

ZÁPADOČESKÁ UNIVERZITA V PLZNI

FAKULTA PEDAGOGICKÁ

CENTRUM BIOLOGIE, GEOVĚD A ENVIGOGIKY

VLIV ZINKU A MĚDI NA FENOTYP SLADKOVODNÍ ŘASY

DESMODESMUS ARMATUS

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Bc. Markéta Šnebergerová

Učitelství pro střední školy, obor Bi-Tv

Vedoucí práce: Mgr. Veronika Cholevová

Plzeň, 2017

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně s použitím uvedené literatury a zdrojů informací.

V Plzni, 27. června 2017

Bc. Markéta Šnebergerová

Poděkování

Na tomto místě bych chtěla poděkovat všem, kteří mi pomohli při vytváření této diplomové práce. Největší poděkování patří vedoucí mé diplomové práce Mgr. Veronice Cholevové, za odborné vedení, cenné rady, ochotu, vstřícnost a lidský přístup při tvorbě této práce. Velké poděkování patří také RNDr. Pavlu Vlachovi, Ph.D., za jeho čas, ochotu a odborné rady při zpracování statistických dat. Dále bych chtěla poděkovat mojí mamince za neustálou podporu, kterou mi při psaní této práce, ale i během celého studia věnovala.

Zadání DP

Obsah

1 Úvod	7
1.1 Cíle práce	7
2 Literární rešerše	9
2.1 Historie výzkumu fenotypové plasticity	9
2.2 Faktory vyvolávající fenotypovou plasticitu	12
2.3 Fenotypová plasticita u řas	12
2.4 Těžké kovy	15
2.4.1 Měď	17
2.4.2 Zinek	18
2.4.3 Způsoby odstranění těžkých kovů z prostředí	19
2.4.4 Vliv těžkých kovů na řasy	21
2.5 Fenotypová plasticita rodu <i>Scenedesmus</i> s. l. a její vliv na taxonomii rodu	28
2.6 <i>Desmodesmus armatus</i>	30
2.7 Hypotézy výzkumu	31
3 Metodika	32
3.1 Získání a uchování <i>Desmodesmus armatus</i>	32
3.2 Vytvoření koncentračních řad zinku a mědi a očkování řas	32
3.2.1 Zinek	33
3.2.2 Měď	33
3.2.3 Očkování <i>Desmodesmus armatus</i>	33
3.3 Uchování médií	33
3.4 Měření parametrů <i>Desmodesmus armatus</i>	34
3.5 Způsob stanovení poměru morfotypů v kultuře	35
3.6 Data sledování kultur	35
3.7 Statistické metody a vyhodnocení dat	36
4 Výsledky	37
4.1 Vliv zinečnatých iontů na počet buněk v cenobiu řasy <i>Desmodesmus armatus</i>	37
4.2 Vliv zinečnatých iontů na sledované parametry řasy <i>Desmodesmus armatus</i>	38
4.2.1 Vliv zinečnatých iontů na sledované parametry u 2-buněčných cenobií řasy <i>Desmodesmus armatus</i>	39
4.2.2 Vliv zinečnatých iontů na sledované parametry u 4-buněčných cenobií řasy <i>Desmodesmus armatus</i>	40

4.3 Vliv měďnatých iontů na počet buněk v cenobiu řasy <i>Desmodesmus armatus</i>	42
4.4 Vliv měďnatých iontů na sledované parametry řasy <i>Desmodesmus armatus</i>	43
4.4.1 Vliv měďnatých iontů na sledované parametry u 2-buněčných cenobií řasy <i>Desmodesmus armatus</i>	44
4.4.2 Vliv měďnatých iontů na sledované parametry u 4-buněčných cenobií řasy <i>Desmodesmus armatus</i>	45
5 Diskuse	47
6 Závěr	53
7 Resumé	54
8 Literatura	55
9 Seznam příloh	71

1 Úvod

V průběhu posledních desítek let byla fenotypová plasticita poměrně rozsáhle studována. Jelikož se jedná o téma mezivědní, setkáme se s ním v mnoha biologických oborech, jako jsou např. botanika, zoologie, ekologie, evoluce a v mnohých dalších oblastech biologického výzkumu. V prvotních studiích si autoři všímali především morfologických změn organismů v závislosti na prostředí. V těchto studiích byly fenotypové projevy hlavním cílem studia. Ovšem důvody sledování fenotypové plasticity se v čase měnily. Postupně se studium fenotypové plasticity převedlo spíše do ekologické roviny, a to především v souvislosti s ekologickými problémy. V současné době už není fenotypová plasticita jako taková tolik sledována jako dříve. Jde spíše o prostředek, který slouží k dalším výzkumům. Vnější morfologické změny organismů se sledují v souvislosti s možností odhadnutí, jak organismy přežívají a reagují na dané faktory např. přítomností predátora v prostředí (Lürling, 2003), teplotními výkyvy (Weaver et Ingram, 1969; Bayoh et Lindsay, 2004; Neustupa et al., 2008; Otaki et al., 2010), rozdíly v pH prostředí (Černá et Neustupa, 2010), různým stupněm vlhkosti a množstvím srážek v prostředí (Gianoli et González-Teuber, 2005; Mal et Lovett-Doust, 2005), přítomností toxických látek v prostředí (Peña-Castro et al., 2004; Monteiro et al., 2011; Chia et al., 2015) či jsou studovány v souvislosti s množstvím dostupných živin a potravy v prostředí (Ghadouani et Pinel-Alloul, 2002; Annapurna et Singh, 2003; Hastwell et Panetta, 2005; Aktan et al., 2009). Vzhledem k faktu, že se jedná o fenomén, který se dotýká většiny říší organismů, objevuje se nespočet studií z různých biologických odvětví (např. Cavicchi et al., 1985; Schlichting, 1986; Day et al., 1994; Yang et Joern, 1994; Van Buskirk, 2002; Van Kleunen et Fischer, 2005; Mondor et al., 2005; Collard et Lycett, 2008; Otaki, 2008 nebo Goldberg, 2012).

1.1 Cíle práce

Cílem této diplomové práce bylo zjistit, jaký vliv mají vybrané sloučeniny těžkých kovů na fenotypovou plasticitu kmene sladkovodní zelené řasy *Desmodesmus armatus* za definovaných podmínek laboratorní kultivace. Práce obsahuje část teoretickou, která se zabývá zpracováním zdrojů týkající se problematiky fenotypové plasticity. Praktická část se snaží potvrdit či vyvrátit předem stanovené hypotézy, které se týkají možných

fenotypových reakcí této řasy na přítomnost těžkých kovů v prostředí. Výsledky výzkumu byly porovnány s dalšími studiemi publikovanými v odborných časopisech.

2 Literární rešerše

Literární rešerše diplomové práce poskytuje přehled o historii výzkumu fenotypové plasticity se zřetelem na výzkum tohoto jevu u řas. Zároveň jsou zde nastíněny možné faktory vyvolávající fenotypovou plasticitu. Jelikož se v praktické části této práce sleduje vliv těžkých kovů na řasy, je i v teoretické části práce věnována kapitola těžkým kovům. V posledních několika letech věnují výzkumníci svoji pozornost různým způsobům odstranění těžkých kovů z prostředí. Proto je v rešerši práce začleněna kapitola zaměřená na stávající poznatky o možnostech využití fykoremediace.

2.1 Historie výzkumu fenotypové plasticity

Samotná definice fenotypové plasticity vznikla už v roce 1965 (Bradshaw, 1965). Autor definoval fenotypovou plasticitu jako genotyp, jehož výsledný projev, tedy fenotyp, může být modifikován různými změnami v životním prostředí. Ke starším definicím patří také definice Scheinera (1993). Autor popisuje fenotypovou plasticitu jako změnu fenotypu jednoho genotypu vlivem prostředí tak, když je jedinec ovlivňován vnějším prostředím. Futuyma (1998) definoval fenotypovou plasticitu jako určitou schopnost jedince měnit fenotyp, v důsledku změny životního prostředí a dále předpokládal, že změna je většinou adaptivní. V průběhu dalších let se v literatuře objevují další definice fenotypové plasticity, nicméně novější definice se od starších výše zmíněných příliš neliší a podstata zůstává stejná. Na počátku 21. století rozebírá ve své studii Agrawal (2001) fenotypovou plasticitu, jako schopnost organismu vytvořit různé fenotypy v závislosti na životním prostředí. Alpert et Simms (2002) o rok později definují fenotypovou plasticitu, jako prostředím vyvolané rozdíly v růstu nebo vývoji organismu. S dalšími podobnými definicemi fenotypové plasticity navazujícími na předešlé autory, se můžeme setkat v mnoha dalších studiích, např. Schlichting et Smith (2002) ve své studii napsali, že pojem fenotypová plasticita je kterákoliv změna vlastností organismu, vyvolaná reakcí na podnět životního prostředí. V roce 2003 West-Eberhard ve své studii popsala, že termínem fenotypová plasticita se rozumí, na podmínky citlivý rozvoj či schopnost jedince reagovat na změny vnějšího prostředí tím, že organismus změni podobu, míru pohybu nebo stupeň

aktivity (West-Eberhard, 2003). S další definicí fenotypové plasticity se setkáme ve studii vydané kolektivem autorů Price et al. (2003), ve které autoři definují fenotypovou plasticitu jako schopnost organismu měnit jeho fenotyp, v závislosti na změně životního prostředí. O rok později Dewitt et Scheiner (2004) definovali fenotypovou plasticitu jako jev, který se projevuje změnou fenotypu či produkcí různých alternativních fenotypů určitého genotypu, v závislosti na ekologických podmínkách. Ve studii „Fenotypová plasticita hmyzu“ se Ananthakrishnan et Whitman (2005), též mimo jiné zabývali definicí fenotypové plasticity. Ve své práci vysvětlují fenotypovou plasticitu jako projev mnoha fenotypů jednoho genotypu, v důsledku změny životního prostředí. Burns et Winn (2006), jež se ve své studii věnují rozdílům fenotypové plasticity mezi invazivními a neinvazivními druhy rostlin, definují tento pojem jako obměny fenotypů určitého genotypu, v závislosti na životních podmínkách. Freeman et Herron (2007) ve své studii „Evoluční analýza“ také definují fenotypovou plasticitu, jako variace fenotypu daného genotypu, v závislosti na změně prostředí. V této studii najdeme jednu z nejnovějších definic fenotypové plasticity, avšak v odborné literatuře je nejvíce používanou a citovanou definice, publikovaná italským biologem Pigliuccim (2001). Pigliucci, který je autorem i spoluautorem odborných knih a článků (např. Pigliucci, 1996; Pigliucci et Byrd, 1998) definuje termín jako vlastnost jednoho určitého genotypu, vytvářet různé fenotypy jako odpověď k měnícím se podmínkám prostředí. Obecně se tedy o fenotypové plasticitě mluví jako o reakci či odpovědi organismu na vnější prostředí (Whitman et Agrawal, 2009). Otázkou je, zda fenotypová plasticita způsobuje evoluci nebo je hlavním evolučním mechanismem (De Jong, 2005).

Jak již bylo zmíněno, fenotypová plasticita je studována v mnoha biologických odvětvích. Mnoho studií a výzkumů je zaměřeno na studium fenotypové plasticity u řas, cévnatých rostlin, bezobratlých živočichů i obratlovců. V průběhu posledních desetiletí se objevují studie, jejichž výsledky prokazují, že mnoho organismů je schopno vykazovat známky fenotypové plasticity, v důsledku měnících se podmínek prostředí (např. Nicotra et al., 1997; Mal et Lovett-Doust, 2005 nebo Cosiins, 2006). Bohatá literatura o tomto tématu ukazuje, o jak široké téma se jedná.

Práce Bradshawa (1965), Khana et Bradshawa (1976), Schlichtinga (1986), Schlichtinga et Levina (1988), Alperta et Simse (2002), Sultana (2003) či Van Kleunena et Fischera (2005) jsou zajímavými studiemi zaměřenými na fenotypovou plasticitu různých druhů cévnatých rostlin. Cavicchi et al. (1985), Shreeve (1987), Yang et Joern (1994),

Ananthakrishnan et Whitman (2005), Mondor et al. (2005), Agrawal (2007), Zhou et al. (2007) nebo Otaki (2008) publikovali studie zabývající se sledováním fenotypové variability bezobratlých živočichů. Existuje i mnoho autorů, kteří studují fenotypovou plasticitu obratlovců. Příkladem mohou být studie Day et al. (1994), de Jong et Bijma (2002), Van Buskirk (2002), Daverat et al. (2006), Collard et Lycett (2008), Hendry (2008) nebo Goldberg (2012). V algologii se setkáváme s četnými studiemi, které se zabývaly fenotypovou plasticitou řas. Za zmínku stojí především průkopnické práce autorů Trainora a Egana (např. Egan et Trainor, 1989; Trainor et Egan, 1990a, b, 1991; Egan et Trainor, 1991; Trainor, 1992), kteří přinesli četné informace o proměnlivosti morfologie zelených kokálních řas rodu *Scenedesmus* za změny chemicko-fyzikálních podmínek a to během kultivace kmenů v laboratorních podmínkách. Mezi další zajímavé práce patří např. studie autorů, Lämperta et al. (1994), Peña-Castra et al. (2004), Stewarta (2006), Aktana et al. (2009), Lürlinga (2009), Solariho et al. (2011). Studiemi této problematiky se zabývali také někteří studenti ve svých diplomových pracech (např. Bučková, 2013; Dobrá, 2013 a Nolčová, 2015). V rámci závěrečných kvalifikačních prací byly zpracovány také bakalářské práce, které zaznamenávaly problematiku těžkých kovů a jejich vliv na řasu *Desmodesmus subspicatus* (Šimíčková, 2012; Ritzová, 2014). Fenotypová plasticita je tedy i v algologii často skloňována. Jedná se o velmi široké téma, které je následně podrobněji rozebráno v dalších podkapitolách.

Mnoho vědeckých článků bylo věnováno mechanismům fenotypové plasticity, modelování vývoje a evoluce fenotypové plasticity (Stearns et Koella, 1986; Moran, 1992; Scheiner, 1993; Van Tienderen, 1997; Futuyma, 1998; Tufto, 2000; Agrawal, 2001; Debat et David, 2001; Nortman, 2003; Windig et al., 2004; Benard, 2004; Berrigan et Scheiner, 2004; Cossins et al., 2006; Czesak et al., 2006 nebo Winterhalter et Mousseau, 2007). Fenotypovou plasticitu sledoval i De Jong (2005), který ve své studii uvedl, že fenotypová plasticita je obvykle myšlenkou evoluční adaptace k variaci životního prostředí a dochází k němu v rámci životnosti jednotlivého organismu, neboť umožňuje organismům přizpůsobovat se různým prostředím. V případě, že fenotyp v daném prostředí nevyhovuje, existuje možnost jednotlivců přizpůsobovat svůj fenotyp tak, aby byl za daných podmínek výhodný.

2.2 Faktory vyvolávající fenotypovou plasticitu

K fenotypové plasticitě organismů dochází při změnách vnějších podmínek (Brönmark et Hansson, 2005). Organismy mohou být ovlivňovány mnoha faktory, jako např. teplota, pH, toxiny, salinita, přítomnost predátora, změna koncentrace dusíku, kyslíku či oxidu uhličitého, ale také kvalita či kvantita potravy (Tremblay, 2003; Brönmark et Hansson, 2005; Ananthakrishnan et Whitman, 2005; Whitman et Ananthakrishnan, 2009). Tyto faktory ovšem musí být organismem zaznamenány. Zda bude organismus reagovat na nově vznikající podněty, které z prostředí přijímá, není zcela jasné. Mnoho faktorů může vyvolat změny v organismech a narušit tak jejich homeostázu (často právě změnou pH, teploty nebo přítomností toxinů v prostředí). Tyto faktory mohou také fungovat jako určitá informace o změně v prostředí, která má nastat (Fusco et Minelli, 2010).

Obecně platí, že schopnost přizpůsobit se je důležitější pro imobilní organismy (např. pro rostliny) než pro ty mobilní (např. většina zvířat). Pohyblivé organismy také vykazují určitou míru plasticity, ovšem většinou mají možnost z prostředí emigrovat. Nepohyblivé organismy nemohou z prostředí uniknout a vzdálit se tak od nepříznivých podmínek, mají pouze tu možnost se přizpůsobit. Ve vodním prostředí jsou organismy ovlivňovány především mechanickými nebo chemickými vlivy. Organismy žijící v tomto prostředí, nemají možnost uniknout a jsou tedy nuceni přizpůsobit se nebo určitým způsobem vhodně reagovat. Pokud organismy nejsou schopny variabilně se přizpůsobit, může dojít v důsledku změn k jejich úmrtí a tudíž k extinkci daného druhu (Schlichting, 1986).

2.3 Fenotypová plasticita u řas

Řasy patří do rozsáhlé skupiny organismů, u kterých bylo dokázáno, že se vyznačují vysokou mírou flexibility a které jsou schopny vytvářet mnoho fenotypů v závislosti na vnějších podmínkách (Lürling, 2009). Studium fenotypové plasticity řas bylo v posledních 30 letech podrobena mnoha výzkumům. Velkým fenoménem bylo především v 90. letech 20. století (např. studie autorů Egana et Trainora (1991, 1992), Lämperta et al. (1994), Lavense et Sorgeloose (1996)). Mnoho taxonů z různých řasových linií bylo sledováno i po roce 2000. Zajímavé jsou např. studie autorů Peña-Castro et al.

(2004), Stewart (2006), Lürling (2009), Černá et Neustupa (2010), Solari et al.(2011), Ajayan et Selvaraju (2012), Ragazzola (2013) nebo Chia et Musa (2014). I v současné době je tomuto tématu věnováno stále hodně pozornosti, ovšem fenotypové projevy řas už nejsou jediným cílem výzkumů – jsou spíše součástí komplexnějších studií. Vědci dle změn ve fenotypu řas odhadují, jak tyto organismy fungují a dále tyto poznatky využívají např. v ekologické rovině v procesech fykoremediace (Mehta et Gaur, 2005; Ahluwalia et Goyal, 2007; Monteiro et al., 2011; Güçlü et Ertan, 2012).

Již ze studie Trainora (1992) bylo známé, že zelená řasa rodu *Scenedesmus* dokáže vytvářet mnoho morfotypů a je fenotypově velmi variabilní (pozn. v současné době rozlišované rody *Scenedesmus*, *Desmodesmus* a *Acutodesmus*, jsou ve starších studiích souhrnně označovány jako rod *Scenedesmus*, aktuálně akceptovány jsou výše zmíněné taxony na základě publikací An et al. (1999) a Tsarenko et Petlevanny (2001)). Kmeny různých druhů rodu *Scenedesmus* pak dokáží žít jako jednobuněčné či mohou tvořit vícebuněčná cenobia složená ze dvou, čtyř nebo osmi buněk (Trainor, 1992). Někdy se mohou tvořit až šestnácti buněčná cenobia (Bold et Wynne, 1985). Jedním z faktorů ovlivňujících fenotypovou plasticitu řas je predáční tlak. Např. Lämpert et al. (1994) sledovali změny ve fenotypu zelené řasy rodu *Scenedesmus* (*S. acutus*) v reakci na přítomnost korýše rodu *Daphnia* v prostředí. Tím, že se řasy naučí správně reagovat na přítomnost tohoto predátora v prostředí, zvýší svou schopnost přežít. Jedním z projevů plasticity ve fenotypu uvedeného organismu na přítomnost predátora v prostředí je schopnost zvětšit svou velikost těla tak, aby ji predátor už nemohl pozřít. *Scenedesmus acutus* byl vystaven působení kairomonů vyloučených korýši rodu *Daphnia*. Řasa na tento podnět reagovala tak, že zvětšila jak rozměry jednotlivých buněk v cenobiu, tak množila i jejich počet. Dalšími autory zabývajícími se reakcemi řas na přítomnost predátora v prostředí byli např. Hessen et Van Donk (1993) či Lürling (2003).

Dle Lavense et Sorgeloose (1996) může mít vliv na plasticitu řas různé pH prostředí. V uvedené studii se autoři domnívají, že pokud se hodnota pH vychýlí z optima, může docházet k určitým morfologickým či fyziologickým změnám nebo k vyšší mortalitě organismů. Domněnku o vlivu pH na fenotyp potvrdila také studie Černé et Neustupy (2010). V této studii autoři sledovali vliv pH na fenotypovou plasticitu zástupců Desmidiales, konkrétně na druhy *Staurastrum hirsutum* a *Euastrum binale* var. *gutwinskii*. Řasy byly vystaveny změnám pH prostředí v rozmezí od 3,5 do 6,5, přičemž bylo zjištěno, že se vzrůstající hodnotou pH docházelo u druhu *Staurastrum hirsutum* ke zmenšení

velikosti buněk a se snižující se hodnotou pH se naopak velikost buněk zvětšovala. Pro *Euastrum binale* var. *gutwinskii* platilo, že se při zvyšujícím se pH velikost buněk nezměnila, avšak změnil se tvar jejich buněk a zároveň docházelo k prohlubování zářezů mezi jednotlivými buňkami. Na tento fakt navázala Bučková (2013) ve své diplomové práci hypotézou, že s rostoucím pH dochází ke zmenšování velikosti buněk a při nižších hodnotách pH velikost buněk roste. Zároveň sledovala, zda při změně pH může dojít i ke změně tvaru buňky. Autorka tak prokázala, že i řasa *Desmodesmus communis* reaguje na změně hodnoty pH změnou fenotypu.

Dle Solomona et al. (2007) má vzestup antropogenních emisí CO₂, vliv na chemické složení oceánů (především na jejich okyselování). V průběhu minulého století se pH mořské vody průměrně snížilo o 0,1. Vědci dále předpokládají, že do roku 2100 se pH sníží o další 0,3 – 0,4 jednotky. Tento trend má vliv na většinu organismů žijících v tomto prostředí, tedy i na řasy. Vědci to vysvětlují tak, že se snižující se hodnotou pH dochází ke snížení obsahu uhličitanu vápenatého v mořích, což ohrožuje schopnost mnoha kalcifikujících organismů tvořit jejich schránky či skelety a může mít tak vliv na jejich růst a tudíž i na jejich fenotyp (Orr et al., 2005; Doney et al., 2009; Büdenbender et al., 2011). Druhy osidlující různé geografické oblasti, zejména korálové řasy, jsou obecně velmi fenotypově variabilní. Tyto řasy se dokáží přizpůsobit změně prostředí tím, že pozmění svou morfologii či fyziologii (Brody, 2004). Fenotypovou plasticitou korálových řas, se zabýval tým vědců z Německa. Ragazzola et al. (2013) ve své studii sledovali, jak se mohou mořské kalcifikující řasy přizpůsobovat současnému trendu okyselování oceánů. Cílem autorů bylo také posoudit míru jejich přežití v nadcházejícím století. V rámci studie kultivovali řasu studených korálových vod, a to druh *Lithothamnion glaciale*. Tento druh řasy vystavili zvýšenému parciálnímu tlaku oxidu uhličitého, a to hodnotám 408, 566, 770 a 1024 μatm po dobu 10 měsíců. Výsledky ukázaly, že docházelo k rapidnímu snížení rychlosti růstu (lineární růst) ve všech hodnotách parciálního tlaku CO₂ při zachování tloušťky stěny buněk. Po dalších 3 měsících se ukázalo, že se míra přizpůsobivosti liší v průběhu času. Po uplynutí doby sledování autoři zaznamenali změny v tloušťce buněčné stěny. U zmíněného kmene řasy docházelo k zúžení stěny buňky, ale tempo růstu přitom zůstalo zachováno. Tento jev naznačuje přerozdělení energie mezi 3 a 10 měsíci a ukazuje na vysoký stupeň plasticity. Vědci se domnívají, že pokud tento jev funguje i v přírodních podmínkách, mohl by řasám v budoucnu poskytnout selektivní výhodu ve vysoce CO₂ nasyceném světě.

