



**WYDZIAŁ BIOLOGII
i OCHRONY ŚRODOWISKA**

Uniwersytet Łódzki

Iwona Bogusz

**Różnorodność gatunkowa i ekologia
okrzemek potencjałem w kryminalistyce
– możliwości i ograniczenia**

Species diversity and autecology of diatoms as
a potential in forensics – possibilities and limitations

Praca doktorska

wykonana w Katedrze Algologii i Mykologii Instytutu
Ekologii i Ochrony Środowiska

pod kierunkiem

Dr hab. Joanny Żelaznej-Wieczorek
prof. UŁ



Łódź, 2025

Spis treści

I.	Wprowadzenie	3
I.1.	Charakterystyka morfologiczna i biologiczna okrzemek	3
I.2.	Cechy budowy okrzemek determinujące ich przydatność w kryminalistyce	6
I.3.	Ekologia okrzemek w ekosystemach dla nich dostępnych	7
I.4.	Kryminalistyka - nauka korzystająca z innych nauk	9
I.5.	Diatomologia kryminalistyczna	10
II.	Hipoteza badawcza	13
III.	Cele szczegółowe rozprawy doktorskiej	13
IV.	Prace stanowiące rozprawę doktorską	15
V.	Teren badań, materiał i metody pracy	16
V.1.	Teren badań	16
V.2.	Pobór i analiza prób	16
VI.	Omówienie uzyskanych wyników	18
VI.1.	Diagnozowanie utonięcia na podstawie obecności okrzemek w narządach wewnętrznych	18
VI.2.	Żebra jako materiał pomocniczy w diagnozowaniu utonięć	19
VI.3.	Analiza porównawcza okrzemek zidentyfikowanych w narządach wewnętrznych pobranych ze zwłok z okrzemkami w próbach środowiskowych pobranych w miejscu znalezienia zwłok	19
VI.4.	Transfer okrzemek na odzież i utrzymanie się ich na niej	21
VI.4.1.	Skarpety jako powszechnie używany element odzieży	21
VI.4.2.	Porównawcza analiza ilościowa i jakościowa okrzemek na skarpetach po kontakcie z ekosystemem wodnym	21
VI.4.3.	Wybrane materiały wykorzystywane do produkcji odzieży	21
VI.5.	Analiza struktury zbiorowisk okrzemek w miarę oddalania się od zbiornika wodnego	22
VI.6.	Struktura zbiorowisk okrzemek dwóch ekosystemów wodnych w bliskiej odległości, lotycznego i lenitycznego oraz gleby	23
VI.7.	Zróznicowanie pomiędzy dwoma ekosystemami rzecznyymi na podstawie analizy struktury zbiorowisk okrzemek	24
VII.	Wnioski – możliwości i uwagi krytyczne wobec wykorzystania wiedzy o różnorodności gatunkowej i ekologii okrzemek w kryminalistyce	26
VIII.	Streszczenie/Summary	28
IX.	Piśmiennictwo uzupełniające	33
X.	Załączniki 1 - 5	39

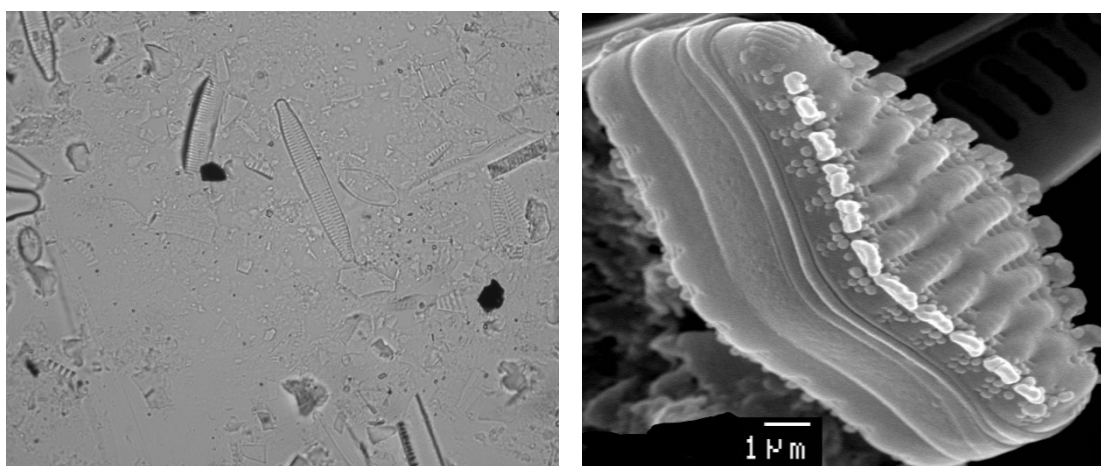
I. Wprowadzenie

I.1. Charakterystyka morfologiczna i biologiczna okrzemek

Okrzemki (Bacillariophyta) to fotoautotroficzne organizmy jednokomórkowe występujące powszechnie w środowisku wodnym i glebowym. Ze względu na typ budowy okrzemki dzielimy na: okrzemki centryczne (*centrice*) i pierzaste (*pennate*). Okrągłe lub eliptyczne okrywy są cechą okrzemek centrycznych, u których ornamentacja okryw jest promienisty lub nieregularny, a liczba osi symetrii jest nieskończenie wielka. W przypadku okrzemek pierzastych występują trzy osie symetrii: oś główna, poprzeczna oraz podłużna. Okrywy okrzemek pierzastych mogą mieć różne kształty, na przykład: eliptyczne, romboidalne lub lancetowate. Ponadto okrzemki pierzaste mogą posiadać: jedną szczelinę (*raphae*) - *Achnanthes* sp., dwie szczeliny - *Navicula* sp. lub nie posiadają jej wcale na przykład *Fragilaria* sp. (Pliński, Witkowski 2009). Przez szczelinę wydzielany jest polisacharydowy śluz, który pomaga przytwierdzić się do podłoża, a także umożliwia ruch okrzemkom. Ponadto jej kształt, lokalizacja oraz zakończenie stanowią cechy umożliwiające identyfikację taksonomiczną. Poza kształtem okryw, obecnością lub brakiem szczeliny ważnymi cechami taksonomicznymi jest także obecność i ilość prążków (*striae*).

Liczba zidentyfikowanych i opisanych gatunków okrzemek podawana jest różna w różnych źródłach. Lange-Bertalot i Moser (1994) podawali liczbę opisanych gatunków okrzemek na ponad 20 000 gatunków. Szacuje się, iż liczba ta może być wyższa – między 100 000 do nawet 500 000, ale pojawiają się wątpliwości co do ich dokładności (Stoermer, Smol 1999). Liczba poznanych i opisanych gatunków na przełomie lat zmieniała się wraz z rozwojem technik obrazowania mikroskopowego. Podstawą identyfikacji taksonomicznej, początkowo była analiza cech morfologicznych widocznych w mikroskopie świetlnym, w którym powiększenie maksymalne wynosiło x1000. Używając mikroskopu świetlnego dokonuje się klasyfikacji na podstawie wymiarów komórki, jej długości i szerokości, a także na podstawie ilości prążków lub kształtu i zakończenia szczeliny. Rozwój skaningowej mikroskopii elektronowej umożliwił lepszą wizualizację i tym samym bardziej precyzyjny opis cech morfologicznych, które nie były widoczne w mikroskopie świetlnym (Ryc.1), a które umożliwiły uwidocznienie wcześniej nieznanymi cech morfologii skorupki (Lobo i in. 1990). Przykładem takich cech mogą być alweole - kamery mieszczące się po wewnętrznej stronie okrywy lub areole, które ułożone regularnie tworzą prążki. Cechy budowy, które można analizować dzięki SEM stały się podstawą nowej taksonomii okrzemek (Round i in. 1990; Morales i in. 2001; Williams i in 2011; Witkowski i in. 2014; Genkal, Kulikovskiy 2015).

Kolejnym krokiem była rewizja klasyfikacji taksonomicznej, co również obejmowało przenoszenie gatunków do wyższych jednostek taksonomicznych. Stało się możliwe przez zastosowanie metod molekularnych polegających na poszukiwaniu typowych markerów DNA. Wykorzystanie danych molekularnych do filogenezy i taksonomii okrzemek zapoczątkowała Medlin i in. (1993), wykorzystując małe podjednostki (SSU) rybosomalnego RNA. Potwierdziło to w wielu przypadkach tradycyjną, opartą na morfologii taksonomię. Kolejne badania wykorzystywały zarówno 18S jak i 16S rybosomalnego RNA (Medlin i Kaczmarek 2004), a następnie jednostka SSU została zastąpiona przez duże podjednostki LSU (Jung i in. 2009; Souffreau i in. 2011). Poza rRNA do wyjaśnienia filogenezy okrzemek wykorzystywano też geny jądrowe, chloroplastowe i mitochondrialne (Lee i in. 2013), a dla potrzeb ekologicznych stosuje się metabarcoding (Rivera i in. 2020; Bailet i in. 2020). Analizy zarówno morfologiczne jak i molekularne wykazały, że okrzemki charakteryzują się wysoką różnorodnością taksonomiczną.



Ryc. 1. Cechy budowy okrzemek widoczne w mikroskopie świetlnym (LM) i skaningowym mikroskopie elektronowym (SEM).

Okrzemki są szeroko rozprzestrzenione na świecie ponieważ wykształciły przystosowania pozwalające na zasiedlanie siedlisk różniących się warunkami abiotycznymi. Na przykład w wodach stojących i wolno płynących, z uwagi na to, że gęstość komórek okrzemek jest większa niż wody, unoszenie się w nich przez dłuższy czas jest znacznie utrudnione. Okrzemki wytworzyły różne cechy adaptacyjne umożliwiające wydłużenie czasu utrzymania się w strefie eufotycznej. Jednym ze sposobów takiej adaptacji jest występowanie okrzemek o małych wymiarach. Okrzemki zmniejszają prędkość opadania również przez zmniejszenie gęstości cytoplazmy oraz zwiększenie oporności kształtu. Odpowiedni kształt

pojedynczej komórki, w której stosunek pola powierzchni jest większy od jej objętości zwiększa opór komórki podczas jej opadania. Za przykład mogą posłużyć wydłużone – igłokształtne komórki u *Fragilaria* i *Nitzschia*. Także tworzenie kolonii, jak u *Aulacoseira*, jest cechą pozwalającą na dłuższe utrzymywanie się w strefie eufotycznej i unoszenie się w wodzie podczas jej ruchów (Round i in. 1990). Czynnikiem zmniejszającym gęstość, a tym samym spowalniającym proces opadania, jest obecność tłuszczów w komórce, które przybierają formę kropelek - ciał lipidowych i produkowane są przez okrzemki, podobnie jak węglowodan – chryzolaminaryna, w celu magazynowania węgla (Maeda i in. 2017). Ciała lipidowe najczęściej mają kształt kulisty, jednak u niektórych okrzemek mogą one mieć inny kształt, szczególnie w późnej fazie kumulacji tłuszczu (Nojima i in. 2017). Rozmiar i liczba ciał lipidowych jest różna w zależności od gatunku oraz od fazy akumulacji tłuszczu. Lokalizacja ciał tłuszczowych jest cechą gatunkową jak na przykład u *Fistulifera solaris*. Kolejną cechą przystosowawczą, która spowalnia opadanie komórki lub kolonii, jest obecność śluzowej otoczki. Warstwa śluzu pozwala również na przytwierdzenie się okrzemki do podłoża oraz jest pomocna przy poruszaniu się form bentosowych. Śluz produkowany przez okrzemki jest złożonym, wieloskładnikowym materiałem, w którym dominują związki węglowodanowe, a także związki białkowe (Molino i in 2016).

Niektóre okrzemki potrafią się przemieszczać. Zdolność tę posiadają okrzemki ze szczeliny. Ruch okrzemek jest następstwem wydzielania przez szczelinę materiału w postaci polisacharydu. Sugeruje się, że siła wprawiająca w ruch okrzemkę jest generowana przez interakcję między włóknami aktynowymi a strukturami transbłonowymi, które mogą swobodnie poruszać się w komórce i szczelinie (Round i in. 1990). Dominującym modelem mechanizmu lokomocji okrzemek stał się ten zaproponowany przez Edgara i współautorów (Edgar, Pickett-Heaps 1983; Edgar, Zavortink 1983; Molino, Wetherbee 2008). Model ten jednak nie daje pełnej odpowiedzi jaki jest mechanizm ruchu. Inne badania sugerują, że poruszanie może odbywać się za pomocą dwóch lub więcej pseudopodiów (nibynózek), które wystają z pancerzyka. Ustalono, że przyczepność okrzemki do podłoża może być uzyskana w wyniku odrywania się nibynózki od podłoża przez działanie śluzu (EPS) (Wang i in. 2013).

Kolejnym przystosowaniem do życia w środowisku wodnym umożliwiającym szybkie zmiany w jakościowej i ilościowej strukturze zbiorowisk okrzemek jest ich rozmnażanie. Okrzemki rozmnażają się zarówno płciowo jak i bezpłciowo, przy czym ten drugi sposób rozmnażania prowadzi do stopniowego zmniejszania się komórek. Dlatego też rozmnażanie płciowe nie tylko pozwala na zwiększanie się ich różnorodności genetycznej, umożliwia ono także odtworzenie komórki o optymalnych w danych warunkach rozmiarach, tym samym

przeciwdziała procesowi zmniejszania się okrzemek. Okrzemki centryczne i pierzaste różnią się sposobem rozmnażania płciowego. Okrzemki centryczne wytwarzają w następstwie mejozy duże makrogamety (komórki jajowe) i małe, wyposażone w wici mikrogamety (plemniki). Okrzemki pierzaste natomiast produkują niewyposażane w wici gamety o równym rozmiarze - izogamety lub o nierównym rozmiarze - anizogamety (Montresor i in. 2016). Na podstawie badań prowadzonych nad rozmnażaniem płciowym okrzemek centrycznych można wnioskować, że faza płciowa u tych okrzemek jest wywoływana poprzez czynniki zewnętrzne (Chepurnov i in 2004; Montresor i in. 2016). Znany jest także przypadek morskiej, centrycznej okrzemki *Skeletonema marinoi*, u której gametangia, ruchliwe gamety i auksosporę, uzyskano przez przeniesienie kultur do środowiska o wyższym zasoleniu (Godhe i in. 2014). U okrzemek pierzastych rozmnażanie płciowe może być indukowane przez specyficzne związki chemiczne – feromony. W badaniach nad *Seminavis robusta* wykazano, że to właśnie feromony pośredniczą w przyciąganiu się między komórkami (Gillard i in. 2013) i determinują przejście od mitozy do mejozy. Chemiczne sygnały również odgrywają rolę w rozmnażaniu płciowym u morskiej okrzemki *Pseudo-nitzschia multistriata* (Scalco i in. 2014; Basu 2017).

I.2. Cechy budowy okrzemek determinujące ich przydatność w kryminalistyce

Charakterystyczną cechą, która odróżnia okrzemki od pozostałych grup glonów, jest zbudowany z uwodnionej krzemionki egzoszkielet o strukturze opalu (Round i in. 1990), który określany jest również jako pancerzyk lub skorupka. Pancerzyk okrzemki powstaje w wyniku pochłaniania krzemionki rozpuszczonej w wodzie, która następnie składowana jest w aparacie Golgiego. W dalszym procesie silikosomy w postaci pęcherzyków uwalniają się z aparatu Golgiego i inkorporują białka frustuliny obecne w błonie komórkowej (Schmid 1988; 1994). Proces budowy egzoszkieletu a następnie eksportowania go na zewnątrz wymaga zaangażowanie dużej liczby genów i ich produktów białkowych. Tworzenie „prefabrykatów” egzoszkieletu i ich wyprowadzenie na zewnątrz błony komórkowej wymaga poświęcenia znacznej ilości potencjału biosyntetycznego komórki (Hildebrand i in. 2018).

Struktura egzoszkieletu okrzemek warunkuje jej niezwykłą wytrzymałość na działanie czynników fizycznych i chemicznych. Egzoszkielet poddany działaniu nawet silnych kwasów nieorganicznych, perhydrolu lub wysokiej temperatury nie ulega destrukcji, co w konsekwencji pozwala na identyfikację okrzemek do poziomu gatunku. Dzięki wytrzymałości pancerzyki okrzemek są dobrze zachowywane w osadach i dzięki temu na podstawie badania tej grupy organizmów możliwe jest odtworzenie warunków środowiskowych panujących w przeszłości (Lobo i in. 2016). Pancerzyk

posiada determinowane genetycznie liczne cechy w budowie morfologicznej, do których należą między innymi: kształt okryw, obecność, kształt i położenie szczeliny, w tym budowa jej zakończeń i części centralnej; obecność, kształt i liczba prążków lub też obecność, kształt i liczba otworów w skorupce (alveole i areole); obecność i rodzaj portuli oraz obecność i kształt żeber w skorupce. Są to główne cechy stosowane w oznaczaniu okrzemek (Round i in. 1990). Wymienione wyżej cechy dają możliwość przeprowadzenia rzetelnej identyfikacji okrzemek do poziomu gatunku oraz trwałego zachowania materiału dowodowego. Materiał ten, w razie potrzeby, może być wielokrotnie poddawany analizie i być wykorzystany do typowania i/lub eliminacji w postępowaniu wykrywczym.

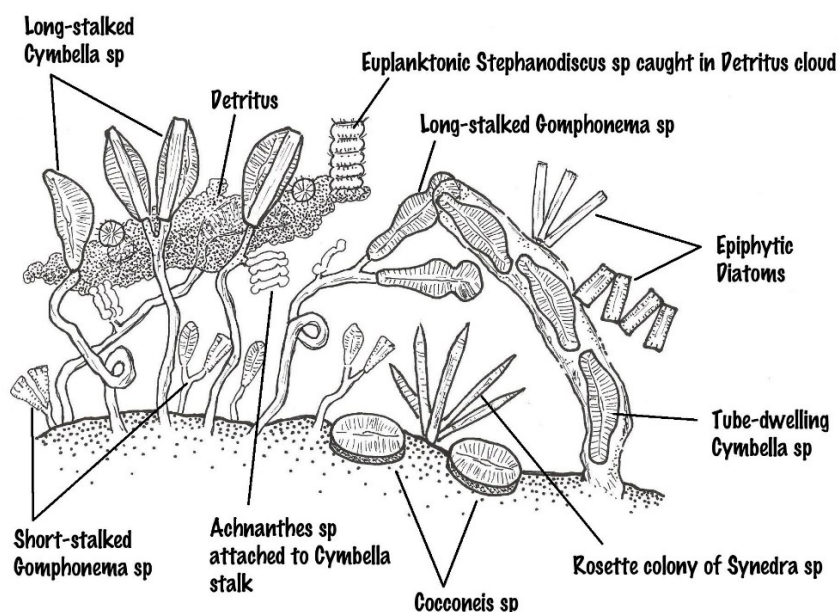
1.3. Ekologia okrzemek w ekosystemach dla nich dostępnych

Zróznicowanie jakościowe i ilościowe struktury zbiorowisk okrzemek w różnych ekosystemach było podstawą do przeprowadzenia badań w różnym celu. Na przykład okrzemki analizowano pod kątem zmian zachodzących w środowisku (Żelazna-Wieczorek, Ziulkiewicz 2007; 2009), a także wpływu działalności człowieka na różne ekosystemy wodne (Szczepocka i in. 2016; Macklin i in. 2019, Szczepocka i in. 2024). Okrzemki wskazywały na poziom zanieczyszczeń, jaki wynikał z niekontrolowanego rozwoju rolnictwa (Walsh, Wepener 2009), a także określano typy ekosystemów, które one zasiedlają (Potapova, Charles 2007; Potapova 2011; Rivera i in. 2018; Stevenson i in. 210). Dlatego też zarówno różnorodność gatunkowa jak i ekologia okrzemek stanowią czynnik predysponujący tę grupę organizmów do poszerzenia kryminalistyki o nową dziedzinę jaką jest diatomologia.

Okrzemki stanowią grupę organizmów charakteryzujących się licznymi cechami umożliwiającymi zasiedlanie różnych środowisk. Możemy je spotkać w wodach słodkich, słonych, stojących i płynących, a także w środowisku glebowym (Kawecka, Eloranta 1994). Prowadzone były i są liczne badania porównawcze zbiorowisk okrzemek w różnych ekosystemach (Serieyssel 2013; Wojtal 2009; Noga i in 2014). Na podstawie przeprowadzonych badań powstało wiele publikacji, w których wykazano, że różne siedliska różnią się strukturą zbiorowisk okrzemek, w tym odnotowano różnice w strukturze dominacji gatunków. Wynika to z szerokiego spektrum preferencji środowiskowych tej licznej w gatunki grupy organizmów. Na uwagę zasługuje też fakt, że pośród okrzemek są takie, które mają specyficzne wymagania co do warunków środowiskowych, w tym wąski zakres tolerancji. Dało to podstawę do określania wartości wskaźnikowych między innymi wobec odczynu wody, zasolenia, stężenia tlenu, saprobii, trofii oraz warunków wilgotnościowych środowiska (Van

Dam i in. 1994). Powstały różne systemy ekologiczne (Denys 1991; Håkansson 1993; Carayon i in. 2019), które zostały wykorzystane przy konstruowaniu i aktualizowaniu programu OMNIDIA. Program ten zawiera bazę danych oraz arkusz kalkulacyjny, co pozwala określać warunki środowisk, w których okrzemki występowały i wyliczać indeksy okrzemkowe.

Okrzemki wykazują preferencje do konkretnych siedlisk (Chao i in. 2023). Mogą występować jako formy wolnopływające w planktonie, ale też jako formy osiadłe. Wśród form osiadłych występuje zróżnicowanie siedliskowe na okrzemki, które preferują dno kamieniste, muliste, piaszczyste, a także te, które żyją jako epifity na roślinach. Ich możliwości życia w różnych warunkach, na różnych podłożach uwarunkowane są budową komórki oraz wykształceniem zdolności poruszania się, lub też różnymi sposobami przytwierdzenia się do podłoża (Ryc. 2) (Pandey i in. 2017). Na przykład niektóre okrzemki z rodzaju *Gomphonema* przytwierdzają się do podłoża za pomocą długich stylików, co umożliwia im życie w górnej warstwie biofilmu, a tym samym lepszy i łatwiejszy dostęp do światła i składników odżywczych (Passy 2007). Wyróżnia się pośród nich także takie gatunki, które tworzą różnego typu kolonie w formie łańcuchów, łodygowatych rozgałęzień oraz rurek. Formy kolonijne tworzą gatunki z rodzajów *Diatoma*, *Ellerbeckia*, *Fragilaria*, *Gomphonema*, *Melosira* i *Synedra*. Okrzemki dzięki długim koloniom mogą wykraczać poza warstwę graniczną biofilmu, co pozwala im na lepszy dostęp do światła i innych zasobów (Nicolosi Gelis i in. 2020).



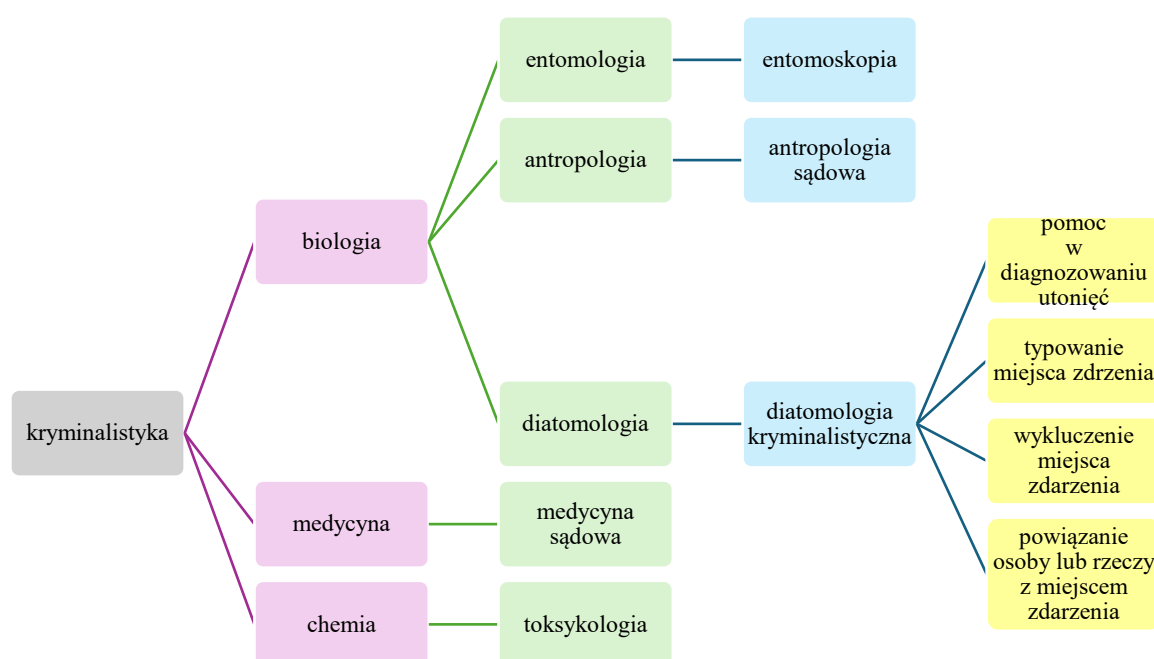
Ryc. 2. Schemat różnych form osiadłych okrzemek (Munteanu 2023).

Poza środowiskiem wodnym można je spotkać na lądzie, w glebie, na wilgotnych skałach i pniach drzew. Okrzemki występują również w skrajnych warunkach środowiskowych: od wód wysoce zanieczyszczonych zarówno materią organiczną jak i związkami chemicznymi (Chonova i in. 2019), po wody nieobciążone zanieczyszczeniami; od wód o wysokich wahaniami temperatur, po wody tylko o niskich lub tylko o wysokich temperaturach (Fan i in. 2023; Hattich i in. 2024; Hejduková i in. 2024); od wód bogatych w tlen, po wody o niskiej zawartości tlenu (Kamp i in. 2011); od wód o niskim zasoleniu, po wody o zasoleniu wysokim (Żelazna-Wieczorek i in. 2015; Feijão i in. 2018; Rodríguez-Miret i in. 2023; Potapova 2011). Spotka się je także w środowiskach, gdzie widoczne są duże wahania natężenia promieniowania słonecznego (Prins i in. 2020; Kawecka, Eloranta 1994). Wykazują one przystosowania do występowania w warunkach skrajnych wilgotnościowo, od okresowo zalanych do całkowitego wyschnięcia podłoża (B-Béres i in. 2019; Béres i in. 2022; Quevedo-Ortiz i in. 2024). Okrzemki są uważane za idealną grupę, która może przynieść wymierne korzyści kryminalistyce. Wynika to z różnych wymagań środowiskowych okrzemek, wielu ich możliwości przystosowawczych, a także tego, że potrafią one w krótkim czasie odbudować strukturę zbiorowiska, które na skutek zmian środowiskowych zostało zaburzone. Obecnie została zauważona w kryminalistyce potrzeba badania zbiorowisk okrzemek w kontekście mapowania takich ekosystemów wodnych jak rzeki, gdzie na ich rozwój ma wpływ wiele zmiennych, szczególnie w klimacie umiarkowanym, gdzie istotną rolę odgrywa między innymi czynnik sezonowości.

1.4. Kryminalistyka - nauka korzystająca z innych nauk

Kryminalistyka to prężnie rozwijająca się nuka obejmująca metody i środki walki z przestępczością (Hanausek, Sławik 1995). Kryminalistyka swój rozwój zawdzięcza głównie innym dziedzinom nauk, a nadrzędnym jej celem jest przeciwdziałanie przestępczości. Jej początki były głównie związane z medycyną sądową, która dążąc do ustalenia przyczyn zgonu pomagała organom ścigania w rozwiązywaniu spraw związanych z przestępczym spowodowaniem śmierci. Sama kryminalistyka jako nauka, głównie dzięki opublikowanym pracom Alfonsa Bertillon'a, Franciszka Galtona oraz Hansa Grossa, zaczęła się rozwijać dopiero pod koniec XIX wieku. Celem kryminalistyki było zwalczanie przestępczości i początkowo była ona związana głównie z techniką kryminalistyczną, która nastawiona była na badanie i analizę dowodu rzeczowego. Z czasem okazało się, iż by zwalczać rosnącą przestępczość sama technika kryminalistyczna to za mało, dlatego pojawiły się kolejne dziedziny

kryminalistyki, takie jak: taktyka kryminalistyczna oraz strategia kryminalistyczna. Dalszy rozwój kryminalistyki związany był i jest z rozwojem innych nauk, na przykład wspomniana wcześniej medycyna sądowa, która dziś działa w oparciu o inne dziedziny nauk, jak na przykład toksykologię (Mikulewicz i in. 2014), biochemię (Maeda i in 2011) oraz wymiarowanie 3D (Brüschweiler i in 2003; Villa i in. 2023) i dzięki temu pozwala na uzyskanie szerszego obrazu na temat przyczyn śmierci. Współczesne badania naukowe z różnych dziedzin, w tym biologii środowiskowej, przynoszą korzyści kryminalistyce dając wiele możliwości w zwalczaniu przestępczości. Jedną z takich nauk biologicznych jest diatomologia kryminalistyczna, która w oparciu o wiedzę na temat budowy oraz ekologii okrzemek może być wykorzystana na wielu płaszczyznach kryminalistyki (Ryc. 3).



Ryc. 3 Schemat przedstawiający zależność kryminalistyki jako nauki od innych wybranych nauk przyrodniczych i medycznych, w tym diatomologii kryminalistycznej

1.5. Diatomologia kryminalistyczna

W medycynie sądowej po raz pierwszy okrzemki zostały wykorzystane przez Revenstorfa, który w 1904 roku próbując rozwiązać sprawę utonięcia wykrył w płucach ofiary okrzemki i od tego czasu zaczęły być one wykorzystywane jako pomoc przy diagnozowaniu utonięć. Od tamtego czasu pojawiło się wiele badań naukowych łączących kryminalistykę z diatomologią, które są kontynuowane do dziś. Rozwijały się od ujawnienia okrzemek we krwi i narządach ofiar utonięć (Incze 1942), przez badania nad okrzemkami obecnymi w szpiku

kostnym (Tamasaka 1942), aż po badania Peabody (1977) oraz Pollanen’a, który jako pierwszy wprowadził termin Forensic Diatomology – diatomologia kryminalistyczna (Pollanen i in. 1998). Termin ten początkowo odnosił się tylko do medycyny sądowej, a właściwie do badań i analiz, jakim były aspekty związane z diagnozowaniem utonięcia. Następstwem prac Pollanen’a były kolejne, koncentrujące się nie tylko na możliwościach diagnostycznych utonięć (Ludes i in. 1994; Lunetta i in 1998; Ludes, i in. 1999; Hürlimann i in. 2000; Krstic i in. 2002; Piette i in. 2006; Delabarde i in. 2013), a także na próbie potwierdzenia lub wykluczenia miejsca ujawnienia zwłok jako miejsca utonięcia (Kakizaki i in. 2011; Bąk i in 2018). Pomimo wielu dyskusji na temat wykorzystania okrzemek w diagnozowaniu utonięć nadal są one bardzo pomocnym i wiarygodnym narzędziem (Tambuzzi i in. 2024). Naukowcy stawiają wciąż nowe pytania związane z okrzemkami w kontekście utonięć, co podkreśla potrzebę ich dalszych badań w tym zakresie. W piśmiennictwie wskazywano, że szpik kostny, szczególnie żebra, może być idealnym narzędziem do analizy okrzemkowej w celu potwierdzenia utonięcia jako przyczynę śmierci. Jednak wokół tej metody pojawiło się też wiele głosów sceptycznych, szczególnie gdy zwłoki przebywały dłużej w wodzie i poddane były procesowi rozkładu. Dlatego też, by rozwiać wątpliwości pojawiła się potrzeba potwierdzenia lub wykluczenia, czy okrzemki mogą biernie przenikać do szpiku kostnego żeber w przypadku długotrwałego przebywania szczątków ludzkich w wodzie.

Następny krok to rozwój diatomologii kryminalistycznej w kierunku powiązania osoby z konkretnym środowiskiem na podstawie transferu okrzemek i utrzymania się ich na różnych materiałach (Scott i in. 2014; Levin i in. 2017; Scott i in. 2019; Magni i in. 2020). Badania wykazały, że analiza okrzemkowa odzieży i przedmiotów może być pomocna przy powiązaniu osób z konkretnym miejscem. Nadal jednak konieczne jest sprawdzanie różnych okoliczności zdarzeń w kontekście obecności i możliwości transferu okrzemek na różne materiały, by móc ją w pełni wykorzystać w procesie wykrywczym. Pomo tego, że w ostatnich kilku latach pojawiło się dużo publikacji będących wynikiem badań naukowych, w których okrzemki mają zastosowanie w kryminalistycznym badaniu miejsca zdarzenia (Ryc. 4) to wciąż wiele pytań pozostaje bez odpowiedzi. Brak nadal takich informacji na przykład: jak długo okrzemki mogą utrzymać się na odzieży, a także czy procesy związane z codziennym użytkowaniem przyczyniają się do utraty przeniesionych po kontakcie okrzemek oraz jaka jest metodyka pozyskiwania materiału okrzemkowego z odzieży i przedmiotów.

Diatomologia kryminalistyczna jako nauka łącząca kryminalistykę i biologię środowiskową prężnie się rozwija, co potwierdzają liczne publikacje naukowe. Pomimo tego

jest ona dziedziną nauki, nadal otwartą na prace eksperymentalne i analizę różnych przypadków.



Ryc. 4. Przykładowe publikacje zawierające problematykę wykorzystania okrzemek w kryminalistyce.

II. Hipoteza badawcza

W rozprawie doktorskiej postawione zostały następujące hipotezy badawcze, które poddane były weryfikacji:

H 1 – Okrzemki są narzędziem wspomagającym w diagnozowaniu utonięć.

H 2 – Analiza struktury zbiorowisk okrzemek pozwala na potwierdzenie lub wykluczenie miejsca ujawnienia zwłok jako miejsca utonięcia.

H 3 – Analiza struktury zbiorowisk okrzemek pozwala na powiązanie osób lub rzeczy z ekosystemem, a nawet z siedliskiem.

H 4 - Mapowanie rzek pod kątem struktury zbiorowisk okrzemek może być wykorzystane w kryminalistyce.

III. Cele szczegółowe rozprawy doktorskiej

Weryfikacja postawionych w rozprawie doktorskiej hipotez wymagała podjęcia badań w celu określenia możliwości wykorzystania w kryminalistyce wiedzy z zakresu taksonomii i ekologii okrzemek.

Badania realizowano poszukując odpowiedzi na pytania i wyjaśnienia następujących zagadnień na podstawie poniższych zadań badawczych:

- zbadanie obecności okrzemek w narządach wewnętrznych, szczególnie w żebrach, pod kątem wnioskowania, że przyczyną śmierci było utonięcie;
- zbadanie, czy struktura zbiorowisk okrzemek zidentyfikowanych w narządach wewnętrznych zwłok ludzkich odzwierciedla strukturę zbiorowisk okrzemek w próbach środowiskowych pobranych w miejscu znalezienia zwłok;
- określenie, czy są ograniczenia odnośnie do miejsca, czasu i sposobu pobierania materiału biologicznego ze zwłok ludzkich podczas sekcji;
- zbadanie i określenie, czy są ograniczenia odnośnie do miejsca, czasu i sposobu pobierania prób środowiskowych z miejsc, w których zwłoki ludzkie zostały ujawnione;
- określenie różnorodności taksonomicznej okrzemek w wybranych ekosystemach wodnych;
- zbadanie i określenie możliwości przenoszenia się i utrzymania okrzemek na wybrane elementy odzieży;

- sprawdzenie, czy okrzemki przenoszone na odzież swym składem ilościowym i jakościowym odzwierciedlają strukturę zbiorowiska okrzemek ze środowiska, z którym miały kontakt;
- zbadanie i określenie, jak zmienia się struktura zbiorowisk okrzemek w miarę oddalania się od zbiornika wodnego;
- zbadanie i określenie przyczyn zróżnicowania pomiędzy dwoma ekosystemami rzecznyymi na podstawie analizy struktury zbiorowisk okrzemek;
- wskazanie ograniczeń, które mogą wpływać na wykorzystanie okrzemek jako kryminalistycznych śladów środowiskowych.

IV. Prace stanowiące rozprawę doktorską

Zgodnie z ustawą *Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce z dnia 20 lipca 2018 r. art. 187 punkt 3* niniejsza rozprawa doktorska ma charakter hybrydowy i składa się ze zbioru opublikowanych i powiązanych tematycznie artykułów naukowych oraz manuskryptu:

- ✓ **Bogusz Iwona**, Bogusz M., Borowska B., Szleszkowski Ł., Żelazna-Wieczorek J.^C 2024. A critical assessment of the diatom test of rib bone marrow as a supporting procedure in the case of drowning. *Journal of Forensic and Legal Medicine* 107, <https://doi.org/10.1016/j.jflm.2024.102753>.
IF 1,2 MNiSW 100 pkt. (**Załącznik 1**)
- ✓ Bogusz M., **Bogusz Iwona**, Żelazna-Wieczorek J. 2023. The possibilities and limitations of comparative diatomaceous analysis for confirming or excluding the site of an incident – case studies. *Forensic Science International* 346(1-3), 111644. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2023.111644>.
IF 2,2 MNiSW 100 pkt (**Załącznik 2**)
- ✓ **Bogusz Iwona**, Bogusz M., Żelazna-Wieczorek J. 2022. Diatoms from inland aquatic and soil habitats as indestructible and nonremovable forensic environmental evidence. *Journal of Forensic Science* 67(6):1490-1504. <https://doi.org/10.1111/1556-4029.15017>.
IF 1,832 MNiSW 70 pkt (**Załącznik 3**)
- ✓ **Bogusz Iwona**, Żelazna-Wieczorek J. Przestrzenne zróżnicowanie występowania okrzemek w dwóch ekosystemach rzecznych – mapowanie okrzemek pod kątem kryminalistyki – manuskrypt (**Załącznik 4**)
- ✓ **Bogusz Iwona**, Żelazna-Wieczorek J., Jesionowska I. 2023. Methodology for securing environmental traces in the form of diatomaceous material. *Issues of Forensic Science* 319 (1):39-52. <https://doi.org/10.34836/pk.2023.319.1>.
MNiSW 20 pkt (**Załącznik 5**)

V. Teren badań, materiały i metody pracy

W celu weryfikacji postawionych hipotez badawczych wytypowano ekosystemy wodne i lądowe, w których przeprowadzono eksperymenty środowiskowe oraz miejsca związane z analizowanymi przypadkami. Niniejszy rozdział oraz zawarte w nim podrozdziały przedstawiają skrócony opis terenu badań, wykorzystanych materiałów, w tym metodyki poboru prób oraz metod opracowania materiału.

Szczegółowy opis terenu badań, metod poboru prób i analizy warunków środowiskowych, przygotowania materiałów do analizy jakościowej i ilościowej okrzemek oraz metod analizy danych znajduje się w publikacjach i manuskrypcie stanowiących rozprawę doktorską: Bogusz i współautorzy 2024 – **Załącznik 1**; Bogusz i współautorzy 2023 – **Załącznik 2**; Bogusz i współautorzy 2022 – **Załącznik 3**; Bogusz i współautor – **Załącznik 4**; Bogusz i współautorzy 2023 – **Załącznik 5**.

V.1. Teren badań

Terenem badań do weryfikacji hipotezy **H 1** były ekosystemy wodne, rów melioracyjny oraz staw. Szczegółowy opis terenu badań zawarto w publikacjach Bogusz i współautorzy 2024, który stanowi **Załącznik nr 1**.

Terenem badań do weryfikacji hipotezy **H 2** były ekosystemy wodne w obrębie Miasta Stołecznego Warszawy oraz okolicznych miejscowości (rzeki, jeziora, stawy, rowy melioracyjne), które były zarazem miejscami ujawnienia zwłok ludzkich. Szczegółowy opis terenu badań zawarto w publikacji Bogusz i współautorzy 2023, który stanowi **Załącznik 2**.

Terenem badań do weryfikacji hipotezy **H 3** były ekosystemy wodne, takie jak rzeka, rów melioracyjny, mokradło oraz ekosystemy lądowe do nich przyległe. Szczegółowy opis terenu badań zawarto w publikacji Bogusz i współautorzy 2022, który stanowi **Załącznik 3**.

Terenem badań do weryfikacji hipotezy **H 4** były dwa ekosystemy rzeczne – rzeka Bug i rzeka Narew, na wybranych odcinkach. Szczegółowy opis terenu badań zawarto w manuskrypcie, który stanowi **Załącznik 4**.

V.2. Pobór materiału, metodyka i analiza prób

W celu weryfikacji hipotez **H 1** oraz **H 2** pobierane i analizowane były próby biologiczne z żeber świńskich, a także środowiskowe ze stawu oraz z rowu melioracyjnego zgodnie ze

szczegółowym opisem w publikacji Bogusz i współautorzy 2024, który stanowi **Załącznik nr 1** oraz próby biologiczne z narządów wewnętrznych ludzkich pobranych podczas sekcji sądowo lekarskiej i próby środowiskowe z miejsc znalezienia zwłok ludzkich zgodnie ze szczegółowym opisem w publikacji Bogusz i współautorzy 2023, który stanowi **Załącznik 2**.

W celu weryfikacji hipotezy **H 3** pobierane były próby środowiskowe z trzech siedlisk wytypowanych w różnych ekosystemach zgodnie ze szczegółowym opisem w publikacji Bogusz i współautorzy 2022 - **Załącznik 3**.

W celu weryfikacji hipotezy **H 4** analizowano próby środowiskowe pobrane z siedmiu stanowisk, na każdym z nich z trzech siedlisk, zgodnie z opisem zawartym w manuskrypcie, który stanowi **Załącznik 4**.

Metody postępowania z materiałem biologicznym pochodzenia ludzkiego, w tym sposób trawienia chemicznego prób, ich oczyszczania oraz zabezpieczenia przed kontaminacją zawarto w publikacji Bogusz i współautorzy 2023, który stanowi **Załącznik 2**. Natomiast specyfikę postępowania w przypadku materiału biologicznego pochodzenia zwierzęcego – zwierzęcy model eksperymentalny, w tym pozyskanie materiału, przechowywanie materiału oraz jego preparatykę przedstawiono szczegółowo w publikacji Bogusz i współautorzy 2024 - **Załącznik 1**.

Metody postępowania z materiałem obejmującym próby środowiskowe z różnych typów podłoży opisano szczegółowo w publikacji Bogusz i współautorzy 2022, stanowiącym **Załącznik 3** oraz w manuskrypcie - **Załącznik 4**.

Ponadto metodykę postępowania z różnymi materiałami, wykorzystanymi między innymi w eksperymentach prowadzonych *in situ*, które mogą być przedmiotem badań diatomologicznych na potrzeby kryminalistyki, opisano szczegółowo w publikacjach Bogusz i współautorzy 2022, stanowiącym **Załącznik 3** i publikacji metodycznej Bogusz i współautorzy 2023 – **Załącznik 5**.

VI. Omówienie uzyskanych wyników

VI.1. Diagnozowanie utonięcia na podstawie obecności okrzemek w narządach wewnętrznych

Analizowano przypadki zwłok znalezionych w środowisku wodnym w latach 2017 – 2019 na terenie Miasta Stołecznego Warszawy i okolicznych miejscowości. Na podstawie autopsji jako przyczynę zgonu stwierdzono utonięcie, z wyjątkiem jednego przypadku, w którym jako przyczynę śmierci wskazano zawał mięśnia sercowego. Analizowano materiał biologiczny w postaci fragmentów narządów pobranych podczas sekcji, takich jak: fragment żebra, płuca, nerki oraz treść żołądka. Pobierano próby środowiskowe z miejsc, w których zwłoki zostały ujawnione pod kątem potwierdzenia w nich obecności okrzemek. Takie analizy stanowić mogą narzędzie wspomagające diagnozowanie utonięcia jako przyczyny śmierci.

Przeprowadzona analiza pod kątem obecności okrzemek w narządach wewnętrznych obejmowała nie tylko analizę ilościową, ale również analizę pod względem taksonomicznym. We wszystkich zbadanych próbach z narządów wewnętrznych stwierdzono 265 gatunków okrzemek. W próbach z nerki i szpiku żebra zidentyfikowano 57 gatunków, co stanowiło 21,5% ze wszystkich zidentyfikowanych okrzemek. Również liczba okryw, które zostały ujawnione w badanych przypadkach w płucach i żołądkach (5639), jest wielokrotnie większa od ilości okryw ujawnionych w nerkach i szpiku żeber (333). Przeprowadzona analiza szerokości i długości okryw okrzemek przenikających do różnych narządów wykazała zróżnicowanie pomiędzy wielkością okrzemek potwierdzonych w płucach i żołądka a wykazanych w próbach z nerki i szpiku kostnego. Wśród okrzemek zidentyfikowanych w płucach i w treści żołądka 88% z nich mieściło się w zakresie długości od 5,1 μm do 85,1 μm , natomiast w przypadku okrzemek przenikających do nerek i szpiku żebra 93% to okrzemki w zakresie długości od 5,1 μm do 50,1 μm . Analizując szerokość okryw zidentyfikowanych okrzemek w płucach i w treści żołądka 80% zawiera się w przedziale szerokości od 2,5 μm do 12,5 μm , natomiast u 70% okrzemek szerokość okryw zidentyfikowana w nerkach i szpiku żebra zawiera się w przedziale 3,3 μm do 9,9 μm , co daje możliwość wnioskowania, że okrzemki o mniejszych rozmiarach łatwiej dostają się do szpiku kości. Obecność okryw o dużych rozmiarach może wskazywać na kontaminację podczas pobierania materiału sekcyjnego lub podczas preparatyki w celu pozyskania oczyszczonych z materii organicznej skorupki (**Załącznik 2**).

VI.2. Żebra jako materiał pomocniczy w diagnozowaniu utonięć

Przeprowadzono badanie eksperymentalne z materiałem biologicznym w postaci żeber świni zanurzonych w dwóch ekosystemach wodnych, w stawie oraz rowie melioracyjnym, w różnych przedziałach czasowych: 1 miesiąc, 3 miesiące, 6 miesięcy oraz 12 miesięcy. Przeprowadzono cztery serie badań. W stawie i w rowie melioracyjnym ujawniono łącznie 158 gatunków okrzemek, przy czym 66 gatunków występowało w obu ekosystemach. W badanych próbach kontrolnych pobranych ze stawu stwierdzono obecność gatunków, których średnia szerokość okryw w znaczącej większości przypadków (94,8%) zawierała się w przedziale 2,85 μm do 21,25 μm . W badanych próbach pobranych z rowu melioracyjnego stwierdzono obecność gatunków, których średnia długości okryw w 91,4% przypadków zawierała się w przedziale od 6,5 do 76,5 μm .

W badanych próbach z wszystkich żeber stanowiących materiał kontrolny, nie poddany zanurzeniu w środowisku wodnym, nie stwierdzono obecności okryw okrzemek. Łącznie w badanych próbach pobranych z żeber z I, II i III serii badań stwierdzono obecność 30 gatunków okrzemek, przy czym dla jednej próby nie odnotowano ani jednej ich okrywy, dla czterech prób odnotowano od 1 do 7 okryw, dla dwóch prób odnotowano od 34 do 39 okryw dla jednej próby odnotowano 376 okryw oraz dla czterech prób odnotowano powyżej 500 okryw. Natomiast w IV serii eksperymentu w próbce pobranej z żebra zanurzonego przez 3 miesiące stwierdzono obecność jedynie 2 okryw gatunku *Sellaphora pupula* (średnia długość okrywy 18,5 μm , średnia szerokość okrywy 7,0 μm). W pozostałych preparatach z żeber (po zanurzeniu przez 1m, 6m i 12m) nie stwierdzono okryw okrzemek.

Wyniki badań eksperymentalnych wskazały, że naruszenie integralności kości, co miało miejsce w seriach I, II i III, a związane było ze sposobem przygotowania materiału poprzez wyłamywanie żeber ze stawów, dało możliwość przenikania okrzemek ze środowiska wodnego do szpiku żeber. Natomiast w serii IV, w celu uniknięcia naruszenia integralności kości do eksperymentu żebra wycięto wraz z główkami kości i z otaczającymi je tkankami miękkimi (Załącznik 1).

VI.3. Analiza porównawcza okrzemek zidentyfikowanych w narządach wewnętrznych pobranych ze zwłok z okrzemkami w próbach środowiskowych pobranych w miejscu znalezienia zwłok

Przeprowadzona analiza struktury zbiorowisk okrzemek w próbach środowiskowych,

zarówno pod względem jakościowym jak i ilościowym, wykazała przestrzenne zróżnicowanie zbiorowisk w odniesieniu do miejsca odnalezienia zwłok jak i różnych formacji ekologicznych w poszczególnych miejscach. W każdym z badanych przypadków najwięcej gatunków zidentyfikowano w próbach z bentosu, natomiast najmniej gatunków zidentyfikowano w próbach z planktonu. Analiza dla prób środowiskowych związanych z przypadkami ujawnienia zwłok pochodzących z rzeki Wisły, na odcinku 20 km, potwierdziła odrębność struktury zbiorowisk okrzemek w poszczególnych miejscach badanych przypadków. Analiza wskazała 50 gatunków okrzemek w największym stopniu decydujących o odmienności badanych miejsc. Gatunki te w różny sposób wskazywały na odrębność tych miejsc. Różne miejsca charakteryzowały się różną liczebnością tych samych gatunków, lub potwierdzono obecność gatunku w jednym miejscu, a brak w innym. Gatunkami obecnymi we wszystkich próbach środowiskowych, klasyfikowanych jako gatunki absolutnie stałe (euconstant species) były: *Melosira varians*, *Gomphonema parvulum*, *Cyclotella meneghiniana* i *Nitzschia palea*. Gatunkiem występującym w kilku miejscach/przypadkach była, między innymi, *Navicula salinarum*, preferująca wody o podwyższonym zasoleniu. Występowała ona w trzech próbach z badanych przypadków, jednak z różnym udziałem procentowym, co wyróżniało te miejsca spośród wszystkich innych. Informacje o gatunkach, których występowanie jest ograniczone do siedlisk o specyficznych warunkach abiotycznych jest wyjątkowo przydatne dla potwierdzenia lub wykluczenia, czy miejsce znalezienia zwłok było też miejsce utonięcia (Załącznik 2).

Przeprowadzone badania organów wewnętrznych zwłok osób, które utonęły, pod kątem obecności okrzemek wykazały ograniczenia dla wnioskowania. Po pierwsze zbyt mała liczba zidentyfikowanych okrzemek w narządach wewnętrznych, w tym badaniu w nerkach, jak i w szpiku żebra. Po drugie licznie występujące okrzemki w próbach pobranych z płuc lub z zawartości żołądka nie stanowią potwierdzenia utonięcia, ponieważ woda z okrzemkami do tych narządów może dostawać się biernie. Po trzecie, pomimo śmierci w wyniku utonięcia, w organach wewnętrznych nie stwierdza się okrzemek z powodu braku lub małej ich liczebności w akwenu, w którym nastąpiła absorpcja wody lub także w przypadku nagłej śmierci, natychmiast po dostaniu się do wody. Po czwarte czas, który upłynął od śmierci do możliwości poboru próby do analizy porównawczej, może wpłynąć na brak zgodności pomiędzy okrzemkami zidentyfikowanymi w narządach z tymi ze środowiska, co wynika ze zmian sezonowych. Po piąte ograniczeniem jest pobieranie prób jedynie z jednego, bardzo często niereprezentatywnego miejsca lub mikrosiedliska dla danego ekosystemu wodnego (Załącznik 2).

VI.4. Transfer okrzemek na odzież i utrzymanie się ich na niej

VI.4.1. Skarpety jako powszechnie używany element odzieży

Analizowano możliwość przeniesienia okrzemek na odzież, w postaci dwóch różnych rodzajów skarpet, wykonanych z bawełny oraz bambusa. W tym celu skarpety założone na stopy miały kontakt z trzema różnymi ekosystemami wodnymi, rzeka, rów melioracyjny i mokradło, w różnych przedziałach czasowych. We wszystkich przypadkach bez względu na rodzaj podłoża i czas kontaktu liczba zliczonych okryw pozyskanych ze skarpet znacznie przekraczała 500. Natomiast w preparatach wykonanych z prób uzyskanych ze skarpet, które po kontakcie z podłożem poddano suszeniu, a następnie praniu, stwierdzono okrywy okrzemek, przy czym dla prób z mokradła i rowu melioracyjnego okryw zliczono mniej niż 500. W tych przypadkach widoczna była zależność pomiędzy czasem kontaktu z podłożem a ilością stwierdzonych okryw w preparatach i dotyczy to obu rodzajów materiałów, z których skarpety były wykonane (**Załącznik 3**).

VI.4.2. Porównawcza analiza ilościowa i jakościowa okrzemek na skarpetach po kontakcie z ekosystemem wodnym

Analiza preparatów ze skarpet po kontakcie z trzema różnymi zbiornikami wodnymi wykazała podobieństwo zbiorowisk okrzemek z tymi, które wyizolowano z prób środowiskowych. Podobieństwo pomiędzy próbami było wysokie niezależnie od rodzaju materiału, z jakiego wykonane były skarpety. Zastosowane przedziały czasowe kontaktu skarpet z danym podłożem oraz fakt prania skarpet, dawały obraz zbiorowisk okrzemek z nich pozyskanych zgodny z próbami środowiskowymi. W próbach niezależnie od tego, czy były to próby środowiskowe, czy pozyskane z różnego rodzaju skarpet, po różnym czasie kontaktu ich z podłożem, uwzględniając fakt prania i nieprania, odnotowano te same okrzemki i w tych samych proporcjach jak w miejscach wybranych do doświadczenia (**Załącznik 3**).

VI.4.3. Wybrane materiały wykorzystywane do produkcji odzieży

Do badań użyto trzech różnych rodzajów materiałów takich jak, bawełna, zamsz oraz gąbka, które stanowiły podłoża do zasiedlania przez okrzemki. Każde z podłoży umieszczano w butelkach z tworzywa sztucznego, które następnie umieszczono w trzech typach środowisk,

dwóch wodnych (staw, rzeka) oraz glebowym. Czas eksperymentu to okres 6 tygodni powtórzony w trzech sezonach. Analiza zbiorowisk okrzemek wyekstrahowanych ze wszystkich substratów użytych w eksperymencie wykazała, że okrzemki składem ilościowym i jakościowym odzwierciedlały rodzaj ekosystemu niezależnie od pory roku. Powyższy eksperyment wskazuje, że różne typy materiałów po dłuższym kontakcie ze środowiskiem, w którym są okrzemki będą przez nie zasiedlane. Może to być pomocnym narzędziem w kryminalistyce, gdy dysponuje się materiałem dowodowym, który miał kontakt ze środowiskiem, w którym występują okrzemki (**Załącznik 3**).

VI.5. Analiza struktury zbiorowisk okrzemek w miarę oddalania się od zbiornika wodnego

Wyznaczone do badań transekty, w miarę oddalania się od trzech ekosystemów wodnych: rzeka, rów i mokradło, różniły się strukturą zbiorowisk okrzemek, zarówno pod względem ilościowym, jaki i jakościowym. Gatunkami stałymi we wszystkich transektach, jednak z różnym udziałem w poszczególnych próbach, były: *Planothidium frequentissimum*, *Eolimna minima*, *Nitzschia palea* oraz *Gomphonema parvulum*. Gatunkami wyróżniającymi dla transektu rzeka – łąd, były: *Stephanodiscus hantzschii*, *Cyclotella meneghiniana* i *Aulacoseira granulata*, które dominowały w środowisku wodnym, natomiast ich liczebność spadała wraz z oddalaniem się od brzegu rzeki. Natomiast gatunkami wyróżniającymi wodną i ladową część tego transektu były: *Navicula veneta*, *N. cincta* oraz *Halamphora montana*, przy czym wyższy udział tych gatunków stwierdzono w próbach glebowych transektu niż w próbach z rzeki. W próbach glebowych odnotowano występowanie *Mayamaea atomus* oraz *M. permissis*, które nie występowały w próbach z wody. Natomiast *Navicula gregaria* w próbach glebowych transektu rzeka – łąd wystąpiła dość licznie, a w próbach z wody wystąpiły pojedyncze jej okrywy. Odnotowanie tak dużej liczby okryw w próbkach glebowych dla tego transektu mogło być wynikiem tego, że miejsce poboru próbek glebowych znajduje się na terasie zalewowej.

Zaobserwowano także wyraźne zróżnicowanie zbiorowisk okrzemek pomiędzy dwiema częściami transektu rów melioracyjny – łąd. W próbach wodnych gatunkami wyróżniającymi były: *Achnanthes eutrophilum*, *Hippodonta capitata*, *Melosira varians*, *Meridion circulare*, *Navicula gregaria*, *Planothidium lanceolatum*, *Staurosira venter* i *Staurosirella pinnata*. Natomiast w próbach glebowych tego transektu wyróżniającymi gatunkami były: *Hantzschia amphioxys*, *Pinnularia borealis*, *P. obscura*, *Luticola ventricosa*, *L. mutica* oraz *Stauroneis phoenicenteron*. Należy zwrócić uwagę, że *Navicula gregaria* w transekcji rzeka – łąd

występowała licznie w próbach glebowych, a w transekcje rów – łąd w próbach glebowych jej nie odnotowano. Tu na uwagę zasługuje fakt, że próby glebowe transektu rzeka – łąd zbierane były z terasy zalewowej, na której do połowy wiosny najczęściej pozostaje woda, która wylewa z głównego koryta. Okrzemkami, które występują w części glebowej w transekcje rów – łąd i części glebowej w transekcje mokradło – łąd były: *Luticola mutica*, *Hantzschia abundans*, *Pinnularia isselana* i *P. marchica*. Natomiast gatunkami charakterystycznymi w części glebowej dla transektu mokradło – łąd, jednak nie notowanych w innych transektach, w częściach glebowych były: *Nitzschia acidoclinata*, *Pinnularia sinistra*, *Stauroneis thermicola* oraz *Nitzschia perminuta*. Gatunki te najliczniej reprezentowane były w największej odległości od wody. W próbach wodnych transektu mokradło gatunkami wyróżniającymi zbiorowiska okrzemek były: *Stauroneis kriegei*, *Gomphonema exilissimum*, *Eunotia bilunaris*, *Mayamaea petersenii* oraz *Navicula cryptocephala*.

W próbach glebowych w transektach wystąpiły gatunki charakterystyczne dla środowiska poddanego okresowemu wysychaniu lub z deficytem wody i zaliczane do gatunków aerofitycznych, jak na przykład gatunki z rodzaju *Luticola*, *Hantzschia* lub *Pinnularia borealis*. W środowiskach typowo wodnych są one bardzo rzadko notowane. (**Załącznik 3**).

VI.6. Struktura zbiorowisk okrzemek dwóch ekosystemów wodnych w bliskiej odległości, lotycznego i lenitycznego oraz gleby

W celu wykazania zróżnicowania struktury zbiorowisk okrzemek w dwóch ekosystemach wodnych i środowisku glebowym znajdujących się w bliskiej odległości, analizowano próby pobrane z trzech typów siedlisk: ze stawu i rzeki oraz próby glebowe z grobli o szerokości 3 metrów rozdzielającej staw i rzekę. Ogółem oznaczono 245 taksonów okrzemek, w tym w próbkach z gleby oznaczono 145 gatunków, z rzeki 175, a ze stawu 162. Odnotowano gatunki stałe i dominujące dla wszystkich typów siedlisk: *Staurosirella pinnata*, *Cocconeis pseudothumensis*, *Achnantheidium minutissimum*, *Planothidium lanceolatum*, *P. dubium*, *P. frequentissimum*. Natomiast gatunkami wyróżniającymi dla środowiska glebowego były: *Staurosirella lapponica* (0,7-7,2%, stały), *Fragilaria vaucheriae* (2,7-6,9%, stały), *Placoneis elginensis* (stały). Gatunkami wyróżniającymi dla stawu były: *Staurosira venter* i *Nitzschia linearis*, które w tym zbiorowisku były też gatunkami stałymi i dominującymi. Przeprowadzona analiza podobieństwa zbiorowisk okrzemek wykazała odrębność każdego z badanych siedlisk oraz wyraźne niepodobieństwo środowiska glebowego od pozostałych (**Załącznik 3**).

VI.7. Zróżnicowanie pomiędzy dwoma ekosystemami rzecznyymi na podstawie analizy struktury zbiorowisk okrzemek

Badania zbiorowisk okrzemek z siedmiu stanowisk, na rzece Narew i rzece Bug, były prowadzone co kwartał, przez dwa pełne sezony, od wiosny 2018 roku do zimy 2020 roku. Przenalizowano 210 prób, w których łącznie zidentyfikowano 293 taksony okrzemek. Skalowanie wielowymiarowe NMDS, przeprowadzone na podstawie analizy podobieństwa Bray-Curtisa, wykazało odrębność zbiorowisk okrzemek pomiędzy rzeką Narew i rzeką Bug. Próby z czterech stanowisk z rzeki Bug wykazały większe podobieństwo względem siebie niż próby z trzech stanowisk wyznaczonych na rzece Narew. Na podstawie analizy SIMPER niepodobieństwo prób pomiędzy rzeką Narew i rzeką Bug zostało określone na blisko 70%, na co głównie miały wpływ udziały procentowe w próbach następujących gatunków *Stephanodiscus hantzschii*, *Aulacoseira granulata*, *Cyclostephanos dubius*, *Cyclotella meneghiniana*, *Aulacoseira ambigua*, *Planothidium frequentissimum*, *Amphora pediculus*, *Cocconeis euglypta*, *C. placentula* oraz *Fragilaria vaucheriae*. Pomimo tego, że próby ze stanowisk na rzece Bug wykazały się większym podobieństwem, niż te ze stanowisk na rzece Narew, to analiza okrzemkowa wykazała również różnice pomiędzy stanowiskami, biorąc pod uwagę częstość występowania niektórych gatunków. Na przykład gatunki stałe dla stanowiska Dębe nie zostały stwierdzone w próbach z innych stanowisk lub obserwowano jedynie ich pojedyncze okrywy.

Próby z wytypowanych do badań stanowisk pobierane były nie tylko z potamoplanktonu, ale też z epifitonu, a także z podłoża bentosowych w postaci epipsammonu, epipelonu lub peryfitonu. Analiza struktury zbiorowisk okrzemek wykazała zróżnicowanie także na poziomie mikrosiedlisk. Na przykład na wybranych stanowiskach zarówno na rzece Narew, jak i rzece Bug zaobserwowano, że w przypadku niektórych gatunków okrzemek udział procentowy jest różny dla poszczególnych mikrosiedlisk.

Ponadto na podstawie analizy okrzemek dokonano charakterystyki ekologicznej stanowisk badawczych obu rzek. Obie rzeki wykazały się słabo zasadowym odczynem wody, są zeutrofizowane i obciążone materią organiczną. Przy czym w przypadku stanowisk na rzece Bug wody te wykazują stan hipertrofii. Natomiast w odniesieniu do zasolenia analizowane gatunki z prób pobranych ze stanowisk na obu rzekach w większości należały do oligohalobów. Z kolei zaś analiza okrzemek w odniesieniu do wilgotności wykazała, że większość zidentyfikowanych taksonów to gatunki wodne oraz tolerujące warunki aerofityczne.

Wcześniejsze prace na temat mapowania rzek obejmowały analizę okrzemek występujących jedynie w planktonie, z oznaczeniem ich do rodzajów. W przypadku badań na rzekach, Narew i Bug, analizowano też próby z różnych typów podłoży, w których okrzemki identyfikowano do poziomu gatunku. Dało to szerszą wiedzę o różnych miejscach i stanowiskach wód płynących, a oznaczenie okrzemek do poziomu gatunku warunkuje dokładność i rzetelność informacji, jaką uzyskuje się o konkretnym środowisku. Jest to szczególnie istotne w kontekście potwierdzenia, ewentualnie wykluczenia, czy miejsce znalezienia zwłok było też miejscem utonięcia. Trudnością w mapowaniu rzek z wykorzystaniem identyfikacji okrzemek do poziomu gatunku jest posiadanie umiejętności na poziomie eksperta, ale z punktu widzenia kryminalistycznego badania miejsca zdarzenia, przy opiniowaniu, takie właśnie umiejętności są pożądane (**Załącznik 4**).

VII. Wnioski – możliwości i uwagi krytyczne wobec wykorzystania wiedzy o różnorodności gatunkowej i ekologii okrzemek w kryminalistyce

1. Podczas pobierania próbek środowiskowych w kontekście wykorzystania okrzemek jako narzędzia pomocniczego przy diagnozowaniu utonięć oraz wykorzystaniu ich do wykluczenia bądź typowania miejsca utonięcia należy kierować się następującymi wskazaniemami (**Załącznik 2**):
 - Próbkę środowiskową powinny być pobierane w trakcie oględzin miejsca znalezienia zwłok, a do próbek powinna być dołączona informacja o czasie opóźnienia* (*po jakim czasie od oględzin pobierano próbki środowiskowe), co może wpływać na strukturę zbiorowiska okrzemek wynikającą ze zmian sezonowych w różnych typach ekosystemów.
 - W przypadku znalezienia zwłok w rzece, w której mogło dojść do ich przemieszczenia wraz z prądem wody, próby należy pobrać także powyżej miejsca znalezienia zwłok, w odległości zależnej od kształtu i zagospodarowania linii brzegowej do miejsca, w którym hipotetycznie mogła nastąpić absorpcja wody.
 - Pobieranie prób nie może być ograniczone tylko do formacji ekologicznej planktonu, a powinno dotyczyć także i próbek z epifitonu oraz próbek bentosowych. Wynika to z faktu, że zbiorowiska okrzemek mogą różnić się strukturą w zależności od mikrosiedliska, oraz faktu, że nie wiadomo, w którym konkretnie miejscu/mikrosiedlisku mogło dojść do aspiracji wody, na przykład z dna, z toni lub z makrofitów (**Załącznik 4**).
2. Materiał biologiczny człowieka w postaci narządów o zachowanej integralności, nerki, płuca oraz fragmentu żebra, do porównawczej analizy okrzemkowej powinien być pobierany podczas sekcji wykonywanej przez medyka sądowego lub anatomopatologa z zachowaniem zasad zapobiegania kontaminacji próby (**Załącznik 2**).
3. Badania na modelu zwierzęcym wykazały, że szpik kostny z żeber stanowi dobry materiał do analizy okrzemkowej w celu potwierdzenia utonięcia jako przyczyny śmierci w środowisku wodnym. Nawet długotrwałe zanurzenie materiału kostnego w wodzie daje możliwość badania go pod kątem obecności okrzemek. Należy jednak pamiętać, że tylko żebra, których integralność nie została naruszona, nadają się do diatomologicznej analizy. Każde uszkodzenie ciągłości struktury kości żeber może przyczynić się do biernej penetracji okrzemek do szpiku, co daje fałszywy obraz, a tym samym nie może być pomocne przy diagnozowaniu utonięcia jako przyczyny śmierci (**Załącznik 1**).

Wyniki badań oraz wnioski z nich płynące potwierdzają, że postawiona hipoteza badawcza: okrzemki są narzędziem wspomagającym w diagnozowaniu utonięć jest prawdziwa.

Wyniki badań oraz wnioski z nich płynące potwierdzają, że postawiona hipoteza badawcza: analiza struktury zbiorowisk okrzemek pozwala na potwierdzenie lub wykluczenie miejsca ujawnienia zwłok jako miejsca utonięcia jest prawdziwa.

4. Okrzemki mogą być wykorzystane do powiązania osób i rzeczy z danym środowiskiem ze względu na ich łatwy transfer na różne materiały nawet po krótkim kontakcie ze środowiskiem wodnym i glebowym oraz ze względu na ich utrzymanie na materiale po transferze, także przy próbach ich usunięcia na przykład w wyniku prania (**Załącznik 3**).
5. Okrzemki mogą być wykorzystane do powiązania osób i rzeczy z danym środowiskiem ze względu na odmienną strukturę zbiorowisk okrzemek w różnych typach siedlisk, nawet jeśli siedliska te są zlokalizowane blisko siebie (**Załącznik 3**) oraz różnych stanowisk i mikrosiedlisk w tym samym ekosystemie rzeczonym (**Załącznik 4**).

Wyniki badań oraz wnioski z nich płynące potwierdzają, że postawiona hipoteza badawcza: analiza struktury zbiorowisk okrzemek pozwala na powiązanie osób lub rzeczy z ekosystemem, a nawet z siedliskiem jest prawdziwa.

Wyniki badań oraz wnioski z nich płynące potwierdzają, że postawiona hipoteza badawcza: mapowanie rzek pod kątem struktury zbiorowisk okrzemek może być wykorzystane w kryminalistyce jest prawdziwa.

6. Próby środowiskowe z ekosystemów wodnych i glebowych oraz z materiału dowodowego, potencjalnie zawierające okrzemki, powinny być pobierane zgodnie z metodyką wypracowaną podczas warsztatów seminaryjnych prowadzonych dla funkcjonariuszy policji. Metody te zostały dopracowane tak, aby spełniały wymagania dotyczące zapewnienia zróżnicowania dostępnego materiału okrzemkowego ze środowiska do analiz porównawczych, jednocześnie uwzględniając procedury i możliwości techniczne podczas oględzin (**Załącznik 5**).

VIII. Streszczenie/Summary

Okrzemki (Bacillariophyta) to powszechnie występujące w środowisku fotoautotroficzne organizmy jednokomórkowe, które wykształciły wiele przystosowawczych cech pozwalających na życie w różnych ekosystemach wodnych. Ich wysycona krzemionką ściana komórkowa stanowiąca zarazem egzoszkielet jest niezwykle odporna na czynniki fizyczne i chemiczne między innymi takie jak: mocne kwasy nieorganiczne, perhydrol oraz wysoka temperatura. Ponadto struktura tego pancerzyka posiada liczne cechy morfologiczne pozwalające na identyfikację okrzemek do poziomu gatunku. Okrzemki występują we wszystkich ekosystemach, w których woda jest dostępna lub panują odpowiednie warunki wilgotnościowe, spotykamy je także w skrajnych warunkach środowiskowych, a ich skład ilościowy i jakościowy jest odzwierciedlaniem warunków. Autekologia okrzemek oraz różnorodność gatunkowa, to cechy predysponujące do wykorzystania okrzemek w kryminalistyce. W tym aspekcie diatomologia stanowiąc specjalność biologii środowiskowej niesie korzyści dla kryminalistyki i daje wiele możliwości w zwalczaniu przestępczości. Wykorzystanie okrzemek w medycynie sądowej datuje się od początku XX wieku, kiedy Revenstorf (1904) wykrył okrzemki w płucach ofiary utonięcia. Od tamtego czasu okrzemki wykorzystywano jako pomocne narzędzie przy diagnozowaniu utonięć. Pojawiało się też sporo pytań i wątpliwości, które przyczyniły się do prowadzenia badań i eksperymentów w zakresie wykorzystania okrzemek w medycynie sądowej. Analizowano obecność okrzemek nie tylko w płucach, ale też w innych narządach, takich jak nerki, żołądek, wątroba oraz szpik kostny, a także prowadzone były badania porównawcze z próbami środowiskowymi pobranymi z miejsc znalezienia zwłok ludzkich. Dzięki tym badaniom wiemy, że okrzemki nie tylko stanowią narzędzie pomocne przy diagnozowaniu utonięć, a także umożliwiają potwierdzenie, wykluczenie oraz typowanie miejsca utonięcia. Okazuje się, że szpik kostny, szczególnie żebra, może być idealnym narzędziem do analizy okrzemkowej w celu potwierdzenia utonięcia jako przyczyny śmierci. W związku z tą metodą pojawiały się też głosy sceptyczne, głównie dotyczące sytuacji, gdy zwłoki na skutek długotrwałego przebywania w wodzie uległy procesowi rozkładu. Dlatego też prowadzono badania, których celem było sprawdzenie, czy okrzemki mogą biernie przenikać do szpiku kostnego żeber w przypadku długotrwałego przebywania szczątków ludzkich w wodzie. Badania nad żebrami, wykorzystując model zwierzęcy, wykluczyły możliwość biernej penetracji okrzemek do szpiku kostnego, a co za tym idzie – potwierdzały przydatność badań żeber w okrzemkowej ocenie utonięcia.

Różnorodność gatunkowa okrzemek oraz fakt zasiedlania praktycznie wszystkich środowisk wodnych i wilgotnych były podstawą do prowadzenia badań nad możliwościami wykorzystania ich przy powiązaniu osób i rzeczy z konkretnym środowiskiem. Dzięki badaniom okrzemek prowadzonym w transekcje woda-łąd w miarę oddalania się od zbiornika wodnego zaobserwowano zmiany jakościowe i ilościowe zachodzące w strukturze zbiorowisk okrzemek. Także badania okrzemek z prób pobranych z różnych środowisk, wodnych i glebowych, zlokalizowanych w niewielkiej odległości od siebie wykazały, że struktura zbiorowisk okrzemek tych środowisk jest różna. Powyższe analizy mogą być podstawą do wykorzystania ich w procesie wykrywczym, a tym samym mają istotne znaczenie w kryminalistyce.

Prowadzone badania nad transferem oraz utrzymaniem się okrzemek na różnych materiałach tekstylnych wyraźnie pokazały, że okrzemki nie tylko się na nie przenoszą i utrzymują, ale swym składem ilościowym i jakościowym odzwierciedlają środowisko, z którym dany materiał miał kontakt. W tym przypadku nawet proces prania nie usunął okrzemek z materiału, a ich analiza potwierdziła kontakt z konkretnym środowiskiem. Pomimo tego, że okrzemki wykazują preferencje do konkretnych siedlisk, to prowadzone badania nad zasiedlaniem różnych materiałów użytkowych wykazały, że struktura zbiorowisk okrzemek, które zasiedlały różne materiały, swym składem ilościowym i jakościowym odzwierciedlała środowisko. Ponadto rodzaj materiału nie miał znaczenia w jego zasiedlaniu. Przeprowadzone badania potwierdziły, że okrzemki mogą być doskonałym narzędziem dla organów ścigania, by potwierdzić, wykluczyć lub wytypować miejsce, z którym podejrzany miał kontakt.

Prowadzone liczne badania w zakresie zróżnicowania jakościowego i ilościowego struktury zbiorowisk okrzemek w ekosystemach wodnych przynoszą informacje o środowisku, a szczególnie o zmianach jakie w nim zachodzą. Dlatego też ta grupa glonów stanowi idealne narzędzie do oceny oraz predykcji na temat badanego ekosystemu. Ich szybka odpowiedź na zmiany środowiskowe w postaci przebudowy zbiorowisk okrzemek stanowi podstawę do wykorzystania ich jako bioindykatorów warunków środowiska. Jednak dla potrzeb kryminalistyki, szybka reakcja okrzemek na zmiany zachodzące w środowisku może być zarówno zaletą, jak i wadą. Zaletą jest gdy materiał środowiskowy zawierający potencjalnie okrzemki jest pobierany dla potrzeb postępowania kryminalistycznego niezwłocznie po zdarzeniu. Wadą natomiast jest wówczas, gdy mija dłuższy czas pomiędzy zdarzeniem a pobieraniem prób okrzemek do badań porównawczych, co związane jest ze zmianami sezonowymi i wpływem antropogenicznym.

Mapowanie ekosystemów wodnych pod kątem analizy okrzemkowej w celu zbadania jak kształtuje się struktura zbiorowisk okrzemek w kontekście na przykład zmian wynikających z sezonowości, to kolejny krok w kierunku rozwoju diatomologii kryminalistycznej, ponieważ informacje te mogą na przykład być podstawą do wskazania miejsca utonięcia.

W celu prawidłowego zabezpieczenia materiału, który może być przedmiotem badań diatomologicznych dla potrzeb kryminalistyki powstała metodyka zawierająca praktyczne wskazówki i zalecenia dedykowane funkcjonariuszom zabezpieczającym materiał dowodowy i porównawczy na miejscu zdarzenia.

Wymagania środowiskowe okrzemek, ich możliwości przystosowawcze oraz ich zdolność odbudowania struktury zbiorowiska zaburzonego w wyniku zmian środowiskowych to cechy, które mogą przynieść korzyści dla kryminalistyki przy diagnozowaniu utonięć, typowaniu, potwierdzeniu i wykluczeniu miejsca utonięcia oraz powiązania podejrzanego lub ofiary z konkretnym środowiskiem.

Summary

Diatoms (Bacillariophyta) are commonly occurring photoautotrophic unicellular organisms in the environment that have developed many adaptive features that allow them to live in a variety of aquatic ecosystems. Their silicon-rich cell wall, which also constitutes their exoskeleton, is extremely resistant to physical and chemical factors, including strong inorganic acids, hydrogen peroxide, and high temperatures. Furthermore, the structure of this exoskeleton has numerous morphological features that allow for the identification of diatoms down to the species level. Diatoms are found in all ecosystems where water is available or where appropriate humidity conditions prevail, and they can also be found in extreme environmental conditions, with their quantitative and qualitative composition reflecting these conditions. The autecology of diatoms and their species diversity make them suitable for use in forensics. In this aspect, diatomology, as a specialty of environmental biology, brings benefits to forensics and offers many opportunities in combating crime. The use of diatoms in forensic medicine dates back to the early 20th century when Revenstorf (1904) detected diatoms in the lungs of a drowning victim. Since then, diatoms have been used as a helpful tool in diagnosing drownings. There have also been many questions and doubts that have led to research and experiments regarding the use of diatoms in forensic medicine. The presence of diatoms has been analyzed not only in the lungs but also in other organs, such as the kidneys, stomach, liver, and bone marrow, and comparative studies have been conducted with environmental

samples taken from the sites where human remains were found. Owing to these studies, we know that diatoms not only serve as a tool in diagnosing drownings but also enable the confirmation, exclusion, and identification of the drowning site. It turns out that bone marrow, especially from the ribs, can be an excellent tool for diatom analysis to confirm drowning as the cause of death. However, there have been skeptical voices regarding this method, mainly concerning situations where corpses that have been in water for a long time have undergone decomposition. Therefore, studies were conducted to determine whether diatoms can passively penetrate the bone marrow of ribs when human remains are submerged in water for an extended period. Research on ribs, using an animal model, excluded the possibility of passive penetration of diatoms into the bone marrow, thereby confirming the usefulness of rib studies in diatom assessment of drowning.

The species diversity of diatoms and the fact that they inhabit practically all aquatic and moist environments formed the basis for conducting research on their potential use in linking individuals and objects to specific environments. Through studies of diatoms conducted in a water-land transect, changes in the qualitative and quantitative structure of diatom communities were observed as the distance from the water body increased. Additionally, studies of diatoms from samples taken from various aquatic and soil environments located in close proximity to each other showed that the structure of diatom communities in these environments is different. The analyses mentioned above may serve as a basis for using them in detection processes, and thus they have significant implications in forensics.

Research on the transfer and persistence of diatoms on various textile materials has clearly shown that diatoms not only transfer and persist on these materials but also reflect the environment with which the material has come into contact through their quantitative and qualitative composition. In this case, even the washing process did not remove diatoms from the material, and their analysis confirmed contact with a specific environment. Despite diatoms showing preferences for specific habitats, studies on the colonization of various usable materials have demonstrated that the structure of diatom communities inhabiting different materials reflects the environment in terms of both quantity and quality. Furthermore, the type of material did not matter in terms of colonization. The conducted studies confirmed that diatoms can be an excellent tool for law enforcement to confirm, exclude, or identify the location with which a suspect had contact.

Numerous studies on the qualitative and quantitative diversity of diatom communities in aquatic ecosystems provide information about the environment, particularly regarding changes occurring within it. Therefore, this group of algae serves as an ideal tool for assessing

and predicting the state of the studied ecosystem. Their rapid response to environmental changes, manifested in the restructuring of diatom communities, forms the basis for using them as bioindicators of environmental conditions. However, for forensic purposes, the quick reaction of diatoms to environmental changes can be both an advantage and a disadvantage. The advantage arises when environmental material containing potentially diatoms is collected for forensic proceedings immediately after an event. The disadvantage occurs when a longer time elapses between the event and the collection of diatom samples for comparative studies, which is related to seasonal changes and anthropogenic influences.

Mapping aquatic ecosystems for diatom analysis to investigate how the structure of diatom communities is shaped, for example, by seasonal changes, is another step towards the development of forensic diatomology, as this information could, for instance, be the basis for indicating a drowning site.

To properly secure material that may be subject to diatomological research for forensic purposes, a methodology has been developed containing practical guidelines and recommendations dedicated to officers securing evidence and comparative material at the scene.

The environmental requirements of diatoms, their adaptive capabilities, and their ability to rebuild the structure of a community disrupted by environmental changes are features that can benefit forensics in diagnosing drownings, identifying, confirming, and excluding drowning sites, as well as linking a suspect or victim to a specific

IX. Literatura uzupełniająca:

- Baillet B., Apothéloz-Perret-Gentil L., Baričević A., Chonova T., Franc A., Frigerio J.F., Kelly M., Mora D., Pfannkuchen M., Proft S., Ramon M., Vasselon V., Zimmermann J., Kahlert M. 2020. Diatom DNA metabarcoding for ecological assessment: Comparison among bioinformatics pipelines used in six European countries reveals the need for standardization. *Science of The Total Environment*, 745. doi:10.1016/j.scitotenv.2020.140948.
- Basu S., Patil S., Mapleson D., Russo M.T., Vitale L., Fevola C., Maumus F., Casotti R., Mock T., Caccamo M., Montresor M., Sanges R., Ferrante M.I. 2017. Finding a partner in the ocean: molecular and evolutionary bases of the response to sexual cues in a potamoplanktonic diatom. *New Phytologist*, 215(1):140-156. doi:10.1111/nph.14557.
- Bąk M., Witkowski A., Dobosz S., Kocielek J.P., Pietras L. 2018. Diatoms and drowning: can diatoms enter the lungs after the initial drowning event? *Romanian Society of Legal Medicine*, 26:29-36. doi:10.4323/rjlm.2018.29.
- B-Béres V., Tóthmérész B., Bácsi I., Borics G., Abonyi A., Tapolczai K., Rimet F., Bouchez A., Várbíró G., Török P. 2019. Autumn drought drives functional diversity of benthic diatom assemblages of continental streams. *Advances in Water Resources*, 126:129-136. doi: 10.1016/j.advwatres.2019.02.010.
- B-Béres V., Kókai Z., Várbíró G., Mustazhapova G., Csabai Z., Perneckner B., Borics G., Bácsi I., Boda P. 2022. Flow intermittence drives the benthic algal composition, biodiversity and diatom-based quality of small hilly streams in the Pannonian Ecoregion, Hungary. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 10:834548. doi:10.3389/fevo.2022.834548.
- Brüschweiler W., Braun M., Dirnhofer R., Thali M.J. 2003. Analysis of patterned injuries and injury-causing instruments with forensic 3D/CAD supported photogrammetry (FPHG): an instruction manual for the documentation process. *Forensic Science International*, 132(2):130-138. doi: 10.1016/s0379-0738(03)00006-9.
- Carayon D., Tison J., Delmas R.F. 2019. Defining a new autecological trait matrix for French stream benthic diatoms. *Ecological Indicators*, 103:650-658, doi:10.1016/j.ecolind.2019.03.055.
- Chao M., Runbo C., Yongxu D., Nannan Z., Yan L., Fengyang S., Yawen F., Xinxin L. 2023. Differences in biodiversity and assembly mechanisms between planktonic and benthic diatom communities in riverine ecosystems: A case study in the Ashi river. *Ecological Indicators*, 157:111258. doi: 10.1016/j.ecolind.2023.111258.
- Chepurnov V.A.; Mann D.G.; Sabbe K.; Vyverman W. 2004. Experimental studies on sexual reproduction in diatoms. *International Review of Cytology* 237:91- doi:10.1016/s0074-7696(04)37003-8.
- Chonova T., Kurmayer R., Rimet F., Labanowski J., Vasselon V., Keck F., Illmer P., Bouchez A. 2019. Benthic diatom communities in an Alpine river impacted by waste water treatment effluents as revealed using DNA metabarcoding. *Frontiers in Microbiology*, 10:653. doi: 10.3389/fmicb.2019.00653.
- Delabarde T., Keyser C., Tracqui A., Charabidze D., Ludes B. 2013. The potential of forensic analysis on human bones found in riverine environment. *Forensic Science International*, 228:1-5doi:10.1016/j.forsciint.2013.03.019.
- Denys L. 1991. A check list of the diatoms in the Holocene deposits of the western Belgian coastal plain, with a survey of their apparent ecological requirements. I. Introduction, ecological code and complete list. *Professional Paper Belgische Geologische Dienst*; 246:1-41.

- Edgar L.A., Pickett-Heaps J.D. 1983. The mechanism of diatom locomotion. I. An ultrastructural study of the motility apparatus. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 218(1212):331-343.
- Edgar L.A., Zavortink M. 1983. The mechanism of diatom locomotion. II: identification of actin. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 218(1212):345-348.
- Fan J., Li F., Hu S., Gao K., Xu J. 2023. Larger diatoms are more sensitive to temperature changes and prone to succumb to warming stress. *Limnology and Oceanography*, 68:2512-2528. doi: 10.1002/lno.12438.
- Feijão E., Gameiro C., Franzitta M., Duarte B., Caçador I., Cabrita M.T., Matos A.R. 2018. Heat wave impacts on the model diatom *Phaeodactylum tricornutum*: Searching for photochemical and fatty acid biomarkers of thermal stress. *Ecological Indicators*, 95:1026-1037. doi: 10.1016/j.ecolind.2017.07.058.
- Genkal S.I., Kulikovskiy M.S. 2015. Morphology and distribution of the North American diatom *Aulacoseira parvula* English & Potapova in Russia. *Inland Water Biology*, 9(4):355-358. doi: 10.1134/S1995082916040052.
- Gillard J., Frenkel J., Devos V., Sabbe K., Paul C., Rempt M., Inzé D., Pohnert G., Vuylsteke M., Vyverman W. 2013. Metabolomics enables the structure elucidation of a diatom sex pheromone. *Angewandte Chemie International Edition*, 14:52(3): 854-7. doi:10.1002/anie.201208175.
- Godhe A., Kremp A., Montresor M. 2014. Genetic and microscopic evidence for sexual reproduction in the centric diatom *Skeletonema marinoi*. *Protist.*, 165(4):401-416, doi: 10.1016/j.protis.2014.04.006.
- Håkansson S. 1993. Numerical methods for the inference of pH variations in mesotrophic and eutrophic lakes in Southern Sweden - A progress report. *Diatom Research*, 8:349-370.
- Hanausek T., Sławik K. 1995. Wprowadzenie do kryminalistyki i kryminologii, wyd. I, Bydgoszcz: Oficyna Wydawnicza „BRANTA”, 7-10.
- Hattich G.S.I., Jokinen S., Sildever S., Gareis M., Heikkinen J. Junghardt N., Segovia M., Machado M., Sjöqvist C. 2024. Temperature optima of a natural diatom population increases as global warming proceeds. *Nature Climate Change*, 14(5):1-8, 14:518–525. doi: 10.1038/s41558-024-01981-9.
- Hejduková E., Kollár J., Nedbalová L. 2024. Freezing stress tolerance of benthic freshwater diatoms from the genus *Pinnularia*: Comparison of strains from polar, alpine, and temperate habitats. *Journal of Phycology*, 60:1105-1120. doi: 10.1111/jpy.13486.
- Hildebrand M., Lerch S.J.L., Shrestha R.P. 2018. Understanding diatom cell wall silicification – moving forward. *Frontiers in Marine Science*, 5: 125. doi: 10.3389/fmars.2018.00125.
- Hürlimann J., Feer P., Elber F., Niederberger K., Dirnhofer R., Wyler D. 2000. Diatom detection in the diagnosis of death by drowning. *International Journal of Legal Medicine.*, 114:6-14. doi:10.1007/s004149900122.
- Incze G. 1942. Fremdkörper in Blutkreislauf Ertrunkener. *Zentralbl. Allg. Pathol. Pathol. Anat.*, 79:176.
- Jung S.W., Han M.S., Ki J.S. 2009. Molecular genetic divergence of the centric diatom *Cyclotella* and *Discostella* (Bacillariophyceae) revealed by nuclear ribosomal DNA comparisons. *Journal of Applied Phycology*, 22(3):319-329. doi:10.1007/s10811-009-9462-5.
- Kakizaki E., Kozawa S., Sakai M. Yukawa N. 2011. Numbers, sizes, and types of diatoms around estuaries for a diatom test. *The American Journal of Forensic Medicine and Pathology*, 32:269-274. doi:10.1097/paf.0b013e318221b857.
- Kamp A, de Beer D, Nitsch J.L, Lavik G, Stief P. 2011. Diatoms respire nitrate to survive dark

- and anoxic conditions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(14): 5649-5654. doi:10.1073/pnas.1015744108.
- Kawecka B., Eloranta P.V. 1994. *Zarys ekologii glonów wód słodkich i środowisk lądowych*. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa.
- Krstic S., Duma A., Janevska B., Levkov Z., Nikolova K., Noveska M., 2002. Diatoms in forensic expertise of drowning—a Macedonian experience, *Forensic Science International*, 127:198-203. doi:10.1016/S0379-0738(02)00125-
- Lange-Bertalot H., Moser G. 1994. *Brachysira*, Monographie der Gattung und Naviculadicta nov. gen. *Bibliotheca Diatomologica*, J. Cramer, Berlin-Stuttgart, 29.
- Lee M.A., Faria D.G., Han M.S., Lee J., Ki J.S. 2013. Evaluation of nuclear ribosomal RNA and chloroplast gene markers for the DNA taxonomy of centric diatoms. *Biochemical Systematics and Ecology*, 50(63): 163-174. doi: 10.1016/j.bse.2013.03.025.
- Levin E.A., Morgan R.M., Jones V.J. 2017. The transfer of diatoms from freshwater to footwear materials: an experimental study assessing transfer, persistence, and extraction methods for forensic reconstruction. *Science and Justice*, 57(5): 349-60. doi: 10.1016/j.scijus.2017.05.005.
- Lobo E.A., Kitazawa S. Kobayasi H. 1990. The use of scanning electron microscopy as a necessary complement of light microscopy diatom examination for ecological studies. *Diatom*, 5:33-43. doi.org/10.11464/diatom1985.5.0_33.
- Lobo E.A., Heinrich C.G., Schuch M., Wetzel C.E., Ector L. 2016. Diatoms as Bioindicators in Rivers. [W] Necchi JR, O. (red.) *River Algae*. Springer, Cham. doi: 10.1007/978-3-319-31984-1_11.
- Ludes B., Quantin S., Coste M., Mangin P. 1994. Application of a simple enzymatic digestion method for diatom detection in the diagnosis of drowning in putrified corpses by diatom analysis. *International Journal of Legal Medicine*, 107(1): 37-41. doi:10.1007/BF01247273.
- Ludes B., Coste M., North N., Doray S., Tracqui A., Kintz P. 1999. Diatom analysis in victim's tissues as an indicator of the site of drowning. *International Journal of Legal Medicine*, 112(3):163-166. doi: 10.1007/s00414005022414.
- Lunetta P., Penttilä A., Hällfors G. 1998. Scanning and transmission electron microscopical evidence of the capacity of diatoms to penetrate the alveolo-capillary barrier in drowning. *International Journal of Legal Medicine*, 111(5):229-237. doi: 10.1007/s004140050159.
- Macklin M.G., Lewin J. 2019. River stresses in anthropogenic times: Large-scale global patterns and extended environmental timelines *Progress in Physical Geography: Earth and Environment*, 43:3-23. doi: 10.1177/030913331880301, 3/.
- Maeda H., Ishikawa T., Michiue T. 2011. Forensic biochemistry for functional investigation of death: Concept and practical application. *Legal Medicine*, 13(2): 55-67. doi:10.1016/j.legalmed.2010.12.005.
- Maeda Y., Nojima D., Yoshino T., Tanaka T. 2017. Structure and properties of oil bodies in diatoms. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 372. doi:10.1098/rstb.2016.0408.
- Magni P.A., Mohar M., Vadiveloo A., Moheimani N.R. 2020. Transferability of Australian diatoms to clothing –assessment of several extraction methods on different fabric types under laboratory conditions. *Forensic Science International*, 312 doi: 10.1016/j.forsciint.2020.110297.
- Medlin L.K., Williams D.M., Sims P.A. 1993. The evolution of the diatoms (Bacillariophyta). I. Origin of the group and assessment of the monophyly of its major divisions. *European Journal of Phycology*, 28(4): 261-275. doi:10.1080/09670269300650381.
- Medlin L.K., Kaczmarska I. 2004. Evolution of the diatoms: V. Morphological and cytological

- support for the major clades and a taxonomic revision. *Phycologia*, 43(3): 245-270. doi: 10.2216/i0031-8884-43-3-245.1.
- Mikulewicz M., Chojnacka K., Szykowska M.I. 2014. How Toxicology Impacts Other Sciences, Editor(s): Philip Wexler, *Encyclopedia of Toxicology* (Third Edition), Academic Press, 746-749, doi: 10.1016/B978-0-12-386454-3.00456-5.
- Molino P.J., Wetherbee R. 2008. The biology of biofouling diatoms and their role in the development of microbial slimes. *Biofouling*, 24(5):365-379. doi:10.1080/08927010802254583.
- Molino P.J., Chiovitti A., Higgins M.J., Dugdale T.M., Wetherbee R. 2016. Diatom adhesives: molecular and mechanical properties. [W]: Smith, A. (red) *Biological Adhesives*. Springer, Cham. doi:10.1007/978-3-319-46082-6_3.
- Montresor M., Vitale L., D'Alelio D.; Ferrante M.I. 2016. Sex in marine potamoplanktonic diatoms: Insights and challenges. *Perspectives in Phycology*, 3:61-75. doi:10.1127/pip/2016/0045.
- Morales E.A. Siver P. Trainor F.R. 2001. Identification of diatoms (Bacillariophyceae) during ecological assessments: comparison between light microscopy and scanning electron microscopy techniques. *Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia*, 151:95-103. doi: 10.1635/0097-3157(2001)151
- Munteanu N. 2023. A Diatom Spring. <https://themeaninofwater.com>. April 16, 2023.
- Nicolosi Gelis M.M., Mujica M.A., Pecile A., Donadelli J., Simonetti M., Gómez N., Cocherio J. 2020. Diatom motility and nuclear alterations are affected by sediment elutriates of agricultural streams. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 205: doi:10.1016/j.ecoenv.2020.111322.
- Noga T., Kochman N., Peszek Ł., Stanek-Tarkowska J., Pajęczek A. 2014. Diatoms (Bacillariophyceae) in rivers and streams and on cultivated soils of the Podkarpacie region in the years 2007–2011. *Journal of Ecological Engineering*, 15(1): 6-25. doi: 10.12911/22998993.1084168.
- Nojima D., Nonoyama T., Yoshino T., Tanaka T. 2017. Lipid droplet dynamics in microalgae revealed by proteomic analysis. *Perspectives in Phycology*, 4: 25-32. doi: 10.1127/pip/2017/0069.
- Pandey L.K., Bergey E.A., Lyu J. 2017. The use of diatoms in ecotoxicology and bioassessment: Insights, advances and challenges. *Water Research*, 118:39-58. doi: 10.1016/j.watres.2017.01.062.
- Passy S.I. 2007. Diatom ecological guilds display distinct and predictable behavior along nutrient and disturbance gradients in running waters. *Aquatic Botany*, 86: 171-178. doi: 10.1016/j.aquabot.2006.09.018.
- Peabody A.J. 1977. Diatoms in forensic science. *Journal of the Forensic Science Society*, 17:81-87.
- Piette M.H., De Letter E.A. 2006. Drowning: still a difficult autopsy diagnosis. *Forensic Science International*, 163:1-9. doi:10.1016/j.forsciint.2004.10.027.
- Pliński M., Witkowski A. 2009. Okrzemki-Bacillariophyta (Diatoms). *Flora Zatoki Gdańskiej i wód przyległych (Bałtyk Południowy)*, Uniwersytet Gdański.
- Pollanen M.S. 1998. *Forensic diatomology and drowning*. Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 45-62.
- Potapova M. 2011. Patterns of diatom distribution in relations to salinity. [W]: Stoermer E.F., Smol J.P., (red.) *The diatoms: applications for the environmental and earth sciences*. Cambridge, UK:Cambridge University Press.
- Potapova M., Charles D. F. 2007. Diatom metrics for monitoring eutrophication in rivers of the United States. *Ecological Indicators*, 7(1): 48-70. doi: 10.1016/j.ecolind.2005.10.001.

