of conflict between molecular phylogeny and taxonomy in the Desmidiaceae (Streptophyta, Viridiplantae): Analyses of 291 rbcL sequences. *Protist*. 162(2), 253-267.

GUANZON Jr., N. G., H. NAKAHARA, Y. YOSHIDA (1994). Inhibitory effects of heavy metals on growth and photosynthesis of three freshwater microalgae. *Fisheries Science*. 60(4), 379-384.

GUIRY M.D. in GUIRY, M.D. & G.M. GUIRY (2021). *AlgaeBase* [online]. [cit. 2022-04-05]. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. Dostupné z: [https://www.algaebase.org/search/species/detail/?species\\_id=35274](https://www.algaebase.org/search/species/detail/?species_id=35274)

GUIRY, M.D. & G.M. GUIRY (2022). *AlgaeBase* [online]. [cit. 2022-04-02]. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. Dostupné z: <https://www.algaebase.org>

HALL, J. D. & R. M. MCCOURT (2015). Conjugating green algae including desmids. In: *Freshwater Algae of North America*. Elsevier, 2015, s. 429-457.

HALL, J. D., K. G. KAROL, R. M. MCCOURT & CH. F. DELWICHE (2008). Phylogeny of the conjugating green algae based on chloroplast and mitochondrial nucleotide sequence data. *Journal of Phycology*. 44(2), 467-477.

HAMMER Ø., D. A. T. HARPER & P. D. RYAN (2001). PAST: paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica*. 4(1), 1-9.

HAMMER, Ø. (2022), PAleontological STatistics, Version 4.11, Reference manual [online]. [cit. 2022-01-15]. Natural History Museum. University of Oslo. 1999-2022. Dostupné z: <https://www.nhm.uio.no/english/research/resources/past/downloads/past4manual.pdf>

HOLLOWAY, D. M. & L. G. HARRISON (1999). Algal morphogenesis: modelling interspecific variation in *Micrasterias* with reaction–diffusion patterned catalysis of cell surface growth. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*. 354(1382), 417-433.

CHATFIELD, C. & A.J. COLLINS (1980). *Introduction to Multivariate Analysis*. Chapman and Hill, New York.

- ISMAIL, M., S.-M. PHANG, S.-L. TONG & M. T. BROWN (2002). A modified toxicity testing method using tropical marine microalgae. *Environmental Monitoring and Assessment*. 75(2), 145-154.
- KADIRI, M. O. (2002). A checklist of desmids in Nigeria. *Global Journal of Pure and Applied Sciences*. 8(2): 223-237, 2 tables.
- KALINA, T. & J. VÁŇA (2005). *Sinice, řasy, houby, mechorosty a podobné organismy v současné biologii*. Karolinum, Praha.
- KALLIO P. & J. LEHTONEN (1981). Nuclear control of morphogenesis in *Micrasterias* In: KIERMAYER, O., ed. *Cytomorphogenesis in Plants*. Springer, Vienna. 191–213.
- KAPLAN, D. (2013). Absorption and adsorption of heavy metals by microalgae. In: RICHMOND, A. & Q. HU, ed. *Handbook of Microalgal Culture, Applied Phycology and Biotechnology*. Blackwell Publishing Ltd, New Jersey. 602-611.
- KAŠTOVSKÝ, J., T. HAUER, R. GERIŠ, B. CHATTOVÁ, J. JURÁŇ, O. LEPŠOVÁ-SKÁCELOVÁ, P. PITELKOVÁ, M. PUSZTAI, P. ŠKALOUD, J. ŠŤASTNÝ & K. ČAPKOVÁ (2018). *Atlas sinic a řas ČR 2*. powerprint, Praha.
- KENDALL, D. G. (1977). The diffusion of shape. *Advances in Applied Probability*. 9(3), 428-430.
- KIERMAYER, O., ed. (1981). *Cytomorphogenesis in Plants*. Springer, Vienna.
- KREMER, H. & E. W. WEISSTEIN (2022). Isoperimetric Quotient. *MathWorld--A Wolfram Web Resource* [online]. [cit. 2022-02-15] Dostupné z: <https://mathworld.wolfram.com/IsoperimetricQuotient.html>
- KRIEGER, W. (1939). *Die Desmidiaceen Europas mit Berücksichtigung der außereuropäischen Arten*. Akademische Verlagsgesellschaft, Leipzig.
- KŘÍSA, B. & K. PRÁŠIL (1994). *Sběr, preparace a konzervace rostlinného materiálu*. Univerzita Karlova, Praha.
- LACALLI, T. C. (1976). Morphogenesis in *Micrasterias*. *Protoplasma*. 88(2-4), 133-146.