Dle Trainora (1992) řasy reagují změnou fenotypu na změnu teploty v prostředí. Pro svůj výzkum použil Trainor druh *Scenedesmus armatus* (pozn. aktuálně taxonomicky akceptovaný jako *Desmodesmus armatus*, Hegewald (2000)). Trainor pozoroval změny v počtu buněk jednotlivých cenobií. Při poklesu teploty na přibližně 10°C začala převládat vícebuněčná cenobia a zároveň se zvětšoval počet ostnů na buňce. Docházelo tedy dle jeho úsudku k tvorbě atypických cenobií. V práci Bučkové (2013) se objevila hypotéza, že s rostoucí teplotou bude docházet ke zmenšování velikosti buněk a zároveň se bude zmenšovat velikost cenobií nebo bude docházet k rozpadu cenobií a při nízké teplotě se bude zvětšovat velikost buněk a budou převládat cenobia nad solitérními buňkami. Autorka trend zvětšování buněk se snižující se teplotou ve své studii potvrdila, avšak první část hypotézy nepotvrdila – se vzrůstající teplotou, se buňky nezmenšovaly. Mezi další autory, zabývající se změnou ve fenotypu řas v důsledku změny teploty patří např. kolektiv autorů Neustupa et al. (2008), kteří sledovali řasu *Micrasterias rotata* (Desmidiiales). Tito autoři ovšem oproti Bučkové (2013) ve své studii pozorovali, že při zvyšující se teplotě dochází ke zmenšování velikosti buněk. Fenotypové projevy řasy rodu *Draparnaldia* v důsledku změn teploty, intenzity světla a dle toho, jak se mění délka světlé části dne, studoval Jojstone (1978). Existují i studie, které dokazují, že i salinita prostředí může provokovat změny ve fenotypu řas (Russell et Veltkamp, 1996).

Aktan et al. (2009) ve své studii uvádějí, že fenotypová plasticita řas je podnícena i množstvím živin v prostředí. Z této práce je patrné, že živiny jsou důležité nejen pro růst řas, ale ovlivňují i výslednou stavbu těla a jejich nedostatek či nadbytek může ovlivňovat morfologické projevy fenotypu.

2.4 Těžké kovy

Těžký kov je termínem, který není v odborné literatuře jednoznačně definován. Obecně se těžké kovy definují jako kovy či polokovy, které přesahují svou hustotou nad 5 gcm⁻³ (Víden, 2005). Do těžkých kovů řadíme rtuť, kadmium, olovo, chrom, měď, zinek, mangan, nikl, aj. Pod označení těžké kovy spadají i prvky jako je např. arsen, selen a hliník, bez ohledu na jejich hustotu. Lepším názvem by pro tuto skupinu dle Vídna (2005) byly kovy toxické, jelikož se jedná o skupinu prvků neodbouratelných a persistentních s vysokým bioakumulačním účinkem. Jako toxické je známe především v kontextu

s životním prostředím, jelikož ve vyšších koncentracích jsou pro živé organismy velice nebezpečné, dokonce až letální (Duffus, 2002; Sengupta, 2002; Sa'idi, 2010).

Těžké kovy se mohou v prostředí vyskytovat přirozeně např. vulkanickou činností. V této formě výskytu těžké kovy životní prostředí a organismy v něm většinou neohrožují, jelikož jsou uvolňovány pouze ve velmi nízkých koncentracích. Některé tyto kovy mohou být pro fungování organismů dokonce prospěšné a zcela nezbytné, jedná se o mikroelementy tzv. stopové prvky jako např. měď, zinek, mangan, železo, aj. (Duffus, 2002; Viden, 2005; Sa'idi, 2010). V důsledku antropogenní činnosti, se do prostředí dostávají těžké kovy v takových koncentracích, ve kterých by se v přírodě bez lidského faktoru pravděpodobně nevyskytly. Toxické kovy jsou nebezpečné z toho hlediska, že zůstávají v přírodě dlouhou dobu a nelze je odbourat přirozenou cestou (Kaplan, 2013). Stávají se tak součástí potravní pyramidy. Pokud se toxické kovy dostanou do organismu, který je na počátku potravního řetězce, začnou se postupně hromadit v tělech organismů na vyšších stupních potravní pyramidy. To může být pak příčinou hynutí konzumentů vyšších řádů, tedy i člověka (Kvasničková, 2004; Sa'idi, 2010; Pandey et Madhuri, 2014).

Toxické kovy mohou v organismech vyvolávat karcinogenní bujení, poškozovat nervovou a oběhovou soustavu. Váží se na bílkoviny, mění jejich strukturu, funkci a působí jako enzymatické jedy. Existují studie, které prokazují, že dlouhodobé vystavení těžkým kovům může způsobit řadu metabolických poruch, vyvolávat mutace v organismu a v neposlední řadě i smrt (Raikwar et al., 2008; Sa'idi, 2010; Kaplan, 2013).

Největší koncentrace těžkých kovů se do prostředí dostává z těžby a průmyslu. Velkou roli v uvolňování toxických kovů do prostředí hrají také emise vozidel, pohonné hmoty, olověné akumulátory, dále potom různá elektronika, ale také podpůrné či ochranné prostředky, používající se v zemědělství jako např. hnojiva, postřiky a pesticidy. Tím ale výčet faktorů, ovlivňujících zvyšující se koncentraci těžkých kovů v prostředí zdaleka nekončí, těžké kovy se do prostředí uvolňují např. z různých nátěrových hmot (jako barvy, laky, aj.), ze stárnoucí infrastruktury vodovodního potrubí (Harvey et al., 2015), ale také různými plasty a odpadky plovoucích ve světových oceánech (Azzarello et Van Vleet, 1987; Howell et al., 2012).

Těžké kovy mohou být přítomny i ve spotřebitelských, běžně užívaných věcech jako např. ve špercích či dětských hračkách, konkrétně arsen, kadmium a olovo zde bylo zjištěno v takových koncentracích, které přesahují regulační normy. Olovo se může v hračkách vyskytovat jako stabilizátor, barevný enhancer nebo jako antikoroziční činidlo.

Tento prvek je jeden z nejčastěji vyskytujících se těžkých kovů v přírodě, a to díky čtyřem stabilním izotopům, které jsou konečnými produkty rozpadových řad. Všechny sloučeniny olova se také používaly jako protivýbušná přísada do benzínu v letech 1930 – 1970. Proto se často vyskytovalo v rozborech ovoce, které pocházely z blízkosti silnic (Lovei, 1998; Duffus, 2002). Kadmium je také někdy používáno jako stabilizátor či jako prostředek, který zvyšuje lesk hraček a šperků. Arsen též může být přítomen v různých barevných hračkách, protože může být součástí různých barev (Finch et al., 2015). Lidé, kteří pravidelně konzumovali nelegálně destilovaný alkohol, mohli být vystaveni otravě olovem nebo arsenem, skrz arsenem kontaminované olovo sloužící k zapojení do destilačního aparátu. Také v jidech na krysy a drobné hlodavce, může být přítomný arsen. Obzvlášť jsou-li tyto jedy používané v blízkosti potravin, jako např. ve skladu obilí apod., může dojít k jejich kontaminaci (Aggarwal, 2014).

2.4.1 Měď

Měď se v přírodě samostatně zpravidla nevyskytuje, je vázána na různé rudy a minerály. Nachází se ve 2 izotopech. V přírodě ji lze nalézt v minerálech jako například v kovelinu CuS , chalkosinu Cu_2S , chalkopyritu CuFeS_2 , ale také v zásaditých uhličitanech jako je malachit $\text{CuCO}_3 \cdot \text{Cu(OH)}_2$ a azurit $2 \text{CuCO}_3 \cdot \text{Cu(OH)}_2$. Najdeme ji také v modré skalici $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (Víden, 2005).

Rozpouštění mědi je podporováno zvýšeným množstvím dusičnanů ve vodě. Bez přítomnosti kyslíku v prostředí k rozpouštění mědi nedochází. Snížení hodnoty pH pod hodnotu 7 působí prudký nárůst rozpustnosti sloučenin s obsahem mědi ve vodním prostředí. Obecně lze tedy říci, že čím je hodnota pH nižší, tím více se v prostředí rozpouštějí sloučeniny mědi i sloučeniny dalších těžkých kovů, což má za následek zvyšující se koncentraci nebezpečných forem těžkých kovů v organismech (Lavens et Sorgeloos, 1996; Sheline et Choi, 2004; Solomon et al., 2007; Černá et Neustupa, 2010; Ragazzola et al., 2013).

Poměrně přísné limity pro koncentraci mědi v povrchových vodách jsou dány její značnou toxicitou pro vodní organismy včetně ryb (Chapman, 1978; Bencko et al, 1995). Měďnaté kationty jsou pak toxické ke všem vodním organismům, např. toxický účinek na ryby se projevuje již při koncentraci kolem $0,5 \text{ mg l}^{-1}$ mědi, lososovité ryby a juvenilní stádia všech druhů ryb, jsou pak vůči mědi ještě výrazně citlivější (Chapman, 1978; Price,

2013). Hodnota LC_{50} (hranice, která vyvolá úhyn 50% testovaných organismů) $CuSO_4 \cdot 5 H_2O$ je např. pro kapra (*Cyprinus carpio*) $1,5 \text{ mg l}^{-1}$ (Hecht et al., 2007).

Tento těžký kov má vliv i na bezobratlé živočichy žijící ve vodním prostředí, jak dokazuje čínská studie autorů Li et al. (2015). Autoři se zabývali fyziologickou odezvou svalové tkáně korýše rodu *Neocaridina denticulata* (Crustacea), na přítomnost Cu^{2+} v prostředí. Vědci zjistili, že přítomností různých koncentrací Cu^{2+} ve vzorku, se snižuje koncentrace bílkovin ve svalové tkáni tohoto živočicha. Na základě výsledků analýzy autoři potvrdili, že čím vyšší byla koncentrace dvoumocné mědi, tím větší byl účinek na celkové poškození svalové tkáně. Celková koncentrace Cu^{2+} hraje významnou roli jako fyziologický ukazatel při vyhodnocování toxických účinků těžkých kovů na *N. denticulata*.

2.4.2 Zinek

Zinek se (podobně jako měď) vyskytuje v nízkých koncentracích v organismech přirozeně. Je to stopový prvek důležitý pro růst a diferenciaci živých organismů (je např. součástí enzymů, hraje roli v mitotickém buněčném dělení a diferenciaci a je obsažen v DNA vazebných proteinech). Nicméně vysoké koncentrace zinku obecně organismu škodí, např. inhibují transport elektronů v dýchacím řetězci (Greenwood et Earnshaw, 1984; Franklin et Costello, 2009).

V přírodě se zinek nachází v minerálech, jako jsou např. sfalerit ZnS , zinkit ZnO , hemimorfit $Zn_2SiO_4 \cdot H_2O$, zinkochromit $ZnCr_2O_4$, aj. (Víden, 2005).

V dnešní době je už známo, že zinek je velmi toxickou látkou pro aquatické organismy. Již při velmi nízkých koncentracích (řádově v desetinách až setinách mg l^{-1}) může docházet ke změnám v organismu a v mnoha případech může dojít až k úhynu jedince (Pitter, 1999; Strnadová et Matějková 2006).

Velkým množstvím sulfidických rud a jejich následnou oxidací se do podzemních i povrchových vod uvolňuje určité množství zinku. Nicméně nebezpečí pro vodní organismy představuje průmysl. Právě z průmyslových odpadních vod obsahujících zinečnaté sloučeniny (např. vody ze zpracování zinkových rud) se do prostředí uvolňuje velké množství zinečnatých kationtů. Dvoumocný zinek se také dostává do vod z odpadů ze závodů na zpracování tuků a z mořiren mosazí. Významné množství zinku se do prostředí dostává i spalováním fosilních paliv (Strnadová et Matějková, 2006).

Zinek je dle Chapmana (1978) pro ryby značně toxický. Jeho studie sledovala vliv tří těžkých kovů (Cu, Cd a Zn) na ryby *Oncorhynchus tshawytscha* a *Salmo gairdneri*. Cílem této studie bylo stanovit koncentraci LC₅₀ ve všech čtyřech fázích života těchto druhů. Autor zjistil, že LC₅₀ pro Zn se pohybovala u obou rodů v rozmezí 93 až 815 µg/l. Jiná studie, zabývající se studiem vlivu zinku na lososovité ryby potvrdila, že se letální koncentrace zinku pohybují kolem 100 µg/l. Autor také doporučil nepoužívat pozinkované nářadí při chovu lososovitých ryb a pro vedení přírodní vody doporučil nevyužívat pozinkované vodovodní potrubí, jelikož se může do vody uvolňovat toxický ZnCl₂ (Price, 2013).

2.4.3 Způsoby odstranění těžkých kovů z prostředí

Při odstraňování těžkých kovů z vodního prostředí se využívá několik postupů. Možnými postupy pro odebrání toxických látek z vod může být např. iontová výměna, membránové procesy anebo odstranění sloučenin těžkých kovů z prostředí pomocí adsorpce. Právě adsorpce je jedním z neúčinnějších řešení k odstraňování těžkých kovů z vodního prostředí. K adsorpci se v průběhu let vyvíjela řada inovativních látek a materiálů (např. karbonové tkaniny, aktivní uhlí, aktivní koks, hydroxid hořečnatý, aj). Tyto látky mají celkem vysokou účinnost, ovšem nevýhoda tkví v poměrně velké finanční náročnosti. Další alternativní možností k odstranění polutantů z prostředí je využití přírodních sorbentů, jako je např. rašelina, hnědé i černé uhlí, kůra a v neposlední řadě řasy. Sorpční kapacita je zřejmě lehce omezená, ale velkou výhodou jsou nízké finanční náklady a minimální zátěž pro životní prostředí (Monser et Adhoum, 2002; Kaplan, 2013).

Studie Ahluwaly et Goyala (2007) se zabývala možnými alternativními cestami odstranění těžkých kovů z prostředí. Účelem této studie bylo blíže prostudovat procesy odstranění těchto nebezpečných látek pomocí mikroorganismů. Dle studie má vypouštění odpadních vod obsahujících těžké kovy z kovožpracujícího průmyslu, negativní účinky na životní prostředí. Běžné technologie zabývající se odstraňováním těžkých kovů nejsou ekonomické a mohou vytvářet další chemickou zátěž pro životní prostředí. Biosorpce těžkých kovů metabolicky neaktivní neživou biomasou řasového či houbového původu je dle autorů velmi inovativní a alternativní technologií pro odstranění těžkých kovů z vodního prostředí. Unikátní chemické složení biomasy dokáže sorbovat kovové ionty

ovšem za předpokladu, že jsou dodrženy určité podmínky. Ve studii bylo zkoumáno mnoho mikroorganismů. Výsledky práce ukazují, že fermentací upravená biomasa organismů *Aspergillus niger*, *Penicillium chrysogenum*, *Rhizopus nigricans*, *Ascophyllum nodosum*, *Sargassum natans*, *Chlorella fusca*, *Oscillatoria anguistissima*, *Bacillus firmus* a *Streptomyces* sp. má nejvyšší schopnost adsorbovat těžké kovy z prostředí a to v rozmezí od 5 do 641 mg l⁻¹ především pro Pb, Zn, Cd, Cr, Cu a Ni. Dle autorů má tato metoda velký potenciál v odebrání kovů z životního prostředí (Ahluwalia et Goyal, 2007). Mnoho řas má tedy velkou schopnost pohlcovat kovy, a proto je zde značný potenciál pro jejich využití k čištění kontaminovaných vod. Mehta et Gaur (2005) se vedle možnosti využití řas k čištění vod zabývali i tím, jaké faktory ovlivňují sorpci kovu. Ve své studii popisují, že tuto schopnost řas ovlivňuje zejména koncentrace kovu a biomasy v roztoku, pH, teplota a další faktory. Dále také uvádějí, že odumřelé buňky řas jsou schopny adsorbovat více kovu, než buňky živé. V uvedené studii se také snažili najít způsob, jak zvýšit sorpční schopnost řas. Zjistili, že CaCl₂ je nejvhodnější a nejekonomičtější způsob pro aktivaci řas. Mehta et Gaur (2005) apelují na to, aby pro využití řas jako metody k odstraňování kovů ze znečištěných vod byl kladen důraz na: výběr kmenů řas s vysokou sorpční kapacitou, nezbytnou znalost sorpčních mechanismů, genetickou manipulaci řasy pro větší počet povrchových vazebných skupin, na rozvoj nízkonákladových metod pro buněčné mobilizace a na ekonomickou proveditelnost.

Autoři Chong et al. (2000) prováděli řadu experimentů s různými koncentracemi zinku a niklu v porovnání se schopnostmi 11ti mikroalgálních druhů odstraňovat nikl a zinek ze syntetických odpadních vod. Mezi sledovanými druhy byla *Chlorella vulgaris*, *Chlorella sorokiniana* a *Scenedesmus quadricauda* (izoláty pocházely ze znečištěné vody z oblasti Wuhan, z Číny) a dalších osmi izolovaných kmenů z oblasti Hongkongu. Izolát „Wuhan“ *Scenedesmus* odstranil většinu niklu, pravděpodobně díky velké biomase. Koncentrace niklu byla snížena z počátečních 30 až na 0,9 mg l⁻¹. Druhým nejúčinnějším druhem pro odstranění niklu byl izolát, předběžně identifikovaný jako *Chlorella miniata*, koncentrace niklu byla snížena na 10 mg l⁻¹. Výkonnost ostatních izolátů byla srovnatelná s *Ch. vulgaris*. Bylo zjištěno, že všechny testované řasy jsou životaschopné, což ukazuje, že těchto 11 druhů by mohlo tolerovat směs 30 mg l⁻¹ niklu a 30 mg l⁻¹ zinku v odpadní vodě.

Ve studii kolektivu autorů Monteiro et al. (2011) byla sledována kapacita biosorpce dvoumocného zinku (Zn²⁺) a dvoumocného kadmia (Cd²⁺) dvěma zelenými řasami

(Chlorophyceae), konkrétně druhy *Scenedesmus obliquus* a *Desmodesmus pleiomorphus*. Kmeny těchto řas byly izolovány ze znečištěného vodního kanálu Esteiro de Estarreja v severním Portugalsku. Výsledky studie ukázaly, že pro každý kov nezávisle řasa *D. pleiomorphus* vykazovala vyšší sorpční kapacitu kovu, než řasa *S. obliquus*, a to v koncentracích v rozmezí od 60 do 300 mg l⁻¹ (s výjimkou 150 mg l⁻¹ Cd²⁺). V roztocích byla řasa *S. obliquus* obecně schopna odstranit ve vyšší míře kadmium než zinek, zatímco naopak tomu bylo pozorováno u řasy *D. pleiomorphus*. Tato studie naznačuje možnou cestu bioremediace pro znečištěné vody těžkými kovy, podobně jako studie autorů Güçlü et Ertan (2012). V této studii byla zjišťována schopnost odstranění zinku (Zn²⁺) z roztoku třemi druhy řas: *Acutodesmus obliquus*, *Desmodesmus armatus* a *Desmodesmus subspicatus*. V průběhu analýz byl sledován mj. růst řasy, který se snižoval s rostoucí koncentrací zinku. Hodnoty EC₅₀ (účinná koncentrace, při které dojde ke změnám u 50% zkoumaných organismů) pro Zn²⁺ byly stanoveny na 2257,824 µg l⁻¹ pro *D. subspicatus*, 1922,049 µg l⁻¹ pro *A. obliquus* a 1634,275 µg l⁻¹ pro *D. armatus*. Procentuálně nejvyšší schopnost odstranění zinku z roztoku vykazoval *D. subspicatus* (40%), následně *A. obliquus* (30%) a *D. armatus* (18%). Odstranění zinku i jiných těžkých kovů spočívá na navázání na buněčný povrch. Autoři prokázali, že mrtvá biomasa adsorbuje více těžkého kovu než živá.

Řasy mají tedy přirozenou schopnost vázat kovy a jsou velkou nadějí v alternativním odstraňování těžkých kovů z prostředí (Omar, 2002; Afkar et al., 2010; Monteiro et al., 2011; Güçlü et Ertan, 2012).

2.4.4 Vliv těžkých kovů na řasy

Fenotyp organismů může být ovlivňován mnoha faktory. Variabilitu fenotypu vyvolávají tedy i různé toxické látky v prostředí, jakými mohou být např. těžké kovy. V uplynulých 20 letech se působením těžkých kovů na fenotypovou plasticitu, zabývala řada autorů (např. Corradi et al., 1995; Pawlik-Skowrońska, 2003; Peña-Castro et al., 2004; Příbyl et Cepák, 2005; Gorbi et al., 2006; Umysová et al., 2009; Afkar et al., 2010; Jasso-Chávez et al., 2010; Anantharaj et al., 2011; Giloni-Lima et al., 2012; Carfagna et al., 2013; Mosleh et Mofeed, 2014; Chia et Musa, 2014; Chia et al., 2015).

Většina řas je citlivá na přítomnost těžkých kovů v prostředí. Měď a zinek (těžké kovy, jejichž vliv na řasu *D. armatus* je sledován v této práci) jsou strukturální a katalytické komponenty proteinů a enzymů, ale když jsou v přebytku, jsou pro řasy extrémně toxické (Steffens, 1990). Reakce řas na toxické kovy se můžou projevit změnami v morfologii, fyziologii a ve vyšších koncentracích jsou letální (např. Peña-Castro et al., 2004; Güçlü et Ertan, 2012).

Dle Trainora (1991) jsou sladkovodní řasy z čeledi Scenedesmaceae (schopné vytvářet mnoho různých fenotypů, v závislosti na prostředí. Abd-El-Monem et al. (1998) provedli studii na zelené řase *Scenedesmus acutus* (dnes známý jako *Acutodesmus obliquus*, revize taxonu Hegewald et Hanagata, 2000). Kmen *S. acutus* tolerantní k chromu (dále uváděn jako chrom-tolerantní kmen) byl vystaven různým koncentracím Cu^{2+} nebo Zn^{2+} s cílem zhodnotit, zda bude takový kmen také tolerantní vůči těmto těžkým kovům a jestli bude řasa schopná si udržet beze změny svoje nutriční hodnoty. Jako indikátor nutriční hodnoty řas byla použita suchá hmotnost sacharidů a bílkovin. Vyhodnocení tolerance kovu bylo založeno na tempu růstu a obnově kultury v porovnání s kmenem této řasy přírodního původu. V uvedené studii byl sledován axenický přírodní izolát (značený S2-N) a chrom-tolerantní kmen (značený S2-T) *Scenedesmus acutus*. Ke kultivačním médiím, ve kterých byla řasa pěstovaná, byl přidáván pentahydrát síranu měďnatého ($\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$) pro vytvoření prostředí s obsahem dvoumocné mědi. Sledovány byly tři různé koncentrace, a to 1; 1,5 a 2 $\text{mg l}^{-1} \text{Cu}^{2+}$. Dvoumocný zinek byl ke kultuře dodáván ve sloučenině chloridu zinečnatého (ZnCl_2) ve čtyřech různých koncentracích, a to 1; 2,5; 5 a 10 $\text{mg l}^{-1} \text{Zn}^{2+}$. Všechny experimenty byly opakovány pětkrát. Kultury byly ponechány vývoji po dobu sedmi dnů. Po dobu této kultivace byly sledovány změny v růstu, morfologii a ve fluorescenci zapříčiněné ztrátou chlorofylu buňkami.

Výsledky výzkumu naznačily, že obsah Cu^{2+} v roztoku vede k poklesu rychlosti růstu u obou kmenů *S. acutus*. Rychlost růstu však byla u senzitivního kmene S2-N výrazně nižší. V koncentraci 1 $\text{mg l}^{-1} \text{Cu}^{2+}$ byl rozdíl v růstu obou kmenů, který byl patrný pouze v časovém intervalu 0 – 2 dnů. V koncentraci 1,5 $\text{mg l}^{-1} \text{Cu}^{2+}$ byl růst S2-N vždy nižší než S2-T, v koncentraci 2 $\text{mg l}^{-1} \text{Cu}^{2+}$ přestala řasa růst v případě obou kmenů. Po 7 dnech sledování se v první koncentraci téměř všechny buňky kmene S2-N staly fluorescenční mikroskopií nedetekovatelné. To naznačuje, že buňky ztratili svou schopnost být fotosynteticky aktivní. Naopak většina S2-T buněk byla stále velmi silně fluorescenčně aktivní. Autoři po sedmi dnech sledování přeočkovali kulturu do standartního kultivačního

roztoku, kde sledovali obnovení rychlosti růstu po dalších sedm dní. Oba kmeny z koncentrace $1 \text{ mg l}^{-1} \text{ Cu}^{2+}$ rychle obnovily tempo růstu bez fáze stagnace. Kmeny z koncentrace $1,5 \text{ mg l}^{-1} \text{ Cu}^{2+}$ stagnovaly dva dny a poté rostl S2-T rychleji, než S2-N. Kmeny z koncentrace $2 \text{ mg l}^{-1} \text{ Cu}^{2+}$ měly delší stagnující fázi a rostly velmi pomalu, stále však platilo, že S2-T rostl stále rychleji, než S2-N (Abd-El-Monem et al., 1998).

