



Česká zemědělská univerzita v Praze  
**Fakulta životního  
prostředí**

**Limitující faktory pro populaci perlorodky říční (*Margaritifera margaritifera*) ve zbytkových refugiích**

Dizertační práce typu „*Soubor prací*“

Doktorand: **Mgr. Ondřej Simon**

Školitel: **doc. Mgr. Pavel Saska, Ph.D.**

Konzultant: **Ing. Karel Douda, Ph.D.**

Obor: Ekologie

Katedra: Ekologie

Praha, 2017

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem předloženou dizertační práci vypracoval samostatně a použil pouze prameny uvedené v seznamu literatury.

Dizertační práce byla vytvořena s použitím projektových dat, anebo jako součást řešení těchto grantů:

- **Internal Grant Agency of Faculty of Environmental Sciences, CULS Prague (42110 1312 3175),**
- **Ministry of Environment of the Czech Republic (MZP 0002071101),**
- **Czech Science Foundation (13-05872S),**

a Záchraného programu perlorodky říční *Margaritifera margaritifera* v ČR (90740/ENV/13 – 4050/630/13)

V Praze dne 14. 3. 2017

Mgr. Ondřej Simon

## **Poděkování**

Děkuji především školiteli doc. Pavlu Saskovi, Ph.D. za velkorysé vedení v průběhu celého doktorského studia a konzultantovi Ing. Karlovi Doudovi, Ph.D. za spolupráci v terénu i nad rukopisy. Dále děkuji všem spoluautorům článků za jejich přínos a milou spolupráci. Zvláštní poděkování patří Ivaně Vaníčkové, Michalu Bílému, Míše Černé, a všem, kdo mne při studiu podporovali, zejména mé ženě Slávce, dcerám Jasně, Františce a Johance, které mi dodávaly sílu vše zdárně dokončit.

1. Úvod.....	6
2. Cíle disertační práce.....	6
3. Literární rešerše.....	8
3.1 Perlorodka říční jako modelový druh vymírajících mlžů – stav populace v ČR.....	8
Charakteristika druhu z pohledu ochranné biologie.....	8
Status ochrany perlorodky říční .....	8
Zmenšování areálu druhu v povodí Labe v ČR a její příčiny .....	9
Zaměření prvního a druhého článku .....	10
3.2 Detrit a procesy ovlivňující jeho produkci v primární říční síti .....	11
Význam detritu pro ochranu perlorodky říční.....	11
Metabolismus primární říční sítě a dominantní role detritu (FPOM) .....	11
Původ detritu v primární říční síti – role a význam helokrénu .....	12
Prvkové složení a stravitelnost detritu .....	13
Detrit a jeho mikroskopicky detekovatelné složky .....	13
Mobilita detritu .....	14
Přírodní zdroje detritu využívaného jako potravní partikule perlorodkou říční .....	14
Zaměření třetího článku .....	15
3.3 Potrava a limitace potravou u perlorodky říční .....	15
Potravní ekologie perlorodky říční .....	15
Potrava juvenilních jedinců.....	15
Kvalitativní charakteristiky detritu jako limitní faktor pro rozmnožování perlorodky ....	16
3.4 Bioindikace jako metoda hodnocení prostředí na příkladu juvenilních mlžů .....	17
Měření fyzikálně-chemických parametrů prostředí, nebo bioindikace?.....	17
Princip bioindikací a jeho obecné limity.....	17
Využití bioindikací pro potřeby ochrany perlorodky říční .....	17
Varianty bioindikačních testů – <i>in-situ</i> versus <i>ex-situ</i> .....	18
Zaměření čtvrtého článku.....	18
3.5 Praktické využití poznatků o ekologii juvenilů perlorodky říční pro odchovy a speciální revitalizace v kontextu záchranného programu perlorodky říční .....	19
Přehled odchovů velkých mlžů ve světě.....	19
Odchovy perlorodky říční v Evropě .....	20
Přirozená a umělá potrava perlorodek a dalších unionidů v chovech.....	20
Vysazování a následné přežívání vysazených mlžů .....	21
Odchovné a reprodukční prvky a jejich vliv na potravní zásobení.....	22
Opatření na zlepšení zásobení detritem speciálními revitalizacemi v povodí .....	22
Revitalizační opatření na eliminaci projevů nadměrné eroze, snížení vlivu eutrofizace a negativních změn využití krajiny v ZCHÚ s výskytem perlorodky říční .....	23
4. Vlastní práce – soubor vědeckých studií.....	25

5.	Diskuse – komentář k vědeckým studiím .....	27
5.1	Perspektivy lokálních populací perlorodky říční v ČR .....	27
	Výjimečné případy reprodukce a náhonový efekt ve střední části biotopu .....	28
	Ekosystémový přístup k ochraně druhu .....	29
	Perspektivní lokální populace v rámci jednotlivých ochrannářských jednotek .....	31
5.2	Metodologické problémy sledování FPOM jakožto potravy mikrofiltrátorů .....	31
	Příčina nedostatku bilančních studií od FPOM: problémy s odběrem reprezentativního vzorku .....	31
	Metody odběru časově integrovaného vzorku FPOM na malých a středních tocích .....	32
5.3	Bioindikace juvenilními perlorodkami – metody, interpretace dat a limity použití .....	35
	Destičky a klíčky – růst versus růstový potenciál .....	35
	Bioindikace pode dnem .....	36
6.	Přínos práce a závěrečné shrnutí .....	38
7.	Summary .....	40
8.	Použitá literatura .....	42
9.	Přílohy .....	49

## 1. Úvod

Perlorodka říční patří mezi celosvětově ustupující velké mlže, kteří jsou stejně jako řada dalších sladkovodních druhů silně ohrožení rychlými změnami a znečišťováním tekoucích vod. Perlorodka má komplikovaný životní cyklus, v jehož průběhu žije jako endoparazit, postupně se stává součástí bentosu, planktonu a obývá i hyporeál pode dnem řek. O fázi života pode dnem nejsou dosud k dispozici žádné publikované poznatky.

Druh má ve střední Evropě již více než padesát let velké problémy s rozmnožováním. Na většině českých zbytkových lokalit se perlorodka dlouhodobě nedokáže rozmnožovat a populace je silně přestárlá. Rozmnožovací cyklus je obvykle přerušen v hyporeálové fázi života.

Disertační práce se zaměřila na tři hlavní tematické okruhy: sumarizaci stavu populace v ČR zejména s ohledem na přirozené rozmnožování a výsledky posilování pomocí odchovů, dále na otázku potravy juvenilních jedinců a zejména detritu z pramenišť a v rozsáhlé sérii bioindikačních experimentů pak byly hledány limitující faktory při terénních expozicích.

## 2. Cíle disertační práce

První oblast, které se věnovaly první dva články tvořící tuto disertační práci, představuje shrnutí základních údajů o stavu populace v ČR. Tyto údaje nebyly od devadesátých let dosud zveřejněny a chyběla jak data o distribuci zbytkových populací v měřítku celého státu, tak podrobnější údaje z centra výskytu v jižních Čechách. Rozsáhlé odchovy realizované týmem J. Hrušky v uplynulých 20 letech (Hruška 1999) byly úspěšně dovedeny od fáze vypouštění 3–5 let starých jedinců, chyběly však informace o etablování se těchto jedinců v přirozeném prostředí. Klíčové cíle prvního tematického okruhu lze shrnout do následujících hlavních otázek:

- Jaká je struktura zbytkových populací v ČR s ohledem na přirozenou niku druhu?
- Rozmnožují se dosud některé populace, a pokud ne, kdy došlo k přerušení reprodukce?
- Jaké jsou výsledky omlazování populací vysazováním juvenilních jedinců z odchovů probíhajících na přelomu 20. a 21. století?

Druhou oblastí, na kterou je disertační práce zaměřena, je detailnější popsání skladby a kvantity detritu na začátku říční sítě. Tento materiál odebíraný z pramenišť typu helokrenů je s úspěchem využíván pro krmení juvenilních perlorodek (Kubíková, Simon et al. 2012) a současně je nedostatek detritu o vhodném složení dlouhodobě považován za základní limitní faktor pro rozmnožování druhu v ČR (Hruška 1999, Švanyga, Simon et al. 2013). Cíle v této oblasti lze shrnout do následujících otázek:

- Jaké je chemické složení a množství detritu vyplavovaného z helokrenů a jak se tyto charakteristiky mění v průběhu roku?
- Lze původ detritu odvozovat spíše od primární produkce suchozemských a mokřadních společenstev prostřednictvím rozkladných procesů, nebo se více uplatňují komplexní procesy v samotném prameništi?
- Lze aplikovat koncept říčního kontinua také na úseky povodí začínající v helokrenech?

Třetí oblastí, na kterou je dizertační práce zaměřena, je detailní popsání přežívání juvenilních perlorodek v různých mikrohabitátech podélného profilu vodního toku společně s analýzou fyzikálních a chemických faktorů prostředí. V této oblasti existuje dosud jen málo publikací (Denic, Taeubert et al. 2015, Gumpinger, Hauer et al. 2015). Zvolen byl tok Vltavy nad vodním dílem Lipno včetně přítoků, kde jsou podle předběžných studií příznivé podmínky pro přežití perlorodek ve všech vývojových stádiích. Cíle v této oblasti lze shrnout do následujících otázek:

- Jaké bioindikační metody jsou nejvhodnější pro testování přežívání a růstu juvenilních perlorodek v podmínkách horské řeky?
- Které fyzikálně-chemické faktory nade dnem a pode dnem řeky korelují s výsledky bioindikací?
- Ovlivňuje chemické složení detritu výsledky bioindikací?
- Která část toku Teplé Vltavy je vhodná pro posilování populace perlorodky říční?

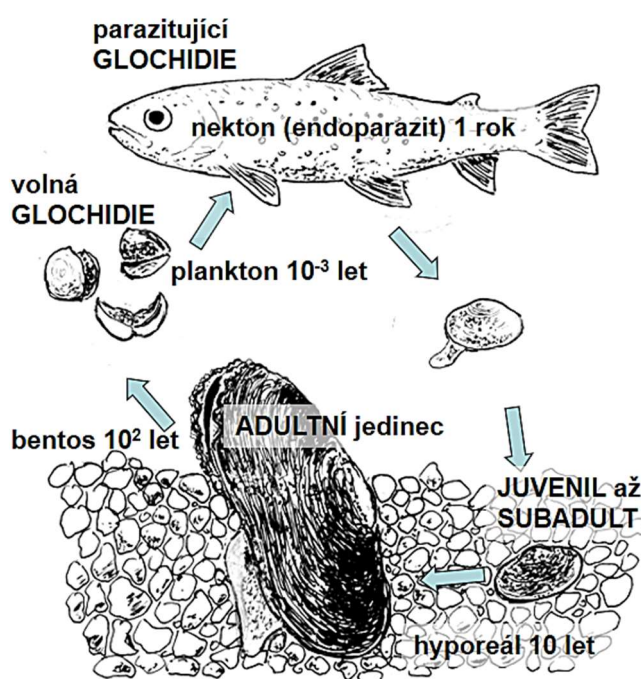
### 3. Literární rešerše

#### 3.1 Perlorodka říční jako modelový druh vymírajících mlžů – stav populace v ČR

##### Charakteristika druhu z pohledu ochranné biologie

Perlorodka říční (*Margaritifera margaritifera* Linnaeus, 1758) je dlouhověký mlž ze skupiny Unionoida (Araujo, Schneider et al. 2016, Bolotov, Vikhrev et al. 2016) dosahující velikosti 10-15 cm. V posledních padesáti letech je mu věnována vzrůstající pozornost jako klíčovému i indikátorovému druhu pro ekosystémy oligotrofních povodí (Geist 2011).

Sladkovodní druhy, a zejména mlži, patří mezi skupiny živočichů nejvíce ohrožené vymíráním (Bauer and Wächtler 2001, Strayer 2006). Jejich ochrana je pak s ohledem na velké biotopové nároky velmi náročná a drahá (Geist 2011). Perlorodka říční patří mezi druhy, které v současnosti mizí v celém areálu, přestože byly v minulosti široce rozšířeny.



Jedním z důvodů je velmi komplikovaný životní cyklus (viz obr. 1). Začíná krátkou planktonní fází v podobě glochidia, po které následuje téměř roční parazitická fáze v rybích žábách. Po odpadnutí z ryby žijí juvenilní perlorodky 10–20 let velmi skrytým způsobem života v hyporeálu pode dnem podhorských toků. Subadultní a dospělí jedinci pak žijí v koloniích na povrchu dna a druh se často dožívá i v našich podmínkách více než 100 let (Bauer and Wächtler 2001). Právě komplexní životní cyklus spojený se striktními nároky na oligotrofní prostředí činí perlorodku říční velmi zranitelnou v době rychlých antropogenních změn říčních sítí probíhajících v posledních 150 letech.

Obrázek 1 – Životní cyklus perlorodky říční: jeden organismus, ale čtyři různé gildy s velmi rozdílnou délkou života (kresba originál M. Bílý, schéma O. Simon, délka trvání životních fází je uvedena v logaritmické škále).

##### Status ochrany perlorodky říční

V současnosti je perlorodka říční hodnocena jako ohrožený druh podle mezinárodní evropské legislativy a je chráněna v rámci celoevropské sítě NATURA 2000. Její ochranu upravuje evropský záchranný program (Araujo and Ramos 2001). Podle národní legislativy je v ČR zařazena od roku 1955 mezi zvláště chráněné druhy, od roku 1992 pak se statutem kriticky ohroženého druhu.





Obrázek 2 – Evropský areál druh *Margaritifera margaritifera* převzatý z Lopes-Lima et al. (2016). Body znázorňují dokumentované lokality velikosti potoka až velké říční populace, zvýrazněná jsou osídlená povodí. Areál druhu zasahuje také do severovýchodní části severní Ameriky. Tmavší barvou ve Francii a Španělsku původní areál příbuzného druhu *Margaritifera auricularia*.

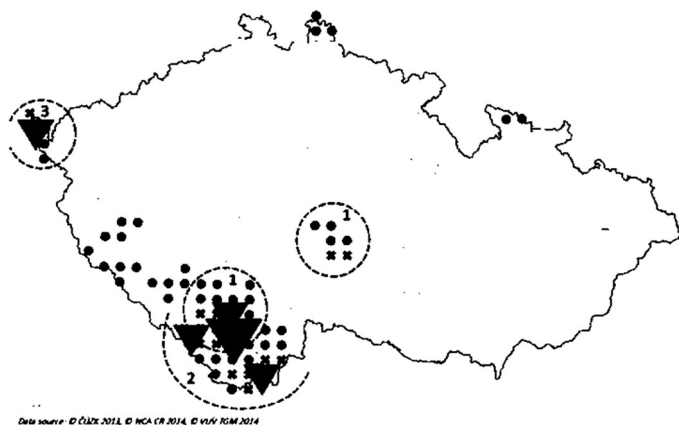
Ochrana perlorodky říční v ČR má dlouhou tradici. Od roku 1913 bylo nařízením Královského místodržitelství v Praze zajištěno její celoroční hájení a lov v přírodě žijících jedinců byl v Čechách zakázán jako v první evropské zemi. V menším měřítku pak byli tito mlži chováni s cílem komerčního využití v mlýnských náhonech. Poslední dokumentovaný hospodářsky zaměřený lov perel v Horažďovicích na Otavě je dokumentován v roce 1944 (Dyk 1947, Dyk and Dyková 1974).

### Zmenšování areálu druhu v povodí Labe v ČR a její příčiny

Přes dlouhodobou ochranu perlorodka říční mizí v celém svém evropském areálu od Portugalska po Karélii (Araujo and Ramos 2000, Ostrovsky and Popov 2011, Lopes-Lima, Sousa et al. 2016) – viz obr. 2. Obecně lze jako dominantní negativní vlivy identifikovat toxické znečištění vody, eutrofizaci, regulaci toků a změny využití ploch v povodích (Bauer 1988, Hruška 1999, Geist 2010).

O zásadním úbytku v době nestabilní politické situace za třicetileté války vlivem nadměrného lovení či nekontrolovaného pytláčení referují ve střední Evropě jen nepříliš spolehlivé zprávy. V Čechách bylo první masové vymírání milionových populací dokumentováno v době rozvoje manufakturní výroby a papíren mezi lety 1850–1940 (Dyk 1947). Dále se zásadně negativně projevovalo vypouštění nečištěných komunálních a průmyslových odpadních vod, výstavba přehrad, regulace řek a potoků. V podhorských oblastech se také radikálně změnilo využití pozemků v povodí. Například tradiční malovýrobní smíšené zemědělství v málo úrodných půdách zaniklo a krajina zarostla lesem. Oproti tomu v úrodnějších polohách nebo na pozemcích systematicky odvodněných byla zemědělská výroba intenzifikována (Hruška 1991a, Dyk 1992). Také diverzita lesních porostů v celých povodích byla zásadně změněna v 19. století zavedením smrkového hospodářství vedoucího k postupné degradaci původně mezotrofních půd. Drobná říční síť byla zásadně změněna výstavbou odvodňovacích systémů v podobě povrchových příkopů, zatrubněním toků a často i plošnou systematickou drenáží. Povrchové odvodnění často akcelerovalo enormní erozi (Švanyga, Simon et al. 2013).

Kombinace přímých i nepřímých důsledků těchto zásahů měla zásadní dopad na teplotní režim, charakter eroze a chemismus vody, což vyústilo v rozsáhlé změny v potravních sítích v jednotlivých povodích. Nedostatek vhodných detritových partikulí s dostatečným obsahem vápníku a živin (Hruška 1991a, Hruška 1991b, Tichá, Simon et al. 2012) byl rozpoznán jako hlavní faktor zabraňující přežívání juvenilů a tak blokující přirozenou reprodukci (Hruška 1991, Švanyga, Simon et al. 2013). Druh se proto na zbytkových lokalitách již téměř 50 let nerozmnožuje. Početnost na lokalitách klesá a areál výskytu je málo rozsáhlý a fragmentovaný. Zcela vymřely populace na severní Moravě a severu Čech, stejně jako všechny populace v povodí Berounky, Otavy a v hlavním toku Vltavy pod Lipenskou přehradní nádrží. Výsledky záchranného programu v podobě omlazení populací jsou sice slibné, ale celkový trend se dosud



zvrátit nepodařilo (viz obr. 3 zpracovaný na základě článku 1 Simon, Vaníčková, Bílý et al. 2015 – články tvořící součást této disertační práce citujeme podle pořadového čísla a jmen autorů). Obdobně i jinde v Evropě jsou doloženy jen ojedinělé úspěchy v podobě obnovené reprodukce ustupujících populací (Altmüller and Dettmer 2006, Larsen, Harsaker et al. 2006).

**Obrázek 3 – Rozsah zbytkového areálu perlorodky říční v ČR ve čtvrcích sítě faunistického mapování (originál podle různých zdrojů). Černé tečky- historický výskyt, ležadé křížky - současný výskyt, trojúhelníky - populace omlazené v rámci záchranného programu v letech 1995 - 2005 (velká značka nad 40 000 vysazených jedinců, malá značka 1000 – 3000 jedinců, čísla označují geneticky odlišné lokální populace nazvané podle hlavního místa výskytu jako 1 – Blanická, 2 – Malšská a 3 – Sálská (upraveno podle článku 1).**

### Zaměření prvního a druhého článku

Od roku 1992 nebyly publikovány údaje o stavu populace v ČR, ani o efektu opatření realizovaných v rámci záchranného programu perlorodky říční. Dále chyběly údaje o prostorové distribuci zbytkových výskytů perlorodky říční s ohledem na přirozenou výškovou hranici areálu. Chyběla také jakákoli data o genetické struktuře populací. Doplnění této mezery bylo cílem článku 1 Simon, Vaníčková, Bílý et al. 2015. Obdobně chyběla detailní regionální data o výskytu v místě stávajícího těžiště populace v jižních Čechách. Též nebyly dostupné údaje o podílu mladých jedinců v nálezech a metodě jejich identifikace bez vyjímání jedinců ze dna toku (což české předpisy neumožňují). Tyto poznatky byly doplněny a zpřístupněny formou článku 2 Matasová, Simon, Dort et al. 2013.

### 3.2 Detrit a procesy ovlivňující jeho produkci v primární říční síti

#### **Význam detritu pro ochranu perlorodky říční**

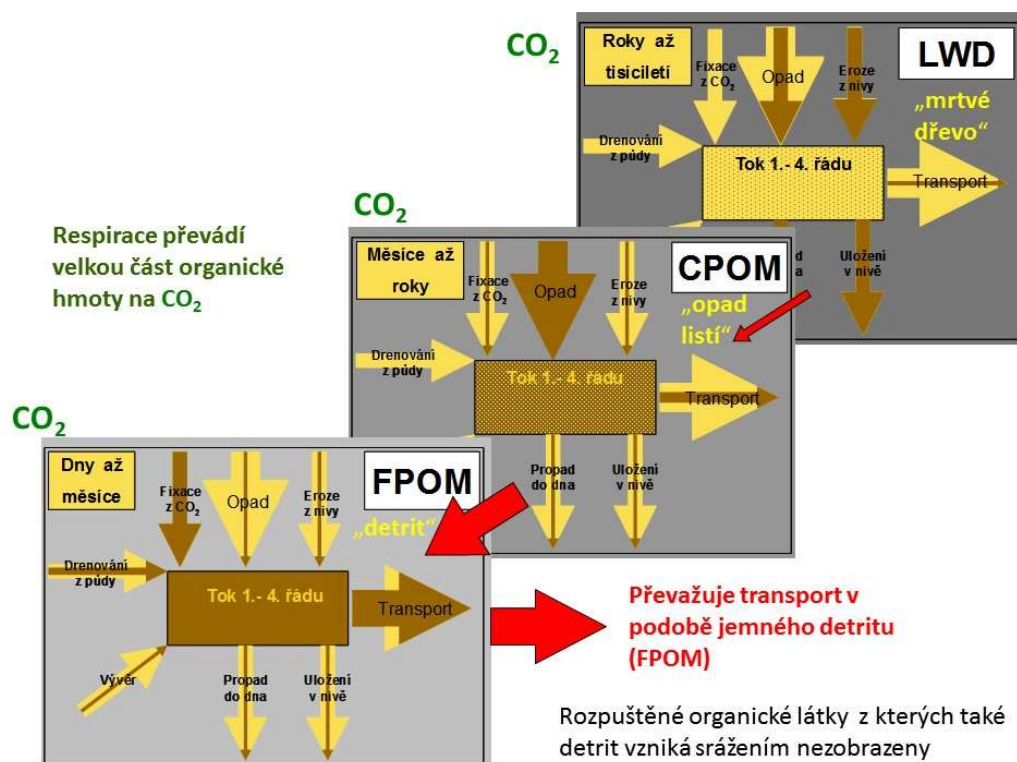
Perlorodka říční se živí v juvenilním i adultním věku detritem (Bauer and Wächtler 2001). Aktivní ochrana druhu proto není možná bez detailního poznání kvalitativních a kvantitativních charakteristik detritu. S ohledem na to, že detritové řetězce mají své počátky jak v akvatických, tak v terestrických rostlinných společenstvech v povodí, musí být zohledněn metabolismus říční sítě od míst s koloniemi perlorodky až po prameny. Právě detrit odebíraný přímo z určitých pramenů (společně s detritem produkovaným rhizosférou aluviálních luk) byl klíčem k realizaci prvních úspěšných polopřirozených odchovů perlorodek na světě (Hruška 2000, Hruška 1999). Další část rešerše je proto věnována detritu a obecněji i procesům jeho vzniku.

