

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Študijný program: Ekologická a evoluční biologie



Dagmar Budd

Abnormálne tvary rozsievok vyvolané zvýšenými koncentraciami chemických látok
Abnormal shapes of diatoms induced by elevated concentrations of chemical substances

Typ závěrečné práce:

Bakalárska práca

Školitelka: Mgr. Jana Kulichová, Ph.D.

Praha, 2023

Prehlásenie

Vyhlasujem, že prácu som vypracovala samostatne a použila len uvedené pramene a literatúru.
Práca nebola použitá na získanie iného alebo rovnakého akademického titulu.

V Prahe, 31. júla 2023

Podpis:

Pod'akovanie

Rada by som týmto pod'akovala najmä svojej školiteľke Mgr. Jane Kulichovej, PhD. za pomoc, dobré rady, odporúčania, pripomienky a hlavne za veľkú trpezlivosť počas vypracovávaní tejto práce. Pod'akovanie patrí aj mojim rodičom, ktorí mi boli oporou počas celého štúdia.

Abstrakt

Práca porovnáva tradičné metódy biomonitoringu a moderný prístup využívajúci flukтуаčnú asymetriu ako meradlo vývojovej nestability na spresnenie metód biomonitoringu s dôrazom na vplyv toxikogénnych látok v sladkovodnom prostredí. V ďalšej kapitole sú informácie o formách znečistenia, pričom práca je primárne zameraná na znečistenie ťažkými kovmi a analýzu vplyvu zvýšených koncentrácií týchto kovov na rozsievky, zelené riasy a iné protistné organizmy. Ťažké kovy sú najčastejšou príčinou vzniku teratologických zmien, preto sú uvedené teratológie na vnútrobunkovej úrovni a v morfológii protistných organizmov, ktoré tieto kovy spôsobujú. Ďalej sú porovnávané vplyvy ťažkých kovov medzi jednotlivými skupinami protistných organizmov navzájom. V rámci niektorých skupín sú uvedené návrhy fykoremediačných opatrení, ktoré by mohli byť do budúcnosti ekologickým riešením čistenia vodných tokov.

Kľúčové slová: flukтуаčná asymetria, vývojová nestabilita, geometrická morfometrika, teratológie, rozsievky, morfologické asymetrie, ťažké kovy, biomonitoring

Abstract

Traditional biomonitoring methods are compared in this thesis with a modern approach which uses fluctuation asymmetry to measure developmental instability and refines biomonitoring methods in order to emphasize the impact of toxigenic substances in freshwater environments. The next section provides information about different types of pollution, with the focus primarily on heavy metal contamination and the impact from increased concentration of these metals on diatom frustules, green algae and other protist organisms. The most common cause of teratological changes comes from heavy metals and the impact of them along with toxicity are analyzed here. What changes is the teratology at the intracellular level and the protist organism morphology, where the cause of the changes can be traced to these heavy metals. The thesis also compares the impact of the heavy metals among different protist organism groups and between each of them. It contains suggested phycoremediation, which in the future could be an ecological solution for the cleanup of rivers and streams.

Keywords: fluctuation asymmetry, developmental instability, geometric morphometrics, teratologies, diatoms, morphological asymmetries, biomonitoring

Obsah

Úvod.....	1
1 Biomonitoring a fluktučná asymetria ako meradlo vývojovej nestability	3
1.1 Biomonitoring.....	3
1.2 Možnosti využitia fluktuáčnej asymetrie ako meradla vývojovej nestability v biomonitoringu	4
1.3 Kvantifikácia asymetrie pomocou geometrickej morfometriky	6
1.4 Porovnanie tradičných metód s metódami využívajúcimi FA a DI.....	9
1.5 Výhody a nevýhody fluktuáčnej asymetrie ako meradla vývojovej nestability	12
2 Stresové faktory prostredia a ich vplyv na rozsievky.....	14
2.1 Chemické znečistenie - vplyv ťažkých kovov.....	14
2.1.1 Meď (Cu)	15
2.1.2 Zinok (Zn).....	16
2.1.3 Kadmium (Cd)	17
2.1.4 Železo (Fe).....	20
2.1.5 Olovo (Pb).....	21
2.1.6 Arzén (As).....	23
2.2 Znečistenie ropnými produktami.....	24
2.3 Znečistenie farmaceutikami a hygienickými produktami	25
2.4 Znečistenie pesticídmi a herbicídmi	25
3 Záver.....	27
3.1 Diskusia	27
3.2 Zhrnutie	29
4 Zoznam použitej literatúry	30

Zoznam skratiek:

DI	Developmental instability (vývojová nestabilita)
FA	Fluctuation asymmetry (fluktučná asymetria)
SDV	Silica deposition vesicle
ROS	Reactive oxygen species

Zoznam obrázkov

Obrázok 1	Anatómia rozsievky	3
Obrázok 2	Série zmenšenia veľkosti buniek <i>Eunotia bilunaris</i>	8
Obrázok 3	Koncepčný model výskytu teratológií spôsobených vystavením sa kontaminantom medzi tolerantnými a citlivými druhmi	10
Obrázok 4	Environmentálne stresory	14
Obrázok 5	Toxicita kadmia a zinku vo vzťahu k vodným a pôdnym protistom	17
Obrázok 7	Typy deformácií pozorovaných u <i>Nitzschia palea</i> vystavených vplyvom kadmia	19
Obrázok 8	Stupne deformácie frustúl u <i>Nitzschia palea</i> , <i>Eunotia</i> sp. a <i>Achnanthydium minutissimum</i> spôsobené ťažkými kovmi	19
Obrázok 9	Príklady deformácií a ich rozsah u <i>Pinnularia</i> sp. vystavenej pôsobeniu kadmia	20
Obrázok 10	Deformácie u <i>Halamphora veneta</i>	23

Úvod

Znečistenie ťažkými kovmi preniklo do rôznych prostredí a neustále sa zhoršuje. Rastúce používanie uhl'ovodíkového odpadu a iných látok v rôznych systémoch sa stali jedným z najväznejších environmentálnych problémov na svete (Ciesielczuk et al. 2014). Niektoré chemické látky sa môžu v prostredí prejavovať negatívne až po dlhšom čase. Tieto účinky sú ťažko sledovateľné a ich „vystopovanie“ k pôvodným, počiatočným príčinám môže byť náročné. Je dôležité mu porozumieť, pokračovať v skúmaní a implementovať opatrenia na minimalizáciu uvoľňovania polutantov. Zároveň je potrebné zamerať výskum na rôzne techniky remediácie následkov, ktoré na životnom prostredí spôsobuje človek svojimi aktivitami (Matthies et al., 2016).

Jednobunkové eukaryotické organizmy sa využívajú na biomonitoring obnovy ekosystémov, na dokumentáciu histórie požiarov, ale najmä na monitorovanie znečistenia životného prostredia. Vo všeobecnosti protisti so schránkou hrajú významnú úlohu pri biomonitoringu v súčasných, ale aj v paleolimnologických štúdiách. Ich schránky v sedimentoch dobre fosilizujú, preto sú zdrojom cenných údajov o environmentálnych zmenách v priebehu času a aj na posúdenie vplyvu človeka na vodné ekosystémy. Väčšina hlavných protistných skupín sú vhodné bioindikátory kvality životného prostredia. Veľký dôraz sa kladie na výskum rozsievok (*Bacillariophyceae*), dierkavcov (*Formanifera*) a meňavkovcov (*Testacea*) (Reid et al., 1995; Payne, 2013).

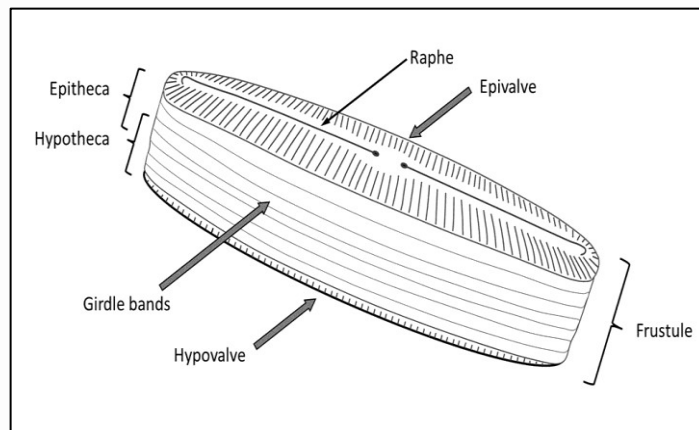
Schránky nachádzame naprieč celým fylogenetickým stromom jednobunkových eukaryot. Ide napríklad o rozsievky (*Bacillariophyceae*) s frustulami, alebo panciernatky (*Dinophyceae*) s thékou (Mann et al., 2016; Orr et al., 2012). Tvary schránok nie sú nemenné. Ak je organizmus vystavený nejakej forme stresu počas ontogenézy, môže dôjsť k pozmeneniu jeho štruktúry. Takto vznikajú teratologické formy (Falasco, Bona, Badino, et al., 2009).

Cieľom práce je porovnať rozsievky, zelené riasy, kokolity a iné skupiny protistov a zistiť, možnosti využitia vývojovej nestability, ktorej meradlom je fluktučná asymetria, ako komplementárnej metódy vo vzťahu k tradičnému biomonitoringu. V prípadoch, keď sa nedá rozoznať ľavá a pravá strana (ako napr. u rodu *Eunotia*, ale aj u iných rodov rozsievok), je možné

ako meradlo použiť celkovú asymetriu (Woodard & Neustupa, 2022). To úzko súvisí s ďalším cieľom práce, ktorým je porovnanie vplyvu stresových faktorov využitím geometrickej morfometriky na meranie a porovnávanie tvaru a asymetrie symetrických znakov, pretože sa nimi skúmajú vzorce vývojovej nestability (Gelšvartas, 2010). Nasledujúca kapitola a podkapitoly sú venované vybraným chemickým anorganickým polutantom, ktoré bývajú najčastejšou príčinou teratologických zmien. Cieľom tejto časti práce je zistiť pôsobenie ťažkých kovov, predovšetkým ich vplyv na rozsievky a porovnať ho s vplyvom na iné eukaryotické jednobunkové organizmy.

1 Biomonitoring a fluktuálna asymetria ako meradlo vývojevej nestability

Práca je zameraná primárne na rozsievky a ich využitie v biomonitoringu i keď, kvôli porovnaniu, uvádzame aj príklady iných schránkatých a neschránkatých skupín protistov. Rozsievky (*Bacillariophyceae*), nájdeme v rôznych ekosystémoch od morských po sladkovodné, či pôdne. Typická je ich obrovská diverzita. Charakteristickým znakom rozsievok je kremičitá schránka, frustula. Je zložená z dvoch prekrývajúcich sa misiek s množstvom druho charakteristických otvorov, cez ktoré bunka prijíma látky z prostredia a zbavuje sa odpadových produktov (Obrázok 1) (Mann et al., 2016).



Obrázok 1 Anatómia rozsievky

Zdroj: <https://www.diatoms.de/en/diatoms/what-are-diatoms>

1.1 Biomonitoring

U riasových skupín znamená biomonitoring využitie riasových spoločenstiev (všeobecne organizmov a ich pozostatkov) na vyhodnotenie kvality vody a monitorovanie ekologického stavu na základe ich odpovede na environmentálne stresové faktory, znečistenie a zmeny v kvalite vody (Mangadze et al., 2019).

Pri určovaní senzitivity bentických rozsievok na kyslé banské vody sa ukázalo, že niektoré druhy sú citlivejšie ako iné, a preto sú vhodné na monitorovanie efektivity remediácie (Lavoie et al., 2018). Spoločenstvá bentických rozsievok sú využívané predovšetkým na monitoring tečúcich vôd, konkrétne na vyhodnocovanie parametrov ako sú salinita, acidita a trofia (Yuan et

al., 2022). Jednotlivci a populácie môžu byť dobre prispôsobené prostrediu. Ekosystém, ktorý sa nám môže javiť ako stresujúci, môže byť pre dané organizmy vyhovujúci (Graham et al., 2010). Práca sa zameriava hlavne na negatívny vplyv zvýšenej koncentrácie anorganických chemických polutantov, konkrétne ťažkých kovov, pesticídov, farmaceutík a ropných produktov.

Ťažké kovy sú definované ako látky s vysokou hustotou a potenciálnou toxicitou na živé organizmy. Niektorí autori používajú termín ťažké kovy na označenie 37 prvkov periodickej sústavy prvkov (všetky kovy okrem alkalických kovov, kovov alkalických zemín a hliníka), ktorých hustota je väčšia ako 5 g.cm^{-3} . Ďalší autori považujú za ťažký kov taký kov, ktorého protónové číslo je väčšie ako 20 (Andráš et al., 2016). Vo všeobecnosti sa do skupiny ťažkých kovov radia olovo (Pb), ortuť (Hg), kadmium (Cd), chróm (Cr), arzén (As), meď (Cu), železo (Fe), zinok (Zn) a iné. Toxické kovy sú tie, ktoré pri určitej koncentrácii pôsobia škodlivo na biotické zložky ekosystémov. Teda nie všetky ťažké kovy sú zároveň aj toxické (Hawkes, 1997).