Účinek zinku na množení buněk, byl podobný u obou kmenů ve všech koncentracích. Růst byl potlačen zejména v koncentracích $2,5$ a $5 \text{ mg l}^{-1} \text{ Zn}^{2+}$. Po přeočkování kultur do kultivačního roztoku bez obsahu kovů měly kmeny z koncentrace $1 \text{ mg l}^{-1} \text{ Zn}^{2+}$ fázi stagnace po dobu dvou dnů, poté pokračoval růst podobným tempem. Kmeny, které rostly v koncentracích 5 a $10 \text{ mg l}^{-1} \text{ Zn}^{2+}$ stagnovaly po dobu čtyř dnů, poté oba kmeny obnovily tempo růstu (Abd-El-Monem et al., 1998).

Působením dvoumocné mědi (Cu^{2+}) nebo dvoumocného zinku (Zn^{2+}) na *S. acutus* se suchá hmotnost sacharidů pro oba kmeny významně snížila. Stejný trend byl pro oba kmeny stanoven i pro obsah bílkovin. Ten se snížil v případě dvoumocné mědi od koncentrace $1,5 \text{ mg l}^{-1} \text{ Cu}^{2+}$, zatímco v případě dvoumocného zinku se obsah bílkovin snižoval již od koncentrace $1 \text{ mg l}^{-1} \text{ Zn}^{2+}$. U kmenů řasy *S. acutus* zároveň došlo k potlačení růstu kultury, a tím se snížila její suchá hmotnost, a tedy i syntéza sacharidů v důsledku ztráty chlorofylu. Nižší hodnoty obsahu proteinů v kulturách s koncentrací Cu^{2+} nebo Zn^{2+} byly pravděpodobně způsobeny v důsledku poruchy jejich syntézy. Autoři tak potvrdili, že chrom-tolerantní kmen řasy *S. acutus* může být také tolerantní k dalším těžkým kovům. Chrom-tolerantní kmen byl tedy méně senzitivní k mědi, nicméně nebyl žádný důkaz o nižší citlivosti na zinek (Abd-El-Monem et al., 1998).

Další studii, zabývající se působením těžkých kovů na řasu rodu *Scenedesmus*, provedli Peña-Castro et al. (2004). V rámci studie byl studován vliv tří těžkých kovů (mědi, chromu a kadmia) na kmen druhu *Scenedesmus incrassatulus*. Jako zdroj dvoumocné mědi byl použit heptahydrát síranu měďnatého ($\text{CuSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$), zdrojem dvoumocného kadmia byl chlorid kademnatý (CdCl_2) a pro studium vlivu šestimocného chromu na řasu *S. incrassatulus* autoři použili dichroman draselný ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$). Řasy byly pěstovány ve standartním BBM kultivačním médiu (Bold's basal medium) a následně uchovány v klimaboxu. Pro vytvoření prostředí s různou koncentrací těžkých kovů, byly vytvořeny čtyři koncentrace od každého kovu, a to koncentrace: $3,15$; 5 ; $6,4$ a 9 mg l^{-1} dvoumocné mědi, 5 ; 7 ; 10 a 13 mg l^{-1} dvoumocného kadmia a 1 ; $1,3$; 2 a $2,8 \text{ mg l}^{-1}$ šestimocného chromu. Dále vytvořili kontrolní kulturu, která neobsahovala žádné těžké

kovy. Kultury byly následovně sledovány po dobu dvou týdnů. Monitorovány byly výkyvy růstu, změny počtu buněk v cenobiu a jejich rozměry, dále pak fotosyntetická aktivita řasy. V přítomnosti EC_{50} mědi, začala řasa v průběhu prvního až čtvrtého dne nahrazovat původně čtyřbuněčná cenobia dvoubuněčnými, a to až z 65%. Pátý den se v kultuře začaly vyskytovat jednobuněčné morfotypy. Sedmý den pak byly jednobuněčné morfotypy v kultuře dominantní a to v 70%. I v této studii se ukázalo, že měď má velký vliv na fotosyntetický aparát řasy. Podobně jako ve studii kolektivu autorů Abd-El-Monem et al. (1998) se buňky staly fluorescenční mikroskopií nedetekovatelné, a to naznačuje, že ztratili svou schopnost být fotosynteticky aktivní. Rozměry buněk pak zůstaly shodné s kontrolním vzorkem. Kultura v přítomnosti EC_{50} kadmia, začala od čtvrtého dne vytvářet dvoubuněčná cenobia. Na konci pokusu pak dvoubuněčná cenobia tvořila skoro 79% biomasy. Koncentrace kadmia vyšší než EC_{50} způsobila dominanci jednobuněčných morfotypů a to skoro ze 70ti%. Na rozdíl od mědi pak tento kov neměl vliv na fotosyntetický aparát. Rozměry buněk se také od kontrolní kultury nelišily. V případě kultury vystavené EC_{50} chromu se dvoubuněčná cenobia stala dominujícími a to už po druhém dnu pozorování. Zhruba v polovině experimentu začaly převládat jednobuněčné morfotypy a to téměř s 60% převahou. Na konci pokusu se pak začaly vytvářet shluky buněk, které byly autory označeny jako autospóry. Ani tento kov však neměl vliv na fotosyntetický aparát řasy, ovšem jako u jediného z testovaných kovů, byla pozorována změna ve velikosti buněk, oproti kontrolní kultuře. Autoři tak potvrdili, že těžké kovy jako kadmium, měď a chrom mají vliv na fenotyp řasy *S. incrassatulus*.

Ve studii Güçlü et Ertana (2012) byla sledována schopnost řas z čeledi Scenedesmaceae (*Acutodesmus obliquus*, *Desmodesmus subspicatus* a *Desmodesmus armatus*) odebírat zinek z prostředí. Mimo to autoři také sledovali vliv tohoto těžkého kovu na fenotypovou plasticitu těchto řas. Zinečnaté kationty byly do kultivačních médií dodávány v podobě dihydrátu chloridu zinečnatého ($ZnCl_2 \cdot 2 H_2O$). Autoři dále vytvořili pět různých koncentrací těžkého kovu v médiu a to 0,25; 0,5; 1; 2 a 4 $mg\ l^{-1} Zn^{2+}$ a kontrolní kulturu bez obsahu kovu. Každý roztok s uvedenou koncentrací zinku i kontrolní kultura měly tři opakování. Kultury byly uchovávány za stálých podmínek. Změny na těchto řasách byly sledovány a zaznamenávány po každých 24, 48, 72 a 96 hodinách od zahájení pokusu. Cenobia byla rozdělena do čtyř kategorií: osmibuněčná cenobia, čtyřbuněčná cenobia, dvoubuněčná cenobia a soliterní buňky (absence cenobií). Toxicita zinku byla vyjádřena EC_{50} v počtu buněk v průběhu 96 hodin ve srovnání

s kontrolami. Fenotypová plasticita byla pozorována u řas *A. obliquus* a *D. armatus*, ale nebyla pozorována u řasy *D. subspicatus*. V případě řasy *D. subspicatus* nedošlo ke snížení počtu buněk v cenobiu. V případě *A. obliquus* a *D. armatus* se počet buněk v coenobiu snižoval s rostoucí koncentrací zinku v médiu. V případě *A. obliquus* byly ve všech koncentracích zinku pozorovány jednobuněčné morfotypy, cenobia zcela chyběla. V kultuře *D. armatus* se v koncentraci $0,25 \text{ mg l}^{-1} \text{ Zn}^{2+}$ tvořila pouze cenobia se čtyřmi buňkami (100% biomasy). V koncentraci $0,5 \text{ mg l}^{-1} \text{ Zn}^{2+}$, byl poměr čtyřbuněčných cenobií nižší (70%) a množství dvoubuněčných morfotypů se zvýšilo na 30%. Ve třetí, čtvrté a páté koncentraci (1; 2 a $4 \text{ mg l}^{-1} \text{ Zn}^{2+}$) se tvořila dvou- a čtyřbuněčná cenobia v poměru 1:1. Tím, že se zvýšila koncentrace těžkého kovu v roztoku, docházelo k rozpadu cenobií. Stejný trend byl pozorován i ve studii Peña-Castro et al. (2004), kdy bylo prokázáno snížení počtu buněk v cenobiu s nárůstem obsahu mědi, chromu či kadmia v roztoku. Güçlü et Ertan (2012) na základě experimentu dodávají, že cenobiální struktura uvedených kmenů byla ovlivněna již při nízkých koncentracích zinku. Tyto výsledky ukazují, že tvar cenobia je velmi citlivý parametr, který rychle reaguje na kolísání i nízkých koncentrací zinku v kultivačním médiu (Güçlü et Ertan, 2012).

Vliv odpadních vod s obsahem textilního indigo barviva na sladkovodní zelenou řasu *Scenedesmus quadricauda* (dnes *Desmodesmus communis*, revize taxonu Hegewald, 2000) studovali Chia et Musa (2014). Tato řasa byla vystavena různým koncentracím indiga, které autoři získali zředěním 100 až 175krát v Boldovo bazálním médiu. Výzkum potvrdil, že se zvyšující se koncentrací indiga v médiu dochází k rapidnímu snížení růstu řasy. Prokázán byl i úbytek chlorofylu v buňkách, dále pak změny v počtu buněk jednotlivých cenobií. Výsledky studie prokázaly, že rozpadavost cenobií významně koreluje s koncentrací odpadní látky v médiu. Čím vyšší byla koncentrace odpadní látky, tím větší poměr jednobuněčných morfotypů byl v kultivačním médiu zaznamenán. EC_{50} byla stanovena na hranici 166krát zředěné odpadní vody v BBM. Tato odpadní voda, vznikající jako produkt textilního průmyslu po barvení indigo barvivem, obsahovala i těžké kovy jako kadmium chrom a měď. Autoři touto studií předkládají důkaz, že i nízké koncentrace odpadních vod, pocházející z textilního průmyslu využívajícího indigo barviva, jsou schopné významně snížit růst populace a ovlivnit fenotyp řasy *S. quadricauda*. Snížení počtu buněk v cenobiu pozorované v této studii dále potvrzuje, že environmentální stres ovlivňuje cenobiální strukturu rodu *Scenedesmus*, což znamená, že

rozpadavost cenobií může být považována za důležitý biologický marker pro testování toxicity.

Dle autorů Chia et al. (2015) se v posledních letech objevily i různé výzkumy věnující se toxickým účinkům atrazinu (člověkem vytvořený syntetický herbicid) na řasy. Do doby, než byl proveden tento výzkum, se žádná práce nevěnovala studii kombinovaného vlivu kovů a atrazinu současně na jakékoli řase. Toxicita atrazinu závisí v době expozice na jeho interakci s fyzikálními a chemickými podmínkami převládajících ve vodním ekosystému. Cílem této studie bylo prozkoumat kombinovaný účinek mědi (Cu^{2+}) a atrazinu na růst, produkci biomasy, fenotypové variace, produkci proteinů a antioxidačních enzymových reakcí sladkovodní zelené řasy *Scenedesmus quadricauda* (dnes *Desmodesmus communis*, revize taxonu Hegewald, 2000) za kontrolovaných laboratorních podmínek. Kombinací mědi a atrazinu došlo k významnému snížení růstu a produkci biomasy, v porovnání s působením samotné mědi nebo samotného atrazinu. Také schopnost řasy produkovat mnohobuněčná cenobia po vystavení měďnatých kationtů a atrazinu současně se významně snížila. Fenotypové variace studovaného kmene ukázaly, že se zvyšující se koncentrací mědi a atrazinu docházelo ke snížení počtu buněk v cenobiu. V kultivačních médiích, která kombinovala současně atrazin i měď se objevovaly i jednobuněčné morfotypy častěji, než v médiích, které obsahovaly pouze atrazin nebo měď. Kombinace dvoumocné mědi a atrazinu měla také vliv na obsah chlorofylu v buňkách. Výsledky této studie zdůrazňují variabilitu interakcí látek, které se mohou běžně vyskytovat v přírodních vodních ekosystémech a kromě toho toxické účinky těchto kombinovaných stresorů, které mohou být často mnohonásobně vyšší, než účinky látek samotných. Autoři tak prokázali, že měří-li se v laboratorních podmínkách jednotlivé faktory samostatně, nemusí výsledky vždy přesně odpovídat tomu, co se děje v přirozeném vodním ekosystému (Chia et al., 2015).

Monteiro et al. (2011) také sledovali toxicitu kadmia a zinku na dvě různé řasy, a to na *Scenedesmus obliquus* (dříve *S. acutus*, dnes *Acutodesmus obliquus*, revize taxonu Hegewald et Hanagata, 2000) a *Desmodesmus pleiomorphus*. Pro média s obsahem dvoumocného zinku, použili autoři chlorid zinečnatý (ZnCl_2) a pro média obsahující dvoumocné kadmium chlorid kademnatý (CdCl_2). Tato studie byla primárně zaměřena na to, jaké množství zinku a kadmia jsou tyto řasy schopny odebrat z prostředí. Sekundárně byly sledovány fenotypové projevy těchto řas. Autoři potvrdili, že vlivem působení zinku i kadmia dochází ke snížení rychlosti růstu obou řas a že inhibice růstu populace byla

v podstatě stejně úměrná koncentraci těžkých kovů v médiu. Analýza růstu řas za působení dvoumocného kadmia naznačila, že je tento kov mnohem toxičtější, než dvoumocný zinek u obou druhů. ANOVA ukázala, že došlo k výraznému efektu u obou testovaných kovů na růst populace *S. obliquus* i *D. pleiomorphus* (Monteiro et al., 2011).

Kromě studií zabývajících se působením kadmia, chromu, zinku a mědi existují i studie, které sledují vliv selenu na řasy. Selen se přirozeně vyskytuje v organismech jako stopový prvek a podílí se na mnoha biologických funkcích. Ovšem při vyšších koncentracích je velmi toxický (Umysová et al., 2009). Umysová et al. (2009) sledovali vliv vybraných sloučenin selenu na zelenou řasu *Scenedesmus quadricauda* (dnes *Desmodesmus communis*, revize taxonu Hegewald, 2000). Selen byl přidáván do médií ve formě seleničitanu sodného (Na_2SeO_3) nebo selenanu sodného (Na_2SeO_4), anebo byly použity obě formy současně. Obě chemické formy selenu byly rozhodujícími faktory v buněčné odpovědi. Seleničitan vykazoval větší toxický účinek než selenan. Zajímavé bylo, že kultura s kteroukoli z uvedených sloučenin selenu měla za následek akumulaci jeho organické formy, a to selenomethioninu. Ve všech kultivovaných kmenech, aktivita thioredoxin reduktázy prudce vzrostla v přítomnosti jakékoli formy selenu. Tato zvýšená aktivita thioredoxinu v řasových buňkách byla odezvou na stres vyvolaný selenové toxicitě. Tato studie poskytla nový pohled na to, jaký vliv má selen na zelené řasy, a to zejména s ohledem na jeho toxicitu a bioakumulaci.

Existují samozřejmě i studie, které věnují svou pozornost řasám z jiných čeledí, než Scenedesmaceae. Např. ve studii kolektivu autorů Nacorda et al. (2007) byla sledována rezistence a zároveň schopnost odebrání těžkých kovů z prostředí u dvou kmenů *Chlorella vulgaris*. Další práci, jejímž pokusným organismem byla *Chlorella vulgaris*, publikoval kolektiv autorů Afkar et al. (2010). V této studii byl studován vliv kobaltu, kadmia a mědi na zmíněnou řasu. V závěru studie je uveden mnoha autory ověřený fakt, že těžké kovy mají vliv na růst populace. Čím vyšší byla koncentrace těchto kovů v médiu, tím k většímu potlačení růstu biomasy *Ch. vulgaris* docházelo. Zajímavým faktem je to, že autoři této práce došli k závěru, že obsah dvoumocné mědi v prostředí má negativní vliv na fotosyntetický aparát této řasy, podobně jako ve studiích Abd-El-Monem et al. (1998) a Peña-Castro et al. (2004), kteří také potvrdili negativní vliv dvoumocné mědi na obsah chlorofylu řas rodů *Acutodesmus* a *Scenedesmus*.

Vliv mědi a kadmia byl studován i na rozsivkách (Bacillariophyceae), konkrétně na penátní rozsivce *Amphora coffeaeformis*, kdy autoři sledovali zejména růst populace, vliv

na fotosyntetické pigmenty a změny v nutriční hodnotě řasy (Anantharaj et al., 2011). Autoři potvrzují, že tyto kovy mají vliv na jimi sledované fenomény a dodávají, že jsou tyto řasy vhodnými bioindikátory znečištění prostředí těžkými kovy. Visviki et Rachlin (1994) ve své studii studovali vliv mědi a kadmia na zelené bičíkovce *Dunaliella salina* a *Chlamydomonas bullosa*. Zaměřili se především na to, jaký vliv má měď a kadmium na strukturální změny těchto dvou řas. Výsledky studie naznačují, že kadmium mělo větší dopad na strukturu těchto druhů než měď. Stres vyvolaný těžkými kovy ovlivnil řadu buněčných parametrů, jako např. velikost jádra a pyrenoidu nebo šířka buněčné stěny.

Existuje mnoho dalších studií věnující se vlivu těžkých kovů na řasy, např. Cain et al., 1980; Corradi et al., 1995; Yan et Pan, 2000; Costa et França, 2003; Příbyl et Cepák, 2005; Bączik-Remisiewicz et al., 2009 aj.).

2.5 Fenotypová plasticita rodu *Scenedesmus* s. l. a její vliv na taxonomii rodu

Historie výzkumu fenotypové plasticity sahá až k 70 létům 20 století (Bradshaw, 1965). Změna ve fenotypu v důsledku měnících se podmínek prostředí zástupců rodu *Scenedesmus*, byla sledována několika autory již počátkem 70 let minulého století (např. Trainor et Hilton, 1963; Trainor, 1964; Swale, 1967).

Ve studii Trainora et Hiltona (1963) byly sledovány morfologické změny řasy *Scenedesmus longus* v důsledku měnících se podmínek prostředí. Řasa rostla i přes široký teplotní rozsah (od 22° C do 38° C), při různé intenzitě osvětlení (od 5 do 650 ft), různému pH (od 5 do 7,5) a v různých kapalných médiích. Výsledky studie uvádějí, že řasa se v průběhu pokusu morfologicky měnila. V různých podmínkách řasa reagovala jinak a autoři si všimli různých morfologických variací. Autoři pozorovali v průběhu pokusu jak vícebuněčná cenobia, tak i jednobuněčné morfotypy, vždy v závislosti na měnících se podmínkách prostředí. V závěru autoři doplňují, že výsledky jejich laboratorní studie mohou naznačovat širokou škálu morfotypů, které se mohou vyskytovat běžně i v přírodě. Právě morfologie zástupců čeledi Scenedesmaceae byla v minulých letech sledovaná a důkladně zmapovaná především dvěma vědci Eganem a Trainorem. Zmínění autoři zaznamenávali variabilitu morfologie širokého spektra zástupců. Získané poznatky poukazující na změnu v morfologii vedly ke zjištění, že fenotypová plasticita se projevuje také i u řas z čeledi Scenedesmaceae (např. Trainor et Hilton, 1963; Trainor 1964, 1966a,

1966b; Swale, 1967; Trainor et Rowland, 1968; Trainor, 1969; Trainor et al., 1976; Trainor, 1979; Egan et Trainor, 1989; Trainor et Egan, 1990a, 1990b, 1991; Egan et Trainor, 1991; Trainor, 1992). Trainor et Egan (1990b) začali pochybovat o správném taxonomickém vymezení rodu *Scenedesmus*, když provedli studii na čtyřech různých kmenech řasy *Scenedesmus armatus*. Autoři se totiž zpočátku domnívali a předpokládali to, že parametry určitých druhů řas (jako např. ostny) rodu *Scenedesmus* mají stabilní charakter. V jejich studii ovšem naznačují, že vznikl problém s taxonomickým zařazením zástupců rodu *Scenedesmus* v důsledku toho, že jejich základní předpoklad byl chybný. Autoři navíc dodávají, že existují i další studie, které sledovali jeden či více kmenů řas z rodu *Scenedesmus* a opakovaně dokazují, že vývoj určitých parametrů řasy jako např. délka či absence ostnů je ovlivněna různými podmínkami prostředí (Trainor, 1964, 1966a, 1966b, 1969).

Výsledky četných studií měly dopad na taxonomii Scenedesmaceae. Důsledky byly detailně popsány a rozebrány ve studii Trainora et al. (1976), který konstatoval, že řasy mohou vykazovat určitou míru plasticity a změn v morfortypu. Autor zmiňuje, že je nutností v popisu nových druhů brát ohled na to, že v různých podmínkách prostředí se mohou vyskytovat zcela odlišné morfortypy daného druhu a může docházet k nesprávnému určení druhů. Autor také poukázal na to, že tradiční popisy druhů, které jsou založené především na popisu morfologie jednotlivých ekotypů, nejsou dostatečné, protože podmínky prostředí ovlivňují fenotyp řas, zejména u rodu *Scenedesmus*. Na fakt, že výsledky studií mají dopad na taxonomii čeledi Scenedesmaceae, navazují i další práce Trainora (např. Trainor, 1979; Egan et Trainor, 1991). Právě ve studii Egana et Trainora (1991) byly sledovány různé kmeny druhu *Scenedesmus communis*, které byly vystaveny působením hnojiv. Analýza morfologických znaků ukázala, že izolovaný kmen *S. communis* vystavený roztokům hnojiv byl podobný *S. komarekii* (kmen UTEX 1236) a druhý izolovaný kmen *S. communis* byl podobný *S. subspicatus* (kmen UTEX 1358). Růst a morfologické exprese kmenů *S. communis* byly velmi podobné těm, které odpovídaly příslušným druhům z UTEX (Culture Collection of Algae at The University of Texas at Austin). Vědci tak další studií potrdili, že taxonomie čeledi Scenedesmaceae je nejasná a že fenotypová plasticita ovlivňuje morfologii organismů, což může mít za následek špatné určení druhů. „Současný stav taxonomie a důsledky fenotypové plasticity na taxonomii rodu *Scenedesmus* jsou velmi diskutabilní“ (Egan et Trainor, 1991).

Z mnohých morfologických studií je patrné základní vymezení morfologie zástupců rodu *Scenedesmus*, kdy je tato řasa schopna vytvářet mnoho morfotypů a je fenotypově velmi variabilní. Jednotlivé kmeny různých druhů mohou tvořit cenobia složená ze dvou, čtyř nebo osmi buněk. Až ke konci 20. století, kdy se začaly používat inovativní metody molekulární biologie k určení příbuznosti jednotlivých druhů a rodů, došlo k objasnění a přestavbě čeledi Scenedesmaceae. Původní rod *Scenedesmus* je v současné době rozdělen na rody *Scenedesmus*, *Acutodesmus* a *Desmodesmus* (An et al., 1999; Tsarenko et Petlevanny, 2001).

2.6 *Desmodesmus armatus*

V roce 1990 si autoři Trainor a Egan uvědomovali, že se pravděpodobně nejedná o velké množství druhů rodu *Scenedesmus*, ale že nejspíše jde o menší počet druhů, které projevují určitou morfologickou plasticitu, odrážející změnu vnějších podmínek. (Trainor et Egan, 1990a). Fenotypová plasticita *Desmodesmus armatus* byla popsána v několika studiích. Práce Trainora et Egana (1990a) potvrdila, že *D. armatus* vykazuje širokou škálu morfotypů, obdobně jako bylo stanoveno pro mnohé další druhy ve Scenedesmaceae. Vědci podotkli, že existuje mnoho popsaných fenotypových variací tohoto druhu, které se mohou lišit v závislosti na tom, o jaký kmen se jedná a v jakých podmínkách se vyskytuje. Autoři dále uvádějí, že jednotlivé studované kmeny *S. armatus* si byly fenotypově velmi podobné. U všech sledovaných kmenů byly pozorovány různé fenotypové variace od jednobuněčných morfotypů po vícebuněčná cenobia. I v dalších studiích autoři potvrdili, že kmeny *D. armatus* vytváří v různých podmínkách různé morfotypy (Egan et Trainor, 1989; Trainor et Egan, 1990a, 1991; Egan et Trainor, 1991; Trainor, 1992).