- Prins A., Deleris P., Hubas C., Jesus B. 2020. Effect of light intensity and light quality on diatom behavioral and physiological photoprotection. *Frontiers in Marine Science*, 7:203. doi: 10.3389/fmars.2020.00203.
- Quevedo-Ortiz G., Fernández-Calero J.M., Cañedo-Argüelles M. 2024. An experimental study to assess resistance and resilience strategies of freshwater diatoms to cope with drying in Mediterranean temporary rivers. *Hydrobiologia*, 851: 4293-4306. doi: 10.1007/s10750-024-05585-4.
- Revenstorf V. 1904. Der Nachweis der aspirierten Ertrankungs flüssigkeit als Kriterium des Todes. *Gerichtl. Med.*, 28:274-279.
- Rivera S.F., Vasselon V., Jacquet, S. 2018. Metabarcoding of lake benthic diatoms: from structure assemblages to ecological assessment. *Hydrobiologia*, 807: 37-51. doi: 10.1007/s10750-017-3381-2.
- Rivera S.F., Vasselon V., Bouchez A., Rimet F. 2020. Diatom metabarcoding applied to large scale monitoring networks: Optimization of bioinformatics strategies using Mothur software. *Ecological Indicators*, 109. doi: 10.1016/j.ecolind.2019.105775.
- Rodríguez-Miret X., Del Carmen Trapote M., Sigró J., Vegas-Vilarrúbia T. 2023. Diatom responses to warming, heavy rains and human impact in a Mediterranean lake since the preindustrial period. *Science of the Total Environment* 884. doi:10.1016/j.scitotenv.2023.163685.
- Round F.E., Crawford R.M., Mann D.G. 1990. *The Diatoms: Biology and Morphology of the Genera*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Scalco E., Stec K., Iudicone D., Ferrante M.I., Montresor M. 2014. The dynamics of sexual phase in the marine diatom *Pseudo-nitzschia multistriata* (Bacillariophyceae). *Journal of Phycology*, 50(5): 817-28. doi: 10.1111/jpy.12225.
- Schmid A.M.M. 1988. The special Golgi-ER-mitochondrion unit in the diatom genus *Coscinodiscus*. *Plant Systematics and Evolution*, 158(2/4): 211–223. <http://www.jstor.org/stable/23674094>.
- Schmid A.M.M. 1994. Aspects of morphogenesis and function of diatom cell walls with implications for taxonomy. *Protoplasma*, 181:43–60. doi: 10.1007/BF01666388.
- Scott K.R., Morgan R.M., Jones V.J., Cameron N.G. 2014. The transferability of diatoms to clothing and the methods appropriate for their collection and analysis in forensic geoscience. *Forensic Science International*, 241: 127-37. doi:10.1016/j.forsciint.2014.05.011.
- Scott K.R., Morgan R.M., Jones V.J., Cameron N.G. 2019. Freshwater diatom transfer to clothing: spatial and temporal influences on trace evidence in forensic reconstructions. *Science and Justice*, 59(3): 292-305. doi:10.1016/j.scijus.2018.11.004.
- Serieyssol K.K. 2013. Species composition and distribution of diatom assemblages in spring waters from various geological formation in southern Poland. *Diatom Research*, 28(4): 519. doi: 10.1080/0269249X.2013.856071.
- Souffreau C., Verbruggen H., Wolfe A.P., Vanormelingena P., Siverd P.A., Cox E.J., Mannf D.G., Van de Vijverg B., Sabbea K., Vyverman W. 2011. A time-calibrated multi-gene phylogeny of the diatom genus *Pinnularia* *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 61: 866–879. doi: 10.1016/j.ympev.2011.08.031.
- Stevenson R. J., Yangdong P., Van Dam H. 2010. Assessing environmental conditions in rivers and streams with diatoms. *The Diatoms: Applications for the environmental and earth sciences*. Ed. John P. Smol and Eugene F. Stoermer. Cambridge: Cambridge University Press., 57–85.
- Stoermer E.F., Smol J.P. 1999. Applications and uses of diatoms: prologue. *The diatoms: Applications for the environmental and earth sciences*, 3-10.

- Szczepocka E., Nowicka-Krawczyk P., Knysak P., Żelazna-Wieczorek J. 2016. Long term urban impacts on the ecological status of a lowland river as determined by diatom indices. *Aquatic Ecosystem Health & Management*, 19(1): 19-28. doi:10.1080/14634988.2016.1145029.
- Szczepocka E., Żelazna-Wieczorek J., Zakrzewski P.K. 2024. Impact of urbanization-driven changes of the riverbeds on its ecological status evidenced by diatom communities – The negative side of the Anthropocene. *Ecological Indicators*, 159: doi:10.1016/j.ecolind.2024.111706.
- Tamasaka L. 1949. Vizihullak csontvelőjének diatomtartalmáról (Diatom content of bone marrow in corpses in water). *Orv. Hetil.*, 16:509-511.
- Tambuzzi S., Gentile G., Zoia R. 2024. Forensic diatom analysis: where do we stand and what are the latest diagnostic advances? *Diagnostics*, 14(20): 2302. doi:10.3390/diagnostics14202302.
- Walsh G., Wepener V. 2009. The influence of land use on water quality and diatom community structures in urban and agriculturally stressed rivers. *Water SA*, 35:579-594.
- Wang J., Cao S., Du C. 2013. Underwater locomotion strategy by a benthic pennate diatom *Navicula* sp. *Protoplasma*, 250: 1203-1212. doi: 10.1007/s00709-013-0502-2.
- Williams D.M., Kociołek J.P. 2011. An overview of diatom classification with some prospects for the future. [W] *The diatom world*. Springer.
- Witkowski A., Żelazna-Wieczorek J., Solak C.N., Kulikovskiy M. 2014. Morphology, ecology and distribution of the diatom (Bacillariophyceae) species *Simonsenia delognei* (Grunow) Lange-Bertalot. *Oceanological and Hydrobiological Studies*, 43(4): 393-401. doi.: 10.2478/s13545-014-0151-x.
- Wojtal A.Z. 2009. The diatoms of Kobylanka stream near Kraków. (Wyżyna Krakowsko-Częstochowska uplands Poland). *Polish Botanical Journal*, 54(2): 129-330.
- Van Dam H., Mertens A., Sinkeldam J. 1994. A coded checklist and ecological indicator values of freshwater diatoms from The Netherlands. *Netherlands Journal of Aquatic Ecology*, 28, 117–133. doi:10.1007/BF02334251.
- Villa C., Lynnerup N., Jacobsen C. 2023. A Virtual, 3D Multimodal Approach to Victim and Crime Scene Reconstruction. *Diagnostics (Basel)*, 13(17): 2764. doi: 10.3390/diagnostics13172764.
- Żelazna-Wieczorek J., Olszyński R.M., Nowicka-Krawczyk P. 2015. Half a century of research on diatoms in athalassic habitats in central Poland. *Oceanological and Hydrobiological Studies*, 44(1):51-67. doi:10.1515/ohs-2015-0006.
- Żelazna-Wieczorek J., Ziułkiewicz M. 2007. Influence of hydrochemical conditions on diatoms in a limnocratic spring. *Oceanological and Hydrobiological Studies*, 36(1): 57-65.
- Żelazna-Wieczorek J., Ziułkiewicz M. 2009. Using benthic diatoms in the assessment of spring water quality in suburban areas. *Oceanological and Hydrobiological Studies*, 38(2): 121-131.

Załącznik 1

A critical assessment of the diatom test of rib bone marrow as a supporting procedure in the case of drowning

Bogusz Iwona, Bogusz Marek, Beata Borowska Beata, Szleszkowski Łukasz, Żelazna-Wieczorek Joanna

Bogusz I., Bogusz M., Borowska B., Szleszkowski Ł., Żelazna-Wieczorek J.^C 2024. A critical assessment of the diatom test of rib bone marrow as a supporting procedure in the case of drowning. *Journal of Forensic and Legal Medicine*. 107, <https://doi.org/10.1016/j.jflm.2024.102753>.

Łódź, 19.09. 2025 r.

Oświadczenie o współautorstwie

Oświadczam, że mój wkład w przygotowanie oryginalnej pracy był **wiodący** i polegał na: przygotowaniu koncepcji pracy, zaplanowaniu i realizacji prac w terenie, identyfikacji taksonomicznej okrzemek, udział w analizie i interpretacji uzyskanych wyników oraz w dyskusji. Pracowałam również nad ostateczną wersją manuskryptu.

I. Bogusz
mgr Iwona Bogusz

Łódź, 10.09. 2025 r.

Oświadczenie o współautorstwie

Oświadczam, że mój wkład w przygotowanie oryginalnej pracy polegał na: przygotowaniu koncepcji pracy, opracowaniu wyników z wykorzystaniem metod matematycznych, udziale w dyskusji oraz w przygotowaniu ostatecznej wersji manuskryptu.

dr hab. Joanna Żelazna-Wieczorek prof. UŁ

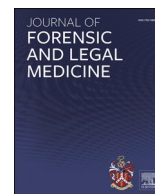
J. Wieczorek

Łódź, 19.09. 2025 r.

Oświadczenie o współautorstwie

Oświadczam, że mój wkład w przygotowanie oryginalnej pracy polegał na: przygotowaniu koncepcji pracy, zaplanowaniu i realizacji prac w terenie, oraz udział w analizie i interpretacji uzyskanych wyników.

M. Bogusz
mgr Marek Bogusz



Research Paper

A critical assessment of the diatom test of rib bone marrow as a supporting procedure in the case of drowning[☆]Iwona Bogusz^a, Marek Bogusz^b, Beata Borowska^c, Łukasz Szleszkowski^d, Joanna Żelazna-Wieczorek^{e,*}^a Police Training Centre in Legionowo, Special Training Unit, 05-119 Legionowo, Żegżyńska 121 St., Poland^b Medical University of Warsaw, Faculty of Medicine, Forensic Medicine Department, 00-001 Warsaw, Oczki 1 St., Poland^c University of Lodz, Faculty of Biology and Environmental Protection, Department of Anthropology, Banacha 12/16 St., 90-237 Łódź, Poland^d Wrocław Medical University, Faculty of Medicine, Department of Forensic Medicine, Mikulicza-Radeckiego 4 St., 50-345 Wrocław, Poland^e University of Lodz, Faculty of Biology and Environmental Protection, Department of Algology and Mycology, Banacha 12/16 St., 90-237 Łódź, Poland

ARTICLE INFO

Keywords:

Diatomaceous comparative analysis

Drowning or death in water

Tissue samples

Bone marrow

ABSTRACT

Diatoms (Bacillariophyta), being single-celled photosynthetic organisms, are widely distributed in aquatic ecosystems around the globe. Their exoskeletons are resistant to most environmental factors as well as chemical reagents in laboratory settings. Moreover, the ornamentation featured on exoskeletons can be used to identify individual diatomaceous species. As a result, the detection of diatoms in the internal organs, and especially rib marrow, of corpses found in water can serve as an important tool for diagnosing drowning as the cause of death as long as passive postmortem penetration of diatoms into those organs is excluded. In the environmental experiments described in this paper, diatoms were detected in rib marrow only when contamination resulted from a mechanical breach of bone integrity and structure, irrespective of the residence time of bone material in the aquatic environment. Our research suggests that the presence of diatom in the rib marrow may be the gold standard in the diagnosis of drowning in the future. Our animal model research dispels one of the doubts, such as the possibility of passive penetration of diatoms into the bone marrow, which is still under discussion in the forensic medicine community.

1. Introduction

Diatoms (Bacillariophyta) are a group of photoautotrophic organisms whose size ranges from a few to several hundred microns^[1,2]. They are distinguished by high diversity, with the number of species estimated at around 200,000.³ Of particular interest is the diatomaceous exoskeleton. It is strongly impregnated with hydrated silica,⁴ which results in high resistance to biodegradation processes⁵ and to chemicals used in the handling of these protists.^{6–8} Moreover, the external structure of the exoskeleton can serve as a basis for taxonomic identification down to the species level.^{1,4,9}

In 2002, the World Health Organization's International Commission of Experts revised the definition of drowning as "the process of experiencing respiratory impairment from submersion/immersion in liquid" with outcomes being "death, morbidity" or "no morbidity".¹⁰ The

pathomechanism of death by drowning consists of acute central nervous system hypoxia¹¹ as a result of the obstruction of the respiratory tract with a liquid, most often water, which usually contains diatoms. If water enters the lungs antemortem, diatoms are spread throughout body organs via circulation.^{12–17} Thus, the finding of diatom valves in organs other than the lungs of a corpse recovered from the water, such as the kidneys or bone marrow, may indicate that the person was still alive (because the heart was pumping blood) while submerged in the water. Although the diatom test has been recognized as the "gold standard" in the diagnosis of drownings,¹⁵ it is still hotly debated in from the forensic community.

This is because most diatoms remain in the lungs, and only a few are transported to other organs through the bloodstream.^{18,19} The absence of diatoms in the kidneys does not allow one to exclude drowning as a cause of death since it can be caused by a rapid cessation of circulation in

[☆] The study was financially supported by the University of Lodz.^{*} Corresponding author.E-mail addresses: ektoim@interia.pl (I. Bogusz), mar_bog@interia.pl (M. Bogusz), beata.borowska@biol.uni.lodz.pl (B. Borowska), lukasz.szleszkowski@umw.edu.pl (Ł. Szleszkowski), joanna.zelazna@biol.uni.lodz.pl (J. Żelazna-Wieczorek).<https://doi.org/10.1016/j.jflm.2024.102753>

Received 15 December 2023; Received in revised form 29 March 2024; Accepted 6 September 2024

Available online 12 September 2024

1752-928X/© 2024 Elsevier Ltd and Faculty of Forensic and Legal Medicine. All rights are reserved, including those for text and data mining, AI training, and similar technologies.

the drowning person. Moreover, due to putrefaction and increased membrane permeability in cells and tissues, the aspirated fluid with diatoms may also be found in the pleural cavity, from where it could have passively reached the rib marrow.^{7,20}

The examination of the rib marrow simultaneously with the kidneys may be helpful, especially in situations where the corpse has developed putrefactive lesions through which diatoms may have passively entered the soft tissues.^{13,21,22} Due to its structure, the cortical bone (*substantia compacta*) of the ribs forms a barrier that is much more difficult or impossible to penetrate by diatoms. Thus, the detection of diatoms in the rib marrow appears to indicate that the person was alive when water entered their lungs.⁵

However, reports on the examination of animal carcasses of various species for the presence of diatoms^{10,15,23–27} include mainly soft tissue studies and do not address the passive penetration of diatoms into the rib marrow. The two recent publications on diatoms passively penetrating the bone marrow of pig long bones^{28,29} did not involve the ribs and used significantly shorter time intervals of exposure to an aquatic environment (a maximum of three months).

The ribs are part of the skeletal system of vertebrates, forming the thorax together with the sternum and the thoracic vertebrae.³⁰ The primary function of the ribs is to protect the organs located in the chest: the heart and lungs.³¹ The ribs also play an important role in the process of breathing: they are the place of attachment of the respiratory muscles, and, due to the flexible cartilage between the ribs and sternum, they enable the volume of the thorax to change, making inhalation and exhalation possible.

An individual rib consists of the shaft (*corpus costae*), neck (*collum costae*), and head (*caput costae*), which connects it to the spine. The costal groove (*sulcus costae*) on the inner surface of the rib serves as a channel for the intercostal vein, artery, and nerve.³⁰ The ribs are flat bones; their number varies from species to species and corresponds to the number of thoracic vertebrae.

Each pig rib consists of two sections: the bony part and the cartilaginous part. The former features a head with articular surfaces separated by a crest. Distal to the head are the neck and tubercle. The latter has a medially facing articular surface that connects to the costal facet of the transverse process of the thoracic vertebra. Therefore, the external structure of the pig rib is the same as that of the human rib,³² and also concerning Haversian canals.³³

Pigs have 14–15 pairs of ribs (including 6–8 pairs of true ones) with well-expressed angles; the shafts are narrow and spirally curved. The length and width of the ribs increase from the first to the seventh pair, then decrease again, with rib curvature increasing from the first to the last one. As in the case of human ribs, the initial seven pairs of ribs connect directly to the sternum (true ribs), with the others being false ribs (pigs have 7–8 pairs of false ribs). In adult animals, the lower ends of the ribs are often thinner, while in piglets – thicker. The articular surfaces of the rib tubercles are flat. Ribs from the second to the seventh pairs feature articular surfaces to connect with the rib cartilage.

Bone marrow is found inside marrow cavities and within the trabecular bone. Solid bone tissue provides marrow with great mechanical stability. The outer and inner layers of flat bones are made of cortical bone containing Haversian canals (*canalis centralis osteoni*) 20–100 µm in diameter, connecting to Volkmann canals (*canalis Volkmanni*).³⁴ If bone integrity is maintained, bone marrow is better protected than any other internal organ from post-mortem injury or contamination (trauma, animal predators or fungi, bacteria, and parasites).^{35,36} However, in the case of a fracture or damage to the bone, marrow is no longer protected, which leads to its loss.^{37,38} Based on a retrospective evaluation of numerous exhumations, bone marrow histological features have been estimated to be preserved for at least 3 months,³⁹ and forensic toxicology studies indicate that marrow can be used for analysis even many years after the person's death.^{40–42}

As Haversian canals might be a potential route of penetration into the marrow of intact bones, the present study aims to confirm or refute

this possibility taking into account the size (length and width) of diatoms found in natural aquatic ecosystems.

Thus, the objective of this work is to verify the usefulness of the diatom test for the diagnosis of drowning cases with corpses devoid of soft tissue by answering the question of whether or not diatoms can passively penetrate the bone marrow of ribs remaining in water for a long time.

For this purpose, experiments were conducted in which pig ribs were submerged in aquatic environments for different time intervals. The use of pig ribs was motivated by the fact that their density and mechanical parameters are the same as those of human bones,^{32,33} and procedures for examining animal carcasses correspond to those applied in forensic medicine.⁴³

2. Material and methods

2.1. Obtaining pig ribs

The test material was purchased commercially from a slaughterhouse. It consisted of fragments of two pork carcasses including ribs together with the sternum, covered with a thin layer of muscles with fascia and fat (Fig. 1A and B). In the slaughterhouse, the carcasses were processed in such a way that the ribs were not damaged and that they remained connected to the thoracic vertebrae of the spine. The carcasses came from pigs aged 12–18 months. To isolate the ribs, the skin, fat, and most of the muscle tissue were removed (Fig. 1C). Finally, the ribs were separated from the sternum and vertebrae. Some of the ribs were broken out of the joints (in Test 1–3), and some of them were cut off with the part of the vertebra and sternum (in Test 4) (Fig. 1D). Care was taken not to damage the structure of distal parts of the ribs.

One rib from each carcass fragment was frozen as control material to exclude a prior presence of diatoms as the literature describes the risk of contamination of animal tissues with diatoms *in vivo* (before slaughtering) due to their widespread presence in soil, water, food^{44–46} and air.⁴⁷

In Experiment 1 (Test 1 and Test 2), the ribs prepared as above were placed in plastic bottles (two in each). In each bottle, numerous (about 30) holes of approximately 1 cm in diameter were made to allow the flow of water containing diatoms. The bottles were attached to a box (Fig. 2A) and submerged in a pond (Fig. 2C). In Experiment 1 (Test 3), to investigate the possibility of passive penetration of diatoms into rib marrow in flowing water (a watercourse), prepared ribs were submerged in a drainage ditch (Fig. 2D). In Experiment 2 in Test 4 prepared ribs (Fig. 2B) were submerged in a drainage ditch (Fig. 2D). The ribs from Test 3 and 4 were placed in steel cages, that guaranteed the free flow of water (Fig. 2B) to prevent damage by animals.

As a result, three tests were carried out within Experiment 1.

1. In Test 1 (winter test), four bottles with two prepared ribs in each of them were submerged in the pond (PON) in January.
2. In Test 2 (spring test), four bottles with two prepared ribs in each of them were submerged in the pond (PON) in March.
3. In Test 3 (summer test), two steel cages with four prepared ribs in each of them were submerged in a drainage ditch (DRD) in July.

As well as one test within Experiment 2.

4. In Test 4 (winter test), two steel cages with four prepared ribs in each of them were submerged in the pond (PON) in January (Fig. 2B).

One bottle with ribs as well as one rib from each cage was recovered from the water after one (1M), three (3M), six (6M), and twelve months (12M) from the time of submersion. The ribs were then labeled and frozen at –20 °C for further preparation. The freezing temperature and storage were consistent with the bone freezing procedure used for DNA analyses.⁴⁸

One of each pair of ribs removed from the water was retained for

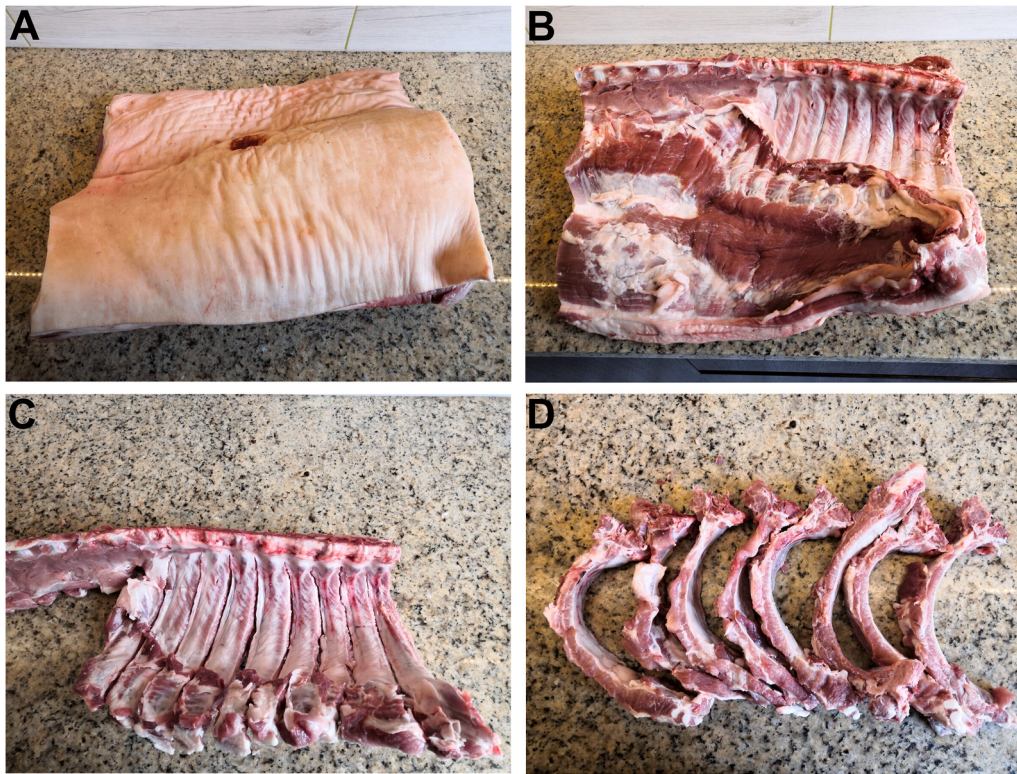


Fig. 1. A piece of pork carcass from the integumentary side (A), from the side of internal organs (B), ribs after separation from skin and pork fat (C), and dissected ribs, separated from the vertebrae of the spine and sternum (D).



Fig. 2. Bottles with ribs placed in a box just before water immersion (A), steel cages in which dissected ribs were placed before immersion in a drainage ditch (B), a pond in which dissected pig ribs were immersed (C), a drainage ditch where dissected pig ribs were immersed (D).

repeated preparation. After retrieving all biological material, the ribs were defrosted (Fig. 3).

The ribs were stripped of soft tissue (Fig. 4), and then both their ends were cut off in such a way as to leave 10 cm long segments of the central part of the shaft. Each obtained samples were tested for the presence of diatoms. One microscope slide was a sample taken from one rib (10 cm). The entire rib fragment was etched in 300 ml of hydrogen peroxide. After digestion, the sample was concentrated in a 4 ml solution with diatom valves. Then 0.5 ml of concentrated solution (10 drops) was placed on a microscope slide.

The results obtained in the above three tests in Experiment 1 proved to be inconclusive. Therefore, it was decided to conduct Experiment 2 with Test 4: the procedure and the method of obtaining and preparing pig ribs were analogous to the first three experiments, but this time every effort was made to ensure that not only the shafts but also the proximal and distal rib ends had not been damaged in the slightest degree before their submersion in water. In Test 4, the ribs were placed in the pond (PON) (Fig. 2C) in January (a winter test) and recovered after one (1M), three (3M), six (6M), and twelve months (12M).

Environmental samples were collected from the pond and from the drainage ditch in the form of 100 ml samples representing plankton (PL), epiphyton (EP), and benthos (BE) to check the rib deposition sites for diatoms and determine their dominant species as potentially most likely to penetrate the bone material.

2.2. Preparation of diatoms from biological and environmental samples

Ribs were rinsed under running distilled water, which was then examined for the presence of diatoms. For this purpose, wet preparations were made and viewed under a light microscope at a magnification of $10\times 40/1.25$. The process of rinsing the ribs was repeated until no more valves were found in the water after rinsing. Then, the central parts of ribs with a length of 10 cm were digested in 300 ml of 30 %

hydrogen peroxide (H_2O_2)⁴⁹ with the addition of several ml of concentrated sulfuric acid (H_2SO_4) at 70 °C for 48 h. The specimens were washed multiple times with Line-EtOH (a mixture of ethanol, diethyl ether, and acetone) with centrifugation for 3 min at 3500 rpm each time. After the last centrifugation, distilled water was added. From the purified diatomaceous sediment, permanent slides were produced using Naphrax® resin and examined at a magnification of 10×100 under oil immersion.

To determine the ratio between live and dead diatoms in wet and unfixed samples before the preparation of purified diatomaceous sediment, the environmental specimens were observed under a light microscope at a magnification of $10\times 40/1.25$.

Samples were subsequently fixed with 1 ml of a 4 % formaldehyde solution. In the next step, 2 ml of each sample was retrieved after shaking, and a few drops of concentrated sulfuric acid (H_2SO_4), and then 2 ml of 30 % chromic acid, were added. After digestion, the resulting samples were centrifuged at 3500 rpm for 3 min, rinsed with distilled water and centrifuged again. The steps were repeated until purified diatomaceous sediment. The sediment was then transferred onto microscopic slides and, after drying, embedded in Naphrax® resin. The permanent slides thus prepared were observed under a light microscope at a magnification of $10\times 100/1.25$. Diatoms were identified (to species level) in each preparation (microscopic permanent slides) by counting out 500 consecutive valves (one frustule is composed of two valves; epivalve and hypovalve) (Fig. 5). Three more stripes were then inspected to identify diatoms that did not appear during the counting. In the case of a smaller number of valves, the whole preparation was reviewed and all valves were counted. We used the most up-to-date iconographic keys to identify diatom species.

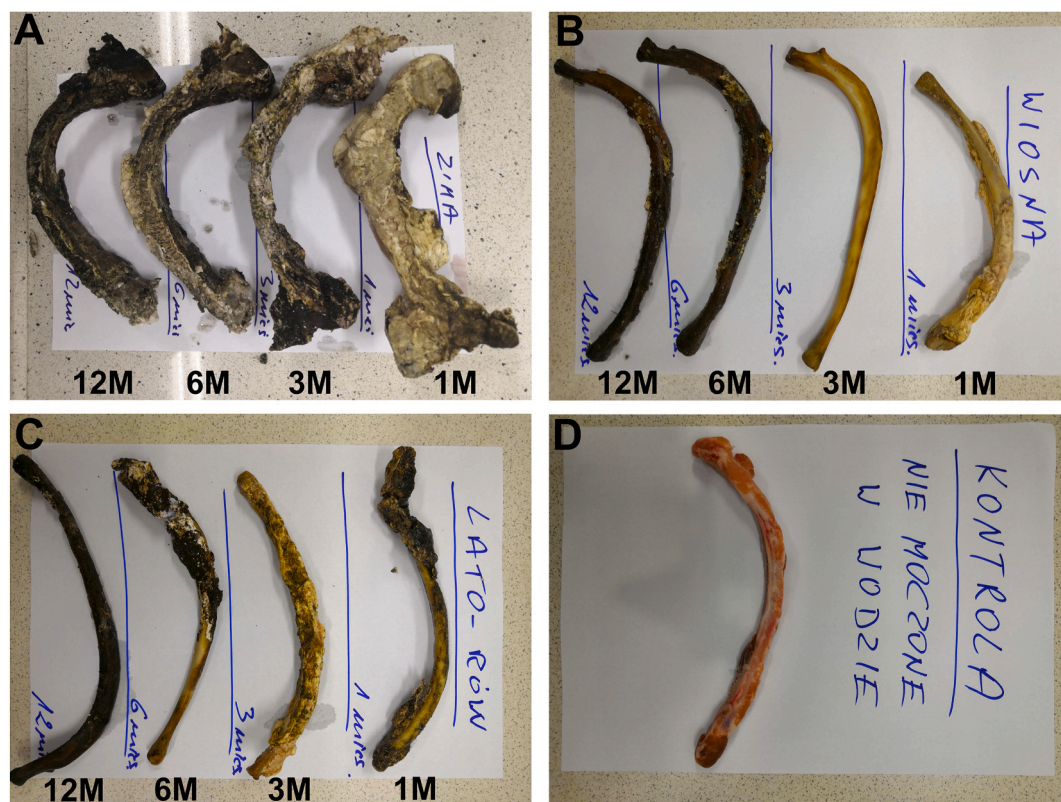


Fig. 3. Ribs after defrosting Test 1 (A), Test 2 (B), Test 3 (C): after one month (1M), after three months (3M), after six months (6M), and after twelve months (12M) and control material (D).

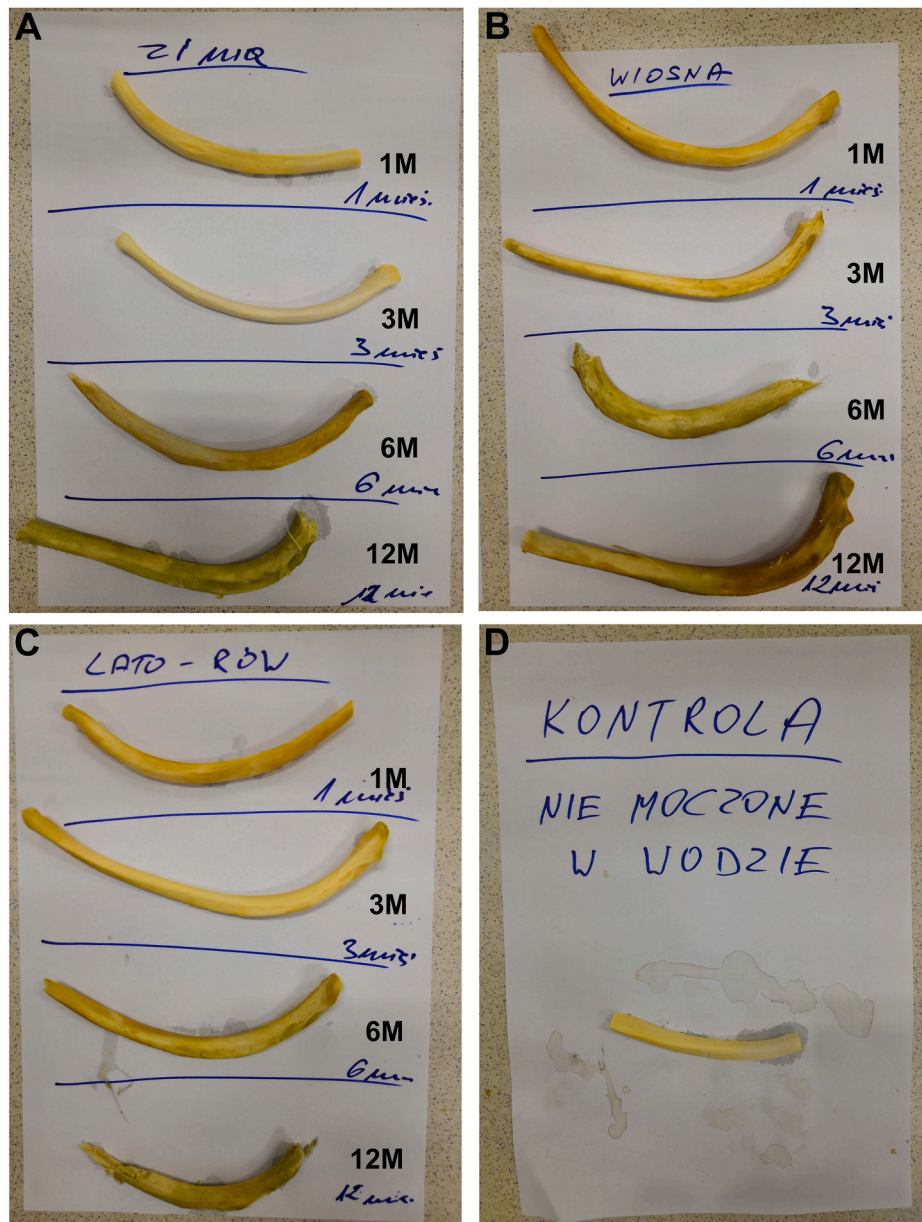


Fig. 4. Ribs after soft tissue purging Test 1 (A), Test 2 (B), Test 3 (C): after one month (1M), after three months (3M), after six months (6M) and after twelve months (12M) and control material (D).

3. Results

3.1. Characteristics of the structure of diatomaceous communities from the ecosystems used in the experiment

The analysis of unfixed environmental samples taken from the pond (PON) and drainage ditch (DRD) confirmed that 90 % of the diatoms were alive. A total of 97 diatom species (including 71 in plankton PL, 80 in epiphyton EP, and 71 in benthos BE) were identified in all tested PON samples (in PL, in EP, in BE), and 130 species (including 93 in PL, 64 in EP and 75 in BE) in DRD samples. Sixty-six species occurred in both ecosystems.

The tested PON samples were dominated by seven species (accounting for at least 5 % of the samples each), while the DRD samples revealed nine dominant species. The most abundant species in both ecosystems was *Nitzschia palea* (Kütz.) W. Sm. (Table 1).

In the studied samples taken from the pond, we found species with an average valve length of 6.6–46.5 μm in most cases (71.1 %). In four

species, i.e., *Nitzschia sigmoidea* (Nitzsch) W. Sm., *Stauroneis phoenicenteron* (Nitzsch) Ehrenb., *Ulnaria delicatissima* (W. Sm.) Aboal & Silva, and *Ulnaria ulna* (Nitzsch) Compère, the average valve length ranged from 166.5 μm to 326.5 μm (Fig. 6).

In terms of valve width, most of the pond species (94.8 %) ranged from 2.85 μm to 21.25 μm , but one species, *Stauroneis phoenicenteron* (Nitzsch) Ehrenb., revealed a valve width of 33.0 μm (Fig. 7).

The species isolated from drainage ditch samples had an average valve length of 6.5 μm –76.5 μm in most cases (91.4 %). However, we also identified much larger species: two with an average length between 111.5 μm and 181.5 μm (*Craticula cuspidata* (Kütz.) Mann and *Cymatopleura solea* (Bréb.) W. Sm.) and four species with an average length between 216.5 μm and 356.5 μm (*Nitzschia sigmoidea* (Nitzsch) W. Sm., *Paraplaconeis minor* Lange-Bert., *Surirella biseriata* Bréb., and *Ulnaria ulna* (Nitzsch) Compère) (Fig. 8).

In terms of valve width, most of the drainage ditch species (84.6 %) ranged from 2.75 μm to 12.15 μm , except for one diatom, *Iconella biseriata* (Bréb.) Ruck & Nakov, with an average valve width of 60 μm

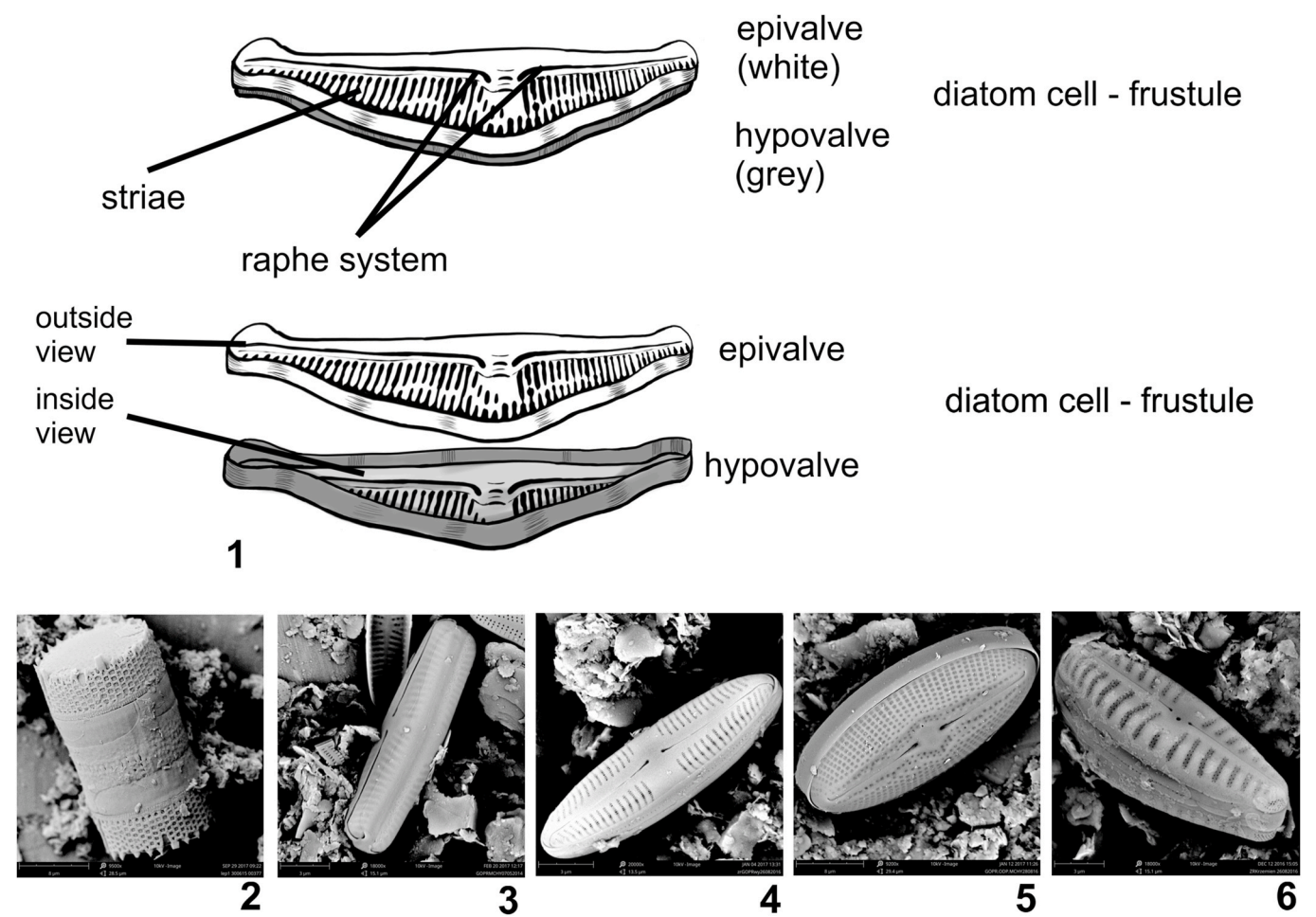


Fig. 5. Scheme of diatom cell exoskeleton (1) and the morphological differentiation of diatoms belonging to particular genus (2–6) shown on SEM analysis.

Taxon	Avg. length (μm)	Avg. width (μm)	PON			DRD		
			PL	EP	BE	PL	EP	BE
<i>Achnanthes eutrophilum</i> (Lange-Bert.) Lange-Bert.	11.5	4.0				2.8	4.0	5.0
<i>Amphora copulata</i> (Kütz.) Schoeman & Arch.	30.5	6.3	5.8	1.9	0.8	2.9	0.4	2.7
<i>Cocconeis placentula</i> Ehrenb.	23.5	16.5	2.0	6.3	0.3	2.8		2.1
<i>Cyclotella meneghiniana</i> Kütz.	24.0	24.0	33.8	14.2	57.0	0.9		1.1
<i>Eolimna minima</i> (Dec.) Lange-Bert.	11.5	3.3	5.9	10.9	2.7	0.6		1.5
<i>Hippodonta capitata</i> (Ehrenb.) Lange-Bert., Metz. & Witk.	25.0	6.0	2.2	1.9	0.5	6.8	0.9	6.3
<i>Melosira varians</i> Ag.	21.5	21.5	1.4	1.9		10.8	0.4	14.7
<i>Meridion circulare</i> (Grev.) Ag.	46.0	6.0		0.5	0.2	4.4	0.9	7.4
<i>Navicula cryptocephala</i> Kütz.	30.0	6.0	1.1	7.2	3.6	0.4	0.4	0.2
<i>Navicula gregaria</i> Donk.	21.5	6.3				3.5	3.6	9.0
<i>Nitzschia palea</i> (Kütz.) W. Sm.	42.5	3.8	4.0	7.9	2.4	1.1	55.2	3.1
<i>Planothidium frequentissimum</i> (Lange-Bert.) Lange-Bert.	17.0	5.3	0.4	0.4	0.7	7.5	1.8	5.3
<i>Stauroneis venter</i> (Ehrenb.) Cl. & Möller	6.5	4.5	1.4	1.1	0.5	7.4		1.5
<i>Stauroneis pinnata</i> (Ehrenb.) Williams & Round	19.0	5.0	0.2		0.3	8.8		3.1
<i>Stephanodiscus hantzschii</i> Grun.	19.0	19.0	17.3	11.4	12.1		1.1	0.2

(Fig. 9).

from the pond (Tests 1 and 2) and from the drainage ditch (Test 3) is presented in (Fig. 10).

3.2. Analysis of ribs in terms of diatom size

The comparison of the prevalence of dominant species is presented in Table 2.

The environmental abundance of diatom species that were dominant in the marrow from ribs submerged in the pond (but not dominant in the pond itself) was as follows: for *Hippodonta capitata* (Ehrenb.) Lange-Bert., Metz. & Witk. 2.2 % in plankton, 1.9 % in epiphyton, and 0.5 % in benthos; for *Planothidium frequentissimum* (Lange-Bert.) Lange-Bert.

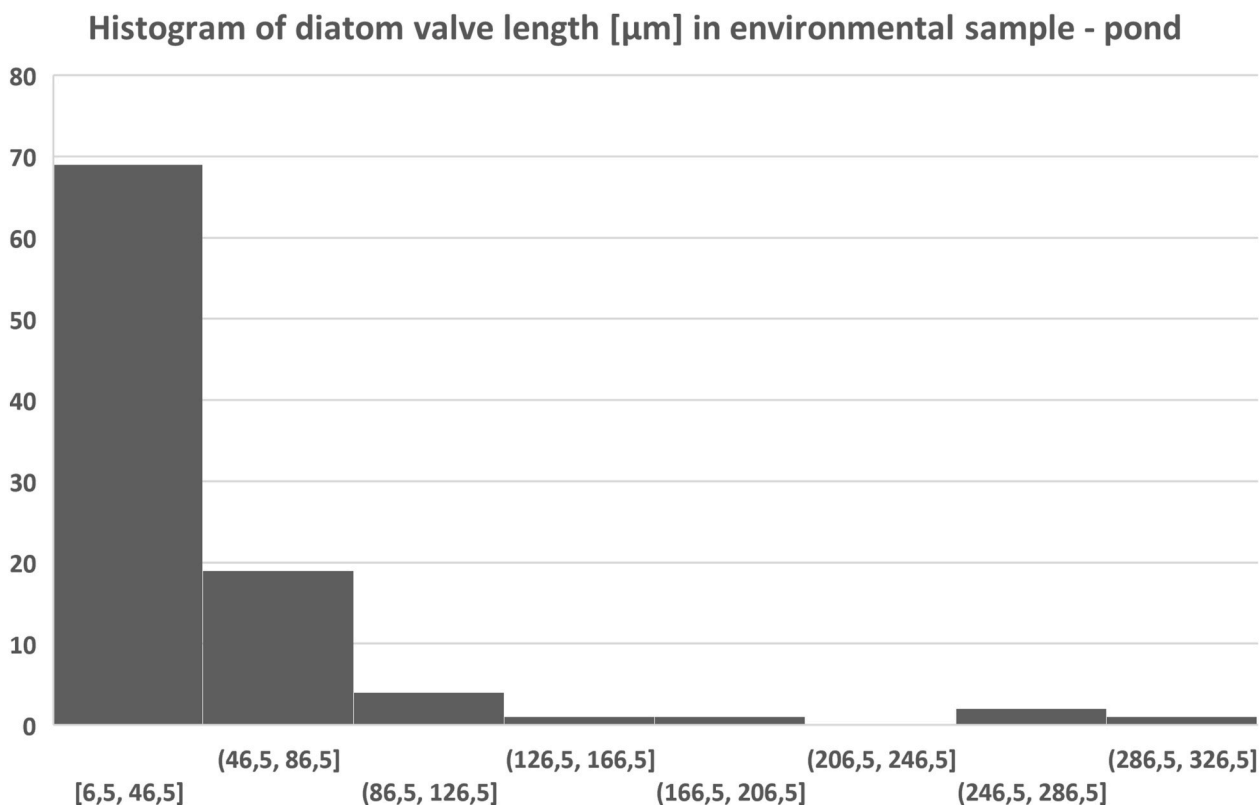


Fig. 6. Histogram of the length of valves of the species revealed in environmental samples taken from the pond.

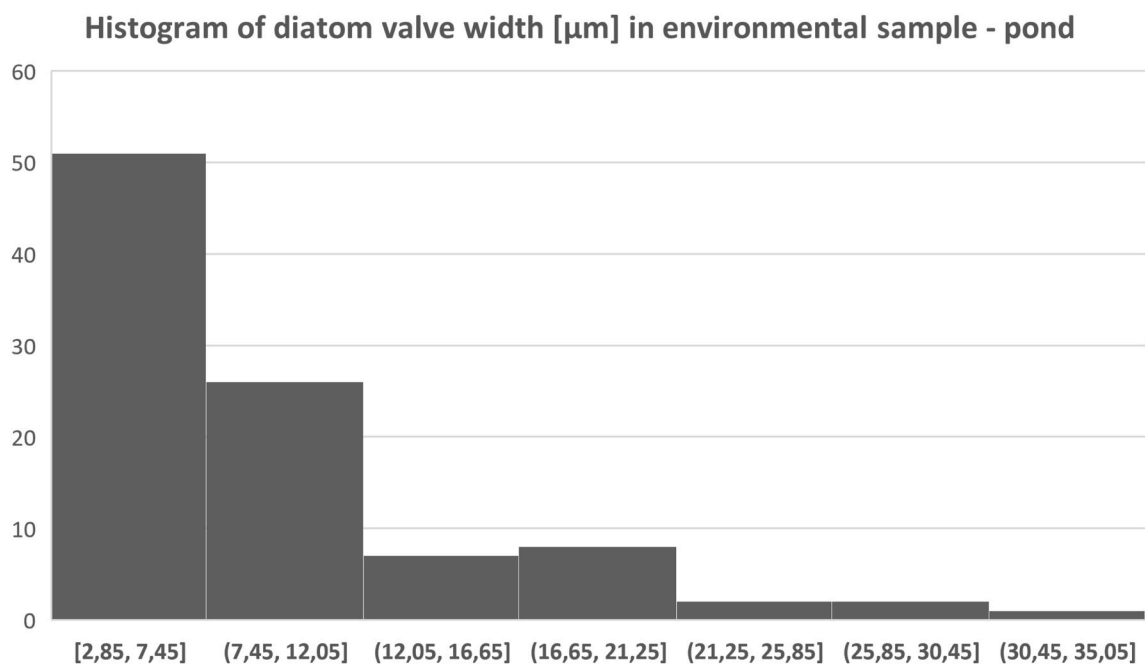


Fig. 7. Histogram of the width of the valves of the species revealed in the environmental samples taken from the pond.

0.4 % in plankton, 0.4 % in epiphyton, and 0.7 % in benthos, for *Pseudostaurosira brevistriata* (Grun.) Williams & Round 0.2 % in plankton, none in epiphyton, and 0.2 % in benthos, and for *Staurosirella pinnata* 0.2 % in plankton, none in epiphyton, and 0.3 % in benthos.

A comparison of the results of Test 3, in which the ribs were immersed in a drainage ditch (DRD), is presented in Table 3. A total of 33 species were found in the tested rib samples.

The environmental abundance of diatom species that were dominant in the marrow from ribs submerged in the drainage ditch (but not dominant in the ditch itself) was as follows: for *Amphora copulata* (Kütz.) Schoeman & Arch. 2.9 % in plankton, 0.4 % in epiphyton, and 2.7 % in benthos, and for *Navicula upsaliensis* (Grun.) Perag. 1.6 % in plankton, 0.7 % in epiphyton, and 1.3 % in benthos.

The average length of the diatom valves identified in samples taken

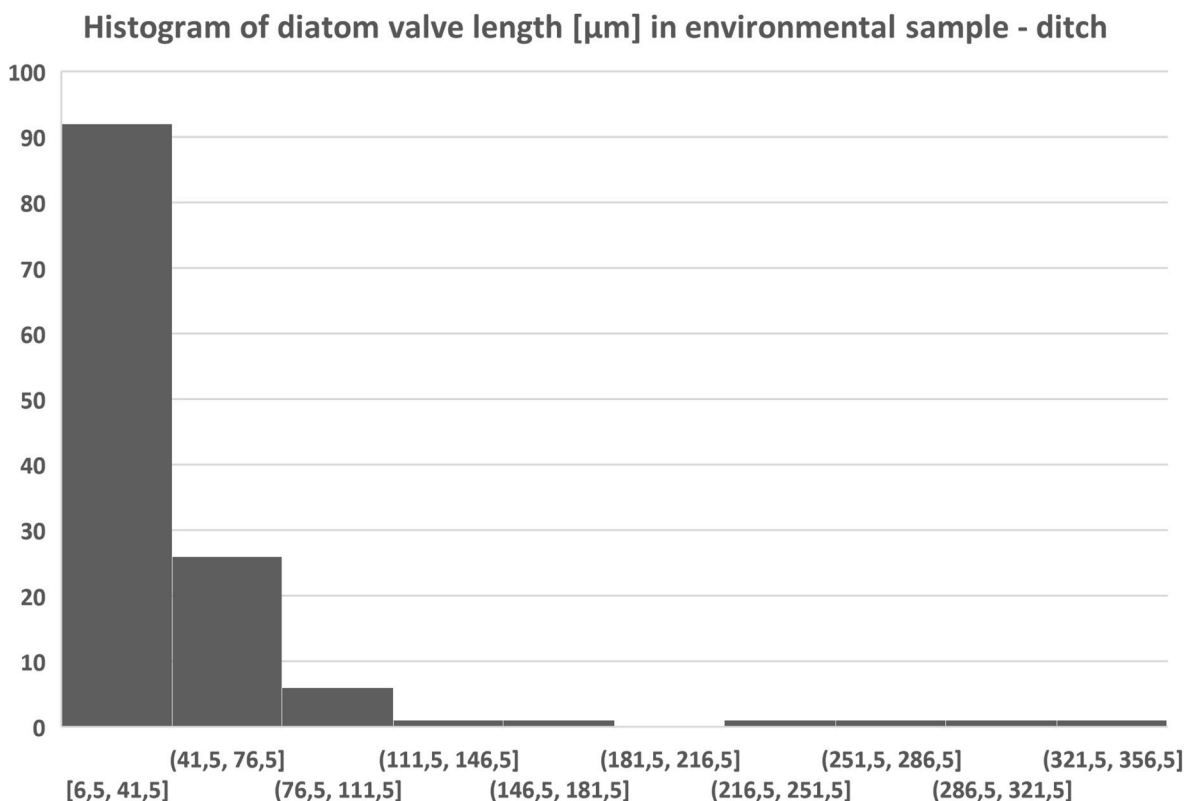


Fig. 8. Histogram of length of species found in environmental samples taken from a drainage ditch.

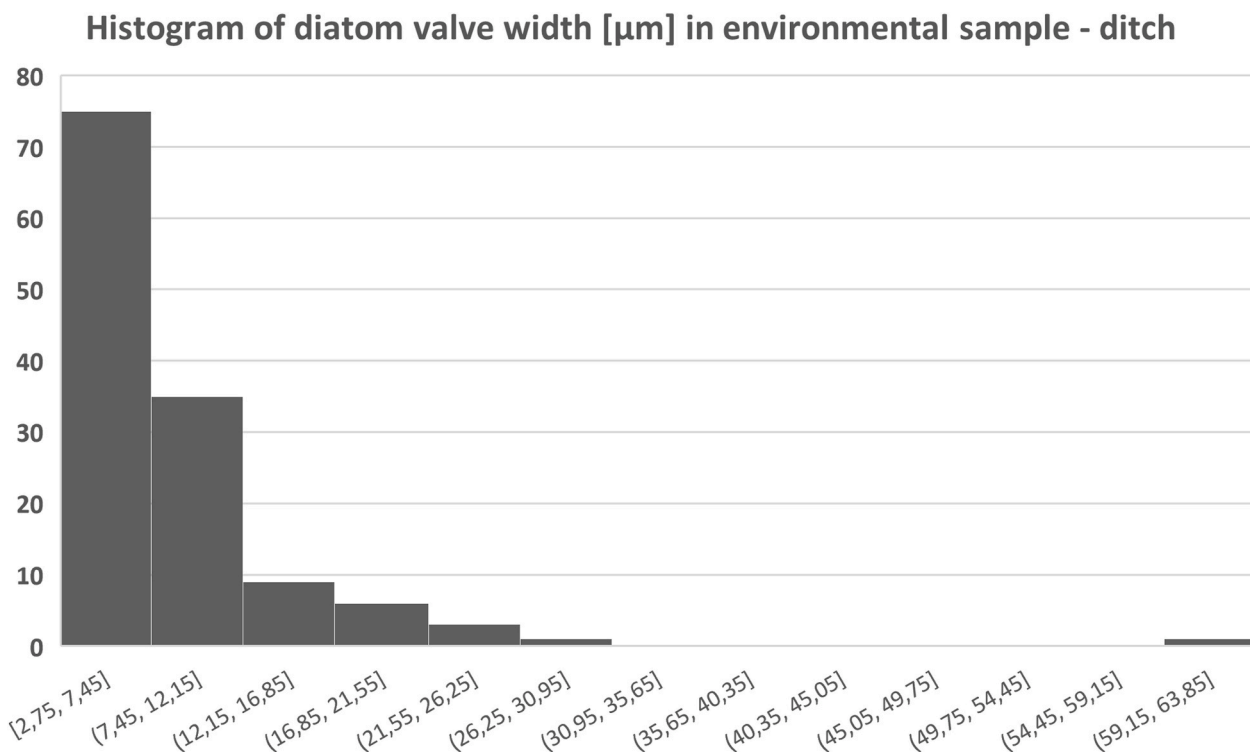


Fig. 9. Histogram of valve width of species revealed in environmental samples taken from a drainage ditch.

from ribs that were submerged in the pond was 6.5–54.5 μm ; more than half of the species (56.7 %) were in the range of 18.5 μm –30.5 μm (Fig. 11).

The average width of diatoms identified in samples taken from pig

ribs submerged in the pond was from 4.0 μm to 24.4 μm . In most species (70.0 %) that value ranged from 4.0 μm to 9.1 μm , and only in *Cyclotella meneghiniana* Kütz. it amounted to 24.4 μm (Fig. 12).

The average length of diatoms found in samples from ribs recovered

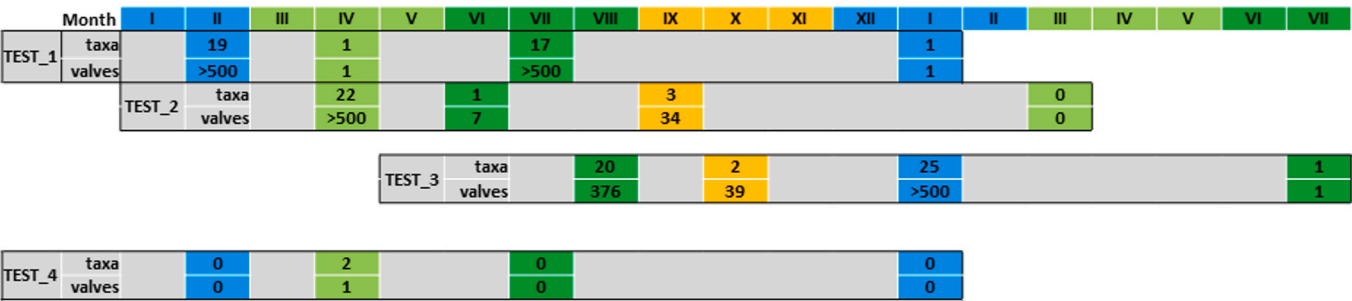


Fig. 10. Comparison of the presence of the number of diatom species and valves in Tests 1–3, and Test 4 with references to the season (blue – winter, light green – spring, green – summer, yellow – autumn). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

Table 2
Percentage of dominant species in the tested samples taken from the ribs from Tests 1 and 2 (PON).

Dominant species	Avg. length (µm)	Avg. width (µm)	Test No. 1				Test No. 2			
			1M	3M	6M	12M	1M	3M	6M	12M
<i>Amphora copulata</i> (Kütz.) Schoeman & Arch.	30.5	6.3	5.6		22.3		8.7		5.9*	
<i>Cyclotella meneghiniana</i> Kütz.	24.0	24.0	2.0		1.2		8.4			
<i>Hippodonta capitata</i> (Ehrenb.) Lange-Bert. Metz. & Witk.	25.0	6.0	3.1		2.8		11.4			
<i>Planothidium frequentissimum</i> (Lange-Bert.) Lange-Bert.	17.0	5.3	4.3		4.0		8.0			
<i>Pseudostaurosira brevistriata</i> (Grun.) Williams & Round	17.5	5.0					5.7			
<i>Staurosirella pinnata</i> (Ehrenb.) Williams & Round	19.0	5.0	70.0		58.3		37.6		41.2*	

Explanation: * - with a low number of valves confirmed in the sample.

Table 3
Percentage of dominant species in the tested samples taken from ribs in Test No. 3 (DRD).

Dominant species	Avg. length (µm)	Avg. width (µm)	Test No. 3			
			1M	3M	6M	12M
<i>Amphora copulata</i> (Kütz.) Schoeman & Arch.	30.5	6.3	3.7		19.7	
<i>Navicula upsaliensis</i> (Grun.) Perag.	32.5	10.8	5.1		1.2	
<i>Planothidium frequentissimum</i> (Lange-Bert.) Lange-Bert.	17.0	5.3	5.6		1.6	
<i>Staurosirella pinnata</i> (Ehrenb.) Williams & Round	19.0	5.0	64.4		67.8	100*

Explanation: * - with a low number of valves confirmed in the sample.

from the drainage ditch ranged from 6.5 µm to 58.5 µm, except for *Ulnaria ulna* (Nitzsch) Compère, with a length of 275 µm (Fig. 13).

The average width of diatoms found in samples from ribs that were submerged in the drainage ditch was predominantly (96.9 %) in the range of 3.23–19.45 µm, except for one species, *Cyclotella meneghiniana* Kütz., with an average width of 24.0 µm (Fig. 14).

In Test 4, only two valves (one specimen – length 18.5 µm, width 7.0 µm) of the species *Sellaphora pupula* (Kütz.) Mereschk. was found in 3M samples (Fig. 10). In the remaining samples, recovered after one, six, and 12 months, no diatoms were detected. To confirm the presence of diatoms in the sample from the third month (3M) and the absence of diatom valves in the samples from the first, sixth, and after 12 months, additional three permanent slides from the same respectively solution sample (4 ml) were analyzed. The presence of diatoms was not confirmed in any of these preparations. During the preparation of the ribs used in Test 4, every effort was made to ensure that not only the rib shaft, but also both of its ends were intact before submersion.

4. Discussion

The use of rib marrow as an adjunct to the diagnosis of drowning is still debated. Under discussion is in particular the possibility of passive penetration of diatoms found in the aquatic environment into the bones of corpses remaining in the water for a long time. Potential routes for diatoms to enter the bone marrow appear to be Haversian canals and disruption of bone integrity.

When preparing pig ribs for Tests 1, 2, and 3, preventing all damage to the heads of the ribs (*caput costae*) was not a priority. The assumption was that after recovering samples from submersion diatoms were to be extracted only from the marrow located in the center of the shafts (*corpus costae*), and so special care was taken to avoid damage to them. This procedure did not produce unambiguous results: numerous diatoms were found in ribs submerged in both standing water (pond) and flowing water (drainage ditch) after one and six months, while very few were found after three and twelve months of submersion. These findings suggest that the passive migration of diatoms to the marrow of pig ribs may occur even at a rate of a few centimeters in one month.

On the other hand, in Test 4, the ribs were prepared in such a way that not only the shaft but also both bone ends were completely intact before their submersion in water. As a result of maintaining a strict preparation regime, no diatom valves were found in the rib marrow.

According to some authors referring to human remains, the results of the diatom test should be considered positive only if the number of diatoms is greater than a certain threshold; for example, 20 diatoms per 10 g of lung sample and five diatoms in other organs.⁴⁹ Thus, the discovery of two diatoms in the marrow of a rib submerged in a drainage ditch for three months in Test 4 would not have any diagnostic value in forensic opinions on drowning as the cause of death. The finding of two diatom valves in only one of the four microscopic permanent slides (3M sample) should be considered as contamination. Hence, it can be assumed that Haversian canals occurring in flat bones and connecting to Volkmann canals³⁴ constitute an impassable barrier to diatoms.

According to literature reports relating to humans, the possibility of diatom penetration through the pulmonary capillaries and into the internal organs, including the rib marrow, depends on diatom size. The

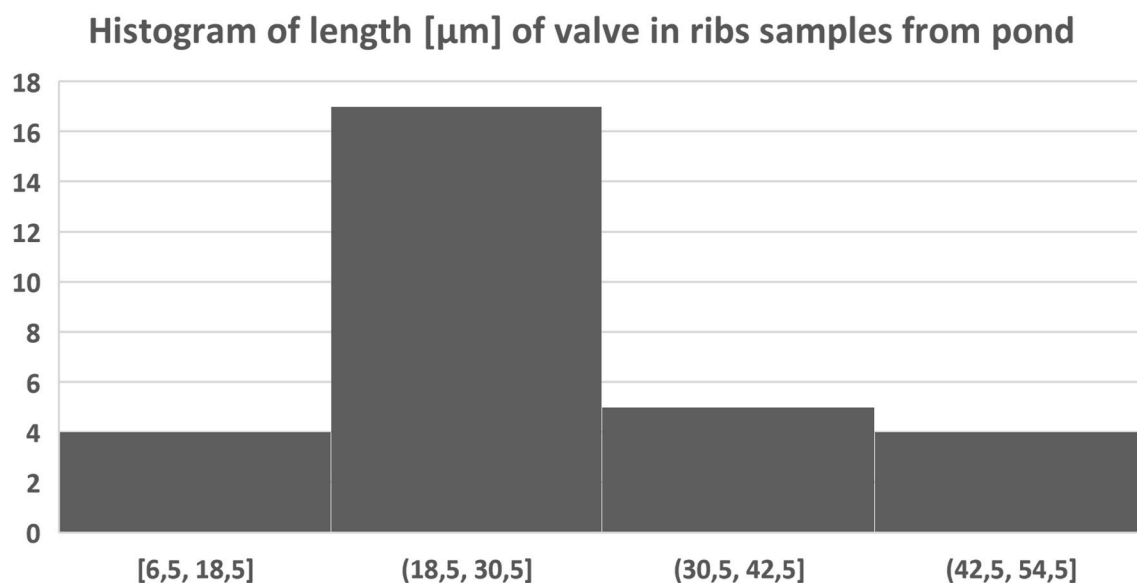


Fig. 11. Histogram of the length of valves of the species found in the tested samples taken from ribs that were immersed in the pond.

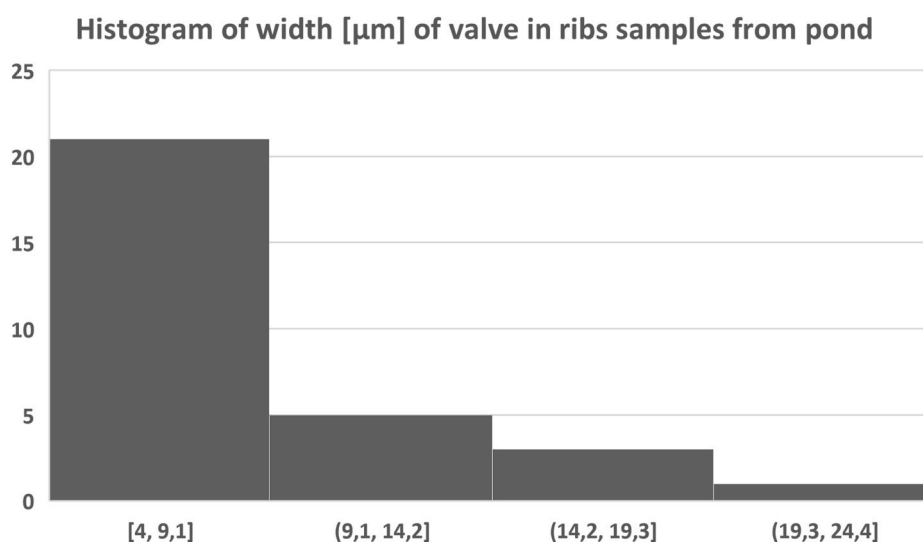


Fig. 12. Histogram of the width of the valves of the species revealed in the tested samples taken from the ribs that were immersed in the pond.

maximum estimated length of diatoms that can cross the human pulmonary barrier ranges from 30 μm ⁴⁷ to 110 μm .¹⁴ However, even larger diatoms can occasionally penetrate the internal organs, especially if they are characterized by a high aspect ratio (e.g. are needle-shaped like *Ulnaria ulna*).²⁰ In our study, we found the presence of diatom species with a maximum average length of up to 52.5 μm (*Navicula reinhardtii* (Grun.) Grun. – only one valve each in four rib marrow samples) and a maximum average width of up to 24.0 μm (*Cyclotella meneghiniana* – in one of the samples it was the dominant species). Except for one *Ulnaria ulna* valve in one marrow sample from a rib submerged in a drainage ditch, we did not detect species larger than those that could penetrate the pulmonary capillaries. This suggests that size is an equally limiting factor for diatom penetration through the pulmonary barrier and the rib marrow.

It is thought that the presence of diatoms in rib samples in the first three tests may be confirmed by the presence of large diatoms in them. However, it should be remembered that diatoms can also penetrate the soft tissues of internal organs through wounds formed both after and before death and as a result of the decomposition of corpses due to

prolonged exposure to water.^{21,22} They can also penetrate the bone marrow as a result of a breach of the bone structure.²⁸ Our research shows that the cortical barrier of the ribs is impassable for diatoms, and so in the absence of a disruption of bone integrity postmortem contamination is unlikely, even in the case of a cadaver in a state of advanced putrefactive decomposition.

Previous analyses of the ribs have shown that contamination may have occurred during retrieval as well as at the time of sample preparation, giving false positive results.^{46,50} It is particularly important to develop a procedure for extracting bone marrow during autopsy, as contamination at this stage is more likely to occur than during preparation taking place in a research laboratory. An interesting method of avoiding contamination when collecting bone marrow from the sternum is the use of aspiration needles (sternal aspiration needles).⁵¹

5. Conclusion

Most forensic studies on the subject published in recent years describe the use of bone marrow as an alternative tissue in toxicological

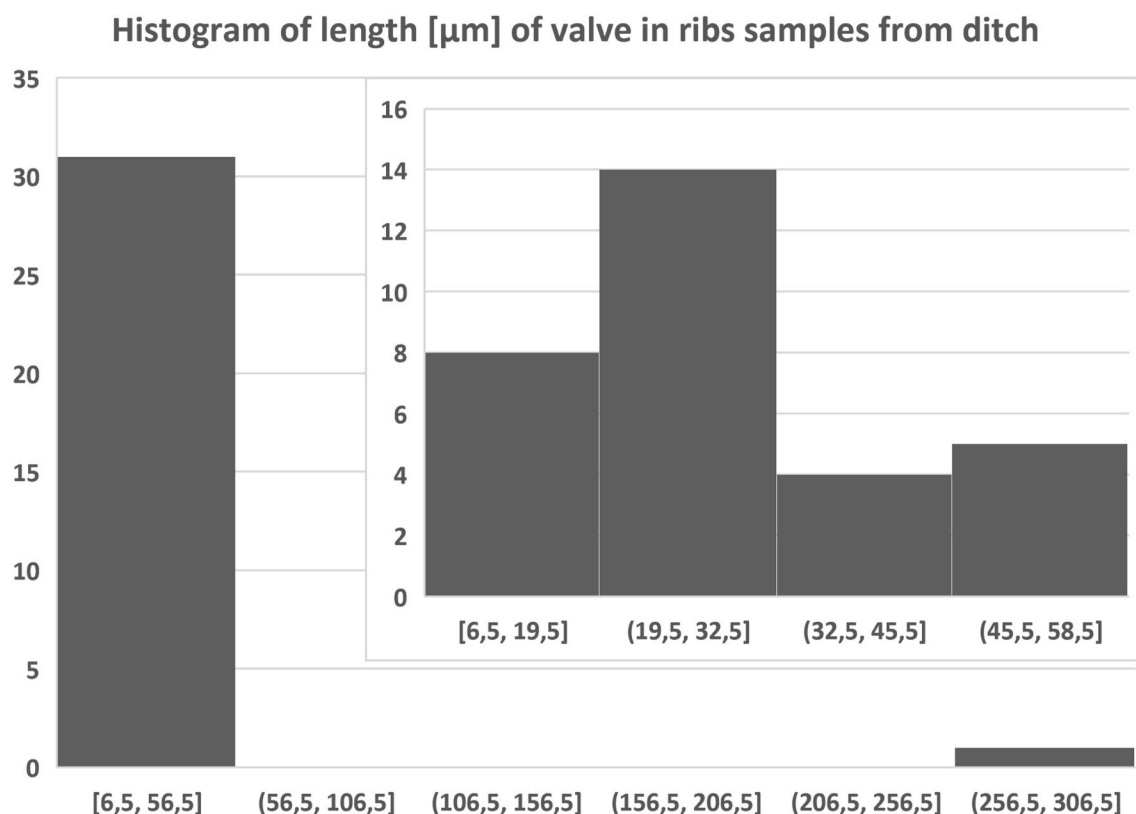


Fig. 13. Histogram of the length of the valves of species found in the tested samples taken from the ribs that were immersed in the drainage ditch.

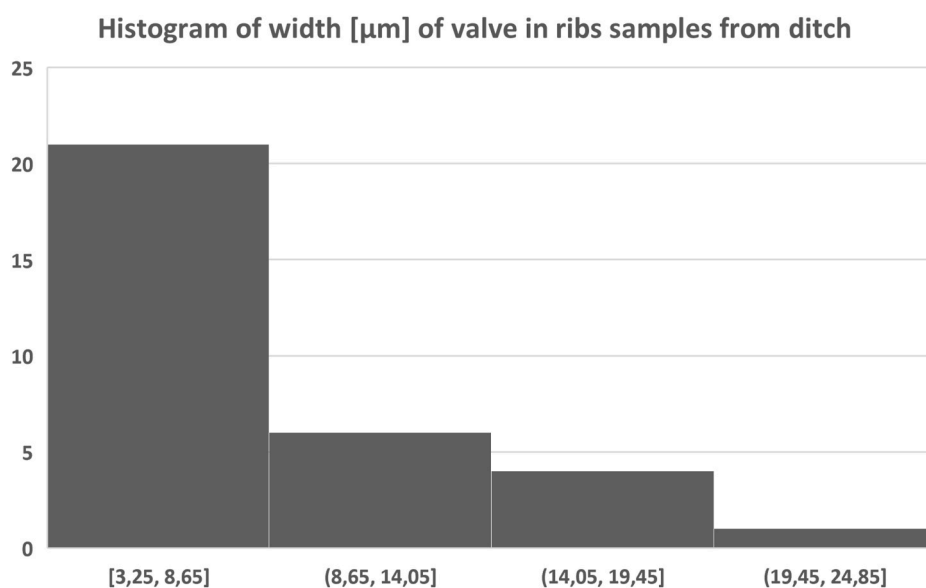


Fig. 14. Histogram of the width of the valves of species found in the tested samples taken from ribs that were immersed in a drainage ditch.

analyses (e.g. drug detection), in forensic genetic analysis, in the diagnosis of drowning by means of the diatom test, and for the detection of aquatic bacteria.^{52–59} Bone marrow may be collected, for example, from the iliac crest of the pelvis, vertebrae, femur, sternum, and ribs.^{35,55,57,60–62} Analysis of the anatomical structure of bone marrow has shown fewer autolytic changes as compared to other organs (e.g. the lungs, liver, kidneys, and brain). Even if cellularity decreased with the time elapsed between death and sampling, the changes were gradual and slower than elsewhere.^{55,63–65} What is more, the ribs have the advantage of being more easily accessible during autopsies as compared

to other sites, e.g. the femur or pelvic bones. Although the ribs may be easily damaged upon extraction and there is a relatively large risk of contamination, the results of our study are rather promising in terms of the diagnosis of drowning cases. The study shows that diatoms cannot passively penetrate the rib marrow.

Given the many advantages of bone marrow in the diagnosis of drowning cases in terms of both the mode and location of death, the need to maintain the integrity of the ribs should be borne in mind. Damage that disrupts bone continuity, whether before the corpse is found or in the autopsy room, can lead to diatom contamination through

passive postmortem penetration into the bone marrow. The issue of possible transfer of diatoms to long bone marrow is important in the recognition of drowning as a cause of death for corpses found in water. Research is done on various aspects of that issue, such as whether and how diatoms penetrate bone marrow as well as what may cause false positive results. Our experiments regarding the long-term residence of rib bones in aquatic ecosystems, the identification of the causes of contamination of the studied specimens, as well as recommendations on how to reduce it, are all part of this research. Our experimental study is the first to open many research threads. One of them is how age and previous bone diseases, e.g. osteoporosis, may affect the protection of the bone marrow and whether it is a barrier that prevents the penetration of diatoms. However, the limitation is obtaining material from older animals, in this case, the animal model - pigs, because they are not routinely slaughtered. Further research should be carried out, among others, in cooperation with forensic medicine scientists and diatomologists, on material obtained in cases where drowning may be the cause.

CRedit authorship contribution statement

Iwona Bogusz: formulation of overarching research goals and aims, conducting a research process, preparation, specifically critical review. **Marek Bogusz:** formulation or evolution of overarching research goals and aims, conducting a research process, specifically data collection, preparation, writing the initial draft, data presentation. **Beata Borowska:** preparation, specifically critical review. **Łukasz Szleszkowski:** preparation, specifically critical review. **Joanna Żelazna-Wieczorek:** formulation of overarching research goals and aims, verification of research outputs, application of statistical techniques to analyze study data, preparation, specifically critical review, oversight and leadership responsibility for the research activity planning and execution.

Declaration of competing interest

none

References

- Round FE, Crawford RM, Mann DG. *The Diatoms: Biology and Morphology of the Genera*. Cambridge, New York: Cambridge University Press; 1990:1-747.
- Bogusz M, Bogusz I, Siwińska A, Kwiatkowska M, Żelazna-Wieczorek J. Does the presence of diatoms in the internal human organs always confirm the death by drowning? *Issues of Forensic Sci*. 2018;302(4):2-10. <https://doi.org/10.34836/pk.2018.302.1>.
- Mann DG, Droop SJM. Biodiversity, biogeography, and conservation of diatoms. *Hydrobiologia*. 1996;336(1-3):19-32. <https://doi.org/10.1007/BF00010816>.
- Williams DM, Kociolek JP. An Overview of diatom classification with some prospects for the future. In: *The Diatom World*. 2011:49-91. https://doi.org/10.1007/978-94-007-1327-7_3.
- Verma K. Role of diatoms in the World of forensic science. *J Forensic Res*. 2013;4(2):181-184. <https://doi.org/10.4172/2157-7145.1000181>.
- Mei M, Xiangzhi M, Enyin V. Evaluation of four digestive methods for extracting diatoms. *Forensic Sci Int*. 2007;170(1):29-34. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2006.08.022>.
- Bak M, Witkowski A, Dobosz S, Kociolek JP, Pietras L. Diatoms and drowning: can diatoms enter the lungs after the initial drowning event? *Romanian Society of Leg Med*. 2018;26:29-36. <https://doi.org/10.4323/rjlm.2018.29>.
- Bogusz I, Bogusz M, Żelazna-Wieczorek J. Diatoms from inland aquatic and soil habitats as indestructible and nonremovable forensic environmental evidence. *J Forensic Sci*. 2022;67(6):1490-1504. <https://doi.org/10.1111/1556-4029.15017>.
- Lange-Bertalot H, Hofmann G, Werum M, Cantonati M. *Freshwater Benthic Diatoms of Central Europe: Over 800 Common Species Used in Ecological Assessment*. Koeltz Botanical Books, Schmittner-Oberreifenberg; 2017:1-942.
- van Beeck EF, Branche C, Szpilman D, Bierens J. A new definition of drowning: towards documentation and prevention of a global public health problem. *Bull World Health Organ*. 2005;83(11):853-856.
- Pearn J. Pathophysiology of drowning w. *Med J Aust*. 1985;142(11). <https://doi.org/10.5694/j.1326-5377.1985.tb113523.x>.
- Lawler W. Bodies recovered from water: a personal approach and consideration of difficulties. *J Clin Pathol*. 1992;45:654-659. <https://doi.org/10.1136/jcp.45.8.654>.
- Pollanen MS. The diatom test for drowning in Ontario. *J Can Soc Forensic Sci*. 1996;29(4):205-211. <https://doi.org/10.1080/00085030.1996.10757063>.
- Lunetta P, Penttilä A, Hallfors G. Scanning and transmission electron microscopical evidence of the capacity of diatoms to penetrate in the alveo-capillary barrier in drowning. *Int J Leg Med*. 1998;111(5):229-237. <https://doi.org/10.1007/s004140050159>.
- Piette MHA, De Letter EA. Drowning: still a difficult autopsy diagnosis. *Forensic Sci Int*. 2006;163(1-2):1-9. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2004.10.027>.
- Farrugia A, Ludes B. Diagnostic of drowning in forensic medicine in: forensic medicine – from old problems to new challenges. <https://doi.org/10.5772/19234>; 2011.
- Kaushik N, Pal KS, Sharma A, Thakur G. Role of diatoms in diagnosis of death due to drowning: case studies. *Int J Med Toxicol Forensic Med*. 2017;7(1):59-65. [https://doi.org/10.22037/ijmtfm.v7i1\(Winter\).14047](https://doi.org/10.22037/ijmtfm.v7i1(Winter).14047).
- Zhao J, Zhang P, Xue Y, et al. Correlation analysis of diatom content in the organs and drowning mediums for the drowning death cases. *Aust J Forensic Sci*. 2019;53(2):191-198. <https://doi.org/10.1080/00450618.2019.1682667>.
- Hürlimann J, Feer P, Elber F, Niederberger K, Dirnhofer R, Wyler D. Diatom detection in the diagnosis of death by drowning. *Int J Leg Med*. 2000;114:6-14. <https://doi.org/10.1007/s004149900122>.
- Bogusz M, Bogusz I, Żelazna-Wieczorek J. The possibilities and limitations of comparative diatomaceous analysis for confirming or excluding the site of an incident – case studies. *Forensic Sci Int*. 2023;346(1-3), 111644. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2023.111644>.
- Krstic S, Duma A, Janevska B, Levkov Z, Nikolova K, Noveska M. Diatoms in forensic expertise of drowning – a Macedonian experience. *Forensic Sci Int*. 2002;127(3):198-203. [https://doi.org/10.1016/S0379-0738\(02\)00125-1](https://doi.org/10.1016/S0379-0738(02)00125-1).
- Levkov Z, Williams DM, Nikolovska Tofilovska DS, Akar ZC. The use of diatoms in forensic science: advantages and limitations of the diatom test in cases of drowning. In: Williams M, Hill T, Boomer I, Wilkinson IP, eds. *The Archaeological and Forensic Applications of Microfossils: A Deeper Understanding of Human History*. The Micropalaeontological Society, Special Publications. London S: Geological Society; 2017:261-277.
- Giancamillo AD, Giudici E, Andreola S, Porta D, Gibelli D, Domeneghini C. Immersion of piglet carcasses in water – the applicability of microscopic analysis and limits of diatom testing on an animal model. *Leg Med*. 2010;12(1):13-18. <https://doi.org/10.1016/j.legalmed.2009.09.007>.
- Munro R, Munro HMC. Some challenges in forensic veterinary pathology: a review. *J Comp Pathol*. 2013;149(1):57-73. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2012.10.001>.
- McEwen BJ, Gerdin J. Veterinary forensic pathology: drowning and bodies recovered from water. *Veterinary Pathology*. 2016;53(5):1049-1056. <https://doi.org/10.1177/03009858156257>.
- Fucci N, Campobasso CP, Mastrogiosuippe L, et al. Diatoms in drowning cases in forensic veterinary context: a preliminary study. *Int J Leg Med*. 2017;131:1573-1580. <https://doi.org/10.1007/s00414-017-1565-y>.
- Piegari G, Biase De D, d'Aquino I, et al. Diagnosis of drowning and the value of the diatom test in veterinary forensic pathology. *Front Vet Sci*. 2019;6(404). <https://doi.org/10.3389/fvets.2019.00404>.
- Marshall M, Chraïbi V, Morgan R. Colonization of diatoms in and on porcine bone substrate and considerations of diatom ecology for forensic science. *J Forensic Sci*. 2023;68:1237-1244. <https://doi.org/10.1111/1556-4029.15296>.
- Marshall M, Chraïbi V, Morgan R. A method for bone marrow extraction of diatoms for forensic science applications. *J Forensic Sci*. 2023;68:1343-1351. <https://doi.org/10.1111/1556-4029.15297>.
- Oxnard Ch, Cartmill M, Brown KB. *The Scientific Bases of Human Anatomy*. Wiley-Blackwell; 2015:90-139.
- Steiniche T, Hauge EM. Normal structure and function of bone. In: An YH, Martin KL, eds. *Handbook of Histology Methods for Bone and Cartilage*. Totowa, New York, s: Human Press; 2003:59-72. https://doi.org/10.1007/978-1-59259-417-7_3.
- Aerssens J, Boonen S, Lowet G, Dequeker J. Interspecies differences in bone composition, density, and quality: potential implications for in vivo bone research. *Endocrinology*. 1998;139(2):663-670. <https://doi.org/10.1210/endo.139.2.5751>.
- Morales Juan-Pablo, Roa H, Ignacio Zavando, Daniela, Galdames Suazo, Iván. Determination of the species from skeletal remains through pistomorphometric evaluation and hiscriminant analysis. *Int J Morphol*. 2012;30(3):1035-1041. <https://doi.org/10.4067/S071795022012000300044>.
- Singh V. *General Anatomy*. Elsevier; 2008:75. New Dehli.
- Mc Intyre IM, King CV, Boratto M, Drummer OH. Postmortem drug analysis in bone and bone marrow. *Ther Drug Monit*. 2000;22(1):79-83. <https://doi.org/10.1097/00007691-200002000-00017>.
- Schloegl H, Rost T, Schmidt W, Wurst FM, Weinmann W. Distribution of ethyl glucuronide in rib bone marrow, other tissues and body liquids as proof of alcohol consumption before death. *Forensic Sci Int*. 2006;156(2-3):213-218. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2005.03.024>.
- Raikos N, Tsoukali H, Njau SN. Determination of opiates in postmortem bone and bone marrow. *Forensic Sci Int*. 2001;123(2-3):140-141. [https://doi.org/10.1016/S0379-0738\(01\)00529-1](https://doi.org/10.1016/S0379-0738(01)00529-1).
- Lafreniere NM, Watterson JH. Detection of acute fentanyl exposure in fresh and decomposed skeletal tissues part II: the effect of dose-death interval. *Forensic Sci Int*. 2010;194(1-3):60-66. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2009.10.008>.
- Grellner W, Glenewinkel F. Exhumations: synopsis of morphological and toxicological findings in relation to the postmortem interval. Survey on a 20-year period and review of the literature. *Forensic Sci Int*. 1997;90(1-2):139-159. [https://doi.org/10.1016/S0379-0738\(97\)00154-0](https://doi.org/10.1016/S0379-0738(97)00154-0).
- Kojima T, Okamoto I, Miyazaki T, Chikase F, Yashiki M, Nakamura K. Detection of methamphetamine and amphetamine in a skeletonized body buried for 5 years. *Forensic Sci Int*. 1986;31(2):93-102. [https://doi.org/10.1016/0379-0738\(86\)90193-3](https://doi.org/10.1016/0379-0738(86)90193-3).
- Giordano G, Biehler-Gomez L, Seneci P, Cattaneo C, Di Candia D. Detecting drugs in dry bone: a pilot study of skeletal remains with a post-mortem interval over 23

- years. *Int J Legal Med.* 2021;135:457–463. <https://doi.org/10.1007/s00414-020-02494-8>.
42. Franceschetti L, Di Candia D, Giordano G, Carabelli I, Vignali G, Cattaneo C. Drugs in bone: Detectability of substances of toxicological interest in different states of preservation. *J Forensic Sci.* 2021;66:677–686. <https://doi.org/10.1111/1556-4029.14636>.
43. Cooper JE, Cooper ME. Forensic veterinary medicine: a rapidly evolving discipline. *Forensic Sci Med Pathol.* 2008;4(2):75–82. <https://doi.org/10.1007/s12024-008-9036-x>.
44. Ludes B, Coste M, North N, Doray S, Tracqui A, Kintz P. Diatom analysis in victim's tissues as an indicator of the site of drowning. *Int J Legal Med.* 1999;112(3):163–166. <https://doi.org/10.1007/s004140050224>.
45. Yen LJ, Jayaprakash PT. Prevalence of diatom frustules in non-vegetarian foodstuffs and its implications in interpreting identification of diatom frustules in drowning cases. *Forensic Sci Int.* 2007;170(1):1–7. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2006.08.020>.
46. Lunetta P, Miettinen A, Spilling K, Sajantila A. False-positive diatom test: a real challenge? A post-mortem study using standardized protocols. *Leg Med.* 2013;15(5):229–234. <https://doi.org/10.1016/j.legalmed.2013.03.002>.
47. Pachar JV, Cameron JM. The diagnosis of drowning by qualitative and quantitative diatom analysis. *Med Sci Law.* 1993;33(4):291–299. <https://doi.org/10.1177/002580249303300404>.
48. Llamas B, Valverde G, Fehren-Schmitz L, Weyrich LS, Cooper A, Haak W. From the field to the laboratory: controlling DNA contamination in human ancient DNA research in the high throughput sequencing era. *Star: Science and Technology of Archaeological Research.* 2017;3(1):114. <https://doi.org/10.1080/20548923.2016.1258824>.
49. Marezza F, Marchetti C, Lanzi G, Lusetti A, Bertani A, Cecchi R. Diatom extraction: a new technique with heated H₂O₂. A technical note. *Leg Med.* 2021;50. <https://doi.org/10.1016/j.legalmed.2021.101861>.
50. Kakizaki E, Shinkawa N, Sonoda A, Yukawa N. Conventional diatom testing using strong acid: Notable false-positive results caused by an underestimated contamination source (blind spot). *Forensic Sci Int.* 2022;330, 111131. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2021.111131>.
51. Szűcs D, Fejes V, Kozma Z, Poór VS. Sternal aspirate sampling of Bacillariophyceae (diatoms) and Cyanobacteria in suspected drowning cases. *Journal of Forensic and Legal Medicine.* 2022;85, 102298. <https://doi.org/10.1016/j.jflm.2021.102298>.
52. Pollanen MS. The diagnostic value of the diatom test for drowning, II. Validity: analysis of diatoms in bone marrow and drowning medium. *Forensic Sci Int.* 1997;42(2):286–290.
53. Gruspier KL, Pollanen MS. Limbs found in water: investigation using anthropological analysis and the diatom test. *Forensic Sci Int.* 2000;112(1):1–9. [https://doi.org/10.1016/s0379-0738\(99\)00231-5](https://doi.org/10.1016/s0379-0738(99)00231-5).
54. Hao LG, Deng SX, Zhao XC. Recent advancement in relationship between DNA degradation and postmortem interval. *Fa Yi Xue Za Zhi.* 2007;23(2):145–147.
55. Cartiser N, Bévalot F, Fanton L, Gaillard Y, Guitton J. State-of-the-art of bone marrow analysis in forensic toxicology: a review. *Int J Legal Med.* 2011;125(2):181–198. <https://doi.org/10.1007/s00414-010-0525-6>.
56. Vandenbosch M, Somers T, Cuypers E. Distribution of methadone and metabolites in skeletal tissue. *J Anal Toxicol.* 2018;42(6):400–408. <https://doi.org/10.1093/jat/bky014>.
57. Orfanidis A, Gika H, Mastrogrianni O, et al. Determination of drugs of abuse and pharmaceuticals in skeletal tissue by UHPLC–MS/MS. *Forensic Sci Int.* 2018;290:137–145. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2018.07.004>.
58. Vandenbosch M, Rooseleers L, Van Den Bogaert W, Wuestenbergs J, Van de Voorde W, Cuypers E. Skeletal tissue, a viable option in forensic toxicology? A view into post mortem cases. *Forensic Sci Int.* 2020;309, 110225. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2020.110225>.
59. Vandenbosch M, Pajk S, Van Den Bogaert W, Wuestenbergs J, Van de Voorde W, Cuypers E. Postmortem analysis of opioids and metabolites in skeletal tissue. *J Anal Toxicol.* 2022;46(7):783–790. <https://doi.org/10.1093/jat/bkab095>.
60. Benkő A. Toxicological analysis of amobarbital and glutethimide from bone tissue. *J Forensic Sci.* 1985;30(3):708–714.
61. Horak EL, Jenkins AJ. Postmortem tissue distribution of olanzapine and citalopram in a drug intoxication. *J Forensic Sci.* 2005;50(3):679–681.
62. Van den Boer TC, Grummett SA, Watterson JH. Utility of immunoassay in drug screening in skeletal tissues: sampling considerations in detection of ketamine exposure in femoral bone and bone marrow following acute administration using ELISA. *J Forensic Sci.* 2008;53(6):1474–1482. <https://doi.org/10.1111/j.1556-4029.2008.00866.x>.
63. Diebold J, Molina T, Camilleri-Broët S, Tourneau A Le, Audouin J. Bone marrow manifestations of infections and systemic diseases observed in bone marrow trephine biopsy review. *Histopathology.* 2000;37(3):199–211. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2559.2000.00965.x>.
64. Roll P, Beham A, Beham-Schmid Ch. Post-mortem histopathological investigations of the bone marrow in forensic medicine: an important issue for both the forensic and clinical pathologist. *Forensic Sci Int.* 2009;186(1-3):17–20. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2008.12.005>.
65. van Doorn NL, Wilson AS, Willerslev E, Gilbert MT. Bone marrow and bone as a source for postmortem RNA. *J Forensic Sci.* 2011;56(3):720–725. <https://doi.org/10.1111/j.1556-4029.2010.01684.x>.

Załącznik 2

The possibilities and limitations of comparative diatomaceous analysis for confirming or excluding the site of an incident – Case studies

Bogusz Marek, **Bogusz Iwona**, Żelazna-Wieczorek Joanna

Bogusz M., **Bogusz I.**, Żelazna-Wieczorek J. 2023. The possibilities and limitations of comparative diatomaceous analysis for confirming or excluding the site of an incident – case studies. *Forensic Science International* 346(1-3), 111644.
<https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2023.111644>.

Łódź, 15.01... 2025 r.

Oświadczenie o współautorstwie

Oświadczam, że mój wkład w przygotowanie oryginalnej pracy był wiodący i polegał na: przygotowaniu koncepcji pracy, zaplanowaniu i realizacji prac w terenie oraz udział w analizie i interpretacji uzyskanych wyników oraz w dyskusji. Pracowałem również nad ostateczną wersją manuskryptu.

mgr Marek Bogusz



Łódź, 15.01... 2025 r.

Oświadczenie o współautorstwie

Oświadczam, że mój wkład w przygotowanie oryginalnej pracy był **znaczący** i polegał na: zaplanowaniu i realizacji prac w terenie, identyfikacji taksonomicznej okrzemek, a także udział w analizie i interpretacji uzyskanych wyników oraz w dyskusji. Pracowałam również nad ostateczną wersją manuskryptu.

mgr Iwona Bogusz

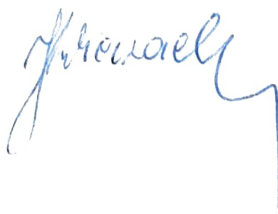


Łódź, 28.01... 2025 r.

Oświadczenie o współautorstwie

Oświadczam, że mój wkład w przygotowanie oryginalnej pracy polegał na: przygotowaniu koncepcji pracy, opracowaniu wyników z wykorzystaniem metod matematycznych, udziale w dyskusji i interpretacji uzyskanych wyników oraz w przygotowaniu ostatecznej wersji manuskryptu.

dr hab. Joanna Żelazna-Wieczorek prof. UL





The possibilities and limitations of comparative diatomaceous analysis for confirming or excluding the site of an incident – Case studies



Marek Bogusz ^{a,c}, Iwona Bogusz ^{b,c}, Joanna Żelazna-Wieczorek ^{c,*}

^a Forensic Medicine Department of Medical University of Warsaw, Warszawa, Poland

^b Special Training Unit, Police Training Centre in Legionowo, Legionowo, Poland

^c Department of Algology and Mycology, Faculty of Biology and Environmental Protection, University of Łódź, Łódź, Poland

ARTICLE INFO

Article history:

Received 5 January 2023

Received in revised form 9 March 2023

Accepted 10 March 2023

Available online 13 March 2023

Keywords:

Death in water

Diatomaceous comparative analysis

Drowning

Forensic ecology

Geolocation

Tissue samples

ABSTRACT

Diatoms (Bacillariophyta) are unicellular photosynthetic organisms commonly occurring in aquatic habitats on Earth. Their autecology makes them almost perfect indicators of environmental conditions and so have high potential for use in forensics. Both eurytopic and stenotopic species are important in site identification: eurytopic forms due to their abundance, and stenotopic forms due to their narrow range of tolerance to environmental conditions. Their presence can hence provide a clear insight into an ecosystem and its microhabitats. The diatoms are useful as significant indicator in diagnosing of drowning. However, to definitively link a corpse with the place where it was found and to indicate whether this was also the crime scene, it is essential that any comparative diatomaceous analyses are performed correctly. The following study presents selected cases in which a comparative diatomaceous analysis was performed. In all cases, the biological samples secured during the autopsy were compared with environmental samples collected from the site of the cadaver disclosure. Our findings show both the possibilities and limitations of using this method in forensics. These forensic investigations need close collaboration between coroners and diatomology experts. It is crucially important to reveal whether the place of corpse finding is the same as the place of drowning.