#### **Metabolismus primární říční sítě a dominantní role detritu (FPOM)**

Systémy tekoucích vod jsou otevřené systémy s velkou schopností transformovat živiny pocházející z povodí (Newbold 1992). Jak postulují tzv. RCC koncept (river continuum concept – koncept říčního kontinua), fyzikální proměnné vykazují u toků zásadní gradient od pramene k ústí. Jeho výsledkem je gradient biotických proměnných, kvality a kvantity organických partikulí a různé schopnosti toku je transportovat (Vannote, Minshall et al. 1980). Řada prací se věnovala detritovým řetězcům, transportu částic a cyklům živin v malých horských tocích (Wallace, Cuffney et al. 1991, Newbold 1992, Cushing, Minshall et al. 1993, Newbold, Thomas et al. 2005, Wallace, Hutchens et al. 2007, Webster 2007, Tant, Rosemond et al. 2015). Postupný transport živin a substrátů dolů po proudu – tzv. spiraling živin – ovlivňuje potoční společenstva. Oproti tomu, prokaryota v biofilmech a suspenzích, živočichové a někdy i rostliny, ovlivňují zpětně koncentrace rozpuštěných nebo partikulovaných živin v toku (Newbold 1992). Mezi nejvíce mobilní částice patří středně velká frakce vločkovacího detritu tzv. FPOM - fine organic particulate organic matter (Iversen, Jensen et al. 1982) - viz obr. 4.

Jednou ze základních složek procesů v říční síti jsou detritové rozkladné řetězce, které určují dostupnost organických látek jakožto potravního zdroje pro heterotrofní organismy (Kominoski and Rosemond 2011). Velikost partikulí detritu sice obecně klesá směrem po proudu s tím, jak roste řád toku dle Strahlera (Strahler 1957, Vannote, Minshall et al. 1980), ale tato závislost může být narušena laterálním přísunem větších částic z aluvia na velkých řekách (Ward and Stanford 1995, Stanford and Ward 2001), nebo srážením či biokompakcací jemných suspenzí na větší částice (Wotton and Malmqvist 2001, Wotton 2007).

Horní části toků bývají obecně převážně heterotrofní a jsou závislé primárně na přísunu hrubého organického materiálu (COPM – coarse organic particulate matter), kterým jsou obohacovány z okolních terestrických společenstev (Anderson and Sedell 1979). Tyto procesy jsou však komplexnější, než předpokládal původní RCC koncept. Zásadní vliv mohou mít například i malá zvýšení koncentrací rozpuštěných limitujících živin vedoucí k prodýchání většího podílu uhlíku (Benstead, Rosemond et al. 2009, Rosemond, Benstead et al. 2015), obdobně jako dříve opomíjené krátkodobé pulsy v podobě povodní a bouřkových průtoků zásadně navyšující celkovou bilanci odnosu jemného detritu FPOM (Wallace, Cuffney et al. 1991, Wallace, Hutchens et al. 2007). Jeho trvanlivější složky se rozpadají do 90 dnů (Wotton 2007).



Obrázek 4 – Zjednodušené schéma vzniku detritu na příkladu potoků a říček (toky 1. - 4. řádu) v povodí šumavské Blanice. Červené šipky ukazují míru přesunu mezi velikostními frakcemi a převažující transport detritu níže po toku (schéma zjednodušeno podle Simon, Fiala et al. 2008).

### Původ detritu v primární říční síti – role a význam helokrénů

Převažující pohled dle RCC předpokládá, že začátek říční sítě typicky tvoří pramen s rychle vyvěrající vodou v celkově živinami chudém prostředí s nízkou biodiverzitou (Vannote, Minshall et al. 1980). Detrit se zde objevuje až postupně vlivem fragmentace větších částic (viz obr. 4). Tím jsou ale přehlíženy komplexní procesy již v samotné pramenné zóně – v prameništích – jak na to poukázali Kubíková, Simon et al. (2012), Flint and McDowell (2015). Zejména semiakvatická prameniště helokrénního typu – nikdy nezamrzající rozptýlené vývěry mírně oteplených vod hlubokého oběhu (Thienemann 1924) – hrají velkou roli. Dle botanické nomenklatury se jedná o pramenné louky, tzv. spring fens (Hajek, Horsak et al. 2006). Tato prostorově málo rozsáhlá stanoviště představují významný prvek z pohledu rozkladných detritových řetězců i primární produkce řas a makrofyty (Ilmonen and Paasivirta 2005).

Teplotní fluktuace jsou zde malé a teplota stoupá v létě výrazněji jen v mikrohabitatech s otevřenou vodní hladinou (Tichá, Simon et al. 2012). S ohledem na svou rozšířenost a intenzivní mikrobiální procesy dané stabilním prostředím i stabilním přísunem živin mohou helokrénní prameniště hrát velkou roli i v měřítku celého systému primární říční sítě. Vliv na utilizaci a cykly živin, transport mobilních partikulí FPOM níže po toku a celkový metabolismus říční sítě nebyl dosud studován (je předmětem článku 3 Tichá, Simon, Houška et al.).

Organická hmota v prameništích je reprezentována detritem různého původu, velikosti i stupně rozkladu (Tichá, Simon et al. 2012). V lesních prameništích porostů s přirozenou skladbou převládá hrubý detrit CPOM pocházející z listového opadu. Naopak v prameništích v otevřené krajině je podle publikovaných údajů hlavním zdrojem listového opadu prameništní bylinná

vegetace (Cushing 1997, Meyer, Strayer et al. 2007). Jen výjimečně je v literatuře zmiňován přínos FPOM samotným vývěrem z podzemí (Iversen, Jensen et al. 1982).

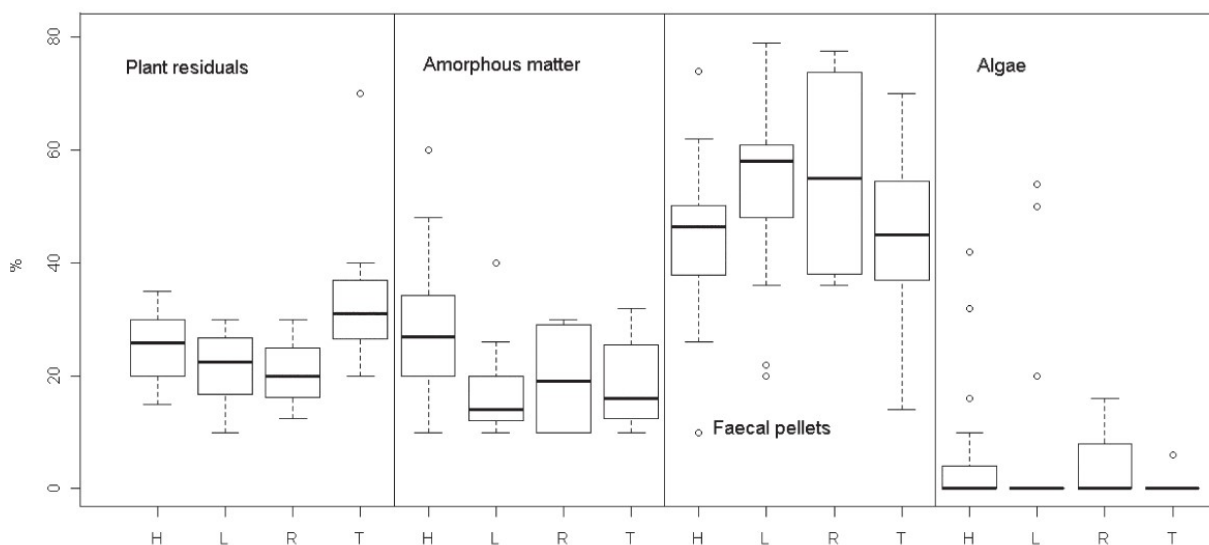
### Prvkové složení a stravitelnost detritu

Pro filtrátory je zásadní také obsah živin v jednotlivých velikostních frakcích detritových částic. Dřevo, opadané listy dřevin, živé listy i ostatní terestrické zdroje obvykle vykazují vyšší C:N nebo C:P poměr než perifyton a FPOM (Sterner 2002). A tento poměr je dále silně závislý na míře mikrobiální kolonizace partikulí (Cross, Wallace et al. 2007). Obecně lze tedy říci, že postupný rozklad organické hmoty v bentických systémech je spojen s výraznými změnami v prvkovém složení částic (Cross, Benstead et al. 2005). Filtrátoři získávají většinu energie z mikrobiálního obalu malých částic FPOM (Nichols and Garling 2000, Newton, Vaughn et al. 2013). Jen malou část energie pak mohou získat z původního základu částice, který je jen obtížně stravitelný. Tato chemicky stabilní složka detritových partikulí je pak exkrecí vyloučena a opakovaně v cyklech využívána až do konečného rozkladu (Mann 1988).

Celkově pak procesy na samém počátku říční sítě představují trvalý zdroj potravy, který živí společenstva místních filtrátorů v prameništích (Gerecke, Cantonati et al. 2011, Kubíková, Simon et al. 2012) a s velkou pravděpodobností poskytuje významný podíl potravních částic i níže položeným společenstvům filtrátorů v tocích vyššího řádu níže po toku (Meyer and Poepperl 2004, Hall, Tank et al. 2016) s příslušnými konsekvencemi pro ochranu biodiversity říčních organismů (Kominoski and Rosemond 2011).

### Detrit a jeho mikroskopicky detekovatelné složky

Informací o biologické nebo mikrobiální charakteristice detritu je na rozdíl od chemických nebo stechiometrických studií dosud jen málo. Souhrnné přehledy pro větší a menší toky podávají Zimmermann-Timm (2002) a Wotton (2007). Speciálně pro případ detritu ze šumavských pramenišť přináší kvalitativní studii práce Tichá, Simon et al. (2012).



**Obrázek 5 – Složení detritu v helokrénech – označeny písmenem H – (v procentech zorného pole) v porovnání s dalšími třemi typy pramenů (mikroskopická analýza 83 trvalých pramenišť v povodí Blanice. H – helokren, L – limnokren, T – prameniště s různými charakteristikami, R – rheokren. Jednotlivé grafy zleva doprava: rostlinné zbytky, amorfni hmota, fekální pelety, řasové buňky (Tichá, Simon et al. 2012).**

Samotná definice detritu je obtížná. Detrit totiž představuje velmi komplexní materiál, jehož základní kostru tvoří křehké vločky mikroorganismů a vysrážených koloidních látek v kombinaci se zbytky rostlinných pletiv (obvykle do velikosti částic 1 mm – tzv. FPOM v hydrobiologické literatuře). Další zásadní složku představují pevné fekální pelety bezobratlých s velkou škálou velikosti a trvanlivosti. Jeho další součástí jsou zejména jílové, v turbulentních tocích i jemné pískové minerální částice. Tato složitá struktura je porostlá mikrobiálním biofilmem, vyskytují se zde živé řasové buňky a široká škála jednobuněčných eukaryot i prokaryot. Podrobné složení hlavních složek v různých typech pramenišť ukazuje obr. 5.

Dále v závislosti na velikosti síta, přes které byl detrit separován, je zde přítomno velké množství meiofauny (bezobratlých organismů s velikostí pod 500  $\mu\text{m}$ ), jako jsou např. adultní korýši lasturnatky (Ostracoda) nebo plazivky (Harpacticoida) a rané instary větších bentických organismů (např. larvy pakomárů, ploštěnky apod.). Detrit tedy představuje komplikovaný svébytný ekosystém v měřítkách mikrosvětla, nikoli homogenní organominerální suspenzi nebo „kal“ rozptýlený ve vodě.

Detrit z šumavských pramenišť helokrénního charakteru detailně analyzovali Tichá, Simon et al. (2012), jeho oživení pak Kubíková, Simon et al. (2011) a Kubíková, Simon et al. (2012). Podstatnou vlastností tohoto materiálu je vysoká komplexnost, variabilita a sezónní změny ve složení, které byly dosud jen minimálně studované – viz článek 3 Tichá, Simon, Houška et al.

### **Mobilita detritu**

Detrit vzniká primárně rozpadem, obohacením a přepracováním rostlinného opadu ve vodním prostředí v oxických podmínkách v místech s dostatkem odumřelé rostlinné hmoty, jako je opad z dřevin nebo makrofytní mokřadní vegetace, v menší míře i z odumřelého dřeva a zbytků živočichů (Graca 2001, Graca, Bärlocher et al. 2005). Jemné vločky detritu s velkým povrchem jsou poté snadno transportovány dále tokem (na rozdíl od hydraulicky stabilnějšího listí nebo dřeva). Jejich pohyb je přerušovaný usazením a resuspendací při zvýšení průtoku nebo vlivem činnosti organismů zvaným bioturbace (Newbold, Thomas et al. 2005). Detrit patří mezi velmi mobilní složku organické hmoty.

Jeho transport může být velmi rychlý i za nízkých vodních stavů. Na jeden skok mezi resuspendací a usazením může detrit urazit vzdálenost řádově stovek metrů. Při vyšších průtocích transportní vzdálenost na jeden skok řádově stoupá (Wallace, Cuffney et al. 1997, Wallace, Hutchens et al. 2007). Schéma na obr. 4 (i při vynechání rozpuštěných látek) ukazuje velkou složitost děje na příkladu horských potoků. Všechny velikostní složky se dočasně či trvale usazují, jsou do toku vnášeny i transportovány, avšak v rozdílné míře a v rozdílných časových intervalech – od sekund (turbulentní procesy, skoky partikulí nade dnem apod.) až po staletí (rozklad a transport velkých kusů mrtvého dřeva – tzv. LWD). To způsobuje velké metodické obtíže pro kvantitativní a bilanční studium odumřelé organické hmoty i v malých tocích a prameništích.

### **Přírodní zdroje detritu využívaného jako potravní partikule perlorodkou říční**

Přírodní zdroje organického potravního detritu mohou být v rozsáhlém areálu výskytu perlorodky pravděpodobně různé. Dobrý růst jedinců na úsecích toků pod jezery (Preston, Keys

et al. 2007, Ostrovsky and Popov 2011, Lavictoire, Moorkens et al. 2015) nabízí jako jednu možnost vznik detritu rozkladem planktonu. V hyporeálu pode dnem může představovat zdroj detritu biofilm na zrnech substrátu (Pasco et al. 2015). V českých podmínkách oligotrofních horských toků jsou jako zdroj detritu, po kterém perlorodky rostou, ověřena ponořená makrofyta (v případě Teplé Vltavy), helokrénní permanentní prameniště a rhizosféra mezotrofních psárkových luk (Blanice, Lužní potok, Zlatý potok) (Hruška 1995, Hruška 2000, Švanyga, Simon et al. 2013). Obdobně jako jsou různé zdroje detritu, je následně velmi pestré i jeho složení (Zimmermann-Timm 2002, Wotton 2007).

### **Zaměření třetího článku**

Řada otázek spojených s metabolismem primární říční sítě je dosud neobjasněná. Zejména roli helokrenních pramenišť bylo věnováno dosud jen málo pozornosti a v řadě studií je tento biotop přehlížen (Kubíková, Simon et al. 2012). Kvantitativní studie dosud zcela chybí. Stejně tak jen minimum studií sledovalo chemické složení detritu primární říční sítě či stabilitu obsahu chemických látek v průběhu roku. Zcela chybí pohled zacílený na velikostní skladbu vloček detritu, která je pro mikrofiltrátory, jako je perlorodka, zásadní. Tuto mezeru v poznání se snaží zaplnit článek 3 Tichá, Simon, Houška et al., který současně doplňuje tradiční RCC koncept o nový aspekt.

Nedostatek poznatků z této oblasti byl částečně daný také technickými obtížemi při vzorkování jemných suspenzí z primární říční sítě, nebo toků střední velikosti. Pro jeho zaplnění byly autorským týmem navrženy, testovány a vyrobeny dva kontinuální sedimentační samplery, z nichž jeden se těší i patentové ochraně. Navrženy byly zvláště pro velmi malé toky prvního a druhého řádu (od průtoku cca 0,01 l) a zvláště pro toky hlubší než 20 cm s rychlostí proudu nad 0,1 m/s (patent 303836 Simon a Douda, datum udělení 10. 4. 2013, užitný vzor 18924 Simon a Douda datum udělení 29. 09. 2008).

### **3.3 Potrava a limitace potravou u perlorodky říční**

#### **Potravní ekologie perlorodky říční**

Jak bylo již výše uvedeno, je známa řada faktorů, které mohou blokovat reprodukci nebo i přežívání adultních jedinců u perlorodky říční (toxické znečištění, eutrofizace, acidifikace, morfologické změny říční sítě apod.). Téměř všechny zbytkové populace v ČR se zachovaly v horních úsecích podhorských toků na horním okraji přirozené niky druhu v místech, kde se tyto faktory neuplatnily. Zde patří mezi hlavní limitující faktory vedle nadměrné eroze a nízké teploty zejména nedostatek dostatečně výživných a na vápník bohatých potravních detritových partikulí. U perlorodky musíme zohlednit potravní ekologii minimálně třech různých fází vývoje (viz obr. 1), z nichž ty nejcitlivější žijí skrytě pode dnem toků. Popsání složité potravní ekologie perlorodky říční tak patrně představuje důležitý klíč k efektivní ochraně druhu.

#### **Potrava juvenilních jedinců**

Literární zdroje se shodují v tom, že potravu dospělců perlorodky říční představují drobné partikule (pod cca 40  $\mu\text{m}$ ), které jedinci filtrují z vody. Dospělci usazení v proudných úsecích oligotrofních toků pasivně filtrují pomocí roztažených plášťových okrajů, mladší jedinci mohou filtrovat aktivně v prostorách pode dnem, nebo zde potravu stírají pomocí svalnaté nohy a řasinek. V typických biotopech se jedná obvykle o detrit o velikosti pod cca 40  $\mu\text{m}$ , nikoli řasové suspenze (Bauer and Wächtler 2001). Potrava juvenilních jedinců v přírodních

podmínkách není v literatuře dosud zpracována. Zkušenosti z chovů ukazují na dobrou využitelnost organického detritu vhodného složení, například z pramenišť, z drenující vody z psárkových luk (Hruška 1995, Hruška 1999, Hruška a kol. 2000), nebo v kombinaci s dalšími jemnými partikulami, jako jsou řasové kultury nebo mikrobiální suspence (Eybe, Thielen et al. 2013). Dosud existují (kromě práce Eybe, Thielen et al., 2013) pouze konferenční příspěvky s touto tematikou. Hledání vazeb mezi skladbou detritu a přírůstkem juvenilních jedinců je jedním z cílů článku 4 Černá, Simon, Bílý et al.

Mnoho autorů využívá k chovu perlorodek polopřirozené systémy, jako jsou boční ramena nebo průtočné systémy napojené na externí zdroj vody (říční, stojatá, pramenná) (Hruška 1999, Vandré, Schmidt et al. 2001, Preston, Keys et al. 2007, Lavictoire, Moorkens et al. 2015). Zde však není možné detailně exaktně stanovit, jaký typ potravy juvenilové přímo využívají.

### **Kvalitativní charakteristiky detritu jako limitní faktor pro rozmnožování perlorodky**

Kvalitativní hodnocení potravy velkých mlžů bylo dosud jenom zřídka předmětem publikovaných prací (Lima, Lima et al. 2012, Newton, Vaughn et al. 2013, Lopes-Lima, Lima et al. 2014), údaje přímo pro perlorodku říční dosud zcela chybí.

Z pohledu nároků perlorodky říční může být limitující buď nedostatečné množství detritu, nebo jeho nevyhovující biochemické složení. V českých podmínkách obvykle nebylo zaznamenáno nedostatečné množství detritu v letní sezóně. Vodní toky v místech posledních výskytů perlorodky jsou obvykle rychle tekoucí, a i při nízkých průtocích je množství nerozpuštěných látek dostatečné (data pro nerozpuštěné látky ve vodě (NL) z větší části lokalit v ČR pořízená VÚV T.G.M. jsou dostupná [na internetových stránkách AOPK ČR](#) pro roky, kdy byl financován monitoring). Koncentrace ve sledovaných lokalitách neklesají pod 2 mg/l.

Problematické je tak zejména chemické složení detritu. Prvním problémem je velký podíl zcela nestrávitelných anorganických látek, jako jsou jílové částice (Reid, Keys et al. 2013, Jones, Grows et al. 2015, Gascho Landis and Stoeckel 2016), vysrážené železo nebo drobné částice písku. Pokud dochází v povodí k významnější erozi, je plavený detrit velmi bohatý na minerální částice a je pro perlorodky nevyužitelný. Ty mohou využít jen organickou složku, a to v závislosti na její výživové hodnotě.

V detritu je dále podstatné zejména zastoupení vápníku v organické podobě využitelné pro perlorodku, která z něho buduje masivní vápenitou schránku (Hruška 1995). Koncentrace vápníku v detritu značně kolísají jak mezi lokalitami, tak mezi velikostními frakcemi. První data tohoto typu využitelná v kontextu potravní ekologie filtrátorů přináší článek 3 Tichá, Simon, Houška et al., kde byla provedena beztlaková separace vložek na velkých sítích, oproti běžně používané vysokotlaké filtraci (Nichols and Garling 2000), která fragilní detritové agregáty rozbíjí. Pro perlorodky je totiž přímo využitelná jen nejmenší velikostní frakce (Bauer and Wächtler 2001), a proto data nezohledňující velikost vložek mají jen sekundární význam.

Další důležitou vlastností detritu, měřitelnou chemicky, je poměr dusíkatých látek (nejčastěji bílkovin) ve srovnání s množstvím uhlíku (převážně nestrávitelné části partikulí) – tzv. poměr C/N. První publikovaná data o C/N poměru pro detritus z pramenišť přináší článek 3 Tichá, Simon, Houška et al. Pro případ říčního detritu jsou pak první data dostupná v článku 4 Černá, Simon, Bílý et al. Podrobnější data o chemismu detritu pro různé mikrohabitaty a různá povodí se zohledněním sezónních a meziročních změn získaná autorským týmem v minulých letech 2010–2016 jsou teprve připravována k publikaci. Publikované údaje o chemických vlastnostech



detritu bez velikostí selekce partikulí (Wetzel 2001, Benstead, Rosemond et al. 2009, Sabater, Artigas et al. 2011) jsou s ohledem na potravní limitaci perlorodky je málo využitelná (Nichols and Garling 2000).