Dle Trainora (1992) je *D. armatus* typický tvorbou válcovitých, lineárně protažených či oválných čtyřostrých cenobií. Ostny se tvoří na krajních buňkách, zřídka se mohou ostny tvořit i na vnitřních buňkách cenobií. Cenobia se skládají většinou ze čtyř buněk, ale mohou se vyskytovat dvou, osmi i šestnácti buněčná cenobia. Literatura dále uvádí možný vznik jednobuněčných morfotypů. Hegewald (2000) popisuje buňky zmíněného druhu jako oválné či vřetenovité. Jeho buněčná stěna se jeví jako hladká, chybí sliz i žebra, uvnitř každé buňky je přítomný velký pyrenoid.

2.7 Hypotézy výzkumu

Na základě výsledků výzkumů fenotypové plasticity pod vlivem těžkých kovů na příbuzné taxony byly stanoveny hypotézy pro výzkum v této práci.

Ve studii autorů Güçlü et Ertan (2012) se uvádí, že vlivem dvoumocného zinku řasy *Acutodesmus obliquus* a *Desmodesmus armatus* (Scenedesmaceae) redukuje počet buněk v cenobiu. V případě *D. armatus* měla vyšší koncentrace zinku za následek snižující se počet buněk v jednotlivých cenobiích.

Hypotéza 1: Působením dvoumocného zinku se bude počet buněk v cenobiu sladkovodní zelené řasy *Desmodesmus armatus* snižovat. Se zvyšující se koncentrací zinečnatých kationtů v kultivačním médiu bude klesat počet buněk v jednotlivých cenobiích.

Ve studii kolektivu autorů Peña-Castro et al. (2004) bylo upozorněno na skutečnost, že působením dvoumocné mědi na řasu *Scenedesmus incrassatulus* (Scenedesmaceae) se snižuje počet buněk v cenobiu. S rostoucí koncentrací měďnatých kationtů v médiu dochází k redukci buněk v cenobiích. Rozměry a tvar buněk ve všech testovaných koncentracích se přibližně shodovaly s rozměry buněk kontrolního média.

Hypotéza 1: Působením dvoumocné mědi se bude počet buněk v cenobiu zelené řasy *Desmodesmus armatus* snižovat. Se zvyšující se koncentrací dvoumocné mědi v médiu bude klesat počet buněk v cenobiích.

Hypotéza 2: Vlivem dvoumocné mědi se velikost buněk v jednotlivých cenobiích řasy *Desmodesmus armatus* nezmění.

3 Metodika

Metodika této práce byla vystavena na základě studie kolektivu autorů Peña-Castro et al. (2004), přičemž byly provedeny drobné úpravy přizpůsobené účelům této diplomové práce. Celý výzkum probíhal na půdě CBG Fakulty pedagogické, Západočeské univerzity v Plzni.

3.1 Získání a uchování *Desmodemus armatus*

Pro výzkum v této práci byla jako testovaný organismus použita sladkovodní zelená řasa *Desmodemus armatus*. Kmen této řasy byl izolován v listopadu roku 2011 (Dobrá, 2013), na půdě CBG Fakulty pedagogické, Západočeské univerzity v Plzni (pozn. V práci Dobrá (2013) a dále také v práci Bučkové (2013) byla řasa na základě morfologického vyhodnocení mylně označována jako *Desmodemus communis*. V průběhu zpracování uvedených diplomových prací však nebyly k dispozici aktuálně známé výsledky molekulárních analýz potvrzující, že se jedná o druh *Desmodemus armatus*). Ke kultivaci této řasy bylo použito sterilní Boldovo bazální médium s dvojnásobným množstvím dusičnanů (2N BBM). Kultura byla uchována v klimaboxu za stálých podmínek. Kultura této řasy je dále k dispozici ve sbírce řas na Oddělení biologie, CBG, FPE ZČU v Plzni. Kultura *D. armatus* byla pravidelně kontrolována a přeočkovávána, přičemž poslední přeočkování z důvodu revitalizace kultury před samotným zahájením pokusu proběhlo v červnu 2015. Kultura byla přeočkována do 250 ml Erlenmeyerovy baňky s obsahem 150 ml BBM média. Tato kultura pak rostla za konstantních podmínek při teplotě $\pm 18^{\circ}\text{C}$ a za umělého osvětlení s dvanáctihodinovou fotoperiodou po dobu jednoho měsíce.

3.2 Vytvoření koncentračních řad zinku a mědi a očkování řas

Pro vytvoření prostředí a tří koncentračních řad s obsahem dvoumocného zinku, byl použit chlorid zinečnatý (ZnCl_2). Tato sloučenina byla zvolena na základě jejího prokázaného vlivu na řasy, publikovaného ve studiích autorů Abd-El-Monem et al. (1998), Monteiro et al. (2011) či Güçlü et Ertan (2012). Pro vytvoření koncentračních řad

s obsahem dvoumocné mědi byl využit pentahydrát síranu měďnatého ($\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$), jehož účinky na zástupce Scenedesmaceae byly zveřejněny ve studii Abd-El-Monem et al. (1998).

3.2.1 Zinek

Na základě účinnosti koncentrací dvoumocného zinku publikované v práci Güçlü et Ertan (2012), byly zvoleny následující koncentrace kovu: $0,5 \text{ mg l}^{-1}$, 2 mg l^{-1} , a $4,5 \text{ mg l}^{-1}$. Ke každé koncentraci bylo vytvořeno jedno opakování. Pro účely tohoto pokusu bylo vytvořeno kontrolní médium bez obsahu těžkého kovu též s jedním opakováním.

3.2.2 Měď

Koncentrační řada tohoto kovu byla zvolena na základě studie autorů Peña-Castro et al. (2004). Pro dvoumocnou měď byly stanoveny tři různé koncentrace, a to $2,5 \text{ mg l}^{-1}$, $6,5 \text{ mg l}^{-1}$ a 10 mg l^{-1} . Ke každé koncentraci bylo vytvořeno jedno opakování. I pro tento pokus bylo vytvořeno kontrolní médium bez obsahu kovu s jedním opakováním.

3.2.3 Očkování *Desmodesmus armatus*

K získání určitého počtu cenobií *Desmodesmus armatus*, byla využita Bürkerova komůrka. Po homogenizaci kultury byl pomocí Bürkerovy komůrky stanoven počet buněk v mililitru a následně byl vypočítán objem kultury, který bylo třeba aplikovat do Erlenmeyerových baněk s obsahem kultivačního média s přídavkem i bez přídavku těžkých kovů. Do každé baňky bylo potom přidáno přibližně 500 000 cenobií této řasy.

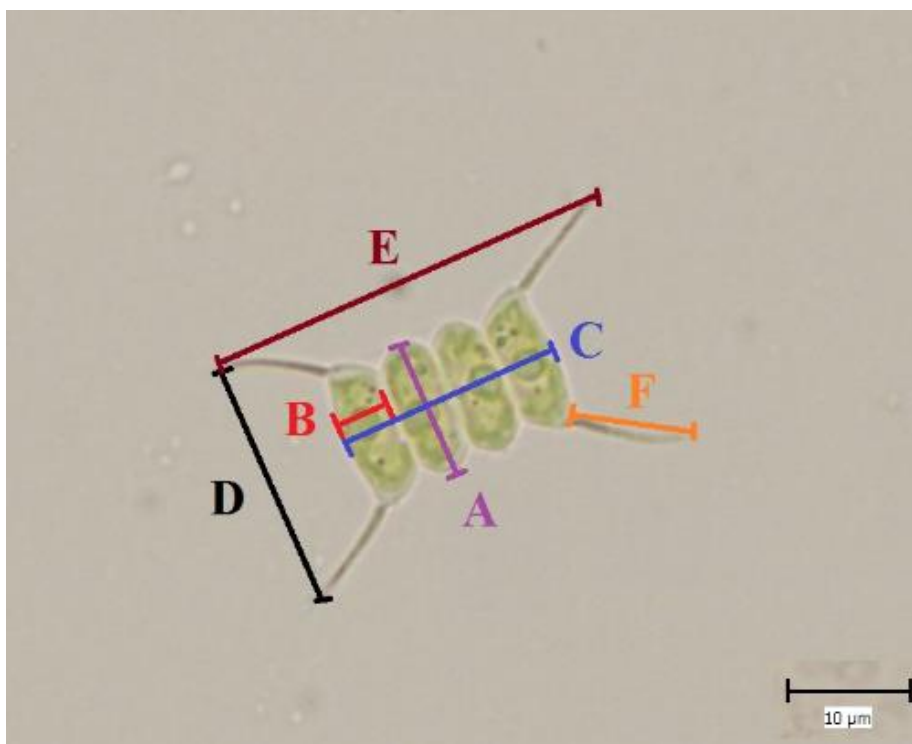
3.3 Uchování médií

K pokusu byly použity Erlenmeyerovy baňky o objemu 500 ml. Do každé baňky bylo přidáno 250 ml 2N BBM určité koncentrace daného těžkého kovu a přibližně 500 000

cenobií řasy *Desmodesmus armatus*. Všechny tyto baňky byly po dobu pokusu uchovávány v klimaboxu při teplotě 18°C a dvanáctihodinovém umělém osvětlení.

3.4 Měření parametrů *Desmodesmus armatus*

Z každé testované kultury, včetně kultur kontrolních, bylo náhodně naměřeno 30 čtyřbuněčných a 30 dvoubuněčných cenobií. Současně byl zaznamenáván výskyt dalších, méně četných morfotypů (např. osmibuněčná cenobia či cenobia atypického vzhledu). Sledovány byly také další faktory, jako poměr zastoupení dvou- čtyř- či osmibuněčných cenobií, či případná letalita řasy. K pozorování byl použit mikroskop Olympus BX51, k vytvoření snímků byla používána digitální kamera Olympus DP72 a program QuickPHOTO CAMERA verze 2.3. U každého cenobia byly změřeny následující parametry: výška a šířka jednotlivé buňky v daném cenobiu, šířka celého cenobia, rozpětí ostnů jedné okrajové buňky, rozpětí ostnů mezi dvěma krajními buňkami a délka jednoho ostnu (Obr. 1).



Obr. 1: Měřené parametry cenobia *Desmodesmus armatus*. A – výška buňky, B – šířka buňky, C – šířka cenobia, D – rozpětí ostnů jedné okrajové buňky, E – rozpětí ostnů dvou krajních buněk, F – délka ostnu. Měřítko = 10µm.

3.5 Způsob stanovení poměru morfotypů v kultuře

Počet 2-buněčných a 4-buněčných morfotypů řasy *Desmodesmus armatus* byl zjišťován odhadem. V průběhu každého mikroskopického pozorování (viz Tab. 1) bylo náhodně zaznamenáno a vyfotografováno 30 cenobií řasy pro každou kulturu včetně opakování. Z tohoto celkového počtu byl následně vyjádřen počet 2-buněčných a 4-buněčných forem v každé jednotlivé kultuře. Ten byl využit ke stanovení poměru obou morfotypů v kultuře.

3.6 Data sledování kultur

Samotná studie pozorování vlivu dvoumocného zinku na řasu *Desmodesmus armatus* probíhala od 29. 7. 2015 do 11. 8. 2015. Sledování vlivu dvoumocné mědi na kulturu probíhalo od 17. 8. 2015 do 30. 8. 2015. U obou pokusů byla zachována stejná doba experimentu dvou týdnů, intervaly jednotlivých dnů byly také shodné u obou experimentů a pohybovaly se v rozmezí jednoho až dvou dnů (Tab. 1).

Tab. 1: Rozpis dnů pozorování řasy *Desmodesmus armatus*.

Zinek		Měď	
Den experimentu	Den pozorování	Den experimentu	Den pozorování
29. 7. 2015	1.	17. 8. 2015	1.
30. 7. 2015	2.	18. 8. 2015	2.
31. 7. 2015	3.	19. 8. 2015	3.
1. 8. 2015	4.	20. 8. 2015	4.
2. 8. 2015	5.	21. 8. 2015	5.
3. 8. 2015	6.	22. 8. 2015	6.
5. 8. 2015	7.	24. 8. 2015	7.
7. 8. 2015	8.	26. 8. 2015	8.
9. 8. 2015	9.	28. 8. 2015	9.
11. 8. 2015	10.	30. 8. 2015	10.

3.7 Statistické metody a vyhodnocení dat

Kontrola normálního rozdělení naměřených dat byla testována a hodnocena pomocí Kolmogorovova – Smirnovova (K-S) testu. Neparametrickým testem (Kruskall-Wallis analýzou rozptylu) byly porovnávány obě opakování ve všech koncentracích v kompletních časových řadách. Pomocí Kruskall-Wallis testu byly zjišťovány potenciaální signifikantní rozdíly mezi jednotlivými opakováními. Vzhledem k tomu, že ani v jednom případě nebyly zjištěny signifikantní rozdíly mezi oběma opakováními, byla data sloučena do jednoho homogenního vzorku, se kterým bylo následně pracováno. Jelikož seskupené soubory vykazovaly normální rozdělení (testováno K-S testem ($P > 0,05$)), byla data dále porovnávána jednocestnou parametrickou ANOVOU s korekční procedurou pro násobné testování hypotéz tzv. Bonferroniho korekcí a Tukey Kramerovým Post Hoc testem. Jednotlivé plastické znaky byly testovány postupně u všech vzorků. Testována byla hypotéza, že jednotlivé plastické znaky se v čase nemění. Dále byly porovnávány jednotlivé znaky (šířka a výška jedné buňky v cenobiu, šířka celého cenobia, rozpětí ostnů v rámci jedné krajní buňky, rozpětí ostnů mezi krajními buňkami a délka ostnů) mezi použitými koncentracemi kovů.

Výsledné hodnoty byly graficky znázorněny pomocí Box-plotů, se znázorněním mediánu a rozdílu třetího a prvního kvartilu (tedy 75. a 25. percentilu), tzv. mezikvartilového rozpětí (zkratka IQR – interquartile range), dále byla použita nejbližší vyšší hodnota než je 1. kvartil – $1,5 \times \text{IQR}$, a nejbližší nižší hodnota než je 3. kvartil + $1,5 \times \text{IQR}$, a odlehlé a extrémní hodnoty.

Všechny testy byly provedeny ve statistickém programu NCSS 9.

4 Výsledky

Výsledky praktické části práce shrnují získané informace o vlivu zinečnatých a měďnatých kationtů na zelenou řasu *Desmodesmus armatus*.

4.1 Vliv zinečnatých iontů na počet buněk v cenobiu řasy *Desmodesmus armatus*

Při kontrole 28. 7. 2015 (den před zahájením všech pokusů) se v kontrolní kultuře vyskytovala pouze 4-buněčná cenobia se dvěma ostny na každé krajní buňce (Příloha 1). Na žádném cenobiu nebyly spatřeny ostny na vnitřních buňkách. Pozorovány nebyly ani žádné další atypické morfotypy. Vlivem zinečnatých iontů se počet buněk v cenobiích u kontaminovaných kultur v průběhu pokusu měnil, nicméně po celou dobu pozorování byla zaznamenána tvorba 2- a 4-buněčných cenobií. Jiné typy cenobií (3-buněčná, 7-buněčná, 8-buněčná či jinak početná cenobia) ani soliterní buňky v kulturách s obsahem těžkého kovu i bez něj pozorovány nebyly. V prvním dnu pozorování bylo procentuální zastoupení cenobií v poměru cca 80 : 20 ve prospěch 4 buněčných cenobií, a to ve všech kontaminovaných kulturách s obsahem ZnCl_2 ($0,5 \text{ mg l}^{-1} \text{ Zn}^{2+}$, $2 \text{ mg l}^{-1} \text{ Zn}^{2+}$ a $4,5 \text{ mg l}^{-1} \text{ Zn}^{2+}$) a to i ve vzorku bez obsahu těžkého kovu. Druhý den pozorování se kultury jevíly podobně jako v první den, vyjma kultury s obsahem $4,5 \text{ mg l}^{-1} \text{ Zn}^{2+}$, kde začínala ubývat 4-buněčná cenobia a začala převládat cenobia 2-buněčná, to v poměru cca 60 : 40. V kultuře bez těžkého kovu bylo zastoupení cenobií stále přibližně 80 : 20 ve prospěch 4-buněčných forem. Od třetího dne pozorování byl sledován úbytek 4-buněčných cenobií, a to již od nejnižší sledované koncentrace $0,5 \text{ mg l}^{-1} \text{ Zn}^{2+}$. Poměr zastoupení obou morfotypů byl však stále ve prospěch 4-buněčných morfotypů v poměru cca 60 : 40. V kulturách s koncentrací $2 \text{ mg l}^{-1} \text{ Zn}^{2+}$, byl poměr čtyřbuněčných cenobií nižší, než v kulturách o koncentraci $0,5 \text{ mg l}^{-1} \text{ Zn}^{2+}$, a to cca 50 : 50. V kulturách o koncentraci $4,5 \text{ mg l}^{-1} \text{ Zn}^{2+}$ se tvořila cenobia v poměru 40 : 60 ve prospěch dvoubuněčných morfotypů. Kultura bez obsahu kovu nevykazovala žádné změny v počtu buněk cenobia oproti prvnímu dni. Od čtvrtého dne pozorování kultury (tj. 1. 8. 2015) docházelo v kulturách o koncentracích $0,5$ a $2 \text{ mg l}^{-1} \text{ Zn}^{2+}$ k dalšímu úbytku 4-buněčných forem. V kulturách o koncentraci $4,5 \text{ mg l}^{-1} \text{ Zn}^{2+}$ bylo pozorováno přibližně 70% 2-buněčných cenobií. Kontrolní vzorek bez obsahu těžkého kovu nevykazoval žádné změny.

Ve druhé polovině pokusu (konkrétně 5. – 7. den pozorování tj. 2. 8. 2015 – 5. 8. 2015) začínala ve všech kontaminovaných kulturách převládat 2-buněčná cenobia, a to přibližně v poměru 70 : 30. I v dalších dnech docházelo ke snižování poměru 2-buněčných a 4-buněčných forem. V průběhu 8. – 10. dne pozorování již dominovaly 2-buněčné formy v poměru 80 : 20 vůči 4-buněčným typům. Kultura bez obsahu těžkého kovu nevykazovala žádné změny počtu buněk v cenobiu v porovnání s prvním dnem experimentu. Stejně výsledky, jak bylo popsáno výše, vykazovala také kontrolní řada kultur.

V průběhu tohoto pokusu byly pozorovány i další reakce řasy *Desmodesmus armatus* na přítomnost zinečnatých iontů v prostředí. Zaznamenána byla i atypická cenobia, a to cenobia s neobvyklým tvarem a umístěním ostnů (pozn. ve srovnání s popisem Swale, 1967; Trainora, 1966a, b, 1969, 1992; Trainora et Egana, 1990a, b) viz Příloha 3). Tyto atypické morfologické variace cenobií nebyly v kultuře zastoupeny hojně, jejich výskyt byl spíše výjimečný. Nejhojněji byla tato cenobia zastoupena ve vzorku s nejvyšší sledovanou koncentrací zinečnatých iontů ($4,5 \text{ mg l}^{-1} \text{ Zn}^{2+}$). V kontrolní kultuře bez obsahu těžkého kovu nebyly pozorovány žádné atypické fenotypy.

4.2 Vliv zinečnatých iontů na sledované parametry řasy *Desmodesmus armatus*

Postupně byly porovnávány jednotlivé časové řady s různými koncentracemi zinku (vzorek 0 – kontrolní vzorek bez zinku, vzorek 1 – s koncentrací zinku $0,5 \text{ mg l}^{-1}$, vzorek 2 – s koncentrací zinku 2 mg l^{-1} a vzorek 3 – s koncentrací zinku $4,5 \text{ mg l}^{-1}$), a to pro 2-buněčná a 4-buněčná cenobia zvlášť. Hodnoty testových charakteristik (ANOVA s Bonferroniho korekcí) a pravděpodobnosti jsou patrné z Tab. 2.

4.2.1 Vliv zinečnatých iontů na sledované parametry u 2-buněčných cenobií řasy *Desmodesmus armatus*

Ve vzorku 0 (vzorek 0 – kontrolní vzorek bez obsahu zinku) se výšky buněk (Obr. 1, rozměr A) u 2-buněčných cenobií pohybovaly v rozmezí 12,46–12,65 μm (SE = 0,23); šířky buněk (Obr. 1, rozměr B) se pohybovaly mezi 5,3–5,43 μm (SE = 0,15); šířka cenobia (Obr. 1, rozměr C) se pohybovala mezi 10,91–11,83 μm (SE = 0,19); rozpětí ostnů jedné buňky (Obr. 1, rozměr D) bylo mezi 24,43–24,78 μm (SE = 0,45); rozpětí ostnů první a poslední buňky (Obr. 1, rozměr E) se pohybovalo v rozmezí 24,9–25,98 μm (SE = 0,51) a délka ostnu (Obr. 1, rozměr F) byla v rozmezí 10,28–10,52 μm (SE = 0,24).

Ve vzorku 1 (vzorek 1 – s koncentrací zinku 0,5 mg l^{-1}) se výšky buněk pohybovaly mezi 12,48–12,66 μm (SE = 0,23); šířka buněk byla v rozmezí 5,26–5,43 μm (SE = 0,15); šířka cenobia se pohybovala mezi 10,91–12,6 μm (SE = 0,19); rozpětí ostnů jedné krajní buňky bylo 24,21–24,81 μm (SE = 0,46); rozpětí ostnů první a poslední buňky se pohybovalo mezi 24,75–25,86 μm (SE = 0,52) a délka ostnu byla v rozmezí 10,3–10,36 μm (SE = 0,23).

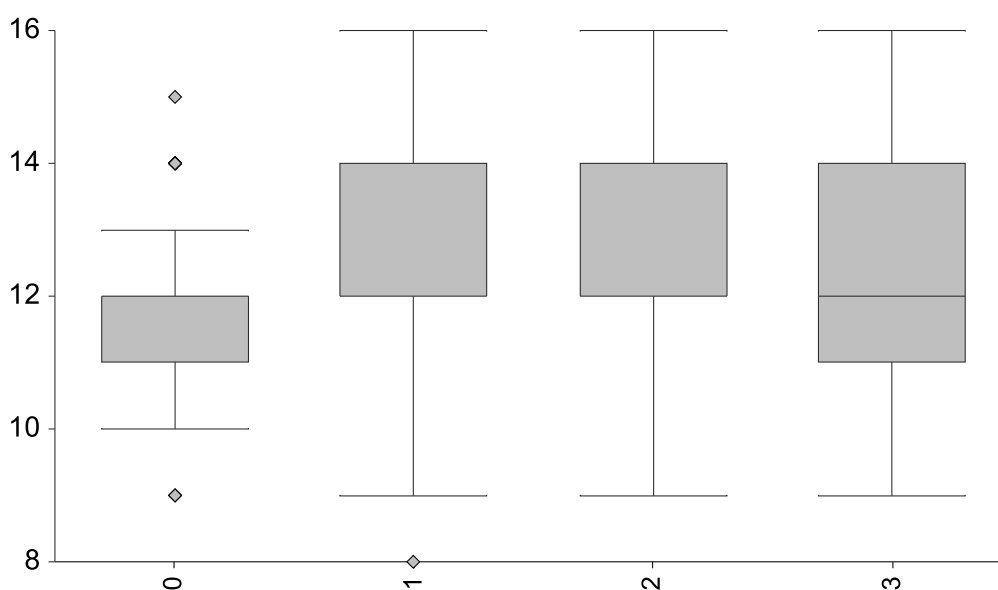
Ve vzorku 2 (vzorek 2 – s koncentrací zinku 2 mg l^{-1}) se výšky pohybovaly v rozmezí 12,45–12,83 μm (SE = 0,23); šířka buněk byla v rozmezí 5,25–5,41 μm (SE = 0,15); šířka cenobia se pohybovala mezi 11,03–12,61 μm (SE = 0,20); rozpětí ostnů jedné krajní buňky bylo mezi 24,36–24,9 μm (SE = 0,45); rozpětí ostnů první a poslední buňky se pohybovalo v rozmezí 24,6–26,67 μm (SE = 0,53) a délka ostnu byla mezi 10,31–10,54 μm (SE = 0,23).