- LACALLI, T. C. & L. G. HARRISON (1987). Turing's model and branching tip growth: relation of time and spatial scales in morphogenesis, with application to *Micrasterias*. *Canadian Journal of Botany*. 65(7), 1308-1319.
- LAMELAS, C., K. J. WILKINSON & V. I. SLAVEYKOVA (2005). Influence of the composition of natural organic matter on Pb bioavailability to microalgae. *Environmental Science & Technology*. 39(16), 6109-6116.
- LAMELAS, C., J. P. PINHEIRO & V. I. SLAVEYKOVA (2009). Effect of humic acid on Cd(II), Cu(II), and Pb(II) uptake by freshwater algae: Kinetic and cell wall speciation considerations. *Environmental Science & Technology*. 43(3), 730-735.
- LEÓN-VAZ, A., R. LEÓN, I. GIRÁLDEZ, J. M. VEGA & J. VIGARA (2021). Impact of heavy metals in the microalga *Chlorella sorokiniana* and assessment of its potential use in cadmium bioremediation. *Aquatic Toxicology*. 239.
- LUKEŠ, I. & Z. MIČKA (1998). *Anorganická chemie - II.: Systematická část*. Karolinum, Praha.
- LÜTZ-MEINDL, U. (2016). *Micrasterias* as a model system in plant cell biology. *Frontiers in Plant Science*. 7(999).
- MALANCHUK, J. L. & G. K. GRUENDLING (1973). Toxicity of lead nitrate to algae. *Water, Air, and Soil Pollution*. 2(2), 181-190.
- MARELLA, T. K., A. SAXENA & A. TIWARI (2020). Diatom mediated heavy metal remediation: A review. *Bioresource Technology*. 305.
- MEINDL, U. (1983). Cytoskeletal control of nuclear migration and anchoring in developing cells of *Micrasterias denticulata* and the change caused by the anti-microtubular herbicide amiprofos-methyl (APM). *Protoplasma*. 118(1), 75-90.
- MEINDL, U., S. LANCELLE & P. K. HEPLER (1992). Vesicle production and fusion during lobe formation in *Micrasterias* visualized by high-pressure freeze fixation. *Protoplasma*. 170(3-4), 104-114.
- MEINDL, U. (1993). *Micrasterias* cells as a model system for research on morphogenesis. *Microbiological Reviews*. 57(2), 415-433.



- MONTEIRO, C. M., S. C. FONSECA, P. M. L. CASTRO & F. X. MALCATA (2011). Toxicity of cadmium and zinc on two microalgae, *Scenedesmus obliquus* and *Desmodesmus pleiomorphus*, from Northern Portugal. *Journal of Applied Phycology*. 23(1), 97-103.
- NAPAN, K., L. TENG, J. C. QUINN & B. D. WOOD (2015). Impact of heavy metals from flue gas integration with microalgae production. *Algal Research*. 8, 83-88.
- NEUSTUPA, J. & P. ŠKALOUD (2007). Geometric morphometrics and qualitative patterns in the morphological variation of five species of *Micrasterias* (Zygnemophyceae, Viridiplantae): Geometrická morfometrika a kvalitativní vzorce morfologické variability u pěti druhů rodu *Micrasterias* (Zygnemophyceae, Viridiplantae). *Preslia: časopis České botanické společnosti*. Česká botanická společnost, Praha. 79(4), 401-417.
- NEUSTUPA, J., P. ŠKALOUD & J. ŠT'ASTNÝ (2010). The molecular phylogenetic and geometric morphometric evaluation of *Micrasterias curx-melitensis*/*M. radians* species complex. *Journal of Phycology*. 46(4), 703-714.
- NEUSTUPA, J., J. ŠT'ASTNÝ & P. ŠKALOUD (2014). Splitting of *Micrasterias fimbriata* (Desmidiaceae, Viridiplantae) into two monophyletic species and description of *Micrasterias compereana* sp. nov. *Plant Ecology and Evolution*. 147(3), 405-411.
- NEUSTUPA, J. & K. WOODARD (2020). Geometric morphometrics reveals increased symmetric shape variation and asymmetry related to lead exposure in the freshwater green alga *Micrasterias compereana*. *Ecological Indicators*. 111.
- NOVÁK, M., S. EMMANUEL, M. A. VILE, et al. (2003). Origin of lead in eight central European peat bogs determined from isotope ratios, strengths, and operation times of regional pollution sources. *Environmental Science & Technology*. 37(3), 437-445.
- OLENICI, A., S. BLANCO, M. BORREGO-RAMOS, L. MOMEU & C. BACIU (2017). Exploring the effects of acid mine drainage on diatom teratology using geometric morphometry. *Ecotoxicology*. 26(8), 1018-1030.
- OSSERMAN, R. (1978). The isoperimetric inequality. *Bulletin of the American Mathematical Society*. 84(6), 1182-1238.