### 3.4 Bioindikace jako metoda hodnocení prostředí na příkladu juvenilních mlžů

#### **Měření fyzikálně-chemických parametrů prostředí, nebo bioindikace?**

Stanovení jednotlivých složek detritu je nákladné a není operativní. Měření chemismu vody bez využití nákladných kontinuálních sond zase podchytí jen okamžitý stav říčního prostředí v době odběru vzorku. Proto se v praxi pro vyhodnocení opatření na zlepšení úživnosti při ochraně perlorodky používá častěji bioindikace juvenilními perlorodkami, zavedená Hruškou (1992b) a Buddensiekem (1995). Ta přímo indikuje, zda detrit přispívá k rychlejšímu růstu nebo zda je naopak pro perlorodky toxický (jako detrity z některých pramenišť), případně mohou z úhynů zpětně detekovat toxické havárie.

Metoda má však ve své laboratorní i terénní variantě řadu limitů a metodických úskalí, jak je pojednáno dále. Její využívání v předchozích fázích záchranného programu perlorodky říční výrazně přispělo k zavedení účinných odchovů a ověřování speciálních revitalizací budovaných s cílem lokálně vytvořit příznivější prostředí pro juvenilní perlorodky.

#### **Princip bioindikací a jeho obecné limity**

Obecným principem různých systémů bioindikací je předpoklad, že výskyt nebo fitness jedinců jednotlivých druhů, vyšších taxonů nebo ekologických skupin odráží stav prostředí. V hydrobiologii se v druhé polovině 20. století rozvinula tzv. evropská bioindikační škola (Zelinka and Marvan 1961, Liebmann 1962, Sládeček 1973), která vypracovala několik saprobiologických bioindikačních systémů, využívaných v praxi např. pro hodnocení míry eutrofizace vodních toků (např. aktuální norma ČSN 75 7716). Tento přístup má však celou řadu kritiků a např. v anglosaském světě se příliš neprosadil (Allan 1995, Allan and Castillo 2007). Výskyt organismů je totiž kromě fyzikálně-chemických podmínek prostředí ovlivněn i mezidruhovými vazbami, bionomií, populačními cykly nebo umístěním v potravním řetězci (MacNeil and Platvoet 2005, Allan and Castillo 2007, Heino, Melo et al. 2014).

Vhodnější je tedy využívat bioindikace v úzkém slova smyslu, kdy z expozice malého vzorku jedinců v daném prostředí usuzujeme, zda zde můžeme očekávat podmínky vhodné pro daný druh organismu. V tomto případě nemusí být na závadu, pokud nevíme, které faktory na daný druh působí. Zejména u dlouhověkých organismů tak můžeme získat kromě míry úmrtnosti i údaje o rychlosti růstu, plodnosti nebo jiných charakteristikách fitness daného druhu. V botanice je např. zavedena metoda přesazovacích pokusů (Grace and Wetzel 1981).

#### **Využití bioindikací pro potřeby ochrany perlorodky říční**

V rámci realizace záchranného programu perlorodky říční (ZP) je využívána bioindikační metoda poprvé vyvinutá v Německu (Buddensiek 1995) za účelem sledování ekologických nároků sladkovodních mlžů. Metoda je založena na přesném změření rychle rostoucích juvenilů na počátku a na konci experimentu. Zjištěný přírůstek se následně vyhodnocuje pro jednotlivé lokality po určitém čase. Prostřednictvím této metody též získáváme údaje o úmrtnosti. Například zvýšená úmrtnost může rychle poukázat na akutní toxicitu prostředí. Metodu dále převzal a opakovaně užíval Hruška (Hruška 1995, Hruška 1999, Hruška and Volf 2003). Vzhledem k vysoké úmrtnosti jedinců těsně po odpadnutí z ryby (kohorta 0+) zavedl Hruška

pro bioindikační testy oproti Buddensiekovi (1995) použití jedinců po ukončení první růstové periody, tedy prožití první zimy (kohorta 1+).

Kritiku využitelnosti bioindikační metody v konkrétních podmínkách bavorských toků a problematiku využití 0+ jedinců publikovali například Schmidt a Vandre (2010), na což reagoval Gum s kolegy upřesněním metodických podmínek, za kterých metoda poskytuje dobré výsledky, a přehledem užití Buddensiekových destiček v dalších evropských státech. Autory zdokumentované užití je však zaměřeno především na odchovy, méně pak na bioindikace (Gum, Lange et al. 2011).

### **Variety bioindikačních testů – *in-situ* versus *ex-situ***

*In-situ* testy jsou prováděny již od průkopnických Buddensiekových prací (Buddensiek 1995) exponováním juvenilních perlorodek přímo ve sledovaném říčním prostředí. Možnost zkrácení doby expozice z typické doby 3-9 měsíců (Hruška 1999, Denic, Taeubert et al. 2015) na jeden letní měsíc při zachování vypovídající hodnoty zavedl Douada, Simon et al. (2012). Současně poukázali na zásadní vztah teploty a rychlosti růstu při vývoji perlorodky říční již dříve dokumentovaný (Hruška 1992a). Křížovou studii srovnávající úspěch přežití první zimy pro populace z povodí Rýna, Labe a Dunaje pracující s 0+ jedinci publikovali Denic, Taeubert et al. (2015). Tato práce poukazuje zejména na závislost růstu i přežívání na vstupní velikosti. Největší přírůstky zde vykazují – nikoli překvapivě – jedinci exponovaní v jediné z testovaných lokalit, kde dosud probíhá i přirozená reprodukce perlorodky.

Pro bioindikaci je také možné využít jiné chovné systémy než Buddensiekovy destičky umožňující individuální vyhodnocení každého jedince. Pro hromadné držení jedinců se používají plastové klíčky s písčitém substrátem (Hruška 1999) nebo síťové válce z nerezového pletiva (Pasco et al. 2015). Většina autorů využívá tyto hromadné systémy umožňující najednou chovat stovky jedinců pouze pro odchov v laboratoři s umělou potravou.

V českém záchranném programu (Švanyga, Simon et al. 2013) byl nedávno zaveden Hruškou navržený odchov juvenilů od věku 0+ přímo v toku v pískových klíčcích v řekách s vhodným složením detritu (např. v Teplé Vltavě, Dort – ústní sdělení). I tyto systémy lze využít k bioindikacím. V článku 4 Černá, Simon, Bílý et al. poprvé prezentují použití většího počtu pískových klíčků po 100 jedincích pro bioindikační vyhodnocení podélného profilu toku. Dále jsou zde také publikovány výsledky z využití desítek klíčků se 100–2000 jedinci pro porovnání podmínek v mikrohabitátech tří lokalit. U všech hromadných systémů je možné pouze souhrnné vyhodnocení průměrného přírůstku.

*Ex-situ* metodu bioindikací zavedl v českém záchranném programu Hruška (Švanyga, Simon et al. 2013) a jiné týmy ji dosud příliš nevyužívají (výjimkou jsou např. testy v chovech prováděné v Lucembursku (Eybe, Thielen et al. 2013)). *Ex-situ* bioindikace jsou metodou přímého hodnocení úživnosti detritu – potravy raných (i adultních) stádií perlorodky říční. Zásadní výhodou této metody je eliminace vlivu teploty, která má dominantní vliv na růst juvenilů i úživnost detritu (Hruška 1992a).

### **Zaměření čtvrtého článku**

Cílem čtvrtého článku Černá, Simon, Bílý et al. je popsat faktory, které ovlivňují přežívání juvenilních jedinců v prostředí podhorské řeky. Rozsáhlá studie pracuje současně ve třech měřítkách. Hodnotí jednak změny v podélném profilu celé řeky a přítoků, dále vyhodnocuje detailně mikrohabitatové podmínky nade dnem a pode dnem na 3 profilech, a nakonec na

jednom profilu studuje diverzitu prostředí pode dnem v různých substrátech a koncentracích kyslíku v hyporeálu. Pro hodnocení prostředí v letech 2014 a 2015 byly použity jak pískové klícky, tak Buddensiekovy destičky (stovky individuálně držených jedinců v destičkách a desítky tisíc hromadně držených juvenilů v klíčkách). Dále byla sbírána data o chemismu vody, chemismu detritu a detailní údaje o teplotě pomocí desítek autonomních záznamových sond. V hyporeálu bylo prováděno přímé měření koncentrace kyslíku a také chemické analýzy sondami přímo z míst expozice zanořených jedinců. Článek tak přináší poprvé komplexní údaje, které propojují výsledky bioindikací (růst jedinců a úmrtnost) s detailními daty o prostředí, včetně jejich sezónní a částečně i diurnální variability. Současné vyhodnocení ve všech třech měřítkách společně s použitím několika bioindikačních metod přináší řadu nových poznatků a umožňuje komplexně zhodnotit biotop kriticky ohroženého druhu. Publikace má i metodický přínos, zejména díky možností srovnání dvou let a řady různých variant bioindikací ve velkém počtu opakování.

### 3.5 Praktické využití poznatků o ekologii juvenilů perlorodky říční pro odchovy a speciální revitalizace v kontextu záchranného programu perlorodky říční

Výše uvedené výsledky základního a aplikovaného výzkumu ekologie perlorodky říční a detritových procesů v primární říční síti mají úzkou vazbu na praktické využití v ochraně přírody. Záchranný program perlorodky říční využívá nebo v budoucnu využije tyto poznatky pro řadu praktických činností. Jedná se první řadě o polopřirozené odchovy juvenilních jedinců s využitím přirozené potravy. Dále jde o navrhování a vyhodnocování efektivity speciálních revitalizací. Významné využití mají prezentovaná data také pro přímou druhovou ochranu perlorodky a ochranu kvality vodního prostředí v příslušných maloplošných a i velkoplošných chráněných územích.

#### **Přehled odchovů velkých mlžů ve světě**

Jedním ze základních nástrojů záchranných programů kriticky ohrožených druhů je přímý odchov v umělých nebo přirozených podmínkách. Odchovy velkých mlžů ze skupiny Unionoida byly vyvinuty a prováděny v severoamerických podmínkách v rámci snahy zlepšit zásobení perleťářského průmyslu (např. Howard 1922). Přehled starších prací k tématu přináší Araujo, Feo et al. (2015). Ve druhé polovině 20. století se rozvíjely spíše komerční chovy ve východní Asii, zaměřené na chov perel (Sicuro 2015). První přehled ochránářsky motivovaných chovů z amerického prostředí s přehledem velikostí přírůstků a úmrtností pro velké mlže přináší Gatenby, Neves et al. (1996).

Odchov řady druhů severoamerických velkých mlžů v separátních cirkulačních systémech navrhl a úspěšně otestoval Barnhart (2006), jiný laboratorní systém s využitím makrofyt popisují Kovitvadhi, Kovitvadhi et al. (2008). Oproti nejrozšířenější metodě odchovu na hostitelských družích ryb byla thajskými autory zavedena metoda in vitro kultivace glochidií některých mlžů s využitím rybí plazmy (Kovitvadhi, Kovitvadhi et al. 2006, Lima, Lima et al. 2012). Základní poznatky o rozmnožování sladkovodních unionidů shrnuje v obsáhlé monografii Strayer (2008).

## Odchovy perlorodky říční v Evropě

V podmínkách střední Evropy se objevily snahy o chov perlorodky již v první polovině 20. století. Obvykle však ztroskotaly na dlouhé generační době druhu a v praxi se omezily na přesazování odrostlých jedinců do náhonů (Dyk 1947).

V devadesátých letech v souvislosti se vzrůstem zájmu o ochranu perlorodky říční Buddensiek (1995) zavedl chov v perforovaných destičkách – primárně však pro bioindikační účely.

Postupy při odchovu tzv. českou metodou polopřirozeného odchovu vyvinul koncem osmdesátých a začátkem devadesátých let J. Hruška se svým týmem. Metoda je založena na přirozeném oplodnění v koloniích, umělé invadaci místních ryb v kontrolované lázni, chovu na rybách, rozkrmení odpadlých juvenilů v prvních letech detritem z pramenišť, dalším chovu v pískových klíčcích v speciálních bočních ramenech s kompostovacím managementem dodávajícím vegetaci vápník a následném vysazení odolných juvenilů do ramen. Paralelně pak probíhá revitalizace povodí zaměřená na odstranění zdrojů znečištění a nadměrné eroze a optimalizaci produkce a transportu potravního detritu (Hruška 2000, Hruška 1991b, Hruška 1992a, Hruška 1992b, Hruška 1999, Švanyga, Simon et al. 2013). Tyto odchovy mají světové prvenství v dosažení reprodukčního věku odchovávaných jedinců ve stáří 15–20 let. V současnosti odchovy probíhají v řadě zemí Evropy (Preston, Keys et al. 2007), novější přehled chovů uvádí Gum, Lange et al. (2011). Ve střední Evropě se nyní úspěšným odchovům věnují kromě ČR týmy v následujících zemích:

- **Sasko** – tým vedený Michalem Langem převzal a modifikoval postupy J. Hrušky, odchovy a vysazování probíhají v povodí Sály včetně potoka Bystřina/Wolfbach na státní hranici ČR/Sasko (Gum, Lange et al. 2011);
- **Rakousko** – tým Blattfisch v povodí Waldaist pod vedením C. Gumpingera odchovává populaci z povodí Dunaje (geneticky je však blízká populacím z povodí Vltavy) (Scheder and Gumpinger 2011, Scheder, Lerchegger et al. 2014);
- **Bavorsko** – F. Elender z Landschaftspflegeverband Passau dlouhodobě realizuje odchovný program s dobrými výsledky. Část jedinců již byla vysazena do řeky Klein Ohe a Wolfstene Ohe. Výsledky dosud nebyly publikovány (ústní sdělení O. Spisar, který odchovné zařízení navštívil v roce 2016).

Výsledky odchovů ve střední Evropě nejsou dostatečně či vůbec publikované. To značně zhoršuje přenos poznatků a vede k opakování chyb.

V českém prostředí Hruška zavedl zimní variantu se zkrácenou délkou odchovu a letní variantu s přirozenou délkou odchovu. Obě využívají krmení pouze detritem z vybraných pramenišť (Švanyga, Simon et al. 2013). V zimním dormantním období mají totiž juvenilové a ryby v přirozených podmínkách jen minimální aktivitu a toto období klidu lze v odchovu výrazně zkrátit úpravou podmínek prostředí. Letní a zimní chov zmiňují na příkladu dvou severoamerických druhů unionidů s kratší dobou dospívání také Jones, Mair et al. (2005).

## Přirozená a umělá potrava perlorodek a dalších unionidů v chovech

Pro skupinu amerických unionidů Nichols a Garling (2000) a Christian, Smith et al. (2004) ověřili přímo v tocích, že ačkoli je zaživací trakt mlžů pravidelně plněn řasovými buňkami, negenerují svou biomasu z řas, ale převážně z bakterií, případně pikoplanktonu. Podobné výsledky z finských jezer pro evropské druhy získali Vuorio, Tarvainen et al. (2007). Naproti tomu Newton, Vaughn et al. (2013) na základě izotopové analýzy získali na geograficky

širokém vzorku mlžů severoamerických řek odlišná data. Jejich studie ukázala, že potrava, kterou mlži využívají ke stavbě své biomasy, byla řasami tvořena přibližně z poloviny.

Je možné, že i u jiných druhů unionidů považovaných za typické filtrátory řasových suspenzí je často přeceňován význam řasové složky v potravě. Pravděpodobně se tak děje i s ohledem na snadnou determinaci některých (nestravitelných) řas a rozsivek v zažívacím traktu mlžů oproti amorfním vločkám detritu nebo mikroskopicky neidentifikovatelným bakteriím.

Detailní studie s využitím izotopů konkrétně pro perlorodku říční dosud chybí. V literatuře se uvádí, že se živí detritem (Bauer and Wächtler 2001), což potvrzují i výsledky z českých úspěšných odchovů krmených pouze detritem (Hruška a kol. 2000) s minimálním podílem řas (viz obr. 5).

V praxi v chovech není nutné vědět, co přesně mlži přijímají a stráví za potravu. Stačí empiricky ověřit, která voda či jiný materiál působí „příznivě na růst“. Mezi prvními, kteří úspěšně testovali zajištění výživy v chovu unionidů pomocí „čerstvé říční vody“, byli Beaty and Neves (2004). Obdobnou metodu s využitím vody z jezera úspěšně používá FBA v Anglii i pro perlorodku Lavictoire, Moorkens et al. (2015).

Pro odchovy unionidů se také podařilo adaptovat a upravit některé akvaristické nebo v mořské aquakultuře běžné postupy s využitím speciálních krmných směsí. Tým vedený R. Nevesem postupně vyvinul a otestoval podmínky odchovu (substrát, cirkulace, krmné řasové směsi apod.) pro řadu druhů amerických ohrožených unionidů. Řada těchto podmínek je však druhově specifická (z vybraných prací například: Gatenby, Parker et al. (1997), O'Beirn, Neves et al. (1998), Jones, Neves et al. (2004), Jones, Mair et al. (2005), Hua and Neves (2007), Liberty, Ostby et al. (2007), Hua, Neves et al. (2013)) a jejich výsledky jsou proto pro odchovy perlorodky říční jen limitovaně využitelné. Na metodu R. Nevese navázalo několik týmů i při odchovu perlorodky říční (Gum, Lange et al. 2011, Eybe, Thielen et al. 2013), případně kombinují akvaristické suspenze s použitím detritu.

Pro další evropský druh perlorodek *Margaritifera auricularia* zavedli systém odchovu s využitím jesetera jako hostitele Araujo, Quirós et al. (2003), Araujo, Feo et al. (2015), Soler, Wantzen et al. (2015).

Studium potravy mikrofiltrátorů, mezi které perlorodka patří, je obtížné. Příjem potravy je navíc velmi komplikovaný. Ke třídění materiálu dochází jak na žábrách, tak v třídícím žaludku. Ne všechny partikule nalezené v zažívacím traktu jsou tedy mlžem využívány k získání energie nebo látek pro stavbu těla (Bauer and Wächtler 2001). Proto je obvykle nutné použít metody, které na základě stabilních izotopů (např. C a N) umožní zjistit, které druhy partikulí jsou skutečně využívány pro stavbu tělesných tkání.

Navíc některé recentní práce popisují zásadní změny v morfologii filtračního aparátu juvenilních perlorodek (Lavictoire, Moorkens et al. 2014) a potvrzují starší domněnky (Hruška 1999) o postupné změně typu potravy v prvních letech života v hyporeálu. Potravní chování juvenilních jedinců v hyporeálové fázi života je velmi málo známé a jeho studium si vyžádá ještě mnoho úsilí.

### **Vysazování a následné přežívání vysazených mlžů**

Publikací hodnotících míru úspěšného etablování vysazených odchovaných mlžů je dosud jen velmi málo. Bolland (2010) se zaměřil na popis lokalit a mikrohabitátů, kam je vhodné

odchované perlorodky vysazovat. Vypouštěné jedince, pokud to jejich velikost umožní, je vhodné označit viditelnými optickými značkami (Araujo, Feo et al. 2015), nebo čipy dálkově detekovatelnými (Hua, Jiao et al. 2015) pro následné snazší dohledávání (v případě PIT značek i pod sedimentem nebo při nízké průhlednosti vody). Přímou pro perlorodku říční žádné údaje o přežívání vysazených jedinců dosud v zahraničí publikovány nebyly. Detailní výsledky vysazování českých odchovů dosud nebyly publikovány, přehled celkového podílu odchovaných jedinců přináší článek 1 Simon, Vaníčková, Bílý et al. 2015. Jednoduchou metodu identifikace subadultů v dlouhodobě se nerozmnožujících populacích pak přináší článek 2 Matasová, Simon, Bílý et al. 2013. Značení vypouštěných jedinců bylo v ČR zkoušeno jen u malého počtu subadultů v osmdesátých letech 20. století pomocí hliníkových značek. Standardní plastové značky se používají v záchranném programu k značení adultních jedinců, se kterými bylo manipulováno např. při transferech nebo odběrech hemolymfy (Švanyga, Simon et al. 2013). V posledních letech byli značeni i subadultní jedinci o velikosti okolo 4 cm vypouštěni po mnohaletém chovu z kontrolní klíčky v NPR Lužní potok v povodí Sály (O. Spisar, ústní sdělení).

### **Odchovné a reprodukční prvky a jejich vliv na potravní zásobení**

Kromě odchovů jsou poznatky o ekologii juvenilů a bioindikační postupy hojně využívány při lokálním zlepšování přírodních podmínek v místech vysazování juvenilních perlorodek z odchovů.

Již v devadesátých letech 20. století bylo experimentálně prokázáno, že určité managementové postupy na stružkách v nivě, či malých potočnických korytech a jejich okolí, zlepšují růst juvenilů pod těmito upravenými místy (Hruška 1991b, Hruška 1992b, Hruška 1995). Navržena byla pomocná boční ramena (tzv. odchovné a reprodukční prvky – ORP), která na malém úseku nově založeného koryta optimalizují podmínky pro juvenilů, zejména s ohledem na potravní zásobení (které je v českých podmínkách limitní) a hydraulicko-morfologické poměry. Mladí jedinci vysazení do tohoto prvku v něm zprvu nacházejí zlepšené podmínky pro svůj vývoj, později pak samostatně migrují do hlavního toku. Příkrmování detritem z pramenišť, realizace ORP, budování potravních stružek a revitalizace povodí patří mezi základní postupy tzv. české metody ochrany perlorodky (Hruška 1992b, Hruška 2000), která umožnila poprvé na světě dovést záchranný program do fáze úspěšného etablování první kohorty subadultů v přirozených podmínkách (Absolon and Hruška 1999, Švanyga, Simon et al. 2013).

### **Opatření na zlepšení zásobení detritem speciálními revitalizacemi v povodí**

Základním postupem české metody záchranného programu perlorodky říční postulovaným Hruškou (1999) je obnova přírodních podmínek v povodí nad místy výskytu do té míry, aby mohla probíhat opět přirozená reprodukce. Na rozdíl od výše popsaných maloplošných zásahů lokalizovaných na přírodních nebo umělých říčních ramenech se tedy jedná o zásahy na velké ploše.

Opatření se zaměřují zejména na zlepšení transportu detritu z míst produkce do míst s výskytem perlorodek a na snížení obsahu minerální složky v detritu pocházející z nadměrné eroze. Důležité jsou také teplotní poměry a zachování vysoké jakosti vody, zejména s ohledem na pufrační schopnost, vodivost a srážlivé formy železa.