Ve vzorku 3 (vzorek 3 – s koncentrací zinku 4,5 mg l^{-1}) se výšky pohybovaly mezi 12,32–12,72 μm (SE = 0,23); šířka buněk byla v rozmezí 5,31–5,48 μm (SE = 0,14); šířka cenobia byla v rozmezí 10,83–12,43 μm (SE = 0,19); rozpětí ostnů jedné krajní buňky se pohybovalo mezi 24,08–24,82 μm (SE = 0,44); rozpětí ostnů první a poslední buňky bylo mezi 24,33–26,88 μm (SE = 0,56) a délka ostnu se pohybovala v rozmezí 10,25–10,48 μm (SE = 0,24).

V případě 2-buněčných cenobií nedošlo k signifikantním změnám, pouze v jednom případě (vzorek 1, 2 a 3, a to 8. den pozorování) byla zjištěna významně širší cenobia (viz Tab. 2). Konkrétní hodnoty pro vzorek 1 (vzorek 1 – s koncentrací zinku 0,5

mg^l⁻¹) byly $F = 6,82$ a $P = 0,00$, pro vzorek 2 (vzorek 2 – s koncentrací zinku 2 mg^l⁻¹) byly $F = 5,7$ a $P = 0,00$ a pro vzorek 3 (vzorek 3 – s koncentrací zinku 4,5 mg^l⁻¹) byly hodnoty $F = 5,89$ a $P = 0,00$.

Dále byly u 2-buněčných cenobií porovnávány hodnoty jednotlivých plastických znaků mezi koncentračními řadami 0 – 3 (tj. kulturou bez obsahu zinku a koncentracemi 0,5; 2 a 4,5 mg^l⁻¹ Zn²⁺). Sledované plastické znaky se mezi jednotlivými koncentracemi v případě 2-buněčných cenobií ($P > 0,05$) nelišily, kromě šířky cenobia, a to v rámci 8. měření, kdy byla zjištěna signifikantně menší šířka cenobia v kultuře bez obsahu těžkého kovu ($F = 3,68$; $P = 0,012$, viz Obr. 2).



Obr. 2: Šířka cenobia u vzorku 0; 1; 2 a 3 (tj. kulturou bez obsahu těžkého kovu a koncentracemi 0,5; 2 a 4,5 mg^l⁻¹ Zn²⁺) 8. den sledování.

4.2.2 Vliv zinečnatých iontů na sledované parametry u 4-buněčných cenobií řasy *Desmodesmus armatus*

Ve vzorku 0 (vzorek 0 – kontrolní vzorek bez obsahu zinku) se výšky buněk u 4-buněčných cenobií pohybovaly v rozmezí 12,58–12,68 μm (SE = 0,21); šířka buňky v rozmezí 5,23–5,38 μm (SE = 0,11); šířka cenobia se pohybovala mezi 23,08–23,46 μm (SE = 0,29); rozpětí ostnů jedné krajní buňky se pohybovalo mezi 24,58–24,98 μm (SE =

0,36); rozpětí ostnů první a poslední buňky bylo v rozmezí 32,83–33,18 μm (SE = 0,41) a délka ostnu se pohybovala mezi 10,31–10,43 μm (SE = 0,16).

Ve vzorku 1 (vzorek 1 – s koncentrací zinku 0,5 mg l^{-1}) se výšky buněk pohybovaly mezi 12,48–12,63 μm (SE = 0,20); šířka buněk v rozmezí 5,15–5,23 μm (SE = 0,11); šířka cenobia se pohybovala mezi 23,1–23,48 μm (SE = 0,28); rozpětí ostnů jedné krajní buňky bylo 24,5–25,03 μm (SE = 0,35); rozpětí ostnů první a poslední buňky se pohybovalo mezi 32,25–32,98 μm (SE = 0,40) a délka ostnu byla v rozmezí 10,31–10,5 μm (SE = 0,16).

Ve vzorku 2 (vzorek 2 – s koncentrací zinku 2 mg l^{-1}) se výšky pohybovaly v rozmezí 12,58–12,86 μm (SE = 0,22); šířka buněk byla v rozmezí 5,1–5,28 μm (SE = 0,12); šířka cenobia se pohybovala v rozmezí 23,03–23,45 μm (SE = 0,29); rozpětí ostnů jedné krajní buňky bylo 24,63–25,13 μm (SE = 0,39); rozpětí ostnů první a poslední buňky bylo mezi 32,71–33,79 μm (SE = 0,40) a délka ostnu byla mezi 10,28–10,4 μm (SE = 0,16).

Ve vzorku 3 (vzorek 3 – s koncentrací zinku 4,5 mg l^{-1}) se výšky pohybovaly mezi 12,31–12,53 μm (SE = 0,20); šířka buňky byla v rozmezí 5,18–5,28 μm (SE = 0,11); šířka cenobia se pohybovala v rozmezí 22,65–23,43 μm (SE = 0,29); rozpětí ostnů jedné krajní buňky se pohybovalo mezi 24,71–25,33 μm (SE = 0,36); rozpětí ostnů první a poslední buňky bylo mezi 32,96–33,88 μm (SE = 0,40) a délka ostnu se pohybovala v rozmezí 10,33–10,53 μm (SE = 0,16).

V případě 4-buněčných cenobií nedošlo k signifikantním změnám – nebyl zjištěn významný vliv zinku ani v jedné z použitých koncentrací na ani jeden ze sledovaných plastických znaků (viz Tab. 2).

Dále byly porovnávány hodnoty jednotlivých plastických znaků mezi koncentračními řadami 0 – 3 (tj. kulturou bez obsahu zinku a koncentracemi 0,5, 2 a 4,5 mg l^{-1} Zn^{2+}). Sledované plastické znaky se mezi jednotlivými koncentracemi v případě 4-buněčných cenobií nelišily ($P > 0,05$).

Tab. 2: Hodnoty testových charakteristik (ANOVA s Bonferonniho korekcí) pro jednotlivé časové řady (vzorky 0 – 3) a vzájemné srovnání časových řad

2-buněčná cenobia				
	vzorek 0	vzorek 1	vzorek 2	vzorek 3
výška buňky	F= 0,05; P= 0,99	F= 0,07; P= 0,99	F= 0,19; P= 0,99	F= 0,18; P= 0,99
šířka buňky	F= 0,07; P= 0,99	F= 0,12; P= 0,99	F= 0,13; P= 0,99	F= 0,29; P= 0,97
šířka cenobia	F= 1,32; P= 0, 22	F= 6,82; P= 0,00	F= 5,7; P= 0,00	F= 5,89; P= 0,00
rozpětí ostnů jedné buňky	F= 0,05; P= 0,99	F= 0,02; P= 0,99	F= 0,13; P= 0,99	F= 0,28; P= 0,97
rozpětí ostnů první a poslední b.	F= 0,57; P= 0,82	F= 0,4; P= 0,93	F= 1,46; P= 0,15	F= 1,70; P= 0,08
délka ostnu	F= 0,08; P= 0,99	F= 0,01; P= 1,00	F= 0,07; P= 0,99	F= 0,07; P= 0,99
4-buněčná cenobia				
	vzorek 0	vzorek 1	vzorek 2	vzorek 3
výška buňky	F= 0,04; P= 0,99	F= 0,06; P= 0,99	F= 0,15; P=0,99	F= 0,12; P= 0,99
šířka buňky	F= 0,17; P= 0,99	F= 0,05; P= 0,99	F= 0,25; P= 0,98	F= 0,07; P= 0,99
šířka cenobia	F= 0,22; P= 0,99	F= 0,18; P= 0,99	F= 0,23; P= 0,99	F= 0,95; P=0,47
rozpětí ostnů jedné buňky	F= 0,09; P= 0,99	F= 0,02; P= 0,98	F= 0,17; P= 0,99	F= 0,25; P= 0,98
rozpětí ostnů první a poslední b.	F= 0,10; P= 0,99	F= 0,10; P= 0,99	F= 0,52; P= 0,86	F= 0,48; P=0,88
délka ostnu	F= 0,22; P= 0,99	F= 0,16; P=0,99	F= 0,06; P= 0,99	F= 0,16; P= 0,99

4.3 Vliv měďnatých iontů na počet buněk v cenobiu řasy *Desmodesmus armatus*

Den před zahájením experimentu dne 16. 8. 2015, byla v kontrolní kultuře pozorována pouze 4-buněčná cenobia se dvěma ostny na obou krajních buňkách (viz Příloha 2). Nebyly pozorovány žádné ostny na vnitřních buňkách ani žádné další atypické morfotypy. Počet buněk v cenobiích se u kontaminovaných kultur v průběhu pokusu měnil, nicméně po celou dobu pozorování byla zaznamenána tvorba 2- a 4-buněčných cenobií. Zároveň byly pozorovány jiné počty buněk v cenobiu. Zaznamenána byla 3-buněčná cenobia, která byla pozorována ve vzorku 3 (vzorek 3 – s koncentrací mědi 10 mg l^{-1}) dne 21. 8. 2015, tj. 5. den pozorování. Další 3-buněčné cenobium bylo pozorováno ve vzorku 3 dne 22. 8. 2015, tj. 6. den pozorování a ve vzorku 1 (vzorek 1 – s koncentrací mědi $2,5 \text{ mg l}^{-1}$) dne 28. 8. 2015, tj. 9. den pozorování (viz Příloha 4). Tato 3-buněčná cenobia byla zpozorována pouze třikrát za celou dobu experimentu. Za celou dobu sledování bylo také zaznamenáno jedno 5-buněčné cenobium (viz Příloha 4) dne 30. 8. 2015, tj. 10. den pozorování ve vzorku 2 (vzorek 2 – s koncentrací mědi $6,5 \text{ mg l}^{-1}$). Pozorována byla také 7-buněčná cenobia (viz Příloha 4), která byla zaznamenána 21. 8. 2015 ve vzorku 2 (vzorek 2 – s koncentrací mědi $6,5 \text{ mg l}^{-1}$) a 24. 8. 2015, tj. 7. den pozorování ve vzorku 3 (vzorek 3 –

s koncentrací mědi 10 mg l⁻¹). Cenobia s jiným počtem buněk v cenobiu zaznamenána nebyla. Taktéž nebyla zjištěna přítomnost jednobuněčných forem.

Již po 24 hodinách od založení pokusu převládaly dvoubuněčné morfotypy ve všech kulturách kontaminovaných CuSO₄ · 5 H₂O (konkrétně se jedná o koncentrace 2,5 mg l⁻¹ Cu²⁺, 6,5 mg l⁻¹ Cu²⁺ a 10 mg l⁻¹ Cu²⁺). Poměrné zastoupení obou forem bylo přibližně 60:40 ve prospěch 2-buněčných cenobií. V kontrolní kultuře bez obsahu těžkého kovu převládala 4-buněčná cenobia v poměru cca 80 : 20. Během 3. – 6. dne pozorování (19., 20., 21. a 22. 8. 2015), docházelo ve všech kontaminovaných kulturách k dalšímu úbytku 4-buněčných morfotypů a převažovala cenobia v poměru cca 30 : 70 ve prospěch 2-buněčných. Od sedmého dne pozorování (24. 8. 2015), převládala 2-buněčná cenobia v poměru asi 80 : 20. Poslední dva dny pozorování (8. – 10. den, 28. 8. 2015 – 30. 8. 2015) dominovala dvoubuněčná cenobia přibližně z 90 %.

Výsledky uvedených poměrů morfotypů se v sérii kultur shodovaly s příslušnými kontrolními kulturami.

Napříč koncentracemi byly nacházeny i neobvyklé morfotypy (pozn. ve srovnání s popisy Swale, 1967; Trainora, 1966a, b, 1969, 1992; Trainora et Egana, 1990a, b). Pozorován byl jak neobvyklý tvar cenobia, tak i různý počet a umístění ostnů (viz Příloha 5 a 6). Atypické morfotypy však byly zaznamenány jen výjimečně a nahodile napříč koncentracemi. Kontrolní kultura během celého experimentu nejevila žádné změny v počtu buněk v cenobiích a atypicky formovaná cenobia zde přítomna nebyla.

4.4 Vliv měďnatých iontů na sledované parametry řasy *Desmodesmus armatus*

Postupně byly porovnávány jednotlivé časové řady s různými koncentracemi mědi (vzorek 0 – kontrolní vzorek bez obsahu mědi ve vzorku, vzorek 1 – s koncentrací mědi 2,5 mg l⁻¹, vzorek 2 – s koncentrací mědi 6,5 mg l⁻¹ a vzorek 3 – s koncentrací mědi 10 mg l⁻¹), a to pro 2-buněčná a 4-buněčná cenobia zvlášť. Hodnoty testových charakteristik (ANOVA s Bonferroniho korekcí) a pravděpodobnosti jsou patrné z Tab. 3.

4.4.1 Vliv měďnatých iontů na sledované parametry u 2-buněčných cenobií řasy *Desmodesmus armatus*

U dvou buněčných cenobií ve vzorku 0 (vzorek 0 – kontrolní vzorek bez obsahu mědi) se výšky buněk (Obr. 1, rozměr A) pohybovaly v rozmezí 12,53–12,75 μm (SE = 0,26); šířky buněk (Obr. 1, rozměr B) se pohybovaly mezi 5,25–5,49 μm (SE = 0,15); šířka cenobia (Obr. 1, rozměr C) byla mezi 11,13–11,36 μm (SE = 0,22); rozpětí ostnů v rámci jedné krajní buňky (Obr. 1, rozměr D) bylo v rozmezí 24,9–25,21 μm (SE = 0,47); rozpětí ostnů první a poslední buňky (Obr. 1, rozměr E) se pohybovalo v rozmezí 25,11–25,54 μm (SE = 0,45) a délka ostnu (Obr. 1, rozměr F) mezi 10,41–10,50 μm (SE = 0,22).

Ve vzorku 1 (vzorek 1 – s koncentrací mědi 2,5 mg l^{-1}) se výšky buněk pohybovaly v rozmezí 12,58–12,66 μm (SE = 0,25); šířka buněk se pohybovala mezi 5,2–5,43 μm (SE = 0,15); šířka cenobia byla v rozmezí 11,11–11,27 μm (SE = 0,21); rozpětí ostnů jedné krajní buňky bylo v rozmezí 24,76–25,22 μm (SE = 0,47); rozpětí ostnů první a poslední buňky bylo v rozmezí 24,83–26,28 μm (SE = 0,49) a délka ostnu se pohybovala v rozmezí 10,25–10,33 μm (SE = 0,20).

Ve vzorku 2 (vzorek 2 – s koncentrací mědi 6,5 mg l^{-1}) se výšky buněk pohybovaly v rozmezí 12,53–12,61 μm (SE = 0,22); šířky buněk byly mezi 5,2–5,41 μm (SE = 0,14); šířka cenobia byla v rozmezí 10,83–11,16 μm (SE = 0,21); rozpětí ostnů v rámci jedné krajní buňky bylo v rozmezí 25,06–25,28 μm (SE = 0,49); rozpětí ostnů první a poslední buňky se pohybovalo mezi 24,95–25,42 μm (SE = 0,45) a délka ostnu se pohybovala v rozmezí 10,15–10,53 μm (SE = 0,19).

Ve vzorku 3 (vzorek 3 – s koncentrací mědi 10 mg l^{-1}) se výšky buněk pohybovaly mezi 12,33–12,66 μm (SE = 0,26); šířka buněk se pohybovala v rozmezí 5,18–5,4 μm (SE = 0,16); šířka cenobia byla mezi 11,01–11,15 μm (SE = 0,21); rozpětí ostnů jedné krajní buňky bylo v rozmezí 24,21–24,86 μm (SE = 0,44); rozpětí ostnů první a poslední buňky bylo mezi 24,83–25,72 μm (SE = 0,48) a délka ostnu se pohybovala v rozmezí 10,31–10,49 μm (SE = 0,20).

V případě 2-buněčných cenobií nedošlo k signifikantním změnám – nebyl zjištěn významný vliv mědi ani v jedné z použitých koncentrací na ani jeden ze sledovaných plastických znaků (viz Tab. 3).

Dále byly porovnávány hodnoty jednotlivých plastických znaků mezi koncentračními řadami 0 – 3 (tj. kulturou bez obsahu mědi a koncentracemi 2,5; 6,5 a 10 mg l⁻¹ Cu²⁺). Sledované plastické znaky se mezi jednotlivými koncentracemi v případě 2-buněčných cenobií nelišily (P>0,05).

4.4.2 Vliv měďnatých iontů na sledované parametry u 4-buněčných cenobií řasy *Desmodesmus armatus*

U 4-buněčných cenobií ve vzorku 0 (vzorek 0 – kontrolní vzorek bez obsahu mědi) se výšky buněk pohybovaly v rozmezí 12,51–12,68 μm (SE = 0,19); šířka buněk se pohybovala mezi 5,28–5,41 μm (SE = 0,11); šířka cenobia byla mezi 22,7–23,03 μm (SE = 0,31); rozpětí ostnů v rámci jedné buňky se pohybovalo mezi 24,95–25,32 μm (SE = 0,21); rozpětí ostnů první a poslední buňky bylo mezi 33,08–33,4 μm (SE = 0,33) a délka ostnu se pohybovala v rozmezí 10,31–10,35 μm (SE = 0,15).

Ve vzorku 1 (vzorek 1 – s koncentrací mědi 2,5 mg l⁻¹) se výšky buněk pohybovaly mezi 12,36–12,76 μm (SE = 0,21); šířka buněk se pohybovala v rozmezí 4,96–5,21 μm (SE = 0,12); šířka cenobia byla mezi 22,56–22,78 μm (SE = 0,29); rozpětí ostnů v rámci jedné krajní buňky bylo v rozmezí 24,64–25,03 μm (SE = 0,23); rozpětí ostnů mezi první a poslední buňkou se pohybovalo v rozmezí 32,26–33,08 μm (SE = 0,38) a délka ostnu byla v rozmezí 10,33–10,4 μm (SE = 0,14).

Ve vzorku 2 (vzorek 2 – s koncentrací mědi 6,5 mg l⁻¹) se výšky buněk pohybovaly v rozmezí 12,38–12,75 μm (SE = 0,21); šířka buněk se pohybovala mezi 4,91–5,15 μm (SE = 0,11); šířka cenobia byla mezi 22,7–23,23 μm (SE = 0,32); rozpětí ostnů v rámci jedné buňky bylo v rozmezí 24,7–25,06 μm (SE = 0,22); rozpětí ostnů mezi první a poslední buňkou bylo mezi 32,55–33,08 μm (SE = 0,41) a délka ostnu se pohybovala v rozmezí 10,3–10,43 μm (SE = 0,15).

Ve vzorku 3 (vzorek 3 – s koncentrací mědi 10 mg l⁻¹) se výšky buněk pohybovaly mezi 12,43–12,75 μm (SE = 0,19); šířka buněk se pohybovala v rozmezí 4,78–5,05 μm (SE = 0,11); šířka cenobia se pohybovala mezi 22,41–23,33 μm (SE = 0,3); rozpětí ostnů jedné buňky bylo mezi 24,41–25,08 μm (SE = 0,21); rozpětí ostnů mezi první a poslední

buňkou bylo mezi 32,9–33,91 μm (SE = 0,33) a délka ostnu se pohybovala v rozmezí 10,4–10,5 μm (SE = 0,15).

Ani v případě 4-buněčných cenobií nedošlo k signifikantním změnám – nebyl zjištěn významný vliv mědi ani v jedné z použitých koncentrací na ani jeden ze sledovaných plastických znaků (viz Tab. 3).

Dále byly porovnávány hodnoty jednotlivých plastických znaků mezi koncentračními řadami 0 – 3 (tj. kulturou bez obsahu mědi a koncentracemi 2,5; 6,5 a 10 mg l^{-1} Cu^{2+}). Sledované plastické znaky se mezi jednotlivými koncentracemi ani v případě 4-buněčných cenobií nelišily ($P > 0,05$).

Tab. 3: Hodnoty testových charakteristik (ANOVA s Bonferonniho korekcí) pro jednotlivé časové řady (koncentrace mědi 0 – 3) a vzájemné srovnání časových řad

2-buněčná cenobia				
	vzorek 0	vzorek 1	vzorek 2	vzorek 3
výška buňky	F=0,05; P= 0,99	F= 0,03; P= 0,99	F= 0,03; P= 0,99	F= 0,17; P= 0,99
šířka buňky	F= 0,23; P= 0,99	F= 0,26; P= 0,98	F= 0,23; P= 0,98	F= 0,12; P= 0,99
šířka cenobia	F=0,08; P=0,99	F= 0,07; P= 0,99	F= 0,21; P= 0,99	F= 0,09; P= 0,99
rozpětí ostnů jedné buňky	F= 0,05; P= 0,99	F= 0,08; P=0,99	F= 0,02; P= 1,00	F= 0,24; P= 0,98
rozpětí ostnů první a poslední b.	F= 0,10; P= 0,99	F= 0,73; P= 0,68	F= 0,14; P= 0,99	F= 0,31; P= 0,97
délka ostnu	F= 0,02; P= 1,00	F= 0,04; P= 0,99	F= 0,36; P= 0,95	F= 0,08; P= 0,99
4-buněčná cenobia				
	vzorek 0	vzorek 1	vzorek 2	vzorek 3
výška buňky	F= 0,10; P= 0,99	F= 0,34; P= 0,96	F= 0,41; P= 0,93	F= 0,26; P= 0,98
šířka buňky	F= 0,25; P= 0,98	F= 0,30; P= 0,97	F= 0,41; P= 0,92	F= 0,57; P= 0,81
šířka cenobia	F= 0,13; P= 0,99	F= 0,08; P= 0,99	F= 0,27; P= 0,98	F= 0,76; P= 0,65
rozpětí ostnů jedné buňky	F= 0,28; P= 0,97	F= 0,29; P= 0,97	F= 0,36; P= 0,95	F= 1,05; P= 0,39
rozpětí ostnů první a poslední b.	F= 0,09; P= 0,99	F= 0,32; P= 0,96	F= 0,16; P= 0,99	F= 0,76; P= 0,65
délka ostnu	F= 0,01; P= 1,00	F= 0,02; P= 1,00	F= 0,08; P= 0,99	F= 0,04; P=0,99

5 Diskuse

Scenedesmaceae jsou jednou z nejhojněji využívaných skupin řas ke sledování projevů vlivu těžkých kovů. Během četných průzkumů byly zaznamenány různorodé odpovědi řas na toxické účinky těžkých kovů (např. Corradi et al., 1995; Abd-El-Monem et al., 1998; Pawlik-Skowrońska, 2003; Peña-Castro et al., 2004; Güçlü et Ertan, 2012; Chia et al., 2015). Vliv těžkých kovů nebyl dosud sledován jen s ohledem na změny ve fenotypu, z tohoto hlediska se jednalo zejména o projevy rozpadavosti cenobií (např. Peña-Castro et al., 2004; Güçlü et Ertan, 2012; Chia et Musa, 2014), studovány byly i dopady na fotosyntézu (Abd-El-Monem et al., 1998; Peña-Castro et al., 2004; Afkar et al. (2010), způsob reprodukce (Corradi et al., 1995; Příbyl et Cepák, 2005) či růstovou rychlost (Afkar et al., 2010; Monteiro et al., 2011; Chia et al., 2015).

V předešlých letech bylo sledováno několik těžkých kovů a jejich vliv na řasy z čeledi Scenedesmaceae (např. Abd-El-Monem et al., 1998; Umysová et al., 2009; Monteiro et al., 2011; Güçlü et Ertan, 2012; Šimíčková, 2012; Ritzová, 2014 nebo Nolčová, 2015). Vliv selenu na kmen řasy *Scenedesmus quadricauda* (dnes *Desmodesmus communis*, revize taxonu Hegewald, 2000) potvrdili Umysová et al. (2009). V práci poukazují na rozdílnou toxicitu užitých forem selenu. Seleničitan (ve formě Na_2SeO_3) vykazoval větší toxický účinek na řasu nežli selenan (v podobě Na_2SeO_4). Tato studie naznačuje, že záleží i na tom, v jakém oxidačním stupni se těžký kov nachází. Např. u chromu, který se nachází ve více oxidačních stupních, bylo zjištěno, že chromité kationty (Cr^{3+}) patří mezi nezbytnou esenciální složku potravy, zatímco kationty chromové (Cr^{6+}) jsou pro organismus škodlivé. Zároveň bylo prokázáno, že nejrizikovější forma chromu, je právě šestimocná (Cervantes et al., 2001). Dále byly studovány vlivy mědi, chromu a kadmia na fenotyp *Scenedesmus incrassatulus* (Peña-Castro et al., 2004). Vliv kadmia a chromu využila ve své studii také Nolčová (2015) u *Desmodesmus armatus* (pozn. jedná se o stejný kmen řasy, který byl využitý i v této studii vlivu mědi a zinku). Obě zmíněné studie vlivu kadmia a chromu potvrdily změny v rozpadavosti cenobií a vliv na velikost některých parametrů řas.