1.2 Možnosti využitia fluktuáčnej asymetrie ako meradla vývojovej nestability v biomonitoringu

V bakalárskej práci sa pracuje s pojmami fluktučná asymetria (FA) a vývojová nestabilita (DI), pretože môžu byť meradlom pôsobenia suboptimálnych vplyvov prostredia na bunky počas fáz delenia. Pod vývojovou nestabilitou sa rozumie neschopnosť jednotlivca chrániť sa pred náhodným ruchom počas ontogenézy (Dongen, 2006). Vývojová nestabilita môže byť chápaná ako drsnosť povrchu epigenetickej krajiny, ktorej dôsledkom sú odchýlky od vývojovej trajektórie (Graham et al., 1998). Termín zároveň definuje ako veľká je odchýlka tvaru jedného jedinca od geneticky určeného "cieľového fenotypu" (Manthey & Ousley, 2020). Rovnako opisuje neschopnosť jedinca vytvoriť konzistentný fenotyp v danom prostredí. Ide o akési „uvoľnenie“ alebo „hru“ v epigenetickom stroji (Graham et al., 1998).

Fluktučná asymetria je malá náhodná odchýlka od dokonalej bilaterálnej symetrie (Tomkins, 2002). Ide tiež o samotný fenotypový prejav vývojovej nestability najčastejšie používaný na jej meranie. Náhodné zmeny vznikajú počas nedokonalej morfogénézy, t. j. nedokonalého vývoja po delení. FA je prítomná aj u organizmov, ktoré nie sú vystavené vplyvom stresových faktorov. FA sa však môže zvýšiť pôsobením stresorov, ktoré narúšajú morfogénézu a opravné systémy (Graham et al., 2010).

Asymetrie sa často vyskytujú v tzv. okrajových biotopoch, kde sú vplyvy vonkajších stresorov obvykle väčšie (Parsons, 1990). Organizmy vo všeobecnosti vykazujú jednu alebo viacero foriem symetrie, ktoré pretrvávajú počas ich ontogenetického vývoja, alebo aspoň v niektorom z jeho štádií. Tieto symetrie sú vývojové invarianty. Bilaterálna symetria je často vývojovo invariantná, keďže jedinci môžu zostať bilaterálne symetrickí napriek výrazným vývojovým zmenám. Vývojová invariantnosť je základom pre fluktuálnu asymetriu, ktorá je meradlom vývojovej nestability (Graham et al., 1998).

Koncept fluktuáčnej asymetrie poukazuje na fakt, že environmentálny aj genetický stres môžu viesť k zvýšenej úrovni asymetrie u jednotlivcov a aj celých populácií. Z tohto dôvodu je fluktuálna asymetria potenciálne dobrým nástrojom pre biomonitoring. FA bola navrhnutá aj ako užitočné meradlo na posúdenie stavu ohrozených druhov a použitá ako bioindikátor v štúdiách zaoberajúcich sa prirodzeným a pohlavným výberom a pri monitorovaní životného prostredia v rámci ochrany prírody. Vo vodných ekosystémoch boli pozorované vyššie miery fluktuáčnej asymetrie u rýb z oblastí silne znečistených DDT, ako aj u bezstavovcov v blízkosti tovární na poľnohospodárske hnojivá (Tomkins, 2002).

Kľúčovým predpokladom v štúdiách vývojovej nestability je fakt, že v prípade absencie perturbácie, t. j. nejakého narušenia, majú všetci jedinci v populácií rovnaký smer vývoja. Vždy však bude existovať určitá genetická variabilita v rámci heterogénnych populácií. Táto genetická variabilita nezvyšuje odhad vývojovej nestability, kým nemajú rôzne genotypy fundamentálne odlišné trajektórie. Tento predpoklad musí byť splnený aj v homogénnej populácií trajektórií pre situácie, ktoré zahŕňajú ako fluktuálnu tak aj smerovú asymetriu¹ (Graham et al., 1998).

Okrem fluktuáčnej asymetrie existujú ďalšie dve formy bilaterálnej asymetrie: smerová asymetria a antisymetria². Aby sme mohli merať vývojovú nestabilitu, či už pre symetrický alebo asymetrický znak, musíme sa najprv uistiť, že skúmaná populácia má skutočne rovnaký smer

¹ Smerová asymetria (directional asymmetry) je systematický rozdiel medzi ľavou a pravou stranou pri štruktúrach s bilaterálnou symetriou, napr. srdce cicavcov je smerovo asymetrické. Ľavá strana je normálne väčšia ako pravá strana (Budečević. et al., 2022).

² Antisymetria opisuje bimodálne rozdelenie, napríklad samci krabov z čeľade *Ocypodidae* majú antisymetrické klepetá. Pravé klepeto je zväčšené u jednej polovice samcov a ľavé klepeto u druhej polovice samcov (Graham et al., 1998).

vývoja. Hoci existuje celý rad spôsobov merania fluktuáčnej asymetrie, najviac používaný je rozptyl σ^2_d jednotlivých asymetrií

$$d_i = l_i - r_i$$

kde l_i je hodnota znaku na ľavej strane jednotlivého i a r_i označujú hodnotu toho istého znaku na pravej strane toho istého jednotlivca (Graham et al., 1998).

Keďže mnohé, ak nie väčšina prípadov smerovej asymetrie a antisymetrie, sú zapríčinené normálnym vývojom, ani jeden z nich sa nedá považovať za užitočný na meranie vývojovej nestability. Smerová asymetria aj antisymetria majú navyše neznámy genetický komponent (Graham et al., 1998).

Existuje mnoho spôsobov ako odhadnúť fluktuáčne asymetrický komponent smerovo asymetrického znaku. Často sa však stáva, že sa fluktuáčna asymetria nadhodnocuje, ak je prítomná aj smerová asymetria. Z tohto dôvodu musí byť horeuvedená rovnica prispôbena na špecifické situácie. Medzi takéto situácie a podmienky, ktoré musia byť splnené pri správnom vyhodnocovaní fluktuáčnej asymetrie u rozsievok, okrem iných, patria:

- (a) stres a zmeny: v stresových podmienkach sa môže vývojová trajektória zmeniť;
- (b) smerová asymetria: odkazuje na rozdiely medzi ľavou a pravou stranou. Korekcie na smerovú asymetriu sú platné, ak je genetický vplyv na variabilitu malý alebo nie je žiadny;
- (c) prístupy k analýze: odporúčaný prístup k analýze závisí od typu chýb a prítomnosti smerovej asymetrie (Graham et al., 1998).

1.3 Kvantifikácia asymetrie pomocou geometrickej morfometriky

Použitím vývojovej nestability a jej meradla fluktuáčnej asymetrie je možné zisťovať aké stresové faktory sú prítomné (napr. radiácia, zvýšené koncentrácie ťažkých kovov). Rovnako je možné použiť malformované schránky rozsievok a zaznamenávať ich podiel. Tento postup sa bežne využíva pri klasickom biomonitoringu, alebo sa využívajú kvantifikácie deformácií prostredníctvom geometrickej morfometriky spolu s vývojovou nestabilitou. Podľa toho sa dá zistiť ako je ovplyvnená morfogenéza, čo organizmom vadí a prečo dochádza k malformáciám (Graham et al., 2010).

Landmarková geometrická morfometrika je technika, ktorá využíva na opis tvaru súbor orientačných bodov. Ide o dvoj alebo trojrozmerný bod definovaný prísnyimi pravidlami. Právě landmarky by mali mať jasný biologický význam. V kontexte štúdie by mali mať nejaký zmysel. Orientačný bod by mal byť prítomný a identifikovateľný na skúmanom organizme. Ak sa orientačný bod nenachádza na jednom alebo viacerých pozorovaných organizmoch, môže byť potrebné ho buď približne označiť, alebo ho z analýzy vylúčiť úplne. Počet vybraných orientačných bodov by nemal prekročiť počet vzoriek, aby sa zabránilo nadbytočnosti. Zvyčajne sa počet orientačných bodov rovná približne počtu vzoriek. Výsledky generované touto metódou, priamo závisia od kvality orientačných bodov (Gelšvartas, 2010).

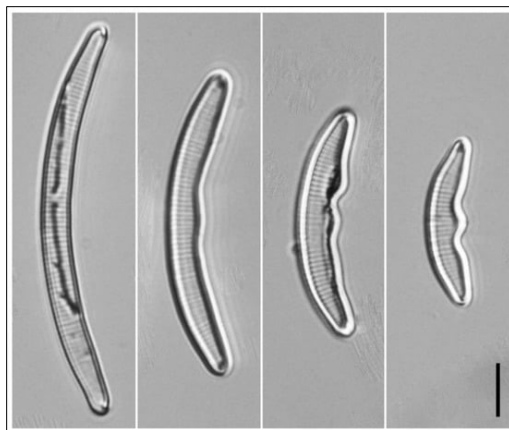
Existujú tri typy orientačných bodov. Právě landmarky, pseudolandmarky, ktoré relatívnu polohou označujú napr. „najvyššie zakrivenia konkrétnej kosti“ a semilandmarky, ktoré sú označené polohou vo vzťahu k iným orientačným bodom. Geometrická morfometrika sa používa na analýzu a kvantifikáciu asymetrie symetrických častí a tvarovej variability morfológických znakov. Hodnotí sa ako veľká je odchýlka od symetrie voči druhej časti (symetrickej podľa osi). Táto technika je určená na presné meranie a analýzu tvarových zmien, čo umožňuje sledovať vplyv environmentálnych faktorov na morfológiu schránok rozsievok (Gelšvartas, 2010).

Používané sú konfigurácie orientačných bodov na analýzu tvarovej variability v evolučnej vývojovej biológii a v iných oblastiach biológie. Bežne sa používa Procrustesova metóda superimpozície, ktorá zahŕňa škálovanie, polohovanie a otáčanie konfigurácií s cieľom odstrániť rozdiely vo veľkosti, polohe a orientácii. Takto získané údaje o tvare možno analyzovať pomocou viacrozmernej štatistiky (Klingenberg, 2010).

Morfologické variácie rozsievok môžu byť adaptívne alebo neadaptívne, v závislosti od typu odpovede na podmienky prostredia. Teratologické formy patria medzi neadaptívne fenotypové abnormality, ktoré zvyčajne zahŕňajú obrysy frustuly, alebo ornamentáciu strií. Niektoré zmeny ako napr. zmeny v obrysoch frustuly bývajú mechanicky prenášané počas rozmnožovania, čím vzniká populácia s inou morfológiou ako tomu bolo u predchádzajúcej generácie. Iné štruktúry, napr. štruktúra a distribúcia strií vyzerá byť limitovaná len na niekoľko generácií. Z tohto dôvodu bývajú abnormálne obrysy frustúl viditeľné častejšie ako iné druhy teratológií. Teratologický vývoj buniek a vznik abnormálnych tvarov buniek u rozsievok

zapríčiňuje veľa rôznych environmentálnych faktorov. To nám poskytuje časový a aj kvantitatívny indikátor stresu. Množstvo štúdií poukazuje na pozitívnu koreláciu medzi abundanciou teratológií a environmentálnym stresom (napr. nízka prúdová rýchlosť, sucho, svetelná intenzita a zvýšená teplota, ale aj zníženie kvality vody a kontaminácia herbicídmi) (Falasco et al., 2009).

Pre viaceré rody penátnych rozsievok³ sú typické teratogénne deformácie ich kremičitých schránok spôsobené účinkami environmentálneho stresu, napr. pôsobením vysokých koncentrácií ťažkých kovov a nízkeho pH. Kvantitatívne hodnotenie týchto deformácií sa však uplatňuje len zriedkavo. Jedným z druhov, u ktorých boli často zaznamenané aberácie, je *Eunotia bilunaris* (Obrázok 2), pre ktorú sú typické bilaterálne symetrické frustuly s dorzoventrálnou diferenciáciou. Preto by bolo možné uplatniť techniku geometrickej morfometrickej analýzy symetrie ako nástroja na posúdenie závažnosti teratogénnych deformácií. Tvarové deformácie bývajú zvyčajne viditeľné na centrálnych častiach ventrálnych obrysov (Woodard & Neustupa, 2022).



Obrázok 2 Série zmenšenia veľkosti buniek *Eunotia bilunaris*
mierka = 10 μm , (Woodard & Neustupa, 2022)

³ Penátne rozsievky sú predĺžené a bilaterálne symetrické. Pomerne málo taxónov je bilaterálne asymetrických. Tvoria heterogénnu skupinu, ktorá zahŕňa arafidné, monorafidné a birafidné taxóny (Spaulding et al. 2021). Termín bilaterálna symetria sa používa u rozsievok symetrických pozdĺž apikálnej a transapikálnej osi (napr. *Navicula pinnularia*). Toto je však neplatí v rámci konceptu morfometriky, kde biradiálna symetria znamená súmernosť podľa apikálnej osi (napr. *Gomphonema*). U *Navicula pinnularia* ide teda o biradiálnu symetriu - majú dve osi symetrie, ktoré ich delia na rovnaké štvrtiny (Savriama & Klingenberg, 2011).

Najväčšou nevýhodou metód geometrickej morfometriky založenej na orientačných bodoch je to, že počet dostupných orientačných bodov môže byť niekedy nedostatočný na zachytenie tvaru objektu. Alternatívou je použitie metódy analýzy obrysov, pri ktorej sú najprv extrahované hranice okolo objektu. Body sa potom digitalizujú pozdĺž tejto hranice a porovnávajú s matematickou funkciou. Zvyčajne sa využíva ďalšia metóda geometrickej morfometriky, napr. Fourierova analýza. Rôzne krivky sa následne porovnávajú pomocou koeficientov funkcií ako tvarové premenné vo viacrozmernej analýze (Gelšvartas, 2010).