© 2023 The Authors. Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

1. Introduction

The diatoms are a group of photoautotrophic organisms distinguished by high species diversity. It is estimated that there are about 200,000 species of diatoms in the biosphere [1], which approximately 6500 occur in various habitats in Poland. Their defining taxonomic characteristic is the specific structure of their cell wall [2–4]. The construction of the cell wall is also very valuable from a forensic perspective, especially as it confers considerable resistance to various environmental, physical and chemical factors. The diatom exoskeleton is strongly saturated with hydrated silica, which gives it an opal structure [3]. This feature makes it resistant to biological decomposition processes and most chemical compounds, including the strong inorganic acids, hydrogen peroxide and high temperatures used in diatom preparation [5–7].

While diatoms inhabit various ecosystems, individual species exhibit specific preferences towards certain environmental

conditions, which affects the composition and abundance of their assemblages depending on the habitat. The diatoms can be classified into two groups based on their distribution: eurytopic species with a wide range of tolerance to environmental conditions and thus inhabit all or almost all types of ecosystems, and stenotopic species, which demonstrate a very narrow spectrum of environmental requirements, and which occur in specific ecosystems and habitats. Species that are identified in a specific type of habitat, for example, acidic raised bogs, are referred to as being *characteristic* of this type of habitat. Diatoms inhabit both 'natural' water ecosystems, as well as those that are strongly transformed or created as a result of human activity [8–12]. Thus, by determining the qualitative and quantitative structure of diatom communities occurring in a given ecosystem, or even a microhabitat, can provide an insight into the conditions characteristic of the location, based on their autecology. In addition, even a "diatomaceous sample" alone may be enough to offer a clue as to its source habitat [13,14].

Water and water-dependent ecosystems in Poland cover 4.4 million ha, i.e. 14% of the area of the country. Every year in Poland, about 500 cases of drowning are reported in various types of aquatic ecosystems, with police statistics indicating 1458 cases of confirmed drowning in 2017–2019 (Table 1).

* Correspondence to: Department of Algology and Mycology, Faculty of Biology and Environmental Protection, University of Łódź, Banacha 12/16 Street, 90-237 Łódź, Poland.

E-mail address: joanna.zelazna@biol.uni.lodz.pl (J. Żelazna-Wieczorek).

Table 1

The number of drowning cases in Poland in 2017–2019 divided into type of aquatic ecosystems (<https://statystyka.policja.pl>).

Aquatic ecosystems	2017	2018	2019
River	117	133	120
Lake	101	124	119
Pond	81	91	82
Lagoon	41	38	39
Sea	14	39	21
other	103	120	75
In total	457	545	456

According to the description of the pathophysiology of the drowning process, water enters the lungs after a period of breath-hold. When drowning in aquatic ecosystems, this water usually contains diatoms. Up to 2 liters of this material then enters the bloodstream. Thus, the disclosure of diatoms in the lungs or stomach of the deceased indicates contact with the aquatic environment before death. In the circulatory system, diatoms are distributed throughout the body along with the blood [15–20]. In cadavers discovered in water, the presence of diatoms in the internal organs, such as kidneys and bone marrow, may indicate that the person was breathing, and hence still alive, after entering the water; it can hence be concluded that death was most likely caused by drowning.

It should be remembered, though, that diatoms can also penetrate internal organs through wounds, formed either before or after death, and as a result of decay during prolonged contact with water [21,22]. However, during drowning, the vast majority of diatoms remain in the lungs, and only a few are transported to distant organs through the bloodstream [23,24]. In cases where a body is placed posthumously in water, diatoms can be found in the lungs following passive absorption of water containing diatoms, but do not penetrate the bloodstream [16]. On the other hand, a lack of diatoms in the kidney does not preclude drowning as the cause of death, as it may be caused by the rapid cessation of circulation in a drowning person. For this reason, it is more important in the diagnosis to find diatoms both in the lung and in the rib marrow [6].

The present study addresses the following questions:

1. How does the size of diatoms affect their presence in various internal organs?

2. Does the qualitative and quantitative differentiation of diatoms identified in the internal organs correspond to the environmental tests secured at the site of the disclosure of the body?
3. Does the analysis of diatom communities allow for confirmation or exclusion of the place where the body was revealed as a drowning site?
4. What are the possible limitations for the use of the diatomaceous comparative analysis?

The study reviews selected cases of deaths in water, and examines the environmental tests performed to determine the presence of diatoms.

1.1. Description of places of analysed cases

The research was based on biological samples taken from cadavers from 2017 to 2019 cases in the Mazowieckie Voivodeship, together with environmental samples taken from the associated aquatic ecosystems (Fig. 1, Table 2).

Among the analysed cases, seven (cases 005, 006, 007, 028, 036, 037, 043) are related to the Vistula river within the Warsaw agglomeration. It is a 20 km section in the middle course of the longest river in Poland (Table 2, Fig. 2). Cases 009 and 025 are taken from the capital city of Warsaw, but these are not directly related with Vistula streambed. In contrast, seven of the examined cases come from different types of ecosystems/habitats in the Mazowieckie Voivodeship.

2. Material and methods

Samples from the lungs, kidneys, rib marrow and gastric contents taken from the identified corpses by doctors from the Department of Forensic Medicine at the Medical University of Warsaw during routine autopsy and subjected to diatom analysis. The forensic medicine doctor confirmed drowning, among others, on the basis of indicators such as: froth around the mouth, nostrils and lungs, alveolar edema and emphysema aquosum.

In addition, 100 ml environmental samples comprising plankton, benthos and epiphyton were taken from the discovery location and subjected to comparative diatomaceous analysis (Table 2). Plankton consists of small organisms having none or very limited possibilities of locomotion. Diatoms belonging to plankton were collected using a

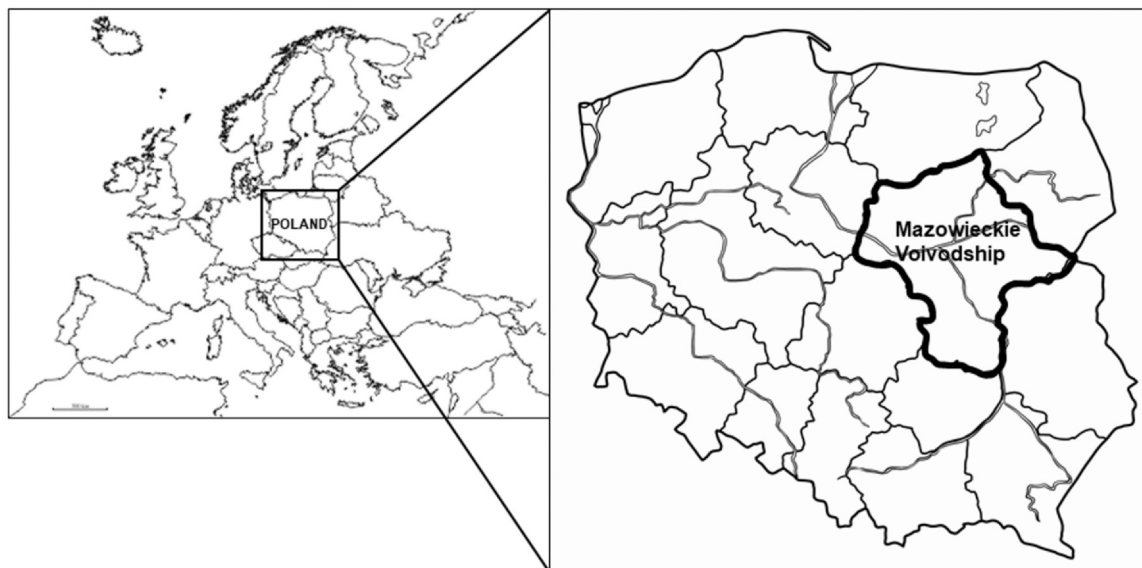


Fig. 1. The study area from which the investigated cases originated.

Table 2

Comparison of the collected biological and environmental samples for individual cases.

Case	Disclosure place	Samples*		Gender	Cause of death	Putrefactive decomposition	Disclosure time	Environmental sampling time
		Organs	Habitat					
005	Vistula	LU, ST, RI	PL, EP, BE	female	drowning	NO	beginning of March 2018	after 2 weeks
006	Vistula	LU, ST, RI	PL, EP, BE	male	myocardial infarction	NO	end of April 2018	after 5 months
007	Vistula	LU, ST, RI	PL, EP, BE	female	drowning	NO	beginning of April 2018	after 2 weeks
008	Pond M	LU, ST, RI	PL, EP, BE	male	drowning	NO	mid of April 2018	after 2 weeks
009	Canal VR	LU, RI	PL, EP, BE	female	drowning	NO	mid of June 2018	after 2 weeks
010	Pond K	LU, RI	PL, BE	female	drowning	NO	end of May 2018	after 1 week
023	Small river J	LU, RI, KI	PL, EP, BE	male	drowning	NO	end of December 2018	after 6 weeks
025	Port VR	LU, KI	PL, EP, BE	male	drowning	NO	beginning of January 2019	after 6 weeks
026	Ditch A	LU, ST, RI, KI	PL	female	drowning	NO	beginning of January 2019	after 2 weeks
028	Vistula	LU, KI	PL, EP, BE	female	drowning	NO	mid of January 2019	after 2 weeks
035	Small river S	LU, RI, KI	PL, EP, BE	male	drowning	YES	beginning of April 2019	after 1 day
036	Vistula	LU, ST, RI, KI	PL, EP, BE	male	drowning	YES	mid of April 2019	after 2 weeks
037	Vistula	LU, ST, RI, KI	PL, EP, BE	male	drowning	YES	beginning of April 2019	after 2 weeks
039	Ditch NG	LU, ST, RI, KI	PL, BE	male	drowning	NO	beginning of May 2019	after 3 weeks
043	Vistula	LU, RI, KI	PL, EP, BE	male	drowning	NO	beginning of June 2019	after 2 weeks
058	Ditch S	LU, ST, RI, KI	PL, EP, BE	male	drowning	NO	end of September 2019	after 3 weeks

Explanations *: LU – lung, ST – stomach, RI – rib marrow, KI – kidney, PL – plankton, EP – epiphyton, BE – benthos

plankton net with a mesh size of no more than 25 µm. Benthos refers to organisms growing upon substrate on the bottom of standing and floating waters. In our study, we took benthic diatoms samples from mud and sand. We used 5 mm Ø glass tube about a meter long for collecting mud and sand sediments with diatoms. Epiphytic diatoms covering submerged macrophytes, visible as a brown film associated with the macrophytes, were collected directly from the plants. The plants were shaken vigorously and squeezed in the plastic bag and the resulting brown suspension was poured into a sample container [25].

2.1. Preparation of diatoms from biological and environmental samples

Fifty grams each of kidney and lung tissue, 10 cm samples of ribs and the entire contents of the stomach collected during the autopsy (Table 2) were digested in 300 ml of 30% hydrogen peroxide (H₂O₂) at 70 °C for 48 h, with the addition of a few ml of concentrated sulfuric acid (H₂SO₄). The samples were then rinsed several times with Line-EtOH (a mixture of ethanol, diethyl ether and acetone) and centrifuged at 2600g for three minutes between each rinsing. Distilled water was added to the samples after the final centrifugation. The cleaned diatom frustules were then transferred to microscope slides and, after drying, embedded in Naphrax® resin. The slides were observed under a light microscope at a magnification of 10 × 100/1.25.

Environmental samples were examined with a light microscope at a magnification of 10 × 40/1.25 to confirm the presence of live diatoms. Following this, 1 ml of 4% formaldehyde (formalin) was added for preservation. From each sample, 2 ml was taken into a test tube, a few drops of concentrated sulphuric acid were added, and 2 ml of 30% chromic acid. After the organic matter had been digested, the samples were centrifuged at 2600g for three minutes. After centrifugation, the samples were rinsed with distilled water and centrifuged again. This operation was repeated until a purified diatom sediment was obtained. The cleaned diatom frustules were then transferred to microscope slides and, after drying, embedded in Naphrax® resin. The microscopic slides were observed under a light microscope at a magnification of 10 × 100/1.25.

The qualitative analysis describing the species composition of diatom assemblages was performed for each microscope slide after counting over 500 valves. The next three bands of the microscope slide were then checked in order to identify the diatoms that did not

appear during the count. In the case of a smaller number of valves being present, the entire slide was observed and all valves were counted.

2.2. Data processing and analysis

The structure of the diatom communities were described by qualitative and quantitative analyses. The quantitative structure of diatoms in each sample was expressed in relative values. Species with a percentage share of ≥ 5% were identified as dominant. The biodiversity of habitats was determined on a case-by-case basis by determining the number of identified taxa and by the Shannon diversity [26,27]. For the purposes of this study, the term *characteristic species* was adopted for an identified species of diatom that was not recorded in any of the other sites studied.

The natural groupings of environmental samples were determined by Hierarchical Cluster analysis (HCA) and non-metric multidimensional scaling analysis (nMDS) based on Bray–Curtis similarity coefficients. The results (nMDS) are given as a 2D diagram in which the degree of similarity is represented as the distances between particular points (samples), with greater distances indicating a lower degree of similarity. The reliability of the ordering of the assemblage is represented by the stress value, which reflects how well the ordination summarizes the observed distances among the samples [26,27].

The diatom species with the strongest influence on the similarities between the environmental samples were identified by Shade Plot analysis, based on the Bray–Curtis similarity coefficient. Shade Plot analysis compares two data matrices with each other and then groups them on two levels according to the similarity of the samples and the factors affecting their similarity, i.e. diatom species. The results are represented graphically by shading individual cells, with the intensity of the shading indicating the degree of the influence of a given factor (species) on the position of its sample within a given similarity cluster. The range of the shading was determined based on the square root.

The similarity between the samples from internal organs and the environmental samples was also determined by the use of comparable numbers of valves identified in the samples; these findings were subjected to HCA analysis [26,27].

The HCA, nMDS and Shade Plot analyses were performed using PRIMER 7.0.13 software.

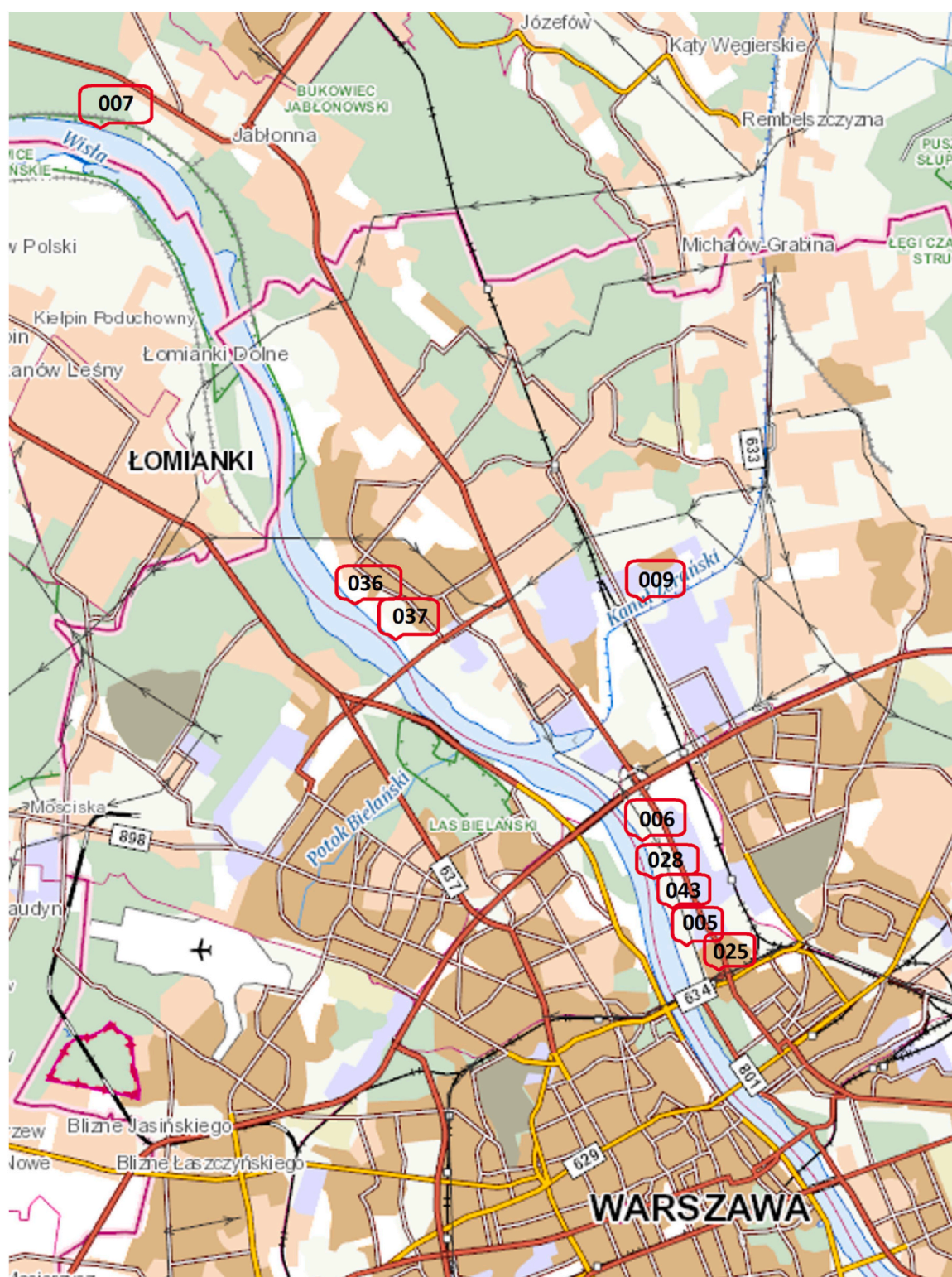


Fig. 2. Location of cases in the Warsaw agglomeration.

The information about the ecological properties of the diatoms were obtained from the OMNIDIA 6.0.6 database and diatom bibliography [4,27–30].

3. Results

The discussed cases concern cadavers disclosed in the aquatic environment. Analysed autopsies, which had been performed by the

forensic medicine doctor, had found drowning to be the cause of death in all cases except the case 006, in which the cause of death had been indicated as myocardial infarction.

The analysis of fresh environmental samples confirmed that 90% of the diatoms in the samples were alive. In all the tested samples, both from internal organs and from the environment, a total of 307 species of diatoms were identified, including 294 in the environmental samples and 265 in the internal organ samples.

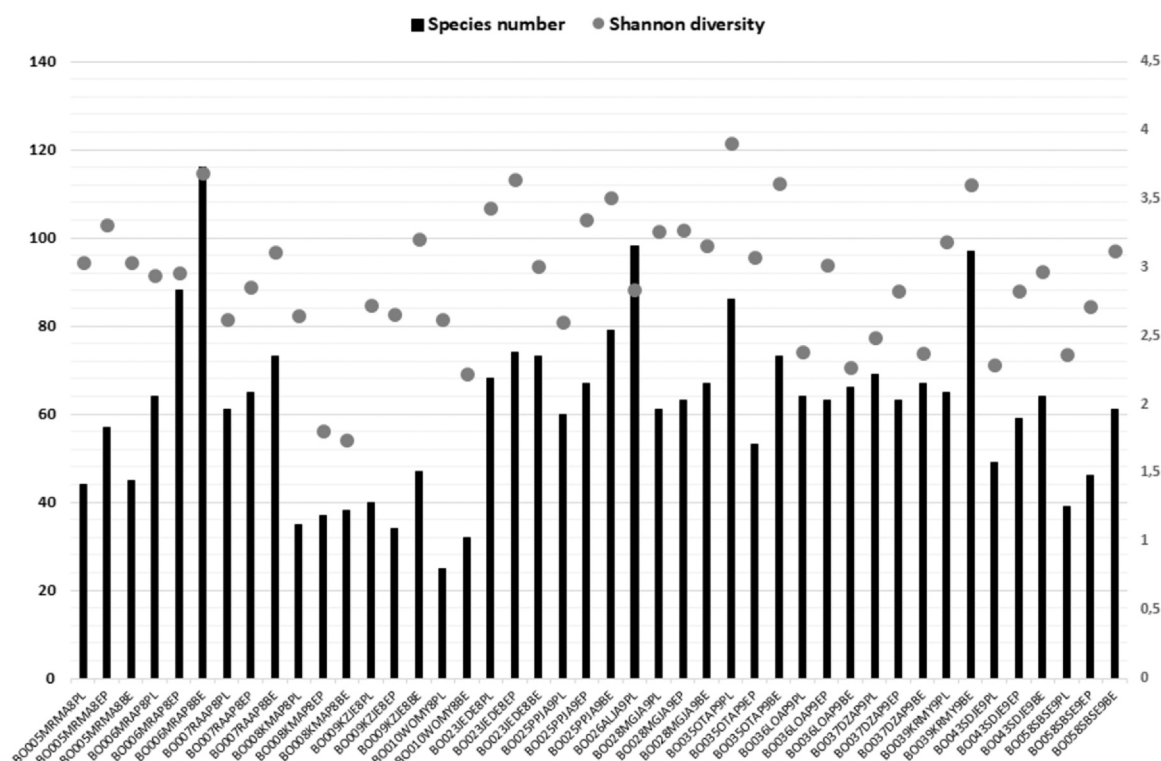


Fig. 3. Diatom diversity of environmental samples in the individual cases studied.

3.1. Analysis of diatom communities in the locations where the bodies were found

The qualitative and quantitative analysis of the diatom community structure in the environmental samples revealed a spatial differentiation of communities with regard to discovery location and the ecological formation. In each case, the most species were identified in the benthic sample. The largest number of diatom species was identified in case 006 from the benthos of the Vistula River (116 species). The lowest number of species was identified in the plankton samples in case 010 (25 species). The lowest Shannon diversity index was determined for the environmental samples in case 008, a small pond, taken in the middle of April. High Shannon index values (i.e. above 3) were determined for cases coming from the Vistula River, regardless of the season (Fig. 3).

The analysis of the similarity between all environmental samples found considerable distinctiveness between diatom communities depending on discovery location (Figs. 4 and 5).

Additionally, the detailed analysis of the case samples from the Vistula River confirmed the distinctiveness of the diatom communities in individual cases along a 20 km distance (Fig. 6).

An analysis was performed to identify the diatom species differentiating the sites of individual cases (Fig. 6).

The analysis identified the 50 species of diatoms that most clearly differentiated the studied locations. These species indicate the distinctiveness of the locations in various ways, i.e. by different species abundances, or by their presence in one place and their absence in another. The species present in all environmental samples (euconstans species) were *Melosira varians* Ag., *Gomphonema parvulum* (Kütz.) Kütz., *Cyclotella meneghiniana* Kütz. and *Nitzschia palea* (Kütz.) W. Smith. *Melosira varians* was the most numerous in the samples from case 008, reaching over 60% of the total share. Of the species occurring in several locations, *Navicula salinarum* Grun. was present in three cases: 028, 039 and 026. In the case of 026 it occupied a share of 44%; distinguishing this location from all the others. *Diadesmis confervacea* Kütz. was recorded in two cases: in

006, where it had a share of less than 1% in epiphyton and benthos; and in 009, in which it occurred in all samples, with a share of more than 5%.

3.2. The analysis of samples from internal organs for the presence of diatoms

The presence of diatoms in the internal organs included both quantitative and taxonomic analyses. In total, 265 diatom species were found in the internal organ samples (Table 3), which constitutes 86.3% of all diatom species identified during the study.

In contrast, only 57 species were identified in the kidney and rib marrow samples, i.e. 18.6% of all identified diatom species. Also, considerably more valves were revealed in the lungs and stomachs ($n = 5639$) than in the kidneys and rib marrow ($n = 333$). The analysis of the width and length of diatom valves penetrating into various organs (Fig. 7 and Fig. 8) found the diatoms in the lungs and stomach to be different in size to those in the kidney and bone marrow samples.

Among the diatoms identified in the lungs and in the stomach content, 88% ranged in length from 5.1 μm to 85.1 μm , while of those penetrating into the kidneys and rib marrow, 93% ranged from 5.1 μm to 50.1 μm . In addition, among those in the lungs and in stomach contents, 80% of the widths ranged from 2.5 μm and 12.5 μm , while in the kidneys and rib marrow, 70% ranged in width from 3.3 μm to 9.9 μm . It should be noted that 5 species were identified in the lungs and stomach contents, ranging from 245 μm to 325 μm in length, and 1 species in the kidneys and the rib marrow *Ulnaria ulna* (Nitzsch) Compère, ranging from 230 μm to 320 μm in length.

3.3. Description of cases

3.3.1. Case 005

The body was discovered in the Vistula River in Warsaw (Fig. 2) in the beginning of March 2018. Environmental samples were taken

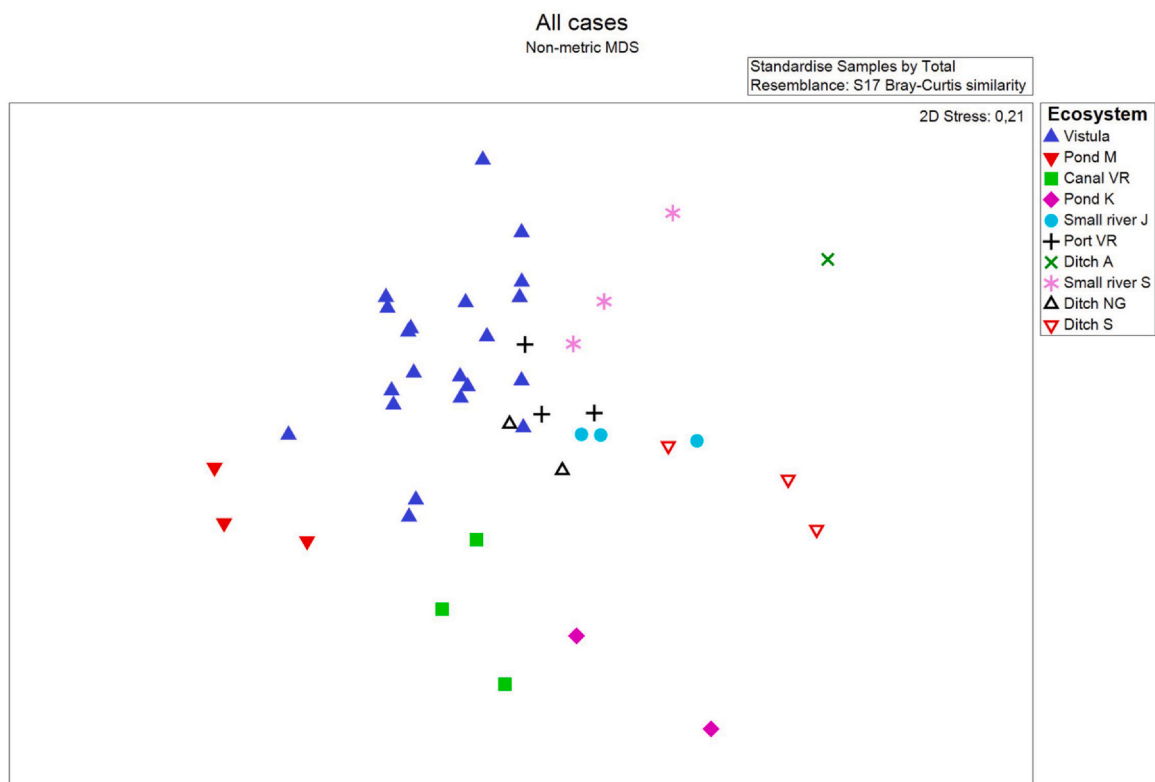


Fig. 4. Ecosystems differentiation due to the structure of diatom communities.

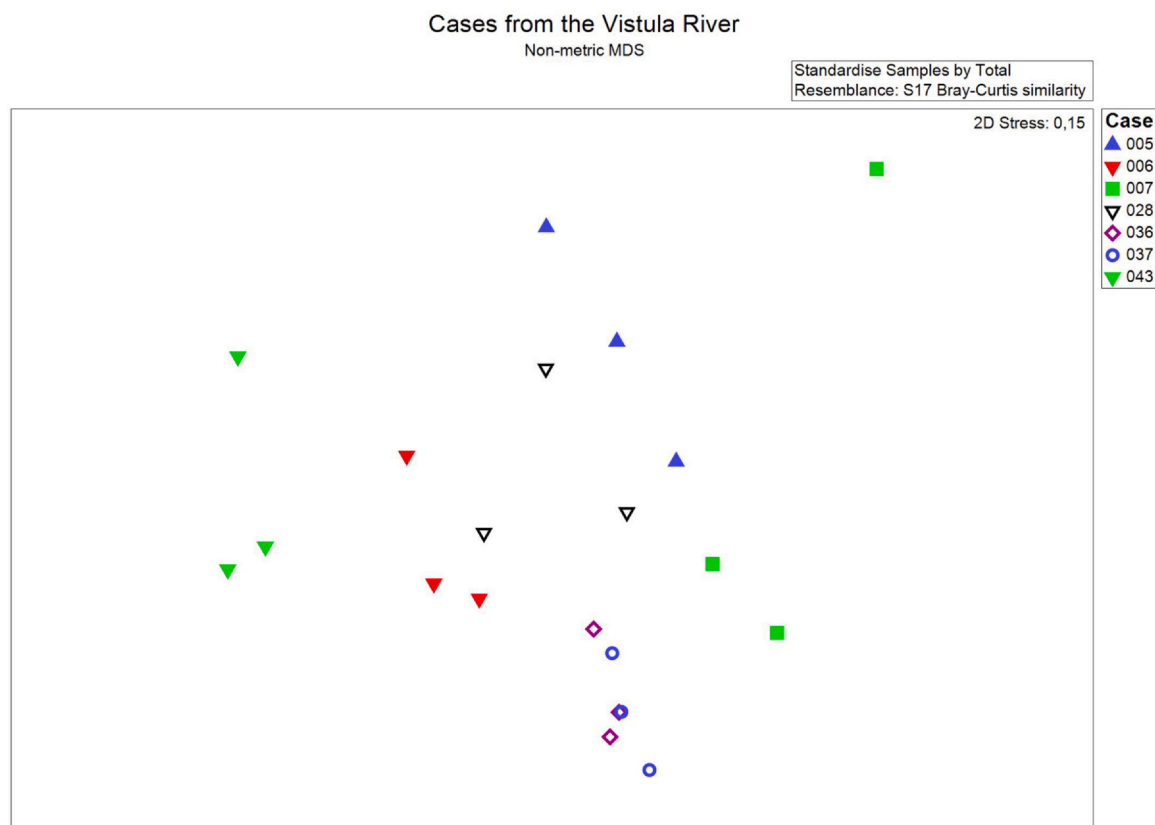


Fig. 5. Habitat differentiation due to the structure of diatom communities in cases in the Vistula River.

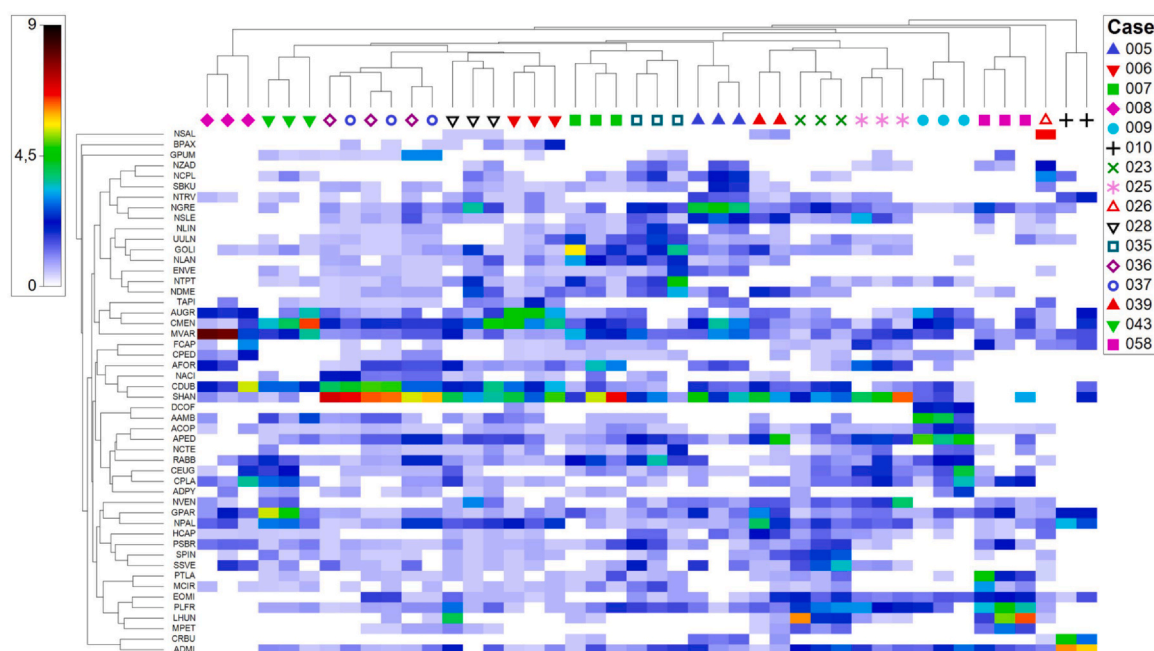


Fig. 6. The Shade Plot analysis diagram shows the participation of important species of diatoms in individual samples (scale - square root number of valves in the sample).

two weeks later and were found to include 63 diatom species. The species characteristic of this site were *Diatoma moniliformis* (Kütz.) Williams, *Navicula meniscus* Schumann, *N. rostellata* Kütz. and *N. trophicatrix* Lange-Bert.

The dominant species in the environmental samples were *Navicula gregaria* Donk. (14–19%), *Stephanodiscus hantzschii* Grun. (6–21%), *Cyclotella meneghiniana* (5–13%), *Navicula slesvicensis* Grun. (5–8%, 4% in the epiphyton), *Melosira varians* (8–9%, 2% in the plankton) and *Nitzschia capitellata* Hust. (5–6%, 2% in the plankton). A total of 9 species (14 valves) were revealed, but only in the lung and stomach contents: not the rib marrow (Table 3). All species revealed in the organ samples were also present in the environmental samples.

3.3.2. Case 006

The body was discovered in the Vistula River in Warsaw at the Grot-Rowecki Bridge (Fig. 2) at the end of April 2018. Autopsy showed that the cause of death was myocardial infarction. Environmental samples were taken five months later and 128 diatom

species were found. The characteristic species of this location were *Amphora minutissima* W. Smith, *Aneumastus rostratus* (Hust.) Lange-Bert., *Cymatopleura elliptica* (Bréb.) W. Smith, *Denticula tenuis* Kütz., *Mayamaea atomus* (Kütz.) Lange-Bert., *Nitzschia fruticosa* Hust. and *N. sociabilis* Hust.

The dominant species in the environmental samples were *Aulacoseira granulata* (Ehrenb.) Simonsen (10–20%), *Cyclostephanos dubius* (Hust.) Round (5–11%), *Cyclotella meneghiniana* (9–19%), *Stephanodiscus hantzschii* (8–23%) and *Nitzschia palea* (6%, 4% in the epiphyton and 2% in the benthos). The conducted research included samples from the lung, stomach contents and rib marrow. Diatoms were revealed in the lungs (only 8 valves belonging to 6 species) and stomach contents (603 valves/138 species); in total, 138 species were found (Table 3). The diatom species revealed in the lung samples were also present in the environmental samples. The stomach contents revealed one cover from 24 species, which was not found in environmental samples: *Cocconeis pseudolineata* (Geitler) Lange-Bert., *Cymbella lanceolata* Ag., *Diatoma ehrenbergii* Kütz., *Fallacia clepsidroides* Witk., *F. insociabilis* (Krasske) Mann, *Frustulia vulgaris*

Table 3
Comparison of the number of valves found in organs and identified species in particular cases.

Case	Lungs (LU)		Stomach (ST)		Kidney (KI)		Rib (RI)	
	Species	Valves	Species	Valves	Species	Valves	Species	Valves
005	1	1	8	13	-	-	0	0
006	6	8	138	603	-	-	0	0
007	9	15	20	45	-	-	4	5
008	30	91	1	1	-	-	5	6
009	29	432	-	-	-	-	0	0
010	19	42	-	-	-	-	0	0
023	38	106	-	-	6	9	44	249
025	61	481	-	-	7	16	-	-
026	90	747	55	741	4	4	1	1
028	7	11	-	-	0	0	-	-
035	64	175	-	-	0	0	0	0
036	54	240	16	49	1	1	11	23
037	46	126	10	12	5	4	6	7
039	15	81	95	990	0	0	0	0
043	35	173	-	-	1	2	3	6
058	0	0	61	456	0	0	0	0

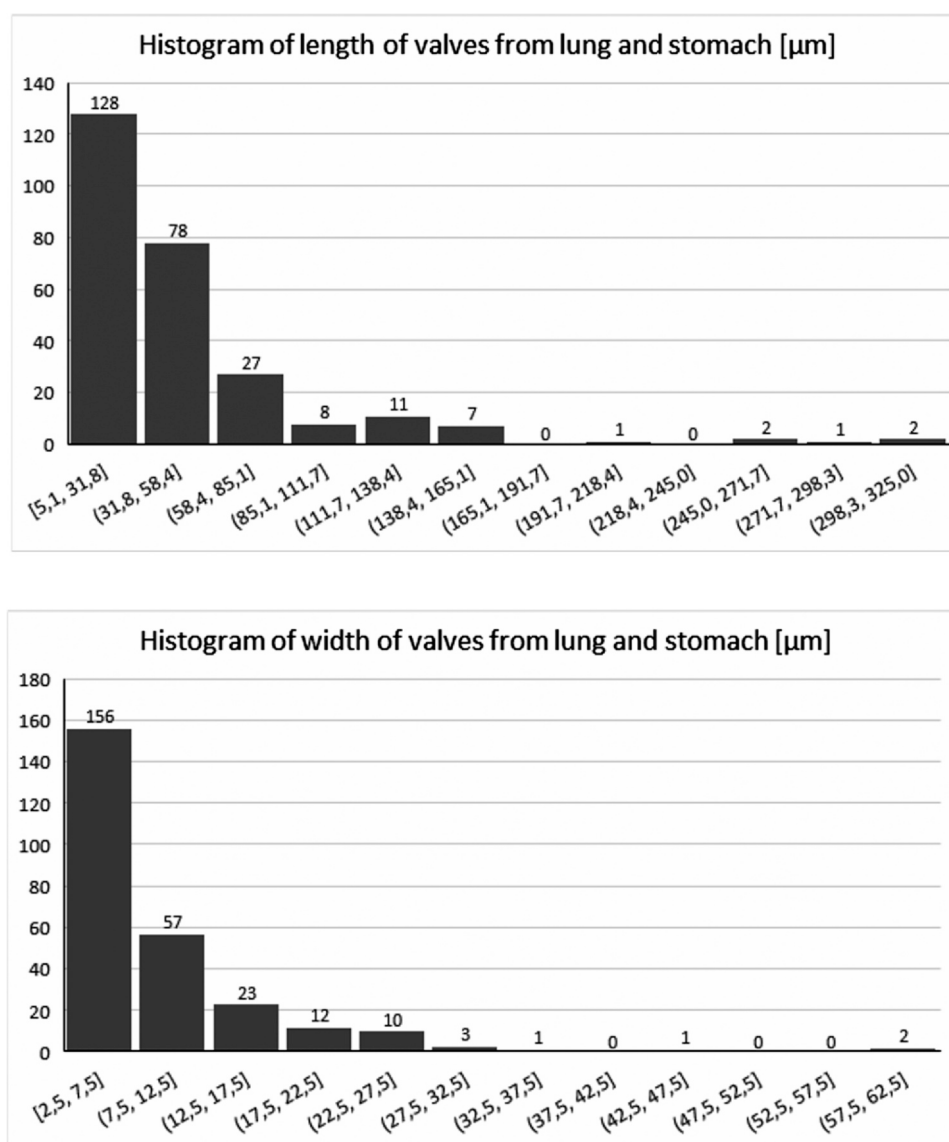


Fig. 7. Histogram of length and width valves of diatom species found in the lung and stomach.

(Thwaites) De Toni, *Gomphonema sarcophagus* Greg., *G. truncatum* Ehrenb., *Navicula libonensis* Schoeman, *N. oblonga* Kütz., *N. rhynchocephala* Kütz., *N. salinarum*, *Nitzschia dubia* W.M. Smith, *N. microcephala* Grun., *N. umbonata* (Ehrenb.) Lange-Bert., *Pantocsekiella ocelata* (Pantocsek) Kiss & Acs, *Pinnularia* cf. *divergens* W.M. Smith, *P. lundii* Hust., *P. subcommutata* Krammer, *Placoneis paraelginensis* Lange-Bert., *Stauroneis acuta* W.M. Smith, *S. anceps* Ehrenb., *Surirella elegans* Ehrenb. and *Tabellaria flocculosa* (Roth) Kütz.

The valves of *Denticula tenuis* and *Nitzschia fruticosa*, characteristic of case site 006, were not found in the organs. Of the dominant species, only *Stephanodiscus hantzschii* was present in samples taken from the organs: one example in the lung and 204 in the stomach contents.

The similarity analysis showed a high consistency between the environmental samples (above 60%) (Fig. 9), which was influenced by the high proportion of *Aulacoseira granulata* in the samples. Over 40% similarity was found between the stomach contents and the environmental samples. This lack of similarity is largely influenced by the fact that only a few species were found in the stomach contents, and their presence was not confirmed in the environmental tests.

3.3.3. Case 007

The body was discovered in the Vistula River in Rajszew (Fig. 2) at the beginning of April 2018. Environmental samples were taken after two weeks and a total of 82 species of diatoms were found. The species characteristic of this place was *Stephanodiscus binderanus* (Kütz.) Krieger.

The dominant species in the environmental samples were *Stephanodiscus hantzschii* (29–44%, 3% in the epiphyton), *Navicula lanceolata* Ehrenb. (5–10%, 2% in the plankton), *Rhoicosphenia abbreviata* (Agardh) Lange-Bertalot (5–6%, 1% in the plankton), *Gomphonema olivaceum* (Horn.) Bréb. (31%, 3% in the plankton and 2% in the epiphyton), *Melosira varians* (10%, 4% in the plankton and benthos), *Asterionella formosa* Hassall (12%, 9% in the plankton and 1% in the epiphyton) and *Ulnaria ulna* (6%, 2% in the plankton and < 1% in the epiphyton).

The conducted research included samples from the lungs, stomach contents and rib marrow. Diatoms were found in samples from lungs (15 valves/9 species), stomach contents (45 valves/22 species) and rib marrow (5 valves/4 species): a total of 23 species (Table 3). All species in organs were also present in the environmental

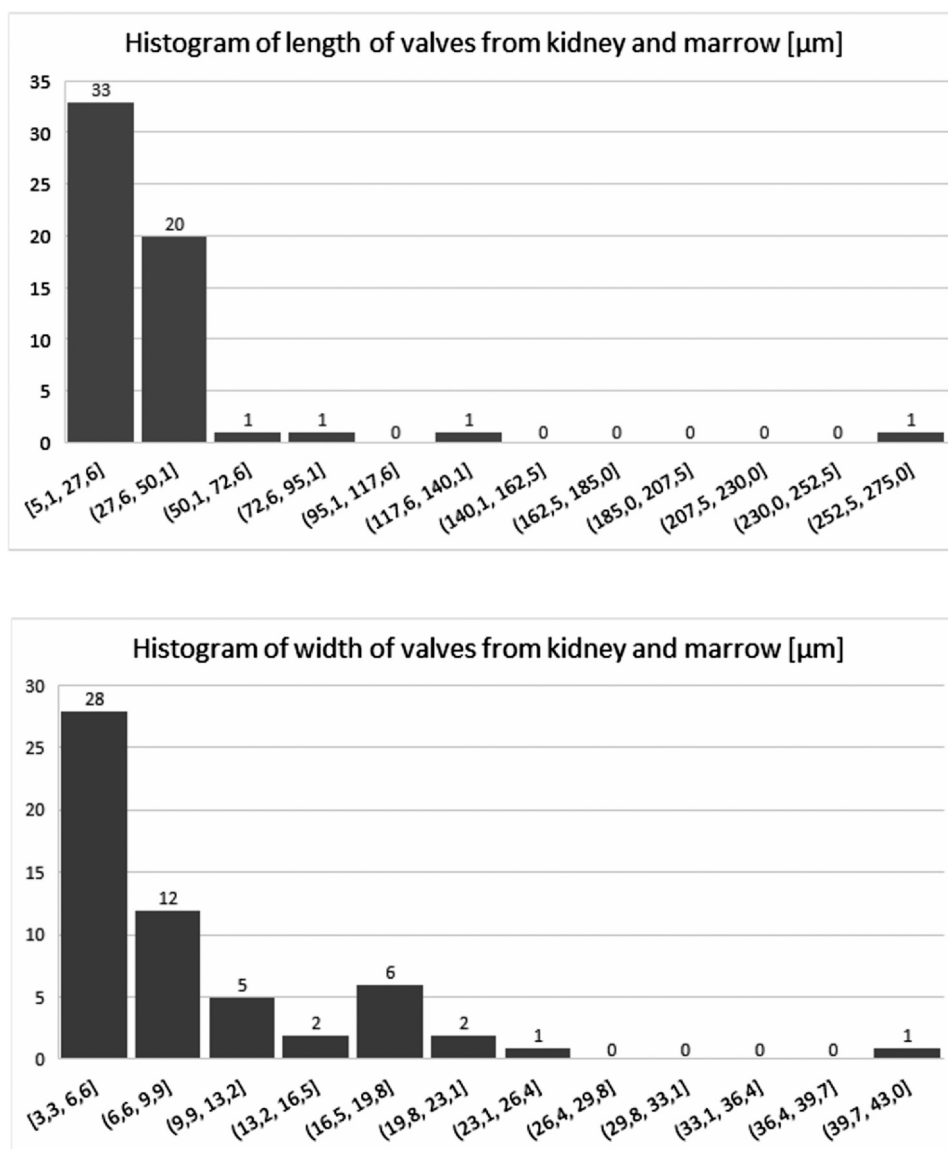


Fig. 8. Histogram of length and width valves of diatom species found in the kidney and rib marrow.

samples. *Rhoicosphenia abbreviata* species, which was recorded in environmental samples, were not revealed in organs.

3.3.4. Case 008

The body was discovered in mid-April 2018, in an oxbow lake in the bed of the Vistula River south of Warsaw. Forty-nine diatom species were found in the environmental samples taken after two weeks. The characteristic species were *Cymbella neocistula* Krammer, *Fragilaria bidens* Heib., *Nitzschia supralitorea* Lange-Bert. and *Placoneis gastrum* (Ehrenb.) Mereschkowsky.

The dominant species in environmental samples were *Melosira varians* (7–65%), *Cocconeis placentula* Ehrenb. (13%; 4% in the plankton and 2% in the benthos), *C. pediculus* Ehrenb. (5%; 1% in both the plankton and the benthos), *Cyclostephanos dubius* (29%; 3% in the epiphyton and 4% in the benthos), *Fragilaria capucina* Desm. (9%, absent from the epiphyton, <1% in the benthos) and *Asterionella formosa* (5%; absent in the plankton, 3% in the epiphyton).

The conducted research included samples from the lung, stomach contents and rib marrow. A total of 30 species were found in samples taken from organs (Table 3). All organ-disclosed species were also present in environmental samples. Among the dominant

species from the environment samples, *Asterionella formosa* and *Fragilaria capucina* were not identified in the organs.

The epiphyton and benthos samples were found to demonstrate high similarity between the environmental and lung samples, i.e. over 80% (Fig. 9), resulting from the dominance of *Melosira varians* in both samples (>60%). This species was also present in the lung, but at a lower percentage than in the benthic and epiphyton samples. It is important to note the relatively high share of *Aulacoseira ambigua* (14%) and *Stephanodiscus hantzschii* (22%) in the lung sample, which may indicate an open depth of water as the site of drowning. *Asterionella formosa* has been identified in benthic and epiphyton samples but is absent from plankton.

3.3.5. Case 009

The body was revealed in the Żerań Channel (Fig. 2) in mid-June 2018. Environmental samples were taken after two weeks. A total of 55 species were found in the environmental samples. The characteristic species of this site were *Eunotia metamonodon* Lange-Bert., *Gomphosphenia lingulatififormis* (Lange-Bert. & Reichardt) Lange-Bert. and *Kolbesia gessneri* (Hust.) Aboal.

The dominant species in the environmental samples were *Amphora pediculus* (Kütz.) Grun. (14–24%), *Diademesma confervacea*

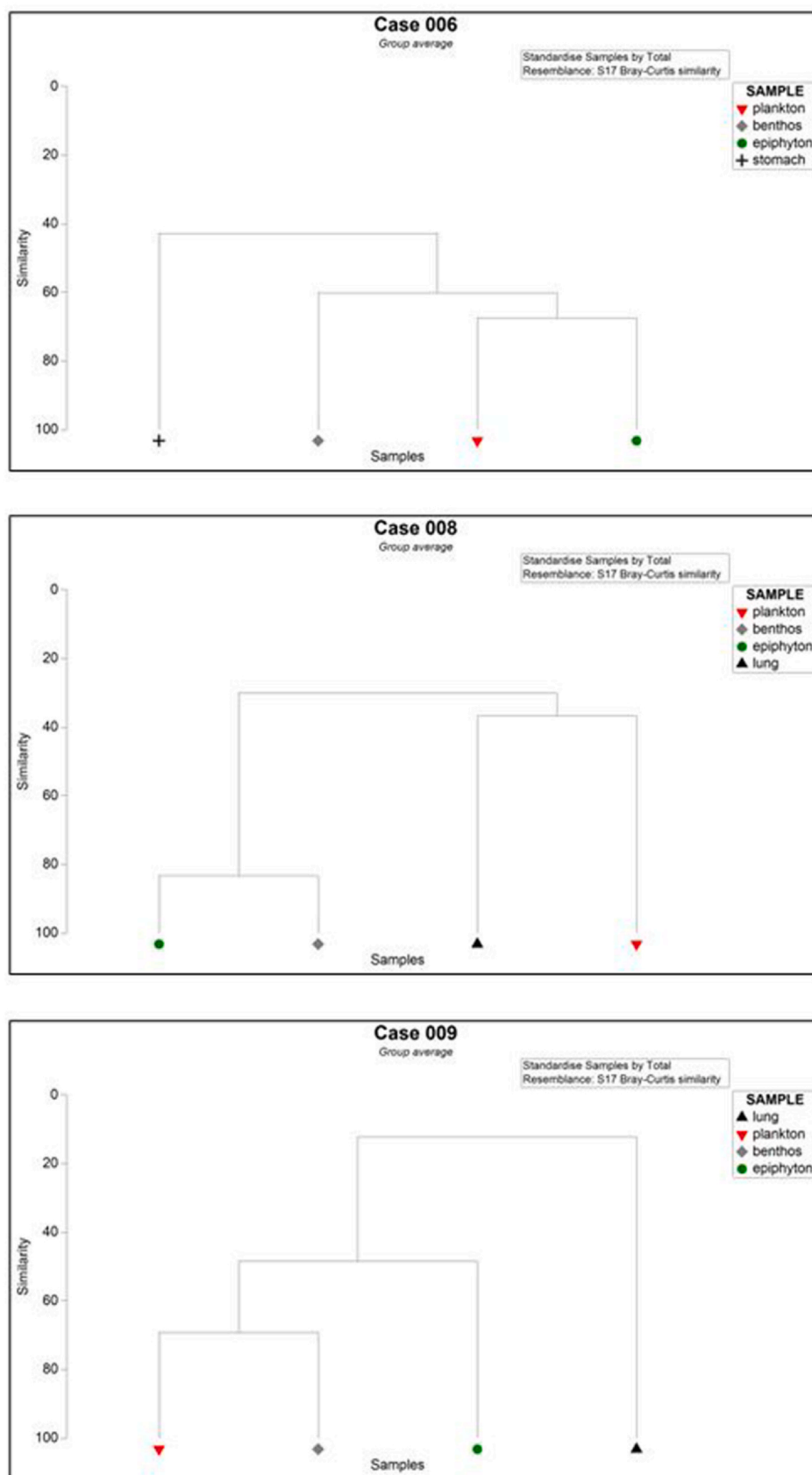


Fig. 9. The Hierarchical Cluster Analysis diagram based on Bray-Curtis similarity coefficient highlights the grouping of environmental and biological samples (cases 006–009).

(5–6%), *Aulacoseira ambigua* (16–20%; 2% in the epiphyton), *Cyclotella meneghiniana* (5–6%; 2% in the epiphyton), *Aulacoseira granulata* (%; 1% in the epiphyton and 3% in the benthos), *Cocconeis euglypta* Ehrenb. (17%; 1% in the plankton and 2% in the benthos), *C. placentula* (12%; <1% in the plankton and 2% in the benthos), *Achnanthisidium minutissimum* (Kütz.) Czarnecki (8%; 2% in the plankton and 4% in the benthos), *A. pyrenaicum* (Hust.) Kobayasi (6%; <1% in the plankton and 1% in the benthos) and *Rhoicosphenia abbreviata* (5%; 2% in the plankton).

Samples were taken from the lung and rib marrow; however, diatoms were only noted in the lung samples (Table 3). The following species not present in the environmental tests were identified: *Caloneis amphisbaena* (Bory) Cleve, *Cocconeis neodiminuta* Krammer, *Cymbella compacta* Østrup, *Diatoma tenuis* Ag., *Navicula cincta* (Ehrenb.) Ralfs, *Nitzschia acicularis* (Kütz.) W.M. Smith, *Sellaphora pupula* (Kütz.) Mereschowsky, *Staurosira venter* (Ehrenb.) Cleve & Möller and *Staurosirella pinnata* (Ehrenb.) Williams & Round.

The dominant species for the environmental samples were also found in the lung samples. However characteristic species of the ecosystem were not found.

High similarity was noted between the plankton and benthos environmental samples (Fig. 9), which was influenced by the similar percentages of *Aulacoseira ambigua*. However, the samples taken from the lung were found to be qualitatively and quantitatively dissimilar to the environmental samples.

3.3.6. Case 010

The body was discovered in a pond surrounded by meadows, at the end of May 2018. A total of 44 species were found in the environmental samples (plankton and benthos) taken after one week. No plants were submerged in the water in the coastal zone in this location. The species characteristic of this place were *Eunotia implicata* Nörpel, Alles & Lange-Bert., *Fragilaria gracilis* Østrup, *Gomphonema hebridense* Greg., *Neidium dubium* (Ehrenb.) Cleve, *Nitzschia acidoclinata* Lange-Bert., *N. paleacea* (Grun.) Grun. and *Pinnularia gibba* Ehrenb.

The dominant species in the environmental samples were *Achnanthisidium minutissimum* (33–37%), *Craticula buderii* (Hust.) Lange-Bert. (8–21%), *Nitzschia palea* (7–11%), *Gomphonema parvulum* (5%) and *Aulacoseira granulata* (5%, missing in benthos).

Although samples were taken from the lung and rib marrow, diatoms were only noted in the lung samples: 19 species/44 valves in total (Table 3). All species found in the lung were also present in the environmental samples. The following species specific to the site were found in the lung samples: *Eunotia implicata*, *Gomphonema hebridense*, *Neidium dubium* and *Pinnularia gibba*.

Among the dominant species, only *Achnanthisidium minutissimum* and *Gomphonema parvulum* were identified in the organ samples. In addition, the dominant species for the benthos *Craticula buderii* and *Nitzschia palea* were not found in the lung samples. This may be due to the small number of valves found in the lung sample.

3.3.7. Case 023

The body was discovered in the small lowland river, a left-bank tributary of the Vistula River, at the end of December 2018. Environmental samples were taken after six weeks under stable winter weather conditions. In total, 94 species were found in the samples, with the characteristic species being *Neidium ampliatum* (Ehrenb.) Krammer and *Pseudostaurosira robusta* (Fusey) Williams & Round.

The dominant species in the environmental samples were *Lemnicola hungarica* (Grun.) Round & Basson (6–37%), *Planothidium frequentissimum* (Lange-Bert.) Lange-Bert. (6–9%), *Achnanthisidium minutissimum* (5–7%), *Stephanodiscus hantzschii* (5–9%), *Staurosira venter* (7–2%; 2% in the benthos), *Staurosirella pinnata* (6–7%; 3% in the benthos), *Cyclostephanos dubius* (6%; 3% in the epiphyton and 2%

in the benthos) and *Navicula gregaria* (5%; 2% in the plankton and benthos).

Samples were taken from the lung, kidney and rib marrow. A total of 64 species of diatom were found in the samples from the lungs (106 valves/38 species), kidney (9 valves/6 species) and rib marrow (249 valves/44 species) (Table 3). All species identified in the organs were also found in the environmental samples. The organ samples were found to contain all dominant species from the environment, and both species characteristic to case 023 (*Neidium ampliatum* and *Pseudostaurosira robusta*).

The plankton and epiphyton samples demonstrated high similarity (about 70%) with the lung and rib marrow samples (Fig. 10); this was due to the fact that 6 species were dominant in these samples. *Lemnicola hungarica* had a 37% share in the benthos, and 6% in the plankton and epiphyton samples. The rib marrow sample showed a similarity of 60% with the plankton and epiphyton samples: it had a high proportion of species that dominate the environmental samples: *Staurosirella pinnata* (25%), *Staurosira venter* (12%), *Planothidium frequentissimum* (8%), *Pseudostaurosira brevis-triata* (Grun.) Williams & Round (5%), *Lemnicola hungarica* (5%), *Stephanodiscus hantzschii* (4%) and *Cyclostephanos dubius* (1.6%).

The distinctiveness of the lung sample was influenced by the presence of large diatom species which were not observed in the rib marrow sample: *Caloneis amphisbaena*, *Craticula cuspidata* (Kütz.) Mann, *Cymbella cymbiformis* Ag. and *Pinnularia viridiformis* Krammer.

3.3.8. Case 025

The body was discovered in a river port located outside the main course of the Vistula river in Warsaw (Fig. 2) at the beginning of January 2019. Environmental samples were taken after six weeks under stable winter weather conditions, and a total of 91 species were found. The species characteristic of this place were *Cocconeis neothumensis* Krammer, *C. placentula* var. *klinoraphis* Geitler, *C. pseudolineata* (Geitler) Lange-Bert., *Encyonema minutum* (Hilse) Mann, *Eunotia minor* (Kütz.) Grun., *Gomphonema italicum* Kütz., *Humidophila perpusilla* (Grun.) Lowe, Kociolek, Johansen & Van de Vijver, *Navicula libonensis* Schoeman, *N. lundii* Reichardt, *N. oppugnata* Hust., *N. streckeri* Lange-Bert. & Witk. and *Rhopalodia gibba* (Ehrenb. Müller).

The dominant species in the environmental samples were *Stephanodiscus hantzschii* (16–40%), *Planothidium frequentissimum* (5–9%), *Asterionella formosa* (66–8%; 3% in the plankton), *Navicula veneta* Kütz. (15%; 2% in the plankton and 3% in the benthos), *N. slesvicensis* (11%; 1% in the plankton and 3% in the benthos), *Amphora pediculus* (6%; 3% in the plankton).

Lung and kidney samples were taken, in which a total of 61 species were identified (Table 3). All species found in the organs were also present in the environmental samples. In the internal organs, the following characteristic species were not identified: *Navicula libonensis*, *N. lundii*, *N. oppugnata* and *N. streckeri*. All dominant species were found in the organ samples, except for *Navicula veneta* and *Asterionella formosa*.

The lung samples were dissimilar to the environmental samples; however, the environmental samples demonstrated strong similarity to each other, especially the benthic and epiphyton samples (nearly 70%) (Fig. 10). In particular, the dominant species *Stephanodiscus hantzschii* constituted 16% of epiphyton and 21% of benthos; in contrast, it constituted 40% of the plankton sample. In addition, *Navicula veneta* demonstrated a 15% share in plankton, but only 2–3% in the remaining samples.

While *Rhopalodia gibba* (15%), *Halamphora veneta* (Kütz.) Levkov (7%), *Nitzschia amphibia* Grunow (7%), *Gomphonema olivaceum* (6%) and *Epithemia sorex* Kütz. (5%), were represented in large numbers in the lung sample, they only appeared singly in the environmental samples.

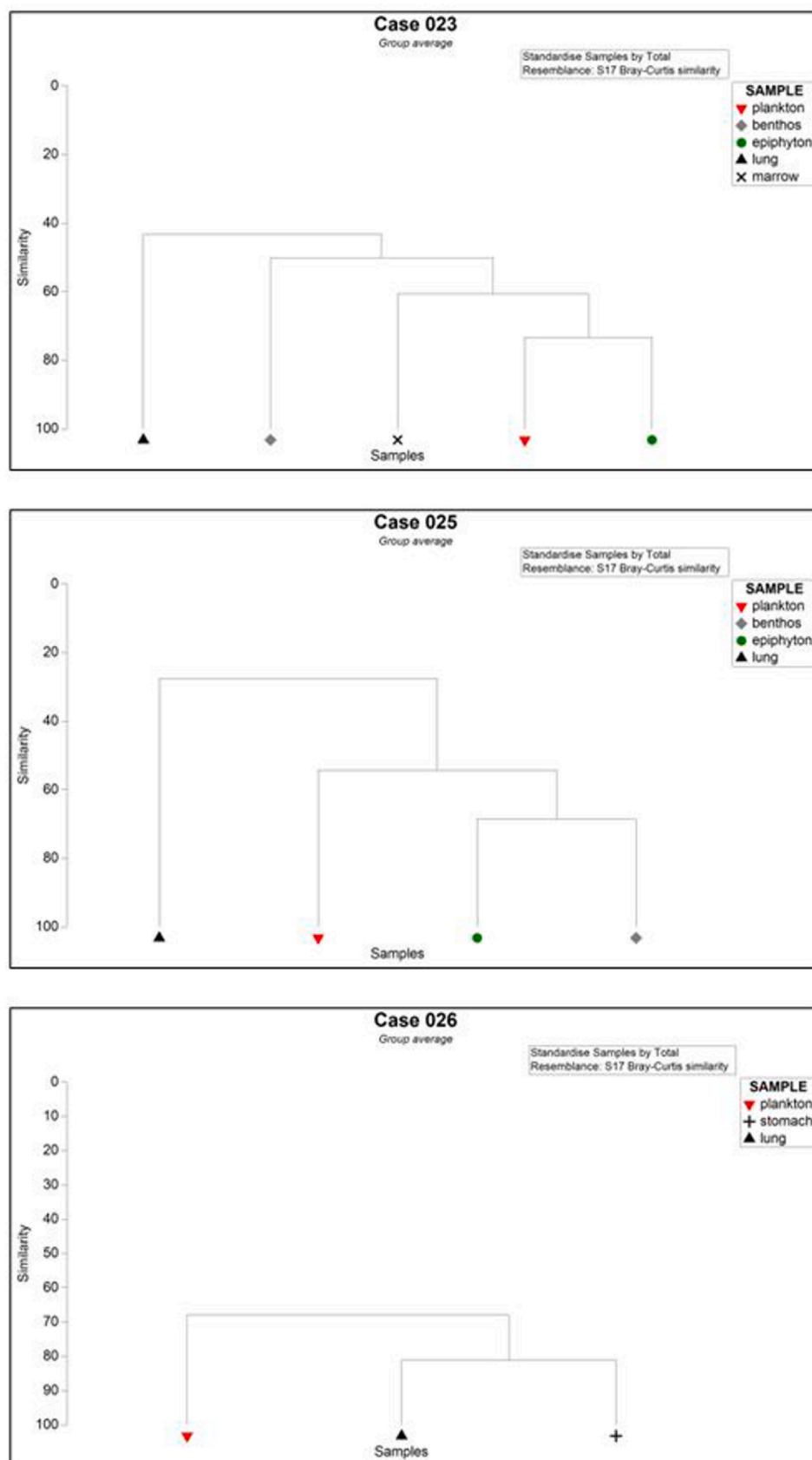


Fig. 10. The Hierarchical Cluster Analysis diagram based on Bray-Curtis similarity coefficient highlights the grouping of environmental and biological samples (cases 023–026).

3.3.9. Case 026

The body was discovered in a drainage ditch in Warsaw at the beginning of January 2019. Environmental samples were taken after two weeks, in winter under the same meteorological conditions. Only a plankton sample was taken for comparative analysis; however, it was found to contain 98 species. The characteristic species of this location were *Eunotia intermedia* (Krasske ex Hust.) Norpel & Lange-Bert., *Fallacia insociabilis* (Krasske) Mann, *Geissleria ignota* (Krasske) Lange-Bert. & Metzeltin, *G. paludosa* (Hust.) Lange-Bert. & Metzeltin, *Gomphonema auritum* Braun ex Kützing, *G. coronatum* Ehrenb., *G. procreum* Reichardt & Lange-Bert., *Humidophila brekkaensis* (Petersen) Lowe, Kociolek, Johansen, Van de Vijver, Lange-Bert. & Kopalová, *Luticola cohnii* (Hilse) Mann, *Nitzschia commutata* Grun., *Pinnularia sinistra* Krammer, *Stauroforma exiguiiformis* (Lange-Bert.) Flower, Jones & Round, *Surirella ovalis* Bréb. and *Ulnaria acus* (Kütz.) Aboal. The dominant species in the environmental samples were *Navicula salinarum* (44%), *Nitzschia adamata* Hust. (5%) and *N. capitellata* (9%).

Samples were taken from the lung, stomach contents, kidney and rib marrow. While numerous diatoms were found in the lungs and stomach contents, 5 species were only present as single valves in the kidney and rib marrow (Table 3). Valves of all characteristic and dominant species were identified in the organ samples.

High similarity was noted between the environmental sample and those from the lung and gastric contents. This similarity was influenced by the high proportion of *Navicula salinarum*: 34% in the lung and 36% in the stomach content, compared to 44% in the environmental test (Fig. 10).

3.3.10. Case 028

The body was discovered in mid-January 2019 in Warsaw, along the Vistula River (Fig. 2). After two weeks, environmental samples were collected and 82 diatom species were found. The species characteristic of this location were *Entomoneis paludosa* (W.M. Smith) Reimer, *Navicula perminuta* Grun., *Pantocsekiella ocelata* (Pantocsek) Kiss & Acs and *Rossethidium pusillum* (Grun.) Round & Bukhtiyarova.

The dominant species in the environmental samples were *Stephanodiscus hantzschii* (10–16%), *Lemnicola hungarica* (16%; absent from epiphyton and benthos), *Cyclotella meneghiniana* (7–23%; 4% in the plankton), *Cyclostephanos dubius* (6–14%; 4% in the plankton), *Navicula veneta* (9%; <1% in the plankton and 1% in the benthos), *Gomphonema olivaceum* (6%; 1% in the plankton and <1% in the benthos), *Navicula tripunctata* (Müller) Bory (6%; 1% in the plankton and <1% in the benthos), *Nitzschia dissipata* var. *media* (Hantzsch) Grun. (7%; absent from the plankton, 2% in the benthos).

In the lung and kidney samples, diatoms were only observed in the lung sample (Table 3). All the species found in the lung were also found in the environmental samples; however, none of the characteristic environment species were identified in the lung tissue. In the lung sample, the only dominant species noted was *Stephanodiscus hantzschii* (2 valves).

3.3.11. Case 035

The decomposed corpse was found at the beginning of April 2019 in a small lowland river southeast of Warsaw. Samples from the environment were taken after one day. They were found to contain a total of 96 species (Table 3). The species characteristic of this place were *Eucoconeis flexella* (Kütz.) Meist., *Fistulifera saprophila* (Lange-Bert. & Bonik) Lange-Bert., *Hippodonta neglecta* Lange-Bert., Metzeltin & Witk. and *Navicula cari* Ehrenb.

The dominant species in the environmental samples were *Stephanodiscus hantzschii* (6–9%; 1% in the epiphyton), *Gomphonema olivaceum* (13%; 2% in the plankton and 4% in the benthos), *Navicula tripunctata* (19%; 2% in the plankton and 3% in the benthos), *Nitzschia dissipata* var. *media* (11%; 2% in the plankton and 3% in the benthos),

Amphora pediculus (5%; 2% in the epiphyton and 3% in the benthos), *Melosira varians* (8%; 2% in the epiphyton and 1% in the benthos), *Navicula gregaria* (5%; 2% in the epiphyton and 4% in the benthos), *Encyonema ventricosum* (Ag.) Grun. (6%; absent from the plankton and 1% in the benthos), *Nitzschia linearis* (Ag.) W.M. Smith (6%; 2% in both the plankton and the epiphyton), *Ulnaria ulna* (6%; 3% in both the plankton and the epiphyton).

Samples were taken from the lung, stomach contents, kidney and rib marrow. Numerous diatoms were only revealed in the lung samples (Table 3) and all of them were also present in the environmental samples. However, the dominant species *Encyonema ventricosum*, *Navicula gregaria*, *Nitzschia dissipata* var. *media* and *N. linearis* were not present in the lung samples.

A high degree of similarity was noted between the plankton and benthos samples (Fig. 11), while the epiphyton samples differed from the others. *Gomphonema olivaceum*, *Navicula tripunctata*, *Encyonema ventricosum* and *Nitzschia dissipata* var. *media* are dominant in the epiphyton sample, while a small number of species, such as *Stephanodiscus hantzschii*, dominate in the plankton and benthos. The distinctness of the lung sample was influenced by the presence of such species as *Amphora copulata* (Kütz.) Schoeman & Arch. (6%) and *Geissleria decussis* (Østrup) Lange-Bert. & Metzeltin (5%), which were only recorded individually in environmental samples. In contrast, in the lung samples only contained single examples of species which were dominant in the environmental samples, such as *Navicula tripunctata* and *Stephanodiscus hantzschii*.

3.3.12. Case 036

The decomposed corpse was found in the Vistula River (Fig. 2) in mid-April 2019. Environmental samples were taken after two weeks and a total of 79 species were found. The characteristic species was *Placoneis clementis* (Grun.) Cox.

The dominant species in the environmental samples were *Stephanodiscus hantzschii* (29–48%), *Cyclostephanos dubius* (8–24%), *Amphora pediculus* (6%; 2% in the plankton and 1% in the benthos), *Gomphonema pumilum* (Grun.) Reichardt & Lange-Bert. (9%; <1% in the plankton and benthos), *Nitzschia palea* (6%; 1% in the plankton and <1% in the benthos).

Samples were taken from the lung, stomach contents, kidney and rib marrow. Numerous diatoms were found in the lung sample (Table 3), stomach contents (49 valves/16 species) and rib marrow (23 valves/21 species); however, only one valve was found in the kidney sample. All species from the organs were also found in the environmental samples. One valve of *Placoneis clementis* (characteristic species) was revealed in the lung sample. The samples from the organs contained all dominant species apart from *Gomphonema pumilum* and *Nitzschia palea*.

The environmental samples were clearly distinct to the internal organ samples. However, a high degree of similarity was noted between the plankton and benthos samples (Fig. 11), which results from the high proportions of *Cyclostephanos dubius* and *Stephanodiscus hantzschii*; however, these species had a much lower share in the epiphyton sample.

Actinocyclus normanii (Greg. ex Grev.) Hust. was well represented in the organ samples: 20% in the stomach contents, 8% in the lungs and 2 valves in the rib marrow. In addition, *Aulacoseira granulata* was found to represent 8% of the lung diatoms, while *Staurosira venter* constituted 6% of the lung diatoms, 10% in the stomach diatoms and 3 valves in the rib marrow. However, these species were recorded individually in environmental samples.

3.3.13. Case 037

The decomposed corpse was found in the Vistula River, in Warsaw (Fig. 2) at the beginning of April 2019. Environmental samples were taken after two weeks and a total of 79 species were

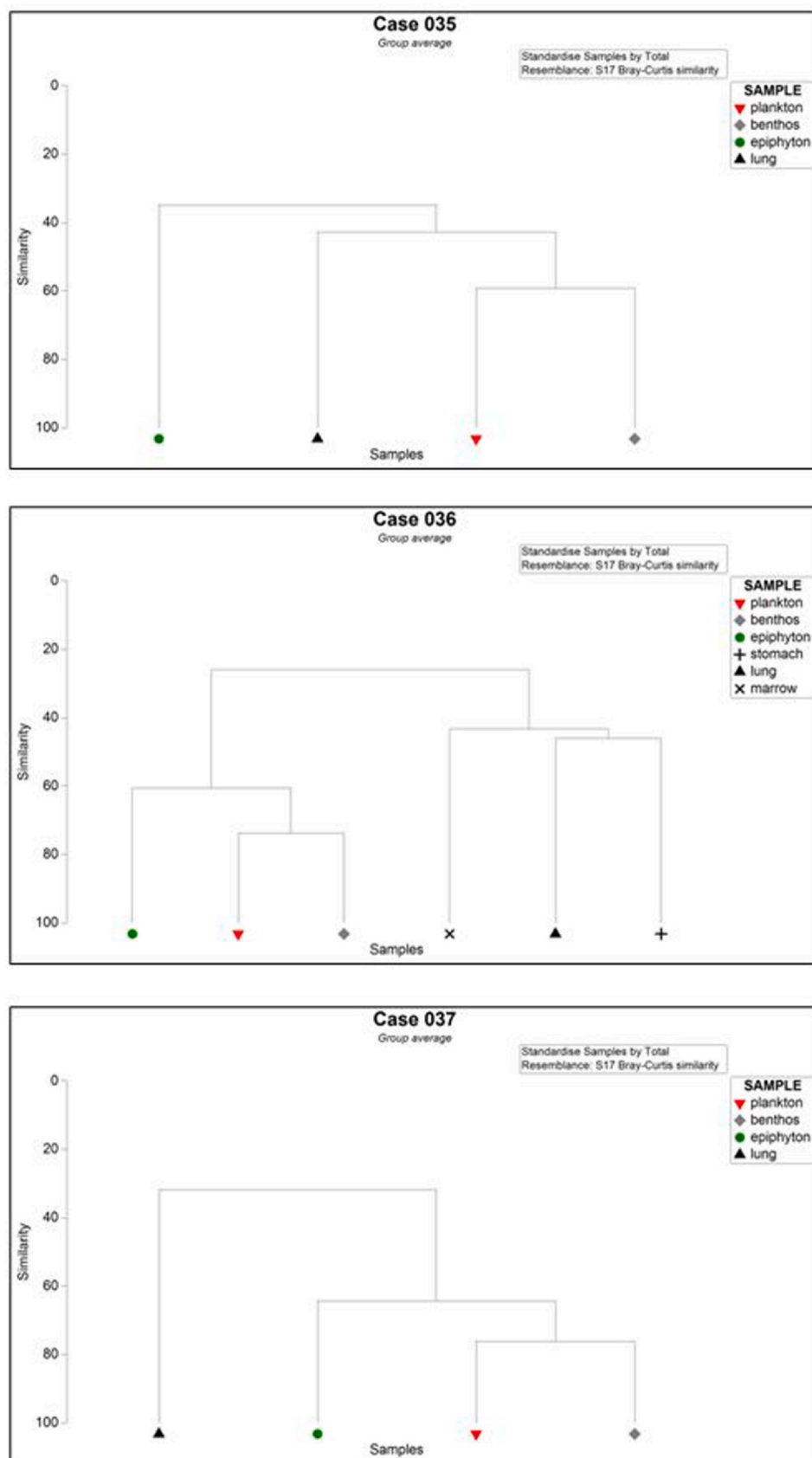


Fig. 11. The Hierarchical Cluster Analysis diagram based on Bray-Curtis similarity coefficient highlights the grouping of environmental and biological samples (cases 035–037).

identified. The characteristic species were *Navicula oblonga* Kütz. and *Tryblionella angustata* W.M. Smith.

The dominant species in the environmental samples were *Stephanodiscus hantzschii* (34–45%), *Cyclotella meneghiniana* (8–23%), *Amphora pediculus* (6%; 2% in the plankton and 1% in the benthos), *Gomphonema parvulum* (9%; < 1% in the plankton and the benthos), *Nitzschia palea* (6%; 1% in the plankton and < 1% in the benthos) and *N. acicularis* (5%; 1% in the plankton and 2% in the epiphyton).

Samples taken from internal organs revealed numerous diatoms in the lung (Table 3), but only 12 valves (10 species) in the stomach contents, 5 valves (4 species) in the kidney and 7 valves (6 species) in the rib marrow. All species revealed in the organs were identified in the environmental samples. One valve of *Tryblionella angustata*, a characteristic species, was confirmed in a lung sample. Among the dominant species, *Gomphonema parvulum*, *Nitzschia palea* and *N. acicularis* were not found in the internal organs.

A high degree of similarity was found between the environmental samples, while the lung sample appeared to be distinct (Fig. 11). The high similarity between the environmental samples results from the presence of the dominant species *Cyclotella meneghiniana* and *Stephanodiscus hantzschii*. The share of dominant species in the lung sample was much lower than in the environment: *Cyclotella meneghiniana* – 3%; *Stephanodiscus hantzschii* – 10%. In addition, the following species were recorded in the lung: *Actinocyclus normanii* (6%), *Diatoma vulgare* (5%), *Gomphonema olivaceum* (8%), *Melosira varians* (11%) (single valves of these species also found in the rib marrow) and *Pseudotaurosira brevistriata* (5%). The above-mentioned species occurred only singly in the environmental samples.

3.3.14. Case 039

The cadaver was revealed in a water canal connecting two ponds in the beginning of May 2019, and environmental samples were collected after three weeks. In these samples, in plankton and benthos, a total of 96 species were found. No plants were submerged in the water in the coastal zone in this place. The species characteristic of this site were *Anomoeoneis sphaerophora* Pfütz., *Fallacia subhamulata* (Grun.) Mann, *Navicula vilaplani* (Lange-Bert. & Sabater) Lange-Bert. & Sabater, *Nitzschia abbreviata* Hust. and *Stauroneis smithii* Grun.

The dominant species in the environmental samples were *Stephanodiscus hantzschii* (10–18%), *Nitzschia palea* (6–15%), *Amphora pediculus* (5–20%), *Gomphonema parvulum* (9%; 3% in the benthos) and *Hippodonta capitata* (Ehrenb.) Lange-Bert., Metzeltin & Witk. (5%; 3% in the benthos).

Samples were taken from the lung, stomach contents, kidney and rib marrow. A total of 96 species were found in the organ samples, with 15 species in the lung sample (81 valves) and 95 species in the stomach contents (990 valves) (Table 3). All species revealed in organs were also present in the environmental samples. Valves of characteristic species, including *Nitzschia abbreviata*, were identified in the organ samples. Of the dominant species, *Stephanodiscus hantzschii*, *Gomphonema parvulum* and *Hippodonta capitata* were found in the organ samples.

A low similarity was found between the environmental samples and the samples from the lung and the gastric contents (25%) (Fig. 12); this was influenced by the high proportion of *Navicula gregaria* (27%) and *N. slesvicensis* (26%) in the organs, and the low share in the environmental samples (< 4%). In addition, dominant species in the environment only constituted below 3% of the samples from the lung and the stomach contents. The strong similarity between the plankton and benthos samples can be attributed to the presence of all dominant species in both samples, viz. *Stephanodiscus hantzschii*, *Amphora pediculus* and *Nitzschia palea*.

3.3.15. Case 043

The body was discovered in the Vistula River in Warsaw (Fig. 2) at the beginning of June 2019. Environmental samples were taken after two weeks and a total of 75 species were found. The species characteristic of this place were *Diatoma problematica* Lange-Bert., *Nitzschia gracilis* Hantzsch and *Platessa joursacense* (Herib.) Chudaev.

The dominant species in the environmental samples were *Cyclotella meneghiniana* (12–42%), *Cyclotella meneghiniana* (5–8%), *Gomphonema parvulum* (22–29%; 1% in the plankton), *Melosira varians* (13%; 3% in the epiphyton and 4% in the benthos), *Aulacoseira granulata* (12%; < 1% in both the epiphyton and the benthos), *A. ambigua* (7%; 3% in the epiphyton and 1% in the benthos), *Nitzschia palea* (8–9%; 1% in the plankton), *Cocconeis placentula* (7–8%; 1% in the plankton) and *C. euglypta* (5%; < 1% in the plankton and in the epiphyton).

Samples were taken from the lung, kidney and rib marrow. A total of 35 species were found in the organ samples: 35 species in the lungs (173 valves), 1 species in the kidneys (2 valves) and 3 species in the rib marrow (6 valves) (Table 3); these species were also identified in the environmental samples. However, *Pseudotaurosira robusta*, present in the environmental samples was not found in the lung sample. Interestingly, the organ samples did not contain *Platessa joursacense*, one of the three characteristic species, or the dominant species *Gomphonema parvulum*, *Aulacoseira ambigua*, *Cocconeis euglypta* and *Nitzschia palea*.

A 40% similarity was found between the lung and plankton samples (Fig. 12). This is due to the presence of large shares of *Aulacoseira granulata* (8% in the lung sample, 12% in the plankton sample) and *Melosira varians* (9% lung, 13% plankton). The high similarity (80%) of the samples collected from the epiphyton and benthos can be attributed to their similar shares of the two dominant species: *Cyclotella meneghiniana* (12% and 16% respectively) and *Gomphonema parvulum* (29% and 22% respectively).

3.3.16. Case 058

The body was discovered in a drainage ditch at the end of September 2019. Environmental samples were taken after three weeks. A total of 70 diatom species were identified. The species characteristic of this location were *Epithemia turgida* (Ehrenb.) Kütz., *Eunotia soleirolii* (Kütz.) Rabenh., *Gomphonema brebissonii* Kütz., *Navicula digiticonvergens* Lange-Bert., *N. tenelloides* Hust., *Nitzschia communis* Rabenh., *Pinnularia isselana* Krammer, *P. schoenfelderi* Krammer and *Psammodium bioretii* (Germain) Bukhtiyarova & Round.

The dominant species in the environmental samples were *Planorbulina frequenter* (11–19%), *Lemnicola hungarica* (25–41%; 3% in the benthos), *Planorbulina lanceolata* (Brébisson ex Kütz.) Lange-Bertalot (20%; 3% in the plankton and 4% in the epiphyton), *Meridion circulare* (Greville) Ag. (10%; 1% in the plankton and < 1% in the epiphyton), *Stephanodiscus hantzschii* (10%; absent from the plankton and the benthos), *Eolimna minima* (Grun.) Lange-Bert. (5%; 4% in the plankton), *Mayamaea petersenii* Barragan, Ector & Wetzel (8%; 3% in the plankton and 2% in the benthos), *Achnanthes minutissimum* (6%; 2% in both the plankton and the benthos), *Navicula gregaria* (7%; 1% in the plankton and 2% in the epiphyton) and *Gomphonema parvulum* (5%; absent from the plankton and 2% in the epiphyton).

Samples were taken from the lung, stomach contents, kidney and rib marrow. Diatoms were identified only in the stomach contents (462 valves/62 species). The stomach contents included all species identified in the environmental samples, as well as all dominant species.

Almost 70% similarity was observed between the stomach contents and benthic samples (Fig. 12). This is due to the presence of the following dominant species in the benthos which also demonstrated

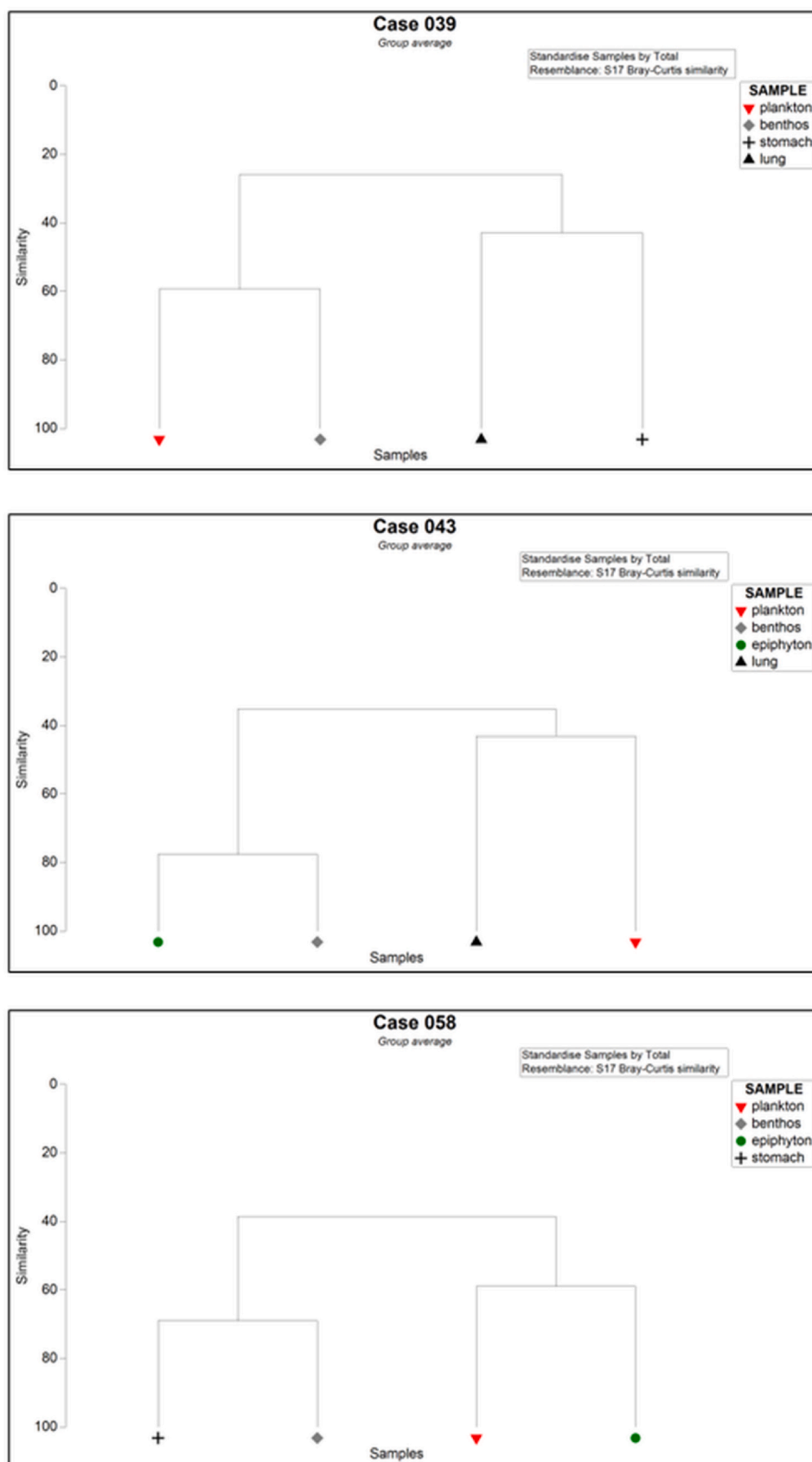


Fig. 12. The Hierarchical Cluster Analysis diagram based on Bray-Curtis similarity coefficient highlights the grouping of environmental and biological samples (cases 039–058).

high proportions in the stomach contents: *Meridion circulare* (11%), *Planothidium frequentissimum* (6%), *P. lanceolatum* (8%) and *Achnanthes minutissimum* (10%). Almost 60% similarity was found between the plankton and epiphyton samples, resulting from the presence of the following dominant species in both samples: *Lemnicola hungarica* and *Planothidium frequentissimum*.

4. Discussion

Each tested site had a unique diatom assemblage structure which reflects the local environmental conditions, and particularly those of the ecosystem, i.e. whether it was formed by standing or flowing waters. This diversity is also driven by the hydromorphology of the water ecosystem, such as the shape of the river bed and any transformations resulting from human activity. Diatom communities are also influenced by hydrochemistry of the water; this is influenced strongly by its geological basis, but also by human activity, municipal and industrial pollution [8,31–34]. Our findings demonstrate that the tested diatom communities differ greatly, even in the urban and relatively short section of the Vistula River. This differentiation results from the use of optimal abiotic conditions by the diatom species, which are influenced by place and time, with a key role being played by the seasonality characteristic of a temperate climate [7,8,31,35]. This considerable diversity demonstrated by the diatom communities makes them valuable tools, both for diagnosing the very fact of drowning, and for identifying the place where it occurred [36].

The use of the diatom test as a tool in the diagnosis of drowning has been extensively discussed in the literature [16,37,38]. In cases of drowning, methodological errors in tissue preparation, possibly resulting in the loss of up to 1/3 of diatoms in the tested organ samples [39], or testing an insufficient mass of the organ sample [22], may lead to a false negative result in the internal organs. In addition, it is possible that a lack of diatoms in the internal organs may also be due to their low abundance in the reservoir from which the water was absorbed.

Our research confirms that in some cases, the diatoms may be relatively abundant in the rib marrow but not in the kidney (case 023 and case 036). This may indicate a sudden cessation of the blood circulation; the explanation that was proposed by Bąk and co-workers [6].

On the other hand, the penetration of diatoms into the body during the presence of the corpse in water, contamination in the preparation of diatoms or the selection of an inappropriate (and single) organ for testing may result in false positive diatom test results [40–42]. Case 006 shows that even in a case of death by heart attack, numerous diatom valves can be present in the stomach, and single valves may be present in the lungs. In addition, diatoms may also be present in the lungs of people who swim frequently, and especially dive [43].

Therefore, this study included a qualitative comparison of the diatom profile of samples from the internal organs and those from the environment of the drowning site; in the case of the latter, samples were collected from all available habitats/formations in which diatoms may be present: benthos, epiphyton and plankton. Our analyses indicate that the diatom test may be important in determining whether the discovery location is the place where water was absorbed into the body. It also allows provides an insight into where the absorption took place, such as from plankton in standing or floating water (in cases 008 and 043) or from a muddy bottom (in cases 026 and 058).

However, the penetration of diatom valves into the body can be limited by their size and their consequent passage through the alveolar membrane. Lunetta et al. [17] estimate that the maximum length of diatoms that can penetrate the alveolar membrane is about 110 µm, while Pachar and Cameron [44] indicate that only diatoms

smaller than 30 µm may appear in internal organs. Our present findings partially confirm this, since more than 90% of the valves found in the kidney and rib marrow samples do not exceed 50 µm in length (Fig. 7). However, in two independent cases (case 007 and 023), single specimens of *Ulnaria ulna* were found in the rib marrow which are 230–320 µm in length. It follows that larger valves can occasionally penetrate internal organs, especially when they have a needle-like shape.

Li et al. [45] report a 60–70% similarity between the diatom species compositions of samples taken from cadavers and from the environment. This is confirmed by our present cases: no higher values were obtained, even for cases where law enforcement agencies clearly confirmed that the corpse was found at the same site where water was absorbed to the internal organs (case 026 and 058).

While only single or small numbers of diatom valves were found in the kidneys and rib marrow, higher numbers were found in samples taken from the lung or from the stomach. The latter two were hence much better research material for determining the location of the body. However, while a complete absence of diatoms from the organs, or their small number, does not necessarily confirm the place of disclosure as the drowning site, it does not exclude this possibility, as noted in cases 005, 007, 028 and 043.

It seems obvious that the samples taken from the internal organs and the drowning site should have qualitatively and quantitatively similar diatom species profiles. If this is not the case, it should be assumed that the place where the body was revealed is not the location of drowning (case 009, 036, 037 and 039). However, based on the above examples, it can be concluded that this is not always the case. Especially when it concerns a large river like the Vistula. This is evident from case 006, while witness testimonies confirm that the body was found in the same place where it fell into the water. As the body was found at the bridge pillar in the middle of the river, it was not possible to collect environmental samples at this site. Moreover, the death was due to heart attack, not from drowning, as in other cases. Environmental samples were taken later, when the investigation had clearly established where the person had entered the water. The inconsistency observed between the environmental and stomach content samples was most likely influenced by seasonal changes in diatom communities [46].

Regardless of the season, the necessity to collect benthos samples is highlighted by case 023, especially when a longer time has elapsed from the moment of finding the corpse to collecting environmental samples. Benthos samples will contain diatom covers belonging to species that are found in large numbers in the plankton or epiphyton when the conditions are optimal for their development.

The species profiles of the internal organs and the drowning site are most likely to converge if the drowning occurred in a body of stagnant water or a small stream, where the environmental conditions are most stable. This is confirmed by cases 010, 023 and 058, and particularly, by case 026, in which the presence of a large number of *Navicula salinarum* can be found; their growth will be favoured by the greater salinity of the watercourse, caused by waters flowing from the neighbouring car park, which is sprinkled with salt-based de-icing mixture in winter.

It should be noted that taking environmental samples only within the shoreline may yield inconsistent benchmarking results (case 008). In this case, drowning in the studied ecosystem was confirmed (findings from the investigation), as confirmed by the analysis of diatoms identified in the lungs, which are typical for open water plankton; however, the proportions of these species were different in environmental samples described as plankton, taken just away from the shore. In addition, significant discrepancies between environmental and biological (lung) samples were noted in case 025. This may be due to two reasons. Firstly, the sampling site was about 100 m away from where the body was found; it was not possible to collect samples from where the body was found due to the

difficulties resulting from the terrain (high, concrete shore of the harbour wharf). Secondly, the sample was taken two months from the moment the body was discovered. The structure of diatom communities in the collected environmental samples, including the share of dominant species, may change depending on the season in which the samples were collected [47–49], hence in case 036 and 037, the apparent discrepancies observed between organ samples and environmental samples may have been due to the fact that water was absorbed several months earlier. In such cases, greater similarities can be observed with the benthic samples, which include dead diatoms from previous seasons that have fallen to the bottom of aquatic ecosystems. In the case of 008, from early spring, *Asterionella formosa* was identified in the benthic and epiphyton samples collected for analysis, but was not found in plankton. This species grows in the plankton of stagnant waters with an increased trophy in the northern hemisphere in spring [50,51]. This may indicate that the presence of *Asterionella formosa* in samples from benthos and epiphyton results from their development in this ecosystem in the previous growing season.

Various circumstances related to finding a corpse in water can limit timely environmental sampling for comparative analysis. Therefore, an important action in the longer term is the creation of a "diatomological map" of a given area, as well as noting the various aquatic ecosystems and the occurrence of individual diatom species; these should take into account, inter alia, seasonal variability, direct and indirect human impact, and could be useful in resolving problems related to the location of the drowning site in cases where reference water samples are not available [32,33]. Hence, our present study attempts to create a diatomological map of the urban section of the Vistula River.

5. Conclusion

Our comparison of the diatomaceous content of samples taken from the organs of people confirmed to have drowned by autopsy and those collected in the local environment, demonstrate the possibilities, and limitations, of such analysis in proceedings aimed at confirming, or excluding, the place of disclosure of the corpse as the scene of the incident.

Taking into account both the variability of the diatom population resulting from seasonality and changes in the environment (e.g. fluctuations in the water level in a reservoir or periodic influx of pollutants to the reservoir from the environment), we present the following recommendations for using environmental samples as reference materials for samples for internal organ from cadavers discovered in the aquatic environment:

- Environmental samples should be collected during the examination of the place where the body was found, possibly as soon as possible after the examination; information about the delay time should be attached to the samples
- If a cadaver was found in a river in which it may have been displaced along with the water current, the environmental samples should also be taken above the place where the cadaver was found, at a distance depending on the shape of the shoreline (to the place where water absorption could have occurred hypothetically),
- Environmental samples should be taken from the microhabitats available in a given ecosystem, i.e. both in the form of plankton, epiphyton and benthic samples,
- Benthic samples contain both live and dead diatoms from previous growing seasons, which is important if a corpse is found several months after drowning. Therefore, benthic samples should also be analysed for live diatoms. Sampling should not be limited to the shoreline only.

CRedit authorship contribution statement

Joanna Żelazna-Wieczorek (corresponding author): formulation of overarching research goals and aims; verification of research outputs; application of statistical techniques to analyze study data; preparation, specifically critical review; oversight and leadership responsibility for the research activity planning and execution, **Marek Bogusz:** formulation or evolution of overarching research goals and aims; conducting a research process, specifically data collection; preparation, writing the initial draft, data presentation, **Iwona Bogusz:** formulation of overarching research goals and aims; conducting a research process, specifically data collection; preparation, specifically critical review.

Conflict of interest

On behalf of myself and my co-authors, I declare that we have nothing to declare. There is no conflict of interest.