Vliv mědi na *S. incrassatulus* potvrdili Peña-Castro et al. (2004). V průběhu experimentu bylo s rostoucí koncentrací Cu^{2+} zaznamenáno snižování počtu buněk v cenobiích. Řasa v průběhu prvního až čtvrtého dne začala nahrazovat původně 4-buněčná cenobia 2-buněčnými formami, a to až z 65%. Pátý den se v kultuře začaly vyskytovat i

jednobuněčné morfotypy. Sedmý den pak byly jednobuněčné morfotypy v kultuře dominantní a to v 70%. Obdobné závěry poskytují i výsledky této práce. Před započítáním studie byla kultura tvořena 4-buněčnými formami. Po dobu experimentu pak v kontrolní kultuře (tj. bez obsahu těžkého kovu) převládala 4-buněčná cenobia v poměru cca 80 : 20 vůči 2-buněčným formám. Od druhého dne od založení pokusu převládaly dvoubuněčné morfotypy ve všech kulturách kontaminovaných $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ ($2,5 \text{ mg l}^{-1} \text{ Cu}^{2+}$, $6,5 \text{ mg l}^{-1} \text{ Cu}^{2+}$ a $10 \text{ mg l}^{-1} \text{ Cu}^{2+}$). Poměrné zastoupení obou forem bylo přibližně 60 : 40 ve prospěch 2-buněčných cenobií. Během 3. – 6. dne pozorování (19., 20., 21. a 22. 8. 2015), docházelo ve všech kontaminovaných kulturách k dalšímu úbytku 4-buněčných morfotypů a převažovala 2-buněčná cenobia v poměru cca 30 : 70. Od sedmého dne pozorování (24. 8. 2015) převládala 2-buněčná cenobia v poměru asi 80 : 20. Poslední dva dny pozorování (8. – 10. den, 28. 8. 2015 – 30. 8. 2015) dominovala dvoubuněčná cenobia přibližně z 90 %. Výsledky uvedených poměrů morfotypů se v sérii kultur shodovaly s příslušnými kontrolními kulturami. Peña-Castro et al. (2004) zároveň poukázali na fakt, že oproti působení kadmia a chromu nebyl zaznamenán vliv mědi na velikost parametrů (délka a šířka buňky v cenobiu). Z výsledků jejich experimentů je patrné, že se ve všech testovaných koncentracích rozměry buněk přibližně shodovaly s rozměry buněk v kontrolní kultuře. Obdobné závěry platí i pro studovaný kmen *D. armatus* (Tab. 3). Stejně jak ukazuje práce Peña-Castro et al. (2004) poukázali také např. Monteiro et al. (2011) či Nolčová (2015) na rozdílný účinek různých těžkých kovů. Z výsledků práce Monteiro et al. (2011) je patrný výraznější toxický účinek kadmia ve srovnání s dvoumocným zinkem platný pro oba druhy sledované v této práci (*S. obliquus* a *D. pleiomorphus*).

V práci Peña-Castro et al. (2004), byly také pozorovány autospóry *D. incrassatulus*, které se sedmý den pokusu staly dominantní. Dle autorů se pak tyto jednobuněčné formy objevovaly díky přítomnosti dvoumocné mědi v roztoku. V této práci nebyly pozorovány žádné útvary, které by bylo možné považovat za autospóry *D. armatus*. Byla ale pozorována určitá plasticita ve fenotypu některých buněk, resp. tvorba cenobií s atypickým počtem buněk, neobvyklým umístěním a počtem ostnů či neobvyklým tvarem buněk (Příloha 4, 5 a 6) v porovnání se studiemi Trainora (1964, 1966a, 1966b, 1969) či Hindáka (1990). Tato atypická cenobia však netvořila dominantní část kultury, objevovala se spíše výjimečně. Ve studii Peña-Castro et al. (2004) se také ukázalo, že měď má velký vliv na fotosyntetický aparát řasy. Podobně jako ve studii kolektivu autorů Abd-El-Monem

et al. (1998) se buňky staly fluorescenční mikroskopií nedetekovatelné, a to naznačuje, že ztratili svou schopnost být fotosynteticky aktivní, to by pak mohlo naznačovat, proč řasa začala produkovat autospóry. Jak již bylo prokázáno v jiných studiích (Monteiro et al., 2011; Güçlü et Ertan, 2012) vliv stejného těžkého kovu na různé druhy řas může být odlišný. Toto tvrzení podporují i odlišné reakce *D. armatus* a *S. incrassatulus*. Je pravděpodobné, že kmen *D. armatus* použitý v experimentech této diplomové práce je vůči mědi méně citlivý než kmen *S. incrassatulus* studovaný Peña-Castrem et al. (2004). Právě rozdíly ve schopnosti řasy odolávat účinkům těžkého kovu mohly vést k tomu, že během experimentů nedocházelo k tvorbě jednobuněčných forem. Koncentrace měďnatých iontů užitých pro sledování změn ve fenotypu *S. incrassatulus* byly zvoleny tak, aby na řasu neměly letální účinek. Podobné úrovně obsahu těžkého kovu byly použity i v této studii. Stejně tak jako v případě *S. incrassatulus* nebyl zjištěn letální účinek užitých koncentrací kovu na *D. armatus*.

Pro účely této diplomové práce byl k vytvoření prostředí s obsahem dvoumocného zinku využit chlorid zinečnatý, stejně tak jako ve studiích Abd-El-Monem et al. (1998) nebo Monteiro et al. (2011). Z výsledků experimentů Güçlü et Ertan (2012) je patrné, že v případě *D. armatus* docházelo s rostoucí koncentrací dvoumocného zinku ke snižování počtu buněk v cenobiu. V koncentraci $0,25 \text{ mg l}^{-1} \text{ Zn}^{2+}$ docházelo k tvorbě pouze cenobií se čtyřmi buňkami (100% biomasy). V koncentraci $0,5 \text{ mg l}^{-1} \text{ Zn}^{2+}$ byl poměr 4-buněčných cenobií nižší (70%) a množství 2-buněčných morfotypů se zvýšilo na 30%. V koncentracích 1 mg l^{-1} , 2 mg l^{-1} a $4 \text{ mg l}^{-1} \text{ Zn}^{2+}$ se tvořila 2- a 4-buněčná cenobia v poměru 1:1. Z výsledků této studie je patrný podobný trend rozpadu cenobií se zvyšující se koncentrací Zn^{2+} v médiu. V případě této diplomové práce bylo v prvním dnu pozorování procentuální zastoupení cenobií v poměru cca 80 : 20 ve prospěch 4 buněčných cenobií, a to ve všech kontaminovaných kulturách s obsahem ZnCl_2 , i v kultuře bez obsahu zinku. Druhý den pozorování se kultury jevíly podobně jako první den, vyjma kultury s nejvyšší koncentrací $4,5 \text{ mg l}^{-1} \text{ Zn}^{2+}$, kde začínala ubývat 4-buněčná cenobia a začala převládat cenobia 2-buněčná. Od třetího dne pozorování byl sledován úbytek 4-buněčných cenobií, a to již od nejnižší sledované koncentrace $0,5 \text{ mg l}^{-1} \text{ Zn}^{2+}$. V kulturách s koncentrací $0,5 \text{ mg l}^{-1} \text{ Zn}^{2+}$ a $2 \text{ mg l}^{-1} \text{ Zn}^{2+}$ byl poměr čtyřbuněčných a dvoubuněčných cenobií cca 50 : 50. V kulturách o koncentraci $4,5 \text{ mg l}^{-1} \text{ Zn}^{2+}$ se tvořila cenobia cca v poměru 40 : 60 ve prospěch dvoubuněčných morfotypů. Od čtvrtého dne pozorování kultury (tj. 1. 8. 2015) docházelo v kulturách o koncentracích $0,5$ a $2 \text{ mg l}^{-1} \text{ Zn}^{2+}$ k dalšímu úbytku 4-buněčných

forem. V kulturách o koncentraci $4,5 \text{ mg l}^{-1} \text{ Zn}^{2+}$ bylo pozorováno přibližně 70% 2-buněčných cenobií. Od čtvrtého dne pozorování kultury (tj. 1. 8. 2015) docházelo v kulturách o koncentracích $0,5$ a $2 \text{ mg l}^{-1} \text{ Zn}^{2+}$ k dalšímu úbytku 4-buněčných forem. V kulturách o koncentraci $4,5 \text{ mg l}^{-1} \text{ Zn}^{2+}$ bylo pozorováno přibližně 70% 2-buněčných cenobií. 5. – 7. den pozorování tj. 2. 8. 2015 – 5. 8. 2015) začínala ve všech kontaminovaných kulturách převládat 2-buněčná cenobia, a to přibližně v poměru 70 : 30. I v dalších dnech docházelo ke snižování poměru 2-buněčných a 4-buněčných forem. V průběhu 8. – 10. dne pozorování již dominovaly 2-buněčné formy v poměru 80 : 20 vůči 4-buněčným typům. Kultura bez obsahu těžkého kovu nevykazovala žádné změny počtu buněk v cenobiu v porovnání s prvním dnem experimentu. Stejně výsledky, jak byly popsány výše, vykazovala také kontrolní řada kultur. Güçlü et Ertan (2012) uvádí, že odpovědi řas na toxicitu zinku se mohou lišit v závislosti na vybraném zkoumaném druhu. Fenotypová plasticita se projevila u jimi zkoumaných kmenů *Acutodesmus obliquus* a *Desmodesmus armatus*, ale nebyla pozorována u řasy *D. subspicatus*, u které nedošlo ke snížení počtu buněk v cenobiu. V případě *A. obliquus* a *D. armatus* se počet buněk v cenobiu snižoval s rostoucí koncentrací zinku v médiu. Stejně tak se počet buněk v cenobiu snižoval v této práci v případě *D. armatus*.

Cílem této studie bylo také v průběhu celého experimentu monitorovat předem stanovené parametry kmene *Desmodesmus armatus* (Obr. 1). Účinky těžkých kovů byly většinou sledovány souběžně s dalšími látkami ve vzorku (např. Chia et Musa, 2014; Chia et al., 2015) nebo byly studie vlivu těžkých kovů zaměřeny schopnost daného kmene odebírat těžké kovy z prostředí (např. Chong et al., 2000; Omar, 2002; Mehta et Gaur, 2005; Afkar et al., 2010; Monteiro et al., 2011; Güçlü et Ertan, 2012). Z toho důvodu je obtížné porovnávat výsledky této práce s výsledky dalších studií, jelikož existuje málo výzkumů zabývajících se primárně sledováním změn v rozměrech buněk či cenobií působením dvoumocného zinku na fenotypovou plasticitu řas z čeledi Scenedesmaceae. Výsledky této práce ukázaly, že v případě 4-buněčných cenobií nedošlo k signifikantním změnám sledovaných parametrů tzn., že nebyl zjištěn významný vliv zinku ani v jedné z použitých koncentrací na ani jeden ze sledovaných plastických znaků (Tab. 2). Porovnávány byly i hodnoty jednotlivých plastických znaků mezi koncentračními řadami 0 – 3 (tj. kulturou bez obsahu zinku a koncentracemi $0,5$; 2 a $4,5 \text{ mg l}^{-1} \text{ Zn}^{2+}$). Sledované plastické znaky se mezi jednotlivými koncentracemi v případě 4-buněčných cenobií nelišily ($P > 0,05$). V případě 2-buněčných cenobií nedošlo k signifikantním změnám

sledovaných parametrů (viz Obr. 1), pouze ale v jednom případě a to ve vzorku 1, 2 a 3, a to při osmém dni pozorování byla naměřena významně širší cenobia (viz Tab. 2). Konkrétní hodnoty pro vzorek 1 (vzorek 1 – s koncentrací zinku $0,5 \text{ mg l}^{-1}$) byly $F = 6,82$ a $P = 0,00$, pro vzorek 2 (vzorek 2 – s koncentrací zinku 2 mg l^{-1}) byly $F = 5,7$ a $P = 0,00$ a pro vzorek 3 (vzorek 3 – s koncentrací zinku $4,5 \text{ mg l}^{-1}$) byly hodnoty $F = 5,89$ a $P = 0,00$. Dále byly i u 2-buněčných cenobií porovnávány hodnoty jednotlivých plastických znaků mezi koncentračními řadami 0 – 3 (tj. kulturou bez obsahu zinku a koncentracemi $0,5$; 2 a $4,5 \text{ mg l}^{-1} \text{ Zn}^{2+}$). Sledované plastické znaky se mezi jednotlivými koncentracemi v případě 2-buněčných cenobií ($P > 0,05$) nelišily, kromě šířky cenobia, a to v rámci 8. měření, kdy byla zjištěna signifikantně menší šířka cenobia v kultuře bez obsahu těžkého kovu ($F = 3,68$; $P = 0,012$, viz obr. 2). Tento jev nelze nijak logicky zdůvodnit. Zřejmě došlo k technické chybě či chybě při měření sledovaných parametrů, jelikož další dny měření, měla řasa stejné rozměry jako před osmým měřením. Vzhledem k předpokladu chyby v měření v průběhu 8. dne je možné konstatovat, že v průběhu pokusu neměly zinečnaté kationty vliv na sledované parametry řasy *Desmodesmus armatus*.

V průběhu experimentu byla zaznamenána atypická cenobia, tj. cenobia s neobvyklým tvarem a umístěním ostnů ve srovnání s popisy Trainora (1966a, b, 1969, 1992), Trainora et Egana, (1990a, b) a Hindáka (1990), viz Příloha 3. Tato atypická cenobia nebyla v kultuře zastoupena hojně, jejich výskyt byl spíše výjimečný. Nejhojněji byla tato cenobia zastoupena ve vzorku s nejvyšší sledovanou koncentrací zinečnatých iontů ($4,5 \text{ mg l}^{-1} \text{ Zn}^{2+}$). V kontrolní kultuře bez obsahu těžkého kovu nebyly pozorovány žádné atypické fenotypy. Z toho je možné usuzovat, že atypické morfotypy se tvoří v důsledku přítomnosti zinečnatých kationtů v médiu.

Güçlü et Ertan (2012) uvádí, že odpovědi řas na toxicitu zinku se mohou lišit v závislosti na vybraném zkoumaném druhu. Dle autorů tak druh *D. armatus* může být považován za dobrý model pro testování toxicity. *Desmodesmus armatus* se tak jeví jako taxon velmi citlivý na přítomnost zinečnatých iontů v prostředí. Dle metodiky Güçlü et Ertana (2012) autoři využili takové koncentrace zinku, které by se mohly vyskytovat v životním prostředí. V závěru své práce autoři navrhli, aby byl počet buněk v cenobiu dále zkoumán jako potenciální nástroj pro programy environmentálního monitorování, zejména pro ty, kteří se zaměřují na zjišťování chronické kontaminace. Nicméně tato studie ukazuje, že ačkoli *D. subspicatus* nevykazoval žádnou míru plasticity, měl procentuálně nejvyšší schopnost odstranit zinek z prostředí (40%). Naopak druh *D. armatus*, který

vykazoval vysokou míru plasticity, prokázal nejnižší schopnost odstranit zinečnaté kationty ze vzorku (18%).

Na základě výsledků Güçlü et Ertana (2012) byla stanovena hypotéza pro tuto práci: působením dvoumocného zinku se bude počet buněk v cenobiu řasy *D. armatus* snižovat. Se zvyšující se koncentrací dvoumocného zinku v médiu bude klesat počet buněk v jednotlivých cenobiích. Výsledky této práce tak obě části této hypotézy víceméně potvrdili, jelikož byl sledován podobný trend rozpadu cenobií se zvyšující se koncentrací Zn^{2+} v médiu.

Při porovnání výsledků práce s výsledky studie Peña-Castro et al. (2004), byla z části potvrzena hypotéza týkající se vlivu měďnatých iontů na fenotyp *D. armatus*. Působením dvoumocné mědi se počet buněk v cenobiu zelené řasy *Desmodesmus armatus* snižoval. Ovšem na rozdíl od výsledků studie Peña-Castro et al. (2004), druhá část hypotézy potvrzena nebyla. Vzhledem k publikovaným výsledkům ve studii Peña-Castro et al. (2004) existoval předpoklad, že se zvyšující se koncentrací dvoumocné mědi v médiu bude klesat počet buněk v cenobiích. Toto ovšem neplatilo pro kmen využitý v této diplomové práci, jelikož dvoubuněčná cenobia převládala ve všech pokusných kulturách bez rozdílu koncentrace Cu^{2+} v médiu. Během studie Peña-Castro et al. (2004), byly při sledování vlivu dvoumocné mědi na *D. armatus* zaznamenávány i rozměry buněk, které se ve všech testovaných koncentracích přibližně shodovaly s rozměry buněk kontrolního média. Na základě těchto výsledků byla vytvořena další hypotéza: „vlivem dvoumocné mědi se velikost buněk v jednotlivých cenobiích řasy *Desmodesmus armatus* nezmění“. Ani v této práci se sledované parametry řasy *Desmodesmus armatus* nezměnily. Výsledky tak druhou hypotézu zcela potvrdily, jelikož ani v jednom sledovaném parametru nedošlo k signifikantním změnám jak u 4-buněčných, tak u 2-buněčných cenobií řasy *D. armatus*.

6 Závěr

Úkolem této diplomové práce bylo zjistit, jaký vliv mají vybrané těžké kovy na fenotypovou plasticitu kmene sladkovodní zelené řasy *Desmodesmus armatus* za předem stanovených podmínek kultivace v laboratoři. Výsledky experimentu vlivu zinečnatých kationtů v prostředí obě části hypotézy víceméně potvrdili, jelikož byl sledován podobný trend rozpadu cenobií se zvyšující se koncentrací Zn^{2+} v médiu. Výsledky experimentu vlivu měďnatých kationtů na řasu *D. armatus* víceméně potvrdili předem stanovené hypotézy. Působením dvoumocné mědi se počet buněk v cenobiu zelené řasy *D. armatus* snižoval. Druhá část hypotézy potvrzena nebyla, jelikož dvoubuněčná cenobia převládala ve všech pokusných kulturách bez rozdílu koncentrace měďnatých kationtů v médiu. Potvrzena byla i druhá hypotéza, jelikož výsledky této práce neukázaly na změnu sledovaných parametrů *D. armatus*.

Do současné doby byly provedeny mnohé výzkumy, které potvrzují, že těžké kovy a obecně toxiny ovlivňují fenotyp různých organismů včetně řasových zástupců různých taxonomických skupin. Těžké kovy jsou nebezpečné mimo jiné i v tom, že se akumulují v organismech a stávají se tak součástí potravního řetězce. V bazální části potravní pyramidy jsou právě i řasy. Hromadění těžkých kovů v organismech může mít pro konzumenty vyšších řádů, tedy i člověka, fatální důsledky (Sa'idi, 2010; Pandey et Madhuri, 2014). Dle určitých změn ve fenotypu řas je možné usuzovat na odolnost organismů vůči působení toxinů. Tyto poznatky je dále možno využívat např. v ekologické rovině v procesech remediace. V posledních letech vzrůstá potřeba odstranění toxických látek z prostředí. Proto byly publikovány četné způsoby bioremediace a další možné alternativní cesty odstranění těžkých kovů z prostředí, jedním z nich může být např. fykoremediace. Řasy tak mohou sloužit jako levný a efektivní prostředek k odebírání toxických látek ze znečištěného vodního prostředí (Ahluwalia et Goyal, 2007).

Smyslem diplomové práce bylo shrnout vědomosti a poznatky z odborné literatury zaměřené na problematiku fenotypové plasticity různých skupin organismů, především řas. Výsledky této práce přináší unikátní poznatky, které mohou rozšířit znalosti o tom, jak reaguje kmen chlorokokální řasy *D. armatus* na přítomnost zinečnatých a měďnatých kationtů v prostředí a naznačují její odolnost vůči působení užitých koncentrací obou sledovaných kovů.

7 Resumé

Cílem diplomové práce bylo sledovat vliv dvou vybraných těžkých kovů – zinku a mědi na fenotyp sladkovodní zelené řasy *Desmodesmus armatus* v laboratorních podmínkách. V průběhu experimentu byly sledovány a zdokumentovávány reakce předem stanovených parametrů cenobia, a to: šířka a výška jedné buňky v cenobiu, šířka celého cenobia, rozpětí ostnů v rámci jedné krajní buňky, rozpětí ostnů mezi krajními buňkami a délka ostnů. Všechna data byla statisticky zpracována a vyhodnocena. Výsledky naznačují, že působením zinečnatých i měďnatých iontů docházelo ke snížení počtu buněk v cenobiu. Použité koncentrace dvoumocného zinku i dvoumocné mědi neměly vliv na změnu parametrů buněk a cenobia *D. armatus*.

Klíčová slova:

Desmodesmus armatus, fenotypová plasticita, měď, Scenedesmaceae, těžké kovy, zinek

The aims of this master thesis were to observe the influence of two heavy metals – zinc and copper on the phenotype of the freshwater green alga *Desmodesmus armatus* in laboratory conditions. During the experiment, predefined coenobial parameters were monitored and also documented: the cell width and cell height, the width of the entire coenobium, the spine span on the same coenobium cell, the spine span between two periferic cells and the length of a spine. All the data were statistically processed and evaluated, too. The results pointed out to the facts that the presence of zinc and copper ions in the culture medium reduced the number of cells in the coenobium. The influence of divalent zinc and divalent copper on cell and coenobial parameters of *D. armatus* was not observed.

Keywords:

Copper, *Desmodesmus armatus*, heavy metals, Scenedesmaceae, phenotypic plasticity, zinc

8 Literatura

- ABD-EL-MONEM, H.M., CORRADI, M.G. et GORBI, G. 2015. Toxicity of copper and zinc to two strains of *Scenedesmus acutus* having different sensitivity to chromium. – *Environmental and Experimental Botany* **40**: 59–66.
- AFKAR, E., ABABNA, H. et FATHI A.A. 2010. Toxicological response of the green alga *Chlorella vulgaris* to some heavy metals. – *American Journal of Environmental Sciences* **6**(3): 230–237.
- AGGARWAL, A. 2014. Textbook of forensic medicine and toxicology. – *Publishing Company* **15**: 630–647.
- AGRAWAL, A.A. 2001. Phenotypic plasticity in the interactions and evolution of species. – *Science* **294**: 321–325.
- AGRAWAL, B.K. 2007. Phenotypic plasticity in aphids (Homoptera: Insecta): Components of variation and causative factors. – *Current Science* **93**: 308–313.
- AHLUWALIA, S.S. et GOYAL, D. 2007. Microbial and plant derived biomass for removal of heavy metals from wastewater. – *Bioresource Technology* **98**(12): 2243–2257.
- AJAYAN, K.V. et SELVARAJU, M. 2012. Heavy metal induced antioxidant defense system of green microalgae and its effective role in phycoremediation of tannery effluent. – *Pakistan Journal of Biological Sciences* **15**(22): 1056–1062.
- AKTAN, Y., LUGLIÉ, A. et SECHI, N. 2009. Morphological plasticity of dominant species in response to nutrients dynamics in Bidighinzu reservoir of Sardinia, Italy. – *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Science* **9**: 137–144.
- AL-HOMAIDAN, A.A., AL-GHANAYEM, A. et ALKHALIFA, A.H. 2011. Green algae as bioindicators of heavy metal pollution in Wadi hanifah stream, Riyadh, Saudi Arabia. – *International Journal of Water Resources and Arid Environments* **1**(1): 10–15.
- ALPERT, P. et SIMMS E.L. 2002. The relative advantages of plasticity and fixity in different environments: When is it good for a plant to adjust? – *Evolutionary Ecology* **16**: 285–297.