1.4 Porovnanie tradičných metód s metódami využívajúcimi FA a DI

Rozsievky sa ľahko šíria a môžu sa dostávať do rôznych biotopov. Dajú sa pomerne ľahko odoberať a odber vzoriek má zanedbateľný vplyv na ekosystém. Čas ich reakcie na zmeny podmienok prostredia sa pohybuje niekde medzi baktériami (zmena z hodiny na hodinu) a väčšími bezstavovcami (zmena v priebehu mesiacov). Sú tiež citlivé na veľmi malé zmeny podmienok prostredia, ktoré nemusia viditeľne ovplyvniť iné spoločenstvá, alebo ich môžu ovplyvniť len pri väčšom narušení (Rath & Padhy, 2010).

Prístupy založené na znakoch majú výhodu v tom, že využívajú údaje na úrovni druhov a aj na úrovni rodov, na získanie ktorých je potrebné vynaložiť menej úsilia a nákladov ako tradičné prístupy založené na druhoch a eliminujú pretrvávajúce taxonomické odchýlky v rozsiahlych geografických oblastiach. Pod znakmi sú v tomto prípade myslené konkrétne vlastnosti, napr. všetky druhy rodu *Navicula* sú pohyblivé. V rámci iných rodov môže existovať rôznorodosť vlastností jednotlivých druhov. Mnohé druhy rodu *Fragilaria* patria do gildy⁴ vysokoprofilových, ale niektoré druhy rodu *Fragilaria* patria do planktónnej gildy. Priradovanie znakov k rozsievkam pomocou taxonómie na úrovni rodu a nie na úrovni druhu by teda mohlo potenciálne ovplyvniť účinnosť metrick znakov na indikáciu stavu (Riato et al., 2022).

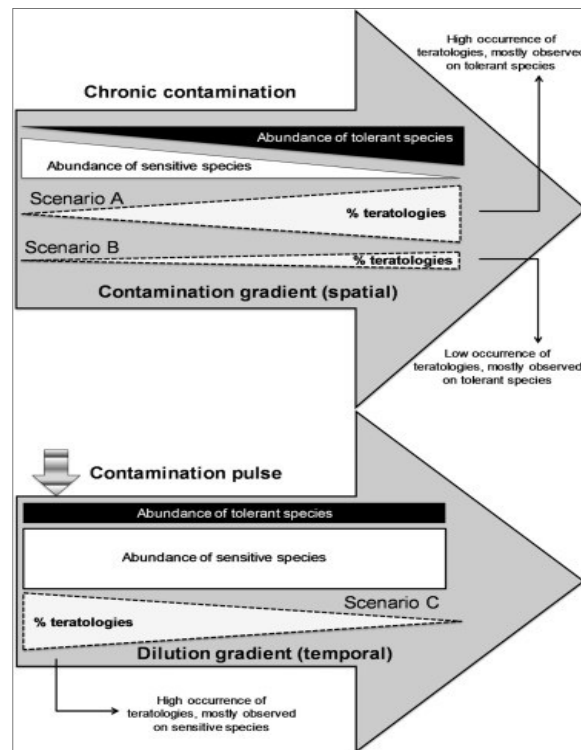
Pri druhu *Euglena gracilis* (*Excavata*, *Euglenoidea*, *Euglenophyceae*) boli, vďaka fluktuáčnej asymetrii a vývojovej nestabilite, identifikované zmeny v morfolologickej variabilite

⁴ Gilda je definovaná ako skupina druhov, ktorá využíva rovnaké environmentálne zdroje podobným spôsobom. Tento pojem zoskupuje druhy bez ohľadu na taxonomické postavenie. Druhy sa významne prekrývajú vo svojich nárokoch, ktoré majú od konkrétnej niky (Simberloff & Dayan, 1991).

tohto druhu pod vplyvom rôznych rastových podmienok. To naznačuje, že vývojová nestabilita a fluktučná asymetria by mohli byť užitočné pri biomonitoringu tohto konkrétneho druhu (Wang et al., 2018).

Na základe horeuvedeného sa predpokladá, že analýzy protistov, vrátane fluktuáčnej asymetrie a vývojovej nestability, by bolo možné použiť ako komplementárne metódy na spresnenie tých tradičných. To by poskytlo detailnejšie informácie o vplyve environmentálnych stresorov na vodné organizmy (Caroni & Irvine, 2010).

Obrázok 3 predstavuje koncepčný model výskytu teratológií, ktoré vznikajú v dôsledku pôsobenia kontaminácie.



Obrázok 3 Koncepčný model výskytu teratológií spôsobených vystavením sa kontaminantom medzi tolerantnými a citlivými druhmi (Lavoie et al., 2017)

V scenári A je spoločenstvo náchylné na deformácie a ich výskyt sa zvyšuje s koncentráciou kontaminantu. V scenári B je výskyt deformácií nízky v dôsledku prevahy druhov, ktoré zvyčajne nevykazujú štrukturálne zmeny v prítomnosti kontaminantov. Keďže je pravdepodobné, že citlivé druhy budú so zvyšujúcou sa kontamináciou vylúčené, je výskyt deformácií frustúl pozorovaných na citlivých druhoch v tomto súbore pre scenáre A a B nízky.

V scenári C krátkodobé vystavenie sa kontaminantom pravdepodobne nezmení zloženie spoločenstva a výskyt deformácií postihne najmä citlivé druhy, keďže tolerantné druhy sú zriedkavé (Lavoie et al., 2017).

Na jedincov v prírodných populáciách pôsobia rôzne biotické a abiotické stresory. Tieto premenné možno kontrolovať v laboratórnom alebo poľnom experimente, ale študovať flukтуаčnú asymetriu u prírodných populácií je komplikované. Zvyčajne je snaha odvodiť stres prostredníctvom flukтуаčnej asymetrie. Flukтуаčná asymetria jedného znaku len málokedy koreluje s flukтуаčnou asymetriou iného znaku. Hlavne ak flukтуаčnú asymetriu sledujeme u viacerých znakov na jednom jedincovi. Individuálna flukтуаčná asymetria je zriedkavá, ale celopopulačná je relatívne bežná. Jeden znak je v jednej populácii asymetrickejší než iný. Kontrola abiotických a biotických stresorov v kontrolovanom experimente môže poskytnúť čiastočné riešenie (Graham et al., 2010).

Pri porovnávaní efektivity rôznych metód biomonitoringu pri odhaľovaní znečistenia pesticídmi bolo zistené, že DI a FA boli menej citlivé ako iné tradičnejšie metódy a boli užitočné len pri veľmi vážnych a veľkých znečisteniach (Utayopas, 1996).

Pri analýzach rozsievkových spoločenstiev z 18 lokalít zo Severnej Ameriky, Európy a Afriky zasiahnutých rôznymi stupňami kontaminácie bolo zistené, že nie všetky teratológie boli ekologicky významné. Niektoré teratológie boli spojené s genetickou variabilitou alebo prirodzenou variabilitou v rozsievkových populáciách a nie so znečistením. Preto by mali byť rozsievkové teratológie ako biomarkery kontaminácie hodnotené individuálne. Do úvahy by sa mali brať tiež špecifiká lokality a samotných rozsievkových populácií (Lavoie et al., 2017).

Reakcie na stres sú znakovito špecifické a môžu zostať nezistené, ak nie sú príslušné znaky merané. V dôsledku toho konkrétne podmienky prostredia ovplyvnia len niektoré vývojové dráhy vedúce k špecifickým reakciám. Preto by mali byť používané komplementárne biomarkery a dáta z prostredia na potvrdenie, či teratológie u konkrétnych rozsievkových komunit skutočne vznikli práve znečistením (Lavoie et al., 2017).

1.5 Výhody a nevýhody fluktuáčnej asymetrie ako meradla vývojovej nestability

Za hlavné výhody fluktuáčnej asymetrie ako meradla vývojovej nestability v porovnaní s tradičnými metódami biomonitingu sa považujú (a) *zvýšená citlivosť*: odhalenie malých zmien vo fenotypovej variácii, ktoré by tradičné metódy nezachytili. Geometrická morfometrika nie je nutná na meranie fluktuáčnej asymetrie, ale môže byť dobrým nástrojom pri riešení zložitých alebo malých tvarových zmien. Ak sa očakáva, že budú fluktuácie v symetrii veľké a ľahko rozoznateľné pomocou tradičných meraní, alebo ak sa výskum nezameriava na detailné zmeny tvaru, geometrická morfometrika nemusí byť potrebná (Benítez et al., 2020); (b) *indikátor kumulatívneho stresu*: fluktučná asymetria je považovaná za dobré meradlo stresorov, ktorým mohol byť organizmus vystavený počas svojho vývoja. Odráža kombinované účinky genetických, environmentálnych a fyziologických stresorov. Vďaka tomu je užitočná na posúdenie celkovej kvality životného prostredia organizmu (Leung et al., 2000); (c) *rýchla reakcia*: fluktučná asymetria sa relatívne rýchlo prejavuje pri zmene prostredia. Predpokladá sa, že vývojová nestabilita odráža schopnosť organizmu vyrovnať sa so stresom počas ranných fáz vývoja. V dôsledku toho sa fluktuácie asymetrie môžu pomerne rýchlo prejavovať ako reakcia na zmeny podmienok prostredia, čo umožňuje včasné odhalenie stresorov (Leung, Brian, 1999). Z toho vyplýva, že vývojová nestabilita môže byť využívaná ako bioindikátor environmentálneho stresu (Foresman & Badyaev, 2005).

Z analyzovaných štúdií je zrejmé, že fluktučná analýza a vývojová nestabilita môžu pomôcť spresniť zaužívané praktiky biomonitingu. Napriek tomu majú aj svoje nevýhody. Aj keď sú citlivé na znečistenie, neposkytujú informáciu o špecifických typoch kontaminácie, ktoré tento efekt spôsobujú. Meranie fluktuáčnej asymetrie stále predstavuje určité koncepčné problémy. Niektoré štúdie tvrdia, že smerovú asymetriu nemožno použiť ako meradlo vývojovej nestability, pretože neznáme množstvo asymetrií má genetický základ. Fluktučná asymetria predstavuje tak len variáciu, ktorá má environmentálny pôvod. Smerovo asymetrické znaky sa však podľa iných štúdií môžu naopak skutočne využiť na hodnotenie vývojovej nestability (Graham et al., 1998).

Tradičné metódy monitoringu sú teda stále potrebné na zistenie, na identifikáciu a pôvod znečistenia (Pawlowski et al., 2018). Vývojová nestabilita, ktorej meradlom je fluktučná asymetria je ako technika náchylná na pozorovateľský bias a poskytuje limitované taxonomické

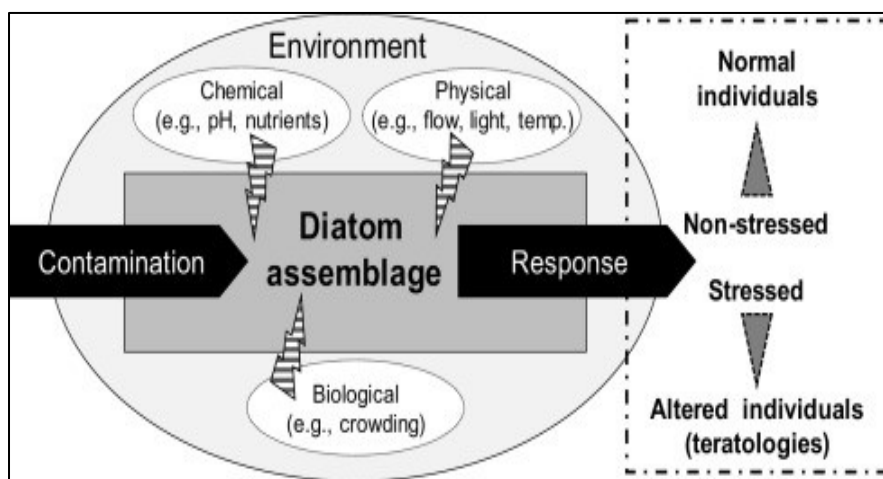
výsledky ako bolo zistené pri meta-analýze štúdií FA a DI v sladkovodných prostrediach. Výsledky štúdií fluktuačnej asymetrie sú nekonzistentné. V niektorých štúdiách sa fluktuačná asymetria zosilňuje pod vplyvom environmentálneho a genetického stresu. Naopak, v iných štúdiách sa FA pri strese nemení. Fluktuačná asymetria môže byť slabým všeobecným nástrojom odhadu stresu alebo fitness. Komplexné prostredie, adaptácia na stres a nevhodná metodika môžu čiastočne prispieť k tejto nekonzistentnosti. Nie je možné kontrolovať tieto stresory v prírodných podmienkach, hoci ich počet sa dá znížiť. Použitím štandardizovaného odberu vzoriek a merania, ako aj zhromažďovaním údajov od viacerých druhov z rôznych taxónov môžeme vývojovú nestabilitu lepšie vyhodnotiť. Rozdielne mikrostanoviská nám môžu poskytnúť menšie množstvo faktorov prostredia pri štúdií prírodných populácií (Graham et al., 2010).

Fluktuačná asymetria a vývojová nestabilita sú užitočné ako jeden z prostriedkov biomonitoringu, ale nemali by úplne nahradiť už zaužívané, tradičné metódy (Li et al., 2010).