- PALMER, M.W. (2022). Ordination Methods - an overview. *Ordination Methods for Ecologists* [online]. [cit. 2022-02-10]. Oklahoma State University. Dostupné z: [http://ordination.okstate.edu/overview.htm#Principal\\_Components\\_Analysis](http://ordination.okstate.edu/overview.htm#Principal_Components_Analysis)
- PANDEY, L. K., D. KUMAR, A. YADAV, J. RAI & J. P. GAUR (2014). Morphological abnormalities in periphytic diatoms as a tool for biomonitoring of heavy metal pollution in a river. *Ecological Indicators*. 36, 272-279.
- PINTO, E., T. C. S. SIGAUD-KUTNER, M. A. S. LEITAO, O. K. OKAMOTO, D. MORSE & P. COLEPICCOLO (2003). Heavy metal-induced oxidative stress in algae. *Journal of Phycology*. 39(6), 1008-1018.
- R CORE TEAM (2020). R: A language and environment for statistical computing [online]. [cit. 2021-12-10]. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Dostupné z: <https://www.R-project.org/>.
- RALFS, J. (1848). *The British desmidiaceae*. Reeve, Benham and Reeve, London.
- RAO, P. H., R. R. KUMAR, B. G. RAGHAVAN, V. V. SUBRAMANIAN & V. SIVASUBRAMANIAN (2011). Is phycovolatilization of heavy metals a probable (or possible) physiological phenomenon? An in situ pilot-scale study at a leather-processing chemical industry. *Water Environment Research*. 83(4), 291-297.
- RATHNAYAKE, I. V. N., M. MEGHARAJ, M. BEER & R. NAIDU (2021). Medium composition affects the heavy metal tolerance of microalgae: a comparison. *Journal of Applied Phycology*. 33(6), 3683-3695.
- ROHLF, F. J. & F.L. BOOKSTEIN (1990). *Proceedings of the Michigan Morphometrics Workshop*. University of Michigan Museum of Zoology.
- ROHLF, F. J. & D. SLICE (1990). Extensions of the procrustes method for the optimal superimposition of landmarks. *Systematic Zoology*. 39(1), 40-59.
- ROHLF, F.J. (1993). Relative warp analysis and an example of its application to mosquito wings. In: MARCUS L.F., E. BELLO, A. GARCIA-VALDECASAS (Eds.) *Contributions to morphometrics*. Monografias, 8. Museo Nacional de Ciencias Naturales, Madrid. 131–159.
- ROHLF, F.J. (2015). The Tps series of software. *Hystrix*. 26(1), 1-4.

- ROTHWELL, J. J., S. G. ROBINSON, M. G. EVANS, J. YANG & T. E. H. ALLOTT (2005). Heavy metal release by peat erosion in the Peak District, southern Pennines, UK. *Hydrological Processes*. 19(15), 2973-2989.
- ROTHWELL, J. J., M. G. EVANS & T. E. H. ALLOTT (2007). Sediment-water interactions in an eroded and heavy metal contaminated peatland catchment, southern pennines, UK. In: KRONVANG, B., J. FAGANELI & N. OGRINC, ed. *The Interactions Between Sediments and Water*. Springer, Dordrecht. 305-312.
- ROTHWELL, J.J., M.G. EVANS, L.C. LIDDAMAN & T.E.H. ALLOTT (2007a). The role of wildfire and gully erosion in particulate Pb export from contaminated peatland catchments in the southern Pennines, U.K. *Geomorphology*. 88(3-4), 276-284.
- ROTHWELL, J.J., M.G. EVANS, S.M. DANIELS & T.E.H. ALLOTT (2007b). Baseflow and stormflow metal concentrations in streams draining contaminated peat moorlands in the Peak District National Park (UK). *Journal of Hydrology*. 341(1-2), 90-104.
- SELMAN, G. G. (1966). Experimental evidence for the nuclear control of differentiation in *Micrasterias*. *Development*. 16(3), 469-485.
- VON SCHWARTZENBERG, K., S. BORNFLETH, A. C. LINDNER & D. HANELT (2013). The Microalgae and Zygnematophyceae Collection Hamburg (MZCH) – living cultures for research on rare streptophytic algae. *Algological Studies*. 142, 77-107.
- SIBI, G. (2019). Factors influencing heavy metal removal by microalgae - a review. *Journal of Critical Reviews*. 29-32.
- STEGMANN, M. B. & D. D. GOMEZ (2002). *A brief introduction to statistical shape analysis*. Lecture note [online]. [cit. 2022-02-20]. Informatics and Mathematical Modelling, Technical University of Denmark, DTU. Dostupné z: <http://www2.imm.dtu.dk/pubdb/edoc/imm403.pdf>
- ŠKALOUD, P., K. NEMJOVÁ, J. VESELÁ, K. ČERNÁ & J. NEUSTUPA (2011). A multilocus phylogeny of the desmid genus *Micrasterias* (Streptophyta): Evidence for the accelerated rate of morphological evolution in protists. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 61(3), 933-943.