Pro zlepšení zásobení detritem jsou realizována napojení pramenišť končících zásakem na primární říční síť (vždy bez zásahu ve vlastní ploše helokrenu), zprůchodnění primární říční sítě přerušené antropogenními zásahy (koleje od těžké techniky, cesty bez propustků) a

budování tzv. potravních stružek (drobných potočních vlásečnic s uměle prodlouženou délkou v místě zbytků mezotrofních luk produkujících potravně vhodný detrit). Zlepšení teplotních poměrů je realizováno obnovou nivních pásů s nízkým zakmeněním v kulturních smrčínách vysazených v minulém století na podmáčených plochách v okolí vodotečí a obecně ochranou sekundárního bezlesí. Drobné vodoteče s mineralizovanými vodami s výrazným srážením železa naopak nejsou napojovány do říční sítě. V celém povodí je podporováno extenzivní (optimálně ekologické) zemědělství a zvyšování poměru listnatých dřevin nad ze zákona povinné podíly. Důležitá je zejména péče o mezofilní louky, které bez seče a přihnojování pevnými hnojivy mají tendenci přecházet v ostřicové porosty (Blažková and Hruška 1999). Přehled opatření uvádí záchranný program (Švanyga, Simon et al. 2013) a jednotlivé plány péče pro konkrétní chráněná území (viz seznam v kapitole níže). Výsledky dosud v převážné většině nebyly publikovány. Výjimku tvoří práce věnované postupům lučního managementu (Blažková a Hruška 1999, Blažková 2010) a dále pak poster srovnávající pomocí bioindikací stanoviště s různým speciálním managementem na podporu tvorby úživného detritu (Švanyga, Simon et al. 2014), který však nepřináší přesvědčivé výsledky.

### **Revitalizační opatření na eliminaci projevů nadměrné eroze, snížení vlivu eutrofizace a negativních změn využití krajiny v ZCHÚ s výskytem perlorodky říční**

Oproti výše popsaným zásahům, které mají zlepšit či navrátit přírodní podmínky do stavu příznivého pro perlorodku, je další skupina opatření zaměřena na eliminaci negativních antropogenních vlivů. Částečně se jedná o opatření obecně využívaná (nebo spíše doporučená), avšak v chráněných územích s výskytem perlorodky říční již byla realizována, a to často ve vzájemné synergii (Wanner, Simon et al. 2012). Jiná opatření zaměřená např. na stabilizaci boční eroze nebo stabilizaci meandrů jsou obecně spíše nevhodná (blokují přirozený vývoj přírodního toku). V chráněných územích je nutné je realizovat z důvodu ochrany posledních zbývajících stabilních kolonií perlorodek tvořených desítkami až stovkami jedinců. V podmínkách stabilních přirozených populací tvořených desetitisíci až miliony jedinců by částečné ztráty způsobené erozí byly běžným jevem.

Příkladem prvního typu opatření (obecně vhodných) je svádění vod z erodujících cestních lesních příkopů do zásakových tůní nebo budování třetích stupňů čištění a bezpečnostních bariér pro případ havárie (nízkozatěžovaných biologických rybníků) pod vesnickými čistírnami odpadních vod (Wanner, Simon et al. 2012). Druhým příkladem opatření potřebných speciálně v chráněných územích s perlorodkou říční jsou oživené haťoštěrkové válce pro stabilizaci boční eroze na přítocích nad koloniemi, anebo stabilizace protiproudých nebo na údolnici kolmých meandrů poskytujících dlouhodobě stabilní podmínky pro kolonie perlorodek.

Přehled typových opatření je obsažen v textu záchranného programu (Švanyga, Simon et al. 2013) a seznamy konkrétních navržených zásahů uvádí plány péče příslušných maloplošných chráněných území:

- Hruška, J., Simon, O., Dort a kol. (2015). Návrh plánu péče pro NPP Zlatý potok. Nepublikovaná zpráva pro CHKO Blanský les. (schvalovací proces + návrh plánu péče)
- Simon, O., Dort, B., Šimek, a kol. (2013). Návrh plánu péče o NPP Horní Malše. Nepublikovaná zpráva pro Jihočeský kraj. 75 s. (vyhlášeno 2014 + platný plán péče)
- Simon, O., Dort, B., a kol. (2013). Návrh plánu péče o EVL Blanice. Nepublikovaná zpráva pro Jihočeský kraj. 35 s. (vyhlášeno 2014 + platný plán péče)
- Simon, O., Kožený, P. a kol. (2010). Návrh plánu péče o NPP Blanice a NPP Prameniště Blanice. Nepublikovaná zpráva pro CHKO Šumava (platný plán péče)

Citace nepublikovaných interních metodik určených pro státní ochranu přírody nejsou v souladu s citačními zvyklostmi uvedeny v seznamu použité literatury, proto je zde uvádíme v rozšířené podobě.

Podrobnější popis opatření s návody pro praktickou ochranu přírody pak podávají 4 certifikované metodiky MŽP (Simon, Černá et al. 2016, Tichá, Simon et al. 2017, Simon, Dort et al. 2016 a Simon, Rambousková et al. 2016).

Dlouhodobé výsledky opatření na zmírnění nebo eliminaci negativních antropogenních vlivů v chráněných územích s výskytem perlorodky říční dosud nebyly až na výjimky (Wanner, Simon et al. 2012) publikovány. Zaměřit se na detailní kvantifikaci efektů těchto opatření je v budoucnu nejvýše žádoucí. Jak poznamenává Brierley a Fryirs (2008), pouze pravidelné vyhodnocování realistických a měřitelných cílů může vést k dlouhodobě úspěšné společnosti akceptované revitalizaci celých povodí.



## 4. Vlastní práce – soubor vědeckých studií

Dizertační práce má charakter souboru prací (viz příloha č. 1–4) – vědeckých studií, jejichž výsledky jsou prezentovány formou publikovaných článků v recenzovaných periodikách. V této disertační práci jsou propojeny doplňujícím komentářem v následující kapitole 5.

### ČLÁNEK 1

**Simon O. P.**, Vaníčková I., Bílý M., Douda K., Patzenhauerová H., Hruška J. and A. Peltanová (2015). "The status of freshwater pearl mussel in the Czech Republic: Several successfully rejuvenated populations but the absence of natural reproduction." *Limnologica* **50**: 11–20. **IF<sub>2015</sub> –1,4 - Q3**

*OPS navrhl studii, analyzoval data s výjimkou molekulárně genetické části, připravil první verzi manuskriptu včetně grafiky obrázků*

První článek shrnuje poznatky o výsledcích posilování populací perlorodky, charakterizuje prostorovou i genetickou strukturu populací a limitní faktory.

### ČLÁNEK 2

Matasová, K., **Simon, O. P.**, Dort, B., Douda, K. and M. Bílý (2013). "Recent distribution of freshwater pearl mussel (*Margaritifera margaritifera*) at historical localities in the upper part of the Vltava river basin (Czech Republic)." *Silva Gabreta* **19**(3): 139–148.

*OPS navrhl studii, shromáždil data, podílel se na psaní manuskriptu*

Druhý článek je klasickou faunistickou studií, která poprvé publikuje standardní data o výskytu a popisuje novou metodu detekce subadultních jedinců bez vyjmutí živočicha ze dna.

### ČLÁNEK 3

Tichá, K., **Simon, O. P.**, Houška, J. and K. Douda. "The reversal of a river continuum at the origin: nutrient-rich fine particulate organic matter exported from helocrene springs." (manuscript, resubmitted **Freshwater Science – Q1**)

*OPS navrhl studii, podílel se významně na terénních pracích, zajistil financování projektu, podílel se vyhodnocení dat a psaní manuskriptu*

Třetí článek se detailně zabývá detritem z pramenišť, který je používán v záchranném programu k odchovu perlorodek. Tato kvantitativní studie dochází také k závěru, že je nutné doplnit klasický koncept říčního kontinua a zdůrazňuje ekologický význam pramenišť pro říční systém.

#### ČLÁNEK 4

Černá, M., **Simon, O. P.**, Bílý, M., Douda, K., Dort, B., Galová, M. and M. Volfová. "Growth and survival of juvenile freshwater pearl mussels: a type of bioindication method, hyporheic oxygen saturation and a locality position within a catchment have an effect." (manuscript – minor revisions **Hydrobiologia Q2**)

*OPS navrhl studii a desin experimentů, podílel se na terénních pracích, analýzách a zpracování dat, zajistil financování a řízení projektu, připravil první verzi manuskriptu včetně grafiky obrázků*

Čtvrtý článek je velmi rozsáhlou studií přežívání a růstu juvenilních perlorodek v říčním prostředí, která pracuje současně v měřítku povodí, habitatů s různým substrátem dna v jednom úseku toku i mikrohabitů v mělkém hyporeálu. Porovnává také nové a klasické metody bioindikací a diskuje možnosti využití výsledků pro vyhodnocení efektivity opatření na ochranu druhu.

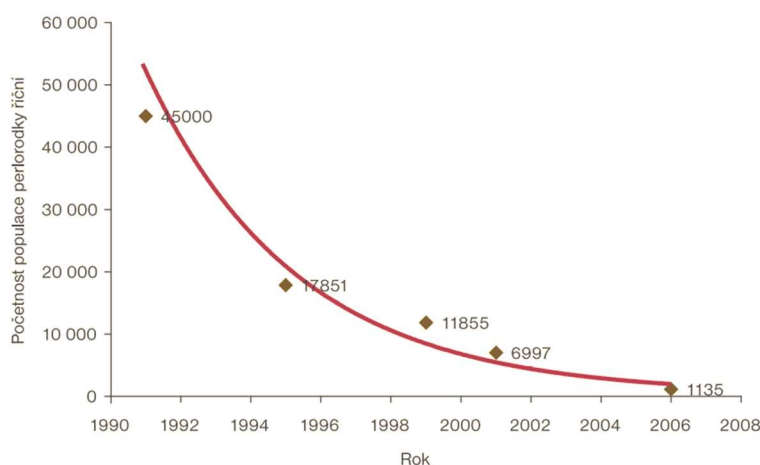
## 5. Diskuse – komentář k vědeckým studiím

V kapitole diskuse jsou kromě souhrnného zhodnocení stavu populace perlorodky říční v ČR zmíněny tři zajímavé aspekty, které vzájemně provazují jednotlivé články dizertační práce a současně přinášejí na tematiku nový pohled. Rozpracována byla následující témata: nové metody vzorkování detritu, využití poznatků pro praktickou ochranu druhu a teoretická otázka interpretace výsledků bioindikačních testů v kontextu ekologie juvenilních stádií perlorodky říční.

### 5.1 Perspektivy lokálních populací perlorodky říční v ČR

Dlouhodobá perspektiva zachování lokálních zbytkových populací v ČR je nejasná. Publikovaných dat o prostorové distribuci, ekologii stanovišť a populační ekologii je dosud velmi málo. Chybí také publikovaná faunistická data, Národní databáze ochrany přírody (NDOP) obsahuje řadu nepřesností. Tuto mezeru částečně zaplnily články 1 Simon, Vaníčková, Bílý et al. 2015 a 2 Matasová, Simon, Dort et al. 2013.

Převládající trendy úbytku populace perlorodky říční v prvních třech čtvrtinách 20. století při své aproximaci naznačovaly brzké lokální vymření druhu. Druh následně vymřel na velké většině svého areálu a početnost oproti polovině 19. století klesla na pod 1 % nebo pravděpodobněji 1 ‰ výchozího stavu. Oproti jiným druhům vodních bezobratlých vázaných na oligotrofní malé a střední toky byl tento pokles početnosti relativně dobře dokumentován (Nowak 1936, Dyk 1947, Dyk and Dyková 1974, Dyk 1992). Vymírání perlorodky na lokalitě Lužní potok s exponenciálním poklesem početnosti bylo využito jako jeden z mála recentních příkladů dokumentovaného poklesu početnosti vodních bezobratlých ve vládní správě o stavu biodiverzity (Miko and Hošek 2009) – viz obr. 6. Aktuální sčítání stanovuje velikost populace na cca 2 000 jedinců (článek 1 Simon, Vaníčková, Bílý et al. 2015).



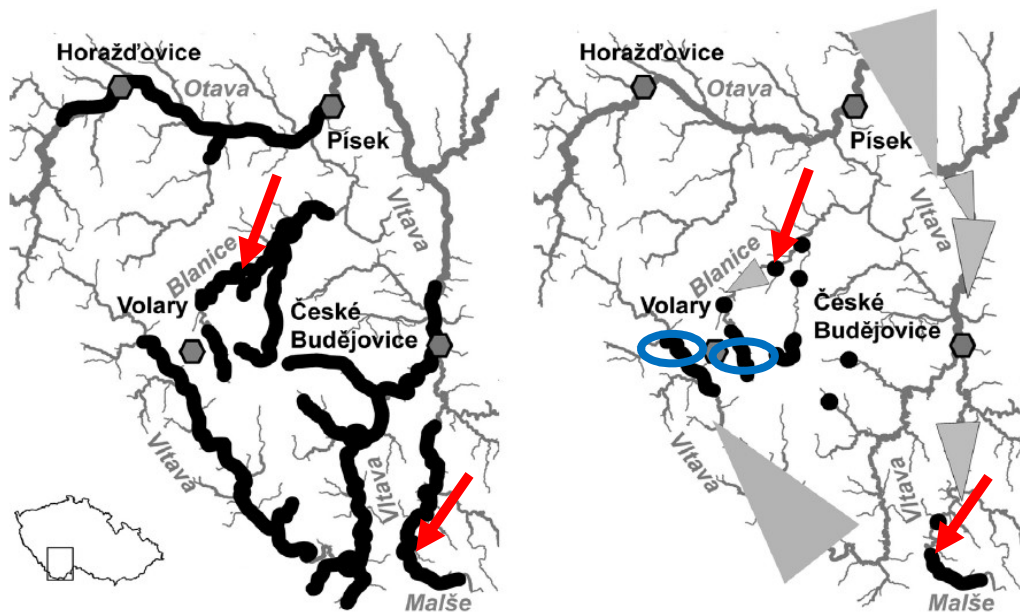
**Obrázek 6 – Prudký pokles početnosti nerozmnožující se populace perlorodky říční v chemicky a troficky nevyhovujících podmínkách Lužního potoka (Ašsko, povodí Sály) – převzato z Miko a Hošek (2009) podle Bílý, Hruška et al. (2008).**

Reprodukce druhu na všech zbytkových lokalitách stagnuje, nebo je přítomna jen v okrajových částech areálu, kde přežívají poslední desítky jedinců (článek 1 Simon, Vaníčková, Bílý et al. 2015). Většina zbytkových lokalit se nachází na horní hranici výškového areálu a současně na tocích nižšího řádu, než představovaly typické lokality druhu (článek 1 Simon, Vaníčková, Bílý et al. 2015).

### Výjimečné případy reprodukce a náhonový efekt ve střední části biotopu

Oba dva doložené případy přirozené reprodukce (náhon Blanice pod Husineckou přehradou a náhon i hlavní tok Malše nad Horním Dvořištěm) byly však nalezeny v mikropopulacích, které jsou lokalizované blíže k optimu původní niky druhu.

Jedná se lokality spíše mezotrofního charakteru s výrazně vyššími teplotami, než panují na typických nerozmnožujících se lokalitách výše proti proudu (šipky na obr. 7). Oproti tomu nejpočetnější kolonie adultních jedinců (ovály na obr. 7), do jejichž okolí je zaměřena většina ochranné péče, se nacházejí již velmi blízko přirozené horní hranice výskytu.



**Obrázek 7 – Původní a současný výskyt perlorodky říční v jižních Čechách. Šipky označují místa s recentně doloženým potvrzeným rozmnožováním malého rozsahu, ovály vyznačují poslední dvě místa s koloniemi nad 100 ks. (upraveno podle článku 1).**

Toto srovnání, společně s některými údaji o populacích v Německu a Rakousku, poukazuje na nutnost komplexnějšího přístupu k ochraně druhu (článek 1 Simon, Vaníčková, Bílý et al. 2015, Csar and Schreder 2008, Gumpinger et al. 2002, Gumpinger, Hauer et al. 2015) se zohledněním přirozeného klimatického a hydrochemického optima druhu (Denic, Tautbert et al. 2015).

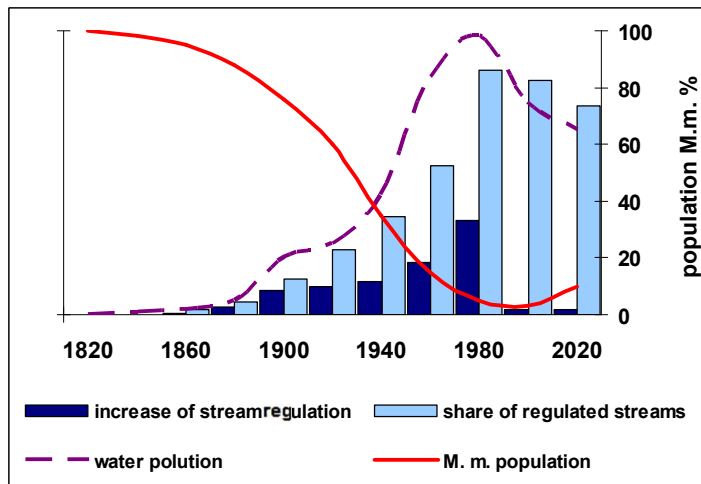
Jiný pohled na tuto problematiku (Hruška 1991b) však poukazuje na možnost, že se pravděpodobně jedná o obecně nevhodný biotop pro druh. Obdobně jako v náhonu Huscherova mlýna v Bavorsku (Spisar – ústní sdělení) nebo náhonu Gießenbach v Rakousku jsou to jen náhradní stanoviště bez dlouhodobé garance stability průtoku a bez oxického hyporeálu. Hrozí zde také vznik podmínek s výskytem toxických forem amoniaku a hromadění toxických iontů z podloží pod kolmatační vrstvou v „příliš stabilním“ korytě bez povodňových disturbancí (Scheder, Lerchegger et al. 2015). Z tohoto pohledu se jedná o neperspektivní polohy. V minulosti sice byly tyto i další náhony hojně osidlovány perlorodkami (tzv. náhonový efekt – Strecker, Bauer et al. (1990)), avšak pro svou hydraulickou a chemickou nestabilitu pravděpodobně trpěly častými extinkcemi a byly závislé na dotaci jedinci z hlavního toku. Potvrzují to malé populace v náhonech na středním toku Malše, Blanice a Zlatého potoka, které byly všechny od počátku 21. století opakovaně postiženy každý minimálně jednou disturbancí (vysycháním, nelegálním vyhrnováním, zanášením jemným sedimentem, legálními rekonstrukcemi spojenými s nutnými záchrannými transfery nebo sesuvy půdy) a původní bohaté populace adultů zanikly nebo vymírají (Švanyga, Simon et al. 2013).

Detailní studium náhonového efektu a drobných okrajových rozmnožujících se populací v eutrofnějších biotopech s využitím komplexního přístupu k fluktuacím biotopu (ve volné vodě i pode dnem) by bylo v budoucnu velmi potřebné, včetně dlouhodobých bioindikací využití kontinuálních sond.

Hydrochemický úhel pohledu (viz článek 4 Černá, Simon, Bílý et al.) považuje níže v říční síti položené lokality za obecně rizikové pro hromadění zdrojů potenciálních havárií výše v povodí a setrvalý nárůst vodivosti a koncentrace dusičnanů. Ředící efekt vodnatějšího toku může být příznivým faktorem pouze u havarijního znečištění biodegradibilními látkami (např. amoniak – viz článek 4 Černá, Simon, Bílý et al., dokladující extinkci na přítoku, avšak přežití v hlavním toku po ředění), nebude však patrně v podmínkách oligotrofních povodí dostačující v případě silně toxických perzistentních xenobiotik. Na řadu látek považovaných za méně toxické pesticidy nebo těžké kovy jsou mlži zejména v juvenilních stádiích velmi citliví (Naimo 1995, Jacobson, Neves et al. 1997, Bringolf, Cope et al. 2007, Gillis, Mitchell et al. 2008, Chandurvelan, Marsden et al. 2012, Clearwater, Wood et al. 2014). Pro odchovy je proto velmi výhodné využívat jako zdroj potravy a vody prameniště s hlubokým oběhem, kde panují stabilní podmínky (článek 3 Tichá, Simon, Houška et al.) a jsou vyloučeny toxické havárie.

### **Ekosystémový přístup k ochraně druhu**

Již v osmdesátých letech 20. století bylo několika autory vyhodnoceno (Dyk and Dyková 1974, Hruška 1985), že trendy vývoje početnosti perlorodky říční v ČR spějí ke kompletnímu vymizení druhu. Ani významné zlepšení jakosti vody v devadesátých letech (Hruška, Kopáček et al. 2000, Oulehle, Hofmeister et al. 2006, Kvitek, Zlabek et al. 2009) tento celkový trend nemohlo zvrátit, protože jiné typy poškození biotopu (regulace a zatrubňování toků, systematické odvodnění, fragmentace biotopu apod.) nevykazují dostatečné zlepšení. Konceptuální schéma na obr. 8 poukazuje i přes určitá dílčí zlepšení na přetrvávání problémů s regulací toků a znečištěním vody.



Obrázek 8 – Konceptuální schéma časové souslednosti relativní početnosti populace perlorodky, znečištění toků a míry míry regulace říčních říčních koryt v 19. a 20. století s prognózou zlepšení početnosti vlivem polopřirozených odchovů (originální schéma O. Simona podle různých autorů).

Záchranný program (Hruška 1985, Hruška 1992b) byl proto od počátku zaměřen primárně právě na lokální a regionální zlepšení podmínek přírodního prostředí tam, kde je to realistické dosáhnout až do úrovně umožnění obnovy přirozené reprodukce. Polopřirozený odchov byl vždy navrhován jen jako dočasné opatření, které nemá význam bez souběžného zlepšení přirozeného biotopu. Tento na svou dobu velmi moderní komplexní ekosystémový přístup je bohužel opakovaně špatně chápán nejen veřejností, ale i zaměstnanci státní ochrany přírody.

Jako strategicky správné rozhodnutí se ukázal striktní důraz na lokality, kde je ekosystémová ochrana reálná. Sem byly koncentrovány limitované prostředky dobrovolné ochrany přírody (záchranný program byl systematictěji financován až od devadesátých let, a i poté stál ve významné míře na dobrovolnické bázi). Naopak, okrajové lokality třetí kategorie v hustěji osídlené krajině (které jsou aktuálně velké míře vymřelé – článek 1 Simon, Vaníčková, Bílý et al. 2015) byly od počátku sledovány pouze okrajově (Absolon and Hruška 1999).