2 Stresové faktory prostredia a ich vplyv na rozsievky

Na bunkovú stenu a schránku skupín protistov môže mať vplyv niekoľko faktorov, vrátane environmentálnych stresorov. Ako vyplýva z obrázku 4, medzi chemické environmentálne stresory zaradíme napr. pH, chemické znečistenie (ťažké kovy, priemyselné chemikálie, pesticídy, farmaceutiká a hygienické produkty), znečistenie nutrientami a pod. Fyzikálnymi environmentálnymi stresormi rozumieme rýchlosť toku, žiarenie, teplotu a pod. Biologickými stresormi sú patogény (vírusy, parazity) a požer, medzidruhová kompetícia a predácia (Lavoie et al., 2017).

Práca je zameraná na chemické znečistenie ťažkými kovmi (kap. 2.1), ktoré sa do prostredia dostávajú činnosťou človeka. Vplyv ďalších typov chemického znečistenia je uvedený v nasledujúcich podkapitolách; znečistenie ropnými produktami v kapitole 2.2, farmaceutikami a hygienickými produktami v kapitole 2.3 a pesticídmi a herbicídmi v kapitole 2.4.



Obrázok 4 Environmentálne stresory (Lavoie et al., 2017)

2.1 Chemické znečistenie - vplyv ťažkých kovov

Ťažké kovy sa v prírode vyskytujú prirodzene v zemskej kôre, ale uvoľňujú sa aj počas rôznych priemyselných aktivít človeka (napr. pri ťažbe a spracovaní nerastných surovín) (Singh et al., 2011). Znečistenie ťažkými kovmi (najmä meď, kadmium a zinok) býva najčastejším dôvodom vzniku teratologických foriem. Ťažké kovy majú tendenciu kumulovať sa v organizmoch, a tým negatívne pôsobiť na ich morfológiu, rast, rozmnožovanie a celkový fitness (Inouye, 1989).

Chemické polutanty ako ťažké kovy, pesticídy a priemyselné chemikálie môžu ovplyvniť tvorbu bunkových stien tým, že narušia vstrebávanie dôležitých živín alebo enzýmov potrebných pri ich tvorbe. U rozsievok môže byť dôvodom citlivosti na uvedené polutanty samotné zloženie bunkovej steny. Niektoré typy znečistenia, napr. ťažké kovy alebo nanočastice spôsobujú väčšie škody na tomto type štruktúry a v tomto špecifickom zložení ako na celulózoých bunkových stenách zelených rias (Morelli et al., 2013). Aj metabolizmus môže u rozsievok zohrávať úlohu. Je známe, že je rýchlejší, preto potrebujú rozsievky vyšší prísun nutričov v porovnaní so zelenými riasami. Preukázalo sa, že nemalú úlohu v citlivosti rozsievok na antropogénne znečistenie mal aj spôsob, akým sa rozmnožujú (Morin & Coste, 2006).

2.1.1 Med' (Cu)

Nadbytok medi môže narušiť normálny metabolizmus buniek tým, že vytláča iné ióny z ich väzobných miest pre kovy alebo sa nešpecificky viaže na enzýmy, DNA a iné biomolekuly. Prípadne môžu voľné ióny medi spôsobiť oxidačné poškodenie katalyzovaním reakcií, pri ktorých vznikajú hydroxylové a iné oxyradikály (Collins et. al., 1995).

Pri druhu zelenej riasy *Chlamydomonas reinhardtii* (*Archaeplastida*, *Chlorophyceae*) bola pozorovaná inhibícia fotosyntézy a rastu vplyvom pôsobenia medi už pri relatívne nízkej koncentrácii 1 μM . Dôvodom bude pravdepodobne fakt, že med' pri tomto konkrétnom druhu vplýva na elektrónový transportný reťazec v chloroplastoch a interferuje aj s inými metabolickými procesmi. *Chlamydomonas* nezapadá úplne do tejto práce, ktorá si kladie primárne za cieľ porovnať komplexnejšie mineralizované schránky. Poznatky zo štúdií tohto zaujímavého druhu by sa dali potenciálne aplikovať aj na iné skupiny, preto je v práci spomenutý (Perreault et al., 2012).

Pri porovnaní rozsievok, zelených rias a ich citlivosti na medené nanočastice (CuNPs) bolo zistené, že rozsievky boli na túto formu znečistenia o niečo citlivejšie ako zelené riasy. Medené nanočastice pôsobili výrazne negatívnejšie na bunkovú stenu rozsievok ako tomu bolo u zelených rias. Oproti kokolitkám a panciernatkám boli rozsievky málo citlivé na znečistenie med'ou (Carlson, n.d.). Med' spôsobovala deformácie obrysov frustúl u *Fragilaria rumpens*, *F. tenera*, *Eunotia exigua* a *Eunotia* sp., zdvojené valvy boli pozorované tiež u *Nitzschia delicatissima* a 90°-vá rotácia frustuly bola zasa viditeľná u *Asterionella formosa*. Veľké

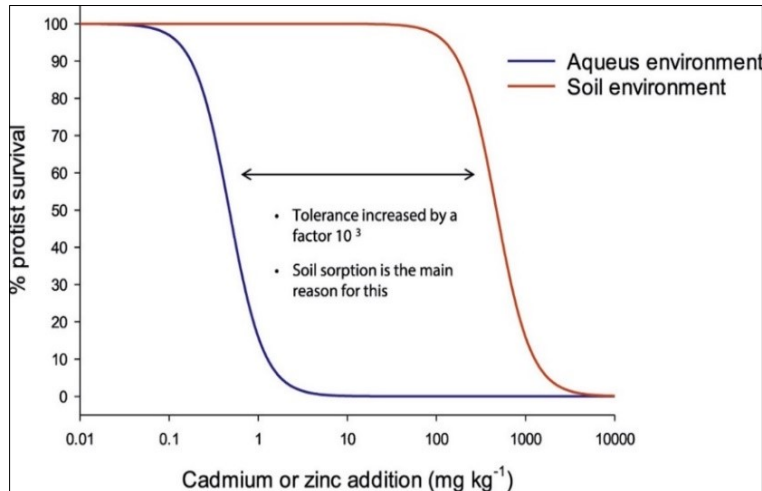
deformity boli pozorované aj u *A. japonica*. Vo všeobecnosti ale tento polutant nespôsoboval atypické ornamentácie (Falasco, 2009). Odpoveďou rozsievky druhu *Thalassiosira pseudonana* na zvýšenú koncentráciu medi bolo zvýšenie expresie génov zodpovedných za detoxikáciu kovov vrátane génov kódujúcich metallothioniny a multidrug resistance proteíny. Rovnako sa ukázalo, že ak sú rozsievky vystavené vyššej koncentrácii medi, zvýšia príjem tohto kovu a expresiu med' viažúcich proteínov. Kokolity reagujú presne naopak (Davis et al., 2006).

2.1.2 Zinok (Zn)

Zinok je kofaktorom mnohých metaloenzýmov potrebných na opravu bunkových membrán, proliferáciu buniek a rast (Lin et al., 2018). Je potrebný pri tvorbe DNA, pri raste buniek a stavbe proteínov (Prasad, 1995). Pri druhoch *Scenedesmus obliquus* (Archaeplastida, Chlorophyceae) a *Chlorella vulgaris* (Archaeplastida, Trebouxiophyceae) sa zistila zvýšená citlivosť na tento kov, pričom *Scenedesmus* bol z týchto dvoch druhov citlivejší na zvyšujúcu sa koncentráciu zinku (Saavedra et al., 2018). Znečistenie nanočasticami oxidu zinočnatého (ZnONPs) opäť výrazne negatívnejšie vplývalo na rozsievky a ich bunkovú stenu než na zelené riasy. Rovnako ako u medi, aj v tomto prípade dokáže zinok inhibovať rôzne metabolické procesy v bunke (Takamura et al., 1989).

Zinok často pôsobí negatívne, keď je v prostredí prítomný ďalší polutant. Príkladom vzájomného pôsobenia dvoch ťažkých kovov sú zinok a kadmium. Obidva kovy sú asociované s abnormálnymi profilmi frustúl a vzormi strií, zdvojenou centrálnou časťou a deformáciami rafe. Vplyv oboch kontaminantov súčasne produkoval nezvyčajné tvary (asymetrické, či skrútené frustuly) najmä u druhov *Fragilaria gracilis*, *Cocconeis pediculus* a *C. placentula*. U *Ulnaria ulna* bola pozorovaná abnormálna ornamentácia strií a premiestnené pozdĺžne časti. U *Planothidium frequentissimum* tieto polutanty spôsobovali zdvojenú centrálnu časť a u *Nitzschia fonticola* atypické rafe (Falasco, 2009).

V jednej zo štúdií sa zistilo, že protisti vo vodnom prostredí boli citlivejší na znečistenie kadmiumom a zinkom ako pôdne druhy (Obrázok 5). Dôvodom je pravdepodobne silná schopnosť sorpcie kadmia v pôde (Johansen et al., 2018).



Obrázok 5 Toxicita kadmia a zinku vo vzťahu k vodným a pôdnym protistom (Johansen et al., 2018)

2.1.3 Kadmium (Cd)

Kadmium zasahuje do metabolických a vývojových procesov, pričom ovplyvňuje najmä jednobunkové sladkovodné zelené riasy druhu *Micrasterias* (*Archaeplastida*, *Zygnematomyceae*). Kadmium má viacero negatívnych vplyvov, medzi ktoré patrí rozpad diktyozómov, autofágia, znížená aktivita fotosystému II, znížená produkcia kyslíka a poškodenie chloroplastov. Tieto účinky sa pripisujú poruchám homeostázy vápnika, ktoré sú pravdepodobne spôsobené tým, že kadmium vytlačí vápnik (Andosch et al., 2012).

Pri porovnávaní rozsievok, panciernatiek a kokolítiek bolo zistené, panciernatky boli citlivejšie na kadmium, kým rozsievky neboli až tak citlivé na tento polutant. Pravdepodobnou príčinou odlišností v citlivosti bude rôzny spôsob detoxikácie a rozdielnosť skupín. Kokolitky sú, z hľadiska citlivosti, na tom podobne ako rozsievky.

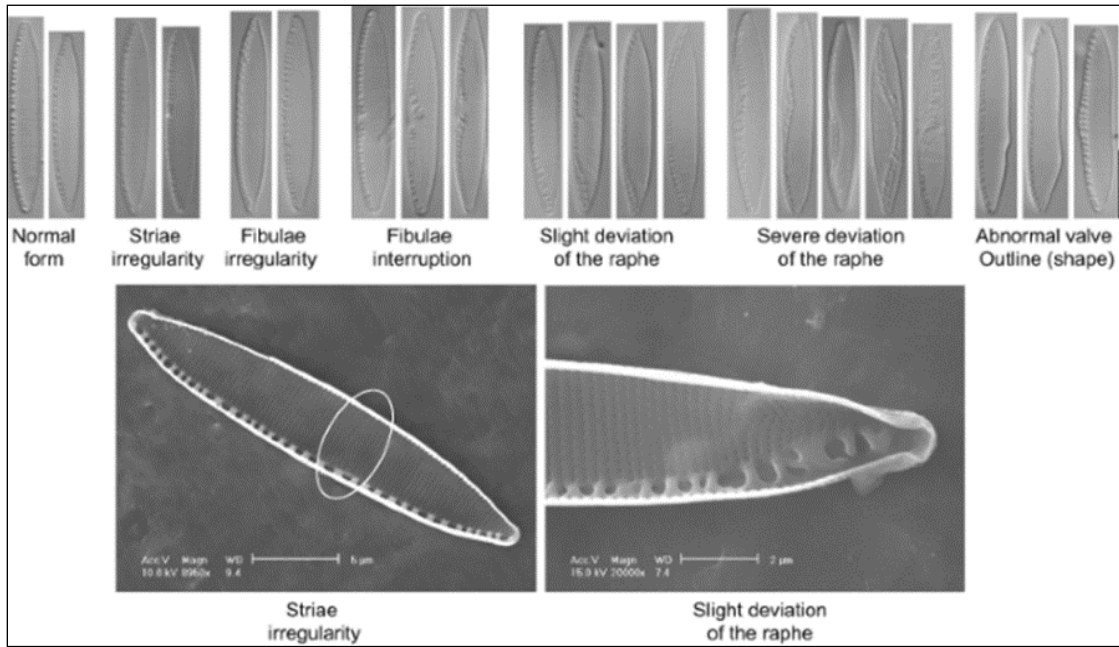
Kokolitky vytvárajú doštičky z uhličitanu vápenatého, ktoré tvoria ochrannú vrstvu okolo bunky, kým rozsievky majú mineralizovanú bunkovú stenu. Citlivosť na kadmium a meď je síce podobná, ale nie úplne rovnaká. Kokolitky sú oproti rozsievkam citlivejšie na kadmium. Dôvod bude opäť v rozdieloch v prijímaní kovov a detoxikácii. Tento proces nie je úplne známy, ale

existujú možné hypotézy. Rozdiely v tom ako tieto skupiny prijímajú meď, môže byť zapríčinená rozdielmi v expresii génov zodpovedných za homeostázu a detoxikáciu (Xu & Morel, 2013).