References

- [1] D.G. Mann, S.J.M. Droop, Biodiversity, biogeography and conservation of diatoms, *Hydrobiologia* 336 (1–3) (1996) 19–32, <https://doi.org/10.1007/BF00010816>
- [2] F.E. Round, R.M. Crawford, D.G. Mann, *The Diatoms: biology & morphology of the genera*, Cambridge University Press, Cambridge, New York, 1990.
- [3] D.M. Williams, J.P. Kociolek, An Overview of diatom classification with some prospects for the future, *The Diatom World*, Springer, 2011, pp. 49–91, https://doi.org/10.1007/978-94-007-1327-7_3
- [4] H. Lange-Bertalot, G. Hofmann, M. Werum, M. Cantonati, *Freshwater Benthic Diatoms of Central Europe: Over 800 Common Species Used in Ecological Assessment*. Koeltz Botanical Books, Schmitt-Oberreifenberg, 2017 ISBN:978-3-946583-06-6.
- [5] M. Mei, M. Xiangzhi, W. Enyin, Evaluation of four digestive methods for extracting diatoms, *Forensic Sci. Int.* 170 (1) (2007) 29–34, <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2006.08.022>
- [6] M. Bąk, A. Witkowski, S. Dobosz, J.P. Kociolek, L. Pietras, Diatoms and drowning: can diatoms enter the lungs after the initial drowning event? *Rom. Soc. Leg. Med.* 26 (2018) 29–36, <https://doi.org/10.4323/rjlm.2018.29>
- [7] I. Bogusz, M. Bogusz, J. Żelazna-Wieczorek, Diatoms from inland aquatic and soil habitats as indestructible and nonremovable forensic environmental evidence, *J. Forensic Sci.* 6 (67) (2022) 1490–1504, <https://doi.org/10.1111/1556-4029.15017>
- [8] B. Kawecka, J. Kwadrans, Diversity of flora and fauna in running waters of the Province of Cracow (southern Poland) in relation to water quality, *Acta Hydrobiol.* 42 (3–4) (2020) 145–173.
- [9] R.W. Battarbee, D.F. Charles, S.S. Dixit, I. Renberg, Diatoms as indicators of surface water acidity, in: E.F. Stoermer, J.P. Smol (Eds.), *The diatoms: applications for the environmental and Earth sciences*, Cambridge University Press, 2001, pp. 85–127.
- [10] M. Potapova, Patterns of diatom distribution in relations to salinity, in: E.F. Stoermer, J.P. Smol (Eds.), *The diatoms: applications for the environmental and Earth sciences*, 2001, pp. 315–332.
- [11] A. Witkowski, T. Radziejewska, B. Wawrzyniak-Wydrowska, H. Lange-Bertalot, M. Bąk, J. Gelbrecht, Living on the pH edge: diatom assemblages of low-pH lakes in western Pomerania (NW Poland), in: J. Seckbach, J.P. Kociolek (Eds.), *The Diatom World*, Cambridge University Press, 2011, pp. 369–384.
- [12] R.I. Hall, J.P. Smol, Diatoms as indicators of lake eutrophication, in: E.F. Stoermer, J.P. Smol (Eds.), *The diatoms: applications for the environmental and Earth sciences*, Cambridge University Press, 1999, pp. 128–168 ISBN:9780521509961.
- [13] E.F. Stoermer, J.P. Smol, *The Diatoms: Applications for the Environmental and Earth sciences*, Cambridge University Press, 1999 ISBN:9780521509961.
- [14] *The Diatom Word*, in: J. Seckbach, J.P. Kociolek (Eds.), Part 3: *Freshwater ecology*, Springer, 2011, pp. 293–417, <https://doi.org/10.1007/978-94-007-1327-7>
- [15] W. Lawler, Bodies recovered from water: a personal approach and consideration of difficulties, *J. Clin. Pathol.* 45 (1992) 654–659, <https://doi.org/10.1136/jcp.45.8.654>
- [16] M.S. Pollanen, The diatom test for drowning in Ontario, Can. Soc. Forensic Sci. J. 29 (4) (1996) 205–211, <https://doi.org/10.1080/00085030.1996.10757063>
- [17] P. Lunetta, A. Penttilä, G. Hallfors, Scanning and transmission electron microscopical evidence of the capacity of diatoms to penetrate in the alveo-capillary barrier in drowning, *International Journal, Leg. Med.* 111 (5) (1998) 229–237, <https://doi.org/10.1007/s004140050159>
- [18] M.H.A. Piette, E.A. De Letter, Drowning: Still a difficult autopsy diagnosis, *Forensic Sci. Int.* 163 (1–2) (2006) 1–9, <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2004.10.027>
- [19] A. Farrugia, B. Ludes, *Diagnostic of Drowning in Forensic Medicine*, Forensic Medicine – From Old Problems to New Challenges, IntechOpen Limited., London, 2011, <https://doi.org/10.5772/19234>
- [20] N. Kaushik, K.S. Pal, A. Sharma, G. Thakur, Role of diatoms in diagnosis of death due to drowning: case studies, *Int. J. Med. Toxicol. Forensic Med.* 7 (1) (2017) 59–65, [https://doi.org/10.22037/ijmtfm.v7i1\(Winter\).14047](https://doi.org/10.22037/ijmtfm.v7i1(Winter).14047)

- [21] S. Krstic, A. Duma, B. Janevska, Z. Levkov, K. Nikolova, M. Noveska, Diatoms in forensic expertise of drowning – a Macedonian experience, *Forensic Sci. Int.* 127 (3) (2002) 198–203, [https://doi.org/10.1016/s0379-0738\(02\)00125-1](https://doi.org/10.1016/s0379-0738(02)00125-1)
- [22] Z. Levkov, D.M. Williams, D. Nikolovska, S. Tofilovska, Z.C. Akar, The use of diatoms in forensic science: advantages and limitations of the diatom test in cases of drowning (Geological Society), in: M. Williams, T. Hill, I. Boomer, I.P. Wilkinson (Eds.), *The Archaeological and Forensic Applications of Microfossils: A Deeper Understanding of Human History. The Micropalaeontological Society, Special Publications*, London, 2017, pp. 261–277 (Geological Society).
- [23] J. Hürlimann, P. Feer, F. Elber, K. Niederberger, R. Dirnhofer, D. Wyler, Diatom detection in the diagnosis of death by drowning, *Int. J. Leg. Med.* 114 (2000) 6–14, <https://doi.org/10.1007/s004149900122>
- [24] J. Zhao, P. Zhang, Y. Xue, X. Kang, S. Zhang, Y. Mab, H. Shi, J. Cheng, Y. Liu, C. Lina, H. Zhaoa, Correlation analysis of diatom content in the organs and drowning mediums for the drowning death cases, *Australian Journal of Forensic Sciences* 53 (2019), pp. 191–198, <https://doi.org/10.1080/00450618.2019.1682667>
- [25] J.C. Taylor, W.R. Harding, C.G.M. Archibald, A methods manual for the collection preparation and analysis of diatom samples, WRC Report TT 281/07, ISBN 1–77005–483–9, January 2007.
- [26] K.R. Clarke, R.M. Warwick, Change in marine communities: an approach to statistical analysis and interpretation, 2nd edition. PRIMER-E Ltd, Plymouth Marine Laboratory, UK, 2001.
- [27] J. Żelazna-Wieczorek, Diatom flora in springs of Łódź Hills (Central Poland): Biodiversity, taxonomy, and temporal changes of epipsammic diatom assemblages in springs affected by human impact. A.R.G. Gantner Verlag K.G. 2011, ISBN:978–3–906166–93–3.
- [28] R.M. Patrick, C.W. Reimer, The diatoms of the United States, exclusive of Alaska and Hawaii. Monograph 13. Philadelphia, PA: Academy of Natural Sciences of Philadelphia, 1966.
- [29] B. Van de Vijver, L. Beyens, H. Lange-Bertalot, The genus *Stauroneis* in the Arctic and (sub) Antarctic regions, *Bibliotheca Diatomologica*, 51 J. Cramer Berlin/ Stuttgart, Germany, 2004.
- [30] M. Werum, H. Lange-Bertalot, The diatoms in springs from Central Europe and elsewhere under the influence of hydrogeology and anthropogenic impacts, *Iconographia Diatomologica*, 13 Ruggell, Liechtenstein, 2004.
- [31] A. Wojtal, The diatoms of Kobyłka stream near Kraków (Wyzyna krakowska-częstochowska upland), *Pol. Bot. J.* 54 (2) (2009) 129–330.
- [32] M.R. Sane, P. Verma, R. Kulkarni, P.K. Mishra, M. Nigam, P.C. Sirkanungo, Diatomological Mapping of Water Bodies of Indore (M.P) Region, *J. Indian Acad. Forensic Med.* 40 (1) (2018) 91–95, <https://doi.org/10.5958/0974-0848.2018.00015.5>
- [33] E. Saini, P. Rohilla, Forensic diatomological mapping: a data base for diatom profiling to solve drowning cases, *Int. J. Curr. Res. Rev.* 12 (24) (2020) 23–31, <https://doi.org/10.31782/IJCRR.2020.122405>
- [34] E. Szczepocka, P. Nowicka-Krawczyk, R.M. Olszyński, J. Żelazna-Wieczorek, Response of diatom assemblages to the disruption of the running water continuum in urban areas, and its consequences on bioassessment, *PeerJ* 9 (2021) e12457, <https://doi.org/10.7717/peerj.12457>
- [35] S. Sabater, Diatoms. In: Likens G.E. (Ed.) *Encyclopaedia of Inland Waters*: 149–156, 2009, ISBN:978–0–12–370626–3.
- [36] L. Zhuo, S. Lin, P. Song, A future perspective in forensic medicine in china: diatomological mapping of water bodies, *J. Forensic Med.* 2 (2016) 107–110, <https://doi.org/10.4103/2349-5014.177407>
- [37] A.J. Peabody, Diatoms in forensic science, *J. Forensic Sci. Soc.* 17 (2–3) (1977) 81–87, [https://doi.org/10.1016/s0015-7368\(77\)71130-2](https://doi.org/10.1016/s0015-7368(77)71130-2)
- [38] J. Zhao, C. Liu, A.S.A. Bardeesi, Y. Wu, Y. Ma, S. Hu, H. Shi, J. Cheng, The diagnostic value of quantitative assessment of diatom test for drowning: an analysis of 128 water-related death cases using microwave digestion-vacuum filtration-automated scanning electron microscopy, *J. Forensic Sci.* 62 (6) (2017) 1638–1642, <https://doi.org/10.1111/1556-4029.13455>
- [39] J. Zhao, C. Liu, S. Hu, S. Hu, S. He, S. Lu, Microwave digestion-vacuum filtration-automated scanning electron microscopy as a sensitive method for forensic diatom test, *Int. J. Leg. Med.* 127 (2) (2013) 459–463, <https://doi.org/10.1007/s00414-012-0756-9>
- [40] B. Ludes, M. Coste, N. North, S. Doray, A. Tracqui, P. Kintz, Diatom analysis in victim's tissues as an indicator of the site of drowning, *Int. J. Leg. Med.* 112 (3) (1999) 163–166, <https://doi.org/10.1007/s004140050224>
- [41] P. Lunetta, A. Miettinen, K. Spilling, A. Sajantila, False-positive diatom test: A real challenge? a post-mortem study using standardized protocols, *Leg. Med.* 15 (5) (2013) 229–234, <https://doi.org/10.1016/j.legalmed.2013.03.002>
- [42] X. Shen, Y. Liu, C. Xiao, C. Zheng, J. Huang, H. Shi, Q. Xu, J. Cheng, C. Liu, J. Zhao, Analysis of false-positive results of diatom test in the diagnosis of drowning – would not be an impediment, *Int. J. Leg. Med.* 133 (2019) 1819–1824, <https://doi.org/10.1007/s00414-019-02021-4>
- [43] G.J. Huh, Progress in method and reliability of diatom test in drowning, *Korean J. Leg. Med.* 44 (2020) 115–122, <https://doi.org/10.7580/kjlm.2020.44.3.115>
- [44] J.V. Pachar, J.M. Cameron, The diagnosis of drowning by qualitative and quantitative diatom analysis, *Med., Sci. Law* 33 (4) (1993) 291–299, <https://doi.org/10.1177/002580249303300404>
- [45] H. Li, X. Kang, D. Zheng, P. Zhang, C. Xiao, Z. Yu, H. Shi, Q. Xu, J. Zhao, C. Liu, L. Wan, Are diatom types or patterns in the organs and water samples of drowning cases always consistent? *Australian J. Forensic Sci.* 54 (3) (2020) 376–385, <https://doi.org/10.1080/00450618.2020.1825803>
- [46] J. Richards, J. Tibby, C. Barr, P. Goonan, Effect of substrate type on diatom-based water quality assessments in the Mount Lofty Ranges, South Australia, *Hydrobiologia* 847 (2020) 3077–3090, <https://doi.org/10.1007/s10750-020-04316-9>
- [47] J. Soininen, P. Eloranta, Seasonal persistence and stability of diatom communities in rivers: are there habitat specific differences? *Eur. J. Phycol.* 39 (2) (2004) 153–160, <https://doi.org/10.1080/0967026042000201858>
- [48] A. Goldenberg Vilar, T. Donders, A. Cvetkoska, F. Wagner-Cremer, Seasonality modulates the predictive skills of diatom based salinity transfer functions, *PLOS One* (2018), <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0199343>
- [49] M.A. Snell, P.A. Barker, B.W.J. Surridge, C. Benskin, H. McW, N. Barber, S.M. Reaney, W. Tych, D. Mindham, A.R.G. Large, S. Burke, P.M. Haygarth, Strong and recurring seasonality revealed within stream diatom assemblages, *Sci. Rep.* 9 (2019) 3313, <https://doi.org/10.1038/s41598-018-37831-w>
- [50] J.W.G. Lund, Studies on *Asterionella formosa* Hass. II. Nutrient depletion and the spring maximum, *J. Ecol.* 38 (1) (1950) 1–14, <https://doi.org/10.2307/2256522>
- [51] C. Bertrand, S. Fayolle, E. Franquet, A. Cazaubon, Responses of the planktonic diatom *Asterionella formosa* Hassall to abiotic environmental factors in a reservoir complex (south-eastern France), *Hydrobiologia* 501 (2003) 45–58, <https://doi.org/10.1023/A:1026251101534>

Załącznik 3

Diatoms from inland aquatic and soil habitats as indestructible and nonremovable forensic environmental evidence

Bogusz Iwona, Bogusz Marek, Żelazna-Wieczorek Joanna

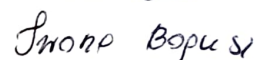
Bogusz I., Bogusz M., Żelazna-Wieczorek J. 2022. Diatoms from inland aquatic and soil habitats as indestructible and nonremovable forensic environmental evidence. *Journal of Forensic Science* 67(6):1490-1504.
<https://doi.org/10.1111/1556-4029.15017>.

Łódź, 15.01 2025 r.

Oświadczenie o współautorstwie

Oświadczam, że mój wkład w przygotowanie oryginalnej pracy był **wiodący** i polegał na: opracowaniu koncepcji pracy, zaplanowaniu i realizacji prac w terenie, identyfikacji taksonomicznej okrzemek, udział w analizie i interpretacji uzyskanych wyników oraz w dyskusji. Pracowałam również nad ostateczną wersją manuskryptu.

Iwona Bogusz



Łódź, 28.01 2025 r.

Oświadczenie o współautorstwie

Oświadczam, że mój wkład w przygotowanie oryginalnej pracy polegał na: opracowaniu koncepcji pracy, udziale w opracowaniu i analizie wyników z wykorzystaniem metod matematycznych oraz interpretacji uzyskanych wyników, a także w dyskusji i w przygotowaniu ostatecznej wersji manuskryptu.

dr hab. Joanna Żelazna-Wieczorek prof. UŁ



Łódź, 15.01 2025 r.

Oświadczenie o współautorstwie

Oświadczam, że mój wkład w przygotowanie oryginalnej pracy polegał na: zaplanowaniu i realizacji prac w terenie, udział w analizie i interpretacji uzyskanych wyników oraz w dyskusji, a także w przygotowaniu ostatecznej wersji manuskryptu.

Marek Bogusz



PAPER

Criminalistics

Diatoms from inland aquatic and soil habitats as indestructible and nonremovable forensic environmental evidence

Iwona Bogusz MSc^{1,3}  | Marek Bogusz MSc^{2,3}  | Joanna Żelazna-Wieczorek PhD³ 

¹Special Training Unit, Police Training Centre in Legionowo, Legionowo, Poland

²Forensic Medicine Department of Medical University of Warsaw, Warszawa, Poland

³Department of Algology and Mycology, Faculty of Biology and Environmental Protection, University of Łódź, Łódź, Poland

Correspondence

Joanna Żelazna-Wieczorek, Department of Algology and Mycology, Faculty of Biology and Environmental Protection, University of Łódź, Banacha 12/16 Street, 90-237, Łódź, Poland.

Email: joanna.zelazna@biol.uni.lodz.pl

Abstract

Environmental analysis of soil, water, and plants plays a key role in the criminal investigation process, as it not only provides information about the course of the crime, but it can also elucidate the connection between the offender, the victim, and the environment. One particularly useful way of linking the victim and offender to a specific environment is by analyzing their clothing for the presence of diatoms. The present research was conducted upon field experiments. Firstly, it examines the variability of diatom and the quantitative analysis of diatom communities in designated places, each at an increasing distance from the aquatic ecosystem. Secondly, it analyses the differentiation of the structure of diatom communities in designated environments located close to each other. Thirdly, it examines the diatom colonization of selected substrates: cotton, chamois leather, and sponge. Finally, it confirms whether the diatoms which transfer to socks after contact with the selected environment reflect the structure of the diatom communities in that environment, even after the socks had been washed. Our findings indicate that diatom communities vary considerably, even between environments separated by short distances, and that objects placed in a particular environment are colonized by diatoms that reflect the environmental samples, irrespective of the substrate. In addition, after contact with a specific aquatic ecosystem, sock material retained diatom collections that reflected the environment samples, even though the time of exposure was very short and after the socks had been washed. This provides valuable information that can be used as forensic evidence.

KEYWORDS

crime scene geolocation, diatoms transfer, environmental trace, forensic ecology, freshwater crime scenes, persistence of diatom traces

Highlights

- The transferability of diatoms from aquatic/soil environment to various substrate types.
- Diatoms as a useful tool for obtaining knowledge about the geolocation of a crime scene.
- Diatoms as difficult to remove evidence linking a suspect with a specific crime scene.

1 | INTRODUCTION

Law enforcement agencies often solve crimes by analyzing forensic traces directly at the crime scene. Environmental traces, particularly

those from the aquatic environment, can also be used as forensic evidence to confirm the presence of a perpetrator and victim at the crime scene. Although such evidence provides information for reconstructing the circumstances of a criminal event, it is often

overlooked by investigators. There are two main reasons for this: firstly, there is a lack of reliable information about its value, and secondly, little unified knowledge exists about securing and analyzing it during the investigation. Many studies have demonstrated how a specific person can be linked to a specific environment, and extensive literature exists about the range of methods that can be used to this end in the criminal investigation process: analysis of the surface texture of quartz grains (1,2), palynological studies (3–6) soil chemical composition studies (7–11), mycological analysis (12,13), entomological signs (14–18), and diatom analysis (19).

Diatoms are microscopic and photoautotrophic organisms that are characterized by specific structure and ubiquity in the aquatic and soil environment. These factors can be useful in linking a person with a specific place or environment. Furthermore, as their cell walls are built from silica (SiO_2), they are extremely durable and resistant to degradation by environmental physical and chemical factors (20).

They are therefore an excellent, permanent source of information about the environment. In addition, as a secured trace, for example, on clothing, they can be stored for an unlimited period; when dried or preserved in the form of preparations, it is possible to examine them later or to reanalyze them in case of any doubts. The resistance of the silica cell wall allows for the species analysis of the diatoms even after the diatoms have been treated with acid or hydrogen peroxide, even at high temperatures.

Diatoms also demonstrate considerable species diversity. It is estimated that there are probably about 200,000 diatom species in the world, of which about 24,000 are described, i.e., only 12% of the known species (21). Nevertheless, this small proportion of species inhabits a range of environments, not only aquatic ones, and the varied sensitivity of the species to environmental conditions makes them perfect bioindicators that can provide information on the water reaction, trophic state, organic matter content, thermal conditions, and salinity, but also water movements, such as standing and flowing waters (22–26). The quantitative and qualitative analysis of diatom assemblages thus allows for an accurate determination of the environmental conditions that they inhabit (27–29).

For example, diatoms are particularly valuable in diagnosing drowning cases: an analysis of the diatom community structure can help confirm whether the site where the corpse was discovered was in fact the site of drowning (30–36). Such a task is otherwise difficult to establish using other means.

However, it remains unclear whether a particular aquatic environment can be identified based on the analysis of diatoms isolated from clothing or footwear. So far, studies have been carried out on the transfer and persistence of diatoms on various footwear materials (37), as well as their transfer to clothing, such as cotton shirts (38,39); in addition, various methods of extracting diatoms from different types of places and materials have also been analyzed (40,41). All these studies confirmed the presence, transferability, and preservation of diatom material on various types of substrates. Despite this, being conducted under laboratory conditions, these studies fail to adequately determine the extent to which the collected diatoms reflect the diatom communities in the environment, as well as the ecosystems and habitats.

One particular case in Poland provided the perfect opportunity to test the potential of diatoms as forensic markers for clothing. Briefly, law enforcement agencies contacted a specialist in the field of diatomology to confirm the location of an incident based on an analysis of the diatoms in a secured pair of socks. After analyzing the clothing, the expert indicated that the diatom material (unpublished data) was crucial in explaining the circumstances of the incident. Therefore, the present study examines the validity of such diatom-based forensic analysis based on socks in a crime investigation. Among clothes, socks are excellent candidates for such analysis, as there is a high probability that diatoms will be transferred to them when walking.

The aim of this work is to verify the research hypothesis: *The diversification of diatom communities with regard to the type of habitat and the inhabited substrate makes their analysis an important tool in recreating the place and course of an incident in a crime investigation.*

In order to verify the hypothesis, the following research tasks were formulated as *in situ* experiments:

1. A comparative analysis was performed of the structure of diatom communities in different ecosystems/habitats and on different types of substrates—Experiment 1.
2. A qualitative and quantitative analysis of diatom communities was performed based on the distance from the aquatic ecosystems, with an indication of characteristic species for individual habitats—Experiment 2.

In order to check the possibility of using socks as a base for diatom material, which can be helpful in the research process, the following experiments were carried out:

3. The influence of time of exposure of socks in contact with the ground or surroundings was evaluated in terms of the possibility of reflecting environmental samples—Experiment 3 (*in situ* experiment);
4. The persistence of diatoms on socks after washing was determined and a comparative analysis was performed of diatoms with environmental tests—Experiment 4.

2 | MATERIALS AND METHODS

2.1 | Experiment 1

Three different research substrates placed in three different habitats (Figure 1) were analyzed:

- a fish pond with an area of 500 m^2 and a depth not exceeding 1 m;
- a 3 m wide dike separating a fish pond from a stream;
- a stream (3 m wide and depth not exceeding 0.5 m .)

The substrates were cotton, chamois leather (square area $10 \times 10 \text{ cm}$), and a sponge with a volume of 100 cm^3 .

To protect the substrates, they were placed in plastic, perforated bottles (volume of 2 L). The bottles with the substrates were left in these habitats from April to September. This period in a temperate climate zone corresponds to the growing season. Samples were taken from all the substrates at six-week intervals: i.e., in June, August, and September. In addition, control samples were also simultaneously taken from the fish pond and the stream (100 ml of plankton and benthos samples). Soil samples were taken from the dike as control material. The soil control samples were taken from an area of 10×10 cm and 5 cm depth. These samples were rinsed with 100 ml of distilled water in order to transfer the diatoms from the soil to the water.

Substrate samples were collected in 100 ml containers filled with distilled water. Each of the samples, after shaking, was examined with a light microscope at a magnification of $10 \times 40/1.25$ to confirm the presence of live diatoms. Following this, 1 ml of a 4% solution of formaldehyde (formalin) was added for preservation.

From each sample, 2 ml was taken into a test tube. Following this, a few drops of concentrated sulfuric acid were added to the test tube, followed by 2 ml of 30% chromic acid. After the organic

matter had been digested, the samples were centrifuged in a centrifuge at $2600 \times g$ for 3 min. After centrifugation, the samples were rinsed with distilled water and centrifuged again. This operation was repeated until a purified diatom sediment was obtained.

The cleaned diatom frustules were then transferred to microscope slides and, after drying, embedded in Naphrax® resin. The microscope slides were observed under a light microscope at a magnification of $10 \times 100/1.25$. The diatoms were identified in each slide when over 500 valves were counted. The next three traverses of the slide were then checked in order to identify any diatoms that did not appear during the count. In the case that a smaller number of valves were observed, the entire slide was observed, and all valves were counted.

2.2 | Experiment 2

In August, three different aquatic ecosystems (temperate climate zone) were analyzed: a drainage ditch, a swamp, and a river (Figure 2).

FIGURE 1 Diagram showing the sampling site (Experiment 1): 1—fish pond, 2—dike, 3—river (the river current is marked with red arrow)

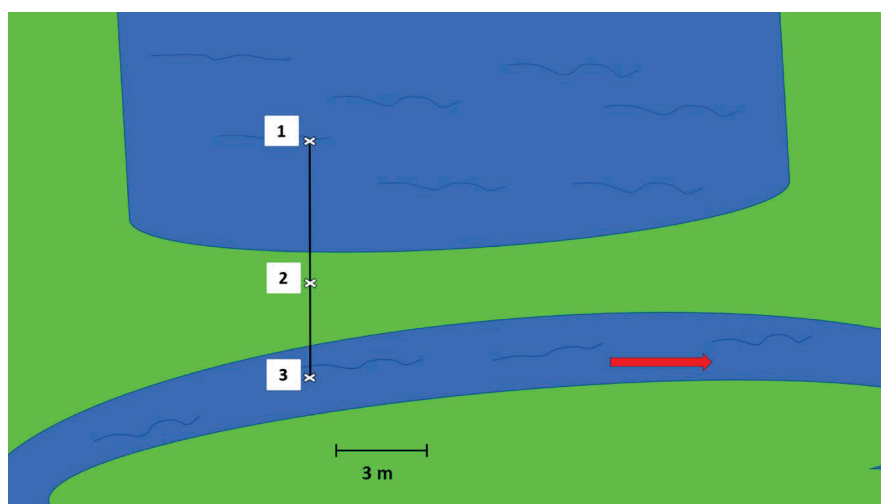


FIGURE 2 The studied ecosystems in Experiment 2 and 3, respectively: swamp, ditch, and the river Bug

Samples (100 ml) of water representing plankton, epiphyton, and benthos were collected from each habitat (Figure 3).

In addition, soil samples were also collected from the vicinity of the aquatic ecosystems from the transect: at the contact of the water with the bank, 1 m from the bank, 3 m from the bank, and 5 m from the bank (Figure 3).

Soil samples were taken from a surface area of 10 × 10 cm and 5 cm deep. These samples were rinsed with 100 ml of distilled water in order to transfer the diatoms from the soil to the water.

Each of the samples was examined with a light microscope at a magnification of 10 × 40/1.25 to confirm the presence of live diatoms. The samples were then fixed with 1 ml of 4% formaldehyde solution (formalin).

From each sample, 2 ml was taken into a test tube. A few drops of concentrated sulfuric acid were then added to the test tube, followed by 2 ml of 30% chromic acid. After the organic matter had been digested, the same procedure was followed as in Experiment 1.

2.3 | Experiment 3

Two types of new, unworn socks were used in the study: cotton and bamboo socks. The socks were put on the feet and then immersed in a water with contact with the ground. Each type of sock was immersed in three different aquatic ecosystems (mentioned in Experiment 2).

The socks were put in contact with the aquatic environment for three different durations: 30 s, 1, and 3 min. Next, the socks were dried in such a way as to avoid contamination. After drying, two 1 cm × 1 cm pieces were cut from each pair of socks from two parts: the heel area and the toe area. To remove the structure of the material, as well as other organic matter, the scraps of the material were treated with 30% chromic acid with a few drops of concentrated sulfuric acid for 72 hours. After the organic matter had been digested, the same procedure was followed as in Experiment 1.

For comparison, in this experiment, sock samples were also heated with 30% hydrogen peroxide at 70°C for 72 h. The samples were then treated with 0.5 cm concentrated sulfuric acid for 2 h.

2.4 | Experiment 4

Two types of new, unworn socks were used in the study: cotton and bamboo socks. The socks were worn, i.e., put on the feet, and then immersed in water in contact with the bottom. Each type of sock was immersed in three different water ecosystems (mentioned in experiment 2).

The socks were put in contact with the aquatic environment for three different durations: 30 s, 1, and 3 min. Next, the socks were dried in such a way as to avoid contamination. Each of the socks was washed separately during an entire washing cycle with the use of washing powder; the washing machine was rinsed with running water to prevent contamination before each sock wash. Each washing cycle took 2 h, and the water temperature was 40°C. After washing, the socks were dried. The socks were then subjected to the same chemical procedure described in Experiment 3. In this experiment, a new pair of socks, both bamboo and cotton, were also tested for the presence of diatoms as controls.

2.5 | Data processing and analysis

The structure of the diatom communities was described by qualitative and quantitative analyses. The quantitative analysis in each sample was expressed in relative values. Species with percentage share of ≥5% in each sample were identified as dominant. Frequency was determined according to Tümping and Friedrich (42) coefficient according to the range values: 100%–75% euconstant taxa (EC), 75%–50% constant taxa (CN), 50%–25% accessory taxa (AC), and 25%–1% accidental taxa (AD).

Hierarchical cluster analysis (HCA) and nonmetric multidimensional scaling analysis (nMDS) based on Bray–Curtis similarity coefficients were used to identify natural groupings of samples. The results (nMDS) are given as a 2D diagram in which the degree of similarity is represented as the distances between particular points (samples), with greater distances indicating a lower degree of similarity. The reliability of the ordering of the assemblage is represented by the stress value, which reflects how well the ordination summarizes the observed distances among the samples (43).

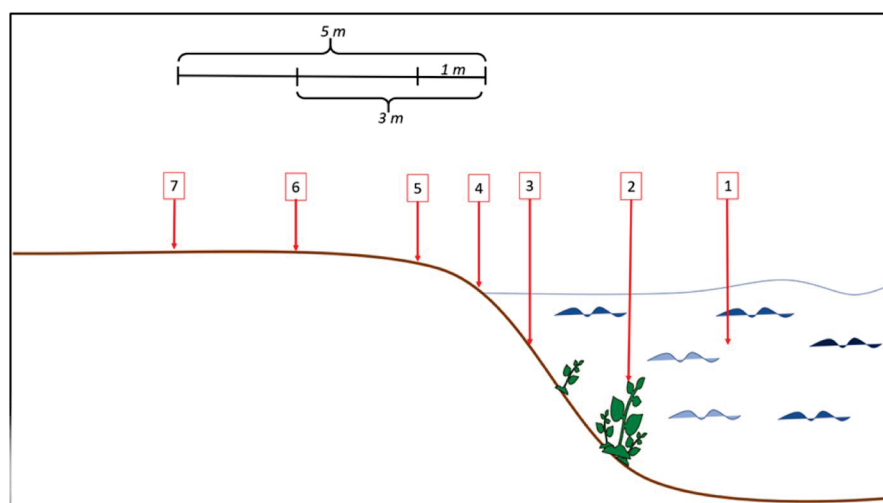


FIGURE 3 Diagram showing the place of sampling in Experiment 2: 1—plankton, 2—epiphyton, 3—benthos, 4—bank, 5—1 m from the bank, 6—3 m from the bank, 7—5 m from the bank

Shade Plot analysis, based on the Bray–Curtis similarity coefficient, was used to identify the diatom species that have the strongest influence on the similarities between the samples. The shade plot analysis compares two data matrices with each other and then groups them on two levels, according to the similarity of the samples and the factors affecting their similarity, i.e., diatom species. The results are represented graphically by shading individual cells: the intensity of the shading indicates the degree of the influence of a given factor (species) on the position of its sample within a given similarity cluster. The range of the shading was determined on the basis of square root. The analyses were performed using PRIMER 7.0.13 software.

The identification of diatoms and information about their ecological properties were based on the OMNIDIA 6.0.6 database and diatom bibliography (first of all, (43–47)).

3 | RESULTS

3.1 | Experiment 1

3.1.1 | Qualitative and quantitative analysis of diatoms in three ecosystems

A total of 245 taxa were determined in the analyzed samples from three different habitats. We determined 145 taxa in soil samples, 175 taxa in samples from the river, and 162 taxa in samples from the pond. The dominant and constant species (Figure 4) were: *Staurosirella pinnata* Ehrenberg, *Cocconeis pseudothumensis*

Reichardt, *Achnantheidium minutissimum* (Kützinger) Czarnecki, *Planorhynchium lanceolatum* Lange-Bertalot, *P. dubium* (Grunow) Round & Bukhtiyarova, and *P. frequentissimum* (Lange-Bertalot) Lange-Bertalot (Figure 4).

The distinguishing species for the soil environment were *Staurosirella lapponica* Grunow (0.7%–7.2%, constant), *Fragilaria vaucheriae* (Kützinger) Peterson (2.7%–6.9%, constant), and *Placoneis elginensis* (Gregory) Cox (constant). In contrast, *Cyclotella meneghiniana* Kützinger was recorded as a constant species only in the soil environment (Figure 4). The distinguishing species for the diatom community occurring in the pond were *Staurosira venter* (Ehrenberg) Cleve & Moeller and *Nitzschia linearis* (Agardh) W. Smith. Those were constant and dominant species in this community (Figure 4).

3.1.2 | Analysis of species composition based on the used substrate

Considerable dissimilarity was observed between the diatom communities in the soil environment, with the April and June samples being completely different to one another (Figure 5). The August soil samples (HCA) are most similar to each other. In contrast, the samples from the river and from the pond show 60% similarity, with a clearly higher similarity demonstrated among communities in the same sampling period (Figure 5).

The multidimensional scaling (nMDS) analysis based on the Bray–Curtis similarity coefficient revealed a differentiation between

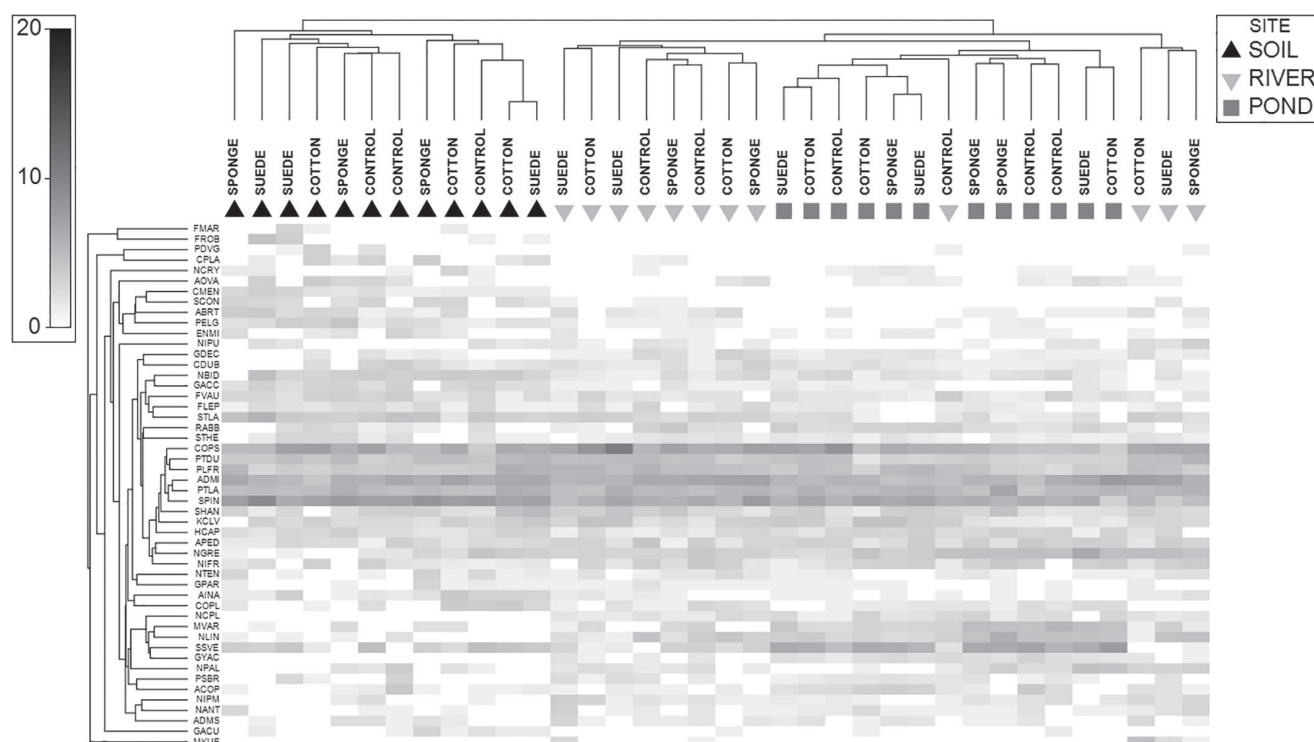


FIGURE 4 The shade plot analysis diagram shows the participation of important species of diatoms in individual samples

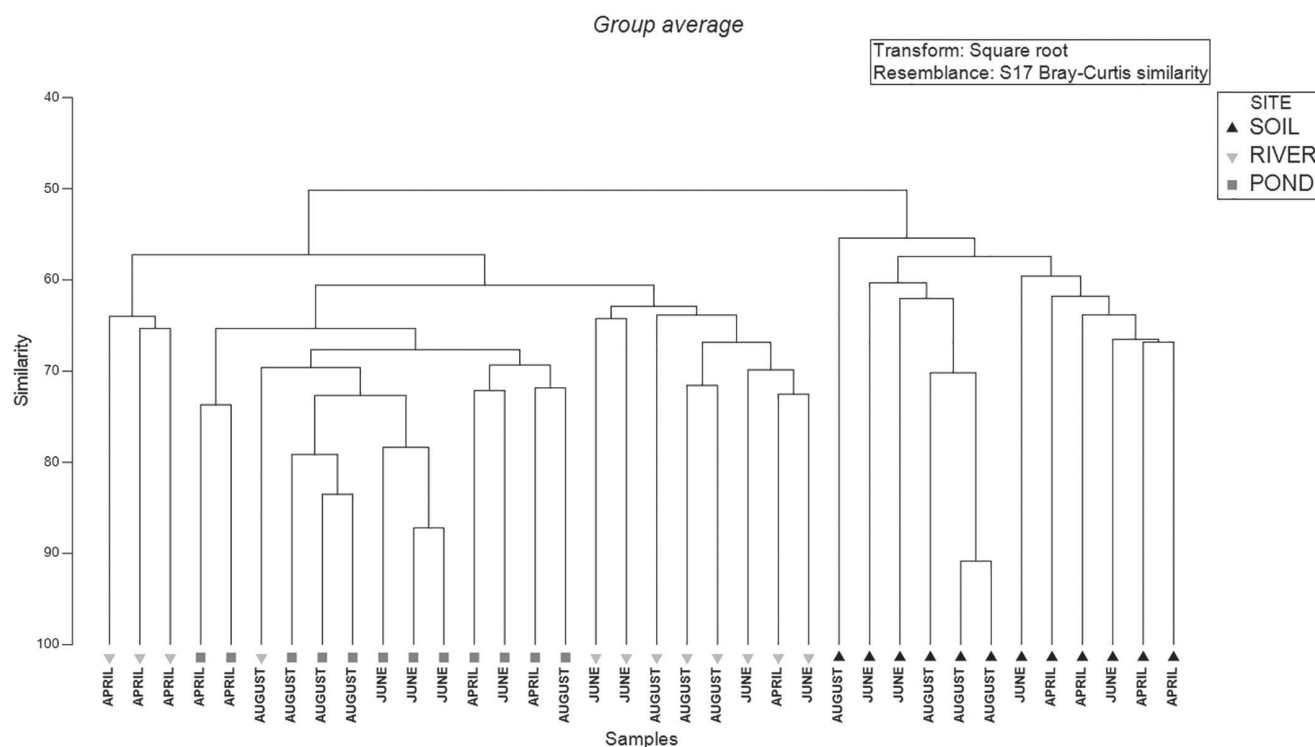


FIGURE 5 The hierarchical cluster analysis diagram based on Bray-Curtis similarity coefficient highlights the differentiation of samples in relation to the season and habitat

samples depending on habitat type. However, no clear differences in colonization were indicated between the substrates (Figure 6).

3.2 | Experiment 2

3.2.1 | Qualitative analysis of diatom communities from three aquatic ecosystems

Out of the three different habitat types selected for the experiment, the river ecosystem is distinguished by lowest diversity of diatoms, with a total of 77 diatom taxa being identified. The swamp and drainage ditch were characterized by higher taxonomic diversity, corresponding to 129 and 128 taxa (Table 1).

In the samples from the swamp and the drainage ditch, the largest number of taxa was recorded in the plankton sample. In the case of the river, the highest number of taxa was recorded in the sample taken 1 m from the bank. The number of identified diatom taxa decreased moving away from the shore along the designated points.

3.2.2 | Comparative analysis of all samples

Although the analysis shows similarity in the river transect (Figure 7—Cluster A.2), a clear distinction could be seen between the samples taken from aquatic habitats and those taken from the soil as

they moved away from the riverbank. While the samples taken 1 m and 3 m from the riverbank were similar to each other, the sample taken furthest from the aquatic environment, i.e., 5 m from the river, was less similar to them.

In the case of the swamp (Figure 7—Cluster A.1), the samples were grouped into one cluster, and the relationships between the samples in the transect were the same as in the case of the river.

For the drainage ditch, the samples taken from the water constituted a separate group, with a species composition closer to that of flowing water environments (Figure 9—Cluster A.2), and the soil samples for this transect constituted a completely separate group (Figure 9—Cluster B).

3.2.3 | Analysis of diatom communities along the transect

The examined transects differ with regard to the structure of diatom communities (Figure 8). The constant species in all transects were *Planothidium frequentissimum* (Lange-Bertalot) Lange-Bertalot, *Eolimna minima* (Grunow) Lange-Bertalot, *Nitzschia palea* (Kützing) Smith, and *Gomphonema parvulum* (Kützing) Kützing; however, they demonstrated different participation between individual samples.

The species distinguishing the river transect were *Stephanodiscus hantzschii* Grunow, *Cyclotella meneghiniana* Kützing, and *Aulacoseira granulata* (Ehrenberg) Simonsen. These diatoms dominated the

Non-metric MDS

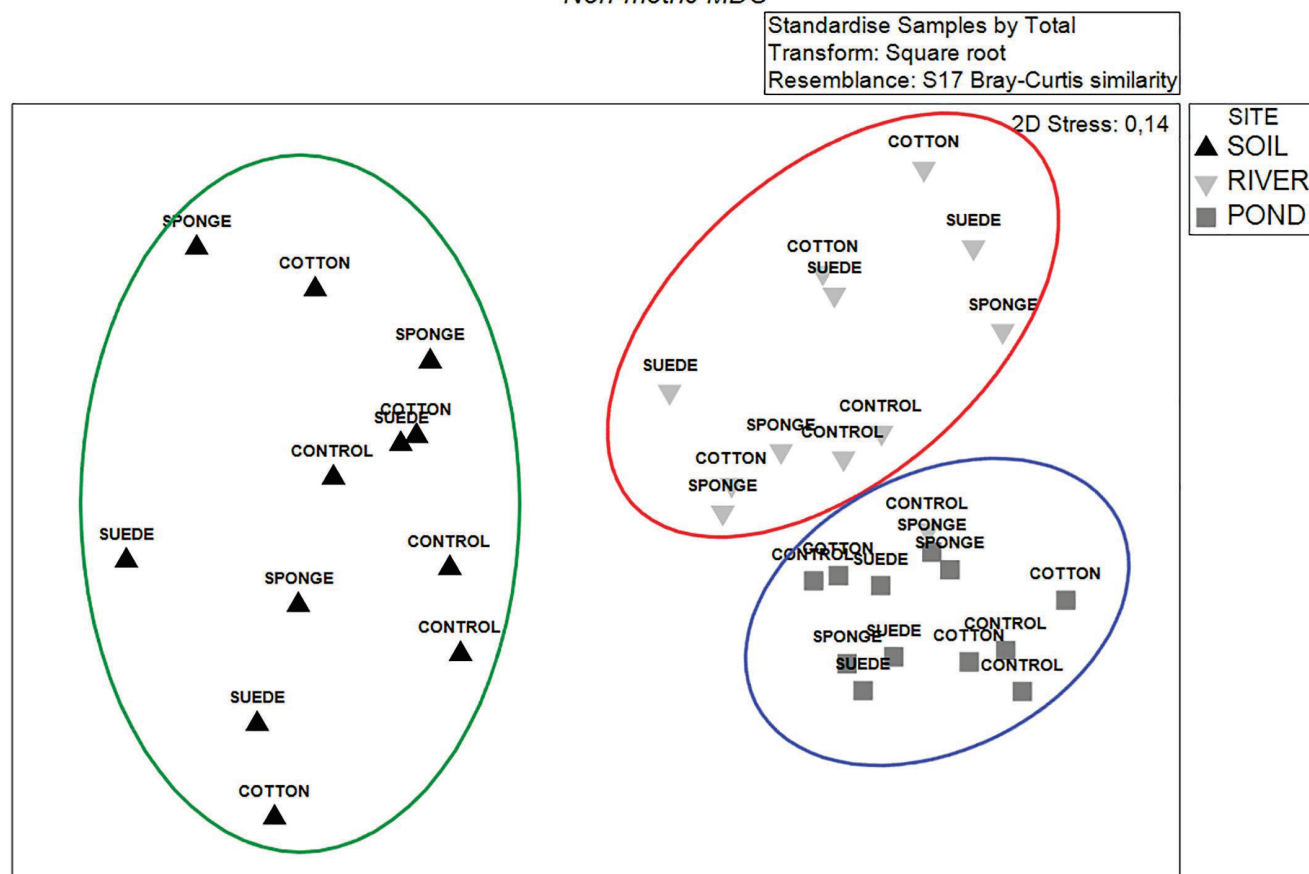


FIGURE 6 The nMDS (2-D) analysis highlights the grouping of samples from different types of ecosystems

TABLE 1 The number of identified diatom taxa in the individual samples

Aquatic environment		Swamp	Drainage ditch	River
Total number of taxa		129	128	77
The number of taxa in samples taken from	Plankton	95	98	60
	Epiphyton	67	60	56
	Benthos	76	71	30
	Shore	46	52	42
	1 m from the shore	59	25	68
	3 m from the shore	38	16	45
5 m from the shore		34	11	33

aquatic environment and their abundance decreased as the distance from the riverbank increased. The distinguishing species for this transect were *Navicula veneta* Kützing, *N. cincta* (Ehrenberg) Ralfs, and *Halamphora montana* (Krasske) Levkov; these diatoms had a higher participation in the soil samples than in the samples from the river.

Mayamaea atomus (Kützing) Lange-Bertalot and *M. permissis* (Hustedt) Brude & Medlin were recorded in the soil samples of this transect but not in the water samples. *Navicula gregaria* Donkin was

found in soil samples of the river transect; it was most abundant in the sample 1 m from the bank, and then, its abundance decreased as the distance from the river bank increased.

A distinct differentiation of diatom communities was observed between the two parts of the drainage ditch transect. While *Achnanthes eutrophilum* (Lange-Bertalot) Lange-Bertalot, *Hippodonta capitata* (Ehrenberg) Lange-Bertalot, *Melosira varians* Agardh, *Meridion circulare* (Greville) Agardh, *Navicula gregaria* Donkin, *Planothidium lanceolatum* Lange-Bertalot, *Staurosira venter* (Ehrenberg)

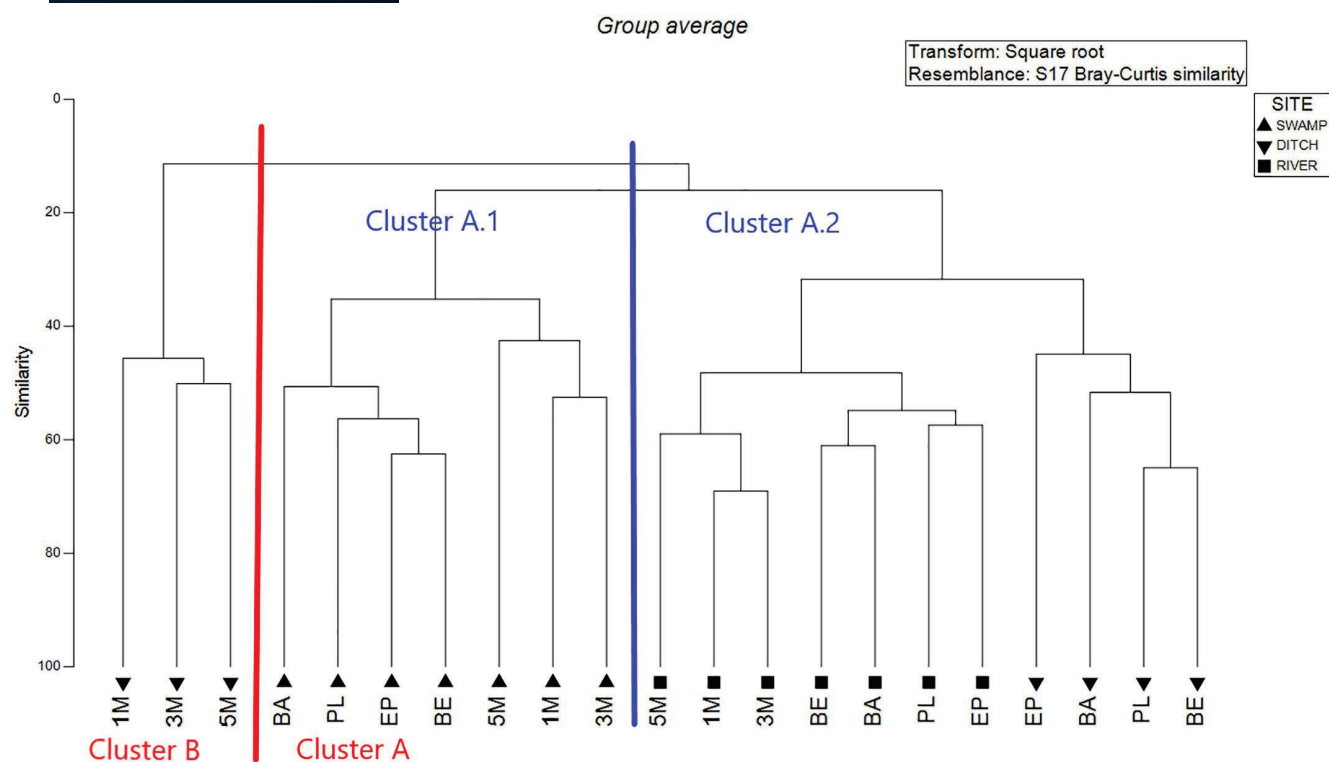


FIGURE 7 The hierarchical cluster analysis based on the Bray-Curtis similarity index highlights the similarity of the samples for three transects

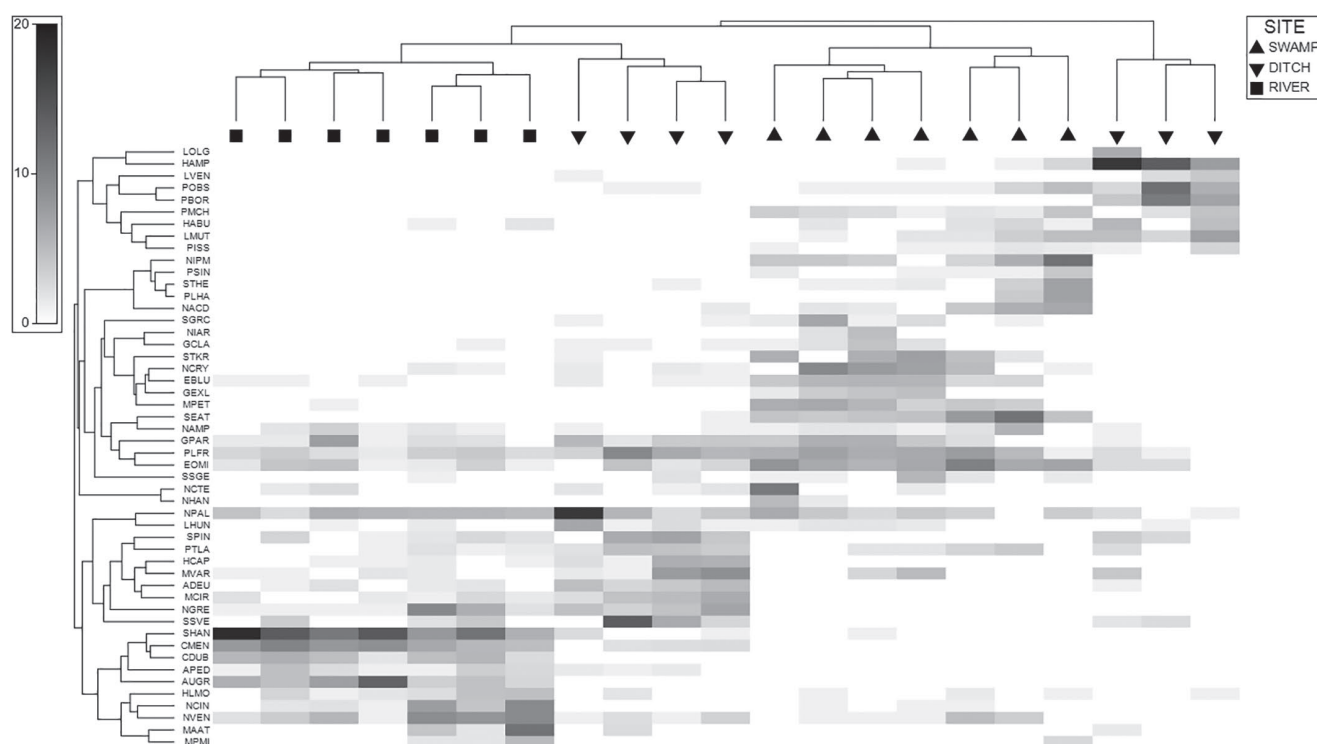


FIGURE 8 The shade plot analysis diagram indicates diatom species that distinguish transects

Cleve & Moeller, and *Staurosirella pinnata* Ehrenberg were the distinguishing species in the water samples, the distinguishing species in the soil samples were *Hantzschia amphioxys* (Ehrenberg) Grunow,

Pinnularia borealis Ehrenberg, *P. obscura* Krasske, *Luticola ventricosa* (Kützing) Mann, *L. mutica* (Kützing) Mann, and *Stauroneis phoenicenteron* (Nitzsch) Ehrenberg. In addition, *Luticola mutica* (Kützing)

Mann, *Hantzschia abundans* Lange-Bertalot, *Pinnularia isselana* Lange-Bertalot, and *P. marchica* Schonfelder were observed in soil samples from both the drainage ditch transect and the swamp transect.

Nitzschia acidoclinata Lange-Bertalot, *Pinnularia sinistra* Krammer, *Stauroneis thermicola* (Boye-Petersen) Lund, and *Nitzschia perminuta* (Grunow) Peragallo were found to be characteristic species in the soil part of the swamp transect but were not recorded in soil samples from other transects. These species were most abundant at the greatest distance from the aquatic sites.

In the water samples of the swamp transect, the distinguishing species were *Stauroneis kriegeri* Patrick, *Gomphonema exilissimum* (Grunow) Lange-Bertalot & Reichardt, *Eunotia bilunaris* (Ehrenberg) Schaarschmidt, *Mayamaea petersenii* Barragan, Ector & Wetzels, and *Navicula cryptocephala* Lange-Bertalot.

3.3 | Qualitative and quantitative analysis of diatoms transferred to socks—Experiment 3 and Experiment 4

3.3.1 | Control samples from socks

In addition, control samples were also taken from new socks after washing them. The washing cycle was the same as in Experiment 4. No diatom valves were observed in any of the control samples.

3.3.2 | Number of valves for unwashed and washed socks

The number of valves counted in slides obtained from unwashed socks significantly exceeded 500. In such cases, the type of substrate in aquatic ecosystems and the contact time appear to have no influence on number. Moreover, diatoms were still observed in samples obtained from socks, which were dried and washed after contact with the aquatic environment; however, in this case, fewer than 500 valves were observed in the samples from both the swamp and the drainage ditch. For samples from the laundered socks, a clear relationship was observed between the contact time with the aquatic environment and the number of valves in the slides. Although this applies to both types of materials, it is noteworthy that much fewer valves were observed in the samples of laundered bamboo socks that had been in contact with the swamp: the number of diatom valves did not reach 500, even at the longest the contact time of 3 min (Table 2 and Figure 9).

3.3.3 | Similarity to environmental samples based on the time of exposure and washing of socks

The analysis of the slides taken from socks after contact with three different aquatic environments (Figure 10 and Figure 11) found the diatoms that were washed out to have similar profiles as the samples

TABLE 2 The number of valves counted and identified in Experiment 3 and Experiment 4 (all valves counted on the slide are marked in red)

Exposure time	Washed socks				Unwashed socks			
	River		Swamp		Drainage ditch		Swamp	
	Bamboo	Cotton	Bamboo	Cotton	Bamboo	Cotton	Bamboo	Cotton
30 s	504	503	427	394	508	520	503	502
1 min	507	505	506	505	511	504	505	500
3 min	511	514	504	502	501	510	500	504

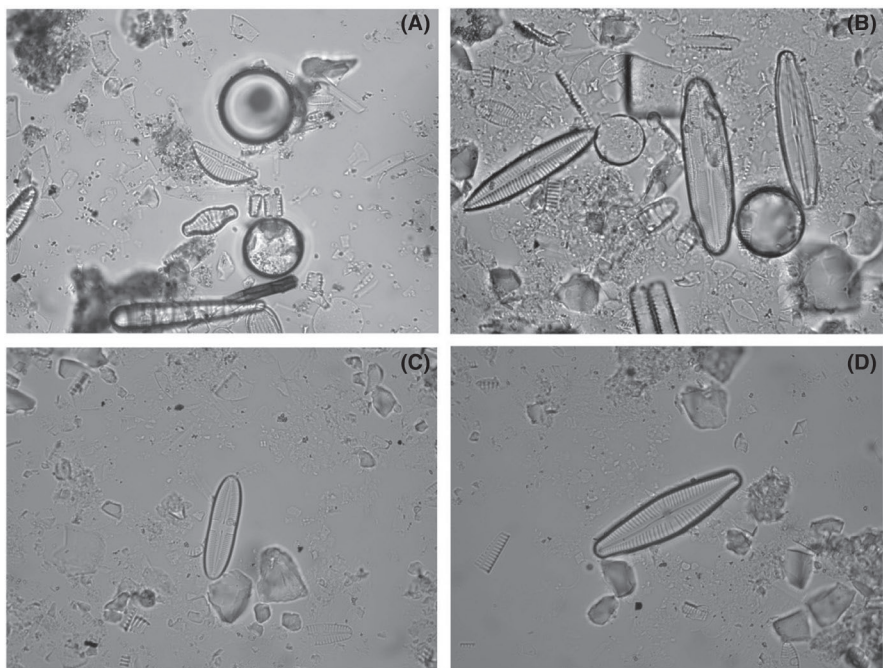


FIGURE 9 Diatom communities observed through a microscope at the same zoom: A—samples obtained from unwashed socks from the ditch, after the longest contact time; B—samples obtained from washed socks from the ditch, after the longest contact time; C and D—samples obtained from washed socks from the swamp, after the longest contact time

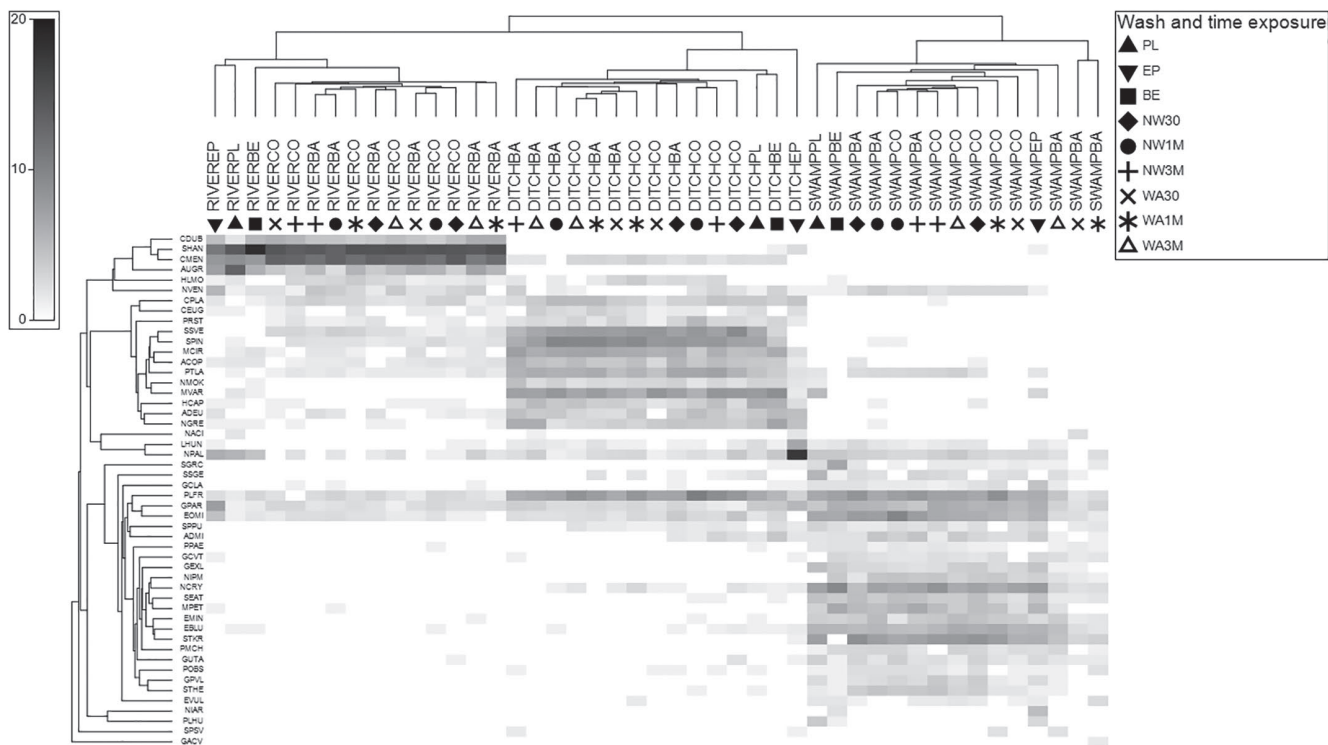


FIGURE 10 The shade plot analysis diagram indicates the dominant diatom species in the three different habitats. Two factors were used: exposure time in a specific water environment and washing socks

collected from those ecosystems (Figure 11 Cluster A1—river, Cluster A2—ditch, Cluster B—swamp). The samples within clusters demonstrated high similarity with each other, regardless of the type of material the socks were made of. In the aquatic ecosystems, neither the time of exposure nor the fact that the socks appeared to have any influence. Again, in the aquatic environment, the greatest dissimilarity

was observed between the samples from washed bamboo socks after 30 s contact and those after 1 min (Figure 11 Cluster B). The same diatom communities were obtained for the environmental samples and those obtained from the socks for each of the experiment locations, regardless of exposure time and whether or not the socks were washed.

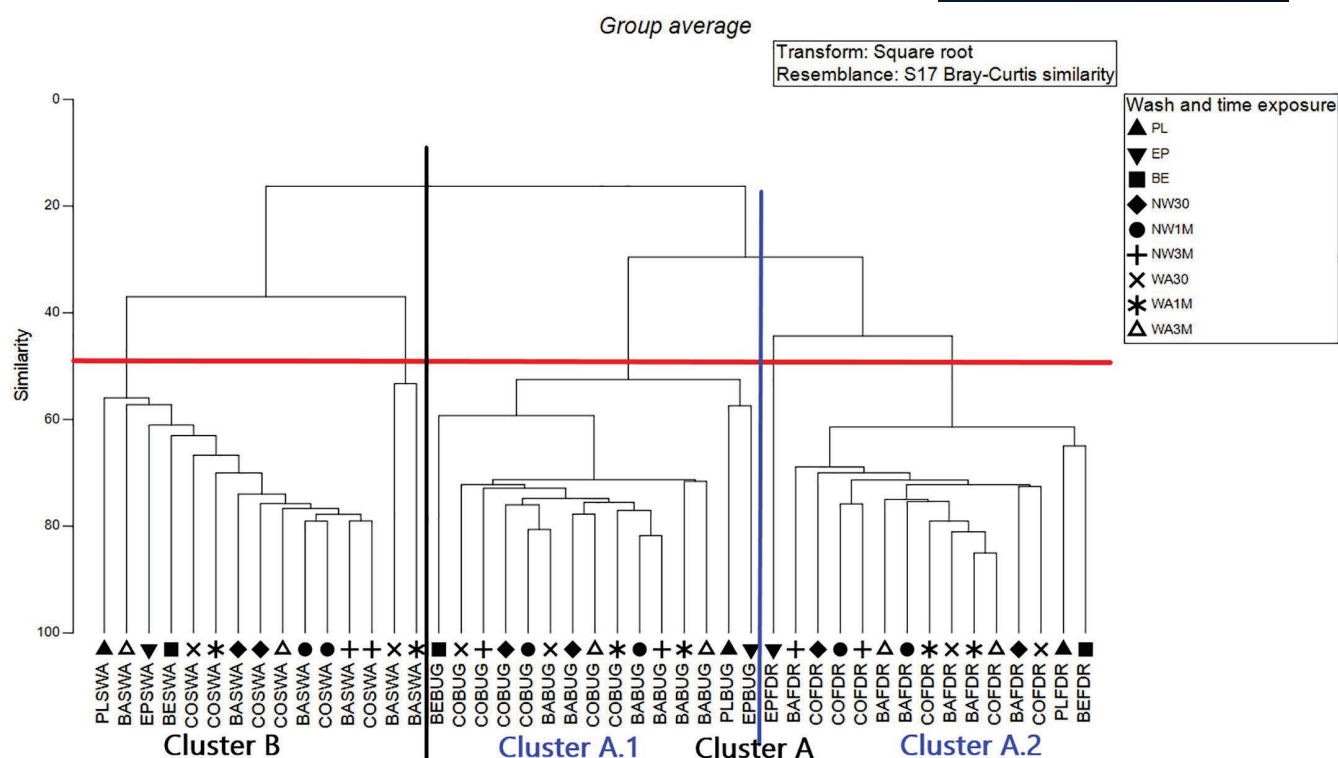


FIGURE 11 The hierarchical cluster analysis diagram based on the Bray–Curtis similarity index shows the similarity between sock samples for three different habitats. Two factors were used: exposure time in a specific aqueous environment and whether the socks were washed

3.3.4 | Dissolving and cleaning sock material

Regardless of which method was used for digesting the samples, chromic acid, or hydrogen peroxide, no differences were observed in the quality of purification.

In both cases, it was difficult to remove the synthetic artifacts included in both types of material (Figure 12).

4 | DISCUSSION

Most of the information published so far on the possibility of using diatoms to identify a crime scene based on obtained environmental traces from elements of clothing and footwear have been obtained from studies carried out in laboratory conditions (37,38,48). The transferability and persistence of diatoms on various types of materials in short-term contact with the aquatic environment have also been studied, with regard to seasonal variability (39). Despite this, some important questions remain unanswered: viz. whether the structure of the material, i.e., the substrate, can influence diatom colonization in different types of habitats (flowing water, standing water, and soil), whether the duration of contact between the substrate and the habitat influences the accuracy of the recovered diatoms as diatom community inhabiting it, and whether the recovered diatoms can still accurately indicate a specific environment following cleaning (washing).

Our in situ experiments add to the body of knowledge on how diatoms can be used to link environmental evidence with crime scenes. In Poland, no environmental research has so far been carried out, which would enable the perpetrator to be linked with the crime scene based on diatom analysis in various types of ecosystems. As such, our findings can be of great interest to forensics investigators. In addition, there is a clear need for further research aimed at diversifying diatom communities in terms of geological substrate type, climatic conditions, and changes in aquatic ecosystems resulting from human impact. Our findings will help to improve the methods and enrich current knowledge on the use of diatoms in forensic investigations, not only in the case of drowning (30–35).

4.1 | Experiment 1

An analysis of diatom communities extracted from the substrates used in the experiment (sponge, chamois, and canvas) did not show any significant differences in the community structure compared to control samples (Figure 4). In addition, the diatom communities taken from individual ecosystems demonstrated different qualitative and quantitative structures, even though they may be located only a short distance from each other (Figure 1). Based on this experiment, it can also be concluded that all the samples taken from the used substrates reflect the type of habitat regardless of the season (Figures 5 and 6). By subjecting the substrates to the possibility of

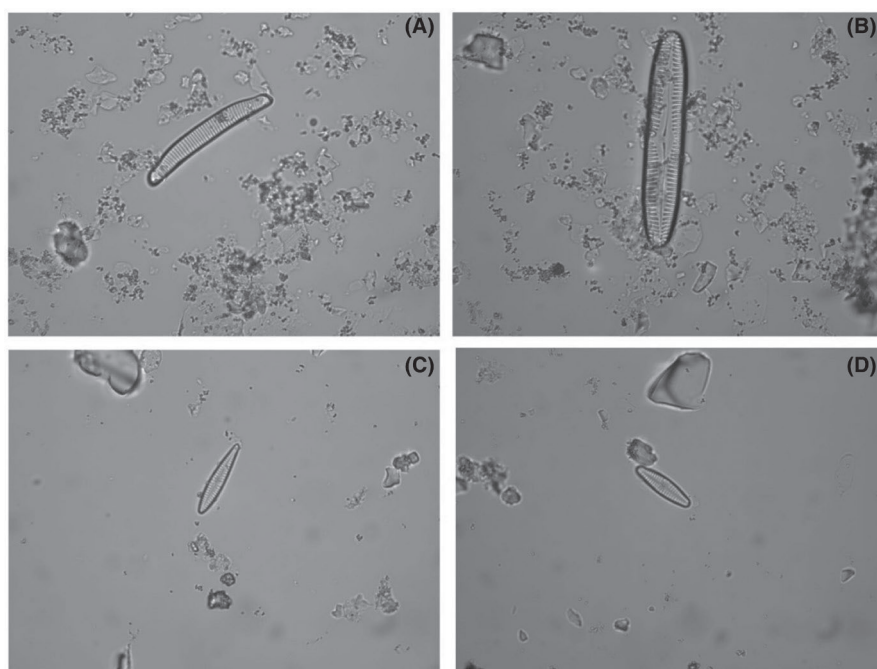


FIGURE 12 Microscope permanent slides with a numerous artifacts: A—cotton socks (*Eunotia minor*), B—bamboo socks (*Pinnularia eifelana*). Microscope slides with a few artifacts: C—bamboo socks (*Gomphonema minusculum*), D—bamboo socks (*Planothidium frequentissimum*)

diatom colonization for 6 weeks, their diatom content fully reflects those of the habitat type (Figures 4 and 6). It has been reported that between 4 and 6 weeks are needed for diatom succession to new natural and artificial substrates (49–51), indicating that the period used herein for colonization of the sponge, chamois leather, and cotton substrates was sufficient.

4.2 | Experiment 2

Diatoms have been used by law enforcement agencies to link suspects with the crime scene (52). Therefore, it is necessary to analyze the possible species variability of diatoms with different environmental conditions, e.g., with an increase in the distance from the tested aquatic ecosystems. Such an analysis may be useful to allow for precise selection of the sampling location at the crime scene. The need for empirical research to support the use of diatoms as environmental traces has been repeatedly indicated in the literature (39,48). Therefore, our environmental research examined the structure of diatom communities obtained from various types of aquatic ecosystems and terrestrial habitats in their vicinity.

It was found that the diatom communities demonstrated significant qualitative and quantitative differentiation between the studied habitats. This knowledge may provide law enforcement agencies with broader possibilities for placing a suspect at the scene of a crime during a forensic investigation. In addition, the use of indirect evidence, such as the clothes worn by the victim, can also enable investigators to determine whether a specific aquatic ecosystem could be the site of drowning. For the three selected aquatic habitats, the qualitative and quantitative variability of diatom communities were evaluated against increasing distance from the aquatic environments. It was found that, in all three transects, the structure

of the diatom communities changed with distance (1 m, 3 m, and 5 m) from the aquatic habitat (Figure 7). The dominant species in the soil samples were *Hantzschia amphioxys*, *H. abundans*, *Pinnularia borealis*, *Luticola ventricosa*, and *L. mutica* (Figure 8). These species are the most characteristic diatoms in periodically humid sites, temporally wetted aerial biotopes, e.g., soil deposits and rock fissures (44,53). The most significant difference in the structure of diatom communities was observed for the drainage ditch transect, especially between the water and soil samples (Figures 7 and 8). This difference is most likely related to the specificity of the drainage ditch, which is deeply cut into the ground (approx. 3 m) with a sharp drop of the bank. In the remaining transects, soil samples were taken from locations that are periodically flooded.

Our findings show that both the aquatic and soil samples from the crime scene, which contain diatoms can be ideal forensic material. That material could be compared with the suspect's clothing, their shoes, but also car tires, and the tools they used, in order to confirm their presence at the crime scene and even that they were the perpetrator. Previous studies have already indicated that soil samples can be helpful in confirming the guilt of a perpetrator (7,54), including those of the diatoms occurring in the soil samples (52). Despite this, no studies have yet been carried out on the diversity of diatom communities between the aquatic habitat and along the transect, from the water border inland, in terms of their use for the purposes of forensics.

4.3 | Experiment 3 and Experiment 4

All studies carried out so far in terms of diatom transfer and their persistence on selected footwear and clothing materials have been conducted in laboratory conditions (37,38,48) and in the

environment (39); however, neither approach considers the diversity of the habitat type. Our study has shown that the material extracted from the socks was associated with the environmental samples, regardless of the material the socks were made of and how long they were in contact with a specific aquatic environment. Diatomaceous material was obtained not by rinsing socks, but by digesting their fragments with chromic acid; this procedure was performed on both unwashed socks and those subsequently subjected to a standard washing procedure.

Socks can yield important evidence, as noted by Ruffel and Sandiford (10), by analyzing their soiling in terms of structure and soil chemistry. Soiled socks also contain diatoms, the analysis of which allows us to determine the crime scene. For this purpose, however, it is necessary to develop the most effective methodology for dealing with the secured evidence material. The analysis of extracted diatoms from socks showed their presence in both cotton and bamboo fabrics. Our findings demonstrate that the diatoms isolated from the socks demonstrated comparable species composition and quantitative ratio to the environmental samples (Figure 10). For law enforcement agencies, the information that it is worth securing socks and other clothing as possible evidence in order to determine the presence of diatoms can be very useful. Investigators can use that evidence at any stage of the forensic investigation process.

A similar experiment was carried out in a natural environment with a simulated passage through a watercourse with an attached sample representing a specific material (39). In our study, in the case of unwashed socks, even in the shortest time interval of exposure to the environment, considerable diatom transfer was observed. Despite this, in four samples of washed socks that were in contact with the environment for 30 seconds, it was not possible to count 500 valves in the microscope slide (Table 2). The reason for this is unclear, as all the trials employed the same method of contact with the environment and washing procedure. Nevertheless, the samples isolated from the socks demonstrated greater than 50% similarity with the environmental samples (Figures 10 and 11).

It should be emphasized that although previous studies on the transfer and persistence of diatoms to various materials have been performed (39,41), these did not examine the possibility of using diatom analysis on washed materials. This can be significant in cases where the perpetrator wants to cover up the traces of the crime. Our findings indicate that diatoms remain in the fabric even after washing they can still be linked to the environmental samples. In our research, a number of identified diatoms were found to belong to widely occurring species. However, these species can be used to describe types of habitats and ecosystems very effectively when analyzed in terms of their quantity in individual samples and their combination with other species with more specific environmental requirements. Although species commonly recorded in various types of inland aquatic ecosystems, such as *Eolimna minima* or *Planothidium frequentissimum*, were recorded in all studied ecosystems (Figures 4 and 8), they demonstrated different shares of the total count. For example, in the case of the swamp transect, apart from cosmopolitan species,

the presence of *Pinnularia marchica*, *Eunotia bilunaris*, *Stauroneis kriegeri*, *Mayamaea petersenii*, or *Sellaphora atomoides* (Figure 8) distinguishes this diatom community from others. Similar observations were made for the soil samples for the drainage ditch transect: the two above mentioned cosmopolitan species were observed with a much smaller share, but in combination with species characteristic only for this habitat, such as *Hantzschia amphioxys*, *H. abundans*, *Luticola ventricosa*, *Pinnularia obscura*, or *P. borealis* (Figure 8).

4.4 | Extraction methods

The literature provides various extraction methods (55), including textile materials, such as various types of clothing materials (39,41,56) and footwear materials (37). In our research, in the case of environmental samples, we used chromic acid to remove the organic matter. However, for sock samples made of natural materials (cotton and bamboo), we tested two extraction methods, one based on 30% hydrogen peroxide and another on 30% chromic acid. No significant differences were observed between the two methods. Additionally, we noticed that in both cases, in some samples, it was difficult to completely remove the artifacts (Figure 11), possibly due to the use of flexible plastics as reinforcement.

5 | CONCLUSION

Our studies describe four independent experiments, including three carried out in situ. These were performed to confirm the validity of quantitative and qualitative diatom analysis when obtaining information on the crime scene in forensic investigations. It included two main components. The first was to analyze the variability of the structure of diatom communities in the context of the diversity of ecosystems and habitats, and to examine the colonization of various types of substrates by diatoms at different times of the year under temperate climate conditions. In addition, to evaluate the possibility of using diatoms in criminal investigations to determine the crime scene, it also analyzed the variability of the structure of diatom communities as the distance from the aquatic ecosystem increased. The findings demonstrate that different types of habitats located in proximity to each other are characterized by separate diatom communities. Importantly, no matter what types of substrate were introduced into the environment (cotton, chamois leather, and sponge), they were all inhabited by the same species occurring in a specific ecosystem. After six-week exposure of the substrates to individual ecosystems, regardless of the season, each diatom communities demonstrated very similar structure to the environment control sample.

The second research component aimed to demonstrate the possibility that diatoms could be transferred to two different sock materials, cotton and bamboo, following different times of exposure to an aquatic environment. In addition, the persistence of diatoms on the socks was studied to confirm whether the diatoms

present on them reflect the environmental samples. Our findings indicate that diatoms not only transfer to sock materials after only brief contact with the aquatic environment but also bond with the structure of the material so permanently that even after the washing process, the recovered diatoms reflect those from the environmental samples. These studies demonstrate the potential of diatoms as sources of information for law enforcement about the potential crime scene. Our research also indicates that socks and other clothing from the suspect or victim may be used as environmental evidence. The fact that diatoms remained on the socks after the entire washing and drying cycle is extremely important: such information can be used to confirm their contact with the environment and link them with the control samples taken from the crime scene.

Due to the diversification of the structure of diatom communities based on geographic and climatic conditions, as well as differences in the use of environmental biology methods in criminal investigation, we strongly recommend further environmental research be carried out in various countries, including Poland, for the use of diatoms in criminal investigation.

ORCID

Iwona Bogusz  <https://orcid.org/0000-0002-4256-7350>

Marek Bogusz  <https://orcid.org/0000-0002-5114-4739>

Joanna Żelazna-Wieczorek  <https://orcid.org/0000-0003-1044-8151>

REFERENCES

1. Bull PA, Morgan RM. Sediment fingerprints: a forensic technique using quartz sand grains. *Sci Justice*. 2006;46(2):107–24. [https://doi.org/10.1016/S1355-0306\(06\)71581-7](https://doi.org/10.1016/S1355-0306(06)71581-7)
2. Konopinski DI, Hudziak S, Bull PA, Morgan RM, Kenyon AJ. Investigation of quartz grain surface textures by atomic force microscopy for forensic analysis. *Forensic Sci Int*. 2012;223(1–2):245–55. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2012.09.011>
3. Horrocks M, Walsh KA. Fine resolution of pollen patterns in limited space: differentiating a crime scene and alibi scene seven meters apart. *J Forensic Sci*. 1999;44(2):417–20. <https://doi.org/10.1520/JFS14477J>
4. Wiltshire PEJ. Consideration of some taphonomic variables of relevance to forensic palynological investigation in the United Kingdom. *Forensic Sci Int*. 2006;163(3):173–82. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2006.07.011>
5. Mildenhall DC. An unusual appearance of a common pollen type indicates the scene of the crime. *Forensic Sci Int*. 2006;163(3):236–40. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2005.11.029>
6. Mildenhall DC, Wiltshire PEJ, Bryant VM. Forensic palynology: why do it and how it works. *Forensic Sci Int*. 2006;163(3):163–72. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2006.07.012>
7. Bull PA, Parker A, Morgan RM. The forensic analysis of soils and sediment taken from the cast of a footprint. *Forensic Sci Int*. 2006;162(1–3):6–12. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2006.06.075>
8. Ruffell A, McKinley J. Forensic geoscience: applications of geology, geomorphology and geophysics to criminal investigations. *Earth Sci Rev*. 2005;69(3–4):235–47. <https://doi.org/10.1016/j.earscirev.2004.08.002>
9. Morgan RM, Bull PA. Data interpretation in forensic sediment and soil geochemistry. *Environ Forensics*. 2005;7:325–34. <https://doi.org/10.1080/15275920600996248>
10. Ruffell A, Sandiford A. Maximising trace soil evidence: an improved recovery method developed during investigation of a \$26 million bank robbery. *Forensic Sci Int*. 2011;209(1–3):e1–7. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2011.03.007>
11. Morgan RM, Little M, Gibson A, Hicks L, Dunkerley S, Bull PA. The preservation of quartz grain surface textures following vehicle fire and their use in forensic enquiry. *Sci Justice*. 2008;48(3):133–40. <https://doi.org/10.1016/j.scijus.2008.04.001>
12. Hawksworth DL, Wiltshire PEJ. Forensic mycology: the use of fungi in criminal investigations. *Forensic Sci Int*. 2011;206(1–3):1–11. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2010.06.012>
13. Wiltshire PEJ. Mycology in palaeoecology and forensic science. *Fungal Biol*. 2016;120(11):1272–90. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2016.07.005>
14. Benecke M. Six forensic entomology cases: description and commentary. *J Forensic Sci*. 1998;43(4):797–805. <https://doi.org/10.1520/JFS14309J>
15. Pai C-Y, Jien M-C, Li L-H, Cheng Y-Y, Yang C-H. Application of forensic entomology to postmortem interval determination of a burned human corpse: a homicide case report from southern Taiwan. *J Formos Med Assoc*. 2007;106(9):792–8. [https://doi.org/10.1016/S0929-6646\(08\)60043-1](https://doi.org/10.1016/S0929-6646(08)60043-1)
16. Cervantès L, Dourel L, Gaudry E, Pasquerault T, Vincent B. Effect of low temperature in the development cycle of *Lucilia sericata* (Meigen) (Diptera, Calliphoridae): implications for the minimum postmortem interval estimation. *Forensic Sci Res*. 2018;3(1):52–9. <https://doi.org/10.1080/20961790.2017.1406839>
17. Matuszewski S, Mađra-Bielewicz A. Post-mortem interval estimation based on insect evidence in a quasi-indoor habitat. *Sci Justice*. 2019;59(1):109–15. <https://doi.org/10.1016/j.scijus.2018.06.004>
18. Matuszewski S. Post-mortem interval estimation based on insect evidence: current challenges. *Insects*. 2021;12(4):314. <https://doi.org/10.3390/insects12040314>
19. Horton PB, Boreham S, Hillier C. The development and application of a diatom based quantitative reconstruction technique in forensic science. *J Forensic Sci*. 2006;51(3):643–50. <https://doi.org/10.1111/j.1556-4029.2006.00120.x>
20. Round FE, Crawford RM, Mann DG. The diatoms biology & morphology of the genera. Cambridge, UK: Cambridge University Press; 1990. p. 4–13.
21. Williams DM, Kociolek JP. An overview of diatom classification with some prospects for the future. In: Seckbach J, Kociolek JP, editors. *The diatom world*. London, UK: Springer; 2011. p. 47–91.
22. Kawecka B, Kwadrans J. Diversity of flora and fauna in running waters of the province of Cracow (southern Poland) in relation to water quality. *Acta Hydrobiol*. 2000;42(3/4):145–73.
23. Hall RI, Smol JP. Diatoms as indicators of lake eutrophication. In: Stoermer EF, Smol JP, editors. *The diatoms: applications for the environmental and earth sciences*. Cambridge, UK: Cambridge University Press; 2001. p. 128–68.
24. Battarbee RW, Charles DF, Dixit SS, Renberg I. Diatoms as indicators of surface water acidity. In: Stoermer EF, Smol JP, editors. *The diatoms: applications for the environmental and earth sciences*. Cambridge, UK: Cambridge University Press; 2001. p. 85–127.
25. Potapowa M. Patterns of diatom distribution in relations to salinity. In: Stoermer EF, Smol JP, editors. *The diatoms: applications for the environmental and earth sciences*. Cambridge, UK: Cambridge University Press; 2001. p. 315–32.
26. Witkowski A, Radziejewska T, Wawrzyniak-Wydrowska B, Lange-Betralot H, Bąk M, Gelbrecht J. Living on the pH edge: diatom assemblages of low-pH lakes in western Pomerania (NW Poland). In: Stoermer EF, Smol JP, editors. *The diatoms: applications for the environmental and earth sciences*. Cambridge, UK: Cambridge University Press; 2001. p. 369–84.

27. Rivera SF, Vasselon V, Jacquet S, Bouchez A, Ariztegui D, Rimet F. Metabarcoding of lake benthic diatoms: from structure assemblages to ecological assessment. *Hydrobiologia*. 2018;807(3):1-15. <https://doi.org/10.1007/s10750-017-3381-2>
28. Thakar MK, Singh R. Diatomological mapping of water bodies for the diagnosis of drowning cases. *J Forensic Leg Med*. 2010;17(1):18-25. <https://doi.org/10.1016/j.jflm.2009.07.016>
29. Weihhoefer LC, Pan Y. Diatom assemblages and their associations with environmental variables in Oregon coast range streams, USA. *Hydrobiologia*. 2006;561:207-19. <https://doi.org/10.1007/s10750-005-1615-1>
30. Peabody AJ. Diatoms in forensic science. *J Forensic Sci Soc*. 1977;17(2-3):81-7. [https://doi.org/10.1016/s0015-7368\(77\)71130-2](https://doi.org/10.1016/s0015-7368(77)71130-2)
31. Pollanen MS. Diatoms and homicide. *Forensic Sci Int*. 1998;91(1):29-34. [https://doi.org/10.1016/S0379-0738\(97\)00162-X](https://doi.org/10.1016/S0379-0738(97)00162-X)
32. Hurlimann J, Feer P, Elber F, Niederberger K, Dirnhofer R, Wyler D. Diatom detection in the diagnosis of death by drowning. *Int J Leg Med*. 2000;114:6-14. <https://doi.org/10.1007/s004149900122>
33. Horton BP. Diatoms and forensic science. The paleontological study papers, Volume 13: pond scum to carbon sink: geological and environmental applications of the diatoms. McLean, VA: The Paleontological Society; 2007. p. 181-90. <https://doi.org/10.1017/S1089332600001534>
34. Kaushik N, Pal KS, Sharma A, Thakur G. Role of diatoms in diagnosis of death due to drowning: case studies. *Int J Med Toxicol Forensic Med*. 2017;7(1):59-65. <https://doi.org/10.22037/ijmtfm.v7i1>
35. Levkov Z, Williams DM, Nikolovska D, Tofilovska S, Cakar Z. The use of diatoms in forensic science: advantages and limitations of the diatom test in cases of drowning. In: Williams M, Hill T, Boomer I, Wilkinson IP, editors. The archaeological and forensic applications of microfossils: a deeper understanding of human history. London, U.K: Geological Society; 2017. p. 261-77. <https://doi.org/10.1144/TMS7.14>
36. Bąk M, Witkowski A, Dobosz S, Kociolok JP, Pietras L. Diatoms and drowning: can diatoms enter the lungs after the initial drowning event? *Rom J Leg Med*. 2018;26(1):29-36. <https://dx.doi.org/https://doi.org/10.4323/rjlm.2018.29>
37. Levin EA, Morgan RM, Jones VJ. The transfer of diatoms from freshwater to footwear materials: an experimental study assessing transfer, persistence, and extraction methods for forensic reconstruction. *Sci Justice*. 2017;57(5):349-60. <https://doi.org/10.1016/j.scijus.2017.05.005>
38. Scott KR, Morgan RM, Jones VJ, Cameron NG. The transferability of diatoms to clothing and the methods appropriate for their collection and analysis in forensic geoscience. *Forensic Sci Int*. 2014;24:127-37. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2014.05.011>
39. Scott KR, Morgan RM, Jones VJ, Cameron NG. Freshwater diatom transfer to clothing: spatial and temporal influences on trace evidence in forensic reconstructions. *Sci Justice*. 2019;59(3):292-305. <https://doi.org/10.1016/j.scijus.2018.11.004>
40. Renberg I. A procedure for preparing large sets of diatom slides from sediment cores. *J Paleolimnol*. 1990;4:87-90. <https://doi.org/10.1007/BF00208301>
41. Magni PA, Mohar M, Vadiveloo A, Moheimani NR. Transferability of Australian diatoms to clothing – assessment of several extraction methods on different fabric types under laboratory conditions. *Forensic Sci Int*. 2020;312:110297. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2020.110297>
42. Tümpling W, Friedrich G, editors. Methoden der biologischen wasseruntersuchung [Methods of biological water analysis]. Jena/Stuttgart/Lübeck/Ulm, Germany: Gustav Fischer Verlag; 1999. p. 133-53.
43. Żelazna-Wieczorek J. Diatom flora in springs of Łódź Hills (Central Poland): biodiversity, taxonomy, and temporal changes of epipsammic diatom assemblages in springs affected by human impact. Ruggell, Liechtenstein: A.R.G. Gantner Verlag KG; 2011. p. 31-7.
44. Lange-Bertalot H, Hofmann G, Werum M, Cantonati M. Freshwater benthic diatoms of Central Europe: over 800 common species used in ecological assessment. Schmitt-Oberreifenberg, Germany: Koeltz Botanical Books; 2017.
45. Patrick RM, Reimer CW. The diatoms of the United States, exclusive of Alaska and Hawaii. Monograph 13. Philadelphia, PA: Academy of Natural Sciences of Philadelphia; 1966.
46. Van de Vijver B, Beyens L, Lange-Bertalot H. The genus *Stauroneis* in the Arctic and (sub) Antarctic regions. *Bibliotheca Diatomologica* 51. Berlin/Stuttgart, Germany: J. Cramer; 2004.
47. Werum M, Lange-Bertalot H. The diatoms in springs from Central Europe and elsewhere under the influence of hydrogeology and anthropogenic impacts. *Iconographia Diatomologica* 13. Ruggell, Liechtenstein: A.R.G. Gantner Verlag KG; 2004.
48. Scott KR, Morgan RM, Jones VJ, Dudley A, Cameron N, Bull PA. The value of an empirical approach for the assessment of diatoms as environmental trace evidence in forensic limnology. *AEFS*. 2017;1:49-78. <https://doi.org/10.1558/aefts.32474>
49. Hoagland KD, Roemer SC, Rosowski JR. Colonization and community structure of two periphyton assemblages, with emphasis on the diatoms (Bacillariophyceae). *Am J Bot*. 1982;69(2):188-213. <https://doi.org/10.1002/j.1537-2197.1982.tb13249.x>
50. Miller AR, Lowe RL, Rotenberry JT. Succession of diatom communities on sand grains. *J Ecol*. 1987;75(3):693-709. <https://doi.org/10.2307/2260200>
51. Hameed HA. The colonization of periphytic diatom species on artificial substrates in the Ashar canal, Basrah. *Iraq Limnologia*. 2003;33(1):54-61. [https://doi.org/10.1016/S0075-9511\(03\)80007-5](https://doi.org/10.1016/S0075-9511(03)80007-5)
52. Siver PA, Lord WD, McCarthy DJ. Forensic limnology: the use of freshwater algal community ecology to link suspects to an aquatic crime scene in southern New England. *J Forensic Sci*. 1994;39(3):847-53. <https://doi.org/10.1520/JFS13663J>
53. Stanek-Tarkowska J, Noga T, Kochman-Kędziora N, Peszek Ł, Pajęczek A, Kozak E. The diversity of diatom assemblages developed on fallow soil in Pogórska Wola near Tarnów (southern Poland). *Acta Agrobot*. 2015;68(1):33-42. <https://doi.org/10.5586/aa.2015.011>
54. Morgan RM, Wiltshire PEJ, Parker A, Bull PA. The role of forensic geoscience in wildlife crime detection. *Forensic Sci Int*. 2006;162(1-3):152-62. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2006.06.045>
55. Di Giancamillo A, Domeneghini C, Gibelli D, Catt C. Diatom extraction with HCl from animal tissues: a technical note. *Leg Med*. 2011;13(5):268-71. <https://doi.org/10.1016/j.legalmed.2011.05.005>
56. Uitend Haag S, Dragutinovic A, Kuiper I. Extraction of diatoms from (cotton) clothing for forensic comparisons. *Forensic Sci Int*. 2010;200(1-3):112-6. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2010.03.039>

How to cite this article: Bogusz I, Bogusz M, Żelazna-Wieczorek J. Diatoms from inland aquatic and soil habitats as indestructible and nonremovable forensic environmental evidence. *J Forensic Sci*. 2022;00:1-15. <https://doi.org/10.1111/1556-4029.15017>

Załącznik 4

**Przestrzenne zróżnicowanie występowania okrzemek w dwóch ekosystemach rzecznych –
mapowanie okrzemek pod kątem kryminalistyki**

Bogusz Iwona, Żelazna-Wieczorek Joanna

Bogusz I., Żelazna-Wieczorek J. Przestrzenne zróżnicowanie występowania okrzemek w dwóch ekosystemach rzecznych – mapowanie okrzemek pod kątem kryminalistyki.
Manuskrypt

Łódź, 15.01 2025 r.

Oświadczenie o współautorstwie

Oświadczam, że mój wkład w przygotowanie manuskryptu był **wiodący** i polegał na: opracowaniu koncepcji pracy, zaplanowaniu i realizacji prac w terenie, identyfikacji taksonomicznej okrzemek, przygotowanie dokumentacji fotograficznej oraz udział w analizie i interpretacji uzyskanych wyników oraz w dyskusji. Pracowałam również nad ostateczną wersją manuskryptu.

Iwona Bogusz

Iwona Bogusz

Łódź, 28.01 2025 r.