Prioritně se ochrana zaměřila na současnou NPP Blanice s jen minimálním osídlením (připravena k vyhlášení na ploše 64 km<sup>2</sup> v roce 1988) a stabilním vodním režimem dotovaným prameny s hlubokým oběhem (článek 3 Tichá, Simon, Houška et al., Kubíková, Simon et al. 2012). Jak ukazují stávající data o stavu populace, je zde početnost dosud největší (článek 1 Simon, Vaníčková, Bílý et al. 2015, článek 2 Matasová, Simon, Dort et al. 2013) a současně se podařilo úspěšným vynucováním ochranných podmínek v NPP zvrátit eutrofizační trendy (přechod pouze na extenzivní pastvu a lukaření, eliminace vlivu komunálních odpadních vod) a předcházet haváriím z lesního hospodářství např. formou trvalého opatření ČIŽP pro Vojenské lesy a statky v ochranném pásmu NPP (nepublikovaná data O. Simon, plán péče o NPP Blanice a Prameniště Blanice).

Biotop druhu se podařilo tedy alespoň na některých lokalitách stabilizovat a následně výrazně zlepšit v řadě parametrů. Problematické se však ukázaly přeshraniční lokality (PP Horní Maše a NPR Lužní potoka a Bystřina), kde je ochrana povodí dosud nedostatečná. Původní záměr generovat formou přeshraniční spolupráce lidské i finanční zdroje pro ochranu biotopu nebyl

naplněn a povodí mají v řadě parametrů po 30 letech pokusů o aktivní ochranu nevyhovující stav biotopu (článek 1 Simon, Vaníčková, Bílý et al. 2015).

Třetí etapa záchranného programu proto jako prioritní území stanovuje soustavu navazujících povodí Blanice a Zlatého potoka. V souladu s kategorizací lokalit na geneticky podložené ochranné jednotky (článek 1 Simon, Vaníčková, Bílý et al. 2015) a důrazem na ochranu říčních ekosystémů od pramenných oblastí po střední teplejší úseky je zde navržena komplexně pojatá ekosystémová ochrana na větších úsecích říční sítě (Švanyga, Simon et al. 2013).

Jak bylo publikováno v článku 1 Simon, Vaníčková, Bílý et al. 2015, na jedné české lokalitě se již podařilo obnovit polopřirozeným odchovem mladou kohortu o velikosti minimálně stovek jedinců ve věku počínající plodnosti. Na dalších čtyřech lokalitách bylo ověřeno přežívání vysazených jedinců v menších počtech.

### **Perspektivní lokální populace v rámci jednotlivých ochranných jednotek**

Perspektivu zachování alespoň jedné ze tří geneticky definovaných populací lze považovat za velmi pravděpodobnou. Dlouhodobé přežití je nejpravděpodobnější u populace blanické vyskytující se roztroušeně v povodí Horní Vltavy, Blanice nad i pod VD Husinec, ve Zlatém potoce a zbytkově i v přítocích Sázavy viz obr. 7 (článek 1 Simon, Vaníčková, Bílý et al. 2015, článek 4 Černá, Simon, Bílý et al.).

Tzv. saalská populace okrajově zasahující na území ČR horním okrajem areálu je silně ohrožená, má nestabilní biotop v malých potocích (problémy s opakovaným vysycháním Bystřiny a acidifikací kombinovanou s eutrofizací u Lužního potoka) a je závislá zejména na ochraně početnějších lokálních populací na bavorské nebo saské straně hranice – obr. 2 (článek 1 Simon, Vaníčková, Bílý et al. 2015, Švanyga, Simon et al. 2013).

Velmi malá populace malšského genotypu o početnosti jen několika stovek jedinců je na hranici vymření (článek 2 Matasová, Simon, Bílý et al. 2013). Její zachování je možné, pokud bude úspěšná přeshraniční spolupráce ČR a Rakouska (zahájený projekt INTEREG 2017-20) a bude realizován plán péče o rozsáhlou PP Horní Malše, který strategicky zahrnuje jak horské zbytkové populace, tak fragmenty populací na středním toku 50 kilometrů od pramenů. Stav biotopu na části zbytkového areálu je však příznivý i pro nejcitlivější vývojová stadia (článek 4 Černá, Simon, Bílý et al.).

## **5.2 Metodologické problémy sledování FPOM jakožto potravy mikrofiltrátorů**

### **Příčina nedostatku bilančních studií od FPOM: problémy s odběrem reprezentativního vzorku**

Převážně heterotrofní říční síť malých povodí je energeticky zabezpečena rozkladem mrtvé rostlinné hmoty pocházející ve své většině ze suchozemských nebo mokřadních ekosystémů (Wetzel 2001, článek 3 Tichá, Simon, Houška et al.). Sledování procesů při primárním rozkladu listů a jiného stromového opadu je již několik desetiletí věnována velká pozornost, recentně např. Tant, Rosemond et al. (2015), Ferreira and Graça (2016), Ishikawa, Togashi et al. (2016), Jonsson and Stenroth (2016), Solagaistua, Arroita et al. (2016), Raposeiro, Ferreira et al. (2017). Pro sledování rychlosti rozkladu pod vlivem makrozoobentosu, anebo při vyloučení tohoto vlivu, byla vypracována a široce rozšířena metodika „husté a řídké sítě“. Stovky provedených studií ve všech biomech proto umožňují synteticky hodnotit různé aspekty rozkladných procesů

(Graca, Bärlocher et al. 2005). Relativní dostatek dat však máme jen o prvním kroku rozkladného řetězce, kde se hrubý opad (CPOM) mění na jemný mobilní detrit FPOM (viz obr. 4). Tento materiál tvořící potravu celým gildám filtrátorů (např. Wallace, Webster et al. 1977, Wotton, Malmqvist et al. 1998) a zprostředkovávající zásadní část uhlíkového cyklu je však často v oblasti aplikovaného i základního výzkumu přehlížen anebo zjednodušeně pojímán jako „organický partikulovaný uhlík“ nebo „ztráta žíháním“. Jak však ukazuje několik málo prací detailně zaměřených přímo na FPOM (Wotton and Malmqvist 2001, Zimmermann-Timm 2002, článek 3 Tichá, Simon, Houška et al.), jedná se o neobyčejně morfologicky a biologicky složitý materiál v podobě lehkých vloček, kde probíhají intenzivní mikrobiální procesy. Nabízí se zde srovnání s aktivovaným kalem v aktivačním stupni čistíren odpadních vod, či spíše – s ohledem na trofické podmínky – kalovým mrakem využívaným v tzv. pomalých anglických vodárenských filtrech.

Nedostatečné poznání procesů vázaných na FPOM v říční síti je dáno ve významné míře značnými metodickými problémy při jeho vzorkování. Zatímco hrubý opad se obvykle nachází deponovaný na stálém místě, kde ho můžeme jako statický objekt snadno vzorkovat řadou metod (Wetzel 2001, Graca, Bärlocher et al. 2005), tak jemný detrit FPOM je často ve vzhledu ve stálém nerovnoměrném pohybu (Newbold, Thomas et al. 2005). Jak ukazují lokální zkušenosti z ČR, pokud nabereme bodový vzorek vody při základním odtoku, dosahují koncentrace celkových nerozpuštěných látek často hodnot na hranici detekčních metod (pro prvkovou analýzu se pak jedná o zcela nedostačující navážku). Náhodně, nebo i periodicky, pak ale koncentrace FPOM i dalších suspenzí logaritmicky krátkodobě rostou (Wallace, Cuffney et al. 1991). Tedy i velmi časté (kupříkladu každodenní) bodové vzorkování vody není vůbec vhodné pro bilanční kvantitativní sledování. V ČR proto například až na lokální výjimky zcela chybí prostorově, časově a průtokově integrovaná data o koncentraci suspenzí v říční síti. Státní dostupná data o koncentraci nerozpuštěných látek pocházejí buď z vyhodnocení jednoho bodového vzorku v náhodný čas měsíčně, anebo z analyzátorových stanic s jedním konstantním bodem odběru (ročenky ČHMÚ, statistické ročenky MŽP).

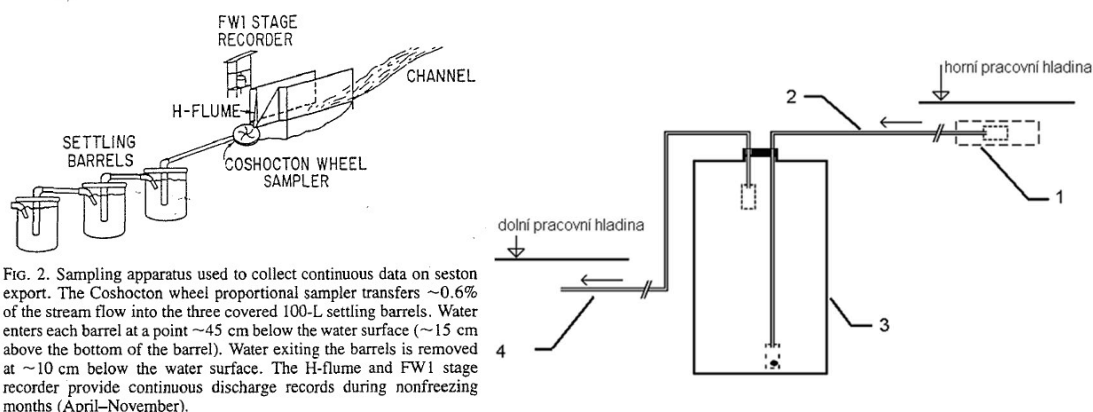
Dosud bylo publikováno jen velmi málo kvantitativních studií na malých tocích bilancujících odnos FPOM v delším časovém intervalu (Cuffney and Wallace 1988, Eggert, Wallace et al. 2012). Pro velké toky je množství informací ještě menší vzhledem k velkým metodickým problémům, jak kvantitativně vzorkovat suspenze v hlubokém heterogenním toku (Beverage and Williams 1990, Lecce 2009). Nutné jsou obvykle velmi nákladné automatické autonomní vzorkovače, které jsou schopné zajistit prostorově integrovaný vzorek. Pro globální přehledy uhlíkových toků je často nutné využívat datové sady, kde je POC (particulated organic carbon, převážně právě FPOM) stanoven pouze nepřesným dopočtem podle dat o rozpuštěném uhlíku DOC (Alvarez-Cobelas, Angeler et al. 2012). První rozsáhlejší studie spiralingu uhlíku v tocích střední velikosti byla publikována teprve nedávno (Hall, Tank et al. 2016). Dále tedy zaměříme pozornost jen na malé a střední toky, kde lze ještě předpokládat homogenní rozptýlení suspenzí v rámci příčného profilu.

### **Metody odběru časově integrovaného vzorku FPOM na malých a středních tocích**

Dostatečně účinný systém pro kvantitativní vzorkování různých suspenzí teoreticky použitelný i v podmínkách šumavských primárních toků popsali Wallace a Cuffney (Cuffney and Wallace 1988, Wallace, Cuffney et al. 1991, Bruce Wallace, Cuffney et al. 1997). Jedná se o kombinaci Coshoctonova rotačního sampleru, který oddělí od proudu celého toku svedeného do žlabu ekvivalentní podíl včetně partikulů do velikosti listů nebo šterku a soustavy tří velkých barelů,



kteřé jsou dostatečné pro odsazení i velmi jemných suspenzí s pomalou dobou sedimentace (autorem označovaných za VFPOM – very fine particulate organic matter). Zařizování se dobře osvědčilo pro toky 1.–3. řádu v horských lesních experimentálních povodích v řídkce osídleném okolí výzkumné stanice Coweta pro studie přirozených i manipulovaných (eliminace makrozoobentosu, eliminace opadu, obohacení živinami) odnosů FPOM z povodí.



**Obrázek 9 – Vzorovací stanice s Coshoctonovým děličem průtoku dle Cuffney a Wallace (1988) a zjednodušené schéma časově integrovaného vzorkovače vlastní konstrukce pro vzorkování FPOM z toků se spádem o hloubce minimálně 4 cm (1 sací koš, 2 přívodní hadička 4 mm, 3 sedimentační průhledná 5 l PET lahev s náplustním košem se zátěží a výtokovým košem se sítí, 4 odpadní hadička 4 mm kde je možné přímo měřit průtok nebo jimat filtrát).**

Výhodou této metody je získání dostatečného množství materiálu pro chemické analýzy, to je však vyváženo velkou cenou, nutností pravidelné obsluhy a údržby a rizikem poškození nebo zcizení částí zařízení. Jímaný FPOM je také „skladován“ v letním období ve výrazně vyšší teplotě, než jaká panuje v toku.

Pro studium detritu, který byl použit jako jediné krmivo pro odchovy v rámci České metody záchranného odchovu (Švanyga, Simon et al. 2013) bylo proto nutné vyvinout vlastní vzorkovací zařízení tak, aby bylo levné a malé (umožnilo použití desítek replikací), zachovalo co nejlépe podmínky toku po dobu vzorkování a současně se dalo použít pro kvantifikaci odnosů.

Kvalitativní studie FPOM vystačí s jednoduchými bodovými vzorky FPOM odebíranými do epruvet nebo nasávanými z depozic v různých mikrohabitátech (Tichá, Simon et al. 2012). V této studii prováděné v povodí Blanice byly rozdíly mezi mikrohabitáty jednoho typu pramenů jen malé a detrit tak měl tendenci vykazovat v rámci jedné lokality spíše homogenní charakter (Tichá, Simon et al. 2012).

Filtrátory typu perlorodky však využívají v adultním a subadultním stádiu pouze detrit aktuálně suspendovaný v proudu. Juvenilní jedinci nebo některé jiné druhy mlžů, například hrachovky *Pisidium cassertanum* a *P. personatum* obývající prameniště a mokřiny (Kubíková, Simon et al. 2011) pak mohou také využívat deponovaný detrit na povrchu dna. Kvantitativní studie v rámci článku 3 Tichá, Simon, Houška et al. se zaměřila na vzorkování suspendovaného (plaveného) detritu a jeho podrobný chemický rozbor po dělení na velikostní frakce.

Vyvinut a testován byl vzorkovač vlastní konstrukce. Zařízení je založené na principu spojených nádob (sací koš musí být výše) a sedimentace částic z protékající vody v nádobě o objemu 5 l, sloužící současně jako výměnná vzorkovnice, schéma viz obr. 9. Při sběru dat pro článek 3 Tichá, Simon, Houška et al. bylo vyrobeno a použito 22 kusů. Podobný princip využil Panno a kolegové pro časově integrovaný sampler využívaný naopak pro filtrované vzorky vody z pramenů (Panno, Krapac et al. 1998). Pro toky, kde není dostatečný spád (bezpečný provoz gravitačního sampleru je při spádu nad 5 cm na metr), byl následně vyvinut podobný sedimentační sampler, kde je proudění zajištěno nálevkovitým ústím se strofoidním zakřivením. Tyto samplery byly použity pro vzorkování suspendovaného FPOM v rámci komplexního sledování biotopu na Teplé Vltavě. V již dokončeném článku 4 Černá, Simon, Bílý et al. jsou prezentována jen vybraná data z deponovaného detritu, data ze suspendovaného detritu byla sbírána i v roce 2016 a jsou dosud zpracovávána. Průběžné výsledky však spolehlivě ukazují nižší zastoupení nestravitelných složek v plavené frakci FPOM oproti detritu deponovanému.

Oba samplery (tlakový i gravitační kontinuální vzorkovač) odebírají časově integrovaný vzorek, který charakterizuje průměrné koncentrace FPOM za dobu vzorkování (1–10 dní). Rychlost průtoku je kontrolována na začátku a konci expozice přímým měřením na odpadní hadičce. Při konstantních podmínkách provozu lze vzorky kvantifikovat, v opačném případě získáme reprezentativní semikvantitativní vzorek. Pro případ ucpaní zařízení nebo prokousání hadiček hlodavci je vhodné standardně používat paralelní expozice alespoň dvou vzorkovačů (článek 3 Tichá, Simon, Houška et al.).

Jak ukázala řada prací, velcí mlži dokáží třídit partikule jak v žaberním aparátu, tak v prvních úsecích zaživacího systému (Baker and Levinton 2003, Beck and Neves 2003, Espinosa, Perrigault et al. 2010, Bucci, Szempruch et al. 2013, Lopes-Lima, Lima et al. 2014). Nevhodné částice vyvrhují jako pseudofekální pelety, anebo projdou střevem bez strávení (Bauer and Wächtler 2001). Vzhledem k tomu, že mikrofiltrátoři jako je perlorodka říční se živí partikulami o velikosti pod cca 50  $\mu\text{m}$  (Bauer and Wächtler 2001), dělili jsme před analýzou detritu na tři velikostní frakce: pod 63  $\mu\text{m}$ , pod 250  $\mu\text{m}$  a pod 1000  $\mu\text{m}$ .

Jak ukázala předchozí kvalitativní mikroskopická studie (Tichá, Simon et al. 2012) a zmiňují i některé publikace (Zimmermann-Timm 2002, Perks, Warburton et al. 2014), je FPOM za běžné situace přítomen v podobě vloček zvaných též agregáty. Z toho důvodu byla zamítnuta možnost filtrovat vzorky podtlakově ve standardní filtrační aparatuře (Nichols and Garling 2000, Christian, Smith et al. 2004). Materiál byl filtrován postupným prokapáváním na velkoplošných sítích s maximální výškou vodního sloupce 40 mm. Pouze poslední frakce byla zfiltrována na GFC filtru o porozitě okolo 0,1  $\mu\text{m}$ . Předsazená síť na sacím koši sampleru eliminovala částice větší než 1 mm. Poměry živin k uhlíku byly v jednotlivých velikostních frakcích rozdílné, a právě nejmenší frakce přímo využitelná perlorodkami měla relativně největší koncentrace N a P v poměru ke koncentraci uhlíku (článek 3 Tichá, Simon, Houška et al.).

To dobře ukazuje potřebnost správného sběru a zpracování vzorků FPOM. V opačném případě bude získaný partikulovaný organický materiál nereprezentativní a jeho C:N a C:P poměry budou významně podhodnocené. To by vedlo k falešným závěrům, že takovýto materiál nemůže z nutričních důvodů postačovat jako potrava pro vývojová stádia perlorodky říční.

### 5.3 Bioindikace juvenilními perlorodkami – metody, interpretace dat a limity použití

Jak bylo rozebráno v literární rešerši, bioindikace mohou často být zavádějící při snaze korelovat biotické indexy s konkrétními fyzikálně-chemickými faktory vodního prostředí. Proto je jejich použití vhodné spíše v užším slova smyslu (analogicky s přesazovacími pokusy), kdy exponujeme vývojová stádia přímo druhu, jehož nároky na prostředí studujeme. I v tomto případě je však nutné klást v experimentech pečlivě formulované otázky a zvažovat, zda zvolený typ bioindikací na ně může dostatečně spolehlivě odpovědět. Bioindikační mikrokosmy vždy jen částečně odpovídají přírodním podmínkám v proudící vodě řeky nebo v jednotlivých mikrostanovištích hyporeálu. Lze předpokládat, že tato podobnost roste v následující řadě: destička volná voda, klíčka volná voda, destička pode dnem, klíčka pode dnem.

Jako základní metoda hodnocení příznivosti testovaného mikrohabitatu je obvykle používána míra úmrtnosti (obsáhlý přehled viz Lavictoire, Moorkens et al. (2015)) a rychlost přírůstku schránky (srovnání více lokalit publikovali dosud pouze Denic, Taeubert et al. (2015)). Výjimku představuje práce Fathallaha, Medhiouba et al. (2010), kteří navrhují jako alternativní metodu sledování dostatečné výživy juvenilních mlžů měřením poměru DNA/RNA a procenta bílkovin v biomase mlžů. Tento postup se však nerozšířil.

#### Destičky a klíčky – růst versus růstový potenciál

Použité metody bioindikace se přirozeným podmínkám pode dnem, kde je předpokládán vývoj juvenilů (Geist and Auerswald 2007) přibližují v řadě rostoucí podobnosti: zasíťovaná komůrka v destičce umístěné ve volné vodě, klíčka plněná tříděným pískem ve volné vodě, analogická destička pode dnem, analogická klíčka pode dnem. Technická náročnost provedení a možnost reálně použít dostatečný počet systémů je pak opačná. Stejně tak roste riziko úhynu všech jedinců, což může vést k rozhodnutí instalace pode dnem nepoužít (Scheder, Lerchegger et al. 2015).

Každá z metod má však určitá další technická a statistická specifika. Klíčky umožňují nasadit velký počet jedinců, ale měření je jen jejich výběr. Současně při větší úmrtnosti se velmi liší počet jedinců na konci pokusu v jedné nádobě. Destičky oproti tomu umožňují individuální držení jedinců, mají však malý počet nasazených jedinců na jeden systém. Čtrnáctidenní až měsíční čištění je nutné u obou variant. Klíčky na příhodných místech mohou sloužit také jako efektivní odchovná metoda (Švanyga, Simon et al. 2013) na rozdíl od destiček, kde dlouhodobé expozice vedly obvykle k vysoké nebo i kompletní úmrtnosti (Lavictoire, Moorkens et al. 2015).

Podívejme se však podrobněji na to, jak věrně systémy držení modelují skutečné prostředí. Buddensiekovy destičky ve volné vodě nejsou limitované kyslíkem, jehož nedostatek v hyporeálu je pravděpodobně hlavním limitem pro přežívání juvenilů např. na námi studované Vltavě. Destičky proto ukazují příznivý vývoj tam, kde v klíčkách nade dnem je již zvýšená úmrtnost a snížený růst (dolní mírně eutrofnější a teplejší lokality Ovesná, Pěkná) a klíčky pode dnem se vyznačovaly 100 % úmrtností (Pěkná) (článek 4 Černá, Simon, Bílý et al.). Destičky tedy ukazují spíše maximální růstový potenciál. Ten se však na reálném stanovišti velmi často nemusí realizovat, např. kvůli nedostatku kyslíku, či nevhodné zrnitosti substrátu.

Pro snadnost instalace a potřebu jen malého množství juvenilů mohou destičky ve volné vodě dobře posloužit při bioindikaci ke sledování toxicity (zejména akutní nebo krátkodobé) a k indikaci příliš studených míst. Limitovanou využitelnost destiček ve volné vodě pro bioindikaci biotopu široce diskutují také Gum, Lange et al. (2011), metodu však německý tým dále používá pro křížové srovnání biotopů v křížových testech (Denic, Taeubert et al. 2015).