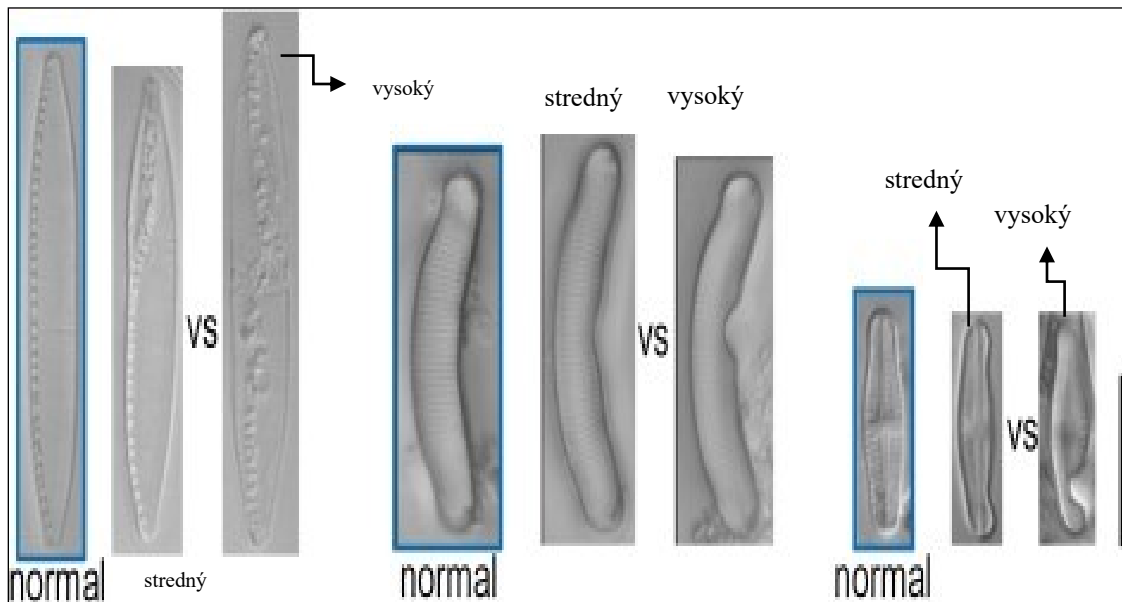
U rozsievky *Planothidium frequentissimum* sa prejavili teratológie spôsobené vplyvmi kadmia. Najviac boli viditeľné na striách, oblasti rafe, na samotných miskách a centrálnej časti. Množstvo teratológií bolo menšie, keď prestalo na rozsievky vplývať kadmium a ani po 28 dňoch v kontrolovanom prostredí sa schránky plne neobnovili. Zdá sa, že teratológie v oblasti strií boli odolnejšie. Aj keď kadmium nebolo už vo vzorkách prítomné, boli deformácie hojné a výrazne vyššie ako v referenčných kultúrach. Rôzne rozsievkové druhy sú však na kadmium rôzne citlivé, a preto je potrebné zahrnúť aj iné druhy a porovnať ich schopnosti regenerácie a čas, ktorý bunky potrebujú v prírodných podmienkach na návrat do pôvodného stavu (Arini et al., 2013).

U rozsievky *Nitzschia palea* boli tiež zaznamenané výrazné zmeny v raste, efektívite fotosyntézy a boli pozorované aj deformácie schránok. Molekulárne reakcie korelovali s hladinou kadmia a korelovali aj množstvá postihnutých génov, intenzity reakcie a frekvencie pozorovaní. Vplyv kadmia mal za následok expresiu génov zapojených do mitochondriálneho metabolizmu, fotosyntézy, oxidačného stresu a metabolizmu kremíka (Tiam et al., 2018).

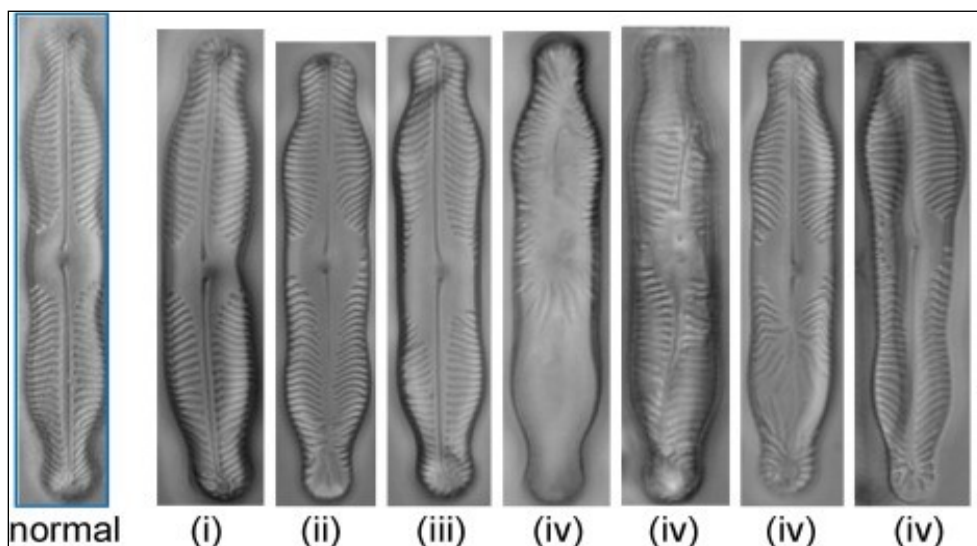
Najviac deformácií bolo viditeľných po ošetrení C₂, ktoré dobre kumulovalo kadmium. Tieto deformácie je možné vidieť na obrázkoch 6 až 8 nižšie. Kadmium spôsobovalo abnormality v tvare frustuly u *Achnanthydium* sp., *Amphora pediculus*, *Eolimna minima*, *Gomphonema parvulum*, *Mayamaea* sp. (vrátane *M. agrestis*) a *Nitzschia palea*. U *Encyonema minutum*, *Eolimna minima* a *Sellaphora seminulum* boli pozorované prerušenia rafe a abnormality. Abnormality v tvare pórov a ornamentácií boli pozorované u *E. minima* a *G. Parvulum*. Kadmium okrem toho spôsobuje aj nezvyčajné zoskupenia kolónií u *Tabellaria flocculosa* (Tiam et al., 2018b).



Obrázok 6 Typy deformácií pozorovaných u *Nitzschia palea* vystavených vplyvom kadmia
 mierka 10 μm, (Tiam et al., 2018a)



Obrázok 7 Stupne deformácie frustúl u *Nitzschia palea*, *Eunotia* sp. a *Achnantheidium minutissimum* spôsobené ťažkými kovmi
 mierka = 10 μm, (Lavoie et al., 2017)



Obrázok 8 Príklady deformácií a ich rozsah u *Pinnularia* sp, vystavenej pôsobeniu kadmia

(i) nepravidelné frustuly/abnormálne tvary, (ii) atypické rafe (iii) aberantná ornamentácia strií/areoly, (iv) zmiešané deformácie, mierka = 10 μm (Lavoie et al., 2017)

Všetky deformácie zobrazené na obrázkoch 6 až 8 sa dajú považovať za významné pre účely biomonitoringu (Lavoie et al., 2017).

U buniek *Dunaliella tertiolecta* (*Archaeplastida*, *Chlorophyceae*) bola pozorovaná adaptácia na stres spôsobený kadmium, vrátane viditeľných poškodení tvaru buniek, zhoršenej pohyblivosti, zvýšenej fyziologickej aktivity a zvýšeného množstva zelenej fluorescence. Pozorovaná bola tiež zväčšená miera expresie proteínov viažúcich chlorofyl, ktoré sú dôležité pri fotosyntéze. Expresia proteínov ovplyvnila povrchové vlastnosti buniek a dynamiku adhézie. Bunky vykazovali zvýšenú tuhosť, čo malo za následok horšiu príľnavosť a deformácie (Ivošević DeNardis et al., 2019).

2.1.4 Železo (Fe)

Železo môže mať rôzny vplyv na bunkovú stenu a schránky eukaryotických mikroorganizmov (Sunda & Huntsman, 1995). Vo veľkej miere záleží na koncentrácii tohto kovu a na špecifickom organizme. Železo je dôležitý nutrient pre veľa organizmov, pretože sa využíva v množstve metabolických procesov vrátane fotosyntézy a respirácie (Boyd & Ellwood, 2010). Pri vysokých množstvách však železo spôsobuje oxidačný stres a celkovo narúša procesy v bunke (Hutchins & Boyd, 2016).

Rozsievky sú relatívne citlivé na zvýšené koncentrácie železa. Prítomnosť zvýšených koncentrácií železa má tiež vplyv na rast panciernatiek a kokolitiek (Marchetti et al., 2012). Rozsievky sú však zároveň citlivé aj na menšie koncentrácie železa ako kokolity a panciernatky, ktoré boli relatívne odolnejšie. Toto sa však týkalo druhov žijúcich v morskom prostredí (Maldonado et al., 2001). Rozsievky druhu *Pinnularia ferrophila* sú špecializované na vodné prostredie bohaté na železo a vyskytujú sa napr. v minerálnych prameňoch. Tento druh vykazoval vysokú variabilitu v transapikálnom smere (Arnika, 2017). Vo vzorkách, kde bola vysoká koncentrácia železa, ale aj iných kovov, napr. arzénu, nebola *Pinnularia ferrophila* deformovaná. Druh *Planothidium frequentissimum* bol však v takýchto podmienkach výrazne deformovaný („J. Kulichová, osobná informácia“).

Naopak rozsievky druhu *Fragilariopsis cylindrus*, sú adaptované na chladné, na železo chudobné vody v polárnych oblastiach. Majú špecializované gény, ktoré mu napomáhajú efektívnejšie využívať a získavať železo z prostredia. Tieto gény sa nazývajú „*iron responsive genes*“. Kódujú proteíny, ktoré regulujú príjem železa, napr. rôzne transportéry a železo viažuce molekuly (Von Quillfeldt, 2004). U zelenej riasy *Chlorella pyrenoidosa* (Archaeplastida, Trebouxiophyceae) bolo zistené, že menšie častice železa spôsobovali inhibíciu rastu buniek. V tomto prípade bol oxidačný stres vyvolaný železom hlavným toxickým mechanizmom (Lei et al., 2016). U zelenej riasy *Ankistrodesmus falcatus* (Archaeplastida, Chlorophyceae) bolo pozorované, že keď boli koncentrácie železa nižšie alebo vyššie ako 0.0005g/l, negatívne to ovplyvňovalo schopnosť rastu tohto druhu (Hoseini et al., 2006).

2.1.5 Olovo (Pb)

Zvýšená koncentrácia olova zvyšuje inhibičný stres voči fotosyntéze rias, pretože ničí pigmenty, ktoré sú pre fotosyntézu dôležité (Hee et al., 2021). Narúša aj pohyb a ukladanie vápnika v bunkách, čo zvyšuje stres (Fullmer, 1992).

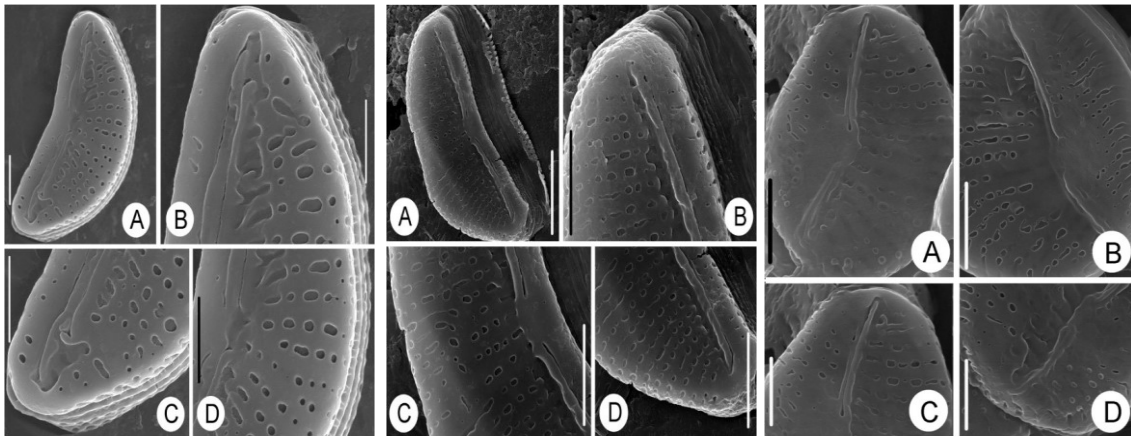
Zelené riasy patriace do rodu *Desmidiaceae* sú zvyčajne jednou z dominantných zložiek fyto-bentosu v kyslých mokradiach nachádzajúcich sa v blízkosti priemyselných oblastí, ktoré boli v 19. a 20. storočí vystavené významnému atmosférickému spádu olova. Ukázalo sa, že morfogénéza desmidových buniek môže byť výrazne ovplyvnená zvýšenou koncentráciou olova v prostredí. U modelového druhu *Micrasterias compereana* (Archaeplastida, Zygnematophyceae)

vystaveného nízkemu množstvu olova sa preukázalo významné zvýšenie tvarovej variability. Rôzne časti buniek reagovali odlišne na koncentrácie olova. Bilaterálna fluktučná asymetria v tvare dvoch susedných bunkových lalokov bola náchylná na zvýšené koncentrácie olova. Kvantitatívne zmeny v morfolologickej variabilite, ktoré sú hodnotené pomocou biradiálnej symetrie a asymetrie buniek by mohli byť vhodnými biologickými indikátormi na znečistenie olovom, najmä biotopov ako sú práve rašeliniská a kyslé slatiny (Neustupa & Woodard, 2020).

U *Chlorella* sp. (*Archaeplastida*, *Trebouxiophyceae*) a *Scenedesmus acutus* (*Archaeplastida*, *Chlorophyceae*) vystavených toxickým účinkom olova sa prejavovali makromolekulárne zmeny. Vplyv olova mal za následok zvýšené množstvo sacharidov a lipidov a znížené množstvo proteínov a fosforylovaných molekúl v oboch izolátoch. Olovo inhibovalo fotosyntézu a ovplyvňovalo syntézu polysacharidov a iných makromolekúl (Dao et al., 2017).