Oświadczenie o współautorstwie

Oświadczam, że mój wkład w przygotowanie oryginalnej pracy polegał na: przygotowaniu koncepcji pracy, w opracowaniu wyników z wykorzystaniem metod matematycznych, udziale w analizie i interpretacji uzyskanych wyników, w dyskusji i w przygotowaniu ostatecznej wersji manuskryptu.

dr hab. Joanna Żelazna-Wieczorek prof. UL

Żelazna-Wieczorek

Manuskrypt

Przestrzenne zróżnicowanie występowania okrzemek w dwóch ekosystemach rzecznych – mapowanie okrzemek pod kątem kryminalistyki

Bogusz Iwona, Żelazna-Wieczorek Joanna

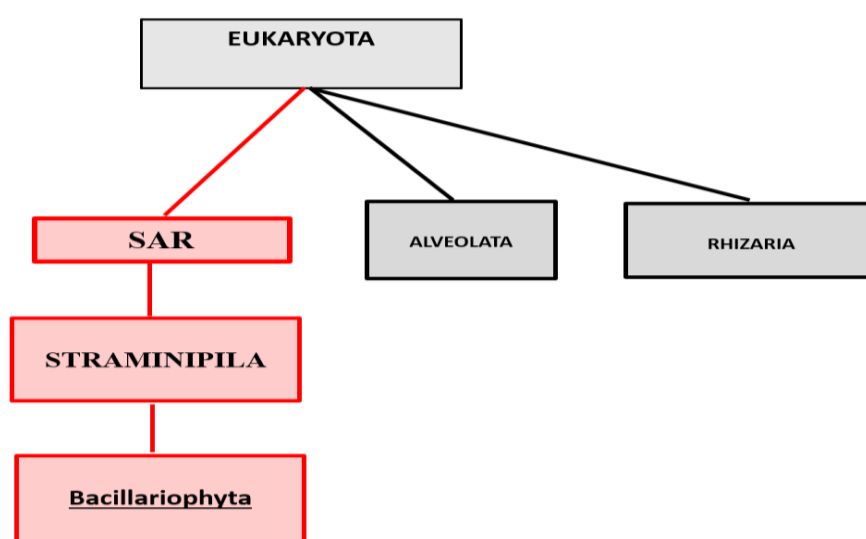
Abstrakt

W Polsce badania diatomologiczne obejmują wiele ekosystemów wodnych, w tym rzeki. Pomimo badań zarówno florystycznych jak i ekologicznych, nie da się przełożyć ich wyników wprost do celów kryminalistycznych w przypadkach takich jak na przykład typowanie miejsca zdarzenia. Ograniczeniem jest zmienność warunków środowiska związana z sezonowością charakterystyczną dla klimatu umiarkowanego, szczególnie w ekosystemach wód płynących. Zmienność ta również wynika z przekształcenia antropogenicznego oraz zachodzących globalnych zmian w środowisku w wyniku ocieplenia klimatu. W związku z powyższym widoczna jest potrzeba badań, które na określonym obszarze, na przykład obejmującym dwa ekosystemy wód płynących, scharakteryzują dynamikę struktury zbiorowisk okrzemek. Istotne jest określenie ich podobieństwa lub odmienności i powiązanie z warunkami abiotycznymi takimi jak: rodzaj podłoża, wpływ człowieka, a także „naturalną” sezonowością. Wody płynące charakteryzują się cechami kształtowanymi przez jednokierunkowy przepływ wody, rodzaj podłoża oraz temperaturę. Przepływ wody oddziałuje na żyjące w rzece organizmy poprzez przynoszenie materii, usuwanie produktów metabolizmu, a także unosi znajdujące się w wodzie organizmy, wpływając tym samym na ich migrację. Kolejny czynnik – podłoże geologiczne, bezpośrednio i pośrednio wpływa na faunę i florę wód płynących, podobnie zresztą jak i temperatura, bo to od niej zależy prędkość wzrostu organizmów oraz długość ich cykli życiowych. Dotychczas prowadzone w Polsce badania rzek charakteryzowały zbiorowiska okrzemek pod kątem ich różnorodności. Jednak do tej pory nie były badane jednocześnie dwie rzeki przez pełne dwa lata. W piśmiennictwie naukowym ukazują się informacje na temat wykorzystania mapowania rzek na potrzeby organów ścigania, szczególnie w aspekcie potwierdzenia, czy miejsce ujawnienia zwłok było miejscem utonięcia lub też przy próbie wytypowania takiego miejsca. Dobrym modelem do takiej analizy są rzeki Bug i Narew, które łącząc się tworzą Zalew Zegrzyński. Praca zawiera wyniki badań, które zostały podjęte w celu przeprowadzenia analizy struktury jakościowej i ilościowej zbiorowisk okrzemek na odcinkach dwóch rzek, Narwi i Bugu, w aspekcie diatomologicznego zmapowania tych rzek.

Istotnym wynikiem badań jest wskazanie zalet oraz wad dostępności danych z mapowania ekosystemów wód płynących pod kątem wykorzystania ich w kryminalistyce.

Wprowadzenie

Okrzemki (Bacillariophyta) należą do SAR – jednej z pięciu głównych grup rodowych Eukaryota. W skład tej grupy wchodzi trzy główne linie ewolucyjne: Straminipila, Alveolata i Rhizaria (*Adl i in. 2019*). Bacillariophyta wyróżniamy jako jedną z dwóch gromad w obrębie Straminipila (Ryc.1). W ramach tej gromady na podstawie analiz molekularnych wyróżniono trzy klasy: Coscinodiscophyceae, Fragillariophyceae i Bacillariophyceae (Round i in. 1990).



Ryc. 2. Uproszczony schemat miejsca okrzemek w systemie klasyfikacji organizmów.

Okrzemki ze względu na kształt komórek z wykształconym egzoszkieletem są zaliczane do organizmów kokoidalnych, które mogą tworzyć kolonie. Komórka ich zawiera jądro komórkowe, mitochondria, chloroplasty, retikulum endoplazmatyczne i diktiosomy (Werner 1977; Flori i in. 2016). Dla okrzemek charakterystyczną cechą odróżniającą je od pozostałych grup glonów jest zbudowany z krzemionki egzoszkielet. Krzemionkowy pancerzyk (theca) okrzemek składa się z dwóch nierównych, nachodzących na siebie części: wieczka (epitheca) i denka (hypotheca). Ścianę boczną okrzemek stanowi najczęściej nieornamentowany pas obwodowy (epicingulum – pas obwodowy wieczka, hypocingulum – pas obwodowy denka). Zarówno wieczko jak i denko pancerzyka posiadają ornamentację, która stanowi podstawę identyfikacji gatunkowej okrzemek. Ornamentacja okrzemek przejawia się w postaci prążków (striae), żeber, wyrostków, punktów, kamer (alweole) a także rzędów otworków (areolae) i kresek (lineolae). Przy identyfikacji bierze się pod uwagę takie cechy morfologiczne jak:

długość i szerokość okrywy, jej kształt, liczbę prążków w polu o długości 10 μm , formę pola środkowego, kształt szczeliny oraz jej zakończenia (Pliński, Witkowski 2009).

Pancerzyk okrzemki powstaje w wyniku wchłaniania krzemionki rozpuszczonej w wodzie, która następnie składowana jest w aparacie Golgiego. W dalszym procesie silikosomy w postaci pęcherzyków uwalniają się z aparatu Golgiego i inkorporują białka frustuliny obecne w błonie komórkowej (Schmid 1988, 1994). Zbudowana z krzemionki skorupka powoduje, że okrywy okrzemek są odporne na fizyczne i chemiczne czynniki niszczące, a tym samym pancerzyki okrzemek są dość dobrze zachowane w osadach i dzięki temu na podstawie badania tej grupy organizmów możliwe jest odtworzenie warunków środowiskowych panujących w ekosystemach w przeszłości (Lobo i in. 2016).

Chloroplasty okrzemek otoczone są czterema błonami i mają tylakoidy zebrane w stopy. W błonach tylakoidów obecne są barwniki – chlorofil a i c. Ponadto obecne są tam karotenoidy oraz fukoksantyna (Pysznik, Gibbs 1992; Kuczyńska i in. 2015). Materiał zapasowy okrzemek stanowią tłuszcze oraz poliglikany (Kates, Volcani 1966; Round i in. 1990). Mitochondria okrzemek mają rurkowate grzebienie mitochondrialne, a ich rozmiary wahają się od 0,5 do 1 nm średnicy (Werner 1977). Plastydy i mitochondria okrzemek posiadają przestrzenne połączenia, dzięki czemu są powiązane metabolicznie poprzez ciągłe przenoszenie energii i redukujące równoważniki między obiema organellami (Flori i in. 2017).

Dynamika zmian struktury jakościowej i ilościowej zbiorowisk okrzemek związana jest z czynnikami, które powodują wzrost lub spadek zagęszczenia populacji poszczególnego gatunku w zbiorowisku. Do tych czynników należą: wzrost liczebności spowodowany podziałami komórek, wyjadanie przez zwierzęta, obumieranie komórek i rozkład bakteryjny oraz straty wywołane przez pasożyty. Wymienione czynniki zmieniają się, co powoduje fluktuacje ilościowe zbiorowisk okrzemek. Ponadto każdy z gatunków wchodzący w skład zbiorowiska okrzemek inaczej reaguje na zmieniające się czynniki środowiskowe.

Zbiorowiska okrzemek, szczególnie w tak zmiennym środowisku, jakim jest woda płynąca, mogą ulegać przebudowaniu pod względem składu gatunkowego i liczebności gatunków. Rozwój danego zbiorowiska zaczyna się od kolonizacji podłoża. Tempo imigracji w wodach płynących zależy w dużej mierze od szybkości prądu wody, ale także od zdolności danego gatunku do zasiedlania różnych podłoży. Przy podłożu chropowatym lub skolonizowanym przez inne organizmy, na przykład bakterie wydzielające śluz, może wzrastać szybkość zasiedlania podłoża (Kawecka, Eloranta 1994).

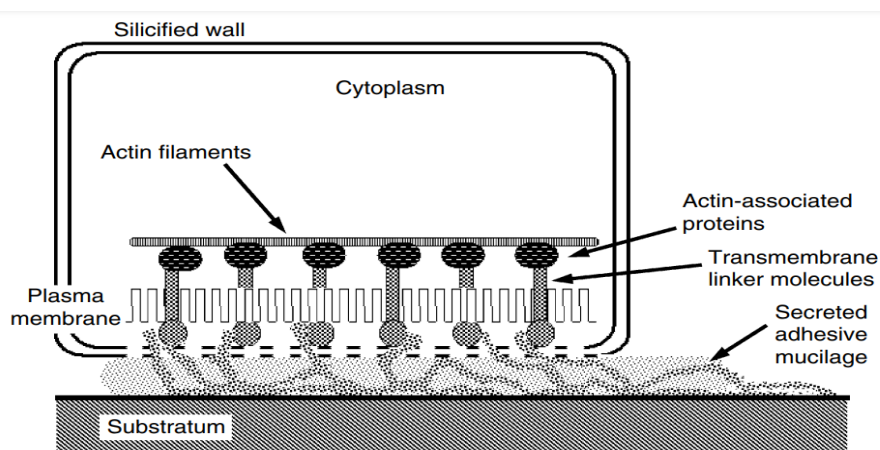
Okrzemki polegają dobowym fluktuacjom liczebności organizmów w zbiorowisku pod wpływem takich zmian jak światło i ciemność, a także zmian natężenia promieniowania

w ciągu dnia. Na skutek tych zmian okrzemki migrują i dotyczy to zarówno form potamoplanktonowych jak i bentosowych. Migracje okrzemek prowadzą do ich skupienia w takich warstwach wody lub podłoża, w których mają najbardziej korzystne warunki świetlne.

Innym aspektem wpływającym na zmianę struktury zbiorowisk okrzemek w strefie klimatu umiarkowanego są zmiany w cyklu rocznym wynikające z sezonowej zmienności natężenia promieniowania słonecznego, co z kolei pociąga za sobą zmianę temperatury wody. W wyniku zmian tych czynników następuje zmiana gęstości wody, jej stratyfikacja oraz stężenie składników pokarmowych. Okrzemki wykazują wzrost ilościowy zarówno wiosną jak i jesienią. Najważniejszymi czynnikami odpowiedzialnymi za ten proces jest temperatura, skład chemiczny wody, a także wahania jej przepływu (Kawecka, Eloranta 1994). Podstawowym czynnikiem umożliwiającym zasiedlanie danego mikrosiedliska jest sposób, w jaki okrzemki się rozmnażają. Rozmnażanie okrzemek składa się z dwóch faz: wegetatywnej oraz płciowej. Podczas podziału wegetatywnego pancerzyk okrzemki ulega rozdzieleniu. Po podziale dwie komórki potomne zachowują jedną „matczyną” skorupkę, która jest większa i do niej dobudowywana jest nowa, mniejsza (Round i in. 1990). Oznacza to, że obie komórki potomne różnią się wielkością i w miarę postępu podziałów komórkowych komórki okrzemek stają się coraz mniejsze. Rozmnażanie płciowe pełni ważną funkcję w cyklach życiowych okrzemek. W wyniku mejozy powstają gamety, a następnie w wyniku koniugacji gamet powstaje diploidalna zygota, która nie jest otoczona krzemionkowym pancerzykiem. Dzięki temu może się ona rozszerzać, tworząc auksosporę, z której powstaje komórka o maksymalnych, specyficznych dla danego gatunku wymiarach.

Okrzemki zajmują różne siedliska. Jednym z nich jest toń wodna, a żyjące w nim zbiorowisko organizmów roślinnych nazywane jest fitoplanktonem. Potamoplanktonem określane są organizmy roślinne zasiedlające toń wodną rzek. Okrzemki, które żyją stale w fitopotamoplanktonie stanowią jego potamoplankton właściwy, czyli eupotamoplankton. Część okrzemek to meropotamoplankton, ponieważ będąc formami osiadłymi tylko w pewnych stadiach swego życia pojawiają się w nim. Tychopotamoplankton (pseudopotamoplankton) stanowią okrzemki, które pojawiają się w nim przypadkowo na skutek oderwania się od podłoża w wyniku działania prądów lub falowania w strefie litoralnej (Kawecka, Eloranta 1994). komórki podczas jej opadania (Round i in. 1990). Okrzemki bentosowe mają zdolność adhezji do podłoża. Po przeniesieniu przez prąd opadają one na dno i przylegają do substratu. Po wstępnej adhezji, dzięki warstwie śluzu powierzchniowego, okrzemki te mogą przyjąć jedną z dwóch strategii stylu życia: przylec do podłoża i pozostać na nim przez dłuższy czas lub wykorzystać przyleganie dla przemieszczania się. Adhezja komórka/podłoże odbywa się za

pośrednictwem wydzielania zewnątrzkomórkowych substancji polimerowych (EPS) (Edgar, Pickett-Heaps 1983; Edgar, Pickett-Heaps 1984). Produkcja śluzu i zdolność adhezyjna pozwala okrzemkom zasiedlać różne typy podłoża oraz przemieszczać się na nich (Holland i in. 2004). U bentosowych okrzemek pierzastych adhezyjny śluz jest wydzielany przez pory w okrywach oraz przez szczelinę (Stanley, Callow 2007). Okrzemki pierzaste opadają na podłoże i stykają się z nią powierzchnią pasa i dlatego też w początkowym przyleganiu do substratu pośredniczy śluz powierzchniowy komórki. Jednak jest on stosunkowo słaby, a okrzemka może być łatwo przemieszczona. Po początkowej adhezji komórka może delikatnie poruszać się lub pozostawać na krótki czas nieruchoma zanim obróci się na stronę okrywy doprowadzając szczelinę do kontaktu z podłożem. Następnie komórki poruszają się ruchem ślizgowym po podłożu równolegle do osi podłużnej skorupki, po którym na podłożu pozostaje ślad śluzu (Molino i in 2016). Ze szczeliny wysuwane są śluzowe nici (zewnątrzkomórkowe substancje polimerowe – EPS), które przylegają do podłoża powodując ruch ślizgowy okrzemki. Odbywa się to dzięki połączeniu ich z transbłonowymi wiązkami aktynowymi, znajdującymi się pod błoną plazmatyczną w szczelinie (Ryc. 2) (Wetherbee i in. 1998). W tym modelu przemieszczanie się jest wynikiem działania sił, które nakładają się na transbłonowe wiązki aktynowe, powodując ich ruch, czego następstwem jest ruch komórki w kierunku przeciwnym do działania siły (Edgar, Pickett-Heaps 1983; Aumeier, Menzel 2012).



Ryc. 3. Schemat przedstawiający kompleks adhezyjny okrzemki szczelinowych wraz z sugerowanym modelem przemieszczania się za Wetherbee i in. (1998).

Okrzemki bentosowe dzielą się na te, które żyją przytwierdzone do substratu: na kamieniach (epility), przytwierdzone do roślin (epifity) lub te, które nie są przytwierdzone do podłoża, a występują na lub w osadzie dennym (Round i in. 1990). Mogą one przyczepiać się do podłoża za pomocą szczeliny (*Amphora*) lub przy pomocy śluzu (*Gomphonema*) albo

poprzez wytworzenie polisacharydowych stylików (*Cymbella*). Okrzemki mogą porastać betonowe elementy umocnień brzegów lub mostów (peryfiton) lub też być związane z dnem – kamienie (epiliton).

Wrażliwość okrzemek na zmianę warunków środowiskowych takich jak: odczyn wody, zasolenie, przewodnictwo oraz trofia (Silva i in. 2022) powoduje, że mogą one być wykorzystywane jako wskaźnik warunków i stanu środowiska (Lai i in. 2016). Dzięki okrzemkom możliwa jest ocena nie tylko zmian klimatycznych, ale też ocena zanieczyszczenia wód materią organiczną oraz eutrofizacji wód (Rakowska 2001). Okrzemki jako bioindykatory środowiska wodnego były przedmiotem wielu prac badawczych (Stoermer, Smol 2001; Eloranta, Soininen 2002; Rakowska 2003; Cantonati i in. 2007; Potapova, Charles 2007; Vanormelingen i in. 2008; Żelazna-Wieczorek 2011; Blanco i in. 2012; Kelly i in. 2012; Szczepocka i in. 2014, 2016; Żelazna-Wieczorek i in. 2015; Żelazna-Wieczorek, Nowicka-Krawczyk 2015; Poikane i in. 2016; Szczepocka, Żelazna-Wieczorek 2018; Olszyński i in. 2019; Robinson i in. 2022).

Celem pracy jest rozpoznanie różnorodności gatunkowej i ekologicznej okrzemek obecnych na wybranych stanowiskach dwóch rzek Narwi i Bugu. Sformułowano następujące hipotezy badawcze, których zasadność poddano ocenie na podstawie podjętych badań:

HO – zróżnicowanie zbiorowisk okrzemek w ekosystemach wód płynących jest dobrym „narzędziem” kryminalistycznym do potwierdzania lub wykluczenia miejsca zdarzenia.

H1 - Zbiorowiska okrzemek w dwóch rzekach położonych na polskim niżu są zróżnicowane pod względem jakościowym i ilościowym.

H2 - Zbiorowiska okrzemek na różnych odcinkach biegu rzeki są zróżnicowane pod względem jakościowym i ilościowym.

H 3 – Zbiorowiska okrzemek są zróżnicowane pod względem jakościowym i ilościowym na różnych mikrosiedliskach w badanych miejscach rzeki.

W celu potwierdzenia lub obalenia postawionych hipotez podjęte badania obejmą:

- ✓ Zidentyfikowanie różnorodności jakościowej i ilościowej zbiorowisk okrzemek rzeki Narew i rzeki Bug na wyznaczonych stanowiskach.
- ✓ Przeanalizowanie warunków środowiskowych w odniesieniu do danych meteorologicznych IMGW i danych temperatury oraz przewodnictwa mierzonych *in situ*, a na tej podstawie możliwość określenia potencjalnej sezonowości występowania okrzemek.
- ✓ Określenie mikrosiedlisk w obu rzekach jako czynnika wpływającego na zróżnicowanie zespołów okrzemek.

Teren badań

Rzeka Narew w aspekcie hydrologicznym była badana w górnym jej biegu (Skorbiłowicz, Skorbiłowicz 2008; Mioduszeński i in. 2011; Zieliński, Suchowolec 2013; Piniewski i in. 2014; Szporak-Wasilewska i in. 2015; Marcinkowski i in. 2019) oraz przeprowadzono badania przed ponad dwudziestoma laty, które uwzględniały faunę i florę na wybranych odcinkach Narwi (Szewczyk i in. 2003). Jak do tej pory nie opublikowano wyników badań związanych z dynamiką zbiorowisk okrzemek w Narwi. Okrzemki wykorzystano do oceny stanu ekologicznego w odcinku górnej Narwi w monografii dotyczącej Zbiornika Siemianówka (Górniak 2006). Rzeka Bug dotychczas także analizowana była pod kątem hydrologicznym (Michalczyk, Sobolewski 2002), ekologicznym oraz występującej tam fauny i flory (Dombrowski i in. 2002; Stryjecki 2009). Rzeka ta była także badana pod kątem procesów rzeźbotwórczych na terenie Janowa Podlaskiego (Kusznierzuk 2008). Badania diatomologiczne na rzece Bug prowadzone były jedynie na Ukrainie i obejmowały okrzemki centryczne (Bilous i in. 2021). Ponadto były tam także przeprowadzone badania stanu ekologicznego rzeki na podstawie fitoplanktonu (Belous i in. 2013; Belous i in. 2016; Bilous i in. 2013; Bilous i in. 2023).

Wybrane do badań odcinki rzek Bugu i Narwi położone są na Niżu Środkowoeuropejskim, w zasięgu Niziny Środkowopolskiej i makroregionów: Niziny Północnomazowieckiej (318.6) oraz Niziny Środkowomazowieckiej (318.7). Stanowiska wyznaczone do badań na rzece Narew znajdują się w mezoregionie Dolina Dolnej Narwi (318.66) oraz mezoregionie Kotlina Warszawska (318.73), natomiast stanowiska znajdujące się na rzece Bug znajdują się w mezoregionie Dolina Dolnego Bugu (318.74) (Kondracki 1998).

Charakterystyka geograficzna, hydrologiczna i klimatyczna badanych rzek

Rzeka Bug. Bug jest lewobrzeżnym dopływem Narwi o długości 772 km. Źródła Bugu znajdują się na północy Podola, na wysokości 311 m n.p.m. Bug kończy swój bieg w ujściu do Narwi w Zalewie Zegrzyńskim, który powstał po spiętrzeniu wód na tamie w Dębie. Średnia wysokość dorzecza Bugu wynosi 183 m n.p.m., ale większa część jego powierzchni mieści się w przedziale wysokości 100–200 m n.p.m. (Mikulski 1963).

Dorzecze Bugu ma charakterystyczny kształt dwóch różnych części połączonych zwężeniem, które przebiega pomiędzy Horodłem a Włodawą. W części górnej i dolnej szerokość dorzecza Bugu wynosi od 70 do 120 km, natomiast w przewężeniu jego szerokość wynosi 30 do 40 km (Dombrowski i in. 2002).

Dorzecze Bugu podlega wpływom dwóch mas powietrza: polarnomorskiego i polarnokontynentalnego – latem przeważają masy powietrza polarnomorskiego i powodują wzrost wilgotności względnej powietrza, zachmurzenie i opady. Natomiast masy powietrza polarnokontynentalnego oddziałują przeważnie w chłodniejszej części roku. Ze względu na przewagę mas powietrza polarnomorskiego na terenach dorzecza występują głównie wiatry zachodnie (Michalczyk, Sobolewski 2002).

Bug jako jedna z nielicznych europejskich rzek zachował naturalnie meandrujące koryto niemal w całym swym biegu. Głównym czynnikiem, który różnicuje siedliska w obrębie rzeki są zachodzące procesy rzeczne. Profil koryta jak i tarasów ulega częstym zmianom, co jest przejawem erozyjno-akumulacyjnej działalności rzeki (Dombrowski i in 2002). Pomimo tego, że Bug jest rzeką przekształconą hydromorfologicznie w niewielkim stopniu, to charakteryzuje się on dość niską jakością wody. Na podstawie informacji Głównego Inspektoratu Ochrony Środowiska klasa czystości wody w Bugu w latach 2016 – 2021 na wybranych odcinkach jest od III do V. Ponadto stan ekologiczny określany jest jako słaby, a nawet zły, w tym na stanowisku wyznaczonym do badań – Barcice (Tab. 1).

Tabela 1. Ocena jakości wody i stanu ekologicznego wybranych punktów monitoringowych na rzece Narew i Bug w latach 2016 – 2021 (wg. GIOŚ)

Nazwa punktu pomiarowo-kontrolnego	Nazwa jednolitych części wód powierzchniowych	Fitoplankton	Makrobezkręgowce bentosowe	Ichtiofauna	Klasyfikacja stanu/potencjału ekologicznego	
		klasa	klasa	klasa	klasa	Stan/potencjał ekologiczny
Bug - Kózki	Bug od granicy w Niemirowie do Kamianki	4	4	4	4	słaby stan ekologiczny
Bug - Głina Nadbużna	Bug od Kołodziejki do Broku	4	4	3	4	słaby stan ekologiczny
Bug - Kryłów	Bug od granicy państwa do Huczwy	3	3	4	4	słaby stan ekologiczny
Bug - Wyszaków	Bug od Broku do dopł. z Sitna	4	4	3	4	słaby stan ekologiczny
Bug - Barcice	Bug od dopł. z Sitna do ujścia	4	5	3	5	zły stan ekologiczny
Narew - profil graniczny Babia Góra	Narew od granicy państwa do zbiornika Siemianówka	2	3	4	4	słaby potencjał ekologiczny
Narew - Ostrołęka	Narew od Pisy do Omulwi	3	3	3	3	umiarkowany stan ekologiczny
Narew - Pułtusk	Narew od Rózu do zbiornika Dębe	3	3	4	4	słaby stan ekologiczny
Dębe - zapora	Zalew Zegrzyński	4	2	-	4	słaby potencjał ekologiczny

Charakterystyka stanowisk badawczych na rzece Bug

Dolina Dolnego Bugu (318.74) jest sześćścieciokilometrowym odcinkiem doliny Bugu pomiędzy Małkinią a Zalewem Zegrzyńskim. Dolina Dolnego Bugu zmienia się w zasadniczy sposób między Brokiem a Kamieńczykiem. Szerokie wcześniej dno doliny wynoszące od 6 do 8 km w okolicach Broku pod Kamieńczykiem zwęża się do 1 – 1,2 km. Przed zwężonym odcinkiem koryto rzeki jest kręte, a meandry stłoczone. Można zaobserwować występowanie starorzeczy, które powstały na skutek awulsji oraz odcinania pętli meandrów. Pierwsze stanowisko na Bugu zostało wyznaczone na odcinku przełomowym w miejscowości Kamieńczyk – 52.605225N, 21.548704E na lewym brzegu rzeki za ujściem lewobrzeżnego dopływu rzeki Liwiec (Ryc. 3). Koryto rzeki w tym miejscu jest dość wąskie, a tarasy nadzalewowe strome i wysokie.



Ryc. 3. Lewy brzeg Bugu w miejscowości Kamieńczyk (lipiec 2018).

Drugie stanowisko wyznaczono przy sztucznym kąpielisku w Wyszkanie – 52.592660N, 21.469974E, na lewym brzegu rzeki w pobliżu mostu (Ryc. 4). Terasa zalewowa jest dość rozległa i stopniowo przechodzi w terasę nadzalewową.



Ryc. 4. Lewy brzeg Bugu w miejscowości Wyszów (lipiec 2018).

Od Wyszkowa po ujście do Narwi dolina Bugu rozciąga się na szerokość od 10 do 15 km. Trzecie stanowisko na rzece Bug wyznaczono w miejscowości Barcice – 52.534984N, 21.264461E (Ryc. 5).



Ryc. 5. Stanowisko na prawym brzegu rzeki Bug w miejscowości Barcice (lipiec 2018).

Terasa zalewowa jest dość szeroka, przechodząc w nieznacznie podwyższoną terasę nadzalewową tuż przy linii lasu (Ryc. 6). W tym miejscu w dolinie Bugu w okresie od późnej wiosny do początku zimy wypasane jest bydło. Zgodnie z danymi GIOŚ na tym odcinku rzeka Bug klasyfikowana jest do V klasy czystości / zły stan ekologiczny (Tab. 1).



Ryc. 6. Barcice - rozległa terasa zalewowa w dolinie Bugu (marzec 2019).

Szerokie dno doliny ma widoczne ślady zmian korytowych, ze starorzeczami meandrów oraz dłuższymi odcinkami porzuconych koryt. Zmiany te powstały w sposób naturalny. Odcinek ujściowy Bugu do Narwi jest uregulowany sztucznie i stanowi początek Zalewu Zegrzyńskiego, które powstało w 1963 roku w wyniku przegrodzenia Narwi.

Czwarte stanowisko wyznaczone zostało przy ujściu Bugu do Zalewu Zegrzyńskiego we wsi Cupel - 52.513284N, 21.086094E (Ryc. 7). W linii terasy zalewowej znajduje się wał przeciwpowodziowy.



Ryc. 7. Stanowisko Cupel - miejsce ujścia Bugu do Zalewu Zegrzyńskiego (lipiec 2018, marzec 2019).

Rzeka Narew. Rzeka Narew jest prawym dopływem Wisły o długości 484 km. Do 1962 roku rzekę tę uważano za prawostronny dopływ Bugu. Źródła Narwi znajdują się na Białorusi. Na terenie Polski Narew rozlewa się tworząc Jezioro Siemianowskie. Od tamy w Bondarach aż do Zalewu Zegrzyńskiego płynie jako rzeka nizinna tworząc rozległe bagna i torfowiska. Rzeka Narew zaliczana jest do rzek anastomozujących i jest jedyną taką rzeką w Europie. Na odcinku od Suraza do Rzędzian rzeka Narew podlega ochronie, wchodząc w obszar Nadnarwiańskiego Parku Narodowego. Rzeka płynie przez obszar o klimacie umiarkowanym i sumą opadów około 600 mm rocznie, co daje średni przepływ $15 \text{ m}^3/\text{s}$ (Marcinkowski i in. 2019). Dolina Narwi wypełniona jest osadami organicznymi, torfami i mułem, miejscami pokryta cienką warstwą namulów lub namulów gliniastych, bogata w węgiel organiczny. Torfowiska w dolinie Narwi są typu fluwiogenicznego (Banaszuk, Kamocki 2008).

Badania hydrologiczne prowadzone w latach 1971 - 2010 wykazały, że rzeka Narew podobnie jak i rzeka Bug, są rzekami niwalnymi silnie wykształconymi (Wrzesiński 2018). Średni przepływ miesiąca wiosennego przekraczał 180% średniego przepływu rocznego. Rzekę Narew zaliczono do rzek niwalnych silnie wykształconych z odmiennym przebiegiem występowania wezbrań (Stanisławczyk 2020). Sezony świadczące o znacznym wzroście przepływu pojawiają się relatywnie późno, a czas ich trwania jest znacznie krótszy niż w pozostałych ciekach reprezentujących typ reżimu niwalnego. W rzece tej na początku roku hydrologicznego pojawia się faza przeciętnych przepływów, po której rozpoczynają się sezony przepływów wysokich związane z wiosennymi wezbrzeniami roztopowymi. Po zakończeniu tej fazy od maja następuje sekwencja sezonów o przeciętnych i niskich przepływach.

Na podstawie informacji Głównego Inspektoratu Ochrony Środowiska wody rzeki Narew sklasyfikowano w latach 2016 do 2021, na wybranych odcinkach od II do IV klasy jakości wody. Ponadto stan ekologiczny określany jest jako słaby, w nielicznych odcinkach jako umiarkowany (Tab. 1).

Charakterystyka stanowisk badawczych na rzece Narew

Wybrane stanowiska obejmujące odcinki rzeki Narew wcześniej nie były badane pod kątem diatomologicznym. Stanowiska te znajdują się w dolnej części biegu rzeki Narwi w mezoregionach Dolina Dolnej Narwi (318.66) oraz Kotlina Warszawska (318.73).

Pierwsze stanowisko zostało wyznaczone w miejscowości Dzierżenin – 2.566313N, 21.090701E (Ryc. 8), położonej pomiędzy Pułtuskim a Serockiem. Próbkę pobierano na prawym brzegu rzeki Narew. W tym miejscu dolina rzeki jest szeroka (około 3 km) i poroździelana porośniętymi roślinnością płatami terasy nadzalewowej.



Ryc. 8. Stanowisko Dzierżenin – prawy brzeg Narwi (lipiec 2018).

Drugie stanowisko zostało wytypowane na prawym brzegu rzeki Narew we wsi Łacha - 52.534812N, 21.075976E, w okolicy mostu drogowego. Za tym stanowiskiem rzeka wpada do zaporowego Jeziora Zegrzyńskiego. Miejsce poboru prób stanowi brzeg porośnięty trzciną pospolitą (*Phragmites australis* (Cav.) Trin. ex Steud), co ogranicza prędkość przepływu wody (Ryc. 9). W środkowej części koryta rzeki widoczne są łachy piasku wystające ponad powierzchnię wody. Stanowisko to znajduje się w zasięgu cofki zbiornika zaporowego.



Ryc. 9. Stanowisko Łacha – prawy brzeg Narwi (lipiec 2018).

Ostatnie stanowisko wyznaczono na prawym brzegu przy zaporze wodnej w Dębie – 52.491131N, 20.927478E, z powodu spiętrzenia wody zniwelowany jest tu przepływ rzeki Narew. Ze względu na rodzaj podłoża w tym miejscu nie pobierano próbek bentosowych z mułu dennego, natomiast zeszkrobano biofilm z powierzchni płyt betonowych (Ryc. 10).



Ryc. 10. Stanowisko Dębe – prawy brzeg Narwi, przed zaporą (lipiec 2018).

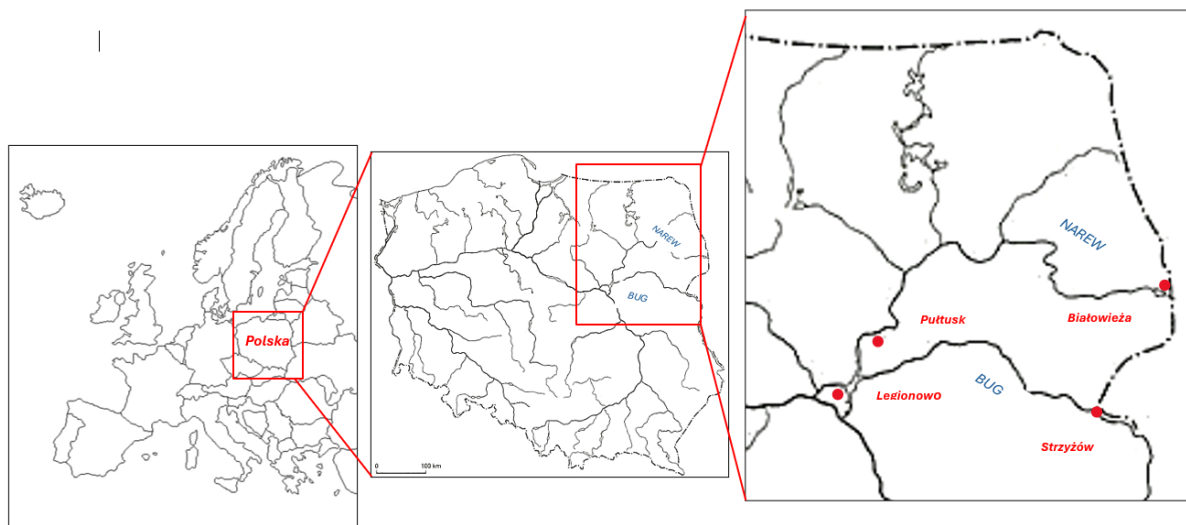
Tło meteorologiczne – dane wieloletnie

Średnia roczna temperatura powietrza w północno-wschodniej Polsce na podstawie pomiarów z siedemdziesięciu ostatnich lat uległa podwyższeniu (Tab. 2).

Tabela 2. Średnia roczna temperatura powietrza na obszarze północno-wschodniej Polski od 1951 do 2020 roku (za Raport IMGW).

DEKADA	Średnia temperatura (°C)	Średnia temperatura (°C)
STACJA	Warszawa	Włodawa
1951–1960	7,79	7,49
1961–1970	7,52	7,15
1971–1980	7,73	7,11
1981–1990	8,14	7,48
1991–2000	8,30	7,80
2001–2010	8,80	8,18
2011–2020	9,85	9,35

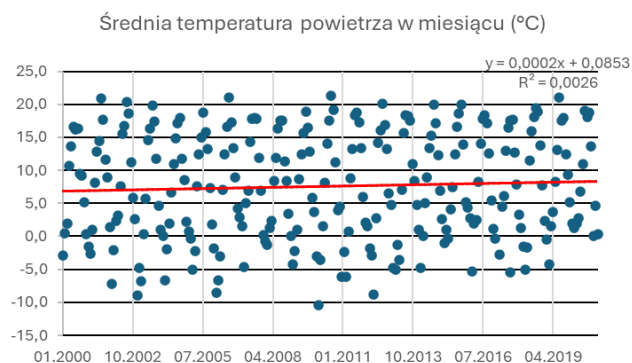
W celu sprawdzenia, czy zachodzą zmiany temperatury powietrza oraz opadów atmosferycznych na obszarze dolin rzek Narwi i Bugu, wykonano analizę na podstawie danych z IMGW za okres od 2001 do 2020 roku. Do analizy tej wytypowano cztery stacje badawcze (Ryc. 11). Dwie stacje na granicy wschodniej Polski, gdzie rzeki wpływają do Polski: stacja w Strzyżowie i stacja w Białowieży. Dwie kolejne stacje pomiarowe, w Pułtusku i w Legionowie, wytypowano ze względu na najbliższą lokalizację do wyznaczonych stanowisk badawczych.



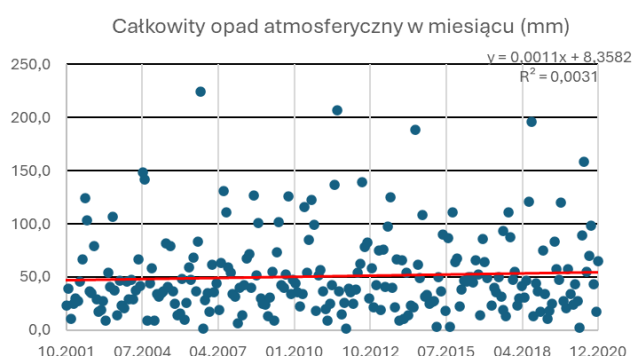
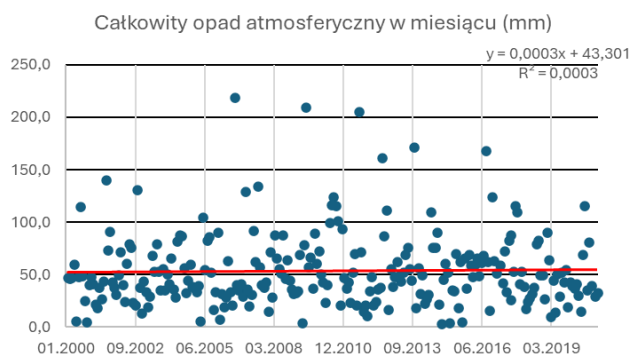
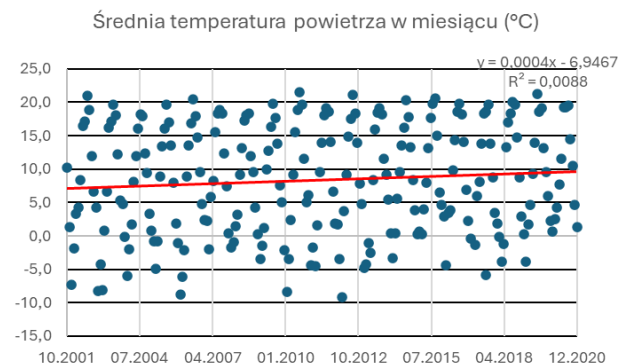
Ryc. 11. Lokalizacja wybranych stacji IMGW z odniesieniem do rzeki Narew i Bug.

Analiza danych z ostatnich dwudziestu lat wykazała tendencję wzrostu temperatury powietrza (Ryc. 12), co potwierdzają też dane ze stacji metrologicznych w Warszawie i Włodawie (Tab. 3). Podobna tendencja zaznacza się dla całkowitego opadu atmosferycznego w miesiącu, jednak nie oddaje ona zmian związanych z okresami suszy i występowaniem krótkotrwałych opadów nawałnych.

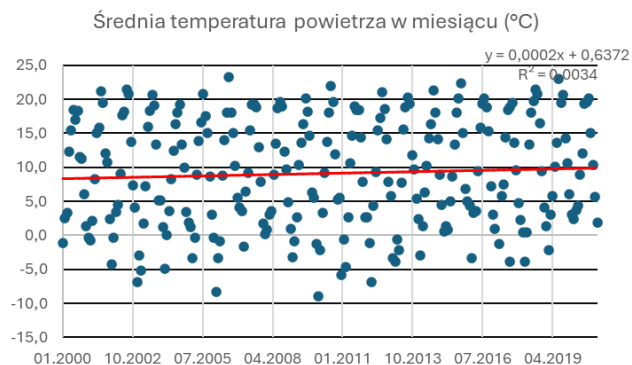
Białowieża



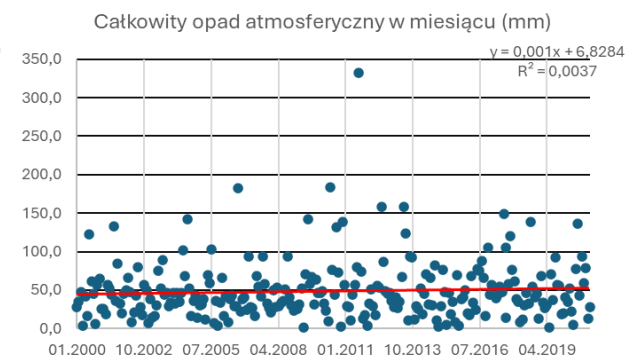
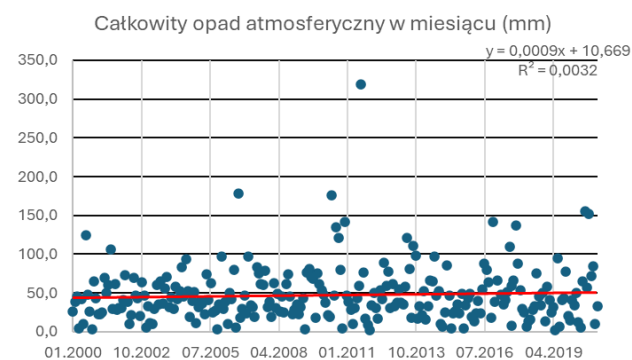
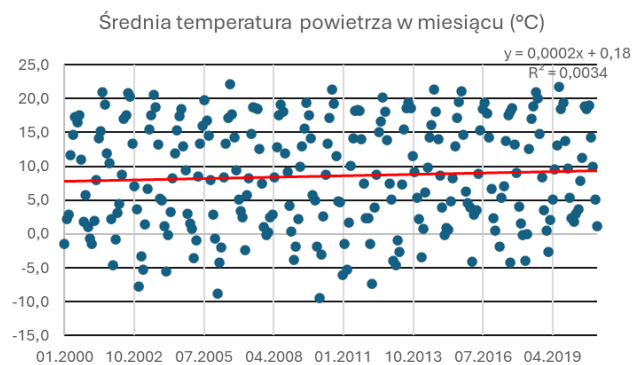
Strzyżów



Legionowo



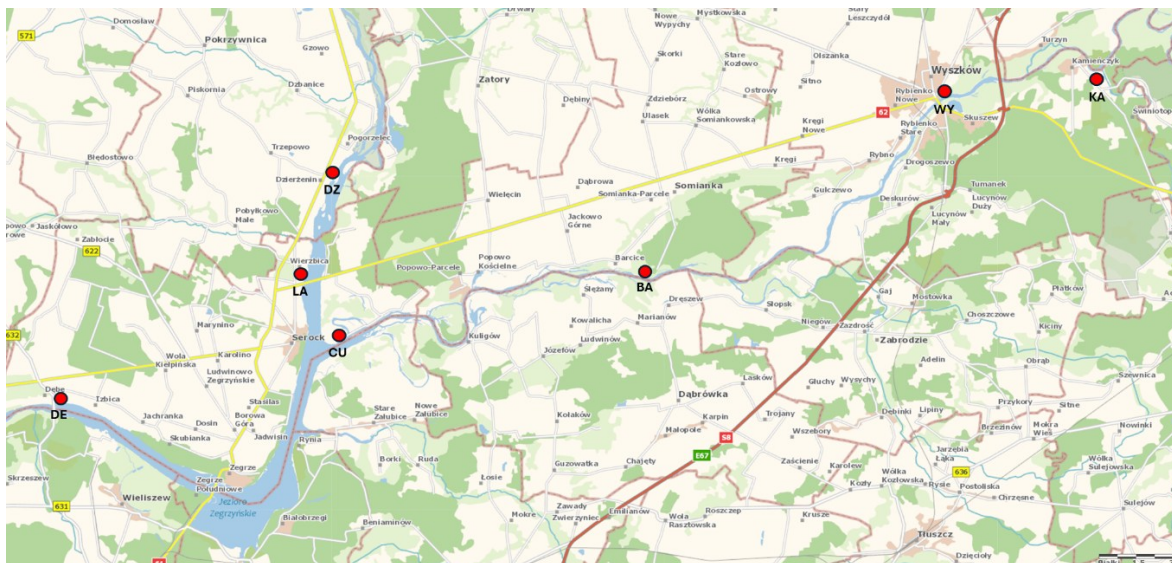
Pułtusk



Ryc. 12. Średnia temperatura oraz opadów atmosferycznych w okresie od 2001 do 2020 w stacjach Białowieża, Strzyżów, Legionowo i Pułtusk (na podstawie danych IMGW).

Material i metody

Material badawczy. Podstawę badań stanowi materiał badawczy zebrany w latach 2018 - 2020 z siedmiu stanowisk. Na rzece Narew wyznaczono trzy stanowiska: Dzierżenin (DZ), Łacha (LA) i Dębe (DE), natomiast na rzece Bug – cztery stanowiska: Kamieńczyk (KA), Wyszaków (WY), Barcice (BA) i Cupel (CU). Wyznaczone stanowiska obejmują powierzchnię około 700 km² (Ryc. 13).



Ryc. 13. Rozmieszczenie stanowisk badawczych na rzece Bug i rzece Narew (geoportal.pl – zmienione).

Próby pobierano przez dwa sezony w kolejnych porach roku (wiosna, lato, jesień, zima). Z każdego z wytypowanych stanowisk pobrano próby z różnych mikrosiedlisk. W zależności od stanowiska były to: potamoplankton, bentos w postaci: peryfitonu, epifitonu, epipsammonu lub epipelonu (Tab. 3).

Tabela 3. Wykaz stanowisk badawczych ze wskazaniem rodzajów zebranych prób.

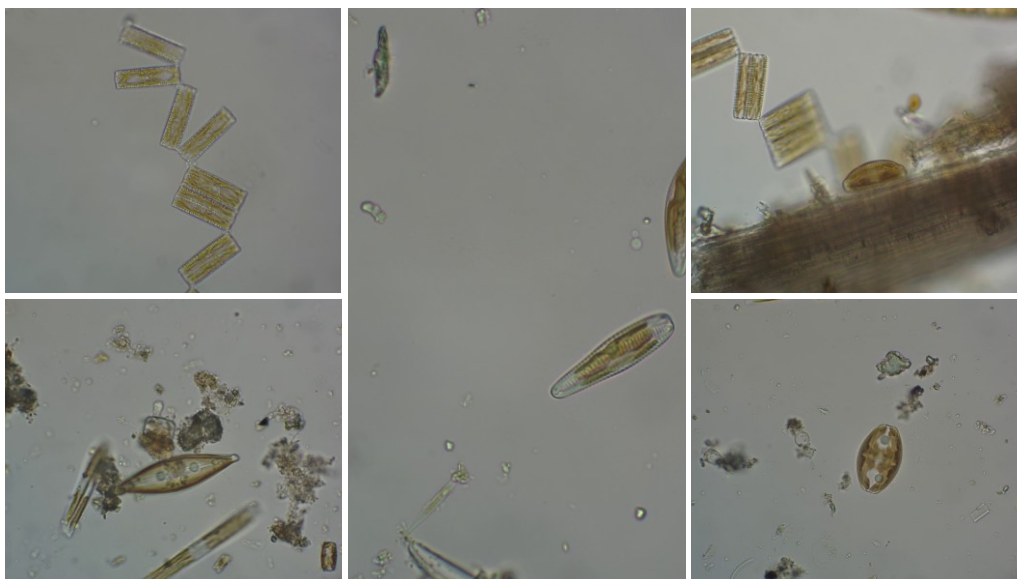
Rzeka / stanowisko	Potamoplankton	Epifiton	Epipsammon	Peryfiton	Epipelon
Narew - Dzierżenin	+	+	-	-	+
Narew - Łacha	+	+	-	-	+
Bug/Narew - Dębe	+	+	-	+	-
Bug - Kamieńczyk	+	+	-	-	+
Bug - Wyszaków	+	+	-	-	+
Bug - Barcice	+	+	-	-	+
Bug - Cupel	+	+	+	-	-

Próby opisano przy użyciu następującego sposobu kodowania: AA BB MMR PR, gdzie: AA – skrót pochodzący od nazwy rzeki, złożony z dwóch liter (BU – Bug, NA – Narew), skrót BB to nazwa stanowiska także złożona z dwóch liter (BA – Barcice, WY – Wyszaków, KA – Kamieńczyk, CU - Cupel, DE – Dębe, DZ - Dzierżenin, LA - Łacha), skrót MMR skrót złożony z dwóch liter oraz cyfry oznacza miesiąc oraz rok (JA- styczeń, FE - Luty, MA - marzec, AP - kwiecień, MY - maj, JE - czerwiec, JY - lipiec, AU - sierpień, SE - wrzesień, OC - październik, NO - listopad, DE - grudzień) oraz skrót PR złożony z dwóch liter oznaczający mikrosiedlisko (PL – potamoplankton, EF – epifiton, EP – epipelon, ES – epipsammon, PE – peryfiton).

Prace terenowe. Próby potamoplanktonu pobierane były przy użyciu siatki planktonowej, przez którą przelewano 30 litrów wody. Po każdym poborze próby siatkę przepłukiwano. Próbę zagęszczano do objętości 100 ml i przelewano do pojemnika. Natomiast próby fitobentosowe w postaci epipelonu i epipsammonu pobierane były do pojemnika o pojemności 100 ml przy użyciu szklanej pipety zakończonej gumową gruszką. Próby pobierano zgodnie z zaleceniami dla podłoża mulistych i piasku (Taylor i in. 2007; Cantonati i in. 2007; Richards i in. 2020). Próby epifitonowe pobierano z helofitów i z hydrofitów, postępując zgodnie z zaleceniami (Taylor i in. 2007; Karthick i in. 2010; Zgrundo i in. 2018; Kolada 2020). Jako substrat pobierano 5 zdrowych roślin w miarę możliwości z głównego nurtu oraz wzdłuż krawędzi szuwaru od strony otwartej toni wodnej (Kolada 2020), które następnie umieszczano w pojemniku z wodą destylowaną. Dla pozyskania biofilmu okrzemkowego próbę wytrząsano do momentu uzyskania brązowej zawiesiny (Kolada 2020), którą po sedymentacji i zlanu nadmiaru wody przelewano do pojemnika. W przypadku stanowiska DE pobierano próbę peryfitonową z ostro nachylonej powierzchni betonowej stanowiącej umocnienie brzegu tuż przy zaporze. Próbę pobierano z głębokości około 30 cm zeskrobując biofilm przy pomocy metalowego skrobaka bezpośrednio do pojemnika 100 ml (Zgrundo i in. 2018).

Przy każdym poborze prób z wytypowanych stanowisk wykonywano pomiary przewodnictwa elektrolitycznego wody oraz temperatury wody (urządzenie pomiarowe Elmetron CP-401).

Prace laboratoryjne. Pobrane próby po przewiezieniu do laboratorium przeglądano przed ich utrwaleniem pod kątem obecności żywych okrzemek (Ryc. 14), a następnie utrwalano 4% roztworem formaldehydu.



Ryc. 14. Żywe okrzemki w mokrych próbach.

W celu uzyskania czystych okryw okrzemek materiał poddawano działaniu mieszaniny 96% kwasu siarkowego (H_2SO_4) oraz 30% kwasu chromowego ($H_2Cr_2O_7$), utleniając materię organiczną. Roztwór ten pozostawiano na okres 48 do 72 godzin w dygestorium chemicznym. Następnie próby przemywano wodą destylowaną i każdorazowo odwirowywano (3500 obrotów/min) przez 3 minuty, po czym zlewano płyn z nad osadu. Ostatecznie uzyskano białoszary osad zawieszony w wodzie destylowanej. Następnie wykonywano trwałe preparaty, nanosząc na szkiełka nakrywkowe osad i pozostawiając go do odparowania wody w warunkach temperatury pokojowej. Po odparowaniu wody szkiełka nakrywkowe odwracano i przyklejano do szkiełka podstawowego syntetyczną żywicą Naphrax[®] ($n = 1,73$). Preparat był podgrzewany do temperatury 275°C w celu odparowania rozpuszczalnika żywicy i utrwalenia oczyszczonego materiału okrzemkowego.

Analiza jakościowa i ilościowa zbiorowisk okrzemek. Wykonane preparaty trwałe zostały użyte do przeprowadzenia analizy jakościowej zbiorowisk okrzemek. Identyfikacja okrzemek, optymalnie do poziomu gatunku, wykonana była z wykorzystaniem mikroskopu świetlnego Opta-tech Serii MB 200 (pow. 10 x 100, obiektyw planachromatyczny, 100 x/1.25).

Na podstawie morfologicznych cech diagnostycznych okrzemki oznaczono do rangi gatunku lub co najmniej rodzaju. Do identyfikacji taksonomicznej okrzemek użyto kluczy ikonograficznych: Krammer, Lange-Bertalot (1986, 1988, 1991a,b, 1997), Lange-Bertalot (1993, 2001, 2004), Lange-Bertalot, Moser (1994), Lange-Bertalot, Metzeltin (1996), Lange-Bertalot, Genkal (1999), Lange-Bertalot i in. (2017), Krammer (1997a, b, 2000, 2002, 2003),

Levkov (2009), Levkov i in. 2007, Metzeltin, Witkowski (1996), Moser i in. (1998), Żelazna-Wieczorek (2011) oraz aktualnych publikacji z zakresu taksonomii. Zgodnie z metodą opisaną przez Żelazną-Wieczorek (2011) przeprowadzono analizę pólnościową zbiorowisk okrzemek. Podczas obserwacji mikroskopowej liczono co najmniej 500 okryw okrzemek.

W celu scharakteryzowania struktury zbiorowisk okrzemek badanych stanowisk na Bugu i Narwi w każdej z badanych prób został określony procentowy udział zidentyfikowanych taksonów. Na podstawie udziału procentowego określone zostały gatunki: dominujące, subdominujące, influenty oraz gatunki akcesoryczne (Tab. 4) (Kawecka, Eloranta 1994, Rakowska 2001).

Tabela 4. Klasyfikacja procentowego udziału gatunków za Rakowska (2001).

Rola gatunku	Udział procentowy
Dominant	> 5%
Subdominant	2-5%
Influent	1-2%
Gatunek akcesoryczny	< 1%

Dla wszystkich zidentyfikowanych taksonów okrzemek określone zostały klasy stałości występowania (Tab. 5). W tym celu wykorzystano współczynnik Tümpinga i Friedricha (1999):

$$C = k_i/k \times 100\%$$

Gdzie:

C – współczynnik stałości wyrażony w [%]

k_i – liczba wszystkich prób, w których obecny był dany gatunek

k – liczba wszystkich analizowanych prób

Tabela 5. Klasy stałości występowania gatunków, klasyfikacja na podstawie Tümpinga i Friedricha (1999).

Częstotliwość występowania gatunku	Udział procentowy
Eukonstant (absolutnie stały)	75 - 100 %
Konstant	50 - 74,9 %
Akcesoryczny	25 - 49,9 %
Przypadkowy	1- 24,9 %

Analizę podobieństwa zbiorowisk okrzemek wykonano na podstawie współczynnika Bray-Curtis'a przy uwzględnieniu wszystkich prób z wytypowanych stanowisk badawczych. Współczynnik Bray-Curtis'a jakościowego i ilościowego podobieństwa został wyliczony przy zastosowaniu wzoru (Clarke, Gorley 2015):

$$S_{jk} = 100 \left\{ 1 - \frac{\sum_{i=1}^p |y_{ij} - y_{ik}|}{\sum_{i=1}^p (y_{ij} + y_{ik})} \right\}$$

Gdzie:

y_{ij} – przedstawia wartość w „i” wierszu i w „j” kolumnie w macierzy danych, tj. dla liczebności „i” gatunku w j próbie ($i=1, 2, \dots, p; j=1, 2, \dots, n$).

y_{ik} – liczebność „i” gatunku w k próbie. $|y_{ij} - y_{ik}|$ przedstawia wartość bezwzględną różnicy

W celu przeanalizowania relacji pomiędzy zbiorowiskami okrzemek w próbach ze stanowisk na rzekach Narew i Bug wykorzystano metodę skalowania wielowymiarowego (ang. Multidimensional Scaling – MDS) w czasie i przestrzeni (odległość oraz rozmieszczenie na osiach XY lub XYZ wskazują na podobieństwa albo różnice między nimi). Metoda ta oparta jest na inwersji współczynnika podobieństwa Bray-Curtis’a, a jej celem jest ukazanie zmiennych ukrytych wpływających na badane obiekty. Jeśli wartość stresu nie jest zbyt duża i wynosi poniżej 0,1, to wynik przeprowadzonej analizy MDS przedstawia silne zależności lub wzorce między badanymi obiektami. Wykonano transformację analizy MDS typu „Shade plot”, co umożliwiło opisanie struktury zbiorowisk okrzemek. Analiza typu „Shade plot” wizualizuje dane liczbowe w taki sposób, że im wyższa wartość w danej komórce, tym ciemniejszy jest jej odcień lub barwa wybranego koloru. Białe wypełnienie komórki oznacza brak gatunków, a czarne reprezentuje największą wartość (Clarke, Gorley 2015).

Do przedstawienia poziomu podobieństwa i niepodobieństwa (wyrażonego w punktach procentowych) pomiędzy próbami wykorzystano analizę SIMPER. Podstawą tej analizy jest inwersja współczynnika podobieństwa Bray-Curtis’a, co umożliwia wskazanie gatunków okrzemek, które w największym stopniu wpływały na podobieństwo lub niepodobieństwo badanych prób (Clarke, Warwick 2001).

Analizę podobieństwa na podstawie współczynnika Bray-Curtis’a, skalowanie wielowymiarowe NMDS, transformację „Shade plot” i analizę SIMPER wykonano z wykorzystaniem programu komputerowego PRIMER-E (wersja 7.0.24, Quest Research Limited, New Zealand).

Analiza ekologiczna zbiorowisk okrzemek. Analiza ekologiczna na podstawie zbiorowisk okrzemek została przeprowadzona z wykorzystaniem danych z piśmiennictwa oraz z bazy danych programu OMNIDIA 6.1.8. (stan na 29.04.2024). Uzyskane informacje dały podstawę do analizy warunków środowiskowych rzek w oparciu o system ekologiczny Van Dama i in.

(1994). Przeanalizowano zakresy wymagań okrzemek względem warunków takich jak: odczyn wody, saprobia, trofia, zasolenie, wymagania tlenowe oraz wilgotność.

Wartości indeksów okrzemkowych obliczono w programie OMNIDIA, ich wartości pozwalają na przyporządkowanie analizowanych prób do jednej z pięciu klas jakości wód oraz stanu ekologicznego (Tab. 6). W analizie wykorzystano IPS – Specific Pollution Sensitivity Index (Coste, Ayphassorho 1991), GDI – Generic Diatom Index (Coste, Ayphassorho 1991) oraz TDI – Trophic Diatom Index (Kelly, Whitton 1995; Szczepocka i in. 2018). Do interpretacji wartości TDI konieczne jest uwzględnienie %PT (% pollution taxa).

Tabela 6. Zakres Wartości indeksów IPS, GDI, TDI oraz odpowiadająca im klasa jakości wody i stan ekologiczny (za Szczepocka i in. 2018, zmodyfikowane).

Klasa jakości wody	Stan ekologiczny	IPS	GDI	trofia	TDI
I	Bardzo dobry	20,0 – 17,0	20,0 – 17,0	oligotrofia	< 35
II	Dobry	16,9 – 15,0	16,9 – 14,0	oligo-mezotrofia	35 < 50
III	Umiarkowany	14,9 – 12,0	13,9 – 11,0	mezotrofia	50 < 60
IV	Słaby	11,9 – 8,0	10,9 – 8,0	eutrofia	60 < 75
V	Zły	7,9 – 0	7,9 – 0	hipertrofia	75 < 100

Wyniki

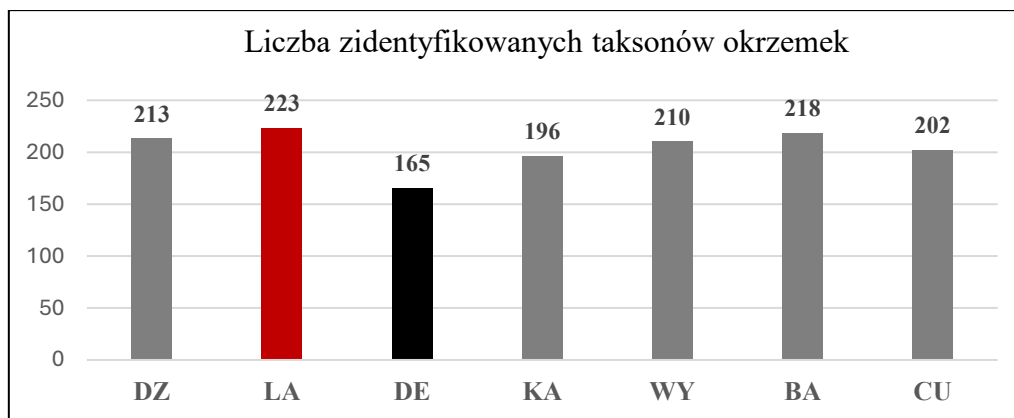
Warunki środowiska wodnego *in situ*. Temperatura wody mierzona jednocześnie z każdorazowym poborem prób na stanowiskach badawczych na rzece Narew i Bug, była najwyższa w lipcu 2018 roku – powyżej 25°C na wszystkich stanowiskach (Tab. 7). Najniższe temperatury wody odnotowano w listopadzie 2018 roku.

Tabela 7. Temperatura wody (°C) odnotowana podczas poboru prób okrzemkowych.

Stanowisko	Rodzaj mikrosiedliska	05.04.2018	26.05.2018	22.07.2018	08.09.2018	24.11.2018	03.03.2019	01.05.2019	04.08.2019	13.10.2019	02.02.2020
Łacha (LA)	PL/EF/EP	12	22	26	21	1	1	16	24	12	4
Dzierżenin (DZ)	PL/EF/EP	10	21	25	21	2	2	17	21	12	4
Dębe (DE)	PL/EF/PE	9	22	27	22	3	3	17	24	13	3
Cupel (CU)	PL/EF/ES	11	22	27	19	1	3	17	23	14	5
Barcice (BA)	PL/EF/EP	10	22	26	18	0	1	18	21	11	4
Wyszków (WY)	PL/EF/EP	11	22	27	20	1	1	18	21	14	5
Kamieńczyk (KA)	PL/EF/EP	10	21	26	18	1	2	17	20	11	4

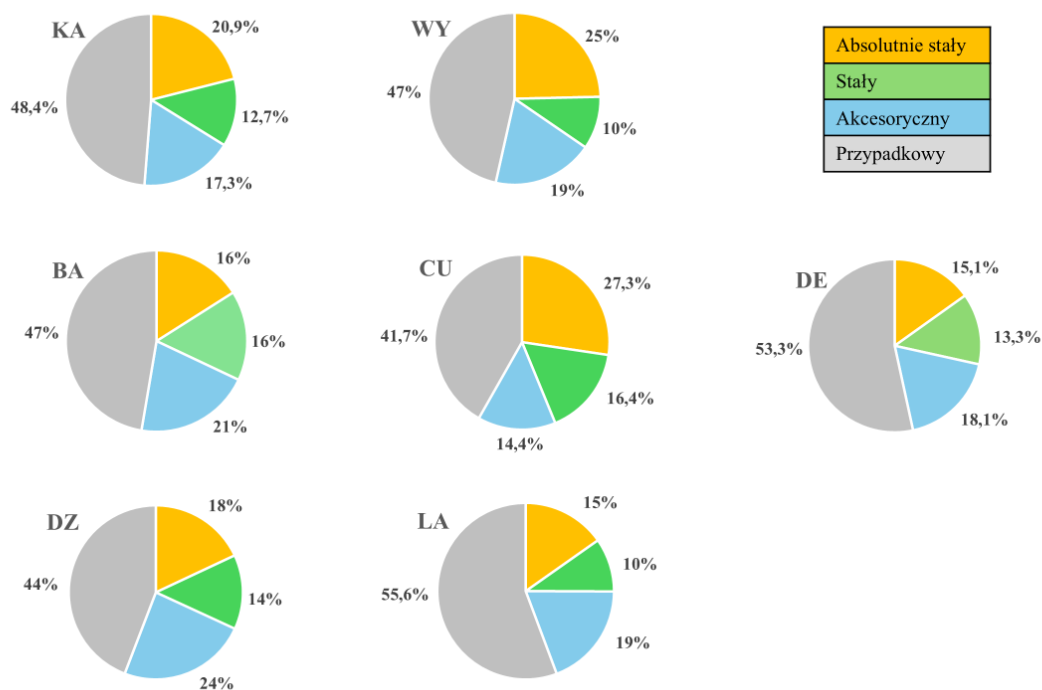
Na wytypowanych do badań stanowiskach zmierzono przewodnictwo elektrolityczne. Przewodnictwo elektrolityczne [$\mu\text{S}/\text{cm}^{-1}$] we wrześniu 2018 roku wynosiło: Kamieńczyk (KA) – 435, Wyszków (WY) – 470, Barcice (BA) – 485, Cupel (CU) – 453, Dębe (DE) – 453, Dzierżenin (DZ) – 433, Łacha (LA) – 505.

Różnorodność taksonomiczna okrzemek rzek Narew i Bug. Analizie taksonomicznej zbiorowisk okrzemek w wytypowanych do badań siedmiu stanowiskach na rzece Narew i Bug poddano 210 prób, w których łącznie zidentyfikowano 293 taksony okrzemek (Aneks I – VII). Najwięcej taksonów okrzemek zidentyfikowano na stanowisku Łacha (LA) – 223, natomiast najmniej na stanowisku Dębe (DE) – 165 (Ryc. 15).



Ryc. 15. Liczba zidentyfikowanych taksonów okrzemek na stanowiskach badawczych.

Analiza udziału w badanych zbiorowiskach okrzemek należących do kategorii absolutnie stałe i stałe wykazała, że na wszystkich stanowiskach badawczych stanowiły one do 35% (od 25% do 35%), jedynie na stanowisku Cupel (CU) stanowiły one 43,7% (Ryc. 16). Najwyższy udział na wszystkich stanowiskach stanowiły taksony przypadkowe.



Ryc. 4. Udział gatunków ze względu na klasy stałości na stanowiskach badawczych na rzece Narew (LA, DZ, DE) i Bug (KA, WY, BA, CU).

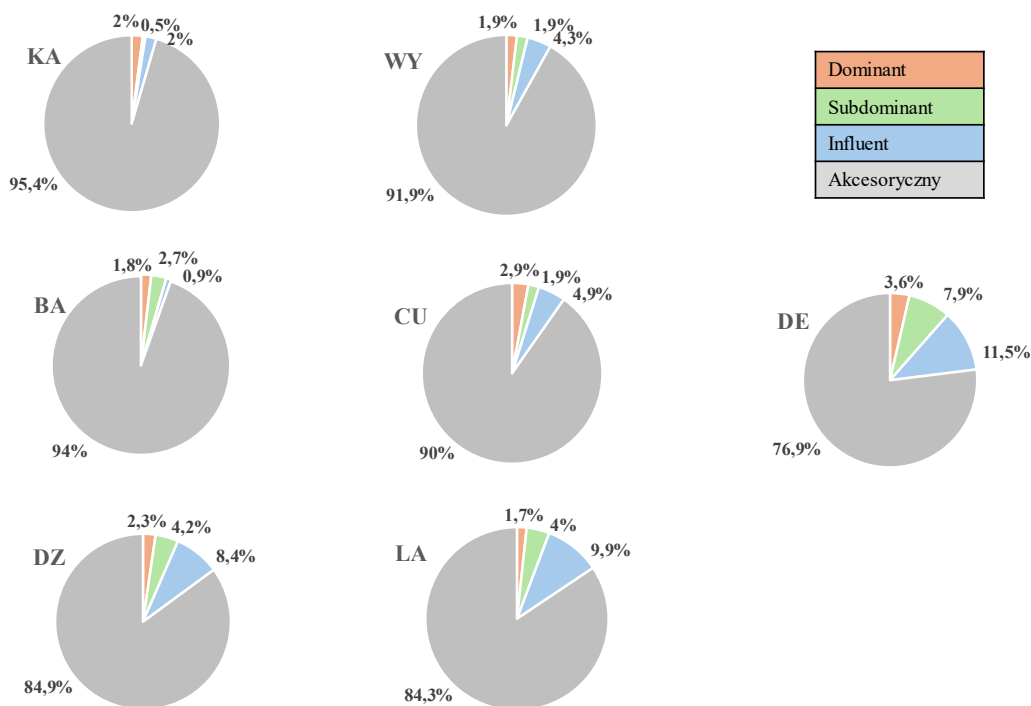
Gatunków absolutnie stałych i stałych dla obu rzek odnotowano 23, w tym absolutnie stałych 14 i stałych 9 (Tab. 9). Gatunkami absolutnie stałymi były: *Amphora copulata*, *A. pediculus*, *Aulacoseira ambigua*, *A. granulata*, *Cyclostephanos dubius*, *Cyclotella*

meneghiniana, *Gomphonema parvulum*, *Navicula capitatoradiata*, *Nitzschia fonticola*, *N. fruticosa*, *N. palea*, *Planothidium frequentissimum*, *Stephanodiscus hantzschii*, *Ulnaria ulna* (Tab. 8).

Tabela 8. Gatunki absolutnie stałe i stałe wspólne dla rzeki Narew i Bug (kolorem pomarańczowym zaznaczono gatunki o stałości występowania od 75 do 100% prób, zielonym od 50 do 74,9 % prób na poszczególnych stanowiskach badawczych.)

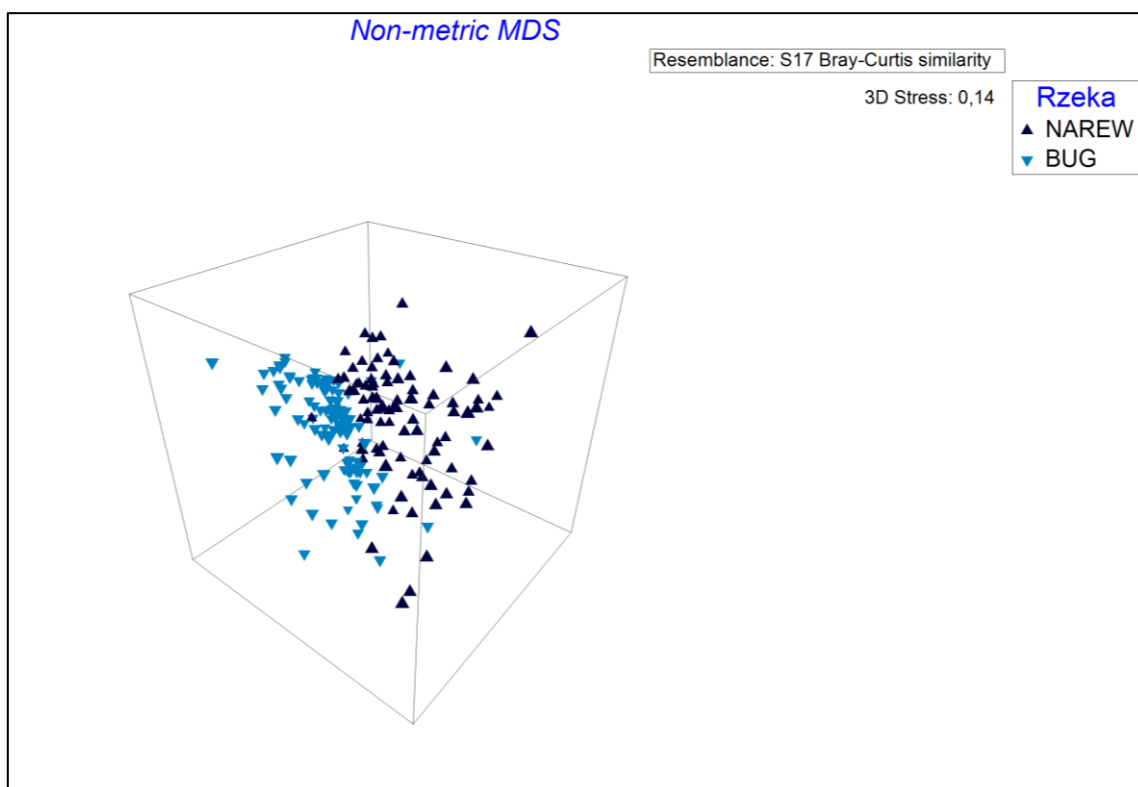
Gatunki	Łacha	Dzierżenin	Dębe	Wyszków	Kamięńczyk	Cupel	Barcice
<i>Amphora copulata</i>	96,6	100	100	93,3	100	100	100
<i>Amphora pediculus</i>	100	96,6	100	86,6	96,6	100	100
<i>Aulacoseira ambigua</i>	93,3	93,3	93,3	100	90,0	100	93
<i>Aulacoseira granulata</i>	83,3	100	100	100	100	100	100
<i>Cocconeis placentula</i>	100	96,6	80,0	93,3	100	90,0	53
<i>Cyclostephanos dubius</i>	96,6	100	93,3	100,0	100	100	100
<i>Cyclotella meneghiniana</i>	93,3	100	100	100	100	100	100
<i>Encyonema lange-bertalotii</i>	66,6	76,6	73,3	63,3	66,6	66,6	90,0
<i>Eolimna minima</i>	96,6	90,0	66,6	76,6	66,6	90,0	98,0
<i>Gomphonema olivaceum</i>	80,0	83,3	70,0	90,0	93,3	96,6	90,0
<i>Gomphonema parvulum</i>	93,3	83,3	86,6	93,3	90,0	80,0	93,3
<i>Navicula antonii</i>	90,0	80,0	86,6	90,0	90,0	96,6	70,0
<i>Navicula capitatoradiata</i>	86,6	93,3	83,3	90,0	90,0	93,3	76,6
<i>Nitzschia fonticola</i>	83,3	76,6	86,6	83,3	76,6	96,6	76,6
<i>Nitzschia fruticosa</i>	100	100	100	100	100	96,6	100
<i>Nitzschia palea</i>	100	100	100	76,6	100	96,6	100
<i>Planothidium frequentissimum</i>	100	100	93,3	100	100	100	100
<i>Pseudostaurosira brevistriata</i>	83,3	73,3	73,3	86,6	80,0	100	90,0
<i>Staurosira venter</i>	60,0	73,3	83,3	76,6	90,0	100	66,6
<i>Staurosirella pinnata</i>	73,3	60,0	73,3	80,0	83,3	83,3	73,3
<i>Stephanodiscus hantzschii</i>	93,3	96,6	100	100	96,6	100	90,0
<i>Ulnaria delicatissima</i>	70,0	83,3	83,3	80,0	83,3	93,3	93,3
<i>Ulnaria ulna</i>	93,3	100	90,0	80,0	90,0	86,6	100

W wyznaczonych stanowiskach badawczych na rzece Narew i Bug odnotowano jako najliczniejszą klasę pod względem dominacji – gatunki akcesoryczne, które osiągały udział 95,4% na stanowisku KA. Dominanty stanowiły najmniej liczną kategorię taksonów w zbiorowiskach okrzemek na badanych stanowiskach (Ryc. 17).



Ryc. 17. Udział kategorii gatunków ze względu na udział w próbie na stanowiskach badawczych na rzece Narew (LA, DZ, DE) i Bug (KA, WY, BA, CU).

Analiza podobieństwa/niepodobieństwa zbiorowisk okrzemek dwóch rzek. Na podstawie skalowania wielowymiarowego NMDS wykonanego dla wszystkich 210 prób z siedmiu stanowisk badawczych wykazano odrębność zbiorowisk okrzemek rzeki Narew i rzeki Bug (Ryc. 18). Jednocześnie w obrazie skalowania wielowymiarowego można zauważyć, że próby z rzeki Bug są bardziej podobne względem siebie niż próby z rzeki Narew. Wartość stresu skalowania wynosi 0,14, co odzwierciedla rzeczywiste zróżnicowanie obu ekosystemów rzecznych. Na podstawie analizy SIMPER niepodobieństwo prób pomiędzy rzeką Narew i rzeką Bug zostało określone na 69,69%, na co głównie miały wpływ udziały procentowe w próbie następujących gatunków: *Stephanodiscus hantzschii*, *Aulacoseira granulata*, *Cyclostephanos dubius*, *Cyclotella meneghiniana*, *Aulacoseira ambigua*, *Planothidium frequentissimum*, *Amphora pediculus*, *Cocconeis euglypta*, *C. placentula* oraz *Fragilaria vaucheriae* (Ryc. 19).

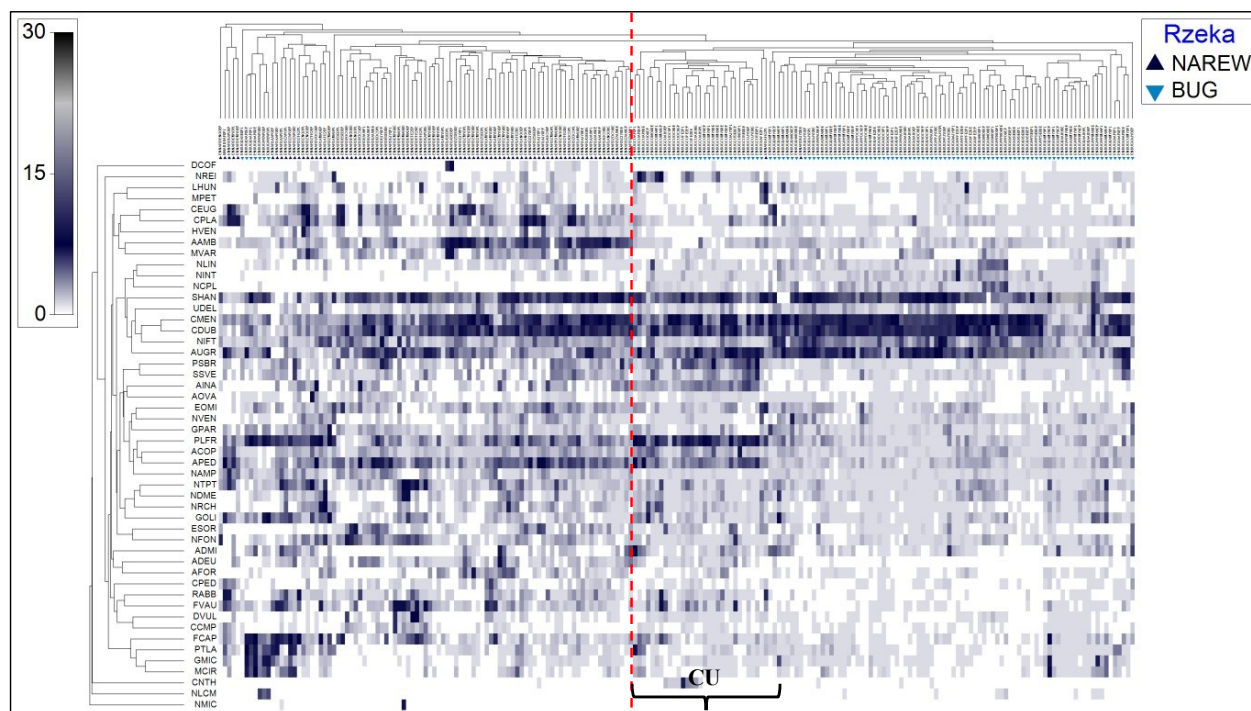


Ryc. 18. Zróżnicowanie zbiorowisk okrzemek w próbach na stanowiskach badawczych rzeki Narew i rzeki Bug na podstawie skalowania wielowymiarowego NMDS.

<i>Groups NAREW & BUG</i>						
Average dissimilarity = 69,69						
	Group NAREW		Group BUG			
Species	Av.Abund	Av.Abund	Av.Diss	Diss/SD	Contrib%	Cum.%
SHAN	46,51	115,38	9,61	0,92	13,79	13,79
AUGR	19,39	71,33	6,04	0,75	8,67	22,46
CDUB	54,16	62,98	5,25	1,28	7,53	29,98
CMEN	32,22	61,58	4,69	1,19	6,73	36,71
AAMB	28,73	2,82	2,51	0,59	3,60	40,31
PLFR	21,70	17,41	2,39	0,81	3,44	43,74
APED	21,42	7,16	1,72	0,95	2,46	46,21
CEUG	17,71	1,13	1,65	0,40	2,37	48,58
CPLA	17,49	2,70	1,54	0,62	2,21	50,79
FVAU	11,36	3,74	1,20	0,55	1,72	52,50

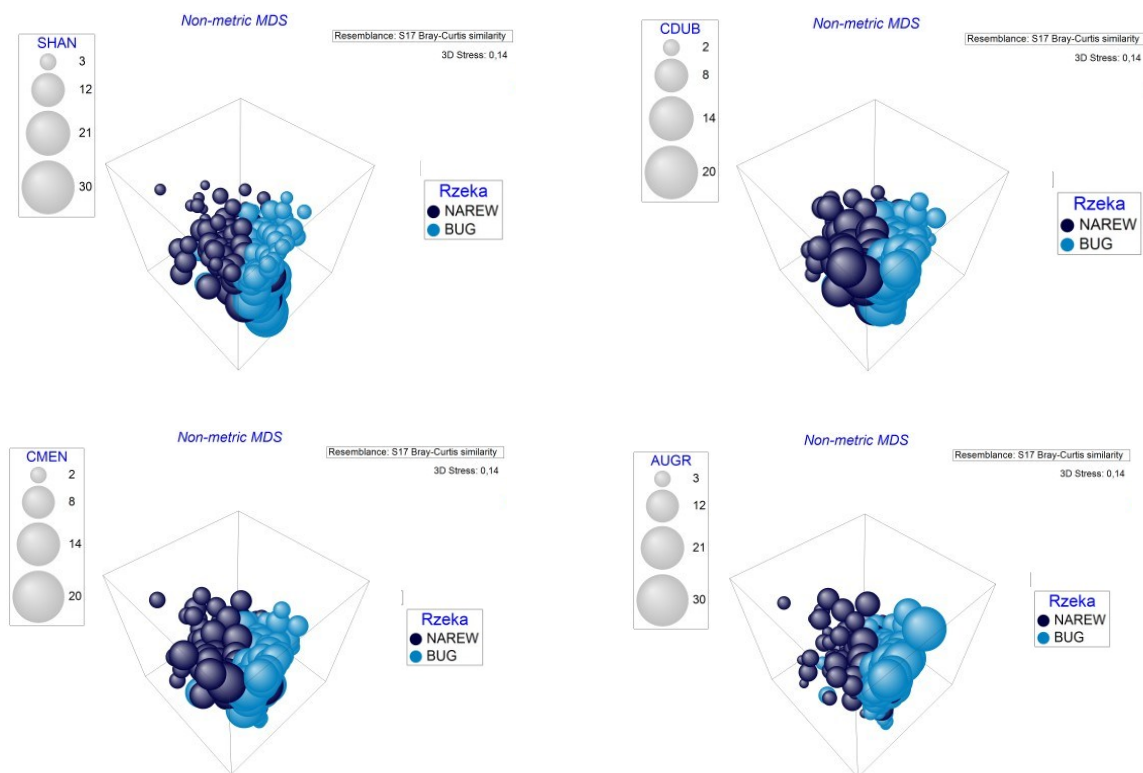
Ryc. 19. Zestawienie średniego udziału gatunków w głównej mierze decydujących o niepodobieństwie prób z obu badanych rzek na podstawie analizy SIMPER.

W celu wytypowania gatunków wyróżniających dla zbiorowisk okrzemek na stanowiskach na rzece Narew i Bug zastosowano transformację danych typu Shade plot (Ryc. 20), którą wykonano na podstawie współczynnika podobieństwa Bray-Curtis'a. Również zastosowano analizę SIMPER, która wskazała gatunki najsilniej wpływające na niepodobieństwo rzek i wyznaczonych stanowisk badawczych.



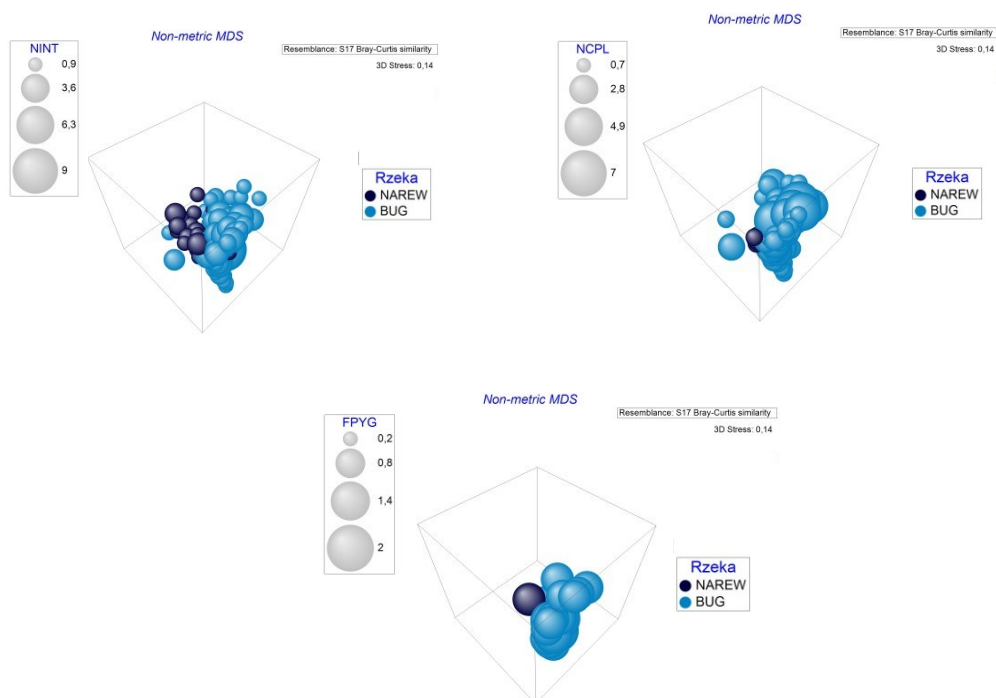
Ryc. 20. Transformacja danych typu Shade plot dla 50 gatunków mających największy wpływ na podobieństwo i niepodobieństwo zbiorowisk okrzemek rzeki Narew i rzeki Bug (czerwona przerywana kreska odcina próby z rzek, klamrą zaznaczono próby ze stanowiska badawczego Cupel (CU)).

Na podstawie analizy transformacji danych typu Shade plot oprócz gatunków absolutnie stałych i dominujących dla obu rzek, takich jak *Stephanodiscus hantzschii*, *Cyclotella meneghiniana*, *Cyclostephanos dubius* oraz *Aulacoseira granulata* (Ryc. 20, 21), można wskazać gatunki odnotowane jako absolutnie stałe w rzece Bug, a w rzece Narew występujące jako przypadkowe: *Nitzschia intermedia*, *Nitzschia capitellata* oraz *Fallacia pygmaea* (Ryc. 20, 22). Natomiast gatunkami charakterystycznymi dla rzeki Narew są: *Diadlesmis confervacea*, *Achnanthisidium eutrophilum*, *Rhoicosphenia abbreviata* oraz *Encyonema leibleinii* (Ryc. 20, 23). Ponadto wyraźnie widoczny jest wpływ obu rzek na zbiorowiska okrzemek ze stanowiska CU, gdzie Bug łączy się z Narwią. Przykładem mogą być *Planorthisidium frequentissimum* oraz *Amphora pediculus*, które są dominujące dla Narwi, ale nie są dojmujące dla stanowisk KA, WY, BA (Bug), jednak w przypadku stanowiska CU (Bug) widać również dominację tych gatunków (Ryc. 20).

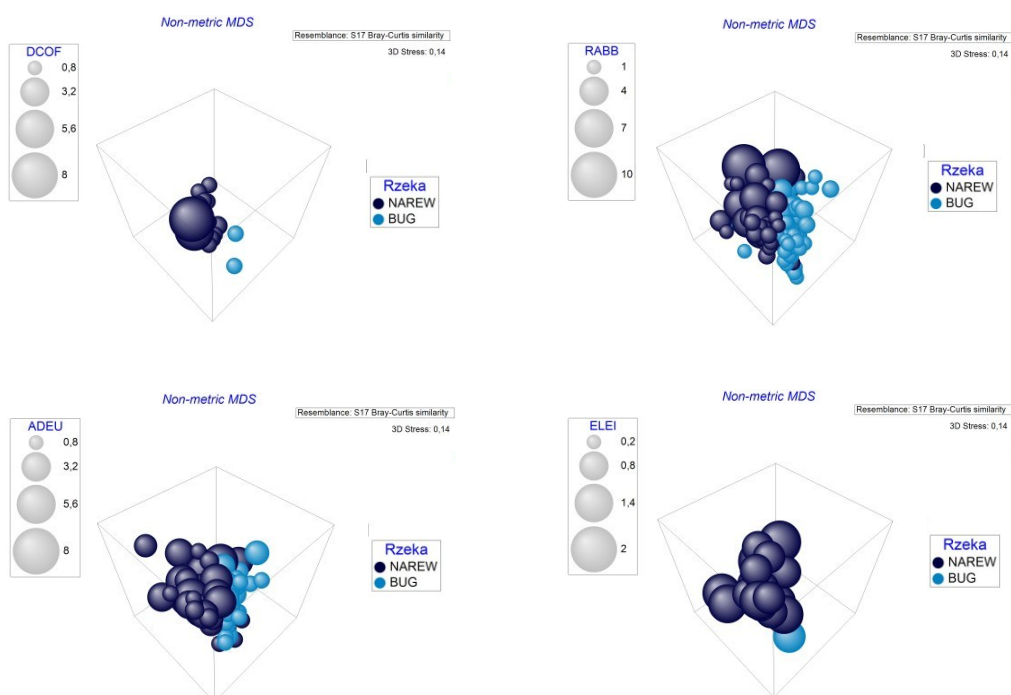


Ryc. 21 Porównanie liczebności gatunków w próbach z rzeki Narew i rzeki Bug: *Stephanodiscus hantzschii* (SHAN) *Cyclostephanos dubius* (CDUB), *Cyclotella meneghiniana* (CMEN) i *Aulacoseira granulata* (AUGR). Średnica kul obrazuje udział procentowy w próbce.

Stephanodiscus hantzschii zidentyfikowano w 203 próbach, przy czym jego wysoki udział procentowy odnotowano głównie w rzece Bug, w której w próbie epipelonu ze stanowiska BA w sierpniu 2019 roku stanowił 80%. *Cyclotella meneghiniana* została oznaczona we wszystkich 210 próbach z obu rzek, wyższy udział procentowy odnotowano w próbach z rzeki Bug z maksymalnym udziałem w próbie epipelonu ze stanowiska WY w sierpniu 2019 roku – 38,6%. *Cyclostephanos dubius* zidentyfikowano w 207 próbach ze stanowisk na Narwi i Bugu, przy czym jego wysoki udział procentowy odnotowano w próbie potamoplanktonu ze stanowiska BA w maju 2018 roku – 35,7%. *Aulacoseira granulata* występowała w 204 próbach ze stanowisk na rzekach Narew i Bug, przy czym z większą liczebnością w rzece Bug. Jej największy udział procentowy odnotowano w próbie potamoplanktonu ze stanowiska BA we wrześniu 2018 roku – 82,9%.



Ryc. 22. Porównanie liczebności gatunków w próbach z rzeki Narew i rzeki Bug: *Nitzschia intermedia* (NINT), *Nitzschia capitellata* (NCPL), *Fallacia pygmaea* (FPYG). Średnica kul obrazuje udział procentowy w próbce.



Ryc. 23. Porównanie liczebności gatunków w próbach z rzeki Narew i rzeki Bug: *Diademes confervacea* (DCOF), *Achnanthes eutrophilum* (ADEU), *Rhoicosphaenia abbreviata* (RABB), *Encyonema leibleinii* (ELEI). Średnica kul obrazuje udział procentowy w próbce.

Zbiorowiska okrzemek rzeki Narew. Zbiorowiska okrzemek zostały zbadane na podstawie 90 prób zebranych z trzech stanowisk badawczych: Dzierżenin (DZ), Łacha (LA) oraz Dębe (DE). Gatunkami absolutnie stałymi i stałymi dla rzeki Narew, które nie osiągnęły tego statusu w rzece Bug były: *Aulacoseira granulata*, *Cocconeis euglypta*, *Cymbella tumida*, *Epithemia sorex*, *Fragilaria radians*, *F. vaucheriae*, *Gomphonema pala*, *Melosira varians*, *Navicula reichardtiana*, *N. reinhardtii*, *N. tripunctata*, *Rhoicosphenia abbreviata* i *Tabularia fasciculata*. W przypadku stanowisk na rzece Narew gatunkami dominującymi w prawie wszystkich próbach były: *Aulacoseira granulata*, *Cyclostephanos dubius* i *Cyclotella meneghiniana*.

Analiza SIMPER zbiorowisk okrzemek ze stanowisk na Narwi wykazała niskie średnie podobieństwo prób na poziomie 34,09, na co wpływ miały *Cyclostephanos dubius*, *Stephanodiscus hantzschii*, *Cyclotella meneghiniana*, *Amphora pediculus*, *Aulacoseira ambigua* oraz *Planothidium frequentissimum*. Natomiast analiza SIMPER pomiędzy zbiorowiskami okrzemek na wybranych do badań stanowiskach wykazała wysokie średnie niepodobieństwo, szczególnie pomiędzy stanowiskami Dzierżenin i Łacha a Dębe na rzece Narew (Tab. 9). Wartości średniego niepodobieństwa pomiędzy zbiorowiskami okrzemek ze stanowisk z rzeki Narew w odniesieniu do stanowisk z rzeki Bug są jeszcze wyższe.

Tabela 9. Średnie niepodobieństwo na podstawie analizy SIMPER (One-Way) pomiędzy stanowiskami badawczymi na rzece Narew (kolor granatowy) i rzece Bug (kolor niebieski).

	Dzierżenin	Łacha	Dębe	Kamieńczyk	Wyszków	Barcice	Cupel
Dzierżenin		62,88	70,78	68,61	71,09	69,75	66,84
Łacha	62,88		68,55	67,90	69,86	69,17	65,49
Dębe	70,78	68,55		71,74	73,34	72,98	69,54
Kamieńczyk	68,61	67,90	71,74		54,78	56,23	63,66
Wyszków	71,09	69,86	73,34	54,78		57,67	65,35
Barcice	69,75	69,17	72,98	56,23	57,67		65,86
Cupel	66,84	65,49	69,54	63,66	65,35	65,86	

Gatunkiem, który został odnotowany tylko w rzece Narew była *Navicula jakovljevicii*. Nieliczne występowanie tego gatunku wykazano w próbach ze stanowisk badawczych Łacha i Dzierżenin (Ryc. 24 i 25).

N. slesvicensis, *N. trivialis*, *N. veneta*, *Nitzschia intermedia*, *Planothidium rostratum*, *Sellaphora pupula*, *Tryblionella apiculata*, *T. hungarica*, *T. levidensis*. Gatunkami dominującymi w prawie wszystkich próbach pobranych ze stanowisk badawczych na rzece Bug (KA, WY, BA, CU) były: *Aulacoseira granulata*, *Cyclostephanos dubius*, *Cyclotella meneghiniana* oraz *Stephanodiscus hantzschii*.