- AN, S.S., FRIEDL, T. et HEGEWALD, E. 1999. Phylogenetic relationships of *Scenedesmus* and *Scenedesmus*-like coccoid green algae as inferred from ITS-2 rDNA sequence comparisons. – *Plant Biology* **1**: 418–428.
- ANANTHAKRISHNAN, T.N. et WHITMAN E.D. 2005. Insect phenotypic plasticity: Diversity of responses. – *Science Publishers* **10**: 1–63.
- ANANTHARAJ, K., GOVINDASAMY, C., NATANAMURUGARAJ G. et JEYACHANDRAN S. 2011. Effect of heavy metals on marine diatom *Amphora coffeaeformis* (Agardh. Kutz). – *Global Journal of Environmental Research* **5**(3): 112–117.
- ANNAPURNA, C. et SINGH, J.S. 2003. Phenotypic plasticity and plant invasiveness: Case study of congress grass. – *Current Science* **85**: 197–201.
- AZZARELLO, M.Y. et VAN VLEET, E.S., 1987. Marine birds and plastic pollution. – *Marine Ecology Progress Series*. **37**: 295–303.
- BAKER, H.G. 1974. The evolution of weeds. – *Annual Review of Ecology and Systematics* **5**: 1–24.
- BÁSCIK-REMISIEWICZ, A. TOMASZEWSKA, E., LABUDA, K. et TUKAJ, Z. 2009. The effect of Zn and Mn on the toxicity of Cd to the green microalga *Desmodesmus armatus* cultured at ambient and elevated (2%) CO₂ concentrations. – *Polish Journal of Environmental Studies* **18**: 775–780.
- BAYOH, M.N. et LINDSAY S.W. 2004. Temperature-related duration of aquatic stages of the Afrotropical malaria vector mosquito *Anopheles gambiae* in the laboratory. – *Medical and veterinary entomology* **18**:174–179.
- BENARD, M.F. 2004. Predator-induced phenotypic plasticity in organisms with complex life histories. – *Annual Review of Ecology and Systematics* **35**: 651–673.
- BENCKO, V., CIKRT, M. et LENER, J. 1995. Toxické kovy v životním a pracovním prostředí člověka. – *Grada, Praha*. 1–288.
- BERRIGAN, D. et SCHEINER S.M. 2004. Modeling the evolution of phenotypic plasticity. 82–97. – In DEWITT, T.J. et SCHEINER, S.M. (eds.). Phenotypic plasticity. – *Oxford University Press, Oxford*.
- BOLD, H.C. et WYNNE, M.J., 1985. Introduction to the algae. Structure and reproduction. Englewood Cliffs. New Jersey, Prentice-Hall. 1–720.
- BRADSHAW, A.D. 1965. Evolutionary significance of phenotypic plasticity in plants. – *Advances in Genetics* **13**: 115–155.

- BRADSHAW, A.D. 1973. Environment and phenotypic plasticity. – *Brookhaven Symposia in Biology* **25**: 75–94.
- BRAKEFIELD, P.M. et REITSMA, N. 1991. Phenotypic plasticity, seasonal climate and the population biology of *Bicyclus* butterflies (Satyridae) in Malawi. – *Ecological Entomology* **16**: 291–303.
- BRODY, H. M. 2004. Phenotypic plasticity: functional and conceptual approaches. – *Oxford University Press*, Oxford, U.K. 1–247.
- BRÖNMARK, C. et HANSSON, L.A. 2005. The biology of lakes and ponds. – *Oxford University Press*, New York. 1–596.
- BUČKOVÁ, M. 2013. Fenotypová plasticita zelené řasy *Desmodesmus communis* vyvolaná změnami pH, teploty a množstvím živin v prostředí. – *MS, Diplomová práce, Západočeská univerzita v Plzni*, 1–89. Plzeň.
- BÜDENBENDER, J., RIEBESELL, U. et FORM, A. 2011. Calcification of the arctic coralline algae *Lithothamnion glaciale* in response to elevated CO₂. – *Marine Ecology Progress Series* **44**: 79–87.
- BURNS J.H. et WINN A.A. 2006. A comparison of plastic responses to competition by invasive and non-invasive congeners in the Commelinaceae. – *Biological Invasions* **8**: 797–807.
- CAIN, J.R., PASCHAL, D.C. et HAYDEN, C.M. 1980. Toxicity and bioaccumulation of cadmium in the colonial green alga *Scenedesmus obliquus*. – *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **9**: 9–16.
- CARFAGNA, S., LANZA, N., SALBITANI, G., BASILE, A., SORBO, S. et VONA, V. 2013. Physiological and morphological responses of lead or cadmium exposed *Chlorella sorokiniana* 211-8K (Chlorophyceae). – *SpringerPlus* **2**(1): 1–147.
- CAVICCHI, S., GUERRA, D., GIORGI, G. et PEZZOLI, C. 1985. Temperature-related divergence in experimental populations of *Drosophila melanogaster*. I. Genetic and developmental basis of wing size and shape variation. – *Genetics* **109**(4): 665–689.
- CERVANTES, C., CAMPOS-GARCÍA, J., DEVARS, S., GUTIÉRREZ-CORONA, F., LOZA-TAVERA, H., TORRES-GUZMÁN, J.C. et MORENO-SÁNCHEZ, R. 2001. Interactions of chromium with microorganisms and plants. – *FEMS Microbiology Reviews* **25**: 335–347.
- COLLARD, M. et LYCETT, S.J. 2008. Does phenotypic plasticity confound attempts to identify hominin fossil species? – *Folia Primatologia* **79**: 111–122.

- CORRADI, M.G., GORBI, G. et BASSI, M. 1995. Hexavalent chromium induces gametogenesis in the freshwater alga *Scenedesmus acutus*. – *Ecotoxicology and Environmental Safety* **30**: 106–110.
- COSSINS, A., FRASER, J., HUGHES, M. et GRACEY, A. 2006. Post-genomic approaches to understanding the mechanisms of environmentally induced phenotypic plasticity. – *The Journal of Experimental Biology* **209**: 2328–2336.
- COSTA, A.C.A. et FRANÇA, F.P. 2003. Cadmium interaction with microalgal cells, cyanobacterial cells, and seaweeds: toxicology and biotechnological potential for wastewater treatment. – *Marine Biotechnology* **5**: 149–156.
- CZESAK, M.E., FOX, C.W. et WOLF, J.B. 2006. Experimental evolution of phenotypic plasticity: how predictive are cross-environment genetic correlations? – *The American Naturalist* **168**: 323–335.
- ČERNÁ, K. et NEUSTUPA, J. 2010. The pH-related morphological variations of two acidophilic species of *Desmidiaceae* (Viridiplantae) isolated from a lowland peat bog, Czech republic. – *Aquatic Ecology* **44**: 409–419.
- DAVERAT, F., LIMBURG, K.E., THIBAUT, I., SHIAO, J.C., DODSON, J.J., CARON, F., TZENG, W.N., IIZUKA, Y. et WICKSTRÖM, H. 2006. Phenotypic plasticity of habitat use by three temperate eel species *Anguilla anguilla*, *A. japonica* and *A. rostrata*. – *Marine Ecology Progress Series* **308**: 231–241.
- DAY, T., PRITCHARD, J. et SCHLUTER, D. 1994. Ecology and genetics of phenotypic plasticity: A comparison of two sticklebacks. – *Evolution* **48**: 1723–1734.
- DEBAT, V. et DAVID, P. 2001. Mapping phenotypes: canalization, plasticity and developmental stability. – *Trends in Ecology & Evolution* **16**: 555–561.
- DE JONG, G. et BIJMA, P. 2002. Selection and phenotypic plasticity in evolutionary biology and animal breeding. – *Livestock Production Science* **78**: 195–214.
- DE JONG, G. 2005. Evolution of phenotypic plasticity: Patterns of plasticity and the emergence of ecotypes. – *New Phytologist* **166** (1): 101–117.
- DOBŘÁ, L. 2013. Fenotypová plasticita *Desmodesmus communis* vyvolaná turbulencí a přítomností predátorů v prostředí. – *MS, Diplomová práce, Západočeská univerzita v Plzni*, 1–72. Plzeň.
- DONEY, S.C., FABRY, V.J., FEELY, R.A. et KLEYPAS, J.A. 2009. Ocean acidification: The other CO₂ problem. – *Annual Review of Marine Science* **1**: 169–192.

- DUFFUS, J.H. 2002. Heavy metals a meaningless term? – *Pure and Applied Chemistry*. **74**(5): 793–807.
- EGAN, P.F., et TRAINOR, F.,R. 1989. The role of unicells in the polymorphic *Scenedesmus armatus* (Chlorophyceae). – *Journal of Phycology* **25**: 65–70.
- EGAN, P.F. et TRAINOR, F.R. 1991. Phenotypic plasticity in *Scenedesmus communis* Hegew. (Chlorophyceae). II. Examples of algal cyclo- and noncyclomorphosis. – *American Journal of Botany* **78**(1): 37–52.
- FINCH, L.E., HILLYER, M.M. et LEOPOLD, M.C. 2015. Quantitative analysis of heavy metals in children's toys and jewelry: A multi-instrument multitechnique exercise in analytical chemistry and public health. – *Journal of Chemical Education* **92**(5): 849–854.
- FRANKLIN, R.B. et COSTELLO, L.C. 2009. The important role of the apoptotic effects of zinc in the development of cancers. – *Journal of Cellular Biochemistry* **106**: 750–757.
- FREEMAN, S. et HERRON, J.C. 2007. Evolutionary analysis. – *Pearson Prentice Hall*. 1–800.
- FUTUYMA, D.J. 1998. How stress selects for reversible phenotypic plasticity. – *Journal of Evolutionary Biology* **18**: 873–883.
- GHADOUANI, A. et PINEL-ALLOUL, B. 2002. Phenotypic plasticity in *Daphnia pulicaria* as an adaptation to high biomass of colonial and filamentous cyanobacteria: Experimental evidence. – *Journal of Plankton Research* **24**(10): 1047–1056.
- GIANOLI, E. et GONZÁLEZ-TEUBER, M. 2005. Environmental heterogeneity and population differentiation in plasticity to drought in *Convolvulus chilensis* (Convolvulaceae). – *Evolutionary Ecology* **19**: 603–613.
- GILONI-LIMA, P.C., DELELLO, D., CREMONEZ, M.L.M., ÉLER, M.N., LIMA, V.A. et ESPÍNDOLA, E.L.G. 2012. Assessment of chromium bioaccumulation in *Pseudokirchneriella subcapitata* (Korshikov) Hindak by the Central Composite Design (CCD) and Response Surface Methodology (RSM). – *Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology* **7**(2): 43–50.
- GOLDBERG, T., NEVO, E. et DEGANI, G. 2012. Phenotypic plasticity in larval development of six amphibian species in stressful natural environments. – *Zoological studies* **51**(3): 345–361.

- GORBI, G., TORRICELLI, E., PAWLIK-SKOWRONSKA, B., DI TOPPI, L.S., ZANNI, C. et CORRADI, M.G. 2006. Differential responses to Cr(VI)-induced oxidative stress between Cr-tolerant and wild-type strains of *Scenedesmus acutus* (Chlorophyceae). – *Aquatic Toxicology* **79**: 132–139.
- GREENWOOD, N.N. et EARNSHAW, A. 1984. Chemistry of the elements – *Pergamon Press* **44**: 287–301.
- GUAYASAMIN, J., KRYNAK, T., KRYNAK, K., CULEBRAS, J. et HUTTER, C. 2015. Phenotypic plasticity raises questions for taxonomically important traits: a remarkable new Andean rainfrog (*Pristimantis*) with the ability to change skin texture. – *Zoological Journal of the Linnean Society* **173** (4): 913–928.
- GÜÇLÜ, Z. et ERTAN, Ö.O. 2012. Toxicity and removal of zinc in the three species (*Acutodesmus obliquus*, *Desmodesmus subspicatus* and *Desmodesmus armatus*) belonging to the family, Scenedesmaceae (Chlorophyta). – *Turkish Journal of Fisheries and aquatic Sciences* **12**: 309–314.
- HASTWELL, G.T. et PANETTA F.D. 2005. Can differential responses to nutrients explain the success of environmental weeds? – *Journal of Vegetation Science* **16**: 77–84.
- HARVEY, P.J., HANDLEY, H.K. et TAYLOR, M.P. 2015. Identification of the sources of metal (lead) contamination in drinking waters in north-eastern Tasmania using lead isotopic compositions. – *Environmental Science and Pollution Research* **22**: 12276–12288.
- HEGEWALD, E. 2000. New combinations in the genus *Desmodesmus* (Chlorophyceae, Scenedesmaceae). – *Algological Studies/Archiv für Hydrobiologie, Supplement Volumes* **96**: 1–18.
- HEGEWALD, E. et HANAGATA, N. 2000. Phylogenetic studies on Scenedesmaceae (Chlorophyta). – *Algological Studies* **100**: 29–49.
- HECHT, S., BALDWIN, D.H., MEBANE, C., HAWKES, T., GROSS, S.J. et SCHOLZ, N.L. 2007. An overview of sensory effects on juvenile salmonids exposed to dissolved copper: Applying a benchmark concentration approach to evaluate sublethal neurobehavioral toxicity. – *National Marine Fisheries Service* **83**: 1–45.
- HENDRY, A.P., FARRUGIA, T.J. et KINNISON, M.T. 2008. Human influences on rates of phenotypic change in wild animal populations. – *Molecular Ecology* **17**: 20–29.

- HESSEN, D.O. et VAN DONK, E. 1993. Morphological changes in *Scenedesmus* induced by substances released from *Daphnia*. – *Archiv für Hydrobiologie* **127**: 129–140.
- HINDÁK, F. 1990. Studies on the Chlorococcal algae (Chlorophyceae). V. – Veda, 1–220. Bratislava.
- HIYAMA, A., TAIRA, W. et OTAKI, J.M. 2012. Color-pattern evolution in response to environmental stress in butterflies. – *Frontiers in Genetics*, **3**: 1–15.
- HOWE, G. et MERCHANT, S. 1992. Heavy metal-activated synthesis of peptides in *Chlamydomonas reinhardtii*. – *Plant Physiology* **98**: 127–136.
- HOWELL, N., LAVERS, J., PATERSON, D., GARRETT, R. et BANATI, R. 2012. Trace metal distribution in feathers from migratory, pelagic birds. – *Australian Nuclear Science and Technology Organisation*. [online]. [cit. 2016-10-03] Dostupný z [www: <http://www.ansto.gov.au/AboutANSTO/MediaCentre/News/ACS013097>](http://www.ansto.gov.au/AboutANSTO/MediaCentre/News/ACS013097).
- CHAPMAN, G. 1978. Toxicities of cadmium, copper, and zinc to four juvenile stages of chinook salmon and steelhead. – *Transactions of the American Fisheries Society* **107**(6): 841–847.
- CHIA, M.A. et MUSA, R.I. 2014. Effect of indigo dye effluent on the growth, biomass production and phenotypic plasticity of *Scenedesmus quadricauda* (Chlorococcales). – *Anais da Academia Brasileira de Ciências* **86**(1): 419–428.
- CHIA, M.A., GALADIMA, S.Y. et JAPHET, W.S. 2015. Combined effect of atrazine and copper on the growth, biomass production, morphology and antioxidant response of *Scenedesmus quadricauda*. – *Phycologia* **54**(2): 109–117.
- CHONG, A.M.Y., WONG, Y.S. et TAM, N.F.Y. 2000. Performance of different microalgal species in removing nickel and zinc from industrial wastewater. – *Chemosphere* **41**: 251–257.
- IWATA, M., TAIRA, W., HIYAMA, A. et OTAKI, J.M. 2015. The lycaenid central symmetry system: Color pattern analysis of the pale grass blue butterfly *Zizeeria maha*. – *Zoological Science* **3**: 233–239.
- JASSO-CHÁVEZ, R., PACHECO-ROSALES, A., LIRA-SILVA, E., GALLARDO-PÉREZ, J.C., GARCÍA, N. et MORENO-SÁNCHEZ, R. 2010. Toxic effects of Cr(VI) and Cr(III) on energy metabolism of heterotrophic *Euglena gracilis*. – *Aquatic Toxicology* **100**: 329–338.

- JOJMSTONE, J.M. 1978. Phenotypic plasticity in *Draparnaldia* (Chlorophyta: Chaetophoraceae). I. Effects of the chemical environment. – *Journal of Phycology* **14**: 302–308.
- KAPLAN, D. 2013. Absorption and adsorption of heavy metals by microalgae. – In Richmond, A. et Hu, Q. (eds). Handbook of microalgal culture: Applied phycology and biotechnology, Second Edition. – *John Wiley & Sons, Ltd.*, 602–611. Oxford, UK.
- KHAN, M.A. et BRADSHAW, A.D. 1976. Adaptation to heterogeneous environments. II. Phenotypic plasticity in response to spacing in *Linum*. – *Australian Journal of Agricultural Research* **27**: 519–31.
- KHAN, M. A., ANTONOVICS, J. et BRADSHAW, A.D. 1976. Adaptation to heterogeneous environments. III. The inheritance of response to spacing in flax and linseed *Linum usitatissimum*. – *Australian Journal of Agricultural Research* **27**: 649–59.
- KVASNIČKOVÁ, D. 2004. Základy ekologie. 3. upravené vydání – *Fortuna* **3**:103. Praha. 1–103.
- LÄMPERT, W., ROTHHAUPT, K.O. et VON ELERT, E. 1994. Chemical induction of colony formation in a green alga (*Scenedesmus acutus*) by grazers (*Daphnia*). – *Limnology and Oceanography* **39**: 1543–1550.
- LAVENS, P. et SORGELOOS, P. 1996. Manual on the production and use of live food for aquaculture. – *FAO Technical Papers* 361, 1–295.
- LI, D.B., ZHANG, W., WANG, L.Q., ZHANG, R.L. et JI, G.H. 2015. Physiological response of *Neocaridina denticulate* to the toxicity of Cu²⁺ and chlorpyrifos. – *Medscape Journal Articles* **36**(2): 727–735.
- LOVEI, M. 1998. Phasing out lead from gasoline: Worldwide experience and policy implications. – *World Bank Technical Paper* **397**.
- LÜRLING, M. 2003. The effect of substances from different zooplankton species and fish on the induction of defensive morphology in the green alga *Scenedesmus obliquus*. – *Journal of Plankton Research* **25**(8): 979–989.
- LÜRLING, M. 2009. Phenotypic plasticity in the green algae *Desmodesmus* and *Scenedesmus* with special reference to the induction of defensive morphology. – *Annales de Limnologie International Journal of Limnology* **39**(2): 85–101.

- MACFIE, S.M., TARMOHAMED, Y. et WELBOURN, P.M. 1994. Effects of cadmium, cobalt, copper and nickel on growth of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*: the influences of the cell wall and pH. – *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **27**: 454–458.
- MAL, T.K. et LOVETT-DOUST, J. 2005. Phenotypic plasticity in vegetative and reproductive traits in an invasive weed, *Lythrum salicaria* (Lythraceae), in response to soil moisture. – *American Journal of Botany* **92**: 819–825.
- MEHTA, S. et GAUR, J. 2005. Use algae for removing heavy metal ions from wastewater: progress and prospects. – *Critical reviews in biotechnology* **25**(3): 113–152.
- MIKLOSI, A. 2007. Dog behaviour, evolution, and cognition. – *Oxford University Press, Chapter 11*: 1–13.
- MONDOR, E.B., ROSENHEIM, J.A. et ADDICOTT, J.F. 2005. Predator-induced transgenerational phenotypic plasticity in the cotton aphid. – *Oecologia* **142**: 104–108.
- MONSER, L. et ADHOUM, N. 2002. Modified activated carbon for removal of copper, zinc, chromium and cyanide from wastewater. – *Separation and Purification Technology* **26**(2): 137–146.
- MONTEIRO, C., CASTRO, P. et MALCATA, F.X. 2011. Capacity of simultaneous removal of zinc and cadmium from contaminated media, by two microalgae isolated from a polluted site. – *Environmental Chemistry Letters* **9**(4): 511–517.
- MORAN, N.A. 1992. The evolutionary maintenance of alternative phenotypes. – *The American Naturalist* **139**: 971–989.
- MOSLEH, Y.Y.I. et MOFEED, J. 2014. Bio-chemical biomarkers in algae *Scenedesmus obliquus* exposed to heavy metals Cd, Cu and Zn. – *Life Science Journal* **11**(10): 995–1004.
- NACORDA, J.O., MARTINEZ-GOSS, M.R., TORRETA, N.K. et MERCA, F.E. 2007. Metal resistance and removal by two strains of the green alga *Chlorella vulgaris* Beijerinck, isolated from Laguna de Bay, Philippines. – *Journal of Applied Phycology* **19**:701–710.
- NEUSTUPA, J., ŠŤASTNÝ, J. et HODAČ, L. 2008. Temperature-related phenotypic plasticity in the green microalga *Micrasterias rotata*. – *Aquatic microbial ecology* **51**: 77–86.

- NICOTRA, A.B., CHAZDON, R.L. et SCHLICHTING, C.D. 1997. Patterns of genotypic variation and phenotypic plasticity of light response in two tropical *Piper* (*Piperaceae*) species. – *American Journal of Botany* **84**(11): 1542–1552.
- NOLČOVÁ, L. 2015. Fenotypová plasticita rodu *Desmodium communis* jako odpověď na stres vyvolaný těžkými kovy. – *MS, Diplomová práce, Západočeská univerzita v Plzni*, 1–76. Plzeň.
- NORTMAN, D. 2003. The evolution of phenotypic plasticity through the Baldwin Effect. – *Noesis* **6**: 1–13.
- OMAR, H.H. 2002. Bioremoval of zinc ions by *Scenedesmus obliquus* and *Scenedesmus quadricauda* and its effect on growth and metabolism. – *International Biodeterioration and Biodegradation* **50**: 95–100.
- OOSTRA, V., DE JONG, M.A., INVERGO, B.M., KESBEKE, F., WENDE, F., BRAKEFIELD, P.M. et ZWAAN, B.J. 2011. Translating environmental gradients into discontinuous reaction norms via hormone signalling in a polyphenic butterfly. – *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **278**: 789–797.
- ORR, J.C., FABRY, V.J., AUMONT, O., BOPP, L., DONEY, S.C. et FEELY, R.A. 2005. Anthropogenic ocean acidification over the twenty-first century and its impact on calcifying organisms. – *Nature* **437**: 681–686.
- OSTRANDER, E.A. et WAYNE, R.K. 2005. The canine genome. – *Genome Research* **15**(12): 1706–1716.
- OTAKI, J.M. 2008. Phenotypic plasticity of wing color patterns revealed by temperature and chemical applications in a nymphalid butterfly *Vanessa indica*. – *Journal of Thermal Biology* **33**: 128–139.
- OTAKI, J. M., HIYAMA, A., IWATA, M., et KUDO, T. 2010. Phenotypic plasticity in the range-margin population of the lycaenid butterfly *Zizeeria maha*. – *Evolutionary Biology* **10**: 252.
- PANDEY, G. et MADHURI, S. 2014. Heavy metals causing toxicity in animals and fishes. – *Research Journal of Animal, Veterinary and Fishery Sciences* **2**(2): 17–23.
- PARKER, I.M., RODRIGUEZ J. et LOIK M.E. 2003. An evolutionary approach to understanding the biology of invasions: local adaptation and general-purpose genotypes in the weed *Verbascum thapsus*. – *Conservation Biology* **17**: 59–72.