Rast buniek rozsievok *Halamphora veneta* a *Surirella crumena* bol vo všeobecnosti inhibovaný, keď boli vystavené účinkom kadmia a olova. *Halamphora veneta* však vykazovala zvýšenú hustotu buniek pri nízkej koncentrácii kadmia. Z toho vyplýva, že druh vykazuje určitú toleranciu voči kadmiu a mohol by preto byť využívaný pri bioremediácii. Systém fotosyntézy a antioxidačný systém u rozsievok má pravdepodobne kľúčovú rolu v tolerancii druhov na zaťaženie ťažkými kovmi kvôli pozorovaným zmenám v koncentráciách chlorofylu a.

Pokiaľ ide o morfológie schránok, aj tu je možné vidieť určité zmeny. Bunky *Halamphora veneta* zo skenov z elektrónového mikroskopu vykazujú menšie deformácie pod vplyvom kadmia. Na fotografiách na obrázku 9 nižšie sú viditeľné výraznejšie zmeny ako rozšírené schránky pod vplyvom olova (Mu et al., 2018).



Obrázok 9 Deformácie u *Halamphora veneta* (Mu et al., 2018)

Obr. 9a)
Halamphora veneta
 v prostredí bez
 prítomnosti ťažkých
 kovov

(A) celá bunka
 (B) predné časti bunky
 (C) zadné konce bunky
 (D) ventrálna strana
 bunky

Obr. 9b)
Halamphora veneta pod
 vplyvom kontaminácie
 kadmíom

(A) celá bunka
 (B) ventrálna časť
 (C) predná časť
 (D) zadná časť

Obr. 9c)
Halamphora veneta pod
 vplyvom kontaminácie
 olovom

(A) celá bunka
 (B) zaokrúhlené predné
 časti bunky (C) ventrálna
 časť rozšírená
 (D) zaokrúhlené zadné časti
 bunky

Deformácie sú viditeľné na ventrálnej strane, kde sa tvoria výdute a mierne zaokrúhlené konce buniek (Mu et al., 2018).

2.1.6 Arzén (As)

Arzén sa v životnom prostredí vyskytuje prirodzene vo forme As^{3+} . V stopových množstvách ho nájdeme v uhlí a koncentrovaný býva sulfidických mineráloch uhlia. Z ľudskej činnosti sa arzén do prostredia uvoľňuje najmä zo spaľovania a pri metalurgických procesoch (Jurkovič et. al. , 2008). Arzén a aj iné ťažké kovy interferujú s procesom fotosyntézy – inhibujú syntézu chlorofylu, redukujú množstvo fotosyntetického pigmentu a narúšajú elektrónový transportný reťazec, ale môže to mať negatívny dopad aj na konkurencieschopnosť rozsievok v porovnaní s inými organizmami, napr. s baktériami (Sharma, 2012).

Dunaliella salina (Archaeplastida, Chlorophyceae), známa svojou odolnosťou voči arzénu, bola skúmaná s cieľom pochopiť mechanizmy jej tolerancie. Proteomická analýza identifikovala rozdielne exprimované proteíny v *D. salina* vystavenej arzeničnanu. Ovplyvnený bol energetický metabolizmus, syntéza proteínov a vychytávanie ROS⁵. Môžeme ich považovať za radikály a proteíny súvisiace s ochranou (Ge et al., 2016). Pri rozsievkach bola zistená aj relatívne veľká citlivosť na arzén a olovo. Test sedimentárnej toxicity sa dá využiť na určovanie citlivosti rozsievok na rôzne ťažké kovy a arzén. Test je dobrým nástrojom na monitoring kvality vody (Adams & Stauber, 2004).

Pôsobenie arzénu a olova výrazne ovplyvňuje rast, fotosyntetickú aktivitu a odpoveď na oxidačný stres u rozsievok. Inhibujúce efekty arzénu na zelené riasy boli primárne spôsobené tým ako dlho boli vysokým koncentráciám arzénu vystavené a nie koncentráciou samotnou. Väčšinou je toxicita arzénu pozorovaná spolu s toxicitou iného polutantu, napr. medi. Bolo zistené, že ak sú prítomné oba polutanty, ich účinky sa vzájomne negujú. Med' umožňuje procesy absorpcie a speciácie arzénu v riasach, preto by toto zistenie mohlo byť potenciálne zaujímavé pre účely bioremediácie (Huang et al., 2021).

Zelená riasa *Chlamydomonas acidophila* (Archaeplastida, Chlorophyceae) bola relatívne citlivá na kadmium, ale odolná voči účinkom arzénu. Pri kontaminácií kadmiumom a arzénom bola tiež pozorovaná intenzívna vakuolizácia a zväčšená koncentrácia škrobu a lipidov. Arzén spôsobil drastickú dezorganizáciu v stigme a thylakoidoch, ale neboli pozorované žiadne zmeny v ultraštruktúre týchto organel (Díaz et al., 2020).

2.2 Znečistenie ropnými produktami

Pri reakcii na znečistenie ropnými produktami boli rozsievky opäť o niečo citlivejšie v porovnaní so zelenými riasami. U oboch skupín sa vyskytovala zmena v zložení bunkovej steny, ale u rozsievok bola táto zmena výraznejšia. U rozsievok a panciernatiek bola zistená zmena zloženia mikrobiálnych komunit, ktoré dokážu rozkladať uhl'ovodíky, keď sa vo vode zvýšila koncentrácia polutantu. Prepojenie metabolizmov medzi riasovými komunitami

⁵ ROS – reactive oxygen species sú nestabilné molekuly obsahujúce kyslík, ktoré ľahko reagujú s inými molekulami a môžu poškodiť DNA, RNA a proteíny (Zorov et al., 2014).

a baktériami ich tak robí odolnými proti stresu spôsobenému ropnými produktami (Quigg et al., 2021).

2.3 Znečistenie farmaceutikami a hygienickými produktami

Na zelené riasy negatívne vplyvajú rôzne skupiny liečiv. Vyzerajú byť relatívne citlivé najmä na antidepresíva (Villain et al., 2016). Pri porovnávaní sladkovodných skupín protistov - konkrétne nálevníkov, panciernatiek, rozsievok a ich citlivosti na farmaceutiká a hygienické produkty bolo zistené, že rozsievky boli najmenej citlivé na tieto typy znečistenia. Dôvodom môžu byť rozdiely v metabolických dráhach (Di Lorenzo et al., 2018). Pre zelené riasy je veľmi problematický Clarithromycin, farmaceutikum prítomné vo vysokých koncentráciách v povrchovej vode (Villain et al., 2016).

2.4 Znečistenie pesticídmi a herbicídmi

Na rozsievky majú výraznejší účinok niektoré typy herbicídov a pesticídov. Ide napríklad o taxóny *Gomphonema* sp. a *Encyonema gracilis*. Aj keď *Navicula cryptotenella* bola relatívne odolná voči znečisteniu herbicídmi. Celkovo sa citlivosť rozsievok na uvedené spôsoby znečistenia líši podľa typu polutantov a podľa toho s akou skupinou organizmov sú porovnávané. Na úrovni spoločenstva sa nepreukázali významné vplyvy účinkov herbicídov. Účinky herbicídov nemerili to aké taxóny boli v spoločenstve najcitlivejšie. Poradie citlivosti dominantných taxónov rozsievok bolo podobné pre každý z ôsmich pozorovaných herbicídov. Zhoda výsledkov medzi jednotlivými herbicídmi naznačuje, že sladkovodné bentické rozsievky môžu byť vhodnými in situ indikátormi na zisťovanie toxicity herbicídov (Wood et al., 2016).

Pri porovnávaní jedného druhu pesticídu a piatich herbicídov bolo zistené, že pesticíd a tri typy herbicídov mali najväčšie inhibičné účinky a ovplyvňovali schopnosť rastu u *Chlamydomonas reinhardtii* (Maule et al., 1984). V inom pozorovaní sa druhy najcitlivejšie na vybrané herbicídy líšili: zelená riasa *Desmodesmus subspicatus* (*Archaeplastida*, *Chlorophyceae*) bola najcitlivejšia na chlórnitrofén a pendimethalín, rozsievky: *Achnanthydium minutissimum* bola najcitlivejšie na chlórprofám, *Nitzschia palea* na dikvát, glyfosát a dichlobenil a *Navicula pelliculosa* bola najcitlivejšia na trifluralín (Nagai, 2019).

Polycyklické aromatické uhľovodíky (PAU), ako je fluorantén, ktorý vzniká pri spaľovaní organických materiálov (drevo, uhlie), či spaľovaním fosílnych palív je často prítomný v riečnych systémoch (Manciulea & Dumitrescu, 2016). Už pri malej koncentrácii spôsobil fluorantén zmeny v rozsievkových spoločenstvách, ale neboli viditeľné žiadne deformácie ich bunkových stien. Pri vysokej koncentrácii však došlo k výraznejším zmenám v rozsievkových spoločenstvách a u väčšiny taxónov boli pozorované už aj abnormálne formy, čo nasvedčuje tomu, že fluorantén má teratologické účinky. Niektoré taxóny boli opäť odolnejšie voči vplyvom tejto látky ako iné (Rimet et al., 2004).

3 Záver

3.1 Diskusia

Hoci sú malformácie rozsievok informatívne, ich používanie ako nástroja biomonitoringu je spojené s určitými problémami. Identifikácia špecifických príčin rozsievkových malformácií môže byť náročná. K abnormalitám frustúl prispieva viacero faktorov a rozlíšenie primárnej príčiny malformácií si môže vyžadovať komplexné analýzy a zohľadnenie ďalších environmentálnych faktorov.

Rozsievky vykazujú prirodzenú variabilitu morfológie schránok, a to aj v prípade, že nie sú vystavené environmentálnemu stresu. Bez správnych základných údajov môže byť ťažké rozlišovať medzi prirodzenou variabilitou a malformáciami spôsobenými stresom. Okrem toho, nie všetky druhy rozsievok musia vykazovať viditeľné malformácie ako reakciu na environmentálny stres. Niektoré druhy môžu vykazovať menšie reakcie, ktoré nie sú ľahko viditeľné. Preto sa použiteľnosť malformácií rozsievok ako indikátorov biomonitoringu môže medzi jednotlivými druhmi a ekosystémami líšiť (Lavoie et al., 2017).

Reakcia rozsievok však môže byť nekonzistentná a zložitá. Rôzne druhy môžu vykazovať rôzny stupeň citlivosti a reakcie na špecifické látky. Výsledok môžu ovplyvniť faktory, ako je trvanie a intenzita vystavenia vplyvom látky, ako aj podmienky prostredia. Nejednotná reakcia na environmentálne stresory môže preto komplikovať ich použitie ako indikátorov biomonitoringu. Pri druhu *Halamphora veneta* bola preukázaná zvýšená hustota buniek pri nízkej koncentrácii kadmia. Z toho vyplýva, že druh vykazuje určitú toleranciu voči kadmii. Naopak u rozsievky *Planothidium frequentissimum* sa prejavili teratológie spôsobené vplyvmi kadmia a najviac boli viditeľné na striách, oblasti rafe a na samotných miskách a centrálnej časti (Mu et al., 2018).

Okrem toho použitie rozsievok v biomonitoringu komplikuje široká škála vybraných taxónov. Rozsievky predstavujú rozmanitú skupinu organizmov s mnohými druhmi a morfológickými variáciami. Každý druh môže reagovať na environmentálne stresory odlišne, čo sťažuje stanovenie univerzálnych metód pre ich použitie ako nástrojov biomonitoringu (Masouras et al., 2021).

Limitujúcim faktorom je aj počet štúdií, ktoré by umožnili zovšeobecnenie, a široká škála vybraných taxónov. Je potrebný ďalší výskum na zvýšenie spoľahlivosti a použiteľnosti rozsievok ako nástroja biomonitoringu.

Rozsievky môžu byť v niektorých prípadoch obzvlášť citlivé a užitočné v porovnaní s inými protistami, ale existujú aj situácie, keď môžu zlyhať pri poskytovaní presných informácií pre účely biomonitoringu. Ich schránky ľahko akumulujú ťažké kovy a môžu vykazovať malformácie v reakcii na toxicitu (Pandey et al., 2018).

Jednou z nevýhod využitia protíst je fakt, že neposkytujú jednoduchú alternatívu k už existujúcemu systému biomonitoringu, ktorý využíva makrobezstavovce na odhad zhoršenej kvality vody v riekach. Napriek tomu existuje reálna možnosť využitia prvokov v biomonitoringu, napr. na monitorovanie podzemných vôd. O protistoch je známe, že vytvárajú cysty, čo nám môže poskytnúť informácie o predchádzajúcich podmienkach v suchých riekach a mokradiach. Ďalej ich veľmi rýchla reakcia na zaplavenie znamená, že prvoky by mali byť užitočné na odhad kvality vody v relatívne krátkom časovom úseku (Joska & South Africa Water Research Commission, 2005).