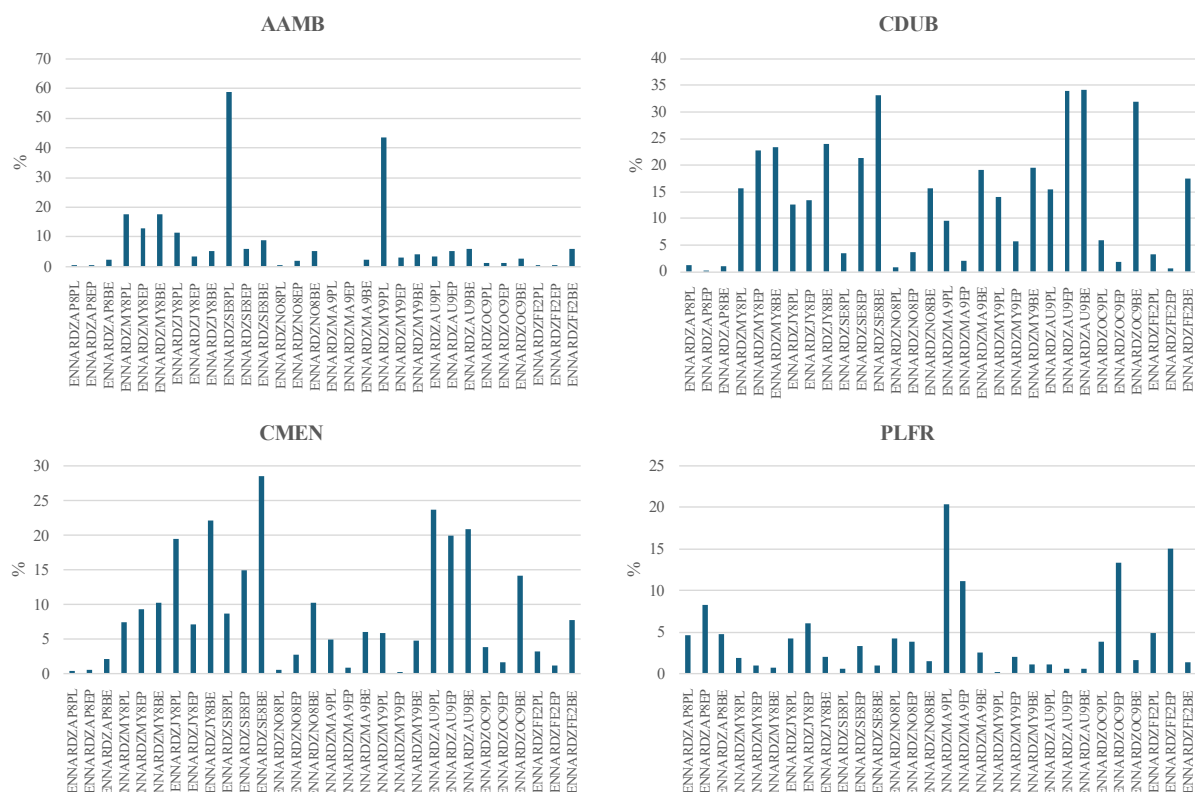
Na podstawie analizy SIMPER dla stanowisk na rzece Bug średnie podobieństwo było niskie, jednak wyższe niż w przypadku Narwi i wynosiło ono 40,55. Za podobieństwo odpowiadają: *Stephanodiscus hantzschii*, *Cyclostephanos dubius*, *Cyclotella meneghiniana*, *Aulacoseira granulata*, *Planothidium frequentissimum* oraz *Nitzschia fruticosa*. Analiza SIMPER pomiędzy zbiorowiskami okrzemek na wybranych do badań czterech stanowiskach wykazała średnie niepodobieństwo od 54,78 do 57,67 pomiędzy stanowiskami Kamieńczyk, Wyszków i Barcice, natomiast od 63,66 do 65,86 pomiędzy tymi stanowiskami a stanowiskiem Cupel (Tab. 9).

Charakterystyka zbiorowisk okrzemek na stanowiskach badawczych

Dzierżenin (DZ) – rzeka Narew. Analizę jakościową zbiorowisk okrzemek wykonano na podstawie 30 prób pobranych z trzech rodzajów siedlisk: toni wodnej, roślin zanurzonych w wodzie oraz mulistego dna. Łącznie zostało zidentyfikowanych 213 taksonów okrzemek, wśród których głównie występowały gatunki akcesoryczne – 84,9%. Gatunki dominujące i subdominujące stanowiły odpowiednio 2,3% i 4,2% (Ryc. 17). Ze względu na stałość występowania główną grupę stanowiły gatunki przypadkowe – 44%, natomiast gatunki absolutnie stałe i stałe stanowiły odpowiednio 18% i 14% (Ryc. 16).

Taksonami absolutnie stałymi w badanym stanowisku były: *Achnantheidium eutrophilum*, *A. minutissimum*, *Amphora copulata*, *A. inariensis*, *A. pediculus*, *Aulacoseira ambigua*, *A. granulata*, *Cocconeis euglypta*, *C. placentula*, *Cyclostephanos dubius*, *Cyclotella meneghiniana*, *Encyonema lange-bertalotii*, *Eolimna minima*, *Fragilaria capucina*, *Gomphonema micropus*, *G. olivaceum*, *G. parvulum*, *Halamphora veneta*, *Hippodonta capitata*, *Navicula antonii*, *N. capitatoradiata*, *N. cryptotenella*, *N. radiosa*, *N. reichardtiana*, *N. tripunctata*, *N. upsaliensis*, *Nitzschia amphibia* f. *amphibia*, *N. dissipata* var. *media*, *N. fonticola*, *N. fruticosa*, *N. palea*, *Planothidium frequentissimum*, *P. lanceolatum*, *Stephanodiscus hantzschii*, *Ulnaria delicatissima*, *U. ulna*. Gatunkami dominującymi i jednocześnie absolutnie stałymi były: *Aulacoseira ambigua*, *Cyclostephanos dubius*, *Cyclotella meneghiniana*, *Planothidium frequentissimum* oraz *Stephanodiscus hantzschii*. Do gatunków subdominujących i jednocześnie absolutnie stałych należy zaliczyć: *Amphora*

pediculus, *Cocconeis euglypta*, *C. placentula*, *Fragilaria capucina*, *Navicula tripunctata* oraz *Nitzschia fruticosa*.



Ryc. 26. Procentowy udział w próbie gatunków absolutnie stałych i jednocześnie dominujących na stanowisku Dzierżenin: *Aulacoseira ambigua* (AAMB), *Cyclostephanos dubius* (CDUB), *Cyclotella meneghiniana* (CMEN) oraz *Planothidium frequentissimum* (PLFR).

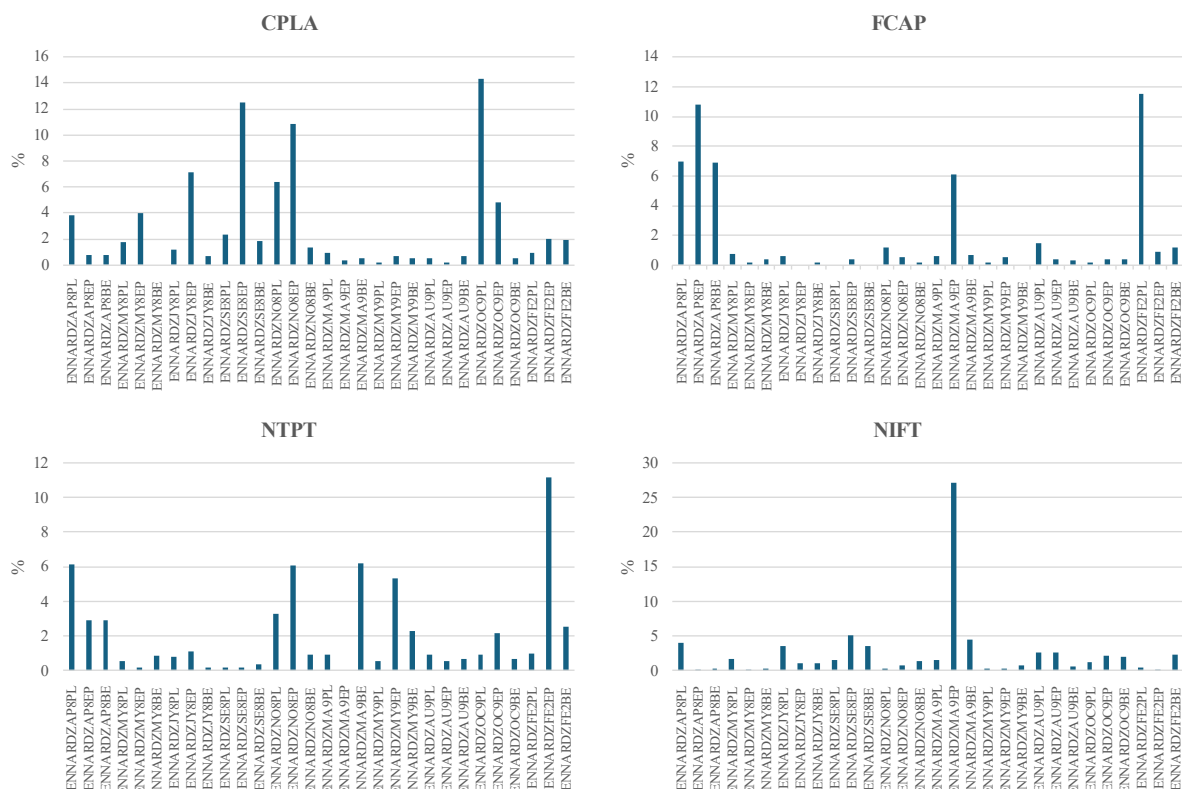
Aulacoseira ambigua była obecna we wszystkich próbach, a jej udział procentowy w próbie mieścił się w zakresie od 0,2% do 58,8%, przy czym najwyższy udział procentowy odnotowano w próbach potamoplanktonu z września 2018 roku – 58,8% i maja 2019 roku – 43,3% (Ryc. 26). *Cyclostephanos dubius* występował we wszystkich próbach, a jego udział procentowy w próbie mieścił się w zakresie od 0,2% do 34,2%, przy czym najwyższy jego udział procentowy odnotowano w próbach epipelonu z września 2018 roku – 33,1% i października 2019 roku – 34,2% (Ryc. 26). *Cyclotella meneghiniana* odnotowana została we wszystkich próbach z udziałem procentowym w zakresie od 0,2% do 28,4% w próbie. Wzrost udziału procentowego stwierdzono w próbach potamoplanktonu i epipelonu z czerwca 2018 roku – 22,1% i sierpnia 2018 roku – 28,4% oraz w próbach z września 2019 roku: potamoplankton – 23,6%, epifiton – 18,8% i epipelon – 20,9% (Ryc. 26). *Planothidium frequentissimum* odnotowano we wszystkich próbach, a jego udział procentowy w próbie był w zakresie od 0,2% do 20,3%, przy czym najwyższy jego udział procentowy odnotowano

w próbie potamoplanktonu i epifitonu z marca 2019 roku – odpowiednio 20,3% i 11,2% oraz w próbie epifitonu z października 2019 roku – 13,4% i lutego 2020 roku – 15,0%. (Ryc. 26).



Ryc. 27. Procentowy udział w próbie gatunków absolutnie stałych i jednocześnie dominujących na stanowisku Dzierżenin: *Stephanodiscus hantzschii* (SHAN), *Amphora pediculus* (APED), *Aulacoseira granulata* (AUGR) oraz *Cocconeis euglypta* (CEUG).

Stephanodiscus hantzschii był obecny w 29 próbach, a jego udział procentowy wynosił od 0,2% do 13,9%. Wysoki udział procentowy odnotowano w próbie epipelonu z czerwca 2018 roku – 10,7% oraz z sierpnia i października 2019 roku – odpowiednio 11,1% i 13,9% (Ryc. 27). *Amphora pediculus* stwierdzona została w 29 próbach, a jej udział procentowy mieścił się w zakresie od 0,2% do 12,9%, przy czym najwyższy udział procentowy odnotowano w próbach epifitonu z lipca 2018 roku – 12,9% i z października 2019 roku – 9,3% (Ryc. 27). *Aulacoseira granulata* odnotowana była we wszystkich próbach z udziałem procentowym w zakresie od 0,2% do 5,0%. Wysoki udział procentowy odnotowano w próbie bentosu z maja i września 2018 roku, odpowiednio – 5,0% i 4,3% (Ryc. 27). *Cocconeis euglypta* był obecny we wszystkich próbach, a jego udział procentowy wynosił od 0,2% do 22,0%. Najwyższy jego udział procentowy odnotowano w próbach z maja 2018 roku: epifiton – 22,0 %, epipelon – 15,8% oraz w próbie potamoplanktonu oraz epifitonu z listopada 2018 roku, odpowiednio – 2,8% i 14,2% (Ryc. 27).



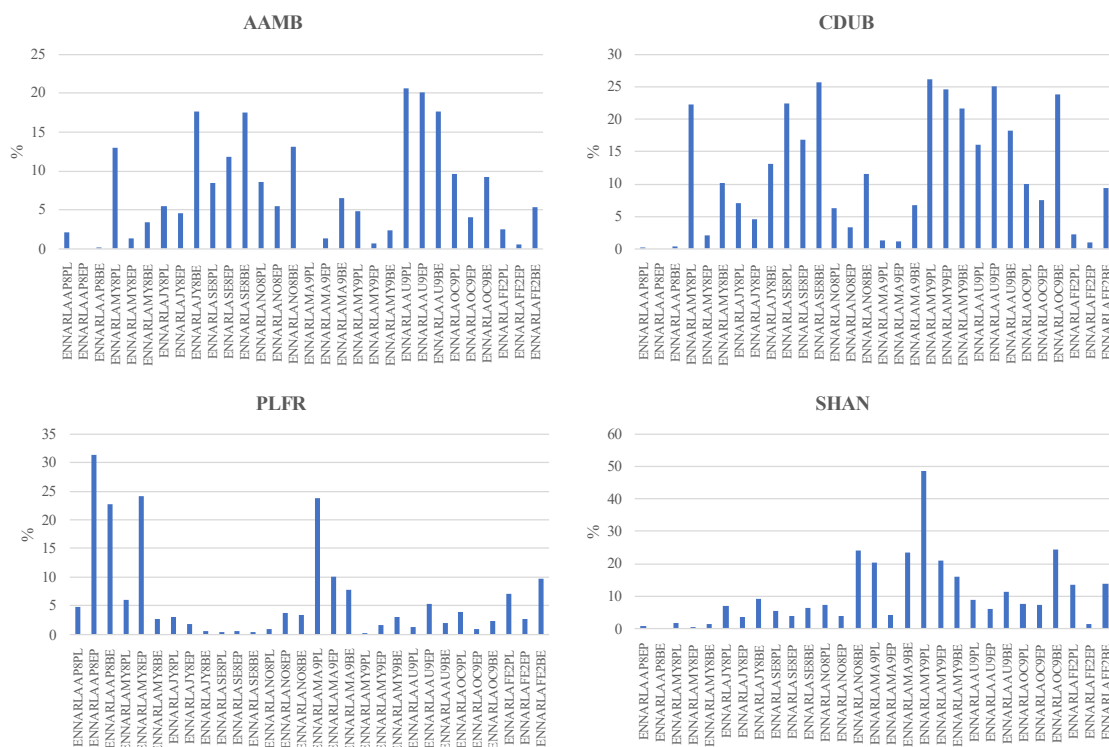
Ryc. 28. Procentowy udział w próbie gatunków absolutnie stałych i jednocześnie dominujących na stanowisku Dzierżenin: *Cocconeis placentula* (CPLA), *Fragilaria capucina* (FCAP), *Navicula tripunctata* (NTPT) oraz *Nitzschia fruticosa* (NIFT).

Cocconeis placentula był obecny we wszystkich próbach, a jego udział procentowy mieścił się w zakresie od 0,2% do 14,3%. Wzrost udziału procentowego odnotowano w próbach epifitonu z lipca, września i listopada 2018 roku, odpowiednio: 7,1%, 12,5% i 10,8% oraz w próbie potamoplanktonu z października 2019 roku – 14,3% (Ryc. 28). *Fragilaria capucina* została odnotowana w 26 próbach z udziałem procentowym w zakresie od 0,2% do 11,5%. Wysoki udział procentowy odnotowano w kwietniu 2018 roku we wszystkich próbach: potamoplankton – 7,0%, epifiton – 10,8% i epipelon – 6,9%. W większości prób, w kolejnych terminach poboru, udział nie przekraczał 1%. Natomiast wzrost liczebności stwierdzono w próbie epifitonu w maju 2019 roku – 6,1%, a następnie w próbie potamoplanktonu z lutego 2020 roku – 11,5% (Ryc. 28). *Navicula tripunctata* była obecna w 29 próbach, a jej udział procentowy wynosił od 0,2% do 11,2%. Wysoki udział procentowy stwierdzono w próbie potamoplanktonu z kwietnia 2018 roku – 6,1%, w próbie epifitonu z listopada 2018 roku – 6,1%, epipelonu w marcu 2019 roku – 6,3%, epifitonu z maja 2019 roku – 5,2% i ponownie wysoki wzrost liczebności w próbie epifitonu z lutego 2020 roku – 11,2% (Ryc. 28). Występowanie *Nitzschia fruticosa* potwierdzono we wszystkich próbach, a jej udział

procentowy wynosił od 0,2% do 27,1%. Wysoki udział procentowy odnotowano w jednej próbie w czasie prowadzenia badań w epifitonie z marca 2019 roku – 27,1% (Ryc. 28).

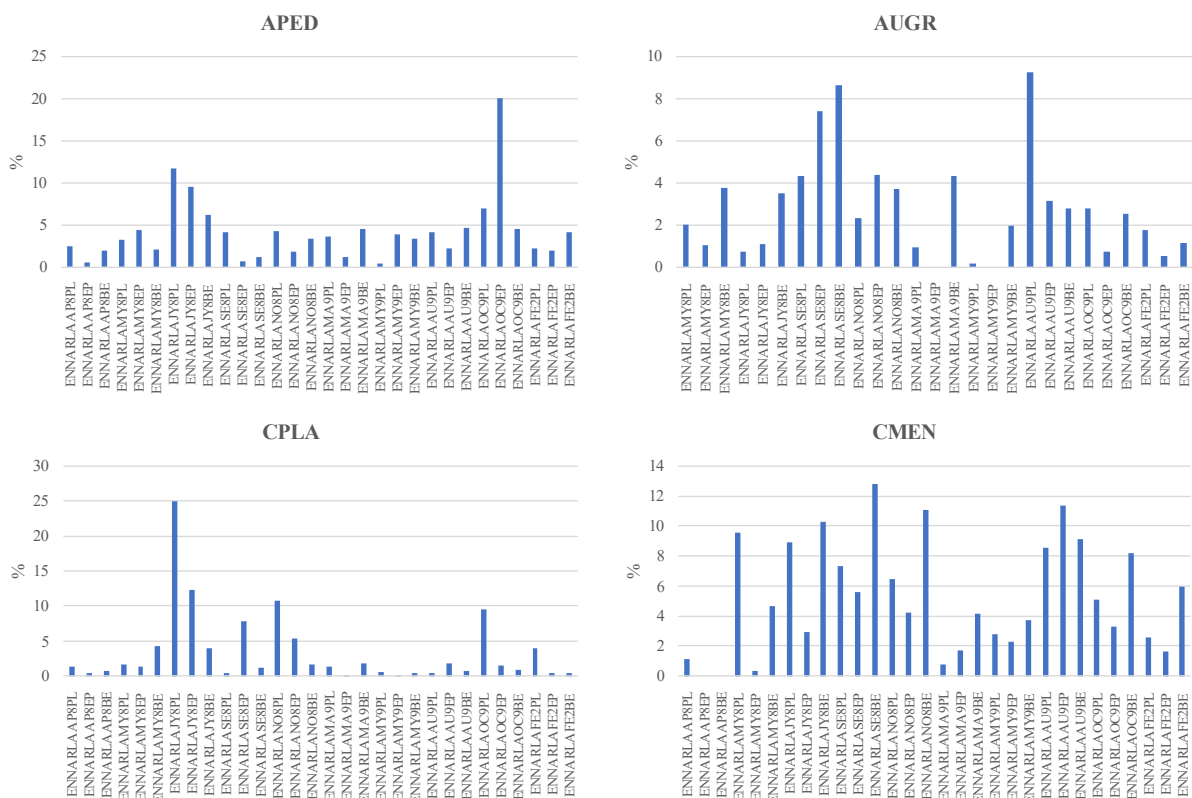
Łacha (LA) – rzeka Narew. Analizę jakościową zbiorowisk okrzemek przeprowadzono na podstawie 30 prób pobranych z trzech rodzajów siedlisk: toni wodnej, roślin zanurzonych w wodzie oraz mulistego dna. Łącznie zostało zidentyfikowanych 223 taksony okrzemek, wśród których głównie występowały gatunki akcesoryczne – 84,3%. Gatunki dominujące i subdominujące stanowiły odpowiednio 1,7% i 4,0% (Ryc. 17). Ze względu na stałość występowania główną grupę stanowiły gatunki przypadkowe – 55,6%, natomiast gatunki absolutnie stałe i stałe stanowiły odpowiednio 15,0% i 10,0% (Ryc. 16).

Gatunkami absolutnie stałymi były: *Achnantheidium eutrophilum*, *Amphora copulata*, *A. ovalis*, *A. pediculus*, *Aulacoseira ambigua*, *A. granulata*, *Cocconeis placentula*, *Cyclostephanos dubius*, *Cyclotella meneghiniana*, *Eolimna minima*, *Epithemia sorex*, *Fragilaria capucina*, *F. vaucheriae*, *Gomphonema acuminatum*, *G. olivaceum*, *G. pala*, *G. parvulum*, *Halamphora veneta*, *Hippodonta capitata*, *Lemnicola hungarica*, *Melosira varians*, *Navicula antonii*, *N. capitatoradiata*, *N. cryptotenella*, *N. reichardtiana*, *N. tripunctata*, *Nitzschia amphibia*, *N. fonticola*, *N. fruticosa*, *N. palea*, *Planothidium frequentissimum*, *P. lanceolatum*, *Pseudostaurosira brevistriata*, *Rhoicosphenia abbreviata*, *Stephanodiscus hantzschii* i *Ulnaria ulna*. Gatunkami dominującymi i jednocześnie absolutnie stałymi były: *Aulacoseira ambigua*, *Cyclostephanos dubius*, *Planothidium frequentissimum* oraz *Stephanodiscus hantzschii*. Do gatunków subdominujących i jednocześnie absolutnie stałych należy zaliczyć: *Amphora pediculus*, *Aulacoseira granulata*, *Cocconeis placentula*, *Cyclotella meneghiniana*, *Eolimna minima*, *Fragilaria capucina*, *F. vaucheriae*, *Melosira varians* i *Navicula tripunctata*.



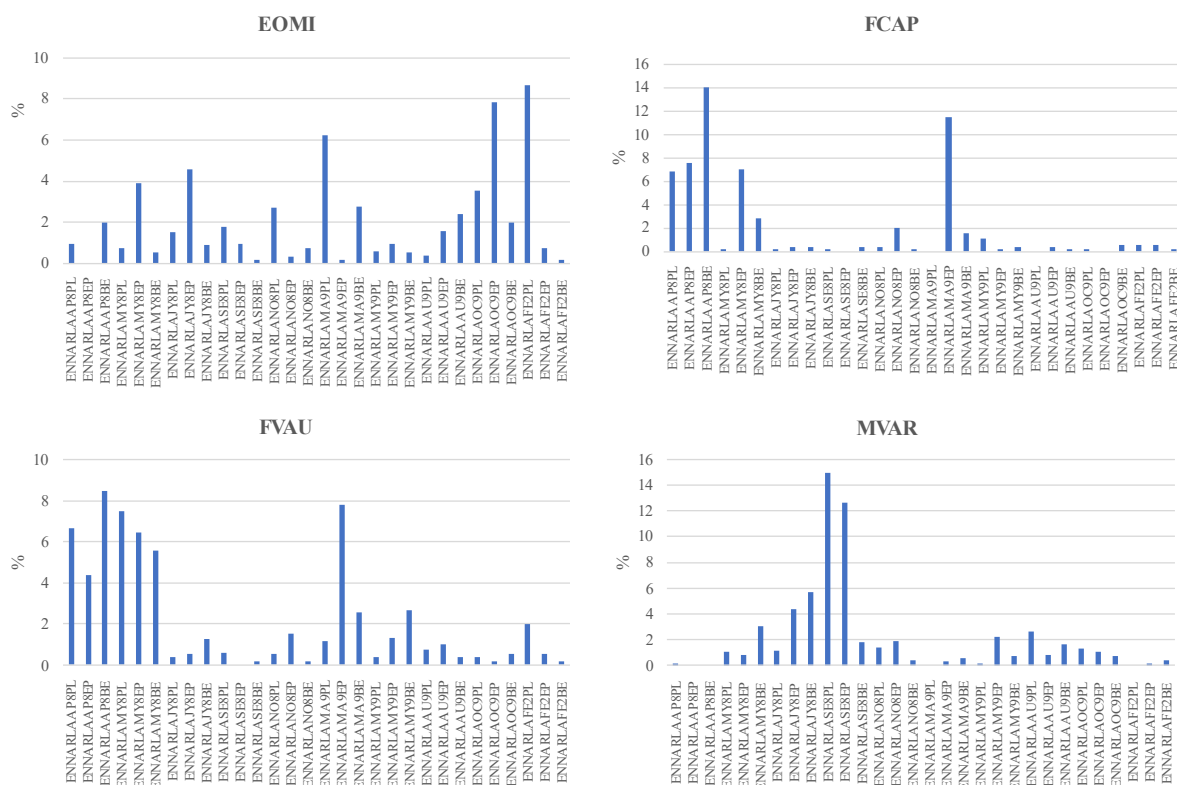
Ryc. 29. Procentowy udział w próbie gatunków absolutnie stałych i jednocześnie dominujących na stanowisku Łacha: *Aulacoseira ambigua* (AAMB), *Cyclostephanos dubius* (CDUB), *Planothidium frequentissimum* (PLFR) oraz *Stephanodiscus hantzschii* (SHAN).

Aulacoseira ambigua była obecna we wszystkich próbach, a jej udział procentowy mieścił się w zakresie od 0,7% do 20,7%, przy czym najwyższy udział procentowy odnotowano w próbach epipelonu w lipcu i wrześniu 2018 roku, odpowiednio – 17,6% i 17,5% oraz w próbach z sierpnia 2019 roku: potamoplankton – 20,7%, epifiton – 20,1%, epipelon – 17,7% (Ryc. 29). *Cyclostephanos dubius* stwierdzono we wszystkich próbach, a jego udział procentowy wynosił od 0,7% do 26,2%, przy czym wysoką liczebność odnotowano w próbie potamoplanktonu z maja 2018 roku – 22,3%, w próbach z września 2018 roku: potamoplankton – 22,5%, epifiton – 16,9 %, epipelon – 25,8%, w próbach z maja i sierpnia 2019 roku – ponad 15% na wszystkich podłożach oraz w epipelonie w październiku 2019 roku – 23,8% (Ryc. 29). *Planothidium frequentissimum* występował we wszystkich próbach, a jego udział procentowy mieścił się w zakresie od 0,7% do 31,0%, przy czym najwyższa liczebność została odnotowana w próbie epifitonu i epipelonu z kwietnia oraz epifitonu z maja 2018 roku – odpowiednio: 31,0%, 23,0% i 24,0% oraz próbie potamoplanktonu z maja 2019 roku – 23,9% (Ryc. 29). *Stephanodiscus hantzschii* był obecny w 28 próbach, a jego udział procentowy wynosił od 0,2% do 48,6%. Najwyższą liczebność odnotowano w próbie potamoplanktonu z maja 2019 roku – 48,6%, przy czym wysoki udział procentowy odnotowano także w próbach epipelonu z listopada 2018 roku oraz z maja i października 2019 roku – ponad 20% (Ryc. 29).



Ryc. 30. Procentowy udział w próbie gatunków absolutnie stałych i jednocześnie dominujących na stanowisku Łacha: *Amphora pediculus* (APED), *Aulacoseira granulata* (AUGR), *Cocconeis placentula* (CPLA) oraz *Cyclotella meneghiniana* (CMEN).

Amphora pediculus była obecna we wszystkich próbach, a jej udział procentowy mieścił się w zakresie od 0,2% do 20,1%, przy czym najwyższy udział procentowy odnotowano w próbie epifitonu z października 2019 roku – 20,1% (Ryc. 30). *Aulacoseira granulata* była stwierdzona we wszystkich próbach, a jej udział procentowy mieścił się w zakresie od 0,7% do 9,3%, przy czym najwyższy udział procentowy odnotowano w próbie epipelonu z września 2018 roku – 8,6% i potamoplanktonu z sierpnia 2019 roku – 9,3% (Ryc. 30). *Cocconeis placentula* był obecny we wszystkich próbach, a jego udział procentowy mieścił się w zakresie od 0,2% do 24,6%. Najwyższą liczebność odnotowano w próbie potamoplanktonu z lipca 2018 roku – 24,9% oraz udział procentowy powyżej 10% w próbach potamoplanktonu z listopada 2018 roku i epifitonu z lipca 2018 roku (Ryc.30). *Cyclotella meneghiniana* występowała w 28 próbach, a jej udział procentowy wynosił od 0,3% do 12,8%. Najwyższą liczebność odnotowano w próbach epipelonu z września i listopada 2018 roku oraz w epifitonie 2019 roku, ponad 10% (Ryc. 30).



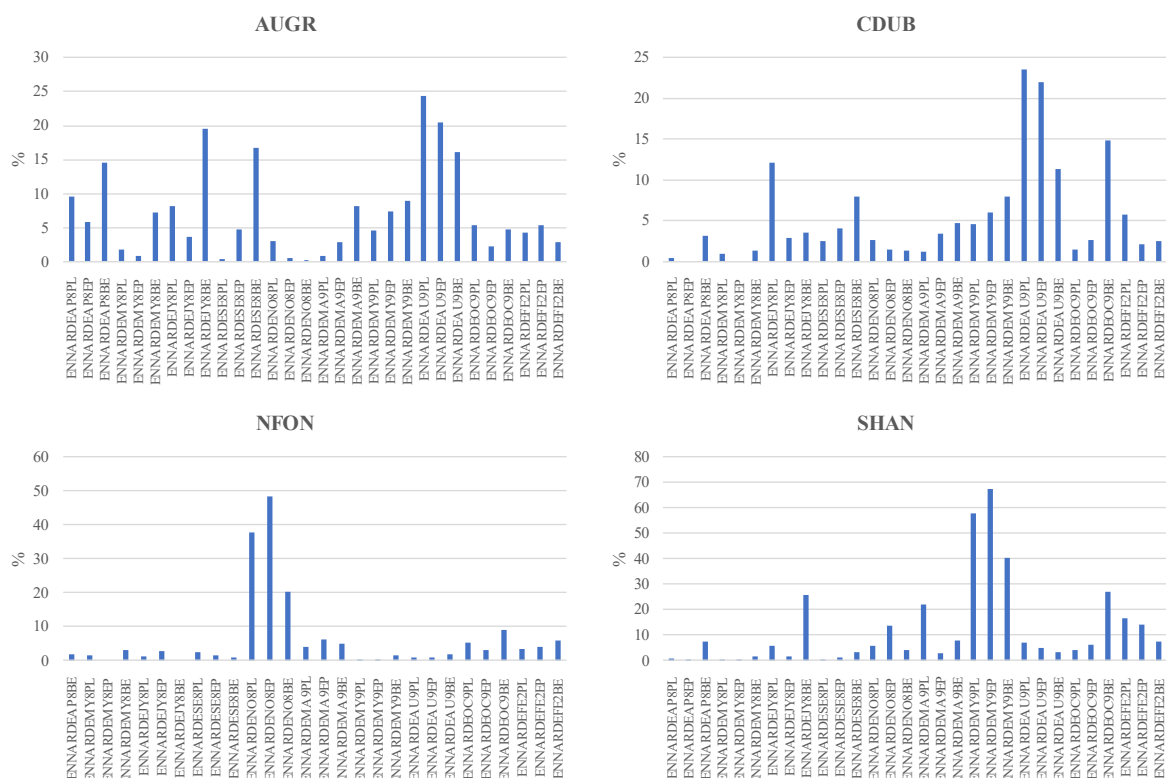
Ryc. 31. Procentowy udział w próbie gatunków absolutnie stałych i jednocześnie dominujących na stanowisku Łacha: *Eolimna minima* (EOMI), *Fragilaria capucina* (FCAP), *Fragilaria vaucheriae* (FVAU) oraz *Melosira varians* (MVAR).

Eolimna minima była obecna w 29 próbach, a jej udział procentowy wynosił od 0,2% do 8,7%. Wzrost liczebności zaznaczył się potamoplanktonie w marcu 2019 roku – 6,2% i potamoplanktonie w lutym 2020 roku – 8,7% oraz w próbie epifitonu z października 2019 roku – 7,8%. W pozostałych próbach nie przekroczył 5% udziału w próbie (Ryc. 31). *Fragilaria capucina* została stwierdzona w 26 próbach, a jej udział procentowy mieścił się w zakresie od 0,2% do 14,1%. Wzrost udziału procentowego widoczny jest we wszystkich próbach z kwietnia 2018 roku, a szczególnie w bentosie – 14,1%. Następnie wzrost liczebności odnotowano w epifitonie w marcu 2019 roku – 11,5% (Ryc. 31). *Fragilaria vaucheriae* była obecna w 29 próbach, a jej udział procentowy był w zakresie od 0,2% do 8,5%. Wysoki udział procentowy stwierdzono we wszystkich próbach z kwietnia i maja 2018 roku i marca 2019 roku – 7,8% (Ryc. 31). *Melosira varians* została odnotowana w 26 próbach, a z udziałem procentowym w zakresie od 0,2% do 15,0%. Wzrost liczebności widoczny jest w próbach z potamoplanktonu i epifitonu z września 2018 roku, odpowiednio: 15,0% i 12,6% (Ryc. 31).



Dębe (DE) – rzeka Narew. Analizę zbiorowisk okrzemek wykonano na podstawie 30 prób pobranych z trzech rodzajów siedlisk: toni wodnej, roślin wodnych oraz z betonu. Łącznie zostało zidentyfikowanych 165 taksonów okrzemek. W stanowisku Dębe głównie występowały gatunki akcesoryczne – 76,9%. Gatunki dominujące i subdominujące stanowiły 3,6% i 7,9% (Ryc. 17). Analiza klas stałości gatunków okrzemek w próbach wykazała, że główną grupę stanowiły gatunki przypadkowe – 53,3%, natomiast gatunki absolutnie stałe i stałe stanowiły odpowiednio: 15,1% i 13,3% (Ryc. 16).

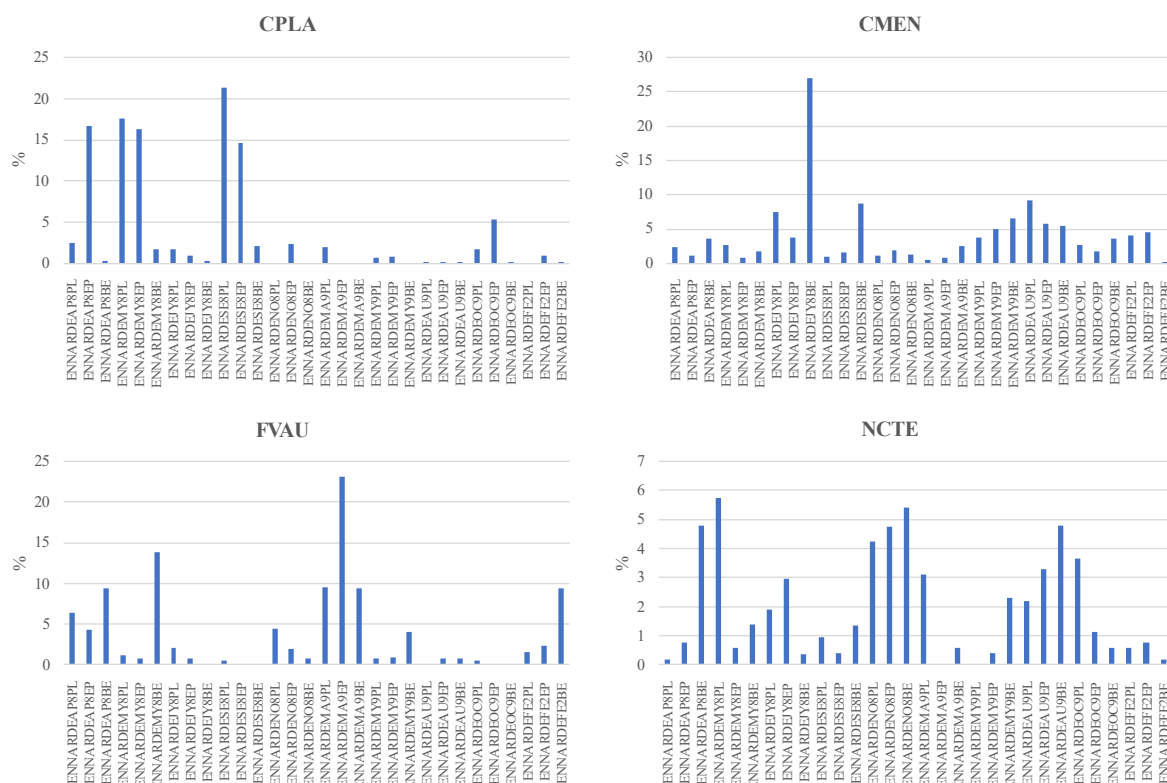
Gatunkami dominującymi i jednocześnie absolutnie stałymi były: *Aulacoseira granulata*, *Cyclostephanos dubius*, *Nitzschia fonticola* oraz *Stephanodiscus hantzschii* (Ryc. 33).



Ryc. 33. Procentowy udział w próbie gatunków absolutnie stałych i jednocześnie dominujących na stanowisku Dębe: *Aulacoseira granulata* (AUGR), *Cyclostephanos dubius* (CDUB), *Nitzschia fonticola* (NFON) oraz *Stephanodiscus hantzschii* (SHAN).

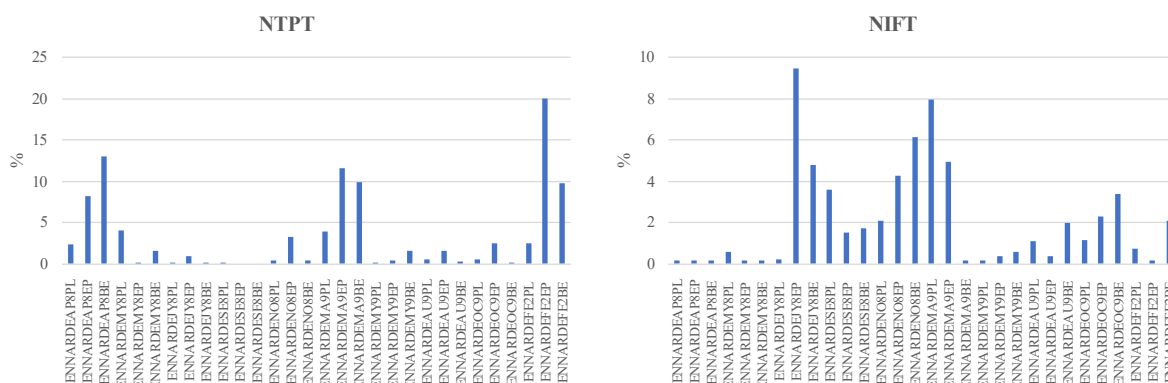
Aulacoseira granulata została stwierdzona we wszystkich próbach, a jej udział procentowy wynosił od 0,2% do 24,5%. Wyraźny wzrost udziału procentowego widoczny jest w próbach peryfitonu z kwietnia, lipca i września 2018 roku odpowiednio: 14,6%, 19,5% i 16,7% oraz we wszystkich próbach z sierpnia 2019 roku powyżej 16% (Ryc. 33). *Cyclostephanos dubius* był obecny w 28 próbach, a jego udział procentowy mieścił się w zakresie od 0,2% do 22,0%. Najwyższą liczebność w próbie odnotowano w planktonie w lipcu 2018 roku – 12,1% oraz w próbach z planktonu i epifitonu w sierpniu 2019 roku – ponad 20%. Wysoki udział odnotowano również w próbie z peryfitonu z października 2019 roku – 14,8% (Ryc. 33). *Nitzschia fonticola* była obecna w 26 próbach, a jej udział procentowy mieścił się w zakresie od 0,2% do 48,0%. Najwyższa liczebność w próbie została stwierdzona w listopadzie 2018 roku, odpowiedni: od 20,2% w peryfitonie do 48,3% w epifitonie (Ryc. 33). *Stephanodiscus hantzschii* został odnotowany we wszystkich próbach, a jego udział procentowy mieścił się w zakresie od 0,2% do 67,4%. Najwyższy jego udział procentowy stwierdzono we wszystkich próbach z maja 2019 roku od 40,3% w peryfitonie do 67,4% w epifitonie (Ryc. 33).

Do gatunków subdominujących i jednocześnie absolutnie stałych należą: *Cocconeis placentula*, *Cyclotella meneghiniana*, *Fragilaria vaucheriae*, *Navicula cryptotenella*, *N. tripunctata* i *Nitzschia fruticosa* (Ryc. 34 i 35).



Ryc. 34. Procentowy udział w próbie gatunków absolutnie stałych i jednocześnie subdominujących na stanowisku Dębe: *Cocconeis placentula* (CPLA), *Cyclotella meneghiniana* (CMEN), *Fragilaria vaucheriae* (FVAU) oraz *Navicula cryptotenella* (NCTE).

Cocconeis placentula stwierdzono w 24 próbach, a jego udział procentowy wynosił od 0,2% do 21,3%. Wyraźny wzrost udziału procentowego widoczny jest w próbach epifitonu z kwietnia, maja i września 2018 roku, odpowiednio: 16,7%, 16,4% i 14,6% oraz w próbach planktonu z maja i września 2018 roku, odpowiednio: 17,6% i 21,3% (Ryc. 34). *Cyclotella meneghiniana* była obecna we wszystkich próbach, a jej udział procentowy wynosił od 0,2% do 27,1%. Najliczniej występowała w próbie peryfitonu z lipca 2018 roku – 27,1% (Ryc. 34). *Fragilaria vaucheriae* była stwierdzona w 24 próbach, a jej udział procentowy wynosił od 0,2% do 23,0%. Najwyższy jej udział procentowy odnotowano w epifitonie z marca 2018 roku – 23,0% (Ryc. 34). *Navicula cryptotenella* odnotowana została w 28 próbach, a jej udział procentowy wynosił od 0,2% do 5,7%. Powyżej 5% udziału stwierdzono w próbie planktonu z maja 2018 roku i peryfitonu w listopadzie 2018 roku (Ryc. 34).

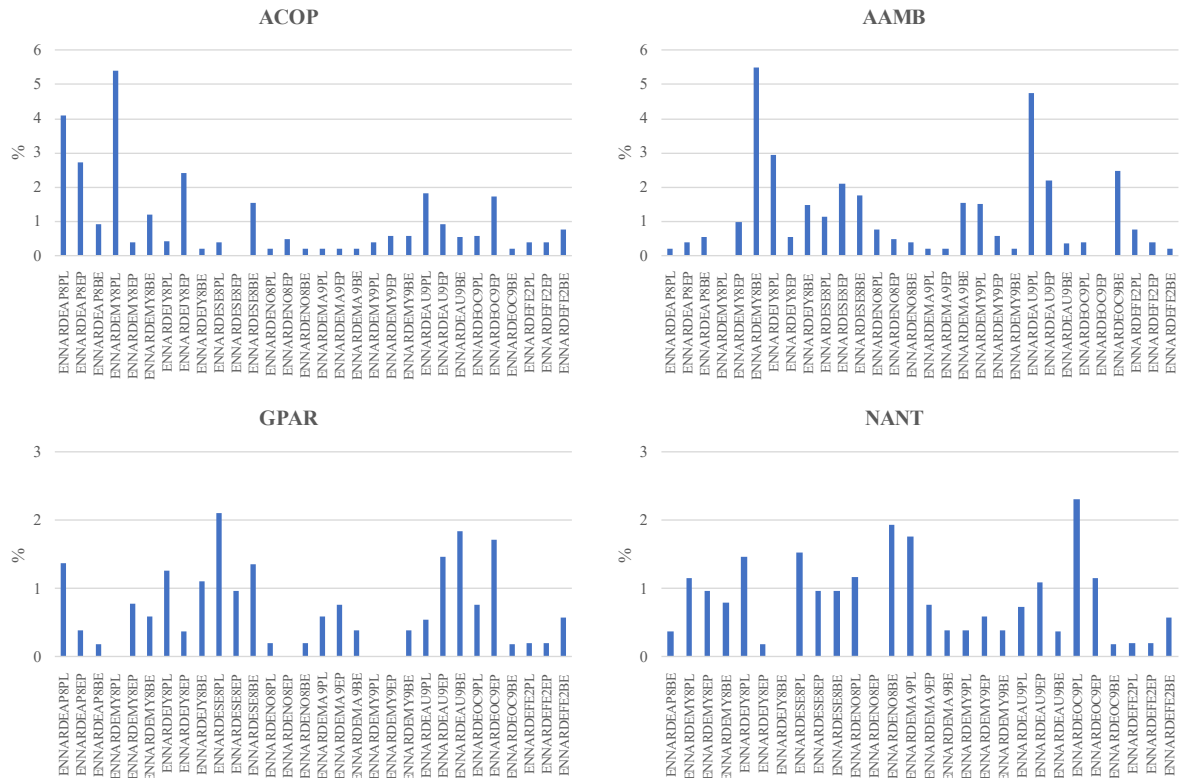


Ryc. 35. Procentowy udział w próbie gatunków absolutnie stałych i jednocześnie subdominujących na stanowisku Debe *Navicula tripunctata* (NTPT) i *Nitzschia fruticosa* (NIFT).

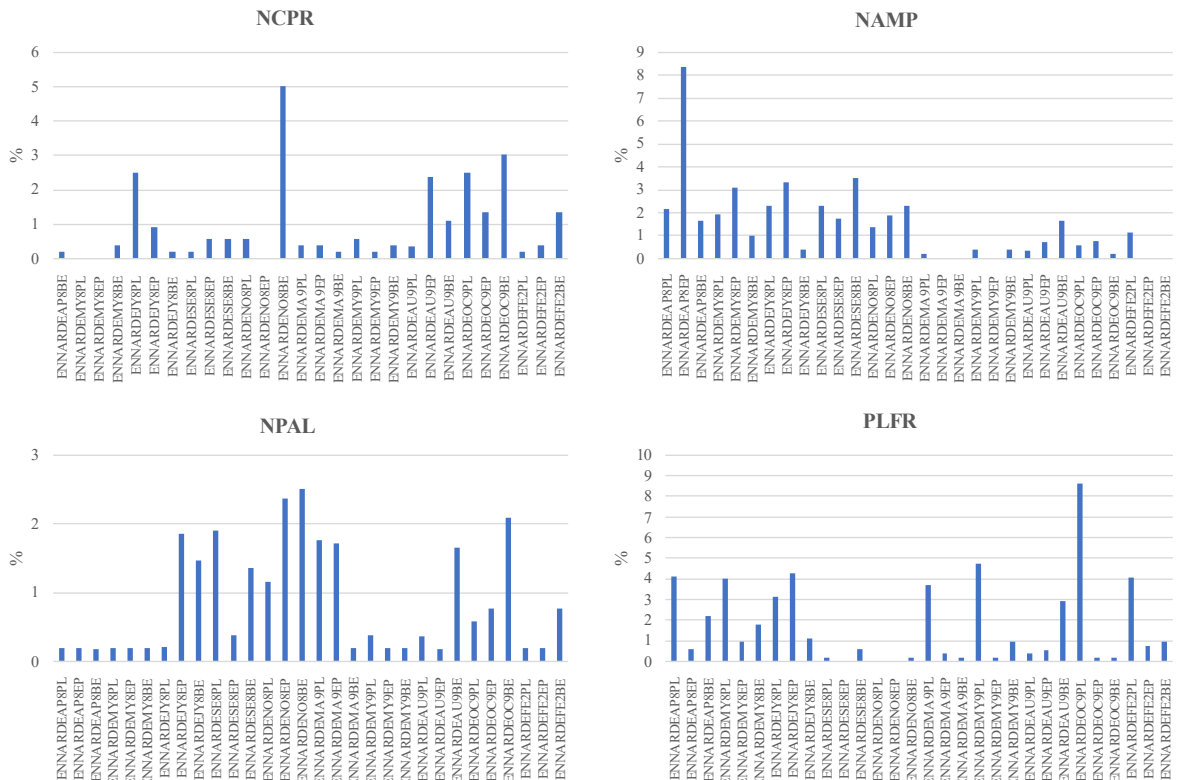
Navicula tripunctata była obecna w 28 próbach, a jej udział procentowy wynosił od 0,2% do 20,0%. Najliczniej występowała w epifitonie z lutego 2020 roku – 20,0%. Wysoki jej udział procentowy, ponad 10%, odnotowano w peryfitonie z kwietnia 2018 roku oraz epifitonie i peryfitonie w marcu 2019 roku (Ryc. 35). *Nitzschia fruticosa* była stwierdzona we wszystkich próbach, a jej udział procentowy wynosił od 0,2% do 9,5%. Wzrost udziału procentowego odnotowano w epifitonie w lipcu 2018 roku – 9,5%, oraz w listopadzie 2018 roku w próbie z peryfitonu – 6,2%. Następnie w próbach planktonu w marcu 2019 roku udział w próbie wynosił 8%, a peryfitonu 5% (Ryc. 35).

Gatunkami absolutnie stałymi o udziale w próbie poniżej 5% były: *Amphora copulata*, *Aulacoseira ambigua*, *Cymbella compacta*, *Encyonema caespitosum*, *Gomphonema parvulum*, *Navicula antonii*, *N. capitatoradiata*, *Nitzschia amphibia*, *N. palea*, *Planothidium frequentissimum*, *Rhoicosphenia abbreviata*, *Ulnaria ulna* i *U. delicatissima* (Ryc. 36,37,38.).

Amphora copulata była stwierdzona w 29 próbach, a jej udział procentowy w próbie wynosił od 0,2% do 5,4%, przy czym udział procentowy powyżej 5% odnotowano w jednej próbie planktonu z maja 2018 roku (Ryc. 36). *Aulacoseira ambigua* była obecna w 28 próbach, a jej udział procentowy w próbie wynosił od 0,2% do 5,5%, przy czym najwyższy udział procentowy odnotowano w próbie peryfitonu z maja 2018 roku (Ryc. 36). *Gomphonema parvulum* wystąpiła w 26 próbach, a jej udział procentowy mieścił się w zakresie od 0,2% do 2,1%. Najwyższy udział procentowy stwierdzono w próbie planktonu września 2018 roku – 2,1% (Ryc. 36). *Navicula antonii* była obecna w 26 próbach, a jej udział procentowy wynosił od 0,2% do 2,3%. Najwyższy udział procentowy widoczny był w próbie planktonu z października 2019 roku – 2,3% (Ryc. 36).

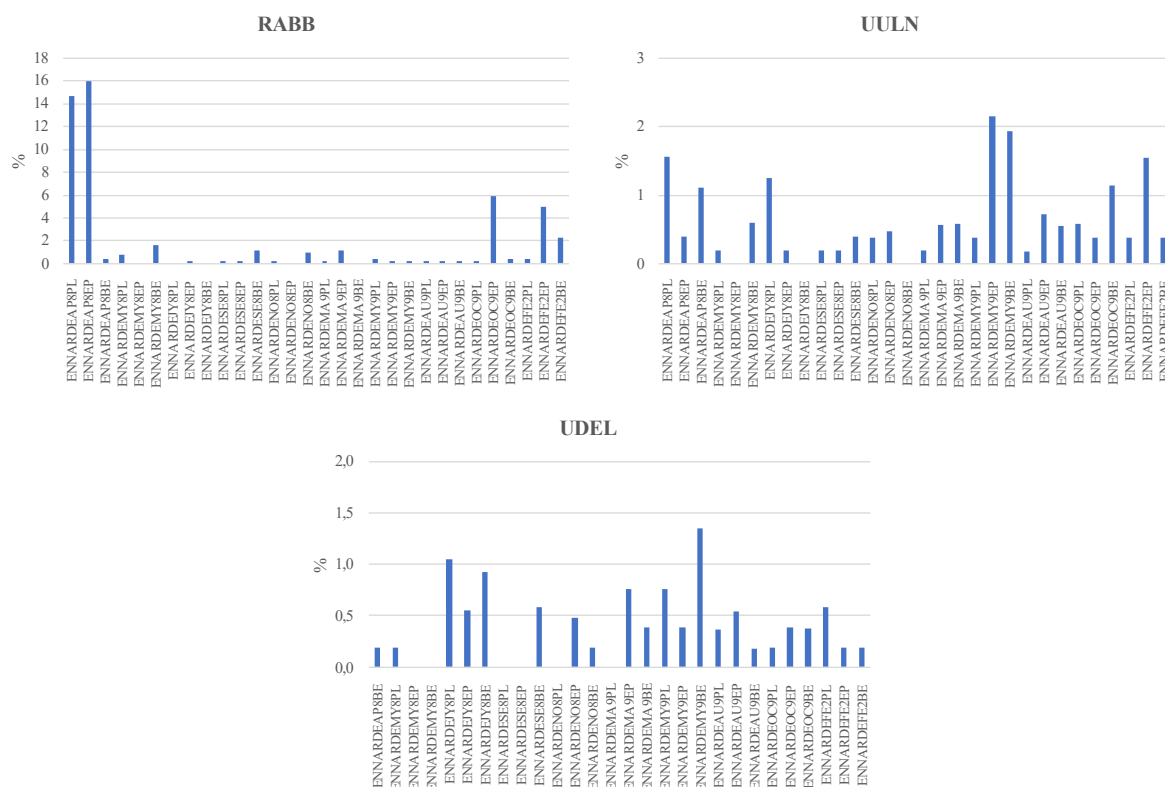


Ryc. 36. Procentowy udział w próbie gatunków absolutnie stałych z udziałem średnim w próbie poniżej 5,0% na stanowisku Dębe: *Amphora copulata* (ACOP), *Aulacoseira ambigua* (AAMB), *Gomphonema parvulum* (GPAR) oraz *Navicula antonii* (NANT).



Ryc. 37. Procentowy udział w próbie gatunków absolutnie stałych, w tym z udziałem średnim w próbie poniżej 5,0% na stanowisku Dębe: *Navicula capitatoradiata* (NCPR), *Nitzschia amphibia* (NAMP), *Nitzschia palea* (NPAL) oraz *Planothidium frequentissimum* (PLFR).

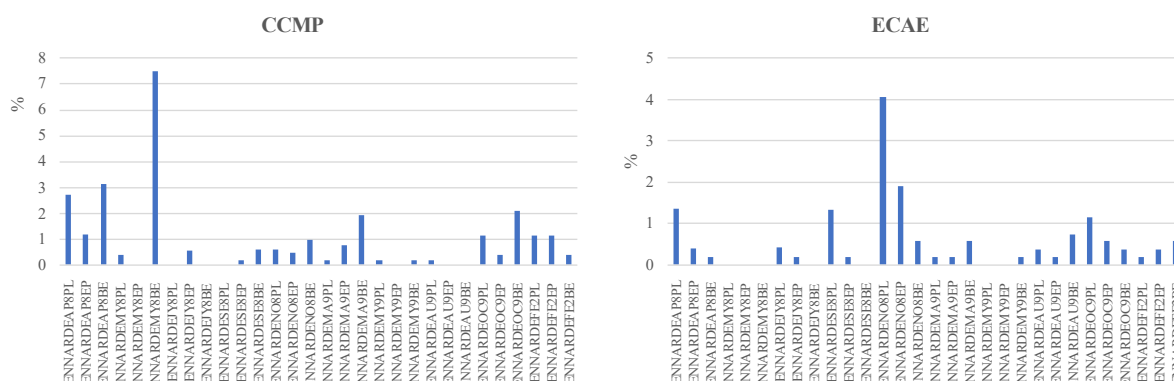
Navicula capitatoradiata była obecna w 25 próbach, a jej udział procentowy mieścił się w zakresie od 0,2% do 5,0%. Najwyższy udział procentowy odnotowano w próbie peryfitonu z listopada 2018 roku – 5,0% (Ryc. 37). *Nitzschia amphibia* została stwierdzona w 25 próbach, a jej udział procentowy mieścił się w zakresie od 0,2% do 8,4%. Z wysokim udziałem procentowym wystąpiła raz w czasie prowadzenia badań w próbie epifitonu z kwietnia 2018 roku – 8,4%. (Ryc. 37). *Nitzschia palea* była notowana we wszystkich próbach, a jej udział procentowy wynosił od 0,2% do 2,5%. Wyższy udział procentowy odnotowano w próbach epifitonu i peryfitonu z listopada 2018 roku – ponad 2% (Ryc. 37). *Planothidium frequentissimum* był obecny w 27 próbach, a jego udział procentowy wynosił od 0,2% do 8,6%. Najwyższy jego udział procentowy, ponad 5%, odnotowano w próbach planktonu z października 2019 roku – 8,6% (Ryc. 37).



Ryc. 38. Procentowy udział w próbie gatunków absolutnie stałych z udziałem średnim w próbie poniżej 5,0% na stanowisku Dębe: *Rhoicosphenia abbreviata* (RABB), *Ulnaria ulna* (UULN) oraz *Ulnaria delicatissima* (UDEL).

Rhoicosphenia abbreviata była obecna w 25 próbach, a jej udział procentowy wynosił od 0,2% do 16,0%. Najwyższy udział procentowy odnotowano w próbach planktonu i epifitonu w kwietniu 2018 roku, odpowiednio: 14,6% i 16,5%. Następnie w większości prób jej liczebność nie przekraczała 2% udziału w próbie. Nieznaczny wzrost liczebności odnotowano w próbach epifitonu na przełomie 2019 i 2020 roku – ponad 5% (Ryc. 38). *Ulnaria ulna* została

stwierdzona w 27 próbach, a jej udział procentowy mieścił się w zakresie od 0,2% do 2,1% (Ryc. 38). *Ulnaria delicatissima* była obecna w 25 próbach, a jej udział procentowy wynosił od 0,2% do 1,4% (Ryc. 38).



Ryc. 39. Procentowy udział w próbie gatunków absolutnie stałych z udziałem średnim w próbie poniżej 5,0% na stanowisku Dębe: *Cymbella compacta* (CCMP), *Encyonema caespitosum* (ECAE).

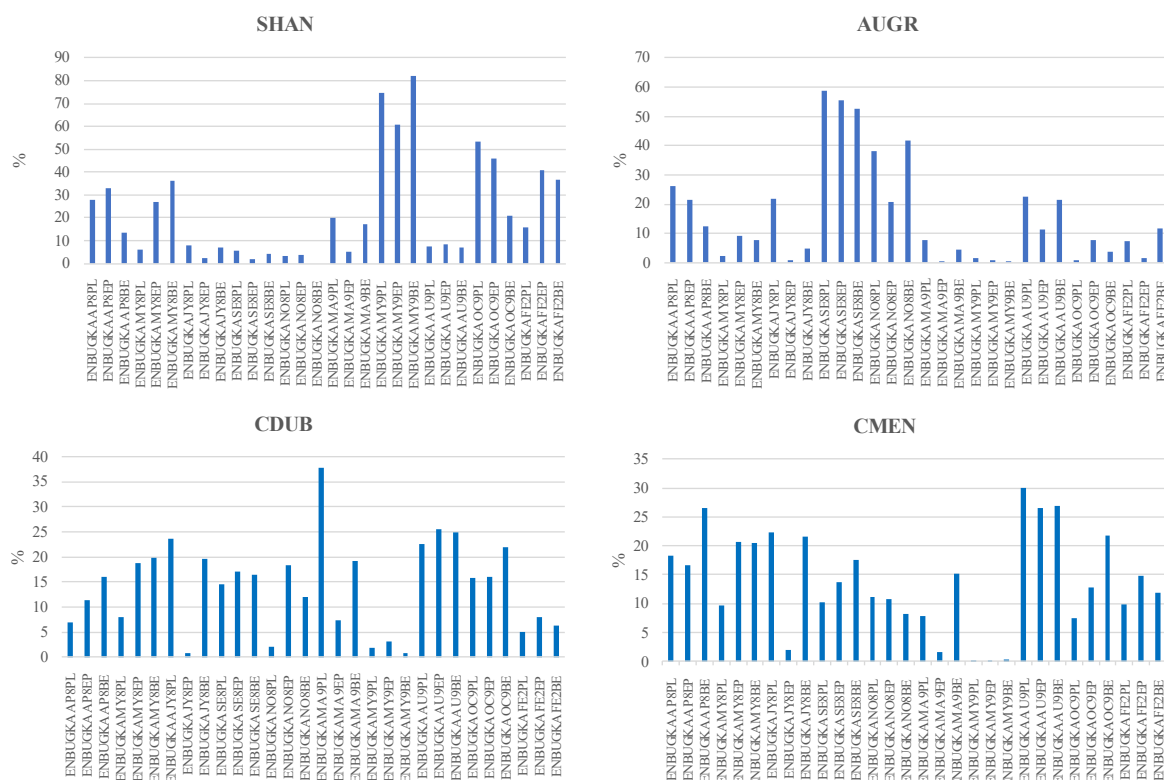
Cymbella compacta była obecna w 23 próbach, a jej udział procentowy mieścił się w zakresie od 0,2% do 7,5%. Wzrost udziału procentowego zaznaczył się w jednej próbie z peryfitonu w maju 2018 roku – 7,5% (Ryc. 39). *Encyonema caespitosum* występowała w 23 próbach, a jej udział procentowy wynosił od 0,2% do 4,1%. Wzrost liczebności odnotowano w próbie planktonu z listopada 2018 roku – 4,1% (Ryc. 39).

Kamieńczyk (KA) – rzeka Bug. Analizę jakościową zbiorowisk okrzemek wykonano na podstawie 30 prób pobranych z trzech rodzajów siedlisk: toni wodnej, roślin zanurzonych w wodzie oraz mulistego dna. Łącznie zostało zidentyfikowanych 196 taksonów okrzemek, wśród których głównie występowały gatunki akcesoryczne – 95,4%. Gatunki dominujące i subdominujące stanowiły odpowiednio 22,5% i 0,5% (Ryc. 17). Ze względu na stałość występowania główną grupę stanowiły gatunki przypadkowe – 49,4%, natomiast gatunki absolutnie stałe i stałe stanowiły odpowiednio: 20,4% i 12,7% (Ryc. 16).

Gatunkami absolutnie stałymi na stanowisku Kamieńczyk były: *Amphora copulata*, *A. pediculus*, *Aulacoseira ambigua*, *A. granulata*, *Cocconeis neodiminuta*, *C. placentula*, *Cyclostephanos dubius*, *Cyclotella meneghiniana*, *Cymatopleura apiculata*, *Fragilaria capucina*, *Geissleria decussis*, *Gomphonema olivaceum*, *G. parvulum*, *Navicula antonii*, *N. capitatoradiata*, *N. slesvicensis*, *N. tripunctata*, *N. trivialis*, *Nitzschia amphibia*, *N. capitellata*, *N. dissipata* var. *media*, *N. fonticola*, *N. fruticosa*, *N. intermedia*, *N. linearis*, *N. palea*, *Planothidium frequentissimum*, *Pseudostaurosira brevistriata*, *Sellaphora pupula*,

Staurosira martyi, *S. venter*, *Staurosirella pinnata*, *Stephanodiscus hantzschii*, *Tryblionella hungarica*, *T. apiculata*, *T. calida*, *T. levidensis*, *Ulnaria delicatissima* i *U. ulna*.

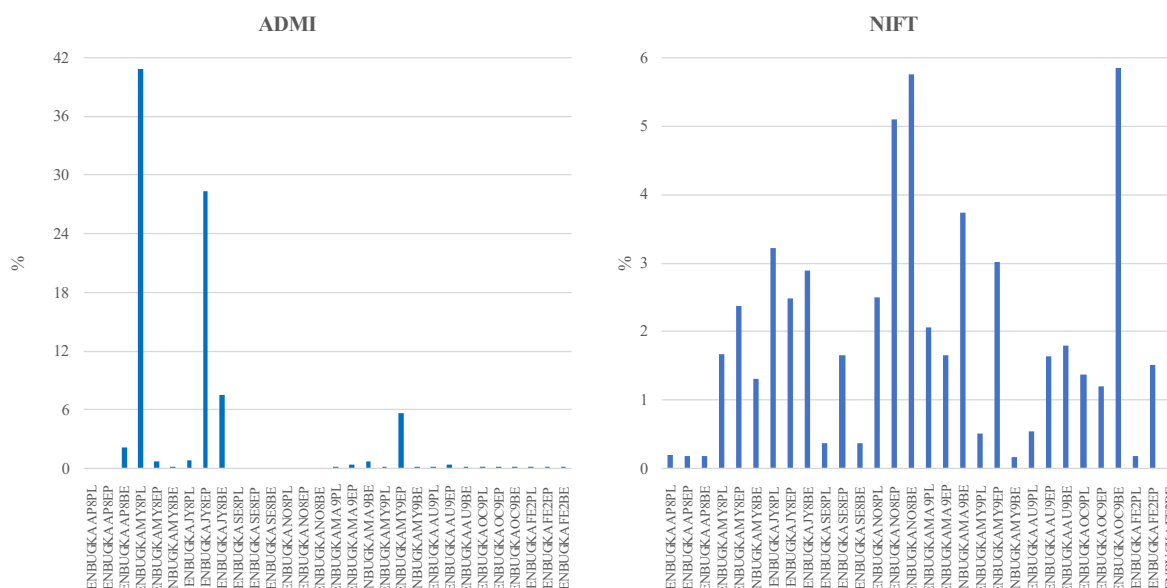
Gatunkami dominującymi i jednocześnie absolutnie stałymi były: *Aulacoseira granulata*, *Cyclostephanos dubius*, *Cyclotella meneghiniana* oraz *Stephanodiscus hantzschii* (Ryc. 40). Do gatunków subdominujących i jednocześnie stałych należy zaliczyć *Achnantheidium minutissimum*, natomiast gatunkiem absolutnie stałym jednak zaklasyfikowanym do influentów jest *Nitzschia fruticosa* (Ryc. 41).



Ryc. 40. Procentowy udział w próbie gatunków absolutnie stałych i dominujących na stanowisku Kamieńczyk: *Stephanodiscus hantzschii* (SHAN), *Aulacoseira granulata* (AUGR), *Cyclostephanos dubius* (CDUB) oraz *Cyclotella meneghiniana* (CMEN).

Stephanodiscus hantzschii był obecny w 29 próbach, a jego udział procentowy wynosił od 2,3% do 82,3%, przy czym najwyższy udział odnotowano w próbach ze wszystkich siedlisk w maju 2019 roku: potamoplankton – 74,7%, epifiton – 60,7% i bentos – 82,3%. Powyżej 50% udziału w próbie odnotowano w potamoplanktonie w październiku 2019 roku (Ryc. 40). *Aulacoseira granulata* była stwierdzona we wszystkich próbach, a jej udział procentowy mieścił się w zakresie od 0,3% do 58,9%, przy czym najwyższy udział procentowy odnotowano w próbach ze wszystkich siedlisk we wrześniu 2018 roku – powyżej 50% (Ryc. 40). *Cyclostephanos dubius* był obecny we wszystkich próbach, a jego udział procentowy wynosił od 3,0% do 37,8%, przy czym najwyższy udział procentowy odnotowano w próbach

potamoplanktonu z marca 2019 roku. Również wysoką liczebnością, powyżej 20%, wyróżniały się próby z potamoplanktonu z lipca 2018 roku oraz wszystkie próby z sierpnia 2018 roku, a także próba z epipelonu z października 2019 roku (Ryc. 40). *Cyclotella meneghiniana* była stwierdzona we wszystkich próbach z udziałem procentowym w zakresie od 0,2% do 29,9%. Najwyższy udział procentowy odnotowano w próbach z sierpnia 2019 roku – ponad 25%. Przeciwnie, bardzo niska liczebność została stwierdzona w trzech próbach z maja 2019 roku – poniżej 0,3% (Ryc. 40).



Ryc. 41. Procentowy udział w próbie gatunków na stanowisku Kamieńczyk: *Achnanthidium minutissimum* (ADMI) i *Nitzschia fruticosa* (NIFT).

Achnanthidium minutissimum oznaczono w 22 próbach, w większości prób z niskim udziałem procentowym (0,2 – 0,7%). Natomiast w dwóch próbach gatunek ten wystąpił z wysokim udziałem procentowym: w próbie z potamoplanktonu z maja 2018 roku – 41,0% i w próbie z epifitonu z lipca 2018 roku – 28,3% (Ryc. 41). Natomiast *Nitzschia fruticosa* była stwierdzona we wszystkich próbach, a jej udział procentowy wynosił od 0,2% do 5,9%. Najwyższy udział procentowy, powyżej 5%, notowano w próbie epifitonu i epipelonu z listopada 2018 roku oraz w próbie epipelonu z października 2019 roku (Ryc. 41).

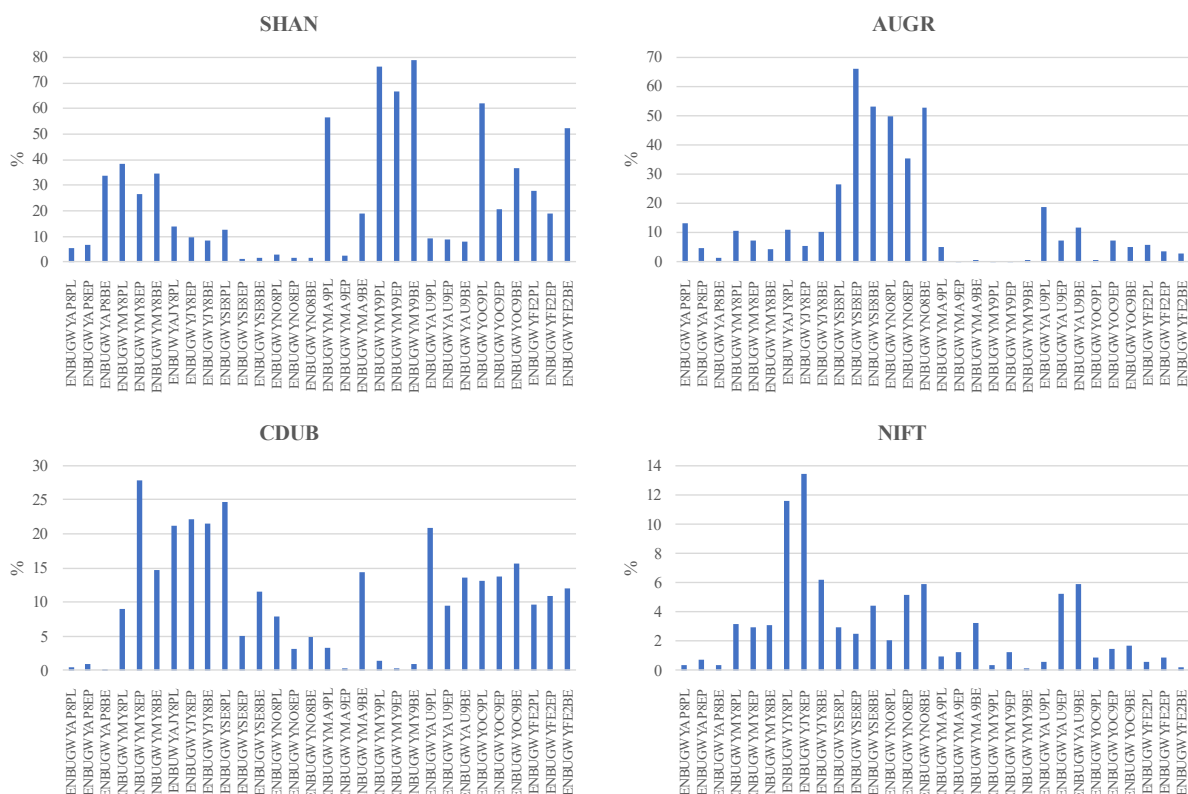
Wyszków (WY) – rzeka Bug. Analizę jakościową zbiorowisk okrzemek wykonano na podstawie 30 prób pobranych z trzech rodzajów siedlisk: toni wodnej, roślin zanurzonych w wodzie oraz mulistego dna. Łącznie zostało zidentyfikowanych 210 taksonów okrzemek, wśród których głównie występowały gatunki akcesoryczne – 91,0%. Gatunki dominujące i subdominujące stanowiły po 1,9% (Ryc. 17). Ze względu na stałość występowania główną

grupę stanowiły gatunki przypadkowe – 47,0%, natomiast gatunki absolutnie stałe i stałe stanowiły odpowiednio: 25,0% i 10,0% (Ryc. 16).

Gatunkami absolutnie stałymi były: *Achnanthidium minutissimum*, *Amphora copulata*, *A. pediculus*, *Aulacoseira ambigua*, *A. granulata*, *Cocconeis neodiminuta*, *C. euglypta*, *C. placentula*, *Cyclostephanos dubius*, *Cyclotella meneghiniana*, *Cymatopleura apiculata*, *Encyonema lange-bertalotii*, *Eolimna minima*, *E subminuscule*, *Epithemia adnata*, *E. gibba*, *E. sorex*, *Fragilaria capucina*, *Geissleria decussis*, *Gomphonema micropus*, *G. olivaceum*, *G. parvulum*, *G. pumilum*, *Gyrosigma acuminatum*, *Halamphora veneta*, *Hippodonta capitata*, *Lemnicola hungarica*, *Karayevia clevei*, *Melosira varians*, *Navicula antonii*, *N. capitatoradiata*, *N. cincta*, *N. cryptocephala*, *N. gregaria*, *N. moskali*, *N. radiosa*, *N. recens*, *N. reichardtiana*, *N. reinhardtii*, *N. slesvicensis*, *N. tripunctata*, *N. trivialis*, *N. veneta*, *N. viridula*, *Nitzschia acicularis*, *N. amphibia*, *N. capitellata*, *N. dissipata* var. *media*, *N. fonticola*, *N. fruticosa*, *N. inconspicua*, *N. intermedia*, *N. linearis*, *N. palea*, *N. recta*, *N. sigmoidea*, *Planothidium frequentissimum*, *P. lanceolatum*, *P. rostratum*, *Pseudostaurosira brevistriata*, *Sellaphora pupula*, *Staurosira martyi*, *S. venter*, *Staurosirella pinnata*, *Stephanodiscus hantzschii*, *Surirella brébissonii* var. *kuetzingii*, *Thalassiosira weissflogii*, *Tryblionella hungarica*, *T. apiculata*, *T. calida*, *T. levidensis*, *Ulnaria delicatissima* i *U. ulna*.

Gatunkami dominującymi były: *Aulacoseira granulata*, *Cyclostephanos dubius*, *Cyclotella meneghiniana* oraz *Stephanodiscus hantzschii*.

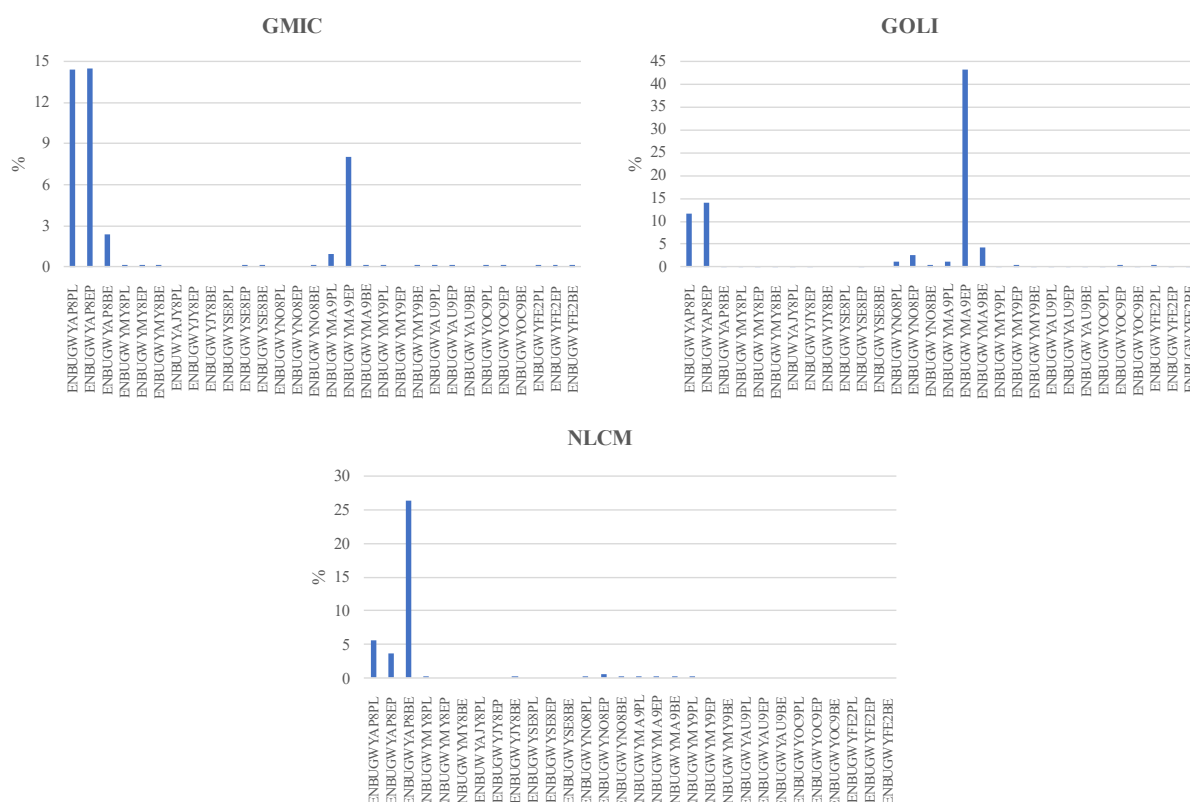
Gatunkami jednocześnie absolutnie stałymi i dominującymi dla badanego stanowiska były: *Aulacoseira granulata*, *Cyclostephanos dubius*, *Cyclotella meneghiniana*, *Nitzschia fruticosa* oraz *Stephanodiscus hantzschii* (Ryc. 42).



Ryc. 42. Procentowy udział w próbie gatunków absolutnie stałych i dominujących na stanowisku Wyszków: *Stephanodiscus hantzschii* (SHAN), *Aulacoseira granulata* (AUGR), *Cyclostephanos dubius* (CDUB) oraz *Nitzschia fruticosa* (NIFT).

Stephanodiscus hantzschii był obecny we wszystkich próbach, a jego udział procentowy wynosił od 1,4% do 76,0%, przy czym najwyższy udział procentowy odnotowano w próbie potamoplanktonu z marca 2019 roku – 56,4% oraz w próbach ze wszystkich siedlisk z maja 2019 roku – powyżej 65%. Również wysoki udział, ponad 50%, odnotowano w potamoplanktonie w październiku 2019 roku oraz w epipelonie w lutym 2020 roku (Ryc. 42). *Aulacoseira granulata* występowała we wszystkich próbach, a jej udział procentowy mieścił się w zakresie od 0,2% do 66,1%. Wysoki udział procentowy odnotowano w próbach ze wszystkich siedlisk z września i listopada 2018 roku (Ryc. 42). *Cyclostephanos dubius* był stwierdzony we wszystkich próbach, a jego udział procentowy wynosił od 0,3% do 27,0%. Wysoki udział procentowy odnotowano w próbach epifitonu z maja 2018 roku oraz we wszystkich próbach z czerwca 2018 roku. Licznie występował również w próbie potamoplanktonu we wrześniu 2018 roku. Ponownie wyższy udział stwierdzono w próbie potamoplanktonu z sierpnia 2019 roku – ponad 20% (Ryc. 42). *Nitzschia fruticosa* była obecna we wszystkich próbach, a jej udział procentowy mieścił się w zakresie od 0,2% do 13,4%. Wysoki udział procentowy odnotowano w próbach potamoplanktonu i epifitonu z maja 2018 roku (Ryc. 42).

Gatunkami wyróżniającymi się wysokim udziałem procentowym w kilku próbach w czasie prowadzenia badań były: *Gomphonema micropus*, *G. olivaceum* oraz *Navicula lacuum* (Ryc. 43).



Ryc. 43. Procentowy udział w próbie gatunków na stanowisku Wyszaków: *Gomphonema micropus* (GMIC), *Gomphonema olivaceum* (GOLI) oraz *Navicula lacuum* (NLCM).

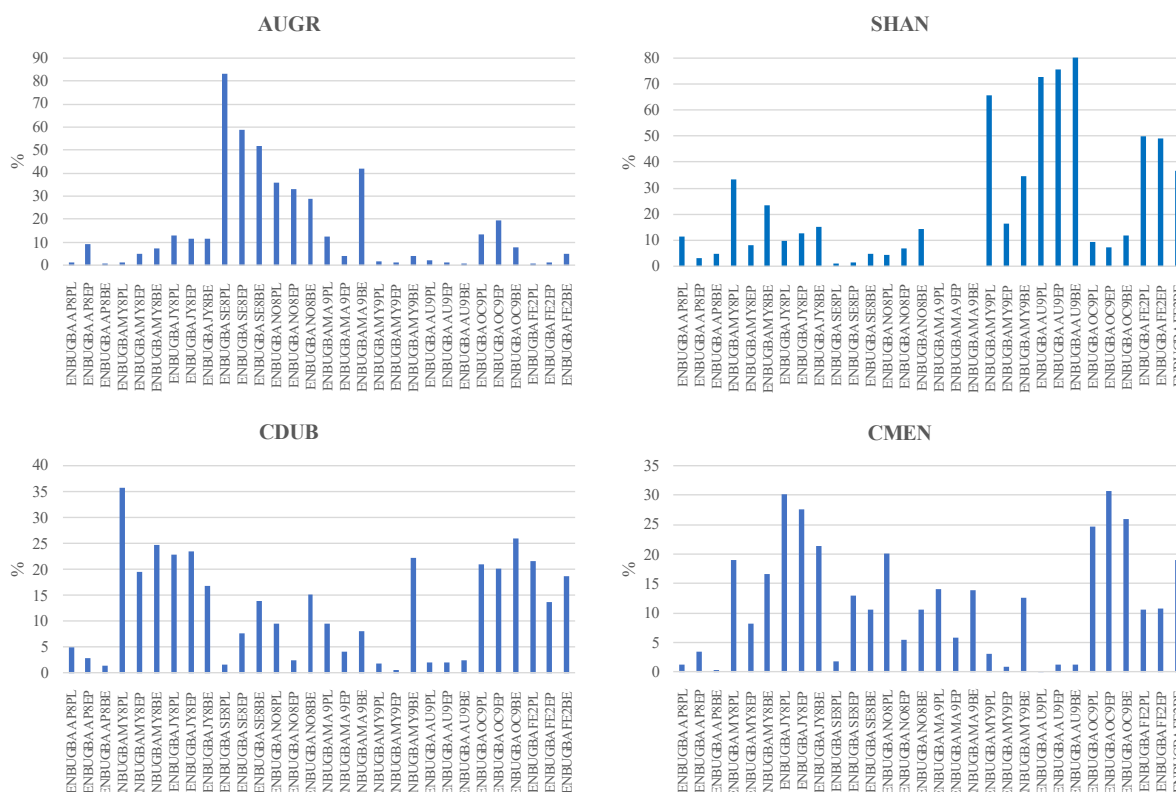
Gomphonema micropus obecna była w 21 próbach. Najwyższy udział procentowy, powyżej 14%, stwierdzono w dwóch próbach z kwietnia 2018 roku – w planktonie i epifitonie. Jednak w większości prób jej udział procentowy był na niskim poziomie – 0,2%. Odnotowano również jednorazowo wzrost liczebności w 2019 roku w próbie epifitonu w marcu – 8,1% (Ryc. 43). *Gomphonema olivaceum* została odnotowana w 27 próbach. Najwyższy jej udział procentowy wyniósł powyżej 43% w próbie epifitonu z marca 2019 roku. W większości prób jej udział procentowy był na niskim poziomie i wynosił 0,2%. Stwierdzono również udział powyżej 10% w próbach z potamoplanktonu i epifitonu w kwietniu 2018 roku (Ryc. 43). *Navicula lacuum* obecna była jedynie w 12 próbach, w tym szczególnie zaznacza się udział procentowy tego gatunku w próbach z kwietnia 2018 roku: potamoplankton – 5,6%, epifiton – 3,6%, bentos – 26,3% (Ryc. 43).

Barcice (BA) – rzeka Bug. Analizę jakościową zbiorowisk okrzemek wykonano na podstawie 30 prób pobranych z trzech rodzajów siedlisk: toni wodnej, roślin zanurzonych w wodzie oraz mulistego dna. Łącznie zostało zidentyfikowanych 218 taksonów okrzemek, wśród których głównie występowały gatunki akcesoryczne – 94,0%. Gatunki dominujące i subdominujące stanowiły odpowiednio 1,8% i 2,7% (Ryc. 17). Ze względu na stałość występowania główną grupę stanowiły gatunki przypadkowe – 47,0%, natomiast gatunki absolutnie stałe i stałe stanowiły odpowiednio: 25,0% i 10,0% (Ryc. 16).

Gatunkami absolutnie stałymi w badanym stanowisku były: *Amphora copulata*, *A. ovalis*, *A. pediculus*, *Aulacoseira ambigua*, *A. granulata*, *Cyclostephanos dubius*, *Cyclotella meneghiniana*, *Encyonema lange-bertalotii*, *Eolimna minima*, *Fragilaria capucina*, *Gomphonema micropus*, *G. olivaceum*, *G. parvulum*, *Navicula capitatoradiata*, *N. cryptotenella*, *N. gregaria*, *N. radiosa*, *N. tripunctata*, *N. trivialis*, *N. veneta*, *Nitzschia amphibia*, *N. dissipata* var. *media*, *N. fonticola*, *N. fruticosa*, *N. intermedia*, *N. linearis*, *N. palea*, *Planothidium frequentissimum*, *P. lanceolatum*, *Pseudostaurosira brevistriata*, *Sellaphora pupula*, *Stephanodiscus hantzschii*, *Tryblionella hungarica*, *Ulnaria delicatissima* i *U. ulna*. Gatunkami dominującymi były: *Aulacoseira granulata*, *Cyclostephanos dubius*, *Cyclotella meneghiniana* oraz *Stephanodiscus hantzschii*.

Gatunkami jednocześnie absolutnie stałymi i dominującymi były: *Aulacoseira granulata*, *Cyclostephanos dubius*, *Cyclotella meneghiniana* oraz *Stephanodiscus hantzschii* (Ryc. 44). Ponadto gatunkami jednocześnie absolutnie stałymi i subdominującymi były: *Nitzschia fruticosa* oraz *Planothidium frequentissimum*, a gatunkiem stałym i subdominującym był *Meridion circulare* (Ryc. 45 i 46).

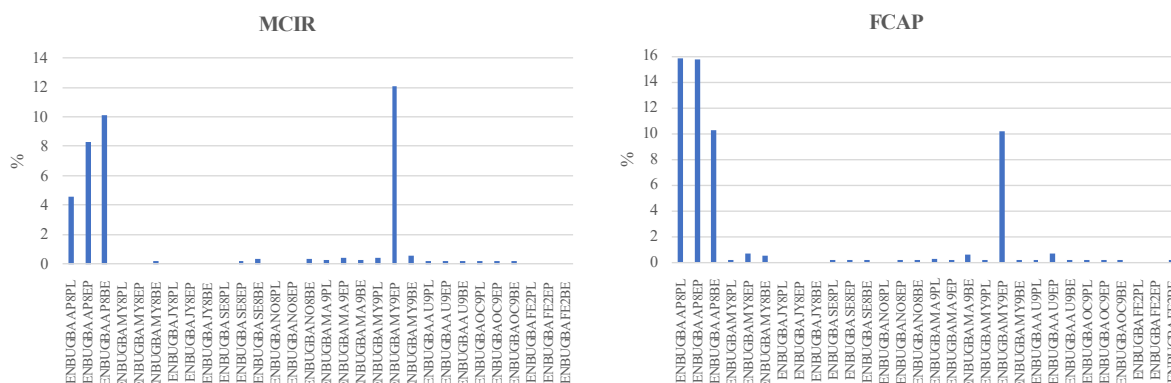
Aulacoseira granulata została stwierdzona we wszystkich próbach, a jej udział procentowy w próbie wynosił od 0,7% do 82,9%, przy czym najwyższy udział procentowy odnotowano w próbach z września 2018 roku, powyżej 50%, w tym w potamoplanktonie – 82,9%. W epipelonie w marcu 2019 roku również gatunek ten odnotowano licznie – 41,9% (Ryc. 44). *Stephanodiscus hantzschii* był obecny w 27 próbach, a jego udział procentowy mieścił się w zakresie od 0,2% do 80,0%. Wysoki udział procentowy odnotowano w próbach z maja i sierpnia 2019 roku, szczególnie w potamoplanktonie z maja – 65,5%. Ponownie wysokim udziałem charakteryzują się próby z lutego 2020 roku. Na uwagę zasługuje fakt, że w próbach z marca 2019 roku nie odnotowano okryw *Stephanodiscus hantzschii* (Ryc. 44).



Ryc. 44. Procentowy udział w próbie gatunków absolutnie stałych i dominujących na stanowisku Barcice: *Stephanodiscus hantzschii* (SHAN), *Aulacoseira granulata* (AUGR), *Cyclostephanos dubius* (CDUB) oraz *Cyclotella meneghiniana* (CMEN).

Cyclostephanos dubius występował we wszystkich próbach, a jego udział procentowy wynosił od 0,7% do 35,7%, a najwyższy udział procentowy odnotowano w próbie potamoplanktonu z maja 2018 roku. Ponadto ponad 20% odnotowano w próbie epipelonu z maja oraz w potamoplanktonie i epifitonie w lipcu 2018 roku. Następnie ponad 20% stwierdzono w próbie epipelonu z maja 2019 roku, oraz w październiku 2019 roku i w potamoplanktonie w lutym 2020 roku (Ryc. 44). *Cyclotella meneghiniana* była obecna we wszystkich próbach, a jej udział procentowy mieścił się w zakresie od 0,2% do 30,7%. Najwyższy udział procentowy odnotowano w lipcu 2018 roku i w październiku 2019 roku – powyżej 20% (Ryc. 44).

Fragilaria capucina, *Gomphonema micropus*, *Meridion circulare*, *Planothidium frequentissimum* oraz *Planothidium lanceolatum* charakteryzowały się niskim udziałem procentowym w większości prób, jednak w przypadku prób z kwietnia 2018 roku odnotowano je z wysokim udziałem procentowym (Ryc. 45 i 46).



Ryc. 46. Procentowy udział w próbie gatunków absolutnie stałych z udziałem średnim w próbie poniżej 5,0% na stanowisku Barcice: *Meridion circulare* (MCIR) oraz *Fragilaria capucina* (FCAP).

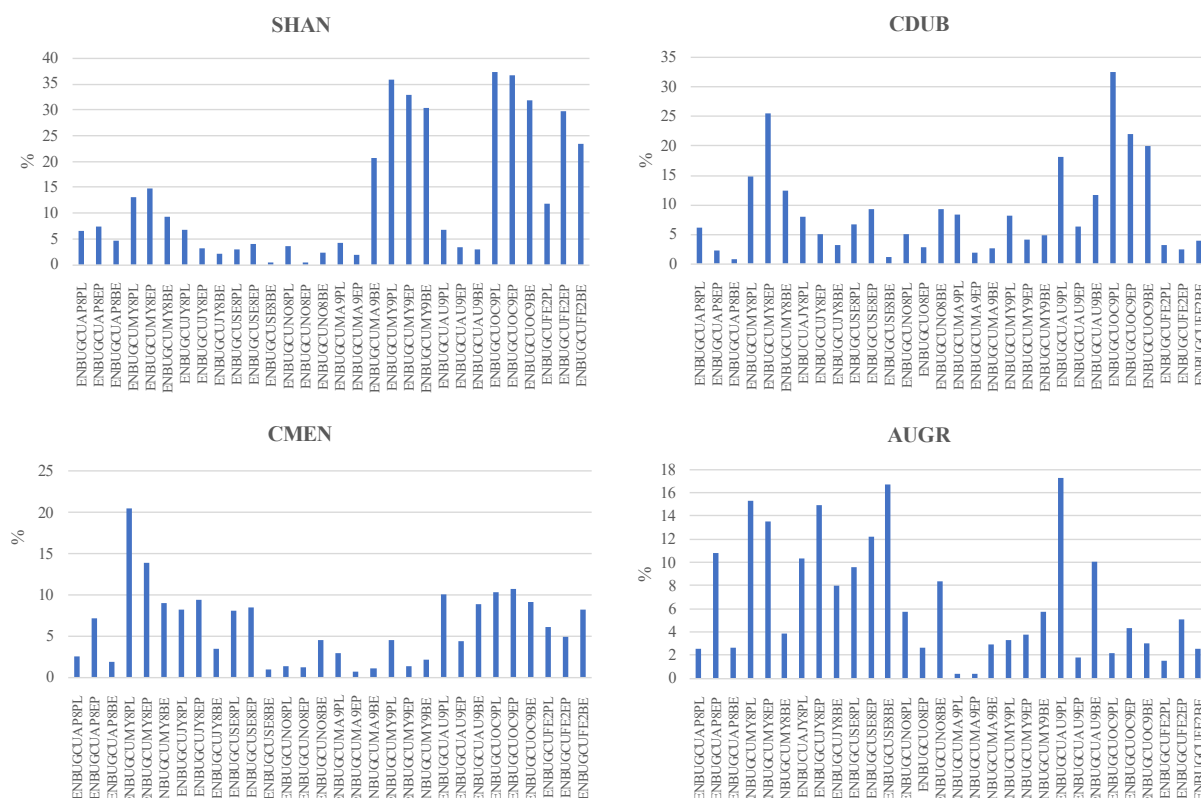
Meridion circulare był stwierdzony w 19 próbach, a jego udział procentowy wynosił od 0,2% do 12,1%, przy czym najwyższy udział procentowy odnotowano w próbie epifitonu z maja 2019 roku. W próbach z kwietnia 2018 roku odnotowano wysoki udział w próbach: potamoplanktonu – 4,6%, epifitonu – 8,3%, i epipelonu – 10,1%. W pozostałych próbach udział procentowy zawierał się w zakresie 0,2% – 0,5% (Ryc. 46). *Fragilaria capucina* obecna była w 24 próbach, a jej udział procentowy mieścił się w zakresie od 0,2 % do 15,8%. Wysoki udział procentowy stwierdzono w próbach z kwietnia 2018 roku: w potamoplanktonie i epifitonie po 15,8%, a w epipelonie – 10,3%. W pozostałych próbach udział procentowy wynosił 0,2% – 0,7%. W próbie epifitonu z maja 2019 roku jednorazowo odnotowano wzrost liczebności do 10,2% udziału w próbie (Ryc. 46).

Cupel (CU) – rzeka Bug. Analizę jakościową zbiorowisk okrzemek przeprowadzono na podstawie 30 prób pobranych z trzech rodzajów siedlisk: toni wodnej, roślin zanurzonych w wodzie oraz piaszczystego dna. Łącznie zostało zidentyfikowanych 202 taksony okrzemek, wśród których głównie występowały gatunki akcesoryczne – 90,0%. Gatunki dominujące i subdominujące stanowiły odpowiednio: 2,9% i 1,9% (Ryc. 17). Ze względu na stałość występowania główną grupę stanowiły gatunki przypadkowe – 41,7%, natomiast gatunki absolutnie stałe i stałe stanowiły odpowiednio: 27,3% i 16,4% (Ryc. 16).