Pískové klíčky ve volné vodě lépe modelují mikrohabitat dna. Juvenilové zde mohou aktivně volit polohu na povrchu nebo pod povrchem, případně vybrat na ploše cca 2 dm<sup>2</sup> místo s nejvhodnějším prouděním, koncentrací detritu, kyslíkovými poměry apod. Pravidelné čištění klíček vyvřením jemných partikulí má na jedné straně kompenzovat ucpávání sítěk nárosty a driftem (ve volném dně nejsou analogické bariéry), na druhou stranu však odstraňuje ze substrátu jemné sedimenty, a tak mění podmínky oproti přirozenému stanovišti. Výsledky srovnání klíček čištěných a nečištěných (přechodně je nebylo možné nalézt) ukazují na zásadní zvýšení úmrtnosti v nečištěných klíčcích (Dort 2015, nepublikováno). Je tedy možné se domnívat, že partikule, které proniknou do pískové klíčky síťovinou s velikostí oka okolo 300 μm, v ní rychle sedimentují a dále nejsou resuspendovány. Spiraling partikulí FPOM (Newbold, Thomas et al. 2005, Hall, Tank et al. 2016) je tak narušen. Partikule v reálném toku na řadě mikrostanovišť přechodně sedimentují za překážkami nebo v proudových stínech a mohou být již při malé hydrologické změně proudem opět resuspendovány. Dále k resuspendaci dochází také bioturbací (Bachteram, Mazurek et al. 2005, Martin Osterling, Bergman et al. 2007), která se v klíčce bez makrozoobentosu a ryb neuplatní.

Klíčka se také nachází nade dnem, což brání jejímu převrstvení po dně sunutými sedimenty. Uvnitř je klíčka plněna tříděným hrubým pískem pro ulehčení extrakce juvenilů, což také nemusí odpovídat poměrům v přirozeném habitatu. Růst v pískové klíčce nade dnem je proto také nutné považovat pouze za růstový potenciál, který v reálných habitatech pode dnem nemusí být realizován např. kvůli nedostatku kyslíku. Pokud však je nedostatek kyslíku indukovan vysokou mikrobiální aktivitou biofilmů na zrnech substrátu, může se tento jev projevit na rozdíl od destiček i přímo v klíčce. Podstatná je také možnost pohybu mezi zrny, která vede k omezení až eliminaci nárostů na schránce. Jedinci delší dobu chování bez možnosti prolézat mezi substrátem mohou mít na schránce excesivní nárosty (Simon, Bílý – vlastní nepublikovaná pozorování).

### **Bioindikace pode dnem**

Teprve klíčky nebo destičky umístěné pode dnem, obdobně jako kolmé síťované rourky vyvinuté Bílým a Simonem (2014) (nepublikováno) a také v jiné formě popsané v posteru Pasco et al. (2015), se více blíží podmínkám v mělkém hyporeálu.

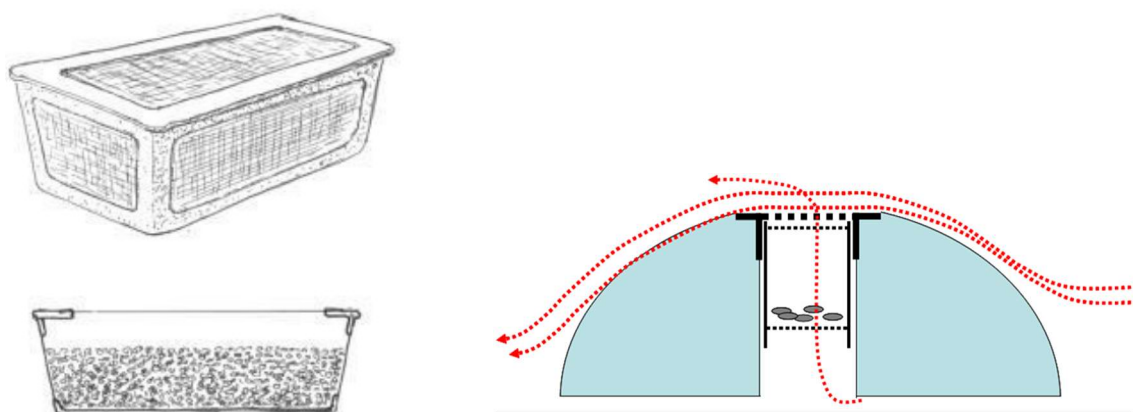
Všechny tyto systémy mohou detekovat problémy se zásobením kyslíkem v hyporeálu (na který jsou mlži přeřinatých stanovišť citliví – Chen, Heath et al. (2001)), i když při jejich instalaci nutně musí dojít k (přechodnému) zvýšení konektivity mezi povrchem dna a hyporeálem. Krátkodobé několikadenní experimenty v tomto případě nejsou vhodné, oproti tomu dlouhodobé expozice destiček a klíček, které nelze pode dnem čistit, mohou vést k ucpání síťových částí a umělému zhoršení kyslíkových poměrů.

Data o přímém měření kyslíku v mikrohabitatu juvenilů jsou dosud vzácná (Sparks and Strayer 1998, Englund, Brunberg et al. 2008, Scheder, Lerchegger et al. 2015), častější je přímé měření redox potenciálu zavedené Geistem (Geist and Auerswald 2007) a používané více týmy v Evropě. Dostupné jsou však dosud převážně jen výsledky v podobě konferenčních příspěvků.

Podstatný příspěvek k poznání zde představuje článek 4 Černá, Simon, Bílý et al. Poprvé jsou zde konfrontovány výsledky bioindikací pode dnem s přímým měřením kyslíku ve vodě z daného mikrostanoviště v různých hloubkách.

Otázkou však zůstává, zda můžeme výsledky bioindikací pode dnem ztotožňovat s přírodními podmínkami v hyporeálu. Buddensiekovy destičky, použité v článku 4 pro jeden měsíc trvající test, vedou ke vzniku dutiny o objemu okolo  $0,5 \text{ cm}^3$  v prostředí písčítých nebo písčito šterkových sedimentů. V jemnějším písku je to jistě nepřirozený otvor, který zde spontánně nemůže vzniknout. Pro směs hrubého písku, kamenů a šterku však není pravděpodobně tato dutina mimořádná. Zásadní rozdíl pro juvenila je však skutečnost, že nemůže měnit polohu ani horizontálně, ani vertikálně. Některým úhynům v destičkách by juvenilové mohli nejspíše předejít včasnou aktivní změnou mikrostanoviště před postupujícími mikroaerobními podmínkami v měřítku centimetrů až decimetrů. Rozdíl mezi expozicí juvenilů v hloubce 3 cm a 13 cm pode dnem v příznivém porézním šterkovém habitatu nebyl statisticky významný (článek 4 Černá, Simon, Bílý et al.). V destičkách také chybí substrát.

Písková klíčka (viz obr. 10a) usazená do dna tím způsobem, že povrch písku v klícce zaplněné do výšky 4 cm a povrch okolního dna je v jedné rovině, dává juvenilovi možnost volit si libovolnou hloubku 0–4 cm a také polohu v rámci plochy cca  $2 \text{ dm}^2$ . Zůstávají však problémy s možným hromaděním FPOM, který nemůže být znovu resuspendován. Tento problém se snaží řešit návrh použití tzv. missourských kamenů („mussel silos“ dle Barnaharta (2008), obr. 10b), kdy vlivem hydraulických jevů nad otvorem zařízení s oblým povrchem dochází k sání a částečnému čištění od usazenin při zvýšení průtoku. Několik prototypů jsme v roce 2016 testovali, avšak hydrologické podmínky pro test byly nepříznivé.



Obrázek 10a – Schéma pískové klíčky se zasíťovanými bočními stranami a víčkem (orig. M. Bílý) a 10b schéma missurského kamenu podle Barnharta (2008).

Oproti klícce ve volné vodě jsou při zanoření do dna jedinci již pod vlivem teploty panující v hyporeálu. Jedna z klíček exponovaných pode dnem v roce 2014 na Teplé Vltavě se vyznačovala výrazně sníženou teplotou (pravděpodobně vlivem upwellingu) a také zásadně nižším růstem (Dort nepublikováno).

Nevýhodou klíček může být stále ještě omezený kontakt s okolní vodou (síťovina pokrývá odhadem 50 % povrchu klíčky) a možnost umělého zhoršení proudění v hyporeálu. Pouze vhodně navržené bioindikace pode dnem mohou dobře popsat reálný růst juvenilů perlorodky říční.

Studie zaměřené na habitatové nároky juvenilů mlžů v hyporeálu jsou obecně dosud velmi řídké (Neves and Widlak 1987, Mummert, Neves et al. 2003, Newton and Bartsch 2007) a žádná z nich se netýká přímo perlorodky říční. Zlepšení poznání v této oblasti je o to potřebnější, že právě ve fázi života pode dnem je často narušen rozmnožovací cyklus druhu (Geist 2010, Reid, Keys et al. 2013, Gumpinger, Hauer et al. 2015)

Prostředí hyporeálu je obtížné pro studium pro svou fyzickou nepřístupnost, mechanickou odolnost, výraznou variabilitu a trojrozměrný charakter (Brunke and Gonser 1997, Braun, Auerswald et al. 2012). Existuje zde sice několik zavedených metod například vytrhávání vymraženého kóru (Dahm, H. et al. 2007), ale počet studií z tohoto prostředí je ve srovnání s pracemi popisujícími povrch dna nebo prostředí proudící vody jen velmi malý. Pokud má být snažení o detailní zmapování kritické fáze života juvenilů perlorodky říční úspěšné, je nutné hojněji využívat bioindikace realizované přímo v hyporeálu, spojené s přímým měřením kritických parametrů prostředí. Článek 4 Černá, Simon, Bílý et al. tak představuje velmi potřebnou primární studii této problematiky.

## 6. Přínos práce a závěrečné shrnutí

Disertační práce se zaměřila na 3 hlavní tématické okruhy: sumarizaci stavu populace v ČR zejména s ohledem na přirozené rozmnožování a výsledky posilování pomocí odchovů, dále na otázku potravy juvenilních jedinců na příkladu detritu z pramenišť a v rozsáhlé sérii bioindikačních experimentů pak byly hledány limitující faktory při terénních expozicích. Dva z článků tvořící disertační práci již byly publikovány a další dva jsou v recenzním řízení.

Stav populace perlorodky říční v ČR je typickou ukázkou rychlého mizení druhu citlivého na čistotu vody ve 20. a 21. století. V povodí Vltavy byly indentifikovány dvě geneticky odlišné populace, další pak byla nalezena v okrajových částech povodí Sály zasahujících na Ašsko. Rozmnožování druhu v ČR s malými výjimkami stagnuje od 70. let. Malé a izolované populace se nacházejí obvykle na horní hranici svého přirozeného areálu v polohách limitovaných nízkou teplotou a nedostatkem potravních partikulí. Získané poznatky byly využity při realizaci záchranného programu perlorodky říční a zlepšily rozsah znalostí o areálu a ekologii druhu.

Zásadní limit pro perlorodku říční v povodí Vltavy představuje nevhodné složené potravních suspenzí. Studovány byly přímo pomocí sedimentačních samplerů i nepřímou s využitím metod bioindikace. Pomocí kontinuálních sedimentačních samplerů DDG vlastní konstrukce se podařilo popsat sezónní bilanci v produkci detritu z pramenišť. Trofická hodnota sledovaného detritu frakce FPOM je vysoká a materiál nemohl být jednoduše odvozen z opadu nadzemní vegetace v okolí s nižším poměrem C-N a C-P. Na jeho vzniku se patrně podílela zejména mikrobiální společenstva v oxické i anoxické zóně helokrénních pramenišť. Podobně komplikované jsou procesy vzniku detritu v říčních biotopech s velkým podílem ponořených makrofyt. Výrazný pokles koncentrací rozpuštěného dusičnanového dusíku (a méně výrazný i

v případě dalších živin) mezi vývěrem a odtokem z helokrenu svědčí pro transformaci živin z rozpuštěné frakce do frakce partikulované.

Prokázaná schopnost mnoha sledovaných pramenišť účinně snižovat množství živin ve vodě již na samém začátku říční sítě si vyžaduje další detailní výzkum. Nejde pouze o doplnění dalšího rozměru do konceptu říčního kontinua (což bylo vyzdviženo v článku 3 Tichá, Simon, Houška et al.) ale jedná se o poznatek přímo využitelný při managementu povodí. Pramenné oblasti zbavené při systematickém odvodění helokrénních pramenišť mohou být jejich obnovou pravděpodobně účinně zbaveny části živin v rozpuštěné formě. Využití je možné jak v chráněných územích, tak zejména ve vodárenských povodích.

Výsledky bioindikačních experimentů pomocí juvenilních perlorodek se liší podle použité metody. Bioindikace v destičkách s individuálním držením jedinců detekovaly nejlepší růst ve spodní části toku, oproti tomu přesnější dosud nepoužívaná metoda pískových klíček spíše ukazovala na lepší růst ve střední části podélného profilu. Rozdíl je patrně způsoben tím, že bioindikační systémy, které nejsou umístěny přímo pod dno, nemohou reagovat na problémy s kyslíkovým režimem v hyporeálu. Přírůstek v komplexnějších bioindikačních systémech s hromadným držením mezi roky méně kolísal a dosahoval ve střední části povodí až 150 % za 3 měsíce.

Mikrohabitatová studie lokalizovaná přímo v mělkém hyporeálu potvrdila výrazný pokles růstu i přežívání při poklesu koncentrace kyslíku pod běžné kolísání (zejména v jemném substrátu). Kyslíkový režim tak patří mezi hlavní potvrzené faktory ovlivňující růst a přežívání mladých mlžů. Další důležitý již dříve popsany faktor je průměrná roční teplota. Obsah organické hmoty, celkového fosforu a vápníku v detritu ve vzorcích z říčního toku oproti vstupní hypotéze neukázal jasnou korelaci s růstem v bioindikačních systémech. Publikované výsledky přinesly první komplexní soubor dat o přežívání a růstu juvenilních perlorodek o stáří 1 a 2 roky současně v různých mikrohabitatech a rozšířily tak poznatky o ekologii druhu v kritické fázi rozmnožovacího cyklu. Bioindikační experimenty lze při správné interpretaci výsledků také dobře využít pro praktické potřeby při ochraně biotopu perlorodky říční.

## 7. Summary

The pearl mussel has been considered a disappearing mollusc worldwide. This species, like other freshwater invertebrates, is strongly affected by anthropogenic changes in catchments and by water pollution. The pearl mussel life cycle is complicated, include a parasitic stage in fish, and benthic, plankton and hyporheic phases under the river bottom. This species has had significant problems with reproduction for more than 50 years in central Europe. The pearl mussel has failed in reproduction for a long time in the most remaining Czech localities and all populations are overaged. The Breeding cycle is interrupt mainly during the hyporheic phase of life, which is 10–20 years long, and animal is detritivorous.

This doctoral thesis has three main topics. The first of them is to **summarise the status of the population in the Czech Republic**, focusing mainly on natural reproduction capabilities and results of artificial breeding. The second topic is **young mussel nourishment, especially by detritus from spring areas**. The last topic is *in situ* **bio-indication experiments searching limiting factors for juvenile mussels**. Two papers creating the thesis were published and another two are in the review process.

The Czech pearl mussel population status is a typical example of a species that has been disappearing rapidly in the 20<sup>th</sup> and 21<sup>st</sup> century because it is sensitive to water quality. Two different populations were identified in the Vltava catchment by genetic methods, another in the Saale catchment margins, which occur in the Ašsko region. Reproduction of the species has been stagnant since the 1970's, with only a few exceptions. Small and isolated local populations limited by low temperature and a deficit of food particles usually occur near the upper border of their natural area. Therefore, the strategy of pearl mussel conservation in the Czech Republic has focused on well-preserved localities and they were established as Sites of Community Importance (SCI).

With the aim to improve the age profile of the population, older juveniles were released. The juveniles survived successfully in all localities. Information describing the species recent occurrence in South Bohemia was published. Analogous to the Czech Republic, the population status is similar in Saxony, Bavaria and Austria, where the species has been disappearing rapidly and the area of its occurrence is fragmented. The evaluation of released juvenile survival after a longer period of time is needed in further studies.

The fundamental limit for pearl mussel has been the unsuitable composition of food suspension in the Vltava catchment. Detritus (fine particulate organic matter, FPOM) was studied directly by sedimentation samplers and indirectly by using bio-indication methods. Using sedimentation samplers DDG (working at the principle of communicating vessels), seasonal changes in the production of spring wetland generated FPOM were studied. From the methodological point of view, due to low cost samplers it was possible to use two reserve devices positioned serially. Production of detritus reached 3mg per litre on average. Even in the Blanice catchment, with 100 springs per hectare, it is considered to be a significant amount of matter. Further research should focus on the downstream transport of detritus in basic flow conditions, as well as on flow pulses caused by flash floods or medium-term changes in flow rate. Only this approach can give the answer to the question of which amount of detritus from spring areas is able to feed the pearl mussel colonies that are dozens of kilometres away.



Studied FPOM has the high-quality trophic value. It is not likely that it could be derived from local terrestrial leaf litter, which has a lower C-N and C-P relation. This FPOM was probably created by the involvement of microbial communities both in the oxic or anoxic zone of helocrene springs. Concentration of dissolved nitride nitrogen considerably decreased (not so considerable in other nutrients) between helocrene source and outflow. It is an evidence that nutrients were transformed from solute to particulate form. The processes of detritus production in riverine biotopes with a high proportion of submerged macrophytes are similarly complicated.

Bio-indication method using juvenile pearl mussel directly in the river channel is applicable for study of pearl mussel ecology. However, the results of experiments differ according to the method used. In mesh cages with individual holding of juveniles in free-floating water conditions, the best growth and a good survival rate were identified in lower reaches of the experimental river stretch. In contrast, sandy cages demonstrated better rate of growth in the middle reaches, yet a higher rate of mortality in the lower reaches. The differences arose from the fact that the bio-indication system, which is not localised under the bottom surface, does not respond to the problematic bottom sediment oxygenation. The growth gain in more complex sandy systems fluctuated less between years and it has been 150% per three-month exposition in the middle reaches.

The microhabitat experimental study which was localised directly in shallow hyporeal has confirmed a significant decrease in grow rate and survival in the case of decreasing oxygen levels below the common fluctuations, especially in soft sediments. Bottom oxygenation is therefore one of the main confirmed factors influencing the growth rate and survival of juvenile mussels. The other main factor is temperature, as was described by earlier authors. Further studies are needed concentrating on the hyporeal environment in order to describe pearl mussel autecology in detail.

Municipal sewage waters have been causing problems with pearl mussel occurrence in some parts of protected areas. In spite of only once monthly periodicity of sampling, some episodic pollution of one of the Vltava river inflows was described. The concentration of  $\text{NH}_4^+$  spiked above 1.2 mg per litre and caused total mortality in exposed cages. In contrast, other 100% mortalities in lower reaches of the experimental river main channel have remained unclarified.

In contrast to an input hypothesis, neither growth nor survival showed any clear correlation with organic matter, total phosphorus and calcium in detritus occurring in the main localities. Detailed laboratory experiments in constant temperature and a wide range of chemical composition of FPOM are needed.

The ecosystem-oriented pearl mussel conservation in the Czech Republic seems to be a useful concept for the future. The new findings described in this thesis can help to improve the pearl mussel conservation action plan and can add another piece of knowledge which is important for the protection of the ecosystem of mountain oligotrophic rivers.

## 8. Použitá literatura

- Absolon, K. and J. Hruška (1999). Perlorodka říční (*Margaritifera margaritifera* Linnaeus, 1758) v České republice. Praha: 1-27.
- Allan, J. D. (1995). Stream ecology. Structure and function of running waters. Dordrecht, Netherlands, Kluwer Academic Publishers.
- Allan, J. D. and M. M. Castillo (2007). Stream ecology: Structure and function of running waters: Second edition.
- Altmüller, R. and R. Dettmer (2006). "Successful species protection measures for the freshwater pearl mussel (*Margaritifera margaritifera*) through the reduction of unnaturally high loading of silt and sand in running waters." Inform. D. Naturschutz Niedersachs **26**(4): 192-204.
- Alvarez-Cobelas, M., D. G. Angeler, S. Sánchez-Carrillo and G. Almendros (2012). "A worldwide view of organic carbon export from catchments." Biogeochemistry **107**(1-3): 275-293.
- Anderson, N. H. and J. R. Sedell (1979). "Detritus processing by macroinvertebrates in stream ecosystems." Annual Review of Entomology **24**: 351-377.
- Araujo, R. and M. A. Ramos (2000). "Status and conservation of the giant European freshwater pearl mussel (*Margaritifera auricularia*) (Spengler, 1793) (Bivalvia : Unionoidea)." Biological Conservation **96**(2): 233-239.
- Araujo, R. and M. A. Ramos (2001). "Action plan for *Margaritifera margaritifera* in Europe." Nature Environ **117**: 29-66.
- Araujo, R., C. Feo, Q. Pou and M. Campos (2015). "Conservation of two endangered European Freshwater mussels (Bivalvia: Unionidae): A three-year, semi-natural breeding experiment." Nautilus **129**(3): 126-135.
- Araujo, R., M. Quirós and M. A. Ramos (2003). "Laboratory propagation and culture of juveniles of the endangered freshwater mussel *Margaritifera auricularia* (Spengler, 1793)." Journal of Conchology **38**(1): 53-60.
- Araujo, R., S. Schneider, K. J. Roe, D. Erpenbeck and A. Machordom (2016). "The origin and phylogeny of Margaritiferidae (Bivalvia, Unionoidea): A synthesis of molecular and fossil data." Zoologica Scripta.
- Bachteram, A. M., K. A. Mazurek and J. J. H. Ciborowski (2005). "Sediment suspension by burrowing mayflies (*Hexagenia* spp., Ephemeroptera: Ephemeridae)." Journal of Great Lakes Research **31**(SUPPL. 2): 208-222.
- Baker, S. M. and J. S. Levinton (2003). "Selective feeding by three native North American freshwater mussels implies food competition with zebra mussels." Hydrobiologia **505**(1-3): 97-105.
- Barnhart, M. C. (2006). "Buckets of muckets: A compact system for rearing juvenile freshwater mussels." Aquaculture **254**(1-4): 227-233.
- Barnhart, M. C. (2008). "Methods for laboratory culture and field caging of freshwater mussels." Unpublished material Biology Dep., Missouri State University, Springfield, MO USA ([unionid.missouristate.edu/.../poster\\_for\\_Frankie.ppt](http://unionid.missouristate.edu/.../poster_for_Frankie.ppt))
- Bauer, G. (1988). "Threats to the freshwater pearl mussel *Margaritifera margaritifera* L. in central Europe." Biological Conservation **45**(4): 239.
- Bauer, G. and K. Wächtler (2001). "Ecology and Evolution of the freshwater Mussels Unionida." Ecological Studies **145**: 1-394.
- Beaty, B. B. and R. J. Neves (2004). "Use of a natural river water flow-through culture system for rearing juvenile freshwater mussels (Bivalvia: Unionidae) and evaluation of the effects of substrate size, temperature, and stocking density." American Malacological Bulletin **19**(1-2): 15-23.
- Beck, K. and R. J. Neves (2003). "An evaluation of selective feeding by three age-groups of the rainbow mussel *Villosa iris*." North American Journal of Aquaculture **65**(3): 203-209.
- Benstead, J. P., A. D. Rosemond, W. F. Cross, J. Wallace, S. L. Eggert, K. Suberkropp, V. Gulis, J. L. Greenwood and C. J. Tant (2009). "Nutrient enrichment alters storage and fluxes of detritus in a headwater stream ecosystem." Ecology **90**(9): 2556-2566.
- Beverage, J. P. and D. T. Williams (1990). "Comparison. US P-61 and Delft sediment samplers." Journal of Hydraulic Engineering **115**(12): 1702-1706.
- Bílý M., J. Hruška, O. Simon, Š. Hřebík, D. Jäger, P. Horký, M. Rulík and J. Křivánek (2008). Effects of Environmental Factors on the Freshwater Pearl Mussel Population in the National Nature Monument "Lužní Potok". VUV T.G.M., Praha. 110 p
- Blažková D. (2010). "Společenstva s ostřicí třeslicovitou (*Carex brizoides*) a jejich sukcese - Communities with *Carex brizoides* and their succession." Silva Gabreta **16**(1): 13-25.
- Blažková D. and J. Hruška (1999). "Vegetace lad s ostřicí třeslicovitou (*Carex brizoides*) v souvislosti s obnovením ekosystémů oligotrofních povodí s perlorodkou říční (*Margaritifera margaritifera*)." Příroda **15**: 7-24.
- Bolland, J. B. (2010). "A protocol for stocking hatchery reared freshwater pearl mussel *Margaritifera margaritifera*." Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems **20**: 695-704.
- Bolotov, I. N., I. V. Vikhrev, Y. V. Bepalaya, M. Y. Gofarov, A. V. Kondakov, E. S. Konopleva, N. N. Bolotov and A. A. Lyubas (2016). "Multi-locus fossil-calibrated phylogeny, biogeography and a subgeneric revision of the Margaritiferidae (Mollusca: Bivalvia: Unionoidea)." Molecular Phylogenetics and Evolution **103**: 104-121.
- Braun, A., K. Auerwald and J. Geist (2012). "Drivers and Spatio-Temporal Extent of Hyporheic Patch Variation: Implications for Sampling." Plos One **7**(7).
- Brierley, G. J. and K. A. Fryirs (2008). River futures: an integrative scientific approach to river repair. Washinkton, Society for ecological restoration international -Island Press.