Na riešenie týchto obmedzení a zvýšenie spoľahlivosti rozsievok ako ukazovateľov biomonitoringu sa často odporúča použiť prístup založený na viacerých taxónoch, ktorý kombinuje rozsievky s inými protistami, aby sa získalo komplexnejšie hodnotenie zdravia ekosystému a životného prostredia. Hoci je odporúčané, aby bolo do programu biomonitoringu zahrnutých viacero skupín organizmov, málokedy je tomu tak, a to najmä z dôvodu logistiky a nákladov. Väčšinou sa na konkrétny biomonitoring využívajú skupiny, ktoré majú nejaké výhody, pokiaľ ide o určovanie a pozorovanie znečistenia napr. citlivosť na herbicídy a živiny u rias (Resh, 2008).

Geometrickú morfometriku ako kvantitatívnu metódu na analýzu tvarových zmien, možno použiť na štúdium rozsievok kultivovaných v experimentálnych podmienkach aj v prírodných populáciách. Táto technika nie je limitovaná výlučne na rozsievky, ale vo veľkej miere sa uplatňuje pri rôznych iných skupinách protistných a mikroskopických organizmov. Použitá bola napr. u mrežovcov (*Radiolaria*), dierkavcov (*Foraminifera*) a nálevníkov (*Ciliophora*) (Danelian & Macleod, 2019; Shi & MacLeod, 2016; Marcotegui et al., 2018).

V štúdiu, ktorá popisuje využitie rozsievok v podmienkach experimentálneho stresu môže geometrická morfometrika pomôcť kvantifikovať a charakterizovať zmeny tvaru vyvolané špecifickými stresormi. Rozsievky môžu byť vystavené rôznym hladinám ťažkých kovov, nerovnováhe živín alebo zmenám pH, preto aby bolo následne možné analyzovať výsledné zmeny tvaru schránok. Porovnaním rozsievok, ktoré boli pod vplyvom stresu s kontrolnou skupinou je možné identifikovať a kvantifikovať zmeny v morfológii vyvolané stresom (Cerisier et al., 2019).

Celkovo možno povedať, že geometrická morfometrika je účinnou metódou na analýzu tvarových zmien u rozsievok kultivovaných v experimentálnych stresových podmienkach. Tento prístup poskytuje cenné poznatky o reakcii rozsievok a iných protistných skupín na environmentálne stresory, čo umožňuje lepšie pochopiť účinky stresu na ich morfológiu a potenciálne dôsledky na ekosystém.

3.2 Zhrnutie

V práci boli porovnávané tradičné metódy biomonitoringu s moderným prístupom využívajúcim geometrickú morfometriku na analýzu a kvantifikáciu asymetrie symetrických častí a tvarovej variability morfologických znakov, fluktuálnu asymetriu ako indikátora environmentálneho stresu a vývojovej nestability pri monitorovaní vodných zdrojov.

Práca sa primárne zameriavala na chemické anorganické polutanty, najmä na kontamináciu ťažkými kovmi a na vplyv tohto typu znečistenia na schránky rozsievok, zelených rias a iných protistných organizmov.

V práci boli analyzované teratologické zmeny spôsobené ťažkými kovmi a ich vplyv na vnútorné prostredie bunky a morfológiu organizmu. Skúmané boli aj rozdiely vo vplyve ťažkých kovov medzi rôznymi skupinami jednobunkových eukaryot.

4 Zoznam použitej literatúry

- Adams, M. S., & Stauber, J. L., (2004), Development of a whole sediment toxicity test using a benthic marine microalga, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 23(8), 1957–1968, <https://doi.org/10.1897/03-232>
- Andosch, A., Affenzeller, M. J., Lütz, C., & Lütz-Meindl, U., (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, <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2012.06.002>
- Andráš, P., Dadová - Jiří, J., & Dirner, K. V., (2016), Problémy definície pojmu ťažký kov What does mean the term heavy metal? Zborník zo VI. medzinárodnej konferencie, Proceeding of the 6th International Conference, November 15, 2016, Bratislava, Slovakia
- Arini, A., Durant, F., Coste, M., Delmas, F., & Feurtet-Mazel, A., (2013), Cadmium decontamination and reversal potential of teratological forms of the diatom *Planothidium frequentissimum* (Bacillariophyceae) after experimental contamination, *Journal of Phycology*, 49(2), 361–370, <https://doi.org/10.1111/jpy.12044>
- Benítez, H. A., Lemic, D., Villalobos-Leiva, A., Bažok, R., Órdenes-Claveria, R., Živković, I. P., & Mikac, K. M., (2020), Breaking symmetry: Fluctuating asymmetry and geometric morphometrics as tools for evaluating developmental instability under diverse agroecosystems, *Symmetry*, 12(11), 1–13, <https://doi.org/10.3390/sym12111789>
- Boyd, P. W., & Ellwood, M. J., (2010), The biogeochemical cycle of iron in the ocean, *Nature Geoscience*, 3(10), 675–682, <https://doi.org/10.1038/ngeo964>
- Budečević, S., Manitašević Jovanović, S., Vuleta, A., Tucić, B. & Klingenberg, C. P., (2022), Directional asymmetry and direction-giving factors: Lessons from flowers with complex symmetry, *Evolution & Development*, 24(3-4), 92-108, <https://doi.org/10.1111/ede.12402>
- Carlson, J. E., (1994), Relative sensitivities of diatoms to selected heavy metals, Master thesis, Eastern Illinois University, Charleston, Illinois, USA
- Caroni, R., & Irvine, K., (2010), The potential of zooplankton communities for ecological assessment of lakes: Redundant concept or political oversight?, *Biology and Environment*, 110(1), 35–53, <https://doi.org/10.3318/BIOE.2010.110.1.35>
- Cerisier, A., Vedrenne, J., Lavoie, I., & Morin, S., (2019), Assessing the severity of diatom deformities using geometric morphometry, *Botany Letters*, 166(1), 32–40, <https://doi.org/10.1080/23818107.2018.1474800>
- Ciesielczuk, T., Kusza, G., Poluszyńska, J., & Kochanowska, K., (2014), Pollution of flooded arable soils with heavy metals and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), *Water, Air, and Soil Pollution*, 225(10), 2145, <https://doi.org/10.1007/s11270-014-2145-0>

- Ciugulea, I., Nudelman, M. A., Brosnan, S., & Triemer, R. E., (2008), Phylogeny of the euglenoid loricate genera *Trachelomonas* and *Strombomonas* (Euglenophyta) inferred from nuclear SSU and LSU rDNA, *Journal of Phycology*, 44(2), 406–418, <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2008.00472.x>
- Collins, S., McCoy, K., Catapane, E. J & Carroll M. A., (2010), The effects of copper and copper blocking agents on gill mitochondrial O₂ Utilization of *Crassostrea virginica*, *Vivo* (Brooklyn), 32(1), 14-19
- Dao, L., Beardall, J., & Heraud, P., (2017), Characterisation of Pb-induced changes and prediction of Pb exposure in microalgae using infrared spectroscopy, *Aquatic Toxicology*, 188, 33–42. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2017.04.006>
- Davis, A. K., Hildebrand, M., & Palenik, B., (2006), Gene expression induced by copper stress in the diatom *Thalassiosira pseudonana*, *Eukaryotic Cell*, 5(7), 1157–1168, <https://doi.org/10.1128/EC.00042-06>
- Di Lorenzo, T., Castaño-Sánchez, A., Di Marzio, W. D., García-Doncel, P., Nozal Martínez, L., Galassi, D. M. P., & Iepure, S., (2018), The role of freshwater copepods in the environmental risk assessment of caffeine and propranolol mixtures in the surface water bodies of Spain, *Chemosphere*, 220, 227–236. [doi:10.1016/j.chemosphere.2018.12.117](https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.12.117)
- Díaz, S., de Francisco, P., Olsson, S., Aguilera, Á., González-Toril, E., & Martín-González, A., (2020), Toxicity, physiological, and ultrastructural effects of arsenic and cadmium on the extremophilic microalga *Chlamydomonas acidophila*, *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(5), 1650, <https://doi.org/10.3390/ijerph17051650>
- Dongen, S., V. (2006). Fluctuating asymmetry and developmental instability in evolutionary biology: Past, present and future, *Journal of Evolutionary Biology*, 19(6), 1727–1743, <https://doi.org/10.1111/j.1420-9101.2006.01175.x>
- Falasco, E., Bona, F., Ginepro, M., Hlúbiková, D., Hoffmann, L., & Ector, L., (2009), Morphological abnormalities of diatom silica walls in relation to heavy metal contamination and artificial growth conditions, *Water SA*, 35(5), 595–606, <https://doi.org/10.4314/wsa.v35i5.49185>
- Foresman, K. R., & Badyaev, A.V., (2005), Developmental instability and the environment: why are some species better indicators of stress than others. In: Merritt, J. F., S. Churchfield, R. Hutterer, & Sheftel B. A. (Eds.), *Advances in the biology of the shrews II*. Carnegie Museum of Natural History
- Fullmer, C. S. (1992), Intestinal interactions of lead and calcium, *Neurotoxicology*, 13(4), 799-807
- Ge, Y., Ning, Z., Wang, Y., Zheng, Y., Zhang, C., & Figeys, D., (2016), Quantitative proteomic analysis of *Dunaliella salina* upon acute arsenate exposure, *Chemosphere*, 145, 112–118, <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.11.049>
- Gelšvartas, J. (2010). Geometric morphometrics

- Graham, J. H., Emlen, J. M., Carl Freeman, D., Leamy, L. J., & Kieser, J. A., (1998), Directional asymmetry and the measurement of developmental instability. *Biological Journal of the Linnean Society*, 64(1), 1-16, <https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.1998.tb01530.x>
- Graham, J. H., Raz, S., Hel-Or, H., & Nevo, E., (2010), Fluctuating asymmetry: Methods, theory, and applications, *Symmetry*, 2, 66–540, <https://doi.org/10.3390/sym2020466>
- Hawkes, S. J. (1997), What is a “Heavy metal”? *Journal of Chemical Education*, 74, 1374, <http://dx.doi.org/10.1021/ed074p1374>
- Hee, C. W., Shing, W. L., & Chi, C. K., (2021), Effect of lead (Pb) exposure towards green microalgae (*Chlorella vulgaris*) on the changes of physicochemical parameters in water, *South African Journal of Chemical Engineering*, 37, 252–255, <https://doi.org/10.1016/j.sajce.2021.04.002>
- Hoseini, S. M., Seyfabadi, S. J., & Fallahi, M., (2006), Effects of iron concentration on the growth of green alga, *Ankistrodesmus falcatus*, *Iranian Scientific Fisheries*, 15 (3), 161–164, <https://doi: 10.22092/ISFJ.2006.114905>
- Huang, Z., Chen, B., Zhang, J., Yang, C., Wang, J., Song, F., & Li, S., (2021), Absorption and speciation of arsenic by microalgae under arsenic-copper co-exposure, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 213, 112024 <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.112024>
- Hutchins, D. A., & Boyd, P. W., (2016), Marine phytoplankton and the changing ocean iron cycle. *Nature Climate Change*, 6(12), 1072–1079, <https://doi.org/10.1038/nclimate3147>
- Inouye, M. (1989). Review teratology of heavy metals: mercury and other contaminants, *Congenital Anomalies*, 333 _44, <https://doi.org/10.1111/j.1741-4520.1989.tb00753.x>
- Ivošević DeNardis, N., Pečar, I. J., Ružić, I., Novosel, N., Mišić Radić, T., Weber, A., Kasum, D., Pavlinska, Z., Balogh, R. K., Hajdu, B., Marček Chorvátová, A., & Gyurcsik, B., (2019), Algal cell response to laboratory-induced cadmium stress: a multimethod approach, *European Biophysics Journal*, 48(3), 231–248, <https://doi.org/10.1007/s00249-019-01347-6>
- Johansen, J. L., Rønn, R., & Ekelund, F., (2018), Toxicity of cadmium and zinc to small soil protists, *Environmental Pollution*, 242(8), 1510–1517. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.08.034>
- Joska, M. A., & South Africa, (2005), Development of a biomonitoring method using protozoans for assessment of water quality in rivers and ground waters and seasonal/emphemeral waters, Report to the Water Research Commission, University of Cape Town, Cape Town, South Africa
- Jurkovič, Ľ., Veselská, V., Gučková, V., Frankovská, J., (2008), Geochemické zhodnotenie kontaminácie pôd arzénom v oblasti Zemianskych Kostolian *Acta Environmentalica Universitatis Comenianae (Bratislava)*, 16, 47–55