Gatunkami absolutnie stałymi w badanym stanowisku były: *Achnanthidium eutrophilum*, *A. minutissimum*, *Amphora copulata*, *A. inariensis*, *A. pediculus*, *Aneumastus stroesei*, *Aulacoseira granulata*, *Cocconeis neodiminuta*, *C. placentula*, *Cyclostephanos dubius*, *Cyclotella meneghiniana*, *Cymatopleura apiculata*, *Eolimna minima*, *E. sorex*, *Fragilaria capucina*, *F. vaucheriae*, *Geissleria decussis*, *Gomphonema micropus*, *G. olivaceum*, *Karayevia clevei*, *Navicula antonii*, *N. capitatoradiata*, *N. cryptotenella*,

N. moskali, *N. reichardtiana*, *N. reinhardtii*, *N. tripunctata*, *N. veneta*, *Neidium dubium*, *Nitzschia amphibia*, *N. capitellata*, *N. dissipata* var. *media*, *N. fonticola*, *N. fruticosa*, *N. intermedia*, *N. linearis*, *N. palea*, *Paraplaconeis minor*, *Planothidium delicatulum*, *P. frequentissimum*, *P. rostratum*, *Platessa conspicua*, *Pseudostaurosira brevistriata*, *Rhoicosphenia abbreviata*, *Sellaphora pupula*, *Staurosira construens*, *S. binodis*, *S. martyi*, *S. venter*, *Staurosirella pinnata*, *Stephanodiscus hantzschii*, *Tryblionella apiculata*, *Ulnaria delicatissima* i *U. ulna*.

Gatunkami dominującymi oraz jednocześnie absolutnie stałymi były: *Aulacoseira granulata*, *Cyclostephanos dubius*, *Cyclotella meneghiniana*, *Planothidium frequentissimum*, *Pseudostaurosira brevistriata* oraz *Stephanodiscus hantzschii* (Ryc. 47 i 48). Do gatunków subdominujących należy zaliczyć: *Amphora inariensis*, *A. pediculus*, *Fragilaria vaucheriae* oraz *Navicula reinhardtii* (Ryc. 49).



Ryc. 47. Procentowy udział w próbie gatunków absolutnie stałych i dominujących na stanowisku Cupel: *Stephanodiscus hantzschii* (SHAN), *Cyclostephanos dubius* (CDUB), *Cyclotella meneghiniana* (CMEN) oraz *Aulacoseira granulata* (AUGR).

Stephanodiscus hantzschii odnotowano we wszystkich próbach, a jego udział procentowy mieścił się w zakresie od 0,2% do 37,3%, przy czym najwyższy jego udział odnotowano w próbach ze wszystkich siedlisk z maja i października 2019 roku – ponad 30%. W lutym 2020 roku nadal utrzymywała się wysoka liczebność tego gatunku w próbach

PLFR

Chemical Class	Percentage (%)
ENBU, GCUA, P8PL	10
ENBU, GCUA, P8EP	9
ENBU, GCUA, P8BE	14
ENBU, GCUA, Y8PL	0
ENBU, GCUA, Y8EP	2
ENBU, GCUA, Y8BE	2
ENBU, GCUA, Y8PL	9
ENBU, GCUA, Y8EP	7
ENBU, GCUA, Y8BE	8
ENBU, GCUA, U9PL	13
ENBU, GCUA, U9EP	4
ENBU, GCUA, U9BE	12
ENBU, GCUA, O8PL	25
ENBU, GCUA, O8EP	1
ENBU, GCUA, O8BE	4
ENBU, GCUA, A9PL	12
ENBU, GCUA, A9EP	6
ENBU, GCUA, A9BE	5
ENBU, GCUA, Y9PL	12
ENBU, GCUA, Y9EP	10
ENBU, GCUA, Y9BE	5
ENBU, GCUA, U9PL	8
ENBU, GCUA, U9EP	5
ENBU, GCUA, U9BE	25
ENBU, GCUA, O9PL	1
ENBU, GCUA, O9EP	4
ENBU, GCUA, O9BE	8
ENBU, GCUA, F2PL	18
ENBU, GCUA, F2EP	9
ENBU, GCUA, F2BE	8

PSBR

Chemical Class	Percentage (%)
ENBU, GCUA, P8PL	0
ENBU, GCUA, P8EP	0
ENBU, GCUA, P8BE	1
ENBU, GCUA, Y8PL	17
ENBU, GCUA, Y8EP	0
ENBU, GCUA, Y8BE	1
ENBU, GCUA, Y8PL	1
ENBU, GCUA, Y8EP	2
ENBU, GCUA, Y8BE	16
ENBU, GCUA, U9PL	41
ENBU, GCUA, U9EP	11
ENBU, GCUA, U9BE	4
ENBU, GCUA, O8PL	35
ENBU, GCUA, O8EP	4
ENBU, GCUA, O8BE	1
ENBU, GCUA, A9PL	2
ENBU, GCUA, A9EP	2
ENBU, GCUA, A9BE	1
ENBU, GCUA, Y9PL	4
ENBU, GCUA, Y9EP	1
ENBU, GCUA, Y9BE	11
ENBU, GCUA, U9PL	1
ENBU, GCUA, U9BE	4
ENBU, GCUA, O9PL	4
ENBU, GCUA, O9EP	0
ENBU, GCUA, O9BE	4
ENBU, GCUA, F2PL	0
ENBU, GCUA, F2EP	4
ENBU, GCUA, F2BE	5

Planothidium frequentissimum odnotowany został we wszystkich próbach, a jego udział procentowy mieścił się w zakresie od 0,2% do 25,4%, przy czym najwyższy udział procentowy odnotowano w próbie potamoplanktonu z listopada 2018 roku oraz epipsammonu z sierpnia 2019 roku. Powyżej 15% udziału w próbie odnotowano również w potamoplanktonie w lutym 2020 roku (Ryc. 48). *Pseudostaurosira brevistriata* była obecna we wszystkich próbach, a jej udział procentowy wynosił od 0,2% do 41,7%, przy czym najwyższy udział odnotowano w próbach epipsammonu z czerwca 2018 roku i września 2019 roku (Ryc. 48).

Charakterystyka ekologiczna stanowisk badawczych na podstawie okrzemek

Określenie warunków środowiska wodnego przeprowadzono na podstawie wartości wskaźnikowych okrzemek z bazy danych OMNIDIA wykorzystując klasyfikację systemu ekologicznego Van Dam i in. (1994).

Rzeka Narew

Odczyn wody. Analizując odczyn wody w oparciu o klasyfikację ekologiczną okrzemek na stanowiskach badawczych na rzece Narew zaznacza się wysoki udział gatunków alkalifilnych i alkalibiontycznych w poszczególnych próbach, co wskazuje na słabo zasadowy odczyn wody. Niewielki udział mają gatunki o nieokreślonych w programie OMNIDIA wymaganiach pod względem odczynu wody (Ryc. 50).



Ryc. 50. Udział procentowy grup okrzemek w stanowiskach Dzierżenin (DZ), Łacha (LA) oraz Dębe (DE) w odniesieniu do odczynu wody na podstawie klasyfikacji ekologicznej Van Dam i in. (1994).

Saprobia. Wody rzeki obciążone są materią organiczną, ponieważ pomimo że główną grupę stanowią okrzemki, które wskazują na warunki β -mezosaprobne, również liczną grupę stanowią gatunki α -mezosaprobne i α -mezo-polisaprobne. W maju 2019 roku na stanowisku Dębe najliczniejszą ($\approx 80\%$) grupę stanowią okrzemki α -mezo-polisaprobne (Ryc. 51).



Ryc. 51. Udział procentowy grup okrzemek w stanowiskach Dzierżenin (DZ), Łacha (LA) oraz Dębe (DE) w odniesieniu do saprobii na podstawie klasyfikacji ekologicznej Van Dam i in. (1994).

Zapotrzebowanie na tlen. Na podstawie klasyfikacji ekologicznej okrzemek w odniesieniu do zapotrzebowania na tlen najliczniejszą grupę stanowią gatunki o wysokich i średnich wymaganiach wobec natlenienia wody. Należy jednak zwrócić uwagę na sezonową zmianę związaną ze wzrostem udziału gatunków o niższych wymaganiach wobec natlenienia wody w okresie lata w obu sezonach badawczych (Ryc. 52).



Ryc. 52. Udział procentowy grup okrzemek w stanowiskach Dzierżenin (DZ), Łacha (LA) oraz Dębe (DE) w odniesieniu do zapotrzebowania na tlen na podstawie klasyfikacji ekologicznej Van Dam i in. (1994).

Warunki troficzne. Na podstawie klasyfikacji ekologicznej okrzemek Van Dam i in. (1994) w odniesieniu do trofii można określić wody rzeki Narew jako eutroficzne. W próbach odnotowano także znaczny udział procentowy okrzemek wskazujących na wzrost stopnia żyzności wód w ciepłych okresach poboru prób oraz na stanowisku badawczym Dębe (DE) w Zalewie Zegrzyńskim od 2019 roku (Ryc. 53).



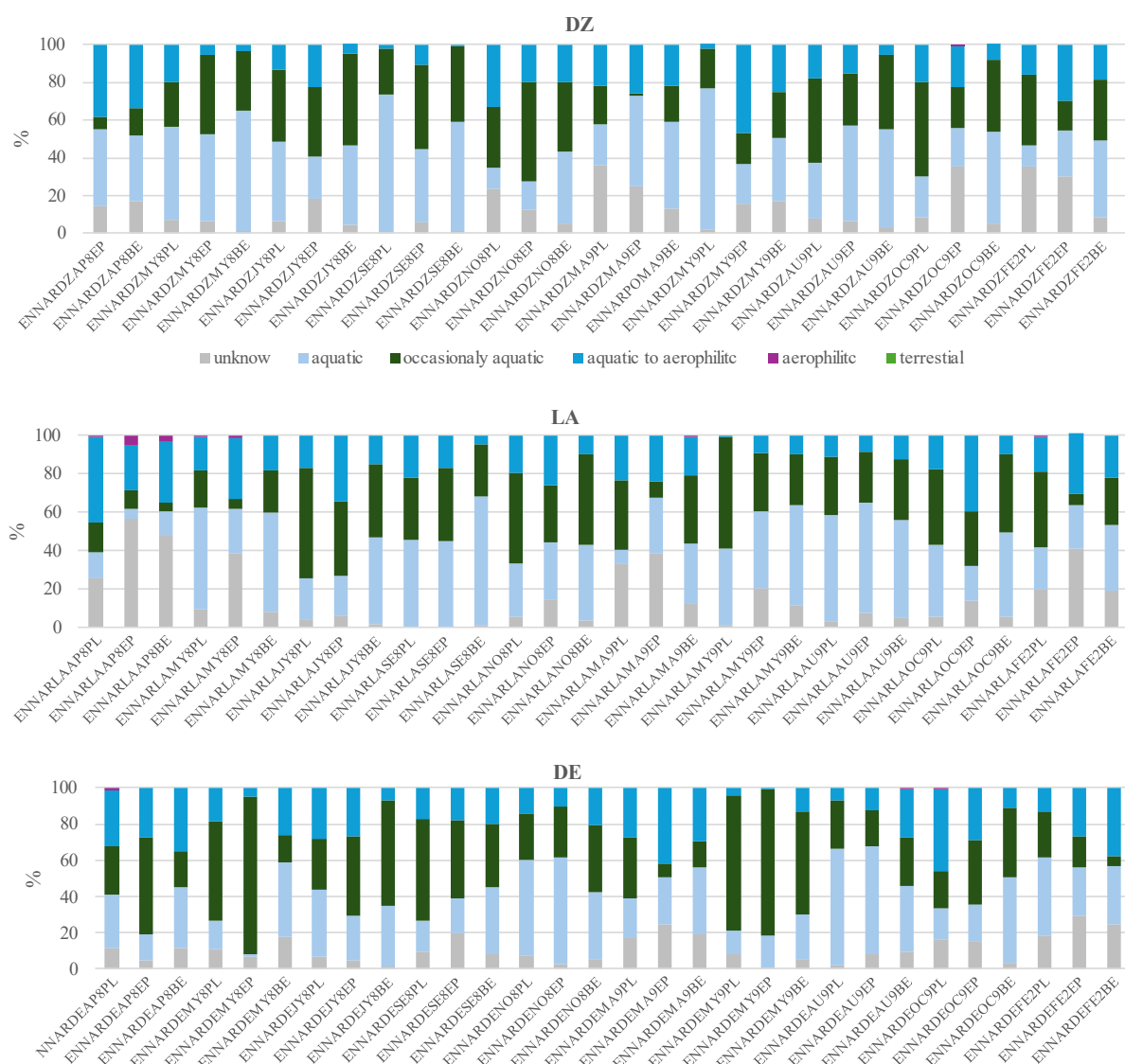
Ryc. 53. Udział procentowy grup okrzemek w stanowiskach Dzierżenin (DZ), Łacha (LA) oraz Dębe (DE) w odniesieniu do trofii na podstawie klasyfikacji ekologicznej Van Dam i in. (1994).

Zasolenie. Klasyfikacja ekologiczna okrzemek w odniesieniu do zasolenia wykazała, że większość gatunków należy do grupy oligohalobów oraz, że w mniejszym stopniu odnotowano gatunki halofilne. We wrześniu 2018 roku i sierpniu 2019 roku na stanowisku Dzierżenin (DZ) odnotowano wzrost udziału w próbach gatunków halofilnych (Ryc. 54).



Ryc. 54. Udział procentowy grup okrzemek w stanowiskach Dzierżenin (DZ), Łacha (LA) oraz Dębe (DE) w odniesieniu do zasolenia na podstawie klasyfikacji ekologicznej Van Dam i in. (1994).

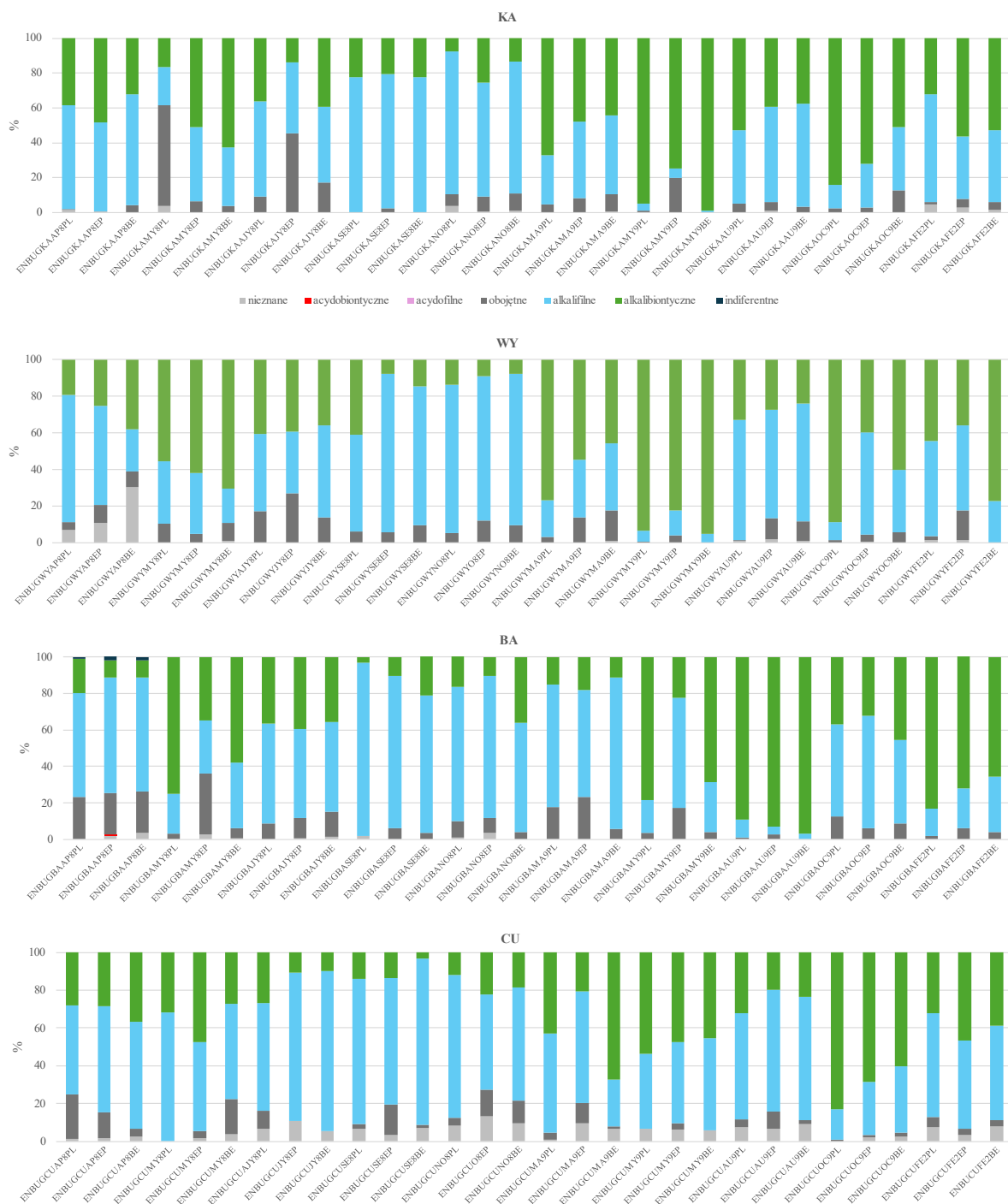
Warunki wilgotnościowe. Biorąc pod uwagę warunki wilgotnościowe w oparciu o klasyfikację ekologiczną okrzemek większość zidentyfikowanych taksonów to gatunki wodne (kategoria wodne i sporadycznie wodne) oraz tolerujące warunki aerofityczne. Analiza tej kategorii klasyfikacji według Van Dam i in. (1994) wykazała udział gatunków o nieokreślonych wymaganiach nawet do 40% w próbie (Ryc. 55).



Ryc. 55. Udział procentowy grup okrzemek w stanowiskach Dzierżenin (DZ), Łacha (LA) oraz Dęba (DE) w odniesieniu do warunków wilgotnościowych na podstawie klasyfikacji ekologicznej Van Dam i in. (1994).

Rzeka Bug

Odczyn wody. Analizując odczyn wody w oparciu o klasyfikację ekologiczną okrzemek zaznacza się wysoki udział gatunków alkalifilnych i alkalibiontycznych w poszczególnych próbach, co wskazuje na zasadowy odczyn wody (Ryc. 56).

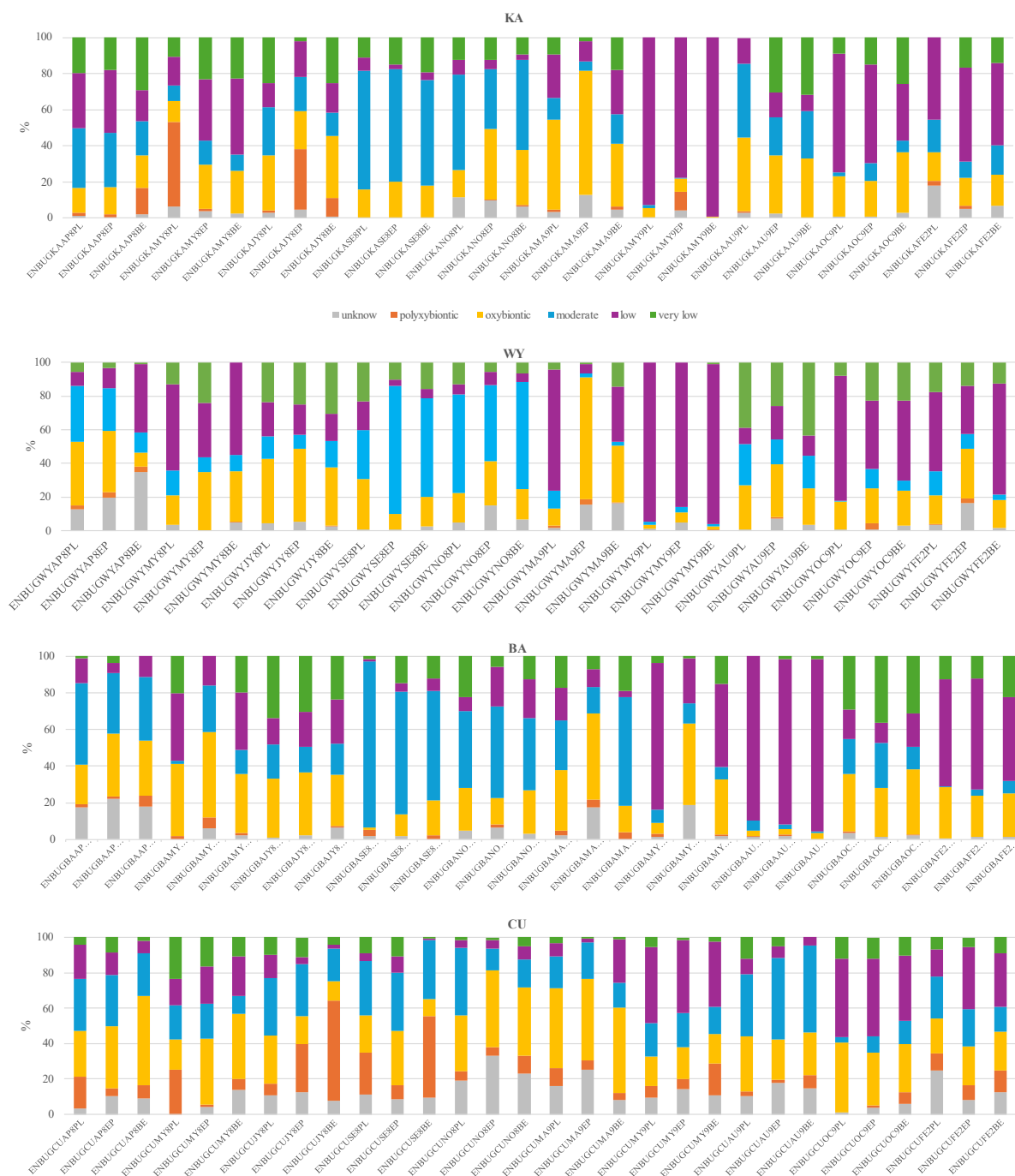


Ryc. 56. Udział procentowy grup okrzemek w stanowiskach Kamieńczyk (KA), Wyszków (WY), Barcice (BA) oraz Cupel (CU) w odniesieniu do odczynu wody na podstawie klasyfikacji ekologicznej Van Dam i in. (1994).

Ryc. 57. Udział procentowy grup okrzemek w stanowiskach Kamieńczyk (KA), Wyszaków (WY), Barcice (BA) oraz Cupel (CU) w odniesieniu do saprobii na podstawie klasyfikacji ekologicznej Van Dam i in. (1994).



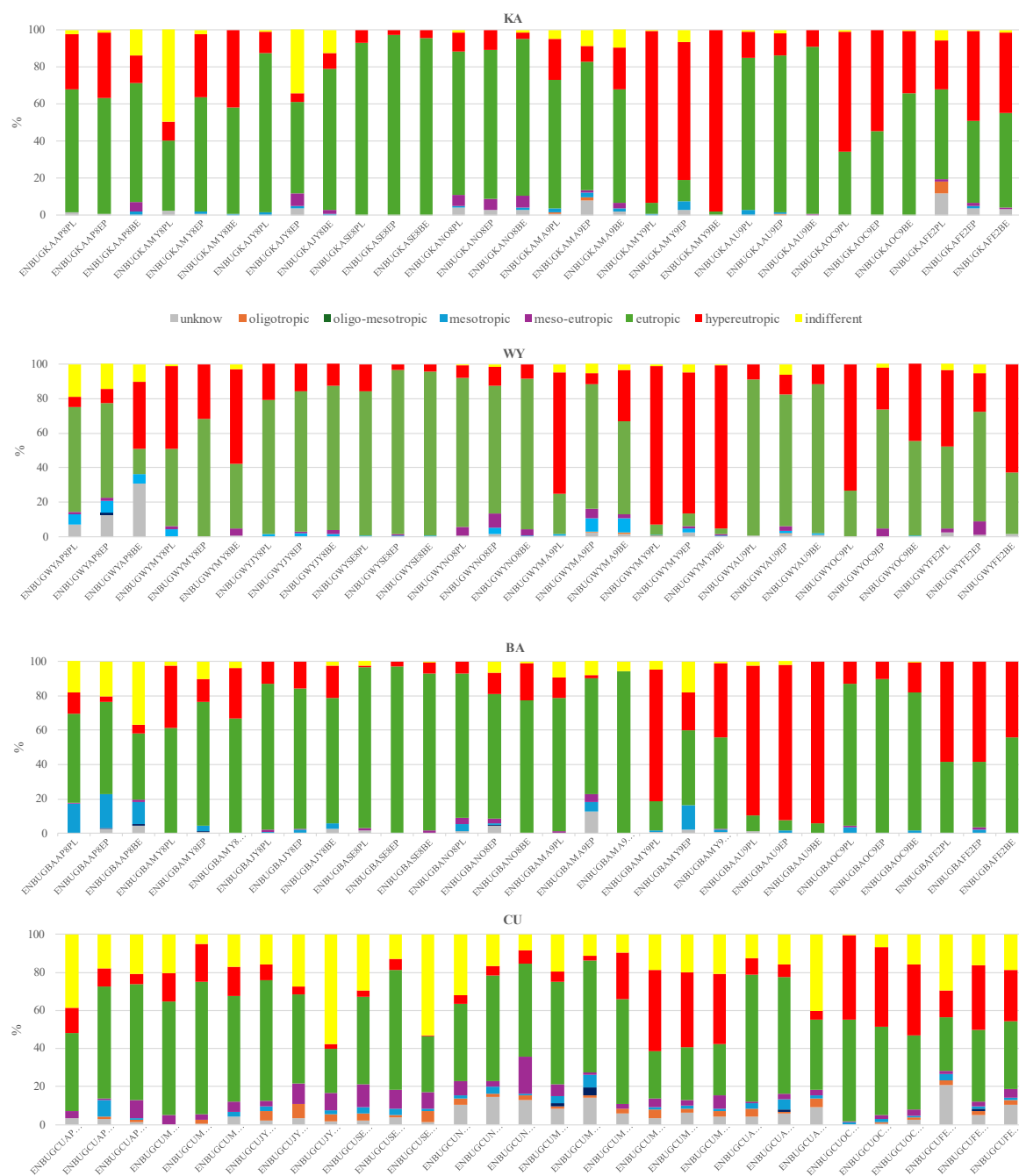
Zapotrzebowanie na tlen. Najliczniejszą grupę okrzemek w rzece Bug stanowią gatunki preferujące średnie natlenienia wody. Zwraca uwagę sezonowa zmiana związana ze wzrostem udziału gatunków o niskich i bardzo niskich wymaganiach wobec natlenienia wody – w maju i sierpniu 2019 roku na stanowiskach Kamieńczyk (KA), Wyszaków (WY) i Barcice (BA), a także w próbach zimowych 2020 roku. Na stanowisku Cupel (CU) występowały okrzemki w wyższych wymaganiach wobec natlenienia niż w trzech pierwszych stanowiskach (Ryc. 58).



Ryc. 58. Udział procentowy grup okrzemek w stanowiskach Kamieńczyk (KA), Wyszaków (WY), Barcice (BA)

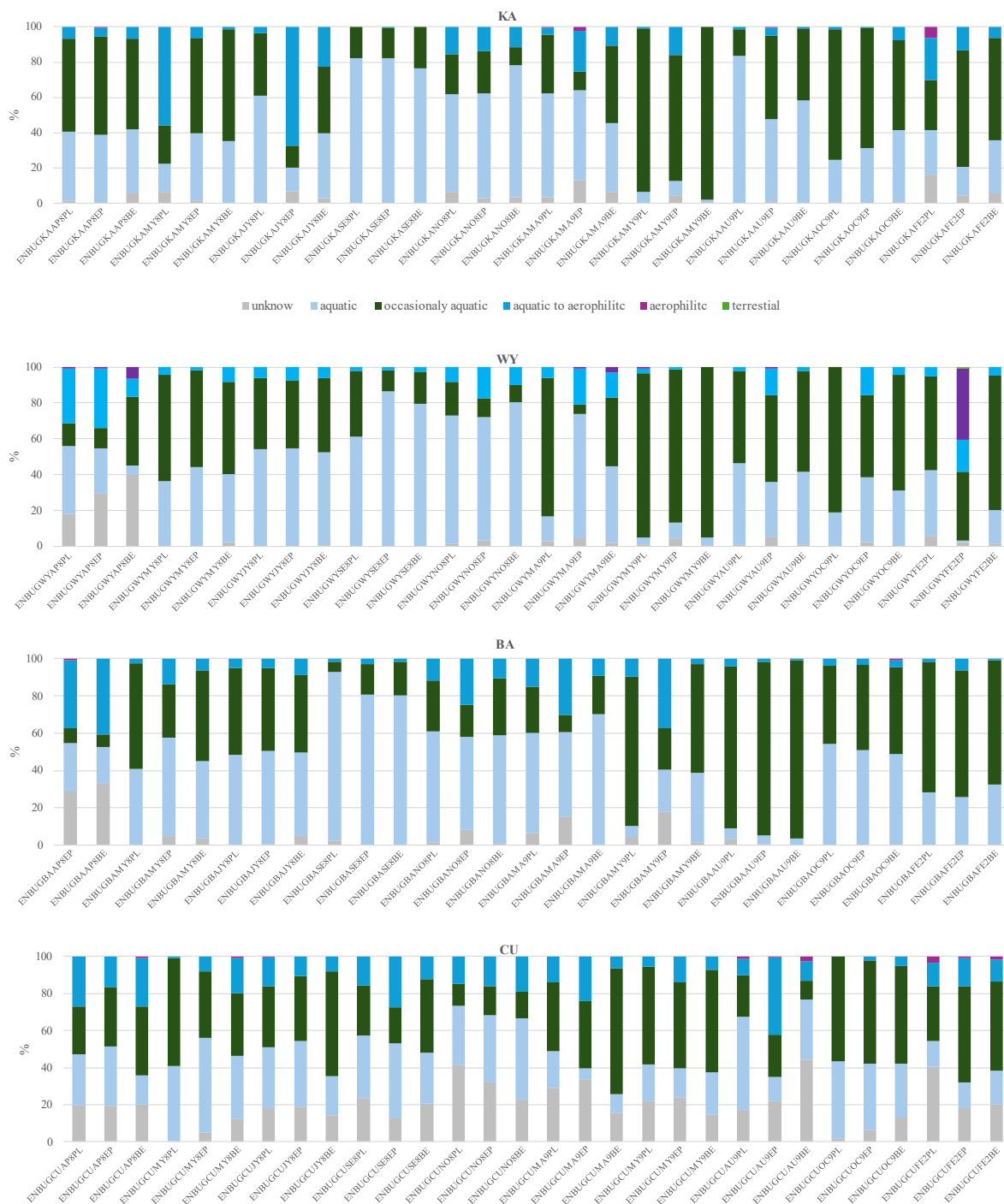
oraz Cupel (CU) w odniesieniu do zapotrzebowania na tlen na podstawie klasyfikacji ekologicznej Van Dam i in. (1994).

Warunki troficzne. Na podstawie klasyfikacji ekologicznej okrzemek w odniesieniu do trofii okrzemki na stanowiskach badawczych na rzece Bug wskazują na eutroficzny, a w ciepłych okresach roku hipertroficzny charakter wód. Na wyższy poziom trofii okrzemki wskazują na pierwszych trzech stanowiskach, natomiast na stanowisku Cupel (CU) odnotowano oprócz dominującej grupy gatunków wskazujących na eutrofii, również okresowo gatunki meso-eutroficzne (Ryc. 59).



Ryc. 59. Udział procentowy grup okrzemek w stanowiskach Kamieńczyk (KA), Wyszków (WY), Barcice (BA) oraz Cupel (CU) w odniesieniu do trofii na podstawie klasyfikacji ekologicznej Van Dam i in. (1994).

Zasolenie. Klasyfikacja ekologiczna okrzemek w odniesieniu do zasolenia wykazała najwyższy udział gatunków oligohalobowych oraz w mniejszym stopniu udział gatunków halofilnych. Zaznacza się wyższy udział gatunków halofilnych w lipcu 2018 roku i od sierpnia 2019 roku, głównie na trzech stanowiskach – Kamieńczyk (KA), Wyszków (WY) i Barcice (BA) (Ryc. 60).



Ryc. 61. Udział procentowy grup okrzemek w stanowiskach Kamieńczyk (KA), Wyszków (WY), Barcice (BA) oraz Cupel (CU) w odniesieniu do warunków wilgotnościowych na podstawie klasyfikacji ekologicznej Van Dam i in. (1994).

Charakterystyka stanu ekologicznego badanych rzek na podstawie indeksów okrzemkowych

Ocenę stanu ekologicznego wykonano na podstawie wybranych indeksów okrzemkowych IPS (Specific Pollution Sensitivity Index), GDI (Ceneric Diatom Index) i TDI (Trophic Diatom Index).

Rzeka Narew

PRÓBA DZIERŻENIN (DZ)	IPS	GDI	TDI	%PT
ENNARDZAP8PL	13,8	12,7	70,44	7,7
ENNARDZAP8EP	16,4	16,1	73,15	5,7
ENNARDZAP8BE	13,6	13,1	67,07	10,1
ENNARDZMY8PL	11,6	12,4	80,22	9,7
ENNARDZMY8EP	11,5	12,8	84,01	1,6
ENNARDZMY8BE	11,9	12,6	83,83	0,8
ENNARDZJY8PL	9,8	11,3	88,3	8,7
ENNARDZJY8EP	12,7	11,8	89,05	3,7
ENNARDZJY8BE	9,5	11,7	84,43	3,9
ENNARDZSE8PL	13,1	13,2	77,54	2,7
ENNARDZSE8EP	10,8	11,3	86,77	11
ENNARDZSE8BE	9,6	11,8	91,63	4,7
ENNARDZNO8PL	10,7	11,3	81	18,6
ENNARDZNO8EP	12,8	11,9	81,39	9,5
ENNARDZNO8BE	11,2	10,9	84,85	9
ENNARDZMA9PL	11,5	12	86,24	6,4
ENNARDZMA9EP	9,1	8,3	82,91	46,9
ENNARDZMA9BE	11,1	9,6	83,91	17,5
ENNARDZMY9PL	12,4	13	83,42	
ENNARDZMY9EP	14	13,4	72,62	3,4
ENNARDZMY9BE	13	12,4	76,79	3,8
ENNARDZAU9PL	9,9	11,9	78,09	7,3
ENNARDZAU9EP	10,6	11,3	89,64	4,6
ENNARDZAU9BE	9,8	11,7	84,07	0,8
ENNARDZOC9PL	12,1	11,8	84,24	8,6
ENNARDZOC9EP	12,9	10,3	88,46	11,1
ENNARDZOC9BE	9,6	10,6	92,61	5,9
ENNARDZFE2PL	13,5	12,3	68,54	
ENNARDZFE2EP	14,2	12,2	85,03	2,3
ENNARDZFE2BE	11,1	10,3	70,67	10,6

PRÓBA ŁACHA (LA)	IPS	GDI	TDI	%PT
ENNARLAAP8PL	14,9	13	62,2	3,6
ENNARLAAP8EP	13,2	14	73,41	6,3
ENNARLAAP8BE	12,8	12,8	72,93	4,3
ENNARLAMY8PL	11,3	12,2	83,01	2
ENNARLAMY8EP	10	11,1	78,51	11,3
ENNARLAMY8BE	13	12,1	77,5	1,2
ENNARLAJY8PL	12,1	11,9	88,59	4,5
ENNARLAJY8EP	11,6	11,3	87,02	15,7
ENNARLAJY8BE	11,7	11,8	87,66	2,5
ENNARLASE8PL	9,6	11,3	91,17	14,4
ENNARLASE8EP	8,5	11,8	90,92	16,1
ENNARLASE8BE	9,8	11,3	89,55	5,4
ENNARLANO8PL	10,9	12	84,64	14,1
ENNARLANO8EP	12,1	12,3	78,81	10,7
ENNARLANO8BE	10,5	11,9	88,44	3,1
ENNARLAMA9PL	11,2	12,2	92,79	6,8
ENNARLAMA9EP	11,2	11	77,25	14,4
ENNARLAMA9BE	10,4	11,8	88,5	5,3
ENNARLAMY9PL	8,4	10,5	93,6	0,6
ENNARLAMY9EP	11,2	11,7	92,8	2,9
ENNARLAMY9BE	10,4	10,9	85,49	1,4
ENNARLAAU9PL	11	12,2	86,46	4,4
ENNARLAAU9EP	10,6	11,7	88,33	6
ENNARLAAU9BE	10,5	11,4	90,11	5,9
ENNARLAOC9PL	11,9	11,5	85,73	8,4
ENNARLAOC9EP	11,7	10,3	93,59	12,9
ENNARLAOC9BE	9,7	11,3	94,67	3,8
ENNARLAFE2PL	9,9	11,7	84,06	10,4
ENNARLAFE2EP	13,6	11,1	85,06	19,6
ENNARLAFE2BE	11,3	12	89,18	9,9

PRÓBA DĘBE (DE)	IPS	GDI	TDI	%PT
ENNADEAP8PL	14,4	12,5	83,82	5,6
ENNADEAP8EP	13,9	11,5	82,12	0,8
ENNADEAP8BE	13,8	12,5	75,77	2,7
ENNADEMY8PL	14,4	12,1	85,33	2,2
ENNADEMY8EP	13,6	12,8	88,4	0,8
ENNADEMY8BE	15,1	13,3	70,7	4,2
ENNADEJY8PL	10,9	11,2	85,21	3,4
ENNADEJY8EP	11,4	9,5	73,11	14,9
ENNADEJY8BE	6,8	11,4	92,58	9,2
ENNADESE8PL	11,2	10,9	69,9	14,1
ENNADESE8EP	12,1	11,4	64,22	14,4
ENNADESE8BE	10,8	11,6	74,7	8,5
ENNADENO8PL	12,6	8,4	74,86	46,7
ENNADENO8EP	10,8	4,7	79,97	60,4
ENNADENO8BE	12,5	10,5	77,56	32,6
ENNADEMA9PL	10,3	10,1	80,25	20,5
ENNADEMA9EP	13,3	11,2	72	15,3
ENNADEMA9BE	9,5	10,5	79,16	18,7
ENNADEMY9PL	7,7	11	94,53	0,9
ENNADEMY9EP	6,7	10,9	93,67	
ENNADEMY9BE	9,2	11,1	87,79	2,8
ENNADEAU9PL	10,5	12,4	80,51	8,12
ENNADEAU9EP	11,3	13	82,24	2,9
ENNADEAU9BE	11,3	11,7	85,4	7,9
ENNADEOC9PL	12,8	14	80,92	8,5
ENNADEOC9EP	13,1	10,6	85,72	12,6
ENNADEOC9BE	10,5	10,6	81,59	16,4
ENNADEFE2PL	9,6	10,8	71,21	5
ENNADEFE2EP	15,3	12	73,3	4,4
ENNADEFE2BE	14,3	12,2	70,19	10,9

Ryc. 62. Stan ekologiczny rzeki Narew na stanowiskach Dzierżenin (DZ), Łacha (LA) oraz Dębe (DE) na podstawie indeksów okrzemkowych IPS, GDI i TDI.

Analiza wartości wskaźnikowych okrzemek z prób zebranych ze stanowiska DZ na podstawie indeksu IPS wykazała, że wody rzeki w większości odpowiadają klasie od II do IV, najczęściej odnotowano klasę IV. Biorąc pod uwagę indeks GDI są to wody o klasie jakości od II do IV, w tym najczęściej odnotowano klasę III. Ze względu na indeks TDI są to wody odpowiadające klasie od IV do V, najczęściej odnotowano klasę V (Ryc. 62). Na kolejnym stanowisku LA, wraz z biegiem rzeki, określono stan ekologiczny na podstawie indeksu IPS jako odpowiadający klasie od III do IV, najczęściej odnotowano klasę IV. Ze względu na indeks GDI są to wody o klasie jakości od II do IV, najczęściej odnotowano klasę III. Indeks TDI określił wody rzeki jako odpowiadające klasie od IV do V, najczęściej odnotowano klasę V (Ryc. 62). Analiza okrzemek z prób zebranych ze stanowiska DE, znajdującego się przy tamie Zalewu Zegrzyńskiego, z uwagi na indeks IPS wykazała, że wody rzeki w większości odpowiadają klasie od II do V, najczęściej odnotowano klasę III i IV. Indeks GDI pozwala zaklasyfikować wody od II do V klasy, najczęściej odnotowano klasę III. Biorąc pod uwagę indeks TDI są to wody odpowiadające klasie od IV do V, najczęściej notowano klasę V (Ryc. 62).

Rzeka Bug

Analiza stanu ekologicznego na podstawie IPS z prób zebranych ze stanowiska KA wykazała, że wody rzeki na tym odcinku w większości odpowiadają klasie od II do V, jednak najczęściej zostały sklasyfikowane jako IV oraz V klasa. Ze względu na indeks GDI są to wody o klasie jakości od II do IV, najczęściej zaklasyfikowano je do klasy III. Ze względu na indeks troficzny są to wody w większości odpowiadające klasie V (28 prób) (Ryc. 63). Na stanowisku WY z uwagi na indeks IPS określono, że wody rzeki w większości odpowiadają klasie od III do V, najczęściej odnotowano klasę V. Ze względu na indeks GDI są to wody o klasie jakości od II do V, przy czym najczęściej odnotowano klasę IV. Ze względu na indeks TDI we wszystkich próbach są to wody odpowiadające klasie V (Ryc. 63). Kolejne stanowisko zgodnie z biegiem rzeki (BA) na podstawie indeksu IPS charakteryzuje się w większości klasie od III do V, najczęściej odnotowano klasę IV. Ze względu na indeks GDI są to wody o klasie jakości od II do IV, najczęściej odnotowano również klasę IV. Natomiast ze względu na indeks TDI są to wody w większości odpowiadające klasie od IV do V, najczęściej odnotowano klasę V, jedynie 3 próby mieszczą się w klasie IV (ryc. 63). Na podstawie analiz zbiorowisk okrzemek z prób zebranych ze stanowiska CU biorąc pod uwagę indeks IPS wody rzeki w większości odpowiadają klasie od II do V, najczęściej odnotowano klasę IV i V. Ze względu na indeks GDI są to wody o klasie jakości od III do V, najczęściej odnotowano klasę III. Ze względu na indeks TDI są to wody o klasie jakości od III do V, najczęściej odnotowano klasę V (23 próby), charakteryzujące się stanem hipertrofii (Ryc. 63).

PRÓBA KAMIEŃCZYK (KA)	IPS	GDI	TDI	%PT
ENBUGKAAP8PL	8,8	12,4	89,28	1,8
ENBUGKAAP8EP	8,5	12,2	91,1	
ENBUGKAAP8BE	9,1	12,7	79,6	1,6
ENBUGKAMY8PL	12,4	14,3	54,25	12,1
ENBUGKAMY8EP	7,6	10,6	93,8	6,3
ENBUGKAMY8BE	7,2	10,8	96,72	3,8
ENBUGKAJY8PL	8,3	11,2	89,83	8,8
ENBUGKAJY8EP	13,4	12,4	59,53	28,2
ENBUGKAJY8BE	10,3	12,5	83,1	12,6
ENBUGKASE8PL	9,4	13,3	83,44	
ENBUGKASE8EP	9,4	13	84,04	2,4
ENBUGKASE8BE	9,3	13,4	85,38	
ENBUGKANO8PL	8,6	9,7	81,73	19,1
ENBUGKANO8EP	9,1	9,4	87,57	18,1
ENBUGKANO8BE	9	9,8	82,4	17,8
ENBUGKAMA9PL	9,4	11	91,86	4,6
ENBUGKAMA9EP	13,8	12,4	89,5	15,1
ENBUGKAMA9BE	8,9	10,6	87,33	11,6
ENBUGKAMY9PL	5,6	10,1	97,96	0,6
ENBUGKAMY9EP	6,8	10,3	86,4	9,1
ENBUGKAMY9BE	4,9	9,8	99,69	
ENBUGKAAU9PL	9,7	11,7	87,46	2,2
ENBUGKAAU9EP	8,7	11,7	93,94	5,7
ENBUGKAAU9BE	8,7	12	92,83	4
ENBUGKAOC9PL	6,8	10	98,88	2,5
ENBUGKAOC9EP	6,9	10,6	96,99	2,8
ENBUGKAOC9BE	6,6	9	96,6	15,1
ENBUGKAFE2PL	9,6	12,1	89,29	13,1
ENBUGKAFE2EP	7,3	10,1	92,18	8,6
ENBUGKAFE2BE	8,1	10,6	94,18	7,2

PRÓBA WYSZKÓW (WY)	IPS	GDI	TDI	%PT
ENBUGWYAP8PL	12,8	14,1	83,52	18,2
ENBUGWYAP8EP	12,6	13	89,38	21,8
ENBUGWYAP8BE	8,6	11,6	83,98	7
ENBUGWYMY8PL	6,8	9,3	93,3	8,1
ENBUGWYMY8EP	7,8	10,7	96,86	4,8
ENBUGWYMY8BE	7,2	8,1	94,51	13,3
ENBUGWYJY8PL	7,2	8,9	92,4	18,8
ENBUGWYJY8EP	7,2	8,6	93,13	25,6
ENBUGWYJY8BE	7,8	10,1	91,69	12,7
ENBUGWYSE8PL	8,3	11,4	91,48	5,4
ENBUGWYSE8EP	9	12,9	79,85	5,3
ENBUGWYSE8BE	8,3	11,8	83,28	8,9
ENBUGWYNO8PL	8,6	11	83,52	12,2
ENBUGWYNO8EP	8,3	8,5	81,68	26,5
ENBUGWYNO8BE	8,1	10,3	81,15	18
ENBUGWYMA9PL	6,3	10,8	96,64	3,7
ENBUGWYMA9EP	13,6	11,6	91,81	20,4
ENBUGWYMA9BE	7,7	8,9	91,51	15
ENBUGWYMY9PL	5,3	10	98,92	0,6
ENBUGWYMY9EP	6,2	9,6	96,37	3,6
ENBUGWYMY9BE	5,2	10,1	99,39	
ENBUGWYAU9PL	8,7	12,6	93,6	1,3
ENBUGWYAU9EP	9,3	10,9	91,3	21,3
ENBUGWYAU9BE	7,4	10,9	93,76	10,9
ENBUGWYOC9PL	6,4	10,1	99,19	1,6
ENBUGWYOC9EP	7,6	10,8	93,9	12,3
ENBUGWYOC9BE	6,5	9,9	96,06	6,2
ENBUGWYFE2PL	7,5	10,9	90,8	5,4
ENBUGWYFE2EP	7,1	7,4	88,24	27,5
ENBUGWYFE2BE	7,2	10,9	98,47	1,7

PRÓBA BARCICE (BA)	IPS	GDI	TDI	%PT
ENBUGBAAP8PL	13,9	12,5	78,24	8,1
ENBUGBAAP8EP	14,2	14,5	70,25	17,1
ENBUGBAAP8BE	14,5	14,3	73,14	18
ENBUGBAMY8PL	8,5	11,4	96,94	0,6
ENBUGBAMY8EP	9,6	9,2	80,05	24,3
ENBUGBAMY8BE	8,4	11,2	94,12	4,8
ENBUGBAJY8PL	8,3	11,1	93,25	8,7
ENBUGBAJY8EP	7,8	10,6	92,97	10,9
ENBUGBAJY8BE	8,1	10,7	92,02	12,5
ENBUGBASE8PL	10,2	14,1	73,73	0,9
ENBUGBASE8EP	8,6	12,6	81,64	6,6
ENBUGBASE8BE	9,1	12,7	82,75	3,7
ENBUGBANO8PL	9,1	11,1	83,37	9,7
ENBUGBANO8EP	7,9	11,4	82,37	11,3
ENBUGBANO8BE	7,8	11	89,12	9,9
ENBUGBAMA9PL	8,2	9,6	83,7	21,7
ENBUGBAMA9EP	10,7	10,2	87,88	30,3
ENBUGBAMA9BE	9,8	13,4	81,95	3,2
ENBUGBAMY9PL	6,4	10,5	96,86	5,8
ENBUGBAMY9EP	12,6	13,2	74,44	24,4
ENBUGBAMY9BE	8	10,6	96,27	4,7
ENBUGBAAU9PL	5,7	10,2	97,66	1,7
ENBUGBAAU9EP	5,7	10,4	95,97	
ENBUGBAAU9BE	5,3	10,1	99,8	
ENBUGBAOC9PL	8,1	10,7	92,73	10,8
ENBUGBAOC9EP	8	11,7	93,23	6,9
ENBUGBAOC9BE	8	10,8	95,25	7,6
ENBUGBAFE2PL	7,6	10,2	99,03	1,8
ENBUGBAFE2EP	6,6	8,9	97,14	9,5
ENBUGBAFE2BE	7,2	10,6	97,17	3,4

PRÓBA CUPEL (CU)	IPS	GDI	TDI	%PT
ENBUGCUAP8PL	12	13,4	76,99	8,9
ENBUGCUAP8EP	13,5	12,8	78,54	6,4
ENBUGCUAP8BE	15,8	12,8	83,5	1,7
ENBUGCUMY8PL	9,1	12,3	70,41	
ENBUGCUMY8EP	9,1	11,2	91,81	5,8
ENBUGCUMY8BE	10,1	11,1	85,82	12,5
ENBUGCUJY8PL	11,7	12,5	85,72	7,9
ENBUGCUJY8EP	12	12,6	69,63	
ENBUGCUJY8BE	11,6	11,8	52,28	
ENBUGCUSE8PL	12,2	12,3	77,09	0,9
ENBUGCUSE8EP	9,6	10,3	73,8	19,3
ENBUGCUSE8BE	12,1	12,2	57,55	
ENBUGCUNO8PL	13,2	11,8	88	29
ENBUGCUNO8EP	12,4	10,4	84,09	13
ENBUGCUNO8BE	10,9	9,7	83,75	18,8
ENBUGCUMA9PL	8,8	12,3	85,08	3,3
ENBUGCUMA9EP	12,5	12,7	74,33	
ENBUGCUMA9BE	3,78	11,7	83,38	1,3
ENBUGCUMY9PL	2,92	11,7	90,87	2,8
ENBUGCUMY9EP	2,76	11,1	92,14	
ENBUGCUMY9BE	5,7	4,9	79,76	0,7
ENBUGCUAU9PL	2,99	12,2	90,82	1,7
ENBUGCUAU9EP	3,34	13,4	68,36	3,3
ENBUGCUAU9BE	3,3	13,1	88,14	0,7
ENBUGCUOC9PL	2,55	10,9	97,54	
ENBUGCUOC9EP	5,2	10,9	97,19	0,6
ENBUGCUOC9BE	2,67	11,3	92,26	1,3
ENBUGCUFE2PL	11,4	12,6	87,84	2,8
ENBUGCUFE2EP	11	11,7	80,63	3
ENBUGCUFE2BE	10,5	11,6	85,2	3

Ryc. 63. Stan ekologiczny rzeki Bug na stanowiskach Kamieńczyk (KA), Wyszków (WY), Barcice (BA) oraz Cupel (CU) na podstawie indeksów okrzemkowych IPS, GDI i TDI.

Dyskusja

Różnorodność gatunkowa okrzemek w rzekach na polskim niżu na przykładzie Narwi i Bugu. Z wytypowanych siedmiu stanowisk na rzekach na polskim niżu, Narew i Bug, na podstawie analizy 210 prób zarówno bentosowych, epifitonowych jak i potamoplanktonowych łącznie zidentyfikowano 293 taksony okrzemek należące do 63 rodzajów. W próbach z Narwi łącznie zidentyfikowano 223 taksony okrzemek, a w przypadku rzeki Bug zidentyfikowano ich 218. Różnorodność gatunkowa pod względem liczby zidentyfikowanych taksonów okrzemek obu rzek jest odmienna w stosunku do innych rzek na polskim niżu. W badaniach okrzemek z prób bentosowych z rzeki Pilicy ogółem zidentyfikowano 378 gatunków (Szulc 2013), znacznie więcej niż badanych rzekach. Podobne badania prowadzono w przypadku rzeki Bzura, gdzie ogółem zidentyfikowano 290 taksonów (Rakowska, Szczepocka 2011). Z kolei badania pod kątem oceny jakości wody z wykorzystaniem okrzemek, prowadzone na próbach pobranych z rzeki Linda, wykazały od 134 do 236 taksonów okrzemek na różnych stanowiskach (Szczepocka i in. 2014). Natomiast z próbek epifitonowych i bentosowych pobranych w odcinku ujściowym Wisły do Bałtyku zidentyfikowano 187 gatunków okrzemek (Majewska i in. 2012). Kolejną rzeką na polskim niżu, która była badana w aspekcie wykorzystania okrzemek do oceny jakości wód była rzeka Ner, gdzie w 18 próbach bentosowych zidentyfikowano łącznie jedynie 87 gatunków okrzemek (Szczepocka i in. 2016). Rzeka Bug jest mniej zróżnicowana pod względem ilości gatunków niż rzeka Narew. Przyczyną może być fakt, że jest on poddany większym wpływom działalności człowieka niż Narew, która zachowała w większości naturalny swój charakter. Obie rzeki mają swe źródła poza granicami Polski, a rejony, przez które przepływają znacząco się różnią. Narew poza granicami kraju przepływa głównie przez tereny zalesione, a na terenie Polski w górnym swym biegu przepływa przez Nadnarwiański Park Krajobrazowy, a w dolnym odcinku, Dolina Dolnej Narwi, rzeka przepływa przez piaszczyste tereny porośnięte borami sosnowymi, w których znajdują się rezerваты przyrody (Kondracki 1998). Wpływ terenów miejskich takich jak: Ostrołęka, Pułtusk, Serock jest zdecydowanie większy w dojnym odcinku Narwi. Rzeka Bug jest rzeką transgraniczną, stanowiąc część wschodniej granicy Polski z Ukrainą oraz Białorusią. W granicach Polski przepływa ona głównie przez tereny rolnicze z małym udziałem lasów. W górnym odcinku, w południowo-wschodniej Polsce, rzeka przepływa przez tereny chronione, parki krajobrazowe i rezerваты przyrody, ale jest tu także widoczny znaczący wpływ terenów rolniczych. W dolnym odcinku rzeka Bug przepływa przez tereny łąkowe i piaszczyste, przeważnie zalesione, znajdują się tu także rezerваты przyrody. Pomimo terenów objętych

ochroną, w obrębie dolnego biegu rzeki wzrasta udział terenów rolniczych oraz ośrodków miejskich (Kondracki 1998).

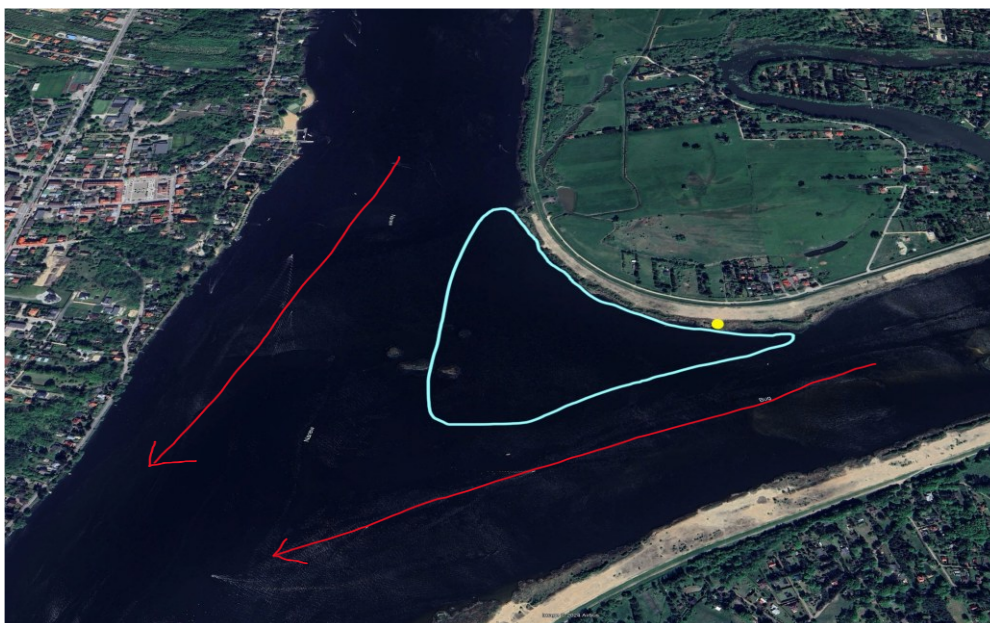
Różnorodność gatunkowa okrzemek na stanowiskach. Gatunkami charakterystycznymi dla obu badanych rzek ze względu na częstość występowania i liczebność w próbach jest *Cyclostephanos dubius* – gatunek dominujący oraz absolutnie stały lub stały w zależności od stanowiska badawczego. Chociaż odnotowano gatunki, które wystąpiły w obu rzekach, to zarysowała się wyraźna różnica częstości ich występowania. Na przykład gatunkami absolutnie stałymi w rzece Bug były: *Nitzschia intermedia*, *N. capitellata* oraz *Fallacia pygmaea*, a w rzece Narew wystąpiły one jako przypadkowe. Natomiast gatunkami charakterystycznymi dla rzeki Narew były: *Diademesis confervacea*, *Achnanthydium eutrophilum*, *Rhoicosphenia abbreviata* oraz *Encyonema leibleinii*. W rzece Bug odnotowano na wszystkich stanowiskach jako gatunki dominujące i absolutnie stałe *Cyclotella meneghiniana* oraz *Stephanodiscus hantzschii*. Gatunki te występują w wielu zbiornikach wodnych, w tym rzekach na obszarze Polski, nie tylko na niżu (Szulc 2013; Szczepocka i in. 2014; Szczepocka i in. 2016), ale również były notowane w rzekach na pogórzu i w górach (Wojtal, Kwadrans 2006; Wojtal 2009). Gatunki te zaliczane są do kosmopolitycznych (Zalat i in. 2022). Pomimo wspólnych gatunków dominujących dla obu rzek oraz dla stanowisk na rzece Narew i Bug badane stanowiska różniły się pod kątem struktury zbiorowisk okrzemek zarówno w aspekcie jakościowym jak i ilościowym. Analiza SIMPER wykazała wysokie średnie niepodobieństwo, szczególnie pomiędzy stanowiskami Dzierżenin i Łacha a Dębe na rzece Narew. Wartości średniego niepodobieństwa na podstawie analizy SIMPER pomiędzy zbiorowiskami okrzemek ze stanowisk rzeki Narew w odniesieniu do stanowisk rzeki Bug są jeszcze wyższe. Różnice pomiędzy stanowiskami wynikają między innymi z liczebności wymienionych wcześniej gatunków dominujących. Na przykład udział procentowy w próbach *Stephanodiscus hantzschii* na stanowiskach Dębe był najwyższy, niższy w próbach ze stanowiska Łacha, a najniższy na stanowisku Dzierżenin. W przypadku stanowisk na rzece Bug był wysoki dla prób z trzech stanowisk: Kamieńczyk, Wyszaków i Barcice, natomiast zdecydowanie niższy w próbach ze stanowiska Cupel. Ponadto na rzece Narew zbiorowiska zdecydowanie różniły się w liczbą zidentyfikowanych taksonów okrzemek w większym stopniu niż w rzece Bug. Najmniej gatunków zidentyfikowano w Dębe, co może wynikać z tego, że jest to miejsce przekształcone przez człowieka – betonowa opaska wzdłuż brzegu przy tamie Zalewu Zegrzyńskiego. Zróżnicowanie w liczbie odnotowanych taksonów pomiędzy stanowiskami mogło też wynikać z oddziaływania antropogenicznego (Szczepocka i in. 2016, Macklin, Lewin 2019) takiego jak:

lokalizacja w pobliżu mostów drogowych (Wyszków i Łacha), lokalizacja przy zaporze (Dębe), lokalizacja w pobliżu sztucznie ukształtowanego zbiornika, jakim jest Zalew Zegrzyński (Cupel i Łacha), lokalizacja przy uformowanej przez człowieka plaży (Wyszków). Zróżnicowanie to mogło także wynikać z otoczenia brzegów terenami wiejskimi (Dzierżenin, Barcice i Kamieńczyk), które w zależności od intensywności praktyk rolniczych mogą wpływać na strukturę zbiorowisk okrzemek (Walsh, Wepener 2009). Rodzaj podłoża, które zasiedlają okrzemki, także ma wpływ na zróżnicowanie struktury ich zbiorowisk. W piśmiennictwie wykazano, że bogactwo gatunkowe zbiorowisk okrzemek jest większe na podłożu twardym niż na nieutwardzonym, gdyż podłoże muliste jest bardziej wrażliwe na przepływ wody niż podłoże kamieniste, a tym samym może naruszać stabilność mikrosiedliska (Baker i in. 2022).

Kolejna różnica pomiędzy stanowiskami na badanych rzekach zarysowuje się, analizując częstość występowania niektórych gatunków. Dla stanowiska Dębe gatunkami stałymi były: *Achnanthydium exiguum*, *Cymbella hustedtii*, *C. lanceolata*, *C. neocistula*, *C. neoleptoceros*, *Encyonema caespitosum* oraz *Diatoma vulgare*, natomiast nie odnotowano ich w próbach ze stanowiska Łacha i stanowiska Dzierżenin lub stwierdzono ich pojedyncze okrywy. W przypadku stanowiska Dzierżenin gatunkami absolutnie stałymi oraz stałymi były: *Amphora inariensis*, *Epithemia adnata*, *Gomphonema pumilum*, *G. subclavatum*, *Lindavia balatonis*, *Mayamaea petersenii*, *Meridion circulare*, *Navicula radiosa*, *N. upsalienensis*, *Nitzschia linearis*, *Planothidium dubium*, *Platessa conspicua*, *Sellaphora bacillum*, *S. pupula* oraz *Staurosira construens*. Z kolei w próbach ze stanowiska Łacha i stanowiska Dębe gatunków tych nie odnotowano lub pojawiały się również ich pojedyncze okrywy. W przypadku stanowiska Łacha także odnotowano gatunki stałe, a których nie stwierdzono w próbach ze stanowisk Dębe i Dzierżenin lub odnotowano pojedyncze ich okrywy. Były nimi: *Cymbella proxima*, *Geissleria decussis*, *Diademesis confervacea*, *Gomphonema brébissonii*, *G. gracile* oraz *Nitzschia recta*. Pomiedzy stanowiskami na rzece Bug także odnotowano takie zróżnicowanie. W przypadku stanowiska Wyszków gatunkami stałymi były: *Melosira varians*, *Nitzschia adamata*, *Navicula viridula*, *Surirella brébissonii* var. *kuetzingii*, jednak na pozostałych stanowiskach ich nie odnotowano lub ich udział procentowy w próbie był poniżej 0,2%. Dla stanowiska Kamieńczyk takim gatunkiem stałym była *Navicula cari*. Natomiast dla stanowiska Barcice gatunkami stałymi, które nie zostały zidentyfikowane w próbach z pozostałych stanowisk lub ich udział procentowy w próbie był poniżej 0,2% były: *Cocconeis lineata*, *Gomphonema angustatum*, *Mayamaea petersenii*, *Navicula libonensis* i *Nitzschia gracilis*. Największą liczbą gatunków stałych i absolutnie stałych, które wyróżniały stanowisko, charakteryzował się Cupel. Gatunkami wyróżniającymi to stanowisko były: *Achnanthydium*

eutrophilum, *Aneumastus stroesei*, *Cymbella compacta*, *Cymbopleura lata*, *Diatoma vulgaris*, *Geissleria acceptata*, *Fragilaria radians*, *Gomphonema subclavatum*, *G. pala*, *Neidium dubium*, *Paraplaconeis minor*, *P. placentula*, *Parlibellus protracta*, *Placoneis clementiodes*, *P. pseudanglica*, *Planothidium dubium*, *P. minutissimum*, *Platessa conspicua*, *Rhoicosphenia abbreviata*, *Sellaphora bacillum*, *Staurosira construens* oraz *S. binodis*.

Zróżnicowanie mikrosiedlisk a struktura zbiorowisk okrzemek. Na wytypowanych stanowiskach pobierano próbki z dostępnych mikrosiedlisk: z toni wodnej – potamoplanktonu, z epifitonu oraz bentosowe z różnych podłoży. Próby bentosowe obejmowały: muł, który w rzece Narwi pobierano ze stanowiska Łacha oraz Dzierżenin, a w rzece Bug ze stanowisk: Kamieńczyk, Wyszków oraz Barcice. Na stanowisku Cupel (Bug) próby bentosowe pobierano z piasku, a w stanowisku Dębe (Narew) próby bentosowe pobierano z opaski betonowej zapory. Okrzemki mają możliwości przystosowania się do warunków siedliskowych przez tworzenie kolonii, mocowanie do podłoża za pomocą stylików lub przy pomocy śluzu. Na przykład gatunki stałe dla stanowiska Dębe, takie jak: *Achnanthes exiguum*, *Cymbella hustedtii*, *C. lanceolata*, *C. neocistula* i *C. neoleptoceros* zaliczane są do grupy (gildii) o niskim profilu. Charakteryzują się one małymi rozmiarami, a także zdolnością przylegania do podłoża całą powierzchnią okryw, jak na przykład okrzemki z rodzaju *Achnanthes*. Zaliczane do tej grupy są także te, które mają zdolność przytwierdzenia się wierzchołkiem równolegle lub prostopadle do podłoża, jak w przypadku gatunków z rodzaju *Cymbella*. Przytwierdzenie do podłoża przy pomocy warstwy śluzu lub stylików uniemożliwia przemieszczanie się, ale daje okrzemkom lepsze możliwości przetrwania w biofilmie w warstwie granicznej. Dzięki temu są one odporne na zakłócenia fizyczne (Passy 2007), jakimi są okresowe ruchy wody, wynikające z oddziaływania warunków atmosferycznych. Stanowisko Cupel jest miejscem, w którym rzeka Bug kończy swój bieg łącząc się z Narwią i tworzy Zalew Zegrzyński. Miejsce poboru prób było poddane działaniu wiatrów zachodnich, powodujących w strefie brzegowej intensywne falowanie wody. Ponadto miejsce to charakteryzowała okresowa stagnacja wody, ponieważ znajduje się ono poza głównym nurtem obu rzek (Ryc. 64).



Ryc. 64. Miejsce poboru prób na stanowisku Cupel (żółty punkt). Nurt rzek oznaczono strzałkami, natomiast niebieski obrys wskazuje na obszar okresowo stagnującej wody.

Pośród gatunków stałych dla tego stanowiska na uwagę zasługują *Achnanthes eutrophilum* i *Cymbella compacta*, które zaliczane są do gildii o niskim profilu i które wykształciły cechy przystosowawcze do utrzymania się w biofilmie. Ponadto gatunkami stałymi były tu także: *Diatoma vulgare*, *Fragilaria radians*, *Gomphonema subclavatum* oraz *G. pala* zaliczane do grupy (gildii) o wysokim profilu (Passy 2007). Okrzemki te mają zdolność do tworzenia rozgałęzionych lub łodygowatych kolonii, które pomimo tego, że są bardziej podatne na wymywanie, wykraczają poza warstwę graniczną biofilmu, dzięki czemu mogą eksploatować zasoby niedostępne dla nisko profilowej gildii (Passy 2007).

Analizując mikrosiedliska pod kątem struktury zbiorowisk okrzemek na stanowiskach rzeki Narew zaobserwowano, że w przypadku niektórych gatunków okrzemek udział procentowy jest różny dla poszczególnych mikrosiedlisk. *Cocconeis placentula* na stanowiskach Dzierżenin i Dębe występował z większym udziałem procentowym w próbach epifitonowych, przy czym były też próby z jego większym udziałem w potamoplanktonie, zaś w próbach ze stanowiska Łacha dla wielu prób większy jego udział procentowy był w potamoplanktonie, przy czym wystąpił nielicznie też w epifitonie. Zgodnie z danymi literaturowymi *Cocconeis placentula* występuje tworząc epifiton (Lange Bertalot i in. 2017), a w przypadku rzek obecność okryw w próbach potamoplanktonowych może wynikać z ruchów wody, które z kolei mogą spowodować oderwanie się okryw od makrofitytów występujących w strefie brzegowej. Innym przykładem jest *Amphora pediculus*, która w różnych terminach poboru prób na stanowisku Dzierżenin występowała z wysokim udziałem

albo w próbach epifitonu, albo w próbach bentosowych lub planktonowych. Natomiast na stanowisku Łacha dla większości prób większy jej udział procentowy był w potamoplanktonie, przy czym były też w próby z jej większym udziałem w epifitonie. W przypadku stanowiska Dębe największy jej udział procentowy był w próbach peryfitonowych, ale wysoki udział odnotowano również w potamoplanktonie. Okrzemki z rodzaju *Amphora* ze względu na swoją budowę reprezentują typ, który zaliczany jest do gildii o niskim profilu, przytwierdzając się do podłoża (Nicolosi Gelis i in. 2020). Większy ich udział procentowy w próbach epifitonu oraz ich obecność w potamoplanktonie można tłumaczyć przepływem wody i falowaniem w strefie brzegowej. Kolejnym przykładem w kontekście porównania mikrosiedlisk pod kątem zróżnicowania zbiorowisk okrzemek mogą być *Aulacoseira ambigua* i *A. granulata*, które na stanowiskach Dębe i Dzierżenin w większości prób pojawiły się z większym udziałem procentowym w próbach bentosowych, przy czym ich wyższy udział procentowy odnotowano też dla prób potamoplanktonowych. Natomiast w przypadku stanowiska Łacha *Aulacoseira ambigua* występowała z większym udziałem w próbach potamoplanktonowych, przy czym były próby bentosowe, które charakteryzowały się jej większym udziałem procentowym. *Aulacoseira ambigua* i *A. granulata* są typowymi okrzemkami planktonowymi (Denys 1991), a ich obecność w próbach bentosowych może wynikać zarówno z ruchów wody jak i opadania okryw na dno.

Analizując poszczególne mikrosiedliska pod kątem struktury zbiorowisk okrzemek na wybranych stanowiskach rzeki Bug można wskazać, że w przypadku niektórych gatunków udział procentowy jest wyższy dla poszczególnych mikrosiedlisk. Przykładem może być *Aulacoseira granulata*, która na stanowisku Kamieńczyk w przypadku większości prób występowała z największym udziałem procentowym w potamoplanktonie, natomiast w kilku terminach poboru odnotowano ją licznie również w epifitonie.

Warunki środowiskowe determinujące zróżnicowanie zbiorowisk okrzemek. Na zbiorowiska okrzemek w ekosystemach lotycznych mają wpływ czynniki hydromorfologiczne takie jak: zachowana ciągłość rzeki, zmienność głębokości, zmienność szerokości, struktura podłoża, skład podłoża, struktura strefy nadbrzeżnej oraz ilość i dynamika przepływu wód – reżim hydrologiczny. Rzeki na terenie Polski są zaklasyfikowane do 6 typów reżimów wodnych (Wrzesiński 2017a). Narew i Bug są zaliczane do typu 3 – reżim niwalny silnie wykształcony. W cyklu rocznym rzeki te podlegają największym zmianom odpływu: wiosną pojawiają się wysokie wezbrania roztopowe, latem i jesienią obserwuje się głęboką niżówkę. Odpływy dla tego typu rzek nie przekraczają 160 mm. Okres przeciętnych przepływów pojawia się na

początku roku hydrologicznego, następnie rozpoczynają się wiosenne wysokie przepływy (Wrzeński 2017b, Wrzeński 2018). Przykładem wpływu wezbrania roztopowego na strukturę zbiorowiska okrzemek są próby z marca drugiego roku badawczego ze stanowiska Barcice. W próbach tych nie ujawniono ani jednej okrywy *Stephanodiscus hantzschii* pomimo tego, że jest to gatunek notowany we wszystkich pozostałych próbach z tego stanowiska i jest to gatunek absolutnie stały i dominujący dla wszystkich badanych stanowisk na rzece Bug. Związane to jest z rozlaniem się rzeki na skutek wezbrania roztopowego. Miejsce poboru prób było odsunięte od głównego koryta rzeki i znajdowało się na granicy terasy zalewowej. Zmiana miejsca poboru prób miała odzwierciedlenie w zmianie struktury jakościowej i ilościowej zbiorowisk okrzemek. Należy też zwrócić uwagę na wahania poziomu wód wynikające z typu reżimu rzeczno, ale także te, które mogą być skutkiem globalnego ocieplenia klimatu. Od końca ubiegłego wieku zaobserwowano zmiany warunków klimatycznych, które wywołują zmiany hydrologiczne (Brzezińska i in. 2023). Pomimo tego, że analiza średniorocznych opadów nie przejawia się zmianami hydrologicznymi, jakim poddawane są aktualnie rzeki na polskim niżu, ostatnio obserwuje się, że warunki panujące w rzekach modyfikowane są przez obfite, nawalne i krótkotrwałe opady atmosferyczne oraz okresy długotrwałej suszy. Opady atmosferyczne kształtujące przepływ danej rzeki powiązane z sezonowością charakterystyczną dla klimatu umiarkowanego mają wpływ na strukturę zbiorowisk okrzemek. Część wód opadowych spływa bezpośrednio do rzek również z terenów przyległych, stanowiąc odpływ powierzchniowy, który w przeciwieństwie do odpływu podziemnego rzeki, jest zjawiskiem okresowym, a nawet epizodycznym, powodując nagły wzrost odpływu rzeczno. W fazie maksimum opadu atmosferycznego następuje formowanie przepływu kulminacyjnego (Soczyńska 1997; Allan 1998; Bajkiewicz-Grabowska, Mikulski 2005). W badaniach wykazano, że opady wynikające z sezonowości wpływają na strukturę zbiorowisk okrzemek zarówno planktonowych jak i bentosowych w rzekach (Chao i in. 2023), w tym szczególnie widoczny jest ten wpływ, gdy opady są nagłe i intensywne (Cho i in. 2020; Hwang 2023). Obecnie obserwowane zmiany klimatu, które przejawiają się i rzadszymi opadami śniegu i brakiem pokrywy śnieżnej, ograniczają zasilanie roztopowe. Odnotowano wzrost odpływu w okresie zimowym i spadek w miesiącach wiosennych na rzekach Narew i Bug (Brzezińska i in. 2023). Nagłe napływy wody i wysychanie koryt rzeki mają istotny wpływ na strukturę zbiorowisk okrzemek (B-Béres i in. 2019). Okrzemki wykształciły różne przystosowania do warunków zmiennego poziomu wód (Falasco i in. 2021). Do cech przystosowawczych zaliczyć można wytwarzanie śluzu, jak na przykład u *Cymbella* i *Gomphonema*, także zdolność przemieszczania się do obszarów wilgotnych, jak w przypadku *Navicula* i *Nitzschia* (Sabater

i in. 2017; Falasco i in. 2021). Ograniczenie przepływu i wysychanie wpływa na zbiorowiska okrzemek, jednak po wznowieniu przepływu potrafią one rozwijać nowe, zdolne do życia populacje, w szybkim czasie kolonizując ekosystem (Quevedo-Ortiz i in. 2024). Dzieje się tak dlatego, że okrzemki mogą przetrwać w wilgotnych ostojach, takich jak: ściółka, liście, a także drewno lub osady (Robson 2008; Falasco i in. 2020). Jednym z przystosowań dającym okrzemkom odporność na wysychanie jest wytwarzanie form przetrwalnikowych (Souffreau i in. 2013). Pomimo tego, że wszystkie te cechy przystosowawcze sprzyjają odbudowie zbiorowiska okrzemek, to wciąż są one organizmami bardzo wrażliwymi na skutki ograniczenia przepływu wody i wysuszenia (Cantonati i in. 2020). Właśnie ta wrażliwość powoduje, że są one idealną grupą organizmów, na podstawie której można zbadać reakcję zbiorowiska na ograniczenia przepływu wody związane z globalną zmianą klimatu (Torn'es i in. 2022). Okresy suszy nasilają wpływ zanieczyszczeń chemicznych, co może prowadzić do wystąpienia form teratologicznych okrzemek (Torn'es i in. 2018). Wzrost stężenia składników odżywczych, zamulenie i zmniejszenie dostępności wody może powodować zmiany w strukturze zbiorowisk okrzemek i prowadzić do wyginięcia wrażliwych gatunków (Novais i in. 2020) oraz przyczynić się do wzrostu udziału w zbiorowiskach gatunków tolerancyjnych, co w rezultacie prowadzi do zmniejszenia różnorodności gatunkowej.

Zlewnie obu badanych rzek znajdują się pod wpływem klimatu umiarkowanego, który charakteryzuje się sezonowością, wynikającą ze zmian opadów atmosferycznych jak i temperatury. Według danych IMGW o wartości średniej miesięcznej temperatur z ostatnich dwudziestu lat na stacjach meteorologicznych w zlewni rzeki Narew i Bug wykazano tendencję wzrostu temperatury powietrza. Wykazana tendencja wpisuje się w odnotowane zmiany temperatury z ostatnich siedemdziesięciu lat. Średnia temperatura powietrza w tym czasie wzrosła o dwa stopnie Celsjusza. Dane te potwierdzają, że obszary zlewni analizowanych rzek poddane są zmianom klimatycznym związanym z globalnym ociepleniem. Sezonowość klimatu i zmienność temperatury wody od 0°C w sezonie zimowym do 27°C w sezonie letnim, przejawiała się wahaniami udziału procentowego poszczególnych gatunków okrzemek w próbach. Dobrym przykładem jest *Cyclotella meneghiniana*, która będąc gatunkiem stałym i dominującym dla wszystkich stanowisk, wykazywała się zmiennym udziałem procentowym w próbach z różnych sezonów. Na stanowisku Cupel najwyższy jej udział procentowy był dla prób z lata z pierwszego roku badawczego przekraczając 20 % udziału w próbie (27°C), po czym jesienią i zimą nastąpił spadek jej udziału procentowego poniżej 5 % (1°C i 3°C), a kolejny wzrost odnotowano dla prób letnich i jesiennych kolejnego roku (23°C oraz 14°C), jednak wzrost ten nieznacznie przekroczył 10%. W przypadku stanowiska Kamieńczyk także

widzieć zmienny udział procentowy tego gatunku w próbach letnich, osiągając 30% (26°C), a najniższy jej udział procentowy na poziomie 0,2% odnotowano dla prób zebranych zimą (2°C) w drugim roku badawczym. Temperatura jest czynnikiem, który modyfikuje inne czynniki, jak na przykład zawartość rozpuszczonego tlenu w wodzie, co z kolei przekłada się na procesy mineralizacji w rzece, wpływając zarazem na zbiorowiska okrzemek.

Gatunek dominujący dla obu rzek, *Cyclostephanos dubius*, a także te gatunki, które były dominujące dla wszystkich stanowisk na Bugu, *Cyclotella meneghiniana* oraz *Stephanodiscus hantzschii*, są wykazywane jako wskaźniki złej jakości wód. Są to gatunki tolerancyjne i odporne na zanieczyszczenia, będące skutkiem przekształceń antropogenicznych zachodzących w środowisku. *Cyclotella meneghiniana* podobnie jak i *Cyclostephanos dubius* to okrzemki charakterystyczne dla wód eutroficznych (Prygiel, Coste 2000; Wojtal, Kwadrans 2006). *Cyclotella meneghiniana* może rozwijać duże populacje, jeśli istnieje prawdopodobieństwo, że zostanie pozbawiona konkurencji (Prygiel, Coste 2000). Kolejnym gatunkiem, który może być wskaźnikiem silnej eutrofizacji wód jest *Stephanodiscus hantzschii* (Kolmakov i in. 2002). Występowanie gatunków okrzemek: *Cyclostephanos dubius*, *Cyclotella meneghiniana* oraz *Stephanodiscus hantzschii* z wysokim udziałem procentowym, szczególnie w okresach letnich, wskazują na to, że wody obu rzek są silnie zeutrofizowane, co wpływa na ocenę ich stanu ekologicznego. Zarówno stanowiska na rzece Narew jak i rzece Bug znajdują się na obszarach wiejskich: Dzierżenin, Kamieńczyk i Barcice, w których rolnictwo, w tym ładunek pierwiastków biogenicznych, związanych z nawożeniem pól uprawnych, jak i hodowli bydła może wpływać na różnorodność taksonomiczną okrzemek (Veraarti i in. 2008). Gatunkiem absolutnie stałym i stałym na stanowiskach badanych rzek była *Eolimna minima* (syn. *Sellaphora nigri* (De Notaris) Wetzel & Ector), która w wielu próbach była też gatunkiem dominującym i subdominującym: Barcice, Dzierżenin i Kamieńczyk. Gatunek ten uważany jest za odporny na zanieczyszczenia organiczne (Moravcová i in. 2013) i może być wskaźnikiem złej jakości wód. Dodatkowym czynnikiem wpływającym na strukturę zbiorowisk okrzemek może być wpływ infrastruktury drogowej (Szczepocka i in. 2016). Taki wpływ można wskazać w przypadku stanowisk Wyszków i Łacha, które znajdują się w okolicy mostów, przy czym stanowisko Wyszków jest zlokalizowane w miejscu sztucznie ukształtowanej miejskiej plaży. Stan jakości wód ekosystemów lotycznych współcześnie coraz silniej wpływa na zróżnicowanie struktury zbiorowisk okrzemek. Wśród okrzemek są gatunki, które charakteryzują się dużą wrażliwością na zanieczyszczenia środowiska wodnego, ale także są takie, które wykazują szeroki zakres tolerancji na różne czynniki środowiskowe, przez co są grupą organizmów o wysokim potencjale bioindykacyjnym (Bona i in. 2021). Indeks

okrzemkowy IPS pozwala na określenie stanowisk w dolnym odcinku rzeki Narew (Dzierżenin, Łacha i Dębe) jako charakteryzujących się jakością wody w większości odpowiadającą klasie od III do IV, najczęściej odnotowano klasę IV (63 próby). Ze względu na indeks GDI są to wody o klasie jakości od II do V, najczęściej odnotowano klasę III (70 prób). Ze względu na indeks TDI są to wody odpowiadające klasie od IV do V, najczęściej notowano stan hipertrofii (83 próby). Jak wynika z preferencji środowiskowych okrzemek tworzących zbiorowiska wody rzeki Narew są obciążone materią organiczną. W odniesieniu do saprobii na podstawie klasyfikacji ekologicznej Van Dam i in. (1994), pomimo że główną grupę stanowią tam okrzemki, które wskazują na warunki β -mezosaprobowe również liczną grupę stanowią gatunki α -mezosaprobowe i α -mezo-polisaprobowe. Na podstawie klasyfikacji ekologicznej Van Dam i in. (1994) warunki troficzne rzeki Narew można określić jako eutrofia. W próbach ze stanowisk z rzeki Narew odnotowano gatunki dominujące i absolutnie stałe, które na podstawie klasyfikacji zaproponowanej przez Lange-Bertalota na podstawie badań, przeprowadzonych wrzecz Ren (Krauze 1994) oraz klasyfikacji zaproponowanej przez Rakowską (2001) są uznawane jako tolerancyjne na zanieczyszczenia: *Aulacoseira ambigua* i *Cyclostephanos dubius* oraz gatunki odporne jak *Cyclotella meneghiniana*. Ponadto w dwóch z badanych stanowisk (Dębe i Dzierżenin) gatunkiem dominującym i absolutnie stałym był *Stephanodiscus hantzschii*, który także zaliczany jest do gatunków odpornych na zanieczyszczenia (Krauze 1994; Rakowska 2001). W próbach z Narwi odnotowano też nieliczne, ale zarazem stałe i absolutnie stałe gatunki zaliczane do grupy szczególnie wrażliwych na zanieczyszczenia: *Cymbella tumida* i *Fragilaria capucina* (Krauze 1994, Rakowska 2001). W przypadku rzeki Bug także analizowano zbiorowiska okrzemek pod kątem oceny stanu ekologicznego wody. Z prób zebranych w dolnym odcinku rzeki Bug ze stanowisk: Kamieńczyk, Wyszaków, Barcice i Cupel biorąc pod uwagę uzyskane wartości indeksu IPS wynika, że są to wody w większości odpowiadające klasie od II do V, najczęściej odnotowano klasę IV (33 próby) i V (22 próby). Ze względu na indeks GDI są to wody o klasie jakości od II do V, najczęściej odnotowano klasę III (42 próby) oraz klasę IV (35 prób). Ze względu na indeks TDI są to wody w większości odpowiadające klasie od IV do V, najczęściej odnotowano klasę V (98 prób na 120 prób), co wskazuje na stan hipertrofii. Jak wynika z analizy struktury zbiorowisk okrzemek wody rzeki Bug są obciążone materią organiczną. Pod względem saprobii na podstawie klasyfikacji ekologicznej Van Dam i in. (1994) w analizowanych próbach występują głównie okrzemki wskazujące na warunki β -mezosaprobowe, ale również licznie reprezentowane są gatunki α -mezosaprobowe i α -mezo-polisaprobowe. W okresach o podwyższonej temperaturze wody udział gatunków wskazujących na znaczne obciążenie materią organiczną był wyższy niż

gatunków β -mesosaprobowych. Wyraźną odrębność pod względem warunków saprobowych wykazuje stanowisko Cupel, w którym odnotowano okresowo wyższy udział gatunków wymagających wody o niskim obciążeniu materią organiczną, należących do oligosaprobów i β -mesosaprobów. Pod względem trofii wody rzeki Bug wykazują warunki eutrofii do hipertrofii.

Na podstawie danych z Głównego Inspektoratu Ochrony Środowiska pod względem ekologicznym klasa czystości wód rzeki Bug na wybranych odcinkach, od granicy państwa do miejscowości, gdzie kończy swój bieg, zwiera się w przedziale od III do V, zaś stan ekologiczny określany jest od słabego do złego. W próbach ze stanowisk rzeki Bug odnotowano gatunki dominujące i absolutnie stałe, które są uznawane jako tolerancyjne na zanieczyszczenia: *Aulacoseira ambigua* i *Cyclostephanos dubius* oraz gatunki odporne jak *Cyclotella meneghiniana* i *Stephanodiscus hantzschii* (Rakowska 2001). Porównując obie rzeki pod kątem wartości indeksów okrzemkowych i wartości wskaźnikowych okrzemek tworzących zbiorowiska można stwierdzić, że wody rzeki Bug są bardziej obciążone zarówno materią organiczną jak i związkami i biogenicznymi. Na stan ten ma wpływ kilka czynników. Pierwszą grupę stanowią warunki fizjograficzne i hydrologiczne. Narew jest rzeką anastomozującą, z dużą retencją, zasilana jest rzeką Biebrzą, co wpływa na nią stabilizująco. Źródła rzeki Narew znajdują się na Białorusi w Puszczy Białowieskiej. Na terenie Polski w górnym odcinku przepływa ona przez tereny chronione (Nadnarwiański Park Krajobrazowy), w którym szkodliwy wpływ związany z działalnością człowieka jest ograniczony. Wcześniejsze badania okrzemek prowadzone w górnym jej odcinku, powyżej zbiornika Siemianówka, ze względu na stopień zanieczyszczenia organicznego (saprobia) na podstawie dwóch indeksów okrzemkowych: GDI i IPS wykazały, że wody rzeki Narew należą do II – III klasy czystości, natomiast indeks TDI wskazał na eutroficzny charakter wody (Górniak i in. 2006). Chociaż wpływ związany z obecnością miast: Łomża, Ostrołęka i Pułtusk, zaczyna się dopiero w środkowym i dolnym biegu rzeki Narew, to zbudowanie i funkcjonowanie zbiornika Siemianówka zmienia warunki kształtujące strukturę zbiorowisk okrzemek. Prowadzono również badania obecności sinic oraz produkowanych przez nie związków chemicznych w obrębie zarówno zbiornika Siemianówka, jak i 130 km poniżej tamy. Budowa tamy powoduje dłuższe zatrzymanie wód rzecznych, co wpływa na zmianę warunków termicznych, a to powoduje znaczny wzrost biomasy fitoplanktonu. Wody rzeki w wyniku oddziaływania zbiornika stają się silnie zeutrofizowane, a ich odpływ kształtuje warunki w niższych odcinkach rzeki (Grabowska, Mazur-Marzec 2011; Grabowska 2012; Grabowska, Mazur-Marzec 2016). Rzeka Bug, która jest rzeką transgraniczną, mimo że w niewielkim stopniu poddana była

przekształceniom zmieniającym hydromorfologię, to wpływ obszarów wiejskich, przez które przepływa zarówno na terenie Ukrainy, Białorusi i Polski jest nie bez znaczenia na kształtowanie się zbiorowisk okrzemek. Badania biologii okrzemek wykazały tendencje do wzrostu częstości występowania rozmnażania bezpłciowego gatunków tolerancyjnych jako reakcję na działanie toksyczne, takie jak metale i pestycydy, które współistnieją z działalnością rolniczą (Pandey i in. 2018). Powoduje to wzrost udziału, a nawet dominację tych gatunków w zbiorowiskach okrzemek. Ponadto stres środowiskowy jakim są zanieczyszczenia, prowadzi do szybszego podziału komórek, ostatecznie powodując zmniejszenie rozmiaru okryw (Pandey i in. 2017), a zanieczyszczenia osadów metalami również na terenach rolniczych mogą wpływać na ruchliwość okrzemek (Nicolosi Gelis i in. 2020). Wcześniejsze badania podkreślają negatywny wpływ zanieczyszczeń wynikający z koncentracji terenów wiejskich i miejskich wzdłuż biegu rzek na zbiorowiska okrzemek tam występujących (Szczepocka i in. 2016; Tornés i in. 2018; Macklin, Lewin 2019; Foets i in 2020; Szczepocka i in. 2024). Badania zbiorowisk okrzemek w rzekach Grabia i Brodnia (Polska Środkowa) wykazały, że obciążenia ich substancjami pokarmowymi mają wpływ na ich strukturę jakościową i ilościową (Sumorok i in. 2009). Obie rzeki są pod wpływem obszarów wiejskich, co przejawia się wysokim poziomem saprobii i trofii, jednak jest on niższy niż w rzece Bug.

Poza obszarem Polski rzeka Bug pod względem ekologicznym była badana w południowej części Ukrainy z podziałem na trzy odcinki: górny (Bilous i in. 2012), środkowy (Belous i in. 2013) i dolny odcinek (Belous i in. 2016; Bilous i in. 2021). Badania te prowadzono pod kątem algologicznym, hydrobiologicznym i hydrochemicznym w latach 2007 – 2011, przy czym obejmowały one tylko próby letnie. Na odcinkach górnej części rzeki Bug na Ukrainie organizmy wskaźnikowe wykazały, że badany odcinek rzeki charakteryzował się niską zasadowością i niską zawartością rozpuszczonych substancji stałych, o wolnym przepływie, umiarkowanie natleniony, a klasę jakości wody określono od I do III. Ponadto wykazano wysoką aktywność fotosyntezy, głównie ze względu na obecność euglenin oraz okrzemek, zaś stan troficzny zmieniał się w kierunku wzrostu żyzności na badanych odcinkach, począwszy od źródła rzeki do dalszych stacji badawczych. Wskazano na wysokie zdolności samooczyszczania ekosystemu w obrębie badanej części rzeki (Bilous i in. 2012). Zbadano również fitoplankton pobrany na odcinkach środkowej części rzeki Bug na Ukrainie pod kątem zanieczyszczenia wody. Dla tego odcinka rzeki obliczono wskaźnik zanieczyszczenia (RPI) w oparciu o pięć parametrów: indeks saprobowy, zawartość jonów amonowych, azotanów, azotynów i ortofosforanów. Na podstawie indeksu saprobowego i zawartości azotynów oceniono klasę jakości wód na III, natomiast na podstawie zawartości azotanów i jonu

amonowego wody odpowiadały II klasie jakości. Określono, że stopień nasycenia wody ortofosforanami odpowiadał IV klasie jakości. Wykazano też, że rzeka na badanych odcinkach ma duże zdolności do samooczyszczania (Bilous i in. 2012). Podobne badania prowadzono na odcinkach dolnej części rzeki Bug na Ukrainie. Analizowano próbki fitoplanktonu i dla badanego odcinka obliczono wskaźnik zanieczyszczenia rzeki (RPI). Ze względu na indeks saprobowy i zawartość jonu amonowego wody na tym odcinku Bugu odpowiadały III klasie jakości. Z uwzględnieniem zawartości azotanów i azotynów należałoby wody zaliczyć do klasy I i II, a wartość RPI obliczona w odniesieniu do ortofosforanów wskazywała na klasę IV. W przypadku tego odcinka, podobnie jak i w we wcześniej badanych odcinkach rzeki Bug wykazano, że rzeka ma duże zdolności do samooczyszczania (Belous i in. 2016). Ostatnie publikowane badania rzeki Bug na Ukrainie (Bilous i in. 2023) wykazały, że indeks saprobowy odpowiada warunkom β -mesosaprobowym i II klasie jakości wody, co odpowiada wodom umiarkowanie zanieczyszczonym, przy czym większość badanych obszarów miała „umiarkowany” stan ekologiczny, a cztery z badanych obszarów charakteryzowały się „dobrym” stanem ekologicznym. Badania prowadzone na rzece Bug na Ukrainie wykazały, że wody te są umiarkowanie zanieczyszczone i mają umiarkowany stan ekologiczny, jednak należałoby ostrożnie podchodzić do interpretacji tych wyników. Przede wszystkim w ocenie stanu wód rzeki Bug na Ukrainie, wykorzystując analizę zbiorowisk okrzemek, zastosowano inne indeksy niż te, które wykorzystano w niniejszej pracy. Ponadto niewykluczone jest, że rzeka Bug w odcinku dolnym jest bardziej zanieczyszczona niż w górnym, na co nakłada się transgraniczny charakter i przebieg przez tereny rolnicze, jak w przypadku stanowiska Kamieńczyk i Barcice, a także miejskie, jak w przypadku stanowiska Wyszaków – negatywny wpływ antropogeniczny.

Zróźnicowanie zbiorowisk okrzemek a mapowanie rzek dla potrzeb kryminalistyki.