- PAWLIK-SKOWROŃSKA, B. 2003. Resistance, accumulation and allocation of zinc in two ecotypes of the green alga *Stigeoclonium tenue* Kütz. coming from habitats of different heavy metal concentrations. – *Aquatic Botany* **57**: 189–198.
- PEÑA-CASTRO, J.M., MARTÍNEZ-JERÓNIMO, F., ESPARZA-GARCÍA, F. et CAÑIZARES-VILLANUEVA, R.O. 2004. Phenotypic plasticity in *Scenedesmus incrassatulus* (Chlorophyceae) in response to heavy metals stress. – *Chemosphere* **57**: 1629–1636.
- PIGLIUCCI, M. 1996. How organisms respond to environmental changes: from phenotypes to molecules (and vice versa). – *Trends in Ecology and Evolution* **11**(4): 168–173.
- PIGLIUCCI, M. 2001. Phenotypic plasticity: Beyond nature and nurture. – *The John Hopkins University Press*, 1–328. Baltimore.
- PIGLIUCCI, M. et BYRD, N. 1998. Genetics and evolution of phenotypic plasticity to nutrient stress in *Arabidopsis*: drift, constraints or selection? – *Biological Journal of the Linnean Society* **64**: 17–40.
- POULIN J., SAKAI A.K., WELLER S.G. et NGUYEN T. 2007. Phenotypic plasticity, precipitation, and invasiveness in the fire-promoting grass *Pennisetum setaceum* (Poaceae). – *American Journal of Botany* **94**: 533–541.
- PRICE, M.H.H. 2013. Sub-lethal metal toxicity effects on salmonids: A review. Report prepared for SkeenaWild Conservation Trust. – *Smithers* **19**: 1–64.
- PRICE, T.D., QVARNSTRÖM, A. et IRWIN, D.E. 2003. The role of phenotypic plasticity in driving genetic evolution. – *Biological Sciences* **270**: 1433–1440.
- PŘIBYL, P. et CEPÁK, V. 2005. Chromium influences growth and cell morphology but itself does not induce gametogenesis in three *Scenedesmus obliquus* strains. – *Czech Phycology* **5**: 91–100.
- RAGAZZOLA, F., FOSTER, L.C., FORM, A.U., BÜSCHER, J., HANSTEEN, T.H. et FIETZKE J. 2013. Phenotypic plasticity of coralline algae in a High CO₂ world. – *Ecology and Evolution* **10**(3): 3436–3446.
- RAIKWAR, M. K., KUMAR, P., SINGH, M. et SINGH, A. 2008. Toxic effect of heavy metals in livestock health. – *Veterinary World* **1**: 28–30.
- RITZOVÁ, Z. 2014. Hodnocení toxických účinků těžkých kovů. – *MS, Bakalářská práce, Ostravská univerzita v Ostravě*, 1–64. Ostrava.

- RUSELL, G. et VELTKAMP, C.J. 1996. Algal ecotypes: what they are and what they are not. – *Nordic Journal of Botany* **17**: 331–336.
- SA'IDI, M. 2010. Experimental studies on effect of heavy metals presence in industrial wastewater on biological treatment. – *International journal of enviromental sciences* **1**(4): 666–676.
- SENGUPTA, A.K. 2002. Environmental separation of heavy metals: engineering processes; principles of heavy metals separation. – *Boca Raton, Lewis Publishers*. 1–14.
- SEXTON, J.P., MCKAY, J.K., et SALA, A. 2002. Plasticity and genetic diversity may allow saltcedar to invade cold climates in North America. – *Ecological Applications* **12**: 1652–1660.
- SHELINE, C.T. et CHOI, D.W. 2004. Toxicity inhibition of mitochondrial dehydrogenases in vitro and in vivo. – *Annals of Neurology* **55**(5): 645–653.
- SHREEVE, T.G. 1987. The mate location behaviour of the male speckled wood butterfly, *Pararge aegeria*, and the effect of phenotypic differences in hind-wing spotting. – *Animal Behavior* **35**: 682–690.
- SCHEINER, S.M. 1993. Genetics and evolution of phenotypic plasticity. – *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics* **24**: 35–68.
- SCHLICHTING, C.D. 1986. The evolution of phenotypic plasticity in plants. – *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics* **17**: 667–693.
- SCHLICHTING, C.D. et LEVIN, D.A. 1988. Phenotypic plasticity in Phlox. I. Wild and cultivated populations of *P. drummondii*. – *American Journal of Botany* **75**: 161–169.
- SCHLICHTING, C.D. et SMITH, H. 2002. Phenotypic plasticity: Linking molecular mechanisms with evolutionary outcomes. – *Evolutionary Ecology* **16**: 189–211.
- SOLARI, C.A., DRESCHER, K., GANGULY, S., KESSLER, J.O., MICHOD, R.E. et GOLDSTEIN, R.E. 2011. Flagellar phenotypic plasticity in volvocalean algae correlates with Péclet number. – *Journal of the Royal Society* **8**: 1409–1417.
- SOLOMON, S.D., MANNING, Q.M., CHEN, Z., MARQUIS, M. et AVERYT. K.B. 2007. Climate Change 2007: The physical science basis. contribution of working group i to the fourth assessment report of the intergovernmental panel of climate change. – *Cambridge University Press, Cambridge*. 1–258.

- STEARNS, S.C. 1989. The evolutionary significance of phenotypic plasticity. – *Bioscience* **39**: 436–445.
- STEARNS, S.C. et KOELLA, J.C. 1986. The evolution of phenotypic plasticity in life-history traits: Predictions of reaction norms for age and size at maturity. – *Evolution* **40**: 893–913.
- STEFFENS, J.C. 1990. The heavy metal-binding peptides of plants. – *Annual review of plant physiology and plant molecular biology* **41**: 553–575.
- STEWART, H.L. 2006. Morphological variation and phenotypic plasticity of buoyancy in the macroalga *Turbinaria ornata* across a barrier reef. – *Marine Biology* **149**: 721–730.
- STRNADOVÁ, N. et MATĚJKOVÁ D. 2006. Adsorption of copper and zinc from aqueous solution on Mg(OH)₂. – *Chemical papers* **100**, 803–808.
- SULTAN, S.E. 2003. Phenotypic plasticity in plants: a case study in ecological development. – *Evolution and development* **5**(1): 25–33.
- SWALE, E.M.F. 1967. A clone of *Scenedesmus* with *Chodatella*-stages. – *British Phycological Bulletin* **3**(2): 281–293.
- ŠIMÍČKOVÁ, M. 2012. Hodnocení akutní toxicity těžkých kovů pomocí testu na řasách *Desmodesmus subspicatus*. – MS, Bakalářská práce, Ostravská univerzita v Ostravě, 1–62. Ostrava.
- TRAINOR, F.R. 1964. The effect of composition of the medium on morphology in *Scenedesmus obliquus*. – *Canadian Journal of Botany* **42**: 515–518.
- TRAINOR, F.R. 1966a. *Scenedesmus* wall ornamentation. I. *Scenedesmus parisiensis* cultures. – *Journal of Phycology* **2**: 85–89.
- TRAINOR, F.R. 1966b. A study of wall ornamentation in cultures of *Scenedesmus*. – *American Journal of Botany* **53**(10): 995–1000.
- TRAINOR, F.R. 1969. *Scenedesmus* morphogenesis. Trace elements and spine formation. – *Journal of Phycology* **5**: 185–190.
- TRAINOR, F.R. 1979. *Scenedesmus* AP 1 (Chlorophyceae): polymorphic in the laboratory but not in the field. – *Phycologia* **18**(3): 273–277.
- TRAINOR, F.R. 1992. Cyclomorphosis in *Scenedesmus armatus* (Chlorophyta): An ordered sequence of ecomorph development. – *Journal of Phycology* **28**: 553–558.

- TRAINOR, F.R. et EGAN, P.F. 1990a. Phenotypic plasticity in *Scenedesmus* (Chlorophyta) with special reference to *S. armatus* unicells. – *Phycologia* **29**(4): 461–469.
- TRAINOR, F.R. et EGAN, P.F. 1990b. The implications of polymorphism for the systematics of *Scenedesmus*. – *British Phycological Journal* **25**: 275–279
- TRAINOR, F.R. et EGAN, P.F. 1991. Discovering the various ecomorphs of *Scenedesmus*: The end of a taxonomic era. – *Archiv fur Protistenkunde* **139**: 125–132.
- TRAINOR, F.R. et HILTON, R.L. 1963. Culture of *Scenedesms longus*. – *Bulletin Of The Torrey Botanical Club* **90**(6): 407–412.
- TRAINOR, F.R. et ROWLAND, H.L. 1968. Control of colony and unicell formation in a synchronized *Scenedesmus*. – *Journal of Phycology* **4**: 310–317.
- TRAINOR, F.R., CAIN, J.R. et SHUBERT, L.E. 1976. Morphology and nutrition of the colonial green alga *Scenedesmus*: 80 Years Later. – *The Botanical Review* **42**(1): 5–25.
- TREMBLAY, Y. 2003. Geographic variation in the foraging behaviour, diet and chick growth of rockhopper penguins. – *Marine Ecology* **251**: 279–297.
- TSARENKO, P.M. et PETLEVANNY, O.A. 2001. Addition to the diversity of algae of Ukraine. – *Algologia*, unnumbered supplement: 1–130.
- TUFTO, J. 2000. The evolution of plasticity and nonplastic spatial and temporal adaptations in the presence of imperfect environmental cues. – *The American Naturalist* **156**: 121–130.
- UMYSOVÁ, D., VÍTOVÁ, M., DOUŠKOVÁ, I., BIŠOVÁ, K., HLAVOVÁ, M., ČÍŽKOVÁ, M., MACHÁT, J., DOUCHA, J. et ZACHLENDER, V. 2009. Bioaccumulation and toxicity of selenium compounds in the green alga *Scenedesmus quadricauda*. – *BMC Plant Biology* **9**: 1–58.
- VAN BUSKIRK, J. 2002. A comparative test of the adaptive plasticity hypothesis: relationships between habitat and phenotype in anuran larvae. – *The American Naturalist* **160**: 87–102.
- VAN KLEUNEN, M. et FISCHER, M. 2005. Constraints on the evolution of adaptive phenotypic plasticity in plants. – *New Phytologist* **166**: 49–60.
- VAN TIENDEREN, P.H. 1997. Generalists, specialists, and the evolution of phenotypic plasticity in sympatric populations of distinct species. – *Evolution* **51**: 1372–1380.
- VÍDEN, I. 2005. Chemie ovzduší. Vyd. 1. – *VSCHT*, 1–98. Praha.

- VISVIKI, I. et RACHLIN, D. 1994. Acute and chronic effect exposure of *Dunaliella salina* and *Chlamydomonas bullosa* to copper and cadmium: effects on ultrastructure. – *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **26**: 154–162.
- WEAVER, M.E. et INGRAM, D.L. 1969. Morphological changes in swine associated with environmental temperature. – *Ecology* **50**(4): 710–713.
- WEISMANN, A. 1875. Studien zur Descendenz-Theorie. I. Ueber den Saison-Dimorphismus der Schmetterlinge. – *Leipzig Engelmann*: 1–93.
[online]. [cit. 2017-04-05] Dostupný z www: <http://vlp.mpiwg-berlin.mpg.de/library/data/lit39349/index_html?pn=1&ws=1.5>.
- WEISMANN, A. 1876. Studien zur Descendenztheorie: II. Über die letzten Ursachen der Transmutationen. – *Leipzig*. [online]. [cit. 2017-04-05] Dostupný z www: <https://archive.org/stream/Weismann1876sc87J/Weismann1876sc87J_djvu.txt>.
- WEST-EBERHARD, M.J. 2003. Developmental plasticity and evolution. – *Oxford University Press*, 1–794. Oxford.
- WHITMAN, D.W. et AGRAWAL, A.A. 2009. What is phenotypic plasticity and why is it important. Pages 1–63 in D. Whitman et T. Ananthkrishnan, (eds.). Phenotypic plasticity of insects: Mechanisms and consequences. – *Science Publishers*, Einfield.
- WHITMAN, D.W. et ANANTHAKRISHNAN, T.N. 2009. Phenotypic plasticity of Insects – Mechanisms and consequence. – *Science Publisher* 1–904.
- WINDIG, J.J., DE KOVEL, C.G.F. et DE JONG, G. 2004. Genetics and mechanics of plasticity. Pp. 31–97 in T. J. DeWitt and S. M. Scheiner (eds.). Phenotypic plasticity: Functional and Conceptual Approaches. – *Oxford University Press*, Oxford.
- WINTERHALTER, W.E. et MOUSSEAU, T.A. 2007. Patterns of phenotypic and genetic variation for the plasticity of diapause incidence. – *Evolution* **61**: 1520–1531.
- WOLTERECK, R. 1909. Weitere experimentelle untersuchungen über Artänderung, speziell über das Wesen quantitativer Artunterschiede bei Daphniden. – *Verhandlungen der deutschen zoologischen Gesellschaft* **19**:110–173.
- YAN, H. et PAN, G. 2000. Toxicity and bioaccumulation of copper in three green microalgal species. – *Chemosphere* **49**: 471–476.
- YANG, Y. et JOERN, A. 1994. Gut size changes in relation to variable food quality and body size in grasshoppers. – *Functional Ecology* **8**: 36–45.

ZHOU, X., TARVER, M.R. et SCHARF, M.E. 2007. Hexamerin-based regulation of juvenile hormone-dependent gene expression underlies phenotypic plasticity in a social insect. – *Development* **134**: 601–610.

9 Seznam příloh

Příloha 1: Fotodokumentace základního fenotypu řasy *Desmodesmus armatus*

Příloha 2: Fotodokumentace základního fenotypu řasy *Desmodesmus armatus*

Příloha 3: Zaznamenaná cenobia s netypickým počtem buněk v cenobiu při pozorování vlivu zinečnatých iontů na řasu *Desmodesmus armatus*

Příloha 4: Zaznamenaná cenobia s netypickým počtem buněk v cenobiu při pozorování vlivu měďnatých iontů na řasu *Desmodesmus armatus*

Příloha 5: Atypická cenobia vyfotografována při pozorování vlivu měďnatých iontů na řasu *Desmodesmus armatus*

Příloha 6: Atypická cenobia vyfotografována při pozorování vlivu měďnatých iontů na řasu *Desmodesmus armatus*

Přílohy

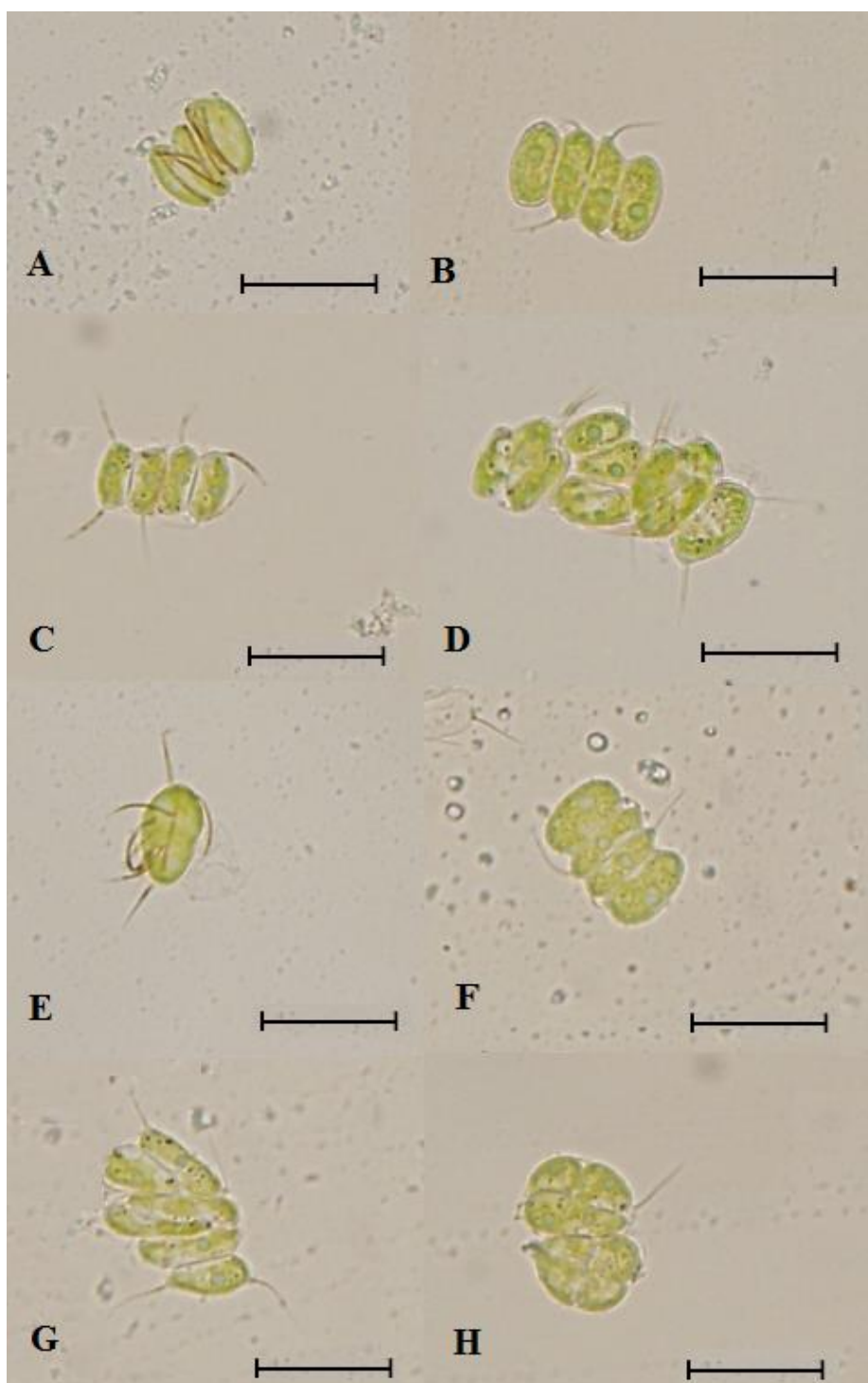
Příloha 1: Fotodokumentace základního fenotypu řasy *Desmodesmus armatus* (fotografie byla pořízena 28. 7. 2015, den před zahájením všech pokusů se zinkem; měřítko = 10 μm).



Příloha 2: Fotodokumentace základního fenotypu řasy *Desmodesmus armatus* (fotografie byla pořízena 16. 8. 2015, den před zahájením všech pokusů s mědí; měřítko = 10 μm).



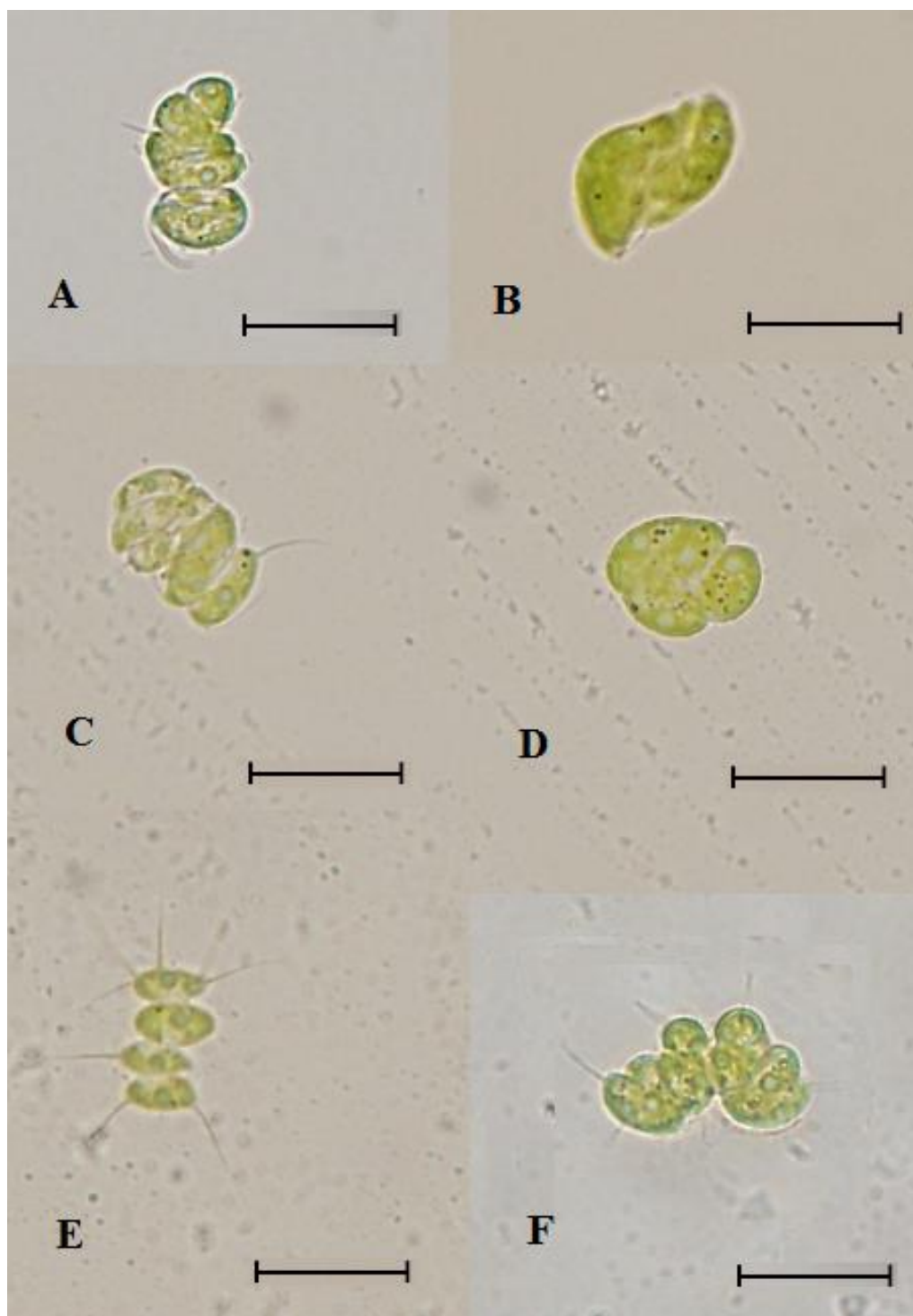
Příloha 3: Zaznamenaná cenobia s netypickým počtem buněk v cenobiu při pozorování vlivu zinečnatých iontů na řasu *Desmodesmus armatus* (A – 31. 7. 2015, koncentrace zinku $4,5 \text{ mg l}^{-1}$, B – 30. 7. 2015, koncentrace zinku 2 mg l^{-1} , C – 2. 8. 2015, koncentrace zinku $4,5 \text{ mg l}^{-1}$, D – 2. 8. 2015, koncentrace zinku $4,5 \text{ mg l}^{-1}$; E – 5. 8. 2015, koncentrace zinku $4,5 \text{ mg l}^{-1}$, F – 7. 8. 2015, koncentrace zinku $0,5 \text{ mg l}^{-1}$, G – 7. 8. 2015, koncentrace zinku 2 mg l^{-1} , H – 9. 8. 2015, koncentrace zinku $4,5 \text{ mg l}^{-1}$ měřítko = $20 \mu\text{m}$).



Příloha 4: Zaznamenaná cenobia s netypickým počtem buněk v cenobiu při pozorování vlivu měďnatých iontů na řasu *Desmodesmus armatus* (A – 21. 8. 2015, koncentrace mědi 10 mg l^{-1} , B – 22. 8. 2015, koncentrace mědi 10 mg l^{-1} , C – 28. 8. 2015, koncentrace mědi $2,5 \text{ mg l}^{-1}$, D – 21. 8. 2015, koncentrace mědi $6,5 \text{ mg l}^{-1}$; E – 24. 8. 2015, koncentrace mědi 10 mg l^{-1} , F – 30. 8. 2015 koncentrace mědi $6,5 \text{ mg l}^{-1}$; měřítko = $20 \text{ }\mu\text{m}$).



Příloha 5: Atypická cenobia vyfotografována při pozorování vlivu měďnatých iontů na řasu *Desmodesmus armatus* (A – 20. 8. 2015, koncentrace mědi 10 mg l^{-1} , B – 24. 8. 2015, koncentrace mědi $6,5 \text{ mg l}^{-1}$, C – 24. 8. 2015, koncentrace mědi $2,5 \text{ mg l}^{-1}$, D – 26. 8. 2015, koncentrace mědi 10 mg l^{-1} , E – 26. 8. 2015, koncentrace mědi $2,5 \text{ mg l}^{-1}$, F – 30. 8. 2015, koncentrace mědi 10 mg l^{-1} ; měřítko = $20 \mu\text{m}$).



Příloha 6: Atypická cenobia vyfotografována při pozorování vlivu měďnatých iontů na řasu *Desmodesmus armatus* (A–B – 21. 8. 2015, koncentrace mědi $6,5 \text{ mg l}^{-1}$, C – 26. 8. 2015, koncentrace mědi 10 mg l^{-1} , D – 26. 8. 2015, koncentrace mědi $6,5 \text{ mg l}^{-1}$, E – 22. 8. 2015, koncentrace mědi $6,5 \text{ mg l}^{-1}$, F – 30. 8. 2015, koncentrace mědi $6,5 \text{ mg l}^{-1}$; měřítko = $20 \text{ }\mu\text{m}$).