- Klingenberg, C. P., (2010), Evolution and development of shape: Integrating quantitative approaches, *Nature Reviews Genetics*, 11, 623–635, <https://doi.org/10.1038/nrg2829>
- Lavoie, I., Hamilton, P. B., Morin, S., Tiam, S. K., Kahlert, M., Gonçalves, S., Falasco, E., Fortin, C., Gontero, B., Heudre, D., Kojadinovic-Sirinelli, M., Manoylov, K., Pandey, L. K., & Taylor, J. C., (2017), Diatom teratologies as biomarkers of contamination: Are all deformities ecologically meaningful?, *Ecological Indicators*, 82, 539–550, <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2017.06.048>
- Lavoie, I., Morin, S., Laderriere, V., & Fortin, C., (2018), Freshwater diatoms as indicators of combined long-term mining and urban stressors in junction creek (Ontario, Canada), *Environments*, 5(2), 1–17, <https://doi.org/10.3390/environments5020030>
- Lei, C., Zhang, L., Yang, K., Zhu, L., & Lin, D., (2016), Toxicity of iron-based nanoparticles to green algae: Effects of particle size, crystal phase, oxidation state and environmental aging, *Environmental Pollution*, 218, 505–512, <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.07.030>
- Leung, B., Forbes, M. R., & Houle, D., (2000), Fluctuating asymmetry as a bioindicator of stress: Comparing efficacy of analyses involving multiple traits, *The American Naturalist* 155(1), 101-115, <https://doi.org/10.1086/303298>
- Leung, B., Assessing and developing the use of fluctuating asymmetry as a bioindicator of environmental stress and quality of organisms, (1999), Ph.D. thesis, Carleton University, Ottawa, Canada, <https://doi.org/10.22215/etd/1999-04182>
- Li, L., Zheng, B., & Liu, L., (2010), Biomonitoring and bioindicators used for river ecosystems: Definitions, approaches and trends, *Procedia Environmental Sciences*, 2, 1510–1524, <https://doi.org/10.1016/j.proenv.2010.10.164>
- Lin, P. H., Sermersheim, M., Li, H., Lee, P. H. U., Steinberg, S. M., & Ma, J., (2018), Zinc in wound healing modulation, *Nutrients*, 10(1), 16, <https://doi.org/10.3390/nu10010016>
- Maldonado, M. T., Boyd, P. W., Laroche, J., Strzepek, R., Waite, A., Bowie, A. R., Croot, P. L., Frew, R. D., & Price, N. M., (2001), Iron uptake and physiological response of phytoplankton during a mesoscale Southern ocean iron enrichment, 46(7), 1802 — 1808, <https://doi.org/10.4319/lo.2001.46.7.1802>
- Manciulea, I., & Dumitrescu, L. (2016), Polycyklické aromatické uhľovodíky (PAU), Learning toxicology through open educational, Transilvania University Of Braşov, Braşov, Romania
- Mangadze, T., Dalu, T., & William Froneman, P., (2019), Biological monitoring in southern Africa: A review of the current status, challenges and future prospects. *Science of the Total Environment*, 648, 1492–1499, <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.08.252>
- Mann, D. G., Crawford, R. M., & Round, F. E., (2016), Bacillariophyta. In *Handbook of the Protists* (pp. 1–62). Springer International Publishing, https://doi.org/10.1007/978-3-319-32669-6_29-1

- Manthey, L., & Ousley, S. D., (2020), Geometric morphometrics. Statistics And Probability In Forensic Anthropology, 5.3, 289-298, Editor(s): Zuzana Obertová, Alistair Stewart, Cristina Cattaneo, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815764-0.00023-X>
- Marchetti, A., Schruth, D. M., Durkin, C. A., Parker, M. S., Kodner, R. B., Berthiaume, C. T., Morales, R., Allen, A. E., & Armbrusta, E. V., (2012), Comparative metatranscriptomics identifies molecular bases for the physiological responses of phytoplankton to varying iron availability, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 109(6), E317–E325 <https://doi.org/10.1073/pnas.1118408109>
- Marcotegui, P. S., Montes, M. M., Barneche, J., Ferrari, W., & Martorelli, S., (2018), Geometric morphometric on a new species of *Trichodinidae*, A tool to discriminate trichodinid species combined with traditional morphology and molecular analysis, International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife, 7(2), 228–236, <https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2018.06.004>
- Masouras, A., Karaouzas, I., Dimitriou, E., Tsirtsis, G., & Smeti, E., (2021), Benthic diatoms in river biomonitoring-present and future perspectives within the water framework directive. Water, 13(4), 478, <https://doi.org/10.3390/w13040478>
- Matthies, M., Solomon, K., Vighi, M., Gilman, A., & Tarazona, J. V., (2016), The origin and evolution of assessment criteria for persistent, bioaccumulative and toxic (PBT) chemicals and persistent organic pollutants (POPs), Environmental Science: Processes and Impacts, 18, 1114–1128, <https://doi.org/10.1039/c6em00311g>
- Maule, A. & Wright, S. J. L., (1984), Herbicide effects on the population growth of some green algae and cyanobacteria, Journal of Applied Bacteriology, 57(2), 369-379, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1984.tb01403.x>
- Morelli, E., Salvadori, E., Bizzarri, R., Cioni, P., & Gabellieri, E., (2013), Interaction of CdSe/ZnS quantum dots with the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum* and the green alga *Dunaliella tertiolecta*: A biophysical approach, Biophysical Chemistry, 182, 4–10, <https://doi.org/10.1016/j.bpc.2013.06.007>
- Morin, S. & Coste, M. (2006), Metal-induced shifts in the morphology of diatoms from the Riou Mort and Riou Viou streams (South West France). In Ács, É., Kiss, K. T., Padisák, J. & Szabó, K. (Eds.), Use of algae for monitoring rivers VI, Hungarian Algological Society, Göd, Hungary, Balatonfüred, pp. 91-106
- Mu, W., Chen, Y., Liu, Y., Pan, X., & Fan, Y., (2018), Toxicological effects of cadmium and lead on two freshwater diatoms. Environmental Toxicology and Pharmacology, 59, 152–162, <https://doi.org/10.1016/j.etap.2018.03.013>
- Nagai, T., (2019), Sensitivity differences among seven algal species to 12 herbicides with various modes of action. Journal of Pesticide Science, 44(4), 225–232. <https://doi.org/10.1584/JPESTICS.D19-039>
- Neustupa, J., & Woodard, K., (2020), Geometric morphometrics reveals increased symmetric shape variation and asymmetry related to lead exposure in the freshwater green alga *Micrasterias compereana*, Ecological Indicators, 111, 106054, <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2019.106054>

- Orr, R. J. S., Murray, S. A., Stüken, A., Rhodes, L., & Jakobsen, K. S. (2012). When naked became armored: An eight-gene phylogeny reveals monophyletic origin of theca in *Dinoflagellates*. *Plos One*, 7(11), e50004, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0050004>
- Pandey, L. K., Sharma, Y. C., Park, J., Choi, S., Lee, H., Lyu, J., & Han, T., (2018), Evaluating features of periphytic diatom communities as biomonitoring tools in fresh, brackish and marine waters. *Aquatic Toxicology*, 194, 67–77, <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2017.11.003>
- Parsons, P. A., (1990), Fluctuating asymmetry: An epigenetic measure of stress, *Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society*, 65(2), 131-45, <https://doi.org/10.1111/j.1469-185x.1990.tb01186.x>
- Pawlowski, J., Kelly-Quinn, M., Altermatt, F., Apothéloz-Perret-Gentil, L., Beja, P., Boggero, A., Borja, A., Bouchez, A., Cordier, T., Domaizon, I., Feio, M. J., Filipe, A. F., Fornaroli, R., Graf, W., Herder, J., van der Hoorn, B., Iwan Jones, J., Sagova-Mareckova, M., Moritz, C., Kahlert, M., (2018), The future of biotic indices in the ecogenomic era: Integrating (e)DNA metabarcoding in biological assessment of aquatic ecosystems, *Science of the Total Environment*, 637–638, 1295–1310, <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.05.002>
- Payne, R. J., (2013), Seven reasons why protists make useful bioindicators, *Acta Protozoologica* 52(3), 105-113, <https://doi.org/10.4467/16890027AP.13.0011.1108>
- Perreault, F., Oukarroum, A., Melegari, S. P., Matias, W. G., & Popovic, R., (2012), Polymer coating of copper oxide nanoparticles increases nanoparticles uptake and toxicity in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*, *Chemosphere*, 87(11), 1388–1394, <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.02.046>
- Prasad, A. S., (1995), Zinc: an overview, *Nutrition*, 11(1), 93–99
- Reid, M. A., Tibby, J., Penny, D., Gell, P., (1995), The use of diatoms to assess past and present water quality *Austral Ecology*, 20(1), 57–b64, <https://doi.org/10.1111/j.1442-9993.1995.tb00522.x>
- Quigg, A., Parsons, M., Bargu, S., Ozhan, K., Daly, K. L., Chakraborty, S., Kamalanathan, M., Erdner, D., Cosgrove, S., & Buskey, E. J., (2021), Marine phytoplankton responses to oil and dispersant exposures: Knowledge gained since the Deepwater Horizon oil spill, *Marine Pollution Bulletin*, 164, 112074 <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2021.112074>
- Rath, B. K., & Padhy, J. K., (2010), Diatoms for assessing the ecological condition of inland freshwater bodies. *Technology and Sustainable Development*, 7(4), 352–359, <https://doi.org/10.1504/WRSTSD.2010.032743>
- Resh, V. H., (2008), Which group is best? Attributes of different biological assemblages used in freshwater biomonitoring programs, *Environmental Monitoring and Assessment*, 138(1–3), 131–138, <https://doi.org/10.1007/s10661-007-9749-4>
- Riato, L., Hill, R. A., Herlihy, A. T., Peck, D. V., Kaufmann, P. R., Stoddard, J. L., & Paulsen, S. G., (2022), Genus-level, trait-based multimetric diatom indices for

assessing the ecological condition of rivers and streams across the conterminous United States, *Ecological Indicators*, 141, 109131, <https://doi.org/10.1016/J.ECOLIND.2022.109131>

- Rimet, F., Ector, L., Dohet, A., Cauchie, H., & Cauchie, H. M., (2004), Impacts of fluoranthene on diatom assemblages and frustule morphology in indoor microcosms, *Vie et Milieu*, 54(2-3), 145–156
- Saavedra, R., Muñoz, R., Taboada, M. E., Vega, M., & Bolado, S., (2018), Comparative uptake study of arsenic, boron, copper, manganese and zinc from water by different green microalgae. *Bioresource Technology*, 263, 49–57, <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.04.101>
- Savriama, Y., & Klingenberg, C. P., (2011), Beyond bilateral symmetry: geometric morphometric methods for any type of symmetry, *BMC Evolutionary Biology*, 11, 280, <https://doi.org/10.1186/1471-2148-11-280>
- Sharma, I., (2012), Arsenic induced oxidative stress in plants, *Biologia*, 67, 447–453, <https://doi.org/10.2478/s11756-012-0024-y>
- Simberloff, D., & Dayan, T., (1991), The guild concept and the structure of ecological communities, *Annual Review of Ecology and Systematics*, 22(1), 115–143, <https://doi.org/10.1146/annurev.es.22.110191.000555>
- Singh, R., Gautam, N., Mishra, A., & Gupta, R., (2011), Heavy metals and living systems: An overview, *Indian Journal of Pharmacology*, 43, 246–253, <https://doi.org/10.4103/0253-7613.81505>
- Sunda, W. G., & Huntsman, S. A., (1995), Iron uptake and growth limitation in oceanic and coastal phytoplankton, *Marine Chemistry*, 50(1-4), 189-206, [https://doi.org/10.1016/0304-4203\(95\)00035-P](https://doi.org/10.1016/0304-4203(95)00035-P)
- Takamura, N., Kasai, F., & Watanabe, M. M., (1989), Effects of Cu, Cd and Zn on photosynthesis of freshwater benthic algae, *Journal of Applied Phycology*, 1, 39–52, <https://doi.org/10.1007/BF00003534>
- Tiam, S. K., Lavoie, I., Doose, C., Hamilton, P. B., & Fortin, C., (2018a), Morphological, physiological and molecular responses of *Nitzschia palea* under cadmium stress, *Ecotoxicology*, 27(6), 675–688, <https://doi.org/10.1007/s10646-018-1945-1>
- Tomkins, J. L. and Janne S. Kotiaho, (2002), Fluctuating asymmetry, In eLS, (Ed), 363 <https://doi.org/10.1038/npg.els.0003741>
- Utayopas, P., (1996), Fluctuating asymmetry: A potential indicator for environmental monitoring in Thailand, *Science & Technology Asia*, 55-61
- Villain, J., Minguéz, L., Halm-Lemeille, M. P., Durrieu, G., & Bureau, R., (2016), Acute toxicities of pharmaceuticals toward green algae mode of action, biopharmaceutical drug disposition classification system and quantile regression models, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 124, 337–343, <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.11.009>

- Von Quillfeldt, C. H., (2004), The diatom *Fragilariopsis cylindrus* and its potential as an indicator species for cold water rather than for sea ice, *Vie et Milieu*, 54(2), 137-143
- Vrbová, K., Kulichová, J. & Tájek, P. Arnika., (2017), Nové nálezy vzácné endemické rozsivky *Pinnularia ferrophila*. *Arnika*, 2, 30-34
- Wang, Y., Seppänen-Laakso, T., Rischer, H., & Wiebe, M. G., (2018), *Euglena gracilis* growth and cell composition under different temperature, light and trophic conditions, *Plos One*, 13(4), <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0195329>
- Wood, R. J., Mitrovic, S. M., Lim, R. P., & Kefford, B. J., (2016), How benthic diatoms within natural communities respond to eight common herbicides with different modes of action, *Science of the Total Environment*, 557–558, 636–643, <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.03.142>
- Woodard, K., & Neustupa, J., (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), 42, <https://doi.org/10.3390/sym14010042>
- Xu, Y., & Morel, F. M. M., (2013), Cadmium in marine phytoplankton, *Metal Ions in Life Sciences*, 11, 509–528, https://doi.org/10.1007/978-94-007-5179-8_16
- Yuan L. L, Smucker N. J., Nietch C. T., & Pilgrim E. M., (2022), Quantifying spatial and temporal relationships between diatoms and nutrients in streams strengthens evidence of nutrient effects from monitoring data, *Freshwater Science*, 41(1), 100–112, <https://doi.org/10.1086/718631>
- Zorov, D. B., Juhaszova M., & Sollott S. J., (2014), Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) and ROS-induced ROS release, *Physiological Reviews*, 94(3), 909–50, <https://doi.org/10.1152/physrev.00026.2013>