Zbiorowiska okrzemek w aspekcie ich zróźnicowania w ekosystemach wód płynących były opisywane dla rejonów południa Polski, w tym dla Tatr Wysokich (Kawecka 2017), a także w kontekście oceny jakości wód dla rzek w Małopolsce i na Podkarpaciu (Noga i in. 2013; Noga i in. 2015; Noga i in. 2016; Noga i in. 2016). Prowadzono też między innymi badania okrzemek rzek Grabia i Brodnia (Polska Środkowa) pod względem obciążenia wód substancjami pokarmowymi (Sumorok i in. 2009). Ponadto badano jakość wody z wykorzystaniem okrzemek bentosowych z rzeki Bzury oraz Pilicy (Szczepocka, Szulc 2009; Szczepocka i in. 2014) oraz wpływ przekształceń hydromorfologicznych rzek na obszarze zurbanizowanym na strukturę zbiorowisk okrzemek z odniesieniem do rzeki o warunkach

referencyjnych (Szczepocka i in. 2024). Brakuje jednak publikowanych, aktualnych prac dotyczących rzek z innych obszarów Polski, w których okrzemki byłyby badane w kontekście zróżnicowania ich zbiorowisk na wybranych odcinkach rzek w różnych mikrosiedliskach w odniesieniu do sezonowości. Analiza zbiorowisk okrzemek dla potrzeb mapowania rzek może być pomocnym narzędziem wykorzystywanym w kryminalistyce w różnych aspektach. Może to być użyteczne zarówno przy diagnozowaniu utonięć jako przyczyny śmierci (Zhuo i in. 2016; Zhang i in. 2020; Zhou i in. 2020; Bogusz i in. 2023), jak i typowania lub wykluczenia miejsca utonięcia, a nawet miejsca popełnienia przestępstwa (Bogusz i in. 2022). Prace ukazujące mapowanie rzek pod kątem zbiorowisk okrzemek w Chinach na potrzeby kryminalistyczne dotyczą jedynie prób planktonowych, w których badania obejmowały oznaczenie okrzemek do rodzaju oraz ilościowo (Zhuo i in. 2016; Zhang i in. 2021). Jedną z najistotniejszych rekomendacji dla mapowania ekosystemów wodnych jest przyjęcie identyfikacji okrzemek do poziomu gatunku. W obrębie rodzajów znajdują się gatunki okrzemek o zróżnicowanych preferencjach wobec środowiska wodnego, które mogą występować często w skrajnych, odmiennych warunkach. Na przykład odnotowana z różnym udziałem w próbach, zarówno z rzeki Narew jak i Bug, *Eunotia bilunaris* jest β -mesosaprobem, ze względu na warunki troficzne neutralna, w odniesieniu do odczynu wody także neutralna. Natomiast podobna do niej pod względem cech morfologicznych *Eunotia pseudogrenlandica* w odniesieniu do saprobii jest oligosaprobem, w odniesieniu do trofii jest oligotrofem, a w odniesieniu do odczynu jest acidofilem. Kolejnym przykładem podobnych morfologicznie gatunków jest występująca w próbach zarówno z rzeki Narew jak i Bug *Navicula veneta*, która należy do gatunków α -mezo-polisaprobowych, w odniesieniu do trofii jest eutroficzna i w odniesieniu do odczynu jest alkalofilem, a *Navicula notha* prezentuje skrajnie inne preferencje jest oligosaprobem, w odniesieniu do trofii jest oligo-mesotroficzna, a w odniesieniu do odczynu wody jest acidofilem. Odnotowana w badanych rzekach *Gomphonema parvulum*, która jest gatunkiem α -mezo-polisaprobowym, eutroficznym, a w odniesieniu do odczynu wody jest neutralna. Podobna do niej *Gomphonema exilissimum* jest oligosaprobem, oligotrofem, a w odniesieniu do odczynu wody jest neutralna. Powyższe przykłady ukazują, jak ważne jest rzetelne oznaczanie okrzemek do poziomu gatunku, a nie tylko rodzajów jak we wcześniej publikowanych pracach (Zhang i in. 2020). Oznaczenie do rodzajów nie daje pełnej informacji o środowisku, w tym na temat obecności gatunków wrażliwych, tolerancyjnych i odpornych na zanieczyszczenia oraz ich udziału w próbach, co jest istotne z punktu widzenia charakterystyki danego stanowiska, a także nie daje informacji na temat okresowej obecności gatunków. Oznaczenie gatunków niesie także korzyści w postaci

wyznaczenia gatunków charakterystycznych dla danego środowiska. Przykładem jest *Navicula jakovljevicii*, której niewielką liczbę okryw ujawniono w próbach ze stanowisk w rzece Narwi. Gatunek ten był dotychczas pojedynczo notowany w ekosystemach wodach Europy (Lange-Bertalot 2001) i brak jest informacji o notowaniu tej okrzemki na terenie Polski. Pojawienie się rzadko występującego gatunku w danym siedlisku może być niezmiernie przydatną informacją z punktu widzenia kryminalistycznego badania miejsca zdarzenia, zwłaszcza gdy gatunek ten pojawia się w danym środowisku okresowo.

W dotychczasowych pracach dotyczących mapowania wykorzystano tylko zbiorowiska rozwijające się w formacji planktonu. Natomiast badania przeprowadzone w rzekach Narew i Bug uwzględniały nie tylko próby planktonowe, ale też próby z różnych typów podłoża: piasek, muł, beton i rośliny – mikrohabitaty. Pozwoliło to na wykazanie, że struktura zbiorowisk okrzemek poszczególnych mikrosiedlisk w rzece także jest zróżnicowana, co daje znacznie szerszą wiedzę o różnych miejscach i stanowiskach wód płynących.

Mapowanie rzek dla potrzeb kryminalistycznych daje dużo większe możliwości stosowania, gdy okrzemki są identyfikowane do poziomu gatunków. Zwiększa to dokładność i rzetelność informacji, jaką uzyskuje się o konkretnym środowisku, co w kontekście potwierdzenia, ewentualnie wykluczenia, czy miejsce znalezienia zwłok było też miejscem utonięcia, ma istotne znaczenie. Trudnością w mapowaniu rzek z wykorzystaniem identyfikacji okrzemek do poziomu gatunku jest posiadanie umiejętności na poziomie eksperta. Jednak gdy spojrzeć na to z punktu widzenia kryminalistycznego badania miejsca zdarzenia trudność ta jest pozorna, ponieważ przy opiniowaniu takie właśnie umiejętności są pożądane.

Piśmiennictwo

- Adl S.M., Bass D., Lane C.E., Lukeš J., Schoch C.L., Smirnov A., Agatha S., Berney C., Brown M.W., Burki F., Cárdenas P., Čepička I., Chistyakova L., Del Campo J., Dunthorn M., Edvardsen B., Eglit Y., Guillou L., Hampl V., Heiss A.A., Hoppenrath M., James T.Y., Karnkowska A., Karpov S., Kim E., Kolisko M., Kudryavtsev A., Lahr D.J.G., Lara E., Le Gall L., Lynn D.H., Mann D.G., Massana R., Mitchell E.A.D., Morrow C., Park J.S., Pawlowski J.W., Powell M.J., Richter D.J., Rueckert S., Shadwick L., Shimano S., Spiegel F.W., Torruella G., Youssef N., Zlatogursky V., Zhang Q. 2019. Revisions to the Classification, nomenclature and diversity of Eukaryotes. *Journal Eukaryot Microbiology*, 66(1): 4-119. doi: 10.1111/jeu.12691.t
- Allan J.D. 1998. *Ekologia wód płynących*. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa.
- Aumeier C., Menzel D. 2012. Secretion in the diatoms. [W]: Vivanco J.M., Baluska F. (red.) *Secretions and exudates in biological systems*. Springer, Heidelberg, 221-250.

- Bajkiewicz-Grabowska E., Mikulski Z. 2005. *Hydrologia ogólna*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa.
- Baker L.A., Biron D.G., Millan F., Voldoire O., Breton V., Allain E., Beauger A. 2022. The substrate, a key factor or not, to explain the species diversity of diatom communities in mineral springs. *Botany Letters*, 169(2):155-165. doi:10.1080/23818107.2022.2028186.
- Banaszuk P., Kamocki A. 2008. Effects of climatic fluctuations and land-use changes on the hydrology of temperate fluviogenous mire. *Ecological Engineering*, 32(2): 133-146, doi:10.1016/j.ecoleng.2007.10.002.
- B-Béres V., Tóthmérész B., Bácsi I., Borics G., Abonyi A., Tapolczai K., Rimet F., Bouchez A., Várbíró G., Török P. 2019. Autumn drought drives functional diversity of benthic diatom assemblages of continental intermittent streams. *Advances in Water Resources*, 126:129-136. doi:10.1016/j.advwatres.2019.02.010
- Belous Ye.P., Barinova S.S., Klochenko P.D. 2013. Phytoplankton of the middle section of the Southern Bug River as the index of its ecological state. *Hydrobiological Journal*, 49(6):29-45. doi:10.1615/HydrobJ.v49.i6.30.
- Belous Ye.P., Barinova S.S., Klochenko P.D., Zhezherya V.A., Zhezherya T.P., Nezbitskaya I.N. 2016. Phytoplankton of the lower section of the Southern Bug River as the index of its ecological state. *Hydrobiological Journal*, 52(4):19-31. doi:10.1615/HydrobJ.v52.i4.30.
- Bilous O., Barinova S., Klochenko P. 2012. Phytoplankton communities in ecological assessment of the Southern Bug River upper reaches (Ukraine) *Hydrobiological Journal*, 49(1):39-50. doi: 10.1615/HydrobJ.v49.i1.50.
- Bilous O.P., Genkal S.I., Zimmermann J., Kusber W.H., Jahn R. 2021. Centric diatom diversity in the lower part of the Southern Bug River (Ukraine): the transitional zone at Mykolaiv city. *Phyto Keys*, 178: 31-69. doi: 10.3897/phytokeys.178.64426.
- Bilous O., Afanasyev S., Abonyi A., Bondar-Kunze E., Hein T. 2023. Reynolds phytoplankton functional classification approach helps evaluate the historical ecological status of the large European Southern Bug River (Ukraine). *Ecological Research*, 39(1):97-111. doi:10.1111/1440-1703.12424.
- Blanco S., Cejudo-Figueiras C., Tudesque L., Bécares E., Hoffmann L., Ector L. 2012. Are diatom diversity indices reliable monitoring metrics? *Hydrobiologia*, 695(1): 199-206. doi:10.1007/s10750-012-1113-1
- Bogusz I., Bogusz M., Żelazna-Wieczorek J. 2022. Diatoms from inland aquatic and soil habitats as indestructible and nonremovable forensic environmental evidence. *Journal of Forensic Sciences*, 6 (67):1490-1504. doi: 10.1111/1556-4029.15017.
- Bogusz M., Bogusz I., Żelazna-Wieczorek J. 2023. The possibilities and limitations of comparative diatomaceous analysis for confirming or excluding the site of an incident - case studies. *Forensic Science International*, 346, doi: 10.1016/j.forsciint.2023.111644.
- Bona F., La Morgia V., Fenoglio S., Morandi L., Falasco E. 2021. Diatom communities and ecological status classification in the upper Po River basin. *Journal of Limnology*, 80(3). doi: 10.4081/jlimnol.2021.2057.
- Brzezińska W., Wrzeziński D., Świątek S. 2023. Wpływ ocieplenia klimatu na odpływ rzek w Polsce w latach 1951–2020 [W]: *Geoprzestrzeń 7*. Bogucki Wydawnictwo Naukowe.

- Cantonati M., Bertuzzi E., Spitale D. (red). 2007. The spring habitat: biota and sampling methods. Museo tridentino di scienze naturali.
- Cantonati M., Kelly M.G., Demartini D., Angeli N., Dörflinger G., Papatheodoulou A., Armanini D.G. 2020. Overwhelming role of hydrology related variables and river types in driving diatom species distribution and community assemblage in streams in Cyprus. *Ecological Indicators*, 117. doi:10.1016/j.ecolind.2020.106690.
- Chao M., Runbo C., Yongxu D., Nannan Z., Yan L., Fengyang S., Yawen F., Xinxin L. 2023. Differences in biodiversity and assembly mechanisms between planktonic and benthic diatom communities in riverine ecosystems: A case study in the Ashi river. *Ecological Indicators*, 157: doi:10.1016/j.ecolind.2023.111258.
- Cho I.H., Kim H.K., Lee M.H., Kim Y.J., Lee H., Kim B.H. 2020. The Effect of monsoon rainfall patterns on epilithic diatom communities in the Hantangang river, Korea. *Water*, 12(5), 1471. doi:10.3390/w12051471.
- Clarke K.R., Gorley R.N. 2015. Getting started with PRIMER v7. PRIMER-E: Plymouth, Plymouth Marine Laboratory.
- Clarke K.R., Warwick R.M. 2001. Change in marine communities: an approach to statistical analysis and interpretation, 2nd edition. PRIMER-E Ltd, Plymouth Marine Laboratory, UK.
- Coste M., Ayphassorho H. 1991. Étude de la qualité des eaux du Bassin Artois – Picardie a l'aide des communautés de diatomées benthiques. Raport Cemagref. Bordeaux – Agence de l'Eau Artois-Picardie, Douai.
- Denys L. 1991/1992. A check-list of the diatoms in the Holocene deposits of the western Belgian coastal plain with the survey of their apparent ecological requirements, I. Introduction, ecological code and complete list. Geological Survey of Belgium Professional Paper, 246: 1–41.
- Dombrowski A., Głowacki Z., Jakubowski W., Kovalchuk I., Michalczyk Z., Nikiforova M., Szwajgier W., Wojciechowski K.H. (red.) 2002. Korytarz ekologiczny doliny Bugu: stan, zagrożenia, ochrona. IUCN: International Union for Conservation of Nature. Fundacja IUCN Poland, IUCN, Office for Central Europe, IUCN, European Programme.
- Edgar L.A. 1983. Mucilage secretions of moving diatoms. *Protoplasma* 118(1):44-48.
- Edgar L.A., Pickett-Heaps J.D. 1983. The mechanism of diatom locomotion. I. An ultrastructural study of the motility apparatus. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 218(1212): 331-343.
- Edgar L.A., Zavortink M. 1983. The mechanism of diatom locomotion. II: identification of actin. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B. Biological Sciences*, 218(1212): 345–348.
- Edgar L.A., Pickett-Heaps J.D. 1984. Diatom locomotion. [W]: Round F.E., Chapman D.J. (red.) *Progress in Phycological Research*, 3. Biopress, Bristol, 47-88.
- Eloranta P., Soininen J. 2002. Ecological status of some Finnish rivers evaluated using benthic diatom communities. *Journal of Applied Phycology*, 14: 1-7. doi:10.1023/A:1015275723489.
- Falasco E., Bona F., Risso A.M., Piano E. 2021. Hydrological intermittency drives diversity decline and functional homogenization in benthic diatom communities. *Science of the Total Environment*, 762:143090. doi:10.1016/j.scitotenv.2020.143090.

- Falasco E., Doretto A., Fenoglio S., Piano E., Bona F. 2020. Supraseasonal drought in an Alpine river: effects on benthic primary production and diatom community. *Journal of Limnology*, 79 (2). doi:10.4081/jlimnol.2020.1933.
- Flori S., Jouneau P.H., Bailleul B., Gallet B., Estrozi L.F., Moriscot C., Bastien O., Eicke S., Schober A., Bártulos C.R., Maréchal E., Kroth P.G., Petroutsos D., Zeeman S., Breyton C., Schoehn G., Falconet D., Finazzi G. 2017. Plastid thylakoid architecture optimizes photosynthesis in diatoms. *Nature Communications*, 8. doi: 10.1038/ncomms15885.
- Flori S., Jouneau P. H., Finazzi G., Maréchal E., Falconet D. 2016. Ultrastructure of the periplastidial compartment of the diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Protist* 167(3): 254-267. doi:10.1016/j.protis.2016.04.001.
- Foets J., Wetzel C.E., Teuling A.J., Pfister L. 2020. Temporal and spatial variability of terrestrial diatoms at the catchment scale: controls on communities. *Peer J.* 8:e9198 doi:10.7717/peerj.9198
- Górniak A. 2006. red.: Ekosystem Zbiornika Siemianówka w latach 1990 – 2004. Białystok.
- Grabowska M., 2012. The role of a eutrophic lowland reservoir in shaping the composition of river phytoplankton. *Ecohydrology Hydrobiology*, 12(3):231-242. doi:10.2478/v10104-012-0016-0.
- Grabowska M., Mazur-Marzec H. 2011. The effect of cyanobacterial blooms in the Siemianówka Dam Reservoir on the phytoplankton structure in the Narew River. *Oceanological and Hydrobiological Studies*, 40(1): 19-26. doi:10.2478/s13545-011-0003-x.
- Grabowska M., Mazur-Marzec H. 2016. The influence of hydrological conditions on phytoplankton community structure and cyanopeptide concentration in dammed lowland river. *Environmental Monitoring and Assessment*, 188. doi:10.1007/s10661-016-5506-x.
- Holland R., Dugdale T.M., Wetherbee R., Brennan A.B., Finlay J.A., Callow J.A. Callow M.E. 2004. Adhesion and motility of fouling diatoms on a silicone elastomer. *Biofouling*, 20: 323-29. doi:10.1080/08927010400029031.
- Hwang E.A., Cho I.H., Kim H.K., Yi C., Kim B.H. 2023. The relationship between rainfall pattern and epilithic diatoms in four streams of Central-Western Korea for three years (2013–2015). *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 20 (5). doi:10.3390/ijerph20054099.
- Karthick B., Taylor J.C., Mahesh M.K., Ramachandra T.V. 2010. Protocols for collection, preservation and enumeration of diatoms from aquatic habitats for water quality monitoring in India. *IUP Journal of Soil and Water Sciences*, 3 (1): 25-60.
- Kates M., Volcani B.E. 1966. Lipid components of diatoms. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism*, 116(2): 264-278. doi:10.1016/0005-2760(66)90009-9.
- Kawecka B. 2017. Zbiorowiska okrzemek (Bacillariophyceae) w źródłach, wodach stojących i płynących polskiej części Tatr. *Fragm. Florist. Geobot. Polon.* 24(2): 303-328,
- Kawecka B., Eloranta P.V. 1994. *Zarys ekologii glonów wód słodkich i środowisk lądowych*. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa.
- Kelly M.G., Whitton B.A. 1995. The trophic diatom index: a new index for monitoring eutrophication in rivers. *Journal of Applied Phycology* 7(4): 433-444. doi:10.1007/BF00003802

- Kelly M.G., Gómez-Rodríguez C., Kahlert M., Almeida S.F., Bennett C., Bottin M., Delmas F., Descy J., Dörflinger G., Kennedy B., Marvan P., Opatřilová L., Pardo I., Pfister P., Rosebery J., Schneider S.C., Vilbaste S. 2012. Establishing expectations for pan-European diatom based ecological status assessments. *Ecological Indicators*, 20: 177-186. doi: 10.1016/j.ecolind.2012.02.020.
- Kolada A. 2020. Podręcznik do monitoringu elementów biologicznych klasyfikacji stanu ekologicznego wód powierzchniowych. Aktualizacja metod. Główny Inspektorat Ochrony Środowiska, Warszawa.
- Kolmakov V.I., Gaevskii N.A., Ivanova E.A., Dubovskaya O.P., Gribovskaya I.V., Kravchuk E.S. 2002. Comparative Analysis of Ecophysiological Characteristics of *Stephanodiscus hantzschii* Grun. in the Periods of Its Bloom in Recreational Water Bodies. *Russian Journal of Ecology*, 33;97-103. doi:10.1023/A:1014448707663.
- Kondracki J. 1998. *Geografia regionalna*. Wydawnictwo naukowe PWN.
- Krammer K. 1997a. Die cymbelloiden Diatomeen. 1. Allgemeines und Encyonema part. *Bibliotheca Diatomologica*, Cramer J., Berlin-Stuttgart, 36.
- Krammer K. 1997b. Die cymbelloiden Diatomeen. 2. Encyonema part., Encyonopsis und Cymbellopsis. *Bibliotheca Diatomologica*, Cramer J., Berlin – Stuttgart, 37.
- Krammer K. 2000. The genus *Pinnularia*. In: Lange-Bertalot H. (red.) *Diatoms of Europe*. A.R.G. Ganther Verlag K.G.
- Krammer K. 2002. *Cymbella*. [W]: Lange-Bertalot H. (red.) *Diatoms of Europe*. A.R.G. Ganther Verlag K.G.
- Krammer K. 2003. *Cymboplectra*, *Delicata*, *Navicymbulla*, *Gomphocymbellopsis*, *Afrocybella*. In: Lange-Bertalot H. (red.) *Diatoms of Europe*. A.R.G., Ganther Verlag K.G.
- Krammer K., Lange-Bertalot H. 1986. *Bacillariophyceae* 1. *Naviculaceae* In: *Süßwasserflora von Mitteleuropa* Ettl H., Gerloff J., Heyning H., Mollenhauer D. (red). 2/1. G. Fischer Verlag, Jena.
- Krammer K., Lange-Bertalot H. 1988. *Bacillariophyceae* 2. *Bacillariaceae*, *Epithemiaceae*, *Surirellaceae*. In: H. Ettl, Gerloff J., Heyning H., Mollenhauer D. (red.) *Süßwasserflora von Mitteleuropa*. Veb G. Fischer Verlag, Jena.
- Krammer K., Lange-Bertalot H. 1991a. *Bacillariophyceae* 3. *Centrales*, *Fragilariaceae*, *Eunotiaceae*. In: H. Ettl, Gerloff J., Heynig H., Mollenhauer D. (red.) *Süßwasserflora von Mitteleuropa*. Veb G. Fischer Verlag, Jena.
- Krammer K., Lange-Bertalot H. 1991b. *Bacillariophyceae* 4. *Achnanthaceae*, *Kritische Ergänzungen zu Navicula (Lineolatae) und Gomphonema Gesamtliteraturverzeichnis Teil 1 - 4*. In: Ettl. H., Gerloff J., Heyning H., Mollenhauer D. (red.): *Süßwasserflora von Mitteleuropa*. Veb G. Fischer Verlag, Stuttgart – Jena.
- Krammer K., Lange-Bertalot H. 1997. *Bacillariophyceae*. 2. *Bacillariaceae*, *Epithemiaceae*, *Surirellaceae*. [W]: Ettl, H., Gerloff J., Heyning H., Mollenhauer D. (red.), *Süßwasserflora von Mitteleuropa* 2/2.
- Kuczyńska P., Jemiola-Rzeminska M., Strzalka K. 2015. Photosynthetic pigments in diatoms. *Marine Drugs*, 13: 5847-5881. doi:10.3390/md13095847.
- Kusznerczuk M. 2008. O czwartorzędowej morfogenezie doliny Bugu pod Janowem Podlaskim. *Annales Universitatis Mariae Curie-Skłodowska, Sectio B*, 63(5): 105-112.

- Lai G.G., Padedda B.M., Wetzel C.E., Lugliè A., Sechi N., Ector L. 2016. Epilithic diatom assemblages and environmental quality of the Su Gologone karst spring (Central Eastern Sardinia, Italy). *Acta Botanica Croatica*, 75(1): 129-143. doi:10.1515/botcro-2016-0008.
- Lange-Bertalot H. 1993. New taxa and much more than 100 taxonomic clarifications supplementary to Süßwasserflora von Mitteleuropa Vol. 2/1-4. *Bibliotheca Diatomologica*, 27.
- Lange-Bertalot H. 2001. *Navicula sensu stricte*, 10 Genera Separated from *Navicula sensu lato*, *Frustulia*. In: Lange-Bertalot H. (red.) *Diatoms of Europe*. A.R.G. Gantner Verlag K. G.
- Lange-Bertalot H., Genkal S.I. 1999. *Diatoms from Siberia I. Islands in the Arctic Ocean (Yugorsky-Shar Strait)*. *Iconographia Diatomologica* 6.
- Lange-Bertalot H., Genkal S.I. 1999. *Diatoms from Siberia I. Islands in the Arctic Ocean (Yugorsky-Shar Strait)*. *Iconographia Diatomologica* 6.
- Lange-Bertalot H., Hofmann G., Werum M., Cantonati M. 2017. *Freshwater Benthic Diatoms of Central Europe: Over 800 Common Species Used in Ecological Assessment*. Cantonati M., Kelly M.G., Lange-Bertalot H. (red.) 942. Koeltz Botanical Books.
- Lange-Bertalot H., Metzeltin D. 1996. *Indicators of oligotrophy, 800 Taxa representative of three ecologically distinct lake types*. Koeltz Scientific Books, Königstein, Germany.
- Lange-Bertalot H., Metzeltin D., Witkowski A. 1996. *Hippodonta gen. nov. Umschreibung und Begründung einer neuen Gattung der Naviculaceae*. *Iconographia Diatomologica* 4.
- Lange-Bertalot H., Moser G. 1994. *Brachysira*, Monographie der Gattung und *Naviculadicta nov. gen.* *Bibliotheca Diatomologica*, J. Cramer, Berlin-Stuttgart 29: 1-212.
- Levkov Z., Krstic S., Metzeltin D., Nakov T. 2007. *Diatoms of Lakes Prespa and Ohrid*. In: Lange-Bertalot H. (red.), *Iconographia Diatomologica*, A.R.G. Gantner Verlag K.G. 16:
- Levkov Z. 2009. *Amphora sensu lato*. In: H. Lange-Bertalot (red.), *Diatoms of Europe. Diatoms of European inland waters and comparable habitats*, A.R.G. Gantner Verlag K.G. 5
- Lobo E.A., Heinrich C.G., Schuch M., Wetzel C.E., Ector L. 2016. *Diatoms as Bioindicators in Rivers*. [W]: Necchi J.R., O. (red.) *River Algae*. Springer, Cham. doi:10.1007/978-3-319-31984-1_11.
- Macklin M.G., Lewin J. 2019. River stresses in anthropogenic times: Large-scale global patterns and extended environmental timelines. *Progress in Physical Geography*, 43(1): 3-23. doi:10.1177/0309133318803013/.
- Majewska R., Zgrundo A., Lemke P., De Stefano M. 2012. *Benthic diatoms of the Vistula River estuary (Northern Poland): Seasonality, substrata preferences, and the influence of water chemistry*. *Phycological Research*, 60:1-19. doi:10.1111/j.1440-1835.2011.00637.x.
- Marcinkowski P., Kiczko A., Okruszko T. 2019. Model-based evaluation of restoration measures efficiency in the anastomosing section of the River Narew. *Ecological Engineering*, 130: 213-227. doi:10.1016/j.ecoleng.2019.02.022.
- Metzeltin D., Witkowski A. 1996. *Diatomeen der Bären-Insel*. [W]: Lange-Bertalot H. (red.), *Iconographia Diatomologica* 4. Koeltz Scientific Books, Königstein, Germany.
- Michalczyk Z., Sobolewski W. 2002. *Hydrological characteristics of the river Bug basin*. [W]: *Annales Universitatis Mariae Curie-Skłodowska, Sectio B, Geographia, Geologia, Mineralogia et Petrographia* 57: 111-126.
- Mikulski Z. 1963, *Zarys hydrografii Polski*, PWN, Warszawa.

- Mioduszeński W., Querner E.P., Bielecka J. 2011. Modelling of Groundwater Fluctuations in the Area Between the Narew and Supraśl Rivers. *Geoplanet: Earth and Planetary Sciences*: 79-87. doi:10.1007/978-3-642-19059-9_5.
- Molino P.J., Chiovitti A., Higgins M.J., Dugdale T.M., Wetherbee R. 2016. Diatom adhesives: molecular and mechanical properties. [W]: Smith, A. (red) *Biological Adhesives*. Springer, Cham. doi:10.1007/978-3-319-46082-6_3.
- Moravcová A., Rauch O., Lukavský J., Nedbalová L. 2013. The response of epilithic diatom assemblages to sewage pollution in mountain streams of the Czech Republic. *Plant Ecology and Evolution*, 146(2): 153-166. doi:10.5091/plecevo.2013.814.
- Moser G., Lange-Bertalot H., Metzeltin D. 1998. Insel der Endemiten, Geobotanisches Phänomen Neukaledonien. *Bibliotheca Diatomologica*, 38. Cramer J., Berlin-Stuttgart.
- Nicolosi Gelis M.M., Mujica M.A., Pecile A., Donadelli J., Simonetti M., Gómez N., Cochero J. 2020. Diatom motility and nuclear alterations are affected by sediment elutriates of agricultural streams. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 205. doi:10.1016/j.ecoenv.2020.111322.
- Noga T., Stanek-Tarkowska J., Kochman N., Peszek Ł., Pajęczek A., Woźniak K. 2013. Application of diatoms to assess the quality of the waters of the Baryczka stream, left-side tributary of the river San. *Journal of Ecological Engineering*, 14(3): 8-23. doi: 10.5604/2081139X.1055818.
- Noga T., Stanek-Tarkowska J., Pajęczek A., Peszek Ł., Kochman-Kędziora N., Irlík E. 2015. Wykorzystanie okrzemek (Bacillariophyta) do oceny jakości wód rzeki Białej Tarnowskiej. *Inżynieria Ekologiczna*, 42: 17-27. doi:10.12912/23920629/1973.
- Noga T., Stanek-Tarkowska J., Kloc U., Kochman-Kędziora N., Rybak M., Peszek Ł., Pajęczek A. 2016. Diatom diversity and water quality of a suburbanstream: a case study of the Rzeszów city in SE Poland. *Biodiversity Research and Conservation*, 41: 19-34. doi: 10.1515/biorc-2016-0004.
- Noga T., Stanek-Tarkowska J., Peszek Ł., Kochman-Kędziora N., Ligęzka R. 2016. The use of diatoms to assess the water quality in the Wisłoka River in the town of Dębica and the surrounding area. *Oceanological and Hydrobiological Studies*, 45(2): 191-201. doi: 10.1515/ohs-2016-0018.
- Novais M.H., Morales E.A., Penha A.M., Potes M., Bouchez A., Barthès A., Costa M.J., Salgado R., Santos J., Morais M. 2020. Benthic diatom community dynamics in Mediterranean intermittent streams: Effects of water availability and their potential as indicators of dry-phase ecological status. *Science of the Total Environment*, 719. doi:10.1016/j.scitotenv.2020.137462.
- Olszyński R.M., Szczepocka M., Żelazna-Wieczorek J. 2019. Critical multi-stranded approach for determining the ecological values of diatoms doi: 10.7717/peerj.8117 in unique aquatic ecosystems of anthropogenic origin. *PeerJ* 7(1). doi: 10.7717/peerj.8117.
- Pandey L.K., Bergey E.A., Lyu J., Park J., Choi S., Lee H., Depuydt S., Oh Y.T., Lee S.M., Han T. 2017. The use of diatoms in ecotoxicology and bioassessment: insights, advances and challenges. *Water Research*, 118:39-58. doi:10.1016/j.watres.2017.01.062.
- Pandey L.K., Lavoie I., Morin S., Park J., Lyu J., Choi S., Lee H., Han T. 2018. River water quality assessment based on a multi-descriptor approach including chemistry, diatom

- assemblage structure, and non-taxonomical diatom metrics. *Ecological Indicators*, 84:140-151. doi:10.1016/j.ecolind.2017.07.043.
- Passy S.I. 2007. Diatom ecological guilds display distinct and predictable behavior along nutrient and disturbance gradients in running waters. *Aquatic Botany*, 86:171-178. doi:10.1016/j.aquabot.2006.09.018.
- Piniewski M., Laizé C.L., Acreman M.C., Okruszko T., Schneider C. 2014. Effect of climate change on environmental flow indicators in the Narew Basin, Poland. *Journal of Environmental Quality*, 43(1): 155-67. doi: 10.2134/jeq2011.0386.
- Pliński M., Witkowski A. 2009. Okrzemki-Bacillariophyta (Diatoms). *Flora Zatoki Gdańskiej i wód przyległych (Bałtyk Południowy)*, Uniwersytet Gdański.
- Poikane S., Kelly M., Cantonati M. 2016. Benthic algal assessment of ecological status in European lakes and rivers: challenges and opportunities. *Science of the Total Environment* 568: 603-613. doi:10.1016/j.scitotenv.2016.02.027.
- Potapova M., Charles D.F. 2007. Diatom metrics for monitoring eutrophication in rivers of the United States. *Ecological Indicators* 7(1): 48-70. doi: 10.1016/j.ecolind.2005.10.001.
- Prygiel J., Coste M. 2000. Guide Méthodologique pour la mise en oeuvre de l'Indice Biologique Diatomées. NF T 90-354. Etude Agences de l'Eau-Cemagref Bordeaux, Agences de l'Eau.
- Pysznik A, Gibbs S.P. 1992. Immunocytochemical localization of photosystem I and the fucoxanthin–chlorophyll a/c light-harvesting complex in the diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Protoplasma* 166: 208-217. doi: 10.1007/BF01322783.
- Quevedo-Ortiz G., Fernández-Calero J.M., Cañedo-Argüelles M., et al. 2024. An experimental study to assess resistance and resilience strategies of freshwater diatoms to cope with drying in Mediterranean temporary rivers. *Hydrobiologia*, 851, 4293–4306 doi:10.1007/s10750-024-05585-4
- Rakowska B. 2001. Studium różnorodności okrzemek ekosystemów wodnych Polski niżowej. Wydawnictwo Uniwersytetu Łódzkiego, Łódź.
- Rakowska B. 2003. Okrzemki – organizmy, które odniosły sukces. *Kosmos*, 2(52): 307- 314.
- Rakowska B., Szczepocka E. 2011. Demonstration of the Bzura River restoration using diatom indices. *Biologia* 66, 411-417. doi:10.2478/s11756-011-0032-3.
- Rakowska B. 2001. Indicatory values in ecological description of diatoms from Polish lowlands. *International Journal of Ecohydrology and Hydrobiology* 1(4): 481-502.
- Richards J., Tibby J., Barr C., Goonan P. 2020. Effect of substrate type on diatom-based water quality assessments in the Mount Lofty Ranges, South Australia. *Hydrobiologia*, 847: 3077-3090. doi: 10.1007/s10750-020-04316-9
- Robson B.J., Matthews T.G., Lind P.R., Thomas N.A. 2008. Pathways for algal recolonization in seasonally-flowing streams. *Freshwater Biology*, 53: 2385-2401. doi:10.1111/j.1365-2427.2008.02061.x
- Robinson C.L., Porter T.M., Maitland V.C., Wright M.T.G., Hajibabaei M. 2022. Multi-marker metabarcoding resolves subtle variations in freshwater condition: Bioindicators, ecological traits, and trophic interactions. *Ecological Indicators*, 145. doi:10.1016/j.ecolind. 2022.109603.
- Round F.E., Crawford R.M., Mann D.G. 1990. *The Diatoms: Biology and Morphology of the Genera*. Cambridge: Cambridge University Press.

- Sabater S., Timoner X., Bornette G., De Wilde M., Stromberg J.C., Stella J.C. 2017. The Biota of Intermittent Rivers and Ephemeral Streams: Algae and Vascular Plants. *Intermittent Rivers and Ephemeral Streams*. doi:10.1016/b978-0-12-803835-2.00016-4.
- Schmid A.M.M. 1988. The special Golgi-ER-mitochondrion unit in the diatom genus *Coscinodiscus*. *Plant Systematics and Evolution*, 158(2/4): 211-223. <http://www.jstor.org/stable/23674094>.
- Schmid A.M.M. 1994. Aspects of morphogenesis and function of diatom cell walls with implications for taxonomy. *Protoplasma*, 181, 43–60. doi:10.1007/BF01666388.
- Silva T.T., Medeiros G., Amaral M.W., Pilatti M.C., Bortolini J.C., Bueno N.C. 2022. Taxonomic and morphofunctional phytopotamoplankton response to environmental variability in rivers from different hydrographic basins in Southern Brazil. *Acta Limnologica Brasiliensia*, 34. doi:10.1590/S2179-975X1222.
- Skorbiłowicz M., Skorbiłowicz E. 2008. The distribution of lead, zinc, and chromium in fractions of bottom sediments in the Narew River and its tributaries. *Oceanological and Hydrobiological Studies*, 37(4): 85-91. doi:10.2478/v10009-008-0019-8.
- Soczyńska U. 1997. *Hydrologia dynamiczna*. Wydawnictwo PWN Warszawa.
- Souffreau C., Vanormelingen P., Sabbe K., Vyverman W. 2013. Tolerance of resting cells of freshwater and terrestrial benthic diatoms to experimental desiccation and freezing is habitat-dependent. *Phycologia*, 52(3):246-255. doi:10.2216/12-087.1.
- Stanisławczyk B. 2020. Sezonowość przepływu i sezony hydrologiczne wybranych rzek Polski. Manuskrypt - Rozprawa doktorska UŁ.
- Stanley M.S., Callow J.A. 2007. Whole cell adhesion strength of morphotypes and isolates of *Phaeodactylum tricornutum* (Bacillariophyceae), *European Journal of Phycology*, 42:2, 191-197; doi: 10.1080/09670260701240863.
- Stoermer E.F., Smol J.P. (red.) 2001. *The diatoms: applications for the environmental and earth sciences*. Cambridge, UK: Cambridge University Press; 315–332.
- Stryjecki R. 2009. Water mites (acari, hydrachnidia) of the Bug River valley between Włodawa and Kodeń. *Teka Komisji Ochrony i Kształtowania Środowiska Przyrodniczego Oddziału Lubelskiego PAN*, 6: 335–344.
- Sumorok B., Żelazna-Wieczorek J., Kostrzewa K. 2009. Qualitative and quantitative phytoseston changes in two different stream-order river segments over a period of twelve years (Grabia and Brodnia, central Poland). *Oceanological and Hydrobiological Studies, Sciendo*, 38(1):55-63. doi:10.2478/v10009-009-0003-y.
- Szczepocka E., Nowicka-Krawczyk P., Knysak P., Żelazna-Wieczorek J. 2016. Long term urban impacts on the ecological status of a lowland river as determined by diatom indices. *Aquatic Ecosystem Health & Management*, 19(1): 19-28. doi:10.1080/14634988.2016.1145029.
- Szczepocka E., Nowicka-Krawczyk P., Kruk A. 2018. Deceptive ecological status of urban streams and rivers – evidence from diatom indices. *Ecosphere*, 9(7): e02310. doi:10.1002/ecs2.2310.
- Szczepocka E., Szulc B. 2009. The use of benthic diatoms in estimating water quality of variously polluted rivers. *Oceanological and Hydrobiological Studies*, 38(1):17-26. doi:10.2478/v10009-009-0012-x.

- Szczepocka E., Szulc B., Szulc K., Rakowska B., Żelazna-Wieczorek J. 2014. Diatom indices in the biological assessment of the water quality based on the example of a small lowland river. *Oceanological and Hydrobiological Studies*, 43(3): 265-273. doi:10.2478/s13545-014-0141-z.
- Szczepocka E., Żelazna-Wieczorek J. 2018. Diatom biomonitoring-scientific foundations, commonly discussed issues and frequently made errors. *Oceanological and Hydrobiological Studies*, 47(3): 313-325. doi:10.1515/ohs-2018-0030.
- Szczepocka E., Żelazna-Wieczorek J., Zakrzewski P.K. 2024. Impact of urbanization-driven changes of the riverbeds on its ecological status evidenced by diatom communities – The negative side of the Anthropocene. *Ecological Indicators*, 159. doi:10.1016/j.ecolind.2024.111706.
- Szewczyk M., Oświecimska-Piasko Z., Dembek W., Siedlecki T. 2003. Gatunki, zbiorowiska roślinne i siedliska decydujące o różnorodności biologicznej doliny górnej Narwi. *Woda - Środowisko - Obszary Wiejskie*, 3(7): 89-106.
- Szporak-Wasilewska S., Piniewski M., Kubrak J., Okruszko T. 2015. What we can learn from a wetland water balance? Narew National Park case study. *Ecohydrology & Hydrobiology*, 15: 136-149. doi: 10.1016/j.ecohyd.2015.02.003.
- Szulc B., Szulc K. 2013. The use of the Biological Diatom Index (BDI) for the assessment of water quality in the Pilica River, Poland. *Oceanological and Hydrobiological Studies*, 42:188-194. doi:10.2478/s13545-013-0073-z.
- Taylor J.C., Harding W.R., Archibald C.G.M. 2007. A methods manual for the collection, preparation and analysis of diatom samples, 1.0. Water Research Commission, Pretoria.
- Tornés E., Mor J. R., Mandaric L., Sabater S. 2018. Diatom responses to sewage inputs and hydrological alteration in Mediterranean streams. *Environmental Pollution*, 238:369-378. doi:10.1016/j.envpol.2018.03.037.
- Tornés E., Alánde-Rodríguez J., Corrochano A., Nolla-Querol P., Maria Carmen Trapote M.C., Sabater S. 2022. Impacts of climate change on stream benthic diatoms – a nation-wide perspective of reference conditions. *Hydrobiologia*, 849:1821-1837. doi:10.1007/s10750-022-04829-5.
- Tümping, W. Friedrich, G. (ed.) 1999. *Methoden der biologischen Wasseruntersuchung*. Jena. Stuttgart. Lübeck. Ulm. G. Fischer Verlag.
- Van Dam H., Mertens A., Sinkeldam J. 1994. A coded checklist and ecological indicator values of freshwater diatoms from The Netherlands. *Netherlands Journal of Aquatic Ecology*, 28, 117–133. doi:10.1007/BF02334251
- Vanormelingen P., Verleyen E., Vyverman W. 2008. The diversity and distribution of diatoms: from cosmopolitanism to narrow endemism. *Biodiversity and Conservation*, 17(2): 393-405. doi:10.1007/s10531-007-9257-4
- Veraarti A.J., Romaní A.M., Tornés E., Sabater S. 2008. Algal response to nutrient enrichment in forested oligotrophic stream. *Journal of Phycology*, 44(3): 564-572. doi:10.1111/j.1529-8817.2008.00503.x.
- Walsh G., Wepener V. 2009. The influence of land use on water quality and diatom community structures in urban and agriculturally stressed rivers. *Water SA*, 35:579-594. doi:10.4314/wsa.v35i5.49184

- Werner D. 1977. The ultrastructure of the diatom cell. [W:] Burnett J., Baker H., Beevers H., Whatley F. (red.) *The Biology of diatoms*. University of California Press, Los Angeles 65-109.
- Wetherbee R., Lind J., Burke J., Quatrano R. 1998. The first kiss: establishment and control of initial adhesion by raphid diatoms. *Journal of Phycology*, 34(1): 9-15.
- Wojtal A. 2009. The diatoms of Kobylanka Stream near Kraków (Wyżyna Krakowsko-Częstochowska Upland, S Poland). *Polish Botanical Journal*, 54(2), 129-330.
- Wojtal A.Z., Kwadrans J. 2006. Diatoms of the Wyżyna Krakowsko-Częstochowska Upland (S Poland) – Coscinodiscophyceae (Thalassiosirophyceae). *Polish Botanical Journal* 51(2):177-207.
- Wrześniński D. 2013: *Entropia odpływu rzek w Polsce*, Bogucki Wydawnictwo Naukowe. Poznań.
- Wrześniński D. 2017a. Typologia reżimu odpływu rzek w Polsce w podejściu nadzorowanym i nienadzorowanym.. *Badania Fizjograficzne Seria A – Geografia Fizyczna* A68: 253-264. doi:10.14746/bfg.2017.8.19.
- Wrześniński D. 2017b. Reżimy rzeczne, [W:] Jokieli P., Marszelewski W., Pociask-Karteczka J. (red.), *Hydrologia Polski*, Polskie Wydawnictwo Naukowe. Warszawa.
- Wrześniński D. 2018. Typologia reżimu odpływu rzek w Polsce w różnych fazach Oscylacji Północnoatlantyckiej. *Badania Fizjograficzne Seria A – Geografia Fizyczna*. A69: 249-261. doi:10.14746/bfg.2018.9.19
- Zalat A. A., Nitychoruk J., Chodyka M., Pidek I. A., Welc F. 2022. Recent and fossil freshwater diatoms of Poland: taxonomy, distribution and their significance in the environmental reconstruction. 1. Coscinodiscophyceae, Mediophyceae and Fragilariophycidae. John Paul II University of Applied Sciences, Biała Podlaska.
- Zgrundo A., Peszek Ł., Poradowska A. 2018. Podręcznik do monitoringu i oceny rzecznych jednolitych części wód powierzchniowych na podstawie fitobentosu. Ostateczna wersja zaktualizowanych metodyk na potrzeby oceny stanu ekologicznego wód powierzchniowych w Polsce na podstawie fitobentosu. Ocean Sense, Gdańsk.
- Zhang L., Nie Q., Dai Y., Zhu S., Wang J., Wang W., Tan X., Zhang P., Li J. 2020. Diatomological mapping of water bodies in Chongqing section of the Yangtze River and Jialing River. *International Journal of Legal Medicine*, 134: 1375-1385. doi:10.1007/s00414-020-02297-x.
- Zhang J., Zhou Y., Vieira D.N., Cao Y., Deng K., Cheng Q., Zhu Y., Zhang J., Qin Z., Ma K., Chen Y., Huang P. 2021. An efficient method for building a database of diatom populations for drowning site inference using a deep learning algorithm. *International Journal of Legal Medicine*, 135:817-827. doi:10.1007/s00414-020-02497-5.
- Zhou Y., Cao Y., Huang J., Deng K., Ma K., Zhang T., Chen L., Zhang J. Huang P. 2020. Research advances in forensic diatom testing, *Forensic Sciences Research*, 5(2): 98-105, doi:10.1080/20961790.2020.1718901.
- Zhuo L., Lin S., Song P. 2016. A future perspective in forensic medicine in China: diatomological mapping of water bodies. *Journal of Forensic Science and Medicine*, 2(2): 107-110. doi:10.4103/2349-5014.177407.
- Zieliński P., Suchowolec T. 2013. Hydromorphological assessment of the anastomosing section of the Narew River after restoration. *Limnological Review*, 13(1): 51-59 doi:10.2478/limre-2013-0006.

- Żelazna-Wieczorek J. 2011. Diatom Flora in Springs of Łódź Hills (Central Poland): Biodiversity, Taxonomy, and Temporal Changes of Epipsammic Diatom Assemblages in Springs Affected by Human Impact. A. R. G., Gantner.
- Żelazna-Wieczorek J., Nowicka-Krawczyk P. 2015. The cascade construction of artificial ponds as a tool for urban stream restoration – the use of benthic diatoms to assess the effects of restoration practices. *Science of the Total Environment*, 538: 591-599. doi:10.1016/j.scitotenv.2015.08.110
- Żelazna-Wieczorek J., Olszyński R.M., Nowicka-Krawczyk P. 2015. Half a century of research on diatoms in athalassic habitats in central Poland. *Oceanological and Hydrobiological Studies*, 44(1): 51-67. doi:10.1515/ohs-2015-0006.

Załącznik 5

Methodology for securing environmental traces in the form of diatomaceous material

Bogusz Iwona, Żelazna-Wieczorek Joanna., Jesionowska Izabela

Bogusz I., Żelazna-Wieczorek J., Jesionowska I. 2023. Methodology for securing environmental traces in the form of diatomaceous material. *Issues of Forensic Science* 319 (1): 39-52.
<https://doi.org/10.34836/pk.2023.319.1>.

Łódź, 15.01... 2025 r.

Oświadczenie o współautorstwie

Oświadczam, że mój wkład w przygotowanie pracy metodycznej był **wiodący** i polegał na: opracowaniu metod zabezpieczania materiału na podstawie doświadczeń zebranych podczas warsztatów i seminariów dla funkcjonariuszy policji. Pracowałam również nad ostateczną wersją manuskryptu.

Iwona Bogusz

Iwona Bogusz

Łódź, 18.01... 2025 r.

Oświadczenie o współautorstwie

Oświadczam, że mój wkład w przygotowanie pracy metodycznej polegał na: opracowaniu koncepcji oraz w przygotowaniu ostatecznej wersji manuskryptu.

dr hab. Joanna Żelazna-Wieczorek prof. UŁ

Joanna Żelazna-Wieczorek

Łódź, 28.01... 2025 r.

Oświadczenie o współautorstwie

Oświadczam, że mój wkład w przygotowanie pracy metodycznej polegał na: opracowaniu koncepcji oraz w przygotowaniu ostatecznej wersji manuskryptu.

Izabela Jesionowska
Izabela Jesionowska

Metodyka zabezpieczania środowiskowych śladów w postaci materiału okrzemkowego

podinsp. Iwona Bogusz¹

ORCID 0000-0002-4256-7350

dr hab. prof. UŁ Joanna Żelazna-Wieczorek²

ORCID 0000-0003-1044-8151

Izabela Jesionowska³

ORCID 0009-0007-5092-4200

- 1 Centrum Szkolenia Policji w Legionowie, iwona.bogusz@biol.uni.lodz.pl
- 2 Uniwersytet Łódzki, Katedra Algologii i Mykologii, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, joanna.zelazna@biol.uni.lodz.pl
- 3 Uniwersytet Łódzki, Katedra Algologii i Mykologii, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, izabela.jesionowska@edu.uni.lodz.pl

Streszczenie

Wykorzystanie okrzemek jako środowiskowych śladów kryminalistycznych stanowi idealne narzędzie do powiązania osoby z konkretnym miejscem – środowiskiem, a także może być pomocne przy diagnozowaniu utonięć lub przy typowaniu miejsca utonięcia. Narzędzie to jest standardowo stosowane przez organy ścigania w wielu krajach Europy, a także w Australii, Chinach, Indiach oraz Stanach Zjednoczonych Ameryki. Celem niniejszej pracy jest wskazanie możliwych metod i zasad, które powinny być stosowane przy zabezpieczaniu okrzemek na miejscu zdarzenia podczas takich czynności procesowych jak: oględziny i przeszukanie, a także propagowanie wiedzy z zakresu diatomologii kryminalistycznej w Polsce. Niniejsza metodyka została opracowana w oparciu o uznane i powszechnie stosowane doświadczenia w pozyskiwaniu i zabezpieczaniu okrzemek do celów badań z zakresu ich taksonomii i ekologii na podstawie piśmiennictwa. Rekomendujemy procedurę postępowania przy zabezpieczaniu materiału okrzemkowego opartą na metodach stosowanych i wypracowanych przez naukowców oraz dostosowaną do warunków i technicznych możliwości, którymi dysponuje polski policjant – technik kryminalistyki.

Słowa kluczowe: diatomologia kryminalistyczna, okrzemki, procedura zabezpieczania prób środowiskowych

Okrzemki jako glony jednokomórkowe powszechnie występują w środowisku wodnym bądź wilgotnym. Prócz wody potrzebują do życia jedynie światła. Poza powszechnością występowania okrzemek na uwagę zasługuje też ich różnorodność gatunkowa, która zarówno w kontekście jakościowym, jak i ilościowym definiuje konkretne środowisko i pozwala na odróżnienie go od innego środowiska wodnego. Powszechność występowania i różnorodność gatunkowa okrzemek czyni je doskonałym narzędziem, które można wykorzystać w postępowaniu przygotowawczym jako ślady środowiskowe, tzw. *environmental traces* (Levin E.A. i in., 2017; Scott K.R.

i in., 2016; Bogusz I. i in., 2018; Scott K.R. i in., 2021; Scott K.R. i in., 2021; Bogusz I. i in., 2022). Okrzemkowe ślady środowiskowe dają możliwość powiązania osoby z konkretnym środowiskiem, a także mogą być wykorzystane jako pomoc przy diagnozowaniu utonięć (Pollanen M.S., 1998; Peabody A.J., Cameron N.G., 2010; Rana A., Manhas S., 2018; Bogusz M. i in., 2018). Analiza okrzemek pod kątem wykorzystania ich w procesie wykrywczym przez organy ścigania w kierunku pomocy przy diagnozowaniu utonięć jest nieodłącznym elementem postępowania w wielu krajach, w tym: Francji (Delabarde T. i in., 2013), Indiach (Rana A., Manhas S., 2018), Chinach (Zhao J., 2019), Macedonii (Krstic S., 2002) i Szwajcarii (Hürlimann J. i in., 2000). Analiza ta jest także wykorzystywana, choć nie na masową skalę, w Polsce (Bogusz M. i in., 2018). Poza diagnozowaniem utonięć w procesie wykrywczym okrzemki mogą być istotnym dowodem umożliwiającym powiązanie sprawcy z konkretnym miejscem. Wiedza ta jest coraz bardziej popularyzowana na łamach publikacji naukowych jak też sympozjach¹ i konferencjach². Propagowanie wiedzy z zakresu diatomologii kryminalistycznej (Żelazna-Wieczorek J., 2019) odbywa się na wielu płaszczyznach, co powoduje wzrost świadomości wśród techników kryminalistyki na temat zasadności zabezpieczania okrzemek jako kryminalistycznych śladów środowiskowych. O ile wiedza na temat możliwości wykorzystania okrzemek jest skutecznie rozpowszechniana pośród funkcjonariuszy policji, którzy w swoich zadaniach mają między innymi przeprowadzanie oględzin miejsca osób i rzeczy, w ramach których ujawniają i zabezpieczają ślady i dowody przestępstwa, o tyle brak jest prawidłowych wytycznych co do sposobu zabezpieczania prób, które będą stanowiły materiał do analizy okrzemkowej. Poza ogólnikowymi wskazaniami dotyczącymi sposobu zabezpieczania prób z materiałem okrzemkowym (Makowska Ż., Bogusz I., 2020) dotychczas nie pojawiły się publikacje zawierające zasady i wskazówki prawidłowego zabezpieczania materiału okrzemkowego na miejscu zdarzenia. Niniejsza praca ma stanowić wykaz najbardziej skutecznych metod zabezpieczania materiału okrzemkowego, którego można dokonać zarówno podczas oględzin miejsca, jak i podczas przeszukania u osoby podejrzanej, w oparciu o obowiązującą literaturę naukową, ale też z uwzględnieniem możliwości technicznych, którymi dysponuje polska policja.

Mikrosiedliska okrzemek w środowisku wodnym

Rozpoznanie siedlisk występowania okrzemek jest kluczowe, aby dobrać odpowiednią procedurę zabezpieczania śladów środowiskowych pod kątem analizy okrzemkowej. Poza swobodnym unoszeniem się w toni wodnej okrzemek, które stanowią jeden z elementów fitoplanktonu, występują one też na podłożach trwale zanurzonych w wodzie, określanych łącznie pojęciem fitobentosu. Sam fitobentos można podzielić na: epiliton – glony porastające kamienie, epipelon – glony rosnące na miękkich osadach takich jak muł, epifiton – glony porastające roślinność występującą w wodzie, epipsammon – glony porastające piasek oraz epiksylon – glony występujące na martwym drewnie zanurzonym w wodzie (Kawecka i Eloranta, 1994).

Okrzemki w każdym z tych mikrosiedlisk będą gatunkowo zróżnicowane. Stąd też istotne jest zabezpieczanie prób nie tylko samej wody, ponieważ w niej będą tylko okrzemki występujące w toni wodnej. Mogą zostać pominięte te, które przytwierdzą się do podłoża trwale zanurzonych w wodzie. Ponadto należy też pamiętać o okrzemkach występujących w przypowierzchniowej warstwie gleby i stanowiących grupę organizmów określaną mianem edafonu (Antonelli i in., 2017).

Kiedy należy pobierać materiał do analizy okrzemkowej?

Okrzemki mogą być pomocne przy diagnozowaniu utonięć, ale sama ich obecność w narządach wewnętrznych bez porównania ich z próbami środowiskowymi pobranymi z miejsca, w którym ujawniono zwłoki, nie przyniesie nam informacji, czy miejsce to było też miejscem utonięcia. Tylko dokładna analiza taksonomiczna, przeprowadzona przez eksperta diatomologa, okrzemek obecnych w narządach wewnętrznych (płuco, nerka, szpik kostny, treść żołądka) oraz tych, które występują w próbach środowiskowych, pozwoli na potwierdzenie lub wykluczenie, czy miejsce znalezienia zwłok było miejscem utonięcia bądź wrzucenia ciała do wody już po śmierci. Dlatego też istotne jest, aby w każdym przypadku ujawnienia zwłok zarówno w środowisku wodnym, jak też w jego pobliżu, pobierać materiał porównawczy do jakościowej i ilościowej analizy diatomologicznej.

1 Sympozjum w Sułkovicach zorganizowane w czerwcu 2019 roku przez Centrum Szkolenia Policji w Legionowie przy współudziale Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego oraz Zakładu Medycyny Sądowej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

2 Konferencja w Gdyni w 2018 roku „Next generation of forensic biology laboratory” zorganizowana przez Centralne Laboratorium Policji

Pobieranie prób powinno obejmować wszystkie miejsca, które mogą być zasiedlane przez okrzemki, stąd też wyróżniamy następujące miejsca poboru prób (zdj. 1):

1. fitoplankton (z toni wodnej);
2. fitobentos (z dna i podłoża trwale zanurzonych w wodzie):
 - a) epipsammon (z powierzchni piasku),
 - b) epipelon (z miękkich osadów, np. mułu),
 - c) epilition (z kamieni występujących w wodzie),
 - d) epifiton (z roślinności występującej w wodzie):
 - z hydrofitów – roślin zanurzonych w wodzie lub pływających po jej powierzchni,
 - z helofitów – roślin zakorzenionych w wodzie z wynurzonymi łodygami,
 - e) epiksylon (z podłoża drewnianego zanurzonego w wodzie);
3. edafon (z przypowierzchniowej warstwy gleby).



Zdj. 1. Dostępne podłoża z materiałem okrzemkowym: 1 – woda, 2 – muł, 3 – drewno zanurzone w wodzie, 4 – rośliny i mszaki mające kontakt ze środowiskiem wodnym, 5 – gleba (autor zdjęć: asp. Kasper Molski)

Poniżej, na podstawie dostępnej literatury, zestawiono w tabelach 1–6 sposoby zabezpieczania materiału okrzemkowego z różnych typów podłoży. Ponadto umieszczono też komentarz, propozycję dostosowania tych metod dla techników kryminalistyki podczas czynności procesowych, takich jak oględziny lub przeszukanie.

Zabezpieczanie fitoplanktonu

Próba z toni wodnej powinna być z zasady podstawową próbą zabezpieczaną podczas oględzin zwłok ujawnionych w środowisku wodnym. By zapewnić jak najbardziej optymalne uzyskanie informacji na temat składu okrzemkowego w tej próbie, należy stosować ściśle określone zasady.

Tab. 1. Instrukcja pobierania prób środowiskowych z toni wodnej z różnych typów ekosystemów (Kawecka i Eloranta, 1994; Taylor i in., 2007; Żelazna-Wieczorek, 2019; Kolada, 2020)

Lp.	Charakter zbiornika			Komentarz
	Wody stojące, głębokie (> 10 m)	Wody stojące, płytkie (≤ 10 m)	Wody płynące	
	Opis czynności			
1.	Przepłukać siatkę planktonową w zbiorniku / cieku wodnym.			- W przypadku braku siatki planktonowej należy pobrać wodę do wiadra o pojemności 10 l, do którego ręczki przywiązany jest sznur umożliwiający zanurzenie wiadra na większe głębokości. Po pobraniu wody do wiadra należy je odstawić na minimum 1 h (można to zrobić na początku oględzin). Czas odstawienia wody pozwoli obecnym w toni wodnej okrzemkom opaść na dno. Po tym czasie wylać delikatnie, nie mieszając, część wody z górnej warstwy, pozostawiając jedynie około 1 l wody na dnie wiadra. - Wodę z dna wiadra zabezpieczyć do słoja (może to być słoik, który wykorzystywany jest do zabezpieczenia śladów osmologicznych). - Należy pamiętać, że zarówno słoje, jak i wiadro muszą być uprzednio przepłukane w tym samym cieku wodnym, z którego pobierana będzie próba
2.	Zanurzyć siatkę na głębokość co najmniej 5 m; wyciągnąć pionowym ruchem.	Zanurzyć siatkę; przeciągać kilka razy pod powierzchnią wody ruchem poziomym.	Zanurzyć siatkę; trzymać nieruchomo pod powierzchnią wody przez kilka minut.	- W przypadku głębokich wód stojących należy uwzględnić występowanie stratyfikacji termalnej – zanurzenie siatki lub wiadra na głębokość minimum 5 m pozwoli na zebranie okrzemek z różnych warstw wody. - W przypadku płytkich wód stojących, gdzie stratyfikacja termalna nie wpływa znacząco na skład zespołu okrzemkowego w kolumnie wody, nie ma potrzeby zanurzania siatki na znaczne głębokości. - Próby z rzek należy w miarę możliwości pobrać ze środka nurtu. - Próby z jezior i stawów należy w miarę możliwości pobrać z ich najgłębszego miejsca. - Jeżeli próby pobierane są w okolicy mostu, należy pobrać je od strony przeciwnej do nurtu wody, tj. „twarzą do prądu”. - Jeżeli próby pobierane są w zbiorniku zaporowym, należy pobrać je minimum kilkadziesiąt metrów od brzegu.
3.	Zagęszczoną próbę o objętości do 100 ml przelać do jałowego pojemnika na próbę.			Na początku sezonu wegetacyjnego (marzec – kwiecień) oraz przy końcu (październik – listopad), w zależności od rzeki, aby zebrać próbę o objętości bliskiej 100 ml konieczne może być kilkukrotne zanurzenie siatki planktonowej w toni wodnej ze względu na niewielką liczebność okrzemek. W przypadku braku siatki planktonowej w powyższych okresach, próbę do wiadra należy pobrać minimum 2 razy.

Zabezpieczanie fitobentosu

Próby z dna i podłoża trwale z nim związanych ze względu na zróżnicowany skład gatunkowy okrzemek w stosunku do tych występujących w toni wodnej (fitoplanktonie) powinny być zabezpieczane równocześnie z próbami fitoplanktonowymi.

Zabezpieczanie epipsammonu

Tab. 2. Instrukcja pobierania prób środowiskowych z podłoża piaszczystego (Kawecka i Eloranta, 1994; Taylor i in., 2007)

Lp.	Opis czynności	Komentarz
1.	Przepłukać czerpacz osadu w zbiorniku / cieku wodnym.	Zamiast czerpacza osadów można użyć pojemnika na mocz o pojemności 100 ml i zebrać nim powierzchniową warstwę piasku do głębokości 1 cm, ewentualnie użyć słoja stosowanego do zabezpieczenia śladów osmologicznych.
2.	Wbić czerpacz ściętą stroną w piasek i zebrać warstwę osadu o miąższości kilku centymetrów.	
3.	Zebraną próbę przenieść do jałowego pojemnika na próbę.	

Zabezpieczanie epipelonu

Tab. 3. Instrukcja pobierania prób środowiskowych z podłoża mulistego (Kawecka i Eloranta, 1994; Taylor i in., 2007)

Lp.	Opis czynności	Komentarz
1.	Pobrać wodę do pipety w celu jej przepłukania.	Plastikową lub szklaną pipetę zakończoną gruszką należy każdorazowo oczyścić pomiędzy próbami; dodatkowe przepłukanie w wodzie, z miejsca poboru kolejnej próby, redukuje ryzyko kontaminacji.
2.	Zebrać powierzchniową warstwę mułu pipetą.	Należy uważać, aby nie wbić pipety w dno. Spowodowałoby to jej zapchanie przez zassanie mułu.
3.	Zebraną próbę przenieść do jałowego pojemnika na próbę.	Przelać zawartość pipety (powierzchniową warstwę mułu) do plastikowego pojemnika o objętości 100 ml („moczówka”).

Zabezpieczanie epilitoru

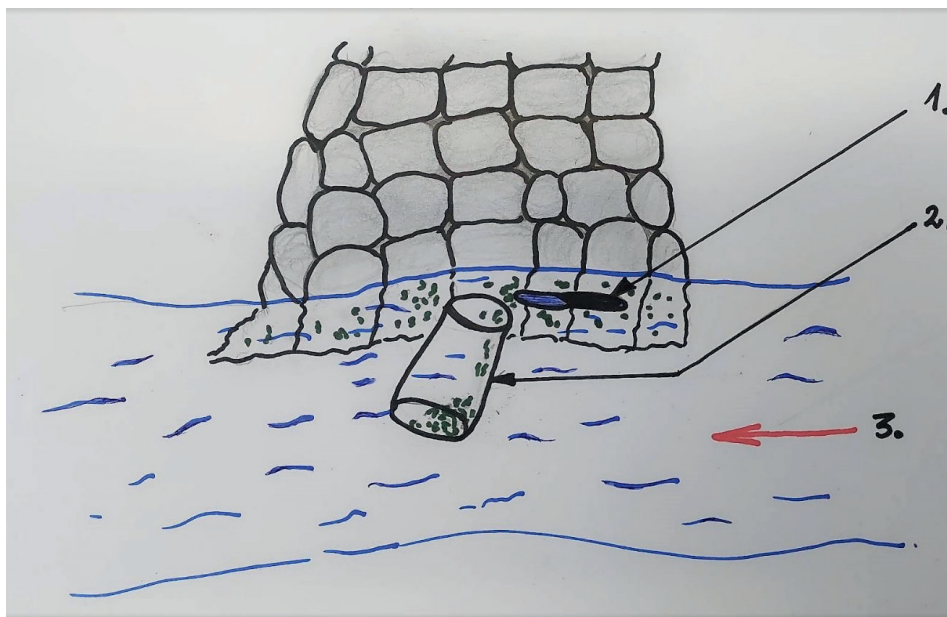
Tab. 4. Instrukcja pobierania prób środowiskowych z naturalnych podłoży kamienistych (Kawecka i Eloranta, 1994; EN 13946: 2003; Townsend i Gell, 2005; Taylor i in., 2007; Karthick i in., 2010; Zgrundo i in., 2018; Żelazna-Wieczorek, 2019; Kolada, 2020; Richards i in., 2020)

Lp.	Opis czynności	Komentarz
1.	Do pobrania epilitoru (okrzemek z kamieni) użyć kувety plastikowej oraz szczoteczki do zębów z twardym włosiem, które należy uprzednio opłukać w cieku wodnym.	- Zamiast kувety można użyć plastikowej miski lub innego plastikowego pojemnika. - Narzędzia należy każdorazowo oczyścić pomiędzy próbami; dodatkowe przepłukanie w wodzie, z miejsca poboru kolejnej próby, redukuje ryzyko kontaminacji. - Do zebrania warstwy okrzemkowej z kamieni można zamiennie użyć drewnianej szpatułki, łyżki, noża lub innego ostrego przedmiotu.

Lp.	Opis czynności	Komentarz
2.	Wlać do 100 ml wody destylowanej do kuwety.	Objętość wody destylowanej należy dostosować do używanej kuwety lub innego pojemnika.
3.	Wybrać co najmniej 5 małych lub średnich kamieni trwale zanurzonych w wodzie.	- Preferowane są kamienie o wielkości od 64 do 265 mm. - Należy wybrać tyle kamieni, jednak nie więcej niż 10 sztuk, aby łączna powierzchnia, z której zostanie pobrany biofilm okrzemkowy, wynosiła około 10 cm². - Należy unikać kamieni pokrytych nitkowatymi glonami oraz z widoczną warstwą osadu dennego. - Jeżeli ponad 75% substratu w danym miejscu porośnięte jest nitkowatymi glonami, należy je zerwać z powierzchni kamieni i kontynuować jak dalej.
4.	Delikatnie opłukać każdy kamień pod powierzchnią wody zbiornika/cieku.	Pozwala to na usunięcie zanieczyszczeń luźno związanych z substratem.
5.	Kamienie ułożyć w kuwecie orientując je do pozycji zastanej.	Pozwala to na zachowanie oryginalnej pozycji substratu i zebranie biofilmu z jego górnej powierzchni.
6.	Energicznie szczotkować górną powierzchnię kamieni w kuwecie, przepłukując co jakiś czas szczoteczkę w wodzie.	- Przepłukiwanie włosia szczoteczki ma na celu uwolnienie spomiędzy niego skorupki okrzemki. - Woda powinna stać się mętna i przybrać brązowy kolor. - Należy usunąć resztki roślinności lub fragmenty kamieni z wody. - W przypadku, gdy ilość zebranego materiału jest niezadowalająca, należy zwiększyć powierzchnię poboru próby.
7.	Zebraną próbę przenieść do jałowego pojemnika na próbę.	Ze względu na małą objętość próby, optymalny będzie plastikowy pojemnik, „moczówka”, o objętości 100 ml.

Tab. 5. Instrukcja pobierania prób środowiskowych z podłoża kamienistych wytworzonych przez człowieka, takich jak: betonowe filary mostu i betonowe umocnienia brzegów (EN 13946: 2003; Zgrundo i in., 2018; Kolada, 2020). Czynność polega na zdrapywaniu biofilmu z podłoża znajdującego się poniżej lustra wody (ryc. 1). W wodach płynących, aby uniknąć utraty zdrapywanego materiału wraz z nurtem należy zdrapywać biofilm bezpośrednio do słoja 0,9 l i odstawić na min. 0,5 h

Lp.	Opis czynności	Komentarz
1.	Skrobak opłukać w zbiorniku / cieku wodnym, jednocześnie wzburzając wodę naprzeciw powierzchni substratu, z której będzie pobierana próba.	- Do zebrania warstwy okrzemkowej można zamiennie użyć drewnianej szpatułki, łyżki, noża lub innego ostrego przedmiotu. - Wzburzenie wody powoduje usunięcie zanieczyszczeń luźno związanych z substratem.
2.	Zeskrobać biofilm z łącznej powierzchni ok. 10 cm ² . Powtórzyć 2 razy.	Zazwyczaj otrzymana próba jest bardzo gęsta, jednak w przypadku, gdy ilość zebranego materiału jest niezadowalająca, należy zwiększyć powierzchnię poboru próby.
3.	Zebrany materiał przenieść do jałowego pojemnika na próbę.	Ze względu na małą objętość próby, optymalny będzie plastikowy pojemnik, „moczówka” o objętości 100 ml.



Ryc. 1. Schemat poboru próby z podłoża kamienistego w nurcie cieku: 1 – skrobak do poboru próby, 2 – słój do poboru próby, 3 – kierunek nurtu (autor: Iwona Bogusz)

Tab. 6. Instrukcja pobierania prób środowiskowych z epifitów: roślin zanurzonych i pływających w wodzie – hydrofitów oraz roślin zanurzonych i zakorzenionych w wodzie – helofitów (EN 13946: 2003; Taylor i in., 2007; Karthick i in., 2010; Zgrundo i in., 2018; Kolada, 2020)

Lp.	Opis czynności	Komentarz
1.	W woreczku foliowym z zapięciem strunowym umieścić 5 roślin pobranych ze środowiska wodnego wraz z 50 ml wody ze zbiornika/cieku.	Zamiast woreczka można użyć pojemnika plastikowego o pojemności 100 ml („moczówka”) lub słoja stosowanego do zabezpieczania śladów osmologicznych.
2.	Energicznie potrząsać zawartością, co spowoduje oderwanie okrzemek od powierzchni roślin*.	- Woda powinna stać się mętna i przybrać brązowy kolor. - W przypadku, gdy ilość zebranego materiału jest niezadowalająca, należy zwiększyć powierzchnię poboru próby. *Etap potrząsania może być pominięty, a rośliny mogą zostać zabezpieczone w całości w pojemniku lub w słoju i zalane wodą destylowaną.
3.	W przypadku helofitów wybrać co najmniej 5 łodyg trwale zanurzonych w wodzie, pozbyć się ich łodygi nad powierzchnią. Następnie odciąć łodygi nad podłożem, z którego wyrastają i przenieść je do kувety lub innego plastikowego pojemnika opłukanego uprzednio w cieku wodnym. Następnie wlać do kувety 100 ml wody lub tyle, by pokryć łodygi roślin i energicznie wyszczotkować** łodygi szczoteczka do zębów z twardym włosiem.	**Etap szczotkowania może być pominięty, a rośliny mogą zostać zabezpieczone w całości w pojemniku lub w słoju i zalane wodą destylowaną.
4.	Powstałe w ten sposób (tj. w pkt 2 i pkt 3) popłuczyny zlać do jałowego pojemnika na próbę.	Ze względu na małą objętość próby, optymalny będzie plastikowy pojemnik, „moczówka” o objętości 100 ml lub słój do zabezpieczania śladów osmologicznych.

Zabezpieczanie epiksylonu – prób z podłoża drewnianego. W tym przypadku pobieranie prób środowiskowych z fragmentów drewna trwale zanurzonych w wodzie należy przeprowadzić w taki sam sposób jak w przypadku pobierania prób środowiskowych z naturalnego podłoża kamienistego (tab. 4) (Żelazna-Wieczorek, 2019).

Zabezpieczanie edafonu – prób z gleby. W przypadku zwłok ujawnionych w wodzie nie ma potrzeby zabezpieczania próbek glebowych. Do pomocy przy diagnozowaniu utonięć oraz do ustalenia, czy miejsce ujawnienia zwłok było tożsame z miejscem utonięcia wystarczą wyżej opisane zabezpieczone próbki fitoplanktonu oraz poszczególne próby fitobentosu.

Należy jednak pamiętać, że w przypadku, gdybyśmy chcieli podejrzanego powiązać z konkretnym miejscem – środowiskiem naturalnym, wskazanym byłoby zabezpieczyć próbkę gleby z miejsca zdarzenia do porównawczej analizy okrzemkowej. To daje nam możliwość porównania próbek gleby z zabezpieczonym na późniejszym etapie materiałem dowodowym w postaci ubłoconych przedmiotów, takich jak: opony, obuwie, skarpety, spodnie, łopaty oraz szpadle z zaschniętym błotem lub ziemią. Taka analiza może potwierdzić lub wykluczyć obecność sprawcy w konkretnym miejscu.

Tab. 7. Instrukcja pobierania prób środowiskowych z gleby (Taylor i in., 2007; Antonelli i in., 2017; Wanner i in., 2018; Żelazna-Wieczorek, 2019)

Lp.	Opis czynności	Komentarz
1.	Oczyścić powierzchnię gleby z materii organicznej w celu ułatwienia zebrania próby.	Jako materię organiczną rozumiemy wszelkie obumarłe rośliny oraz pozostałości po zwierzętach.
2.	Za pomocą czerpacza gleby, pobrać próbę o powierzchni 100 cm ² , do głębokości ok. 5 cm.	- Próbkę gleby można pobrać plastikowym pojemnikiem o pojemności 100 ml („moczówka”), zagłębiając go w glebie na głębokość ok. 5 cm, a następnie zebrać tę warstwę gleby do pojemnika. - Zamiast pojemnika plastikowego można użyć słoja, takiego samego, którego używa się do zabezpieczania śladów zapachowych.
3.	Zebraną warstwę gleby zalać wodą destylowaną, wstrząsnąć i przelać przez sitko*.	- Uzyskany przesącz powinien być mętny, o brązowej barwie. *Można dokonać zabezpieczenia samej próbki gleby, wówczas nie należy jej przepłukiwać, a umieścić w papierowej kopercie, umożliwiając jej wyschnięcie.
4.	Zebrany materiał przenieść do jałowego pojemnika na próbę.	Ze względu na małą objętość próby, optymalny będzie plastikowy pojemnik, „moczówka” o objętości 100 ml.

Wszystkie powyższe próby powinny być utrwalone 95% alkoholem etylowym lub metylowym w stosunku 1:10 (na 1 objętość alkoholu na 10 objętości wody).

Postępowanie z przedmiotami, które mogą zawierać materiał okrzemkowy, by mógł on być wykorzystany do porównawczej analizy okrzemkowej:

Obuwie

- Ublocone obuwie można zabezpieczyć do papierowych kopert, a następnie umieścić w kartonowym pudełku i w takiej formie wysłać do badań diatomologicznych.
- Jeśli obuwie to miałoby być także przedmiotem badań traseologicznych oraz biologicznych, należy w pierwszej kolejności pobrać wymazy do celów badań biologicznych: z wnętrza obuwia oraz z ewentualnych brunatnych plam, które mogłyby być krwią (w celu upewnienia się, czy mamy do czynienia z krwią można wykonać testy paskowe, np. Peroxtesmo lub Hemophan). W następnej kolejności buty umieścić w worku foliowym ze struną i zalać je 1 l wody destylowanej. Po zamknięciu worka strunowego energicznie nim potrząsać w celu wypłukania osadu okrzemkowego.

- Następnie wodę po wypłukaniu zlać do słoja i utrwalić próbę alkoholem 95% w stosunku 1:10 (1 objętość alkoholu na 10 objętości wody). Obuwie wysuszyć w naturalnych warunkach i po wysuszeniu może być poddane badaniom traseologicznym.

Opony

- Ublocone opony należy przepłukać 1 l wody destylowanej nad miską lub kuwetą dostosowaną do wielkości opony. W celu uzyskania dokładnego materiału z próbą okrzemkową należy opony dodatkowo wyszorować szczoteczką z twardym włosiem, jednak o większych rozmiarach niż szczoteczka do zębów, np. szczoteczka do mycia rąk.
- Wodę po wypłukaniu zlać do słoja i utrwalić próbę alkoholem 95% w stosunku 1:10.

Narzędzia: łopaty, grabie, szpadle i inne ubłocone przedmioty (zdj. 2a-2h)

- Jeśli przedmioty te mają być poddane badaniom biologicznym lub widać na nich ślady przypominające zaschniętą krew, przed zabezpieczeniem prób okrzemkowych należy najpierw pobrać ze stosownych miejsc wymazy (dla upewnienia się można też wykonać testy paskowe na obecność krwi).
- Do worka z zapięciem strunowym wlać 0,5–1 l wody destylowanej (ilość zależy od wielkości narzędzia).



Zdj. 2a-2h. Pozyskanie próby z narzędzia; kolejność wykonywanych czynności oznaczona na zdjęciach od A do H (autorzy zdjęć: asp. Kasper Molski, mł. asp. Michał Zakrzewski)

- Część roboczą narzędzia wraz z częścią trzonka (tam, gdzie będzie występować gleba) zanurzyć w worku z wodą. Po zapięciu lub zaciśnięciu worka nad częścią roboczą potrząsać energicznie workiem, by wypłukała się gleba.
- Wodę po wypłukaniu zlać do słoja i utrwalić próbę alkoholem 95% w stosunku 1:10.

Ubłocona odzież, np. spodnie, skarpety, rękawice, bluzy itp. (zdj. 3a-3g)

- Zabezpieczamy w całości pakując do papierowych pakietów, które umieszczamy w papierowych kopertach.
- Jeśli wyżej wymienione elementy odzieży będą przedmiotem innych badań biologicznych – badania genetyczne lub analiza mechanizmu powstawania plam krwawych – można je wysłać do analizy okrzemkowej po wykonaniu tych badań.
- Alternatywą jest wykruszenie zaschniętego na odzieży błota lub wyczesanie go szczoteczką do zębów z twardego włosia do papierowych pakietów, które następnie należy umieścić w papierowych kopertach.



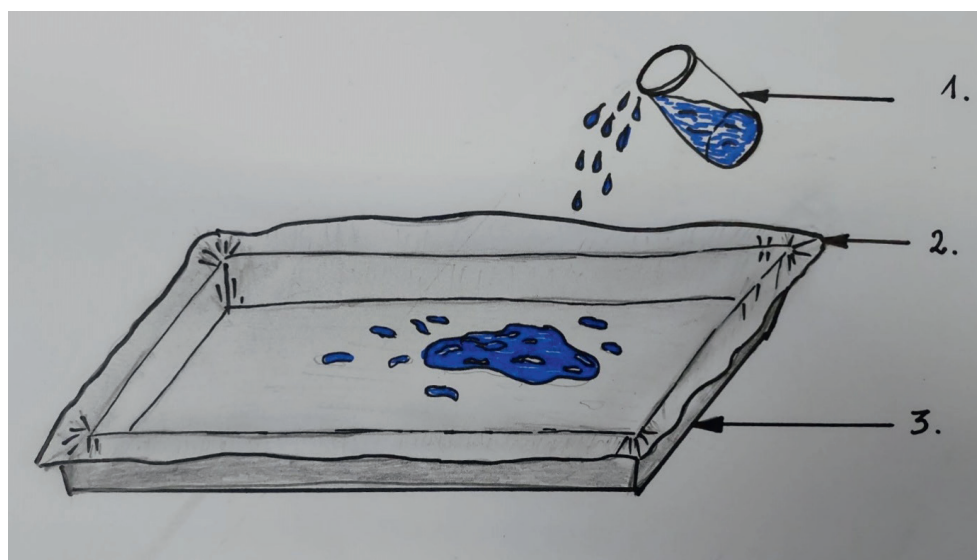
Zdj. 3a-3h. Zabezpieczanie próby z odzieży na przykładzie ubłoconych spodni; kolejność wykonywanych czynności oznaczona na zdjęciach od A do G (autorzy zdjęć: asp. Kasper Molski, mł. asp. Michał Zakrzewski)

Niezbędne oprzyrządowanie do zabezpieczania prób okrzemkowych:

- wiadro 10 l ze sznurkiem;
- słoje 0,9 l lub 1 l;
- pojemniki plastikowe o pojemności 100 ml, „moczówki”;
- kuweta plastikowa, miska lub inny pojemnik dostosowany rozmiarem do zabezpieczanej próby;

- szklana pipeta z gruszką;
- worki foliowe z zabezpieczeniem strunowym dostosowane rozmiarem do zabezpieczanych prób;
- szczoteczka do zębów z twardego włosia;
- szczoteczka do mycia rąk;
- woda destylowana;
- sitko do przelania wody z prób glebowych;
- alkohol etylowy lub metylowy 95%;
- papierowe koperty;
- papier szary na pakiety;
- kartonowe pudełko.

Alternatywą dla przechowywania prób mokrych przez dłuższy czas jest ich zabezpieczenie w następujący sposób: na czystą kuwetę kładziemy bibułę filtracyjną i wylewamy całą mokrą próbę, po wstrząśnięciu łącznie z osadem i pozostawiamy do wyschnięcia (ryc. 2). Następnie bibułę składamy w formie pakietu z wysuszonym osadem do środka i pakujemy do papierowej koperty.



Ryc. 2. Sposób wyłożenia bibuły i wylania próby w celu jej utrwalenia przez wysuszenie: 1 – słoć z próbą, 2 – bibuła, 3 – kuweta (autor: Iwona Bogusz)

Należy pamiętać, by wszystkie zabezpieczone próby, czy to w szklanych słojach, czy w plastikowych pojemnikach, czy też w kopertach papierowych lub w kartonowych pudełkach były trwale połączone z metryczkami śladowymi. W zależności od czynności procesowej próbkę zabezpieczoną nazwiemy przedmiotem, śladem, bądź materiałem porównawczym. Decyzja ta należy do prowadzącego postępowanie oraz technika kryminalistyki wykonującego daną czynność.

Wnioski końcowe

Publikowane źródła wskazują na wykorzystanie w procesie wykrywczym śladów środowiskowych, tzw. *environmental traces* w postaci pyłków roślinnych (Horrocks M., Walsh K.A., 1999; Wiltshire P.E.J., 2006; Mildenhall D.C., 2006; Mildenhall D.C. i in., 2006), grzybów (Hawksworth D.L., Wiltshire P.E.J., 2010; Wiltshire P.E.J., 2016), owadów (Benecke M., 1998; Pai C-Y i in., 2007; Cervantès L. i in., 2018; Matuszewski S., Mądra-Bielewicz A., 2019; Matuszewski S., 2021), gleby (Ruffell A., McKinley J., 2005, Morgan R.M., Bull P.A., 2005; Ruffell A., Mc Kinley J., 2006, Bull P.A. i in., 2006), w tym ziaren piasku (Bull P.A., Morgan R.M., 2006; Morgan R.M. i in., 2008; Konopinski D.I. i in., 2012) oraz okrzemek (Pollanen M.S., 1998; Horton P.B. i in., 2006; Peabody A.J., Cameron N.G., 2010; Scott K.R. i in., 2016; Levin E.A. i in., 2017; Scott K.R. i in., 2021; Bogusz I. i in., 2022). Biorąc to pod uwagę nie należy pomijać zabezpieczania materiału w postaci prób ze środowiska w celu późniejszego wykorzystania ich w procesie wykrywczym. Próby środowiskowe są często wykorzystywane przez organy ścigania w krajach zachodnich, odgrywają olbrzymią rolę nie tylko w tworzeniu wersji

kryminalistycznych, ale także mogą być świetnym materiałem dowodowym. Ponadto nie należy zapominać, że kryminalistyka jest dziedziną ciągle rozwijającą się i to, co było niemożliwe do zbadania 20 lat temu, dziś nie stanowi problemu dla ekspertów kryminalistyki. Jednak, by eksperci w przyszłości mogli dokonać właściwych analiz i wyciągnąć stosowne wnioski, należy dostarczyć im właściwie zabezpieczony materiał badawczy. Niniejsza praca rekomenduje wytyczne do zabezpieczenia materiału okrzemkowego, który nawet jeśli nie w aktualnie toczącym się postępowaniu, będzie mógł być wykorzystany też w przyszłości. Biorąc pod uwagę sezonową zmienność struktury zbiorowisk okrzemek oraz ich zmienność ze względu na różne czynniki środowiskowe: odczyn wody, zasolenie, przewodnictwo oraz trofię (Kawecka B., Kwandrans J., 2000; Hall R.I., Smol J.P., 2001; Battarbee R.W., 2001; Potapova M., 2001; Witkowski A. i in., 2001, Silva T. i in., 2022), pominięcie zabezpieczenia prób diatomologicznych podczas oględzin może być istotnym błędem, którego nie da się naprawić. Alternatywny sprzęt niezbędny do zabezpieczenia prób okrzemkowych wypunktowany w niniejszej publikacji jest stosunkowo niedrogi, a czynności, które w związku z ich zabezpieczeniem należy wykonać, nie są skomplikowane.

Bibliografia

1. Antonelli M., Wetzel C.E., Ector L., Teuling A.J., Pfister L. (2017). On the potential for terrestrial diatom communities and diatom indices to identify anthropic disturbance in soils. *Ecological Indicators*, 75, 73–81.
2. Battarbee R.W., Charles D.F., Dixit S.S., Renberg I. (2001). Diatoms as indicators of surface water acidity. In: Stoermer E.F., Smol J.P., editors. *The diatoms: applications for the environmental and earth sciences*. Cambridge, UK: Cambridge University Press, 85–127.
3. Benecke M. (1998). Six forensic entomology cases: description and commentary. *J Forensic Sci.* 43(4), 797–805. <https://doi.org/10.1520/JFS14309J>.
4. Bogusz I., Bogusz M., Żelazna-Wieczorek J. (2018). Zastosowanie okrzemek w kryminalistyce. *Problemy Kryminalistyki*, 301, 21–28.
5. Bogusz I., Bogusz M., Żelazna-Wieczorek J. (2022). Diatoms from inland aquatic and soil habitats as indestructible and nonremovable forensic environmental evidence. *Journal of Forensic Sciences*, 67 (4). <https://doi.org/10.1111/1556-4029.15017>.
6. Bogusz M., Krajewski P., Siwińska A., Żelazna-Wieczorek J. (2018). Wykorzystanie testu okrzemkowego w diagnozowaniu utonięć na podstawie badań przeprowadzonych w ZMS WUM w latach 2015–2017. *Problemy Współczesnej Kryminalistyki*, 22, 25–42.
7. Bull P.A., Morgan R.M. (2006). Sediment fingerprints: a forensic technique using quartz sand grains. *Sci Justice*. 46(2), 107–24. [https://doi.org/10.1016/S1355-0306\(06\)71581-7](https://doi.org/10.1016/S1355-0306(06)71581-7).
8. Bull P.A., Parker A., Morgan R.M. (2006). The forensic analysis of soils and sediment taken from the cast of a footprint. *Forensic Sci Int.* 162(1–3), 6–12. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2006.06.075>.
9. Cervantès L., Dourel L., Gaudry E., Pasquerault T., Vincent B. (2018). Effect of low temperature in the development cycle of *Lucilia sericata* (Meigen) (Diptera, Calliphoridae): implications for the minimum postmortem interval estimation. *Forensic Sci Res.* 3(1), 52–9. <https://doi.org/10.1080/20961790.2017.1406839>.
10. Delabarde T., Keyser C., Tracqui A., Charabidze D., Ludes B. (2013). The potential of forensic analysis on human bones found in riverine environment. *Forensic Science International*, 228 (1–3), e1–e5. <https://doi.org/10.1016/J.FORSCIINT.2013.03.019>.
11. Hall R.I., Smol J.P. (2001). Diatoms as indicators of lake eutrophication. In: Stoermer E.F., Smol J.P., editors. *The diatoms: applications for the environmental and earth sciences*. Cambridge, UK: Cambridge University Press, 128–168.
12. Hawksworth D.L., Wiltshire P.E.J. (2011). Forensic mycology: the use of fungi in criminal investigations. *Forensic Sci Int.* 206(1–3), 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2010.06.012>.
13. Horrocks M., Walsh K.A. (1999). Fine resolution of pollen patterns in limited space: differentiating a crime scene and alibi scene seven meters apart. *J Forensic Sci.* 44(2), 417–20. <https://doi.org/10.1520/JFS14477J>.
14. Horton P.B., Boreham S., Hillier C. (2006). The development and application of a diatom based quantitative reconstruction technique in forensic science. *J Forensic Sci.* 51(3), 643–650. <https://doi.org/10.1111/j.1556-4029.2006.00120.x>.
15. Hürlimann J., Feer P., Elber F., Niederberger K., Dirnhofer R., Wyler D. (2000). Diatom detection in the diagnosis of death by drowning. *International Journal of Legal Medicine* 114, 6–14. <https://doi.org/10.1007/s004149900122>.

16. Karthick B., Taylor J.C., Mahesh M.K., Ramachandra T.V. (2010). Protocols for collection, preservation and enumeration of diatoms from aquatic habitats for water quality monitoring in India. *IUP Journal of Soil and Water Sciences*, 3 (1), 25–60.
17. Kawecka B., Eloranta P.V. (1994). *Zarys ekologii glonów wód słodkich i środowisk lądowych*. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa.
18. Kawecka B., Kwandrans J. (2000). Diversity of flora and fauna in running waters of the province of Cracow (southern Poland) in relation to water quality. *Acta Hydrobiol.* 42(3/4), 145–73.
19. Kolada A. (2020). Podręcznik do monitoringu elementów biologicznych klasyfikacji stanu ekologicznego wód powierzchniowych. Aktualizacja metod. Główny Inspektorat Ochrony Środowiska, Warszawa.
20. Konopinski D.I., Hudziak S., Bull P.A., Morgan R.M., Kenyon A.J. (2012). Investigation of quartz grain surface textures by atomic force microscopy for forensic analysis. *Forensic Sci Int.* 223(1–2), 245–55. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2012.09.011> 3.
21. Krstic S., Duma A., Janevska B., Levkov Z., Nikolova K., Noveska M. (2002). Diatoms in forensic expertise of drowning – a Macedonian experience. *Forensic Science International* 127(3), 198–203. [https://doi.org/10.1016/s0379-0738\(02\)00125-1](https://doi.org/10.1016/s0379-0738(02)00125-1).
22. Levin E.A., Morgan R.M., Scott K.R., Jones V.J. (2017). The transfer of diatoms from freshwater to footwear materials: an experimental study assessing transfer, persistence, and extraction methods for forensic reconstruction. *Science and Justice*, 57 (5), 349–360.
23. Makowska Ż., Bogusz I. (2020). Ślady biologiczne. W: Frankowski A., Trojanowski P. (red.) *Dobre praktyki technika kryminalistyki*. Centralne Laboratorium Kryminalistyczne Policji, Warszawa, 49–51.
24. Matuszewski S. (2021). Post-mortem interval estimation based on insect evidence: current challenges. *Insects*. 12(4), 314. <https://doi.org/10.3390/insects12040314>.
25. Matuszewski S., Mądra-Bielewicz A. (2019). Post-mortem interval estimation based on insect evidence in a quasi-indoor habitat. *Sci Justice*. 59(1), 109–115. <https://doi.org/10.1016/j.scijus.2018.06.004>.
26. Mildenhall D.C. (2006). An unusual appearance of a common pollen type indicates the scene of the crime. *Forensic Sci Int.* 163(3), 236–40. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2005.11.029>.
27. Mildenhall D.C., Wiltshire P.E.J., Bryant V.M. (2006) Forensic palynology: why do it and how it works. *Forensic Sci Int.* 163(3), 163–72. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2006.07.012>.
28. Morgan R.M., Bull P.A. (2005). Data interpretation in forensic sediment and soil geochemistry. *Environ Forensics*. 7, 325–34. <https://doi.org/10.1080/15275920600996248>.
29. Morgan R.M., Little M., Gibson A., Hicks L., Dunkerley S., Bull P.A. (2008). The preservation of quartz grain surface textures following vehicle fire and their use in forensic enquiry. *Sci Justice*. 48(3), 133–140. <https://doi.org/10.1016/j.scijus.2008.04.001>.
30. Pai C-Y, Jien M-C, Li L-H, Cheng Y-Y, Yang C-H. (2007). Application of forensic entomology to postmortem interval determination of a burned human corpse: a homicide case report from southern Taiwan. *J Formos Med Assoc.* 106(9), 792–798. [https://doi.org/10.1016/S0929-6646\(08\)60043-1](https://doi.org/10.1016/S0929-6646(08)60043-1).
31. Peabody A.J., Cameron N.G. (2010). Forensic science and diatoms. W: Stoermer E.F., Smol J.P. (red.) *The diatoms: applications for the environmental and earth sciences*. Cambridge University Press, New York, 534–539.
32. Pollanen M.S. (1998). Diatoms and homicide. *Forensic Science International*, 91 (1), 29–34.
33. Potapova M. (2001). Patterns of diatom distribution in relations to salinity. In: Stoermer E.F., Smol J.P., editors. *The diatoms: applications for the environmental and earth sciences*. Cambridge, UK: Cambridge University Press, 315–332.
34. Rana A., Manhas S. (2018). Significance of diatoms in diagnosis of drowning deaths: a review. *Peer Reviewed Journal of Forensic & Genetic Sciences*, 1 (5), 77–81.
35. Rana A., Manhas S. (2018). Significance of diatoms in diagnosis of drowning deaths: a review. *Peer Reviewed Journal of Forensic & Genetic Sciences*, 1 (5), 77–81.
36. Richards J., Tibby J., Barr C., Goonan P. (2020). Effect of substrate type on diatom-based water quality assessments in the Mount Lofty Ranges, South Australia. *Hydrobiologia*, 847, 3077–3090. DOI: 10.1007/s10750-020-04316-9.
37. Ruffell A., McKinley J. (2005). Forensic geoscience: applications of geology, geomorphology and geophysics to criminal investigations. *Earth Sci Rev.* 69(3–4), 235–47. <https://doi.org/10.1016/j.earscirev.2004.08.002>.

38. Scott K.R., Jones V.J., Cameron N.G., Young J.M., Morgan R.M. (2021). Freshwater diatom persistence on clothing I: A quantitative assessment of trace evidence dynamics over time. *Forensic Science International*, 325. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2021.110898>.
39. Scott K.R., Jones V.J., Cameron N.G., Young J.M., Morgan R.M. (2021). Freshwater diatom persistence on clothing II: Further analysis of species assemblage dynamics over investigative timescales. *Forensic Science International*, 326. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2021.110897>
40. Scott K.R., Morgan R.M., Jones V.J., Dudley A., Cameron N., Bull P.A. (2016). The value of an empirical approach for the assessment of diatoms as environmental trace evidence in forensic limnology. *Archaeological and Environmental Forensic Science*, 1, 49–78.
41. Silva, T.T., Medeiros, G., Amaral, M.W., Pilatti, M.C., Bortolini, J.C., & Bueno, N.C. (2022). Taxonomic and morphofunctional phytoplankton response to environmental variability in rivers from different hydrographic basins in Southern Brazil. *Acta Limnologica Brasiliensia*.
42. Taylor J.C., Harding W.R., Achribald C.G. (2007) A methods manual for the collection, preparation and analysis of diatom samples, Version 1.0. Water Research Commission.
43. Townsend S., Gell P. (2005) The role of substrate type of benthic diatom assemblages in the Daly and Roper Rivers of the Australian wet/dry tropics. *Hydrobiologia*, 548: 101–115. <https://doi.org/10.1007/s10750-005-0828-7>
44. Wanner M., Betker E., Shimano S., Krawczynski R. (2018). Are soil testate amoebae and diatoms useful for forensics?. *Forensic Science International*, 289, 223–231.
45. Wiltshire P.E.J. (2006). Consideration of some taphonomic variables of relevance to forensic palynological investigation in the United Kingdom. *Forensic Sci Int.* 163(3), 173–82. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2006.07.011>.
46. Wiltshire P.E.J. (2016). Mycology in palaeoecology and forensic science. *Fungal Biol.* 120(11), 1272–1290. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2016.07.005>.
47. Witkowski A., Radziejewska T., Wawrzyniak-Wydrowska B., Lange H., Bąk M., Gelbrecht J. (2001). Living on the pH edge: diatom assemblages of low-pH lakes in western Pomerania (NW Poland). In: Stoermer E.F., Smol J.P., editors. *The diatoms: applications for the environmental and earth sciences*. Cambridge, UK: Cambridge University Press, 369–384.
48. Zgrundo A., Peszek Ł., Poradowska A. (2018). Podręcznik do monitoringu i oceny rzecznych jednolitych części wód powierzchniowych na podstawie fitobentosu. Załącznik 2.6. Ostateczna wersja zaktualizowanych metodyk na potrzeby oceny stanu ekologicznego wód powierzchniowych w Polsce na podstawie fitobentosu. Ocean Sense, Gdańsk.
49. Zhao J., Zhang P., Xue Y., Kang X., Zhang S., Mab Y., Shi H., Cheng J., Liu Y., Liua C., Zhaoa H. (2019). Correlation analysis of diatom content in the organs and drowning mediums for the drowning death cases. *Australian Journal of Forensic Sciences* 53(2), 191–198. <https://doi.org/10.1080/00450618.2019.1682667>.
50. Żelazna-Wieczorek J. (2019). Przesłanki do zastosowania okrzemek w kryminalistyce. W: Bogusz I. (red.) *Możliwości wykorzystania okrzemek w kryminalistyce*. Centrum Szkolenia Policji, Legionowo, 13–34.