- Bringolf, R. B., W. G. Cope, C. B. Eads, P. R. Lazaro, M. C. Barnhart and D. Shea (2007). "Acute and chronic toxicity of technical-grade pesticides to glochidia and juveniles of freshwater mussels (Unionidae)." Environmental Toxicology and Chemistry **26**(10): 2086-2093.
- Bruce Wallace, J., T. F. Cuffney, S. L. Eggert and M. R. Whiles (1997). "Stream organic matter inputs, storage, and export for Satellite Branch at Coweeta Hydrologic Laboratory, North Carolina, USA." Journal of the North American Benthological Society **16**(1): 67-74.
- Brunke, M. and T. Gonser (1997). "The ecological significance of exchange processes between rivers and groundwater." Freshwater Biology **37**(1): 1-33.
- Bucci, J. P., A. J. Szempruch and J. F. Levine (2013). "A stable isotope tracer ( $\gamma^{13}\text{C}$ ) study of escherichia coli retention in two freshwater bivalves (*Corbicula fluminea* and *Elliptio complanata*) (Corbiculidae and Unionidae)." American Malacological Bulletin **31**(2): 281-288.
- Buddensiek, V. (1995). "The culture of juvenile freshwater pearl mussels *Margaritifera margaritifera* L. in cages: A contribution to conservation programmes and the knowledge of habitat requirements." Biological Conservation **74**(1): 33-40.
- Chandurvelan, R., I. D. Marsden, S. Gaw and C. N. Glover (2012). "Impairment of green-lipped mussel (*Perna canaliculus*) physiology by waterborne cadmium: Relationship to tissue bioaccumulation and effect of exposure duration." Aquatic Toxicology **124**: 114-124.
- Chen, L. Y., A. G. Heath and R. J. Neves (2001). "Comparison of oxygen consumption in freshwater mussels (Unionidae) from different habitats during declining dissolved oxygen concentration." Hydrobiologia **450**: 209-214.
- Christian, A. D., B. N. Smith, D. J. Berg, J. C. Smoot and R. H. Findlay (2004). "Trophic position and potential food sources of 2 species of unionid bivalves (Mollusca:Unionidae) in 2 small Ohio streams." Journal of the North American Benthological Society **23**(1): 101-113.
- Clearwater, S. J., S. A. Wood, N. R. Phillips, S. M. Parkyn, R. Van Ginkel and K. J. Thompson (2014). "Toxicity thresholds for juvenile freshwater mussels *Echyridella menziesii* and crayfish *Paranephrops planifrons*, after acute or chronic exposure to *Microcystis* sp." Environmental Toxicology **29**(5): 487-502.
- Cross, W. F., J. B. Wallace and A. D. Rosemond (2007). "Nutrient enrichment reduces constraints on material flows in a detritus-based food web." Ecology **88**(10): 2563-2575.
- Cross, W. F., J. P. Benstead, P. C. Frost and S. A. Thomas (2005). "Ecological stoichiometry in freshwater benthic systems: Recent progress and perspectives." Freshwater Biology **50**(11): 1895-1912.
- Csar, D. and C. Schreder, Gumpinger, K. (2008). The freshwater pearl mussel in Austria - current status and prospects for the future.
- Cuffney, T. F. and J. B. Wallace (1988). "Particulate organic matter export from three headwater streams: discrete versus continuous measurements." Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences **45**(11): 2010-2016.
- Cushing, C. E. (1997). "Organic matter dynamics in Rattlesnake Springs, Washington, USA." Journal of the North American Benthological Society **16**(1): 39-43.
- Cushing, C. E., G. W. Minshall and J. D. Newbold (1993). "Transport dynamics of fine particulate organic matter in two Idaho streams." Limnology & Oceanography **38**(6): 1101-1115.
- Dahm, C. N., M. V. H., C. V. Baxter and W. W. Woessner (2007). Hyporheic Zones. Methods in Stream Ecology: 119-142.
- Denic, M., J. E. Taeubert, M. Lange, F. Thielen, C. Scheder, C. Gumpinger and J. Geist (2015b). "Influence of stock origin and environmental conditions on the survival and growth of juvenile freshwater pearl mussels (*Margaritifera margaritifera*) in a cross-exposure experiment." Limnologica **50**: 67-74.
- Douda, K., O. P. Simon, B. Dort, and J. Švanyga (2012). The relative importance of temperature and food to juvenile growth of *Margaritifera margaritifera* in its natural habitat. In Teixeira, A., Lopes-Lima, M., Varandas, S. (Eds.): International Meeting of Biology and Conservation of Freshwater Bivalves Braganca, Portugal, 4th-7th September 2012, Book of Abstracts Polytechnic Institute of Braganca. Braganca 102 p. (poster)
- Dyk, V. (1947). České perly (život, ochrana a národohospodářský význam perlorodek). Praha, Jos.R. Vilímek.
- Dyk, V. (1992). "Profilová odřezovátele lokalit perlorodky říční." Erica, Plzeň **1**: 21-38.
- Dyk, V. and S. Dyková (1974). "The pearl oyster (*Margaritifera margaritifera* Linnaeus 1758) a neglected indicator of the pollution of mountain and submountain water flows of the crystalline region in Czechoslovakia." Acta veterinaria **43**: 287-304.
- Eggert, S. L., J. B. Wallace, J. L. Meyer and J. R. Webster (2012). "Storage and export of organic matter in a headwater stream: responses to long-term detrital manipulations." Ecosphere **3**(9): 1-25.
- Englund, D., A. Brunberg and G. Jacks (2008). "A case study of a freshwater pearl mussel (*Margaritifera margaritifera*) population in Central Sweden." Geografiska Annaler, Series A: Physical Geography **90**(4): 251-258.
- Espinosa, E. P., M. Perrigault, J. E. Ward, S. E. Shumway and B. Allam (2010). "Microalgal cell surface carbohydrates as recognition sites for particle sorting in suspension-feeding bivalves." Biological Bulletin **218**(1): 75-86.
- Eybe, T., F. Thielen, T. Bohn and B. Sures (2013). "The first millimetre - rearing juvenile freshwater pearl mussels (*Margaritifera margaritifera* L.) in plastic boxes." Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems **23**(6): 964-975.
- Fathallah, S., M. N. Medhioub, A. Medhioub and H. Boussetta (2010). "Biochemical indices (RNA/DNA ratio and protein content) in studying the nutritional status of *Ruditapes decussatus* (Linnaeus 1758) juveniles." Aquaculture Research **42**(1): 139-146.

- Ferreira, V. and M. A. S. Graça (2016). "Effects of whole-stream nitrogen enrichment and litter species mixing on litter decomposition and associated fungi." *Limnologica* **58**: 69-77.
- Flint, S. A. and W. H. McDowell (2015). "Effects of headwater wetlands on dissolved nitrogen and dissolved organic carbon concentrations in a suburban New Hampshire watershed." *Freshwater Science* **34**(2): 456-471.
- Gascho Landis, A. M. and J. A. Stoeckel (2016). "Multi-stage disruption of freshwater mussel reproduction by high suspended solids in short- and long-term brooders." *Freshwater Biology* **61**(2): 229-238.
- Gatenby, C. M., B. C. Parker and R. J. Neves (1997). "Growth and survival of juvenile rainbow mussels, *Villosa iris* (Lea, 1829) (Bivalvia: Unionidae), reared on algal diets and sediment." *American Malacological Bulletin* **14**(1): 57-66.
- Gatenby, C. M., R. J. Neves and B. C. Parker (1996). "Influence of sediment and algal food on cultured juvenile freshwater mussels." *Journal of the North American Benthological Society* **15**(4): 597-609.
- Geist, J. (2010). "Strategies for the conservation of endangered freshwater pearl mussels (Margaritifera margaritifera L.): a synthesis of Conservation Genetics and Ecology." *Hydrobiologia* **644**(1): 69-88.
- Geist, J. (2011). "Integrative freshwater ecology and biodiversity conservation." *Ecological Indicators* **11**(6): 1507-1516.
- Geist, J. and K. Auerswald (2007). "Physicochemical stream bed characteristics and recruitment of the freshwater pearl mussel (*Margaritifera margaritifera*)." *Freshwater Biology* **52**(12): 2299-2316.
- Gerecke, R., M. Cantonati, D. Spitale, E. Stur and S. Wiedenbrug (2011). "The challenges of long-term ecological research in springs in the northern and southern Alps: indicator groups, habitat diversity, and medium-term change." *Journal of Limnology* **70**(1): 168-187.
- Gillis, P. L., R. J. Mitchell, A. N. Schwalb, K. A. McNichols, G. L. Mackie, C. M. Wood and J. D. Ackerman (2008). "Sensitivity of the glochidia (larvae) of freshwater mussels to copper: Assessing the effect of water hardness and dissolved organic carbon on the sensitivity of endangered species." *Aquatic Toxicology* **88**(2): 137-145.
- Graca, M. A. S. (2001). "The role of invertebrates on leaf litter decomposition in streams- A review." *Internat. Rev. Hydrobiol* **86**(4-5): 383-393.
- Graca, M. A. S., F. Bärlocher and M. O. Gessner (2005). *Methods to Study Litter Decomposition (A Practical Guide)*, Springer, Netherlands, 329 pp., Springer, Netherlands.
- Grace, J. B. and R. G. Wetzel (1981). "Habitat Partitioning and Competitive Displacement in Cattails (*Typha*): Experimental Field Studies." *The American Naturalist* **118**(4): 463-474.
- Gum, B., M. Lange and J. Geist (2011). "A critical reflection on the success of rearing and culturing juvenile freshwater mussels with a focus on the endangered freshwater pearl mussel (*Margaritifera margaritifera* L.)." *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems* **21**(7): 743-751.
- Gumpinger, C., C. Hauer and C. Scheder (2015). "The current status and future challenges for the preservation and conservation of freshwater pearl mussel habitats." *Limnologica* **50**: 1-3.
- Gumpinger, K. and e. al. (2002). *Die Flussmussperlmuschel in Österreich*. Wien, Umweltbundesamt - Federal Environmental Agency Austria.
- Hajek, M., M. Horsak, P. Hajkova and D. Dite (2006). "Habitat diversity of central European fens in relation to environmental gradients and an effort to standardise fen terminology in ecological studies." *Perspectives in Plant Ecology Evolution and Systematics* **8**(2): 97-114.
- Hall, R. O., Jr., J. L. Tank, M. A. Baker, E. J. Rosi-Marshall and E. R. Hotchkiss (2016). "Metabolism, Gas Exchange, and Carbon Spiraling in Rivers." *Ecosystems* **19**(1): 73-86.
- Heino, J., A. S. Melo, T. Siqueira, J. Soininen, S. Valanko and L. M. Bini (2014). "Metacommunity organisation, spatial extent and dispersal in aquatic systems: patterns, processes and prospects." *Freshwater Biology*: n/a-n/a.
- Howard, A.D. (1922). "Experiments in the culture of freshwater mussels." *Bulletin of the U. S. Bureau of Fisheries* **38**: 63-89.
- Hruška, J. (1985). "Ochrana perlorodky říční v CHKO Šumava- jih." *Památky a příroda* **9**: 559-562.
- Hruška, J. (1991a). "Projekt "záchrana perlorodky říční v České republice" 1. část. Základní charakteristika a příčiny ohrožení." *Památky a příroda* **12**: 545-548.
- Hruška, J. (1991b). "Projekt "záchrana perlorodky říční v České republice" 2. část Biotop perlorodky říční." *Památky a příroda* **16**: 609-612.
- Hruška, J. (1992a). "The freshwater pearl mussel in South Bohemia: Evaluation of the effect of temperature on reproduction, growth and age structure of the population." *Archiv für Hydrobiologie* **126**: 181-191.
- Hruška, J. (1992b). "Projekt: Záchrana perlorodky říční v České republice" 3. část." *Ochrana Přírody* **47**: 7-11.
- Hruška, J. (1995). *Problematik der Rettung ausgewählter oligotropher Gewässersysteme und deren natürlicher Lebensgemeinschaften in der Tschechischen Republik*. Lindberger Hefte 5 (Sammlung der Referate der Arbeitstagung "Schutz und Erhaltung der Perlmuschelbestände"), Landschut: p. 98-123.
- Hruška, J. (1999). "Nahrungsansprüche der Flußperlmuschel und deren halbnatürliche Aufzucht in der Tschechischen Republik." *Heldia* **4**(6): 69-79.
- Hruška, J. (2000). Experience of semi-natural breeding programme of freshwater pearl mussel in the Czech Republic. In: *Die Flusssperlmuschel in Europa: Bestandssituation und Schutzmassnahmen, Ergebnisse des Kongresses vom 16.-18.10.2000 in Hof*. Wassereirtschaftsamt Hof.: p. 69-75.
- Hruška, J. a kol. (2000). *Projekt komplexní péče o NPP Blanice. Závěrečná zpráva za období 1996-1999*. AOPK ČR Praha. 101 s., 5 příloh. Nepublikováno.
- Hruška, J. and O. Volf (2003). "20 let výzkumu a aktivní ochrany perlorodky říčnív ČR." *Ochrana Přírody* **58**(6): 168-171.

- Hruška, J. Experience of semi-natural breeding programme of freshwater pearl mussel in the Czech Republic. Ergebnisse des Kongresses vom 16.-18.10.2000 in Hof.
- Hruška, J., J. Kopáček, T. Hlavatý and J. Hošek (2000). "Trend of atmospheric deposition of acidifying compounds at Čertovo lake, southwestern Czech republic (1992 - 1999)." Silva Gabreta **4**: 71-86.
- Hua, D. and R. J. Neves (2007). "Captive survival and pearl culture potential of the pink heelsplitter *Potamilus alatus*." North American Journal of Aquaculture **69**(2): 147-158.
- Hua, D., R. J. Neves and Y. Jiao (2013). "Effects of algal density, water flow and substrate type on culturing juveniles of the rainbow mussel (*Villosa iris*) (Bivalvia: Unionidae) in a laboratory recirculating system." Aquaculture **416-417**: 367-373.
- Hua, D., Y. Jiao, R. Neves and J. Jones (2015). "Use of PIT tags to assess individual heterogeneity of laboratory-reared juveniles of the endangered Cumberlandian combshell (*Epioblasma brevidens*) in a mark-recapture study." Ecology and Evolution **5**(5): 1076-1087.
- Ilmonen, J. and L. Paasivirta (2005). "Benthic macrocrustacean and insect assemblages in relation to spring habitat characteristics: patterns in abundance and diversity." Hydrobiologia **533**(1): 99-113.
- Ishikawa, N. F., H. Togashi, Y. Kato, M. Yoshimura, Y. Kohmatsu, C. Yoshimizu, N. O. Ogawa, N. Ohte, N. Tokuchi, N. Ohkouchi and I. Tayasu (2016). "Terrestrial-aquatic linkage in stream food webs along a forest chronosequence: Multi-isotopic evidence." Ecology **97**(5): 1146-1158.
- Iversen, T. M., T. Jensen and J. Skriver (1982). "Inputs and transformation of allochthonous particulate organic matter in a headwater stream." Holarctic ecology **5**: 10-19.
- Jacobson, P. J., R. J. Neves, D. S. Cherry and J. L. Farris (1997). "Sensitivity of glochidial stages of freshwater mussels (Bivalvia: Unionidae) to copper." Environmental Toxicology and Chemistry **16**(11): 2384-2392.
- Jones, I., I. Gowns, A. Arnold, S. McCall and M. Bowes (2015). "The effects of increased flow and fine sediment on hyporheic invertebrates and nutrients in stream mesocosms." Freshwater Biology: n/a-n/a.
- Jones, J. W., R. A. Mair and R. J. Neves (2005). "Factors affecting survival and growth of juvenile freshwater mussels cultured in recirculating aquaculture systems." North American Journal of Aquaculture **67**(3): 210-220.
- Jones, J. W., R. J. Neves, S. A. Ahlstedt and R. A. Mair (2004). "Life history and propagation of the endangered dromedary pearl mussel (*Dromus dromas*) (Bivalvia: Unionidae)." Journal of the North American Benthological Society **23**(3): 515-525.
- Jonsson, M. and K. Stenroth (2016). "True autochthony and allochthony in aquatic-terrestrial resource fluxes along a landuse gradient." Freshwater Science **35**(3): 882-894.
- Kominoski, J. S. and A. D. Rosemond (2011). Conservation from the bottom up: forecasting effects of global change on dynamics of organic matter and management needs for river networks. Freshwater Science, The Society for Freshwater Science. **31**: 51-68.
- Kovitvadhi, S., U. Kovitvadhi, P. Sawangwong and J. Machado (2008). "A laboratory-scale recirculating aquaculture system for juveniles of freshwater pearl mussel *Hyriopsis* (*Limnoscapha*) *myersiana* (Lea, 1856)." Aquaculture **275**(1-4): 169-177.
- Kovitvadhi, S., U. Kovitvadhi, P. Sawangwong, A. Thongpan and J. Machado (2006). "Optimization of diet and culture environment for larvae and juvenile freshwater pearl mussels, *Hyriopsis* (*Limnoscapha*) *myersiana* Lea, 1856." Invertebrate Reproduction and Development **49**(1-2): 61-70.
- Kubíková, L., O. P. Simon, K. Tichá, K. Douda, M. Maciak and M. Bílý (2012). The influence of mesoscale habitat conditions on the macroinvertebrate composition of springs in a geologically homogeneous area. Freshwater Science, The Society for Freshwater Science. **31**: 668-679.
- Kubíková, L., O. Simon and K. Fricová (2011). "The occurrence of *Pisidium* species (Bivalvia: Sphaeriidae) in oligotrophic springs of the Blanice River catchment (Czech Republic) in relation to ecological conditions." Biologia **66**(2): 299-307.
- Kvítek, T., P. Zlabek, V. Bystrický, P. Fucik, M. Lexa, J. Gergel, P. Novak and P. Ondr (2009). "Changes of nitrate concentrations in surface waters influenced by land use in the crystalline complex of the Czech Republic." Physics and Chemistry of the Earth **34**(8-9): 541-551.
- Larsen, B. M., Harsaker, K., Kleiven, E., Kvellestad, A., Simonsen, J.H. (2006). Oagna. 3. Fisk. Kalking i vann og vassdrag. Effektkontroll av store prosjekter 2005. www.dirmat.no: 1-16.
- Lavictoire, L., E. Moorkens, A. D. Ramsey, W. Sinclair and R. A. Sweeting (2015). "Effects of substrate size and cleaning regime on growth and survival of captive-bred juvenile freshwater pearl mussels, *Margaritifera margaritifera* (Linnaeus, 1758)." Hydrobiologia.
- Lavictoire, L., Moorkens, E., Ramsey, A., Sinclair, W. and R. A. Sweeting (2014). Investigations into feeding structures of juvenile freshwater pearl mussels (*Margaritifera margaritifera*) through scanning electron microscopy. Conference poster from web page [https://www.researchgate.net/profile/Louise\\_Lavictoire](https://www.researchgate.net/profile/Louise_Lavictoire)
- Lecce, S. A. (2009). "A depth-proportional intake device for automatic water samplers." Journal of the American Water Resources Association **45**(1): 272-277.
- Liberty, A. J., B. J. Ostby and R. J. Neves (2007). "Determining a suitable substrate size and sampling frequency for rearing juvenile rainbow mussels *Villosa iris*." North American Journal of Aquaculture **69**(1): 44-52.
- Liebmann, H. (1962). Handbuch der Frischwasser- und Abwasserbiologie: Biologie des Trinkwassers, Badewassers, Fischwassers, Vorfluters und Abwassers, R. Oldenbourg.
- Lima, P., M. L. Lima, U. Kovitvadhi, S. Kovitvadhi, C. Owen and J. Machado (2012). "A review on the "in vitro" culture of freshwater mussels (Unionoida)." Hydrobiologia **691**(1): 21-33.