ŠKALOUD, P. (2019). CAUP - Algal culture collection in Prague. *European Journal of Phycology*. 54:sup1: 229.

THOMPSON, D. W. (1917). *On growth and form*. University press, Cambridge.

TOUMI, A., M. BELKOURA, S. BENABDALLAH, M. EL ALAMI, L. L. IDRISSE & A. NEJMEDDINE (2007). Effect and bioaccumulation of heavy metals (Zn, Cd) on *Micractinium pusillum* alga. *Environmental Technology*. 28(1), 19-23.

URL, W. (1955). *Resistenz von Desmidiaceen gegen Schwermetallsalze*. Sitzungsber. Österr. Akad. Wiss. Mathem. Naturw. 164, 207–230.

VAN GEEST, A. (2022). Digicodes. *Digital Image Collection of Desmids* [online]. [cit. 2022-04-20]. Dostupné z: <http://www.digicodes.info/index.html>

VILE, M. A., R. K. WIEDER & M. NOVÁK (2000). 200 Years of Pb deposition throughout the Czech Republic: Patterns and sources. *Environmental Science & Technology*. 34(1), 12-21.

VOLLAND, S., A. ANDOSCH, M. MILLA, B. STÖGER, C. LÜTZ & U. LÜTZ-MEINDL, 2011. Intracellular metal compartmentalization in the green algal model system *Micrasterias denticulata* (streptophyta) measured by transmission electron microscopy-coupled electron energy loss spectroscopy. *Journal of Phycology*. 47(3), 565-579.

VOLLAND, S., C. LÜTZ, B. MICHALKE & U. LÜTZ-MEINDL (2012). Intracellular chromium localization and cell physiological response in the unicellular alga *Micrasterias*. *Aquatic Toxicology*. 109, 59-69.

VOLLAND, S., E. BAYER, V. BAUMGARTNER, A. ANDOSCH, C. LÜTZ, E. SIMA & U. LÜTZ-MEINDL (2014). Rescue of heavy metal effects on cell physiology of the algal model system *Micrasterias* by divalent ions. *Journal of Plant Physiology*. 171(2), 154-163.

WEISSTEIN, E. W. (2022). "Bonferroni Correction." From *MathWorld--A Wolfram Web Resource* [online]. [cit. 2022-02-15]. Dostupné z: <https://mathworld.wolfram.com/BonferroniCorrection.html>

WENGER, K., S. TANDY & B. NOWACK (2005). Effects of chelating agents on trace metal speciation and bioavailability. In: NOWACK, B. & J. M. VANBRIESEN, ed.

*Biogeochemistry of Chelating Agents*. American Chemical Society, Washington, DC. 204-224.

WOODARD, K. & J. NEUSTUPA (2022). Geometric morphometrics of bilateral asymmetry in *Eunotia bilunaris* (Eunotiales, Bacillariophyceae) as a tool for the quantitative assessment of teratogenic deviations in frustule shapes. *Symmetry*. 14(1).

YAN, H. a G. PAN (2002). Toxicity and bioaccumulation of copper in three green microalgal species. *Chemosphere*. 49(5), 471-476.

ZELDITCH, M. L., D. L. SWIDERSKI, H. D. SHEETS a W. L. FINK (2004). *Geometric Morphometrics for Biologists*. Elsevier Acad Press, London.