- Lopes-Lima, M., P. Lima, M. Hinzmann, A.-n. Rocha and J. Machado (2014). "Selective feeding by *Anodonta cygnea* (Linnaeus, 1771): The effects of seasonal changes and nutritional demands." Limnologia - Ecology and Management of Inland Waters **44**(0): 18-22.
- Lopes-Lima, M., R. Sousa, J. Geist, D. C. Aldridge, R. Araujo, J. Bergengren, Y. Bernal, E. Bódis, L. Burlakova, D. Van Damme, K. Douda, E. Froufe, D. Georgiev, C. Gumpinger, A. Karatayev, U. Kebapçı, I. Killeen, J. Lajtner, B. M. Larsen, R. Lauceri, A. Legakis, S. Lois, S. Lundberg, E. Moorkens, G. Motte, K. O. Nagel, P. Ondina, A. Outeiro, M. Paunovic, V. Prié, T. von Proschwitz, N. Riccardi, M. Rudzite, M. Rudzitis, C. Scheder, M. Seddon, H. Şerefişan, V. Simić, S. Sokolova, K. Stoeckl, J. Taskinen, A. Teixeira, F. Thielen, T. Trichkova, S. Varandas, H. Vicentini, K. Zajac, T. Zajac and S. Zogaris (2016). "Conservation status of freshwater mussels in Europe: State of the art and future challenges." Biological Reviews.
- MacNeil, C. and D. Platvoet (2005). "The predatory impact of the freshwater invader *Dikerogammarus villosus* on native *Gammarus pulex* (Crustacea: Amphipoda); influences of differential microdistribution and food resources." Journal of Zoology **267**(1): 31-38.
- Mann, K. H. (1988). "Production and use of detritus in various freshwater, estuarine, and coastal marine ecosystems." Limnology & Oceanography **33**(4): 910-930.
- Martin Osterling, E., E. Bergman, L. A. Greenberg, B. S. Baldwin and E. L. Mills (2007). "Turbidity-mediated interactions between invasive filter-feeding mussels and native bioturbating mayflies." Freshwater Biology **52**(8): 1602-1610.
- Meyer, E. I. and R. Poepperl (2004). "Assessing food-web structure, matter fluxes, and system attributes of a Central European mountain stream by performing mass-balanced network analysis." Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences **61**(9): 1565-1581.
- Meyer, J. L., D. L. Strayer, J. B. Wallace, S. L. Eggert, G. S. Helfman and N. E. Leonard (2007). "The contribution of headwater streams to biodiversity in river networks1." Journal of the American Water Resources Association **43**(1): 86-103.
- Miko, L. and M. Hošek (2009). PŘÍRODA A KRAJINA ČESKÉ REPUBLIKY - Zpráva o stavu 2009. Praha: 105.
- Mummert, A. K., R. J. Neves, T. J. Newcomb and D. S. Cherry (2003). "Sensitivity of juvenile freshwater mussels (*Lampsilis fasciola*, *Villosa iris*) to total and un-ionized ammonia." Environmental Toxicology and Chemistry **22**(11): 2545-2553.
- Naimo, T. J. (1995). "A review of the effects of heavy metals on freshwater mussels." Ecotoxicology **4**(6): 341-362.
- Neves, R. J. and J. C. Widlak (1987). "Habitat Ecology of Juvenile Fresh-Water Mussels (*Bivalvia*, *Unionidae*) in A Headwater Stream in Virginia." American Malacological Bulletin **5**(1): 1-7.
- Newbold, J. D. (1992). Cycles and spirals of nutrients. The Rivers Handbook, Hydrological and Ecological principles. P. Calow and G. E. Petts. Oxford, Blackwell Scientific Publications: 379-408.
- Newbold, J. D., S. A. Thomas, G. W. Minshall, C. E. Cushing and T. Georgian (2005). "Deposition, benthic residence, and resuspension of fine organic particles in a mountain stream." Limnology and Oceanography **50**(5): 1571-1580.
- Newton, T. J. and M. R. Bartsch (2007). "Lethal and sublethal effects of ammonia to juvenile *Lampsilis* mussels (*Unionidae*) in sediment and water-only exposures." Environmental Toxicology and Chemistry **26**(10): 2057-2065.
- Newton, T. J., C. C. Vaughn, D. E. Spooner, S. J. Nichols and M. T. Arts (2013). "Profiles of biochemical tracers in unionid mussels across a broad geographical range." Journal of Shellfish Research **32**(2): 497-507.
- Nichols, S. J. and D. Garling (2000). "Food-web dynamics and trophic-level interactions in a multispecies community of freshwater unionids." Canadian Journal of Zoology **78**(5): 871-882.
- Nowak, W. (1936). "Perlorodka říční a její perly (se zvláštním zřetelem k poměrům v republice Československé)." Sborník vědeckých ústavů zemědělských ČSR **146**: 1-76.
- O'Beirn, F. X., R. J. Neves and M. B. Steg (1998). "Survival and growth of juvenile freshwater mussels (*Unionidae*) in a recirculating aquaculture system." American Malacological Bulletin **14**(2): 165-171.
- Ostrovsky, A. N. and I. Y. Popov (2011). "Rediscovery of the largest population of the freshwater pearl mussel (*Margaritifera margaritifera*) in the Leningrad oblast (north-west Russia)." Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems **21**(2): 113-121.
- Oulehle, F., J. Hofmeister, P. Cudlín and J. Hruska (2006). "The effect of reduced atmospheric deposition on soil and soil solution chemistry at a site subjected to long-term acidification, Nacetčn, Czech Republic." Science of The Total Environment **370**(2-3): 532-544.
- Panno, S. V., I. G. Krapac and D. A. Keefer (1998). "A new device for collecting time-integrated water samples from springs and surface water bodies." Environmental and Engineering Geoscience **4**(3): 375-383.
- Pasco, P.Y., Capoulade, M., Dury, P., Ribeiro, M., Beauflis, B. and L. Rostagat (2015). Experiments on reinforcement and in-situ rearing systems of the pearl mussel (*Margaritifera margaritifera*) in the Armorican Massif (France). In Mehler, K., Burlakova, L. E., Karatayev, A. Y., Dickinson, S. (Eds.): Second International Meeting on Biology and Conservation of Bivalves, October 4-8, 2015, Buffalo, New York, USA. p. 96.
- Perks, M. T., J. Warburton and L. Bracken (2014). "Critical assessment and validation of a time-integrating fluvial suspended sediment sampler." Hydrological Processes **28**(17): 4795-4807.
- Preston, S. J., A. Keys and D. Roberts (2007). "Culturing freshwater pearl mussel *Margaritifera margaritifera*: A breakthrough in the conservation of an endangered species." Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems **17**(5): 539-549.

- Rambousková, K., V. Kladvivá, J. Švanyga and O. Simon (2016). Zásady péče a využívání povodí s perlorodkou říční - Metodiky podpory perlorodky říční oddíl A. Ministerstvo životního prostředí ČR. Praha. 50 s. (certifikovaná metodika, nepublikováno)
- Raposeiro, P. M., V. Ferreira, R. Guri, V. Gonçalves and G. M. Martins (2017). "Leaf litter decomposition on insular lentic systems: effects of macroinvertebrate presence, leaf species, and environmental conditions." *Hydrobiologia* **784**(1): 65-79.
- Reid, N., A. Keys, J. S. Preston, E. Moorkens, D. Roberts and C. D. Wilson (2013). "Conservation status and reproduction of the critically endangered freshwater pearl mussel (*Margaritifera margaritifera*) in Northern Ireland." *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems* **23**(4): 571-581.
- Rosemond, A. D., J. P. Benstead, P. M. Bumpers, V. Gulis, J. S. Kominoski, D. W. P. Manning, K. Suberkropp and J. B. Wallace (2015). "Experimental nutrient additions accelerate terrestrial carbon loss from stream ecosystems." *Science* **347**(6226): 1142-1145.
- Sabater, S., J. Artigas, A. Gaudes, I. Munoz, G. Urrea and A. M. Romani (2011). "Long-term moderate nutrient inputs enhance autotrophy in a forested Mediterranean stream." *Freshwater Biology* **56**(7): 1266-1280.
- Scheder, C., B. Lerchegger, M. Jung, D. Csar and C. Gumpinger (2014). "Practical experience in the rearing of freshwater pearl mussels (*Margaritifera margaritifera*): Advantages of a work-saving infection approach, survival, and growth of early life stages." *Hydrobiologia* **735**(1): 203-212.
- Scheder, C., B. Lerchegger, P. Flödl, D. Csar, C. Gumpinger and C. Hauer (2015). "River bed stability versus clogged interstitial: Depth-dependent accumulation of substances in freshwater pearl mussel (*Margaritifera margaritifera* L.) habitats in Austrian streams as a function of hydromorphological parameters." *Limnologica* **50**: 29-39.
- Scheder, S. and K. Gumpinger, Csar, D. (2011). "Application of a five-stage field key for the larval development of the freshwater pearl mussel (*Margaritifera margaritifera* Linné, 1758) under different temperature conditions - a tool for the approximation of the optimum time for host fish infection in captive breeding." *Ferrantina* **64**: 13-22.
- Schmidt, C. and R. Vandre (2010). "Ten years of experience in the rearing of young freshwater pearl mussels (*Margaritifera margaritifera*)." *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems* **20**(7): 735-747.
- Sicuro, B. (2015). "Freshwater bivalves rearing: a brief overview." *International Aquatic Research* **7**(2): 93-100.
- Simon, O., M. Černá, J. Hruška, B. Dort and K. Rambousková (2016). Metodika postupů na zajištění potravní nabídky pro perlorodku říční speciálními revitalizacemi - Metodiky podpory perlorodky říční oddíl C. Ministerstvo životního prostředí ČR. Praha. 37 s. (certifikovaná metodika, nepublikováno)
- Simon, O., B. Dort and J. Hruška (2016). Metodika odchovů - Metodiky podpory perlorodky říční oddíl E. Ministerstvo životního prostředí ČR. Praha. 37 s. (certifikovaná metodika, nepublikováno)
- Simon, O., D. Fiala, P. Kožený and K. Fricová (2008). Zdroj, transformace a transport přirozeného POC – jako ekosystémová služba přirozené říční nivy? In Pithart, D., Benedová, Z., Křováková, K. (Eds.): Ekosystémové služby říční krajiny. Třeboň, 28.4.2008. Třeboň: Ústav systémové biologie a ekologie AVČR, 2008, s. 191–199.
- Simon, O., K. Rambousková, B. Dort and M. Bílý (2016). Metodika bioindikací - Metodiky podpory perlorodky říční oddíl F. Ministerstvo životního prostředí ČR. Praha. 27 s. (certifikovaná metodika, nepublikováno)
- Sládeček, V. (1973). "The reality of three British biotic indices." *Water Research* **7**(7): 995-1002.
- Solagaistua, L., M. Arroita, I. Aristi, A. Larrañaga and A. Elosegi (2016). "Changes in discharge affect more surface than subsurface breakdown of organic matter in a mountain stream." *Marine and Freshwater Research* **67**(12): 1826-1834.
- Soler, J., Wantzen, K. M. and R. Araujo (2015). Project grande mulette: Conservation of the giant pearl mussel (*Margaritifera auricularia*) in Europe. In Mehler, K., Burlakova, L. E., Karatayev, A. Y., Dickinson, S. (Eds.): Second International Meeting on Biology and Conservation of Bivalves, October 4-8, 2015, Buffalo, New York, USA. p. 96
- Sparks, B. L. and D. L. Strayer (1998). "Effects of low dissolved oxygen on juvenile *Elliptio complanata* (Bivalvia:Unionidae)." *Journal of the North American Benthological Society* **17**(1): 129-134.
- Stanford, J. A. and J. V. Ward (2001). "Revisiting the serial discontinuity concept." *Regulated Rivers: Research and Management* **17**(4-5): 303-310.
- Sterner, R. W., Elsner, J.J. (2002). *Ecological stoichiometry. The biology of elements from molecules to the biosphere*. Princeton, Princeton University Press.
- Strahler, A. N. (1957). "Quantitative analysis of watershed geomorphology." *Transactions, American Geophysical Union* **38**(6): 913-920.
- Strayer, D. L. (2006). Challenges for freshwater invertebrate conservation. *Journal of the North American Benthological Society*, North American Benthological Society. **25**: 271-287.
- Strayer, D. L. (2008). *Freshwater mussel ecology: A multifactor approach to distribution and abundance*.
- Strecker, U., G. Bauer and K. Wächter (1990). "Untersuchungen über die Entwicklungsbedingungen junger Flussperlmuscheln." *Schriftenreihe Bayer. Landesamt für Umweltschutz* **97**: 25-30.
- Švanyga J., Simon O. P., Dort B. and K. Douda (2014). Application of special meadow management within the measures of Action Plan for Freshwater Pearl mussel (*Margaritifera margaritifera*) in the Czech Republic. In Martins, A. M. F. at al (Eds.): World Congress of Malakology, Ponta Delgada, Azores, July 22-28 2013, Book of abstracts Sociedade Alfonso Chaves. Ponta Delgada 216 p. (poster)
- Švanyga, J., O. P. Simon, T. Mináriková, O. Spisar and M. Bílý (2013). Záchraný program pro perlorodku říční v ČR (Action plan for the endangered freshwater pearl mussel in the Czech Republic) (in Czech). K. NCA CR, CZ-148 00, Prague: 1-76.

- Tant, C. J., A. D. Rosemond, A. M. Helton and M. R. First (2015). "Nutrient enrichment alters the magnitude and timing of fungal, bacterial, and detritivore contributions to litter breakdown." Freshwater Science **34**(4): 1259-1271.
- Thienemann, A. (1924). "Hydrobiologische Untersuchungen an Quellen." Arch. Hydrobiol **14**: 151-190.
- Tichá, K., O. P. Simon, K. Douša and L. Kubíková (2012). "Detrital Components in Submontane Organogenic Springs in Relation to Their Morphology, Microhabitats and Macroinvertebrates." Polish Journal of Ecology **60**(1): 163-175.
- Tichá, K., O. Simon, J. Hruška and J. Švanyga (2017). Speciální revitalizace, obnova vodního režimu a protierozní opatření - Metodiky podpory perlorodky říční oddíl D. Ministerstvo životního prostředí ČR. Praha. 50 s. (certifikovaná metodika, nepublikováno)
- Vandré, R., C. Schmidt and G. Wenz (2001). "Contributes modern agriculture to the decline of the freshwater pearl mussel? A historical review." Zeitschrift für Ökologie und Naturschutz **9**(3): 129-137.
- Vannote, R. L., G. W. Minshall, K. W. Cummins, J. R. Sedell and C. E. Cushing (1980). "The river continuum concept." Can. J. Fish. Aquat. Sci **37**: 130-137.
- Vuorio, K., M. Tarvainen and J. Sarvala (2007). "Unionid mussels as stable isotope baseline indicators for long-lived secondary consumers in pelagic food web comparisons." Fundamental and Applied Limnology **169**(3): 237-245.
- Wallace, J. B., J. J. Hutchens and J. W. Grubaugh (2007). Transport and storage of FPOM. Methods in stream ecology. F. R. Hauer and G. A. Lamberti. New York, Academic Press -Elsevier: 249-271.
- Wallace, J. B., J. R. Webster and W. R. Woodall (1977). "The role of filter feeders in flowing waters." Arch. Hydrobiol **79**(4): 506-532.
- Wallace, J. B., T. F. Cuffney, J. R. Webster, G. J. Lugthart, K. Chung and B. S. Goldowitz (1991). "Export of fine organic particles from headwater streams: effects of season, extreme discharges, and invertebrate manipulation." Limnology & Oceanography **36**(4): 670-682.
- Wallace, J. B., T. F. Cuffney, S. L. Eggert and M. R. Whiles (1997). "Stream organic matter inputs, storage, and export for Satellite Branch at Coweeta Hydrologic Laboratory, North Carolina, USA." Journal of the North American Benthological Society **16**(1): 67-74.
- Wanner, F., O. P. Simon and V. Kládíková (2012). "Decrease in the trophic status of a second-order oligotrophic stream (Zbytinský Potok) by a new wastewater treatment plant with two low-loaded stabilisation ponds." Silva Gabreta **18**(1): 23-34.
- Ward, J. V. and J. A. Stanford (1995). "The serial discontinuity concept: Extending the model to floodplain rivers." Regulated Rivers: Research and Management **10**: 159-168.
- Webster, J. R. (2007). "Spiraling down the river continuum: stream ecology and the U-shaped curve." Journal of the North American Benthological Society **26**(3): 375-389.
- Wetzel, R. G. (2001). Limnology third edition. London, Academic Press.
- Wotton, R. S. (2007). "Do benthic biologists pay enough attention to aggregates formed in the water column of streams and rivers?" Journal of the North American Benthological Society **26**(1): 1-11.
- Wotton, R. S. and B. Malmqvist (2001). "Feces in aquatic ecosystems." BioScience **51**(7): 537-544.
- Wotton, R. S., B. Malmqvist, T. Muotka and K. Larsson (1998). "Fecal pellets from a dense aggregation of suspension-feeders in a stream: An example of ecosystem engineering." Limnol. Oceanogr **43**(4): 719-725.
- Zelinka, M. and P. Marvan (1961). "Zur präzisierung der biologischen klassifikation der reinheit fließender gewässer." Arch. Hydrobiol. **57**(3): 389-407.
- Zimmermann-Timm, H. (2002). "Characteristics, dynamics and importance of aggregates in rivers - An invited review." International Review of Hydrobiology **87**(2-3): 197-240.



## 9. Přílohy

### SEZNAM PŘÍLOH

#### **Příloha 1**

Článek 1 – Simon O. P., Vaníčková I., Bílý M., Douda K., Patzenhauerová H., Hruška J. and A. Peltanová (2015). "The status of freshwater pearl mussel in the Czech Republic: Several successfully rejuvenated populations but the absence of natural reproduction." *Limnologica* **50**: 11-20.

#### **Příloha 2**

Článek 2 – Matasová, K., Simon, O. P., Dort, B., Douda, K. and M. Bílý (2013). "Recent distribution of freshwater pearl mussel (*Margaritifera margaritifera*) at historical localities in the upper part of the Vltava river basin (Czech Republic)." *Silva Gabreta* **19**(3): 139-148.

#### **Příloha 3**

Článek 3 – Tichá, K., Simon, O. P., Houška, J. and K. Douda. "The reversal of a river continuum at the origin: nutrient-rich fine particulate organic matter exported from helocrene springs."

#### **Příloha 4**

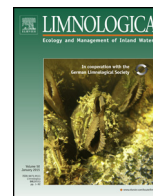
Článek 4 – Černá, M., Simon, O. P., Bílý, M., Douda, K., Dort, B., Galová, M. and M. Volfová. "Growth and survival of juvenile freshwater pearl mussels: a type of bioindication method, hyporheic oxygen saturation and a locality position within a catchment have an effect."

#### **Příloha 5**

Seznam publikací Ondřeje Simona za posledních 6 let

#### **Příloha 6**

Odborný životopis



# The status of freshwater pearl mussel in the Czech Republic: Several successfully rejuvenated populations but the absence of natural reproduction<sup>☆</sup>



Ondřej P. Simon<sup>a,b,\*,1</sup>, Ivana Vaníčková<sup>c,d,1</sup>, Michal Bílý<sup>b</sup>, Karel Douša<sup>e</sup>,  
Hana Patzenhauerová<sup>f</sup>, Jaroslav Hruška<sup>g</sup>, Alena Peltánová<sup>c</sup>

<sup>a</sup> T.G Masaryk Water Research Institute, Podbabská 30, CZ-16000 Prague 6, Czech Republic

<sup>b</sup> Faculty of Environmental Sciences, Czech University of Life Sciences Prague, Kamýcká 129, CZ-16521 Prague 6, Czech Republic

<sup>c</sup> Nature Conservation Agency (NCA CR), Kaplanova 1931/1, CZ-14800, Prague, Czech Republic

<sup>d</sup> Biology Centre of the Academy of Sciences of the Czech Republic, Institute of Hydrobiology, Na Sádkách 7, CZ-37005 České Budějovice, Czech Republic

<sup>e</sup> Faculty of Agrobiography, Food and Natural Resources, Czech University of Life Science, Kamýcká 129, CZ-16521 Prague 6, Czech Republic

<sup>f</sup> Institute of Vertebrate Biology, Academy of Sciences of the Czech Republic, Květná 8, CZ-603 65 Brno, Czech Republic

<sup>g</sup> Miletínský 7, CZ-383 01 Ktiš, Czech Republic

## ARTICLE INFO

### Article history:

Received 31 March 2014

Received in revised form

17 November 2014

Accepted 18 November 2014

Available online 24 November 2014

### Keywords:

*Margaritifera margaritifera*

Action plan

Unionidae

Conservation biology

Long-term study

Rejuvenation

## ABSTRACT

The freshwater pearl mussel was historically abundant in many streams and rivers in the Elbe, Oder, and Danube Basins in the Czech Republic, Central Europe. By the 21st century, the mussels had become extinct in the lower and middle altitudes, and current populations are only present near the upper limit of their natural range. The current population of this mussel is estimated to be only 1% of the historical abundance. The population decline was related to the negative impacts of pollution from industry, intense agriculture, forestry, and sewage water. The freshwater pearl mussel habitat has also been impacted by watercourse regulations and has been fragmented by dams and weirs. All of these impacts have resulted in failure of the reproductive cycle; the last significant cohort of juveniles settled approximately 30 – 40 years ago. Therefore, this species is considered critically endangered, and an action plan was developed to conserve the populations in the Czech Republic. Special measures were conducted between 1984 and 2005 to improve the age structure of elderly populations. Fish infected with millions of glochidia were released in two locations, and over 53,000 captive-bred juveniles that were three to five years old were released in seven locations. Only the latter approach resulted in a small number of subadults that gradually emerged from the substratum to the bottom surface, as confirmed by monitoring efforts. Despite simultaneous efforts to restore mussel habitat over the last 25 years, natural reproduction still does not occur in the Czech Republic. Therefore, complete restoration of oligotrophic streams is the key to the future presence and natural reproduction of freshwater pearl mussels in the Czech Republic.

© 2014 The Authors. Published by Elsevier GmbH. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>).

## Introduction

Freshwater species, particularly bivalve molluscs, are greatly threatened with extinction (Bauer and Wächtler, 2001; Strayer, 2006), and their protection requires a comprehensive approach (Geist, 2011). The freshwater pearl mussel (*Margaritifera margari-*

*tifera*) was historically an abundant species in oligotrophic streams, but it has been disappearing rapidly in recent decades. This species has a complex life cycle that begins with a very brief planktonic phase in the form of microscopic glochidia, which is followed by a parasitic phase on the gills of salmonid fishes for nearly a year. The completion of metamorphosis is followed by a hidden phase in hyporheic zone. Finally, the young mussel emerges at the bottom surface and may live up to a century as a stable, sessile benthic filter-feeder consuming fine detritus (Bauer and Wächtler, 2001). The complexity of the freshwater pearl mussel's lifecycle makes it vulnerable to rapid anthropogenic changes that have affected freshwater ecosystems over the last two centuries.

Currently, the freshwater pearl mussel is designated endangered species based on European Union legislation and is protected

<sup>☆</sup> This article is part of a special issue entitled "The current status and future challenges for the preservation and conservation of freshwater pearl mussel habitats".

\* Corresponding author at: T.G Masaryk Water Research Institute, Podbabská 30, CZ-16000, Prague 6, Czech Republic. Tel.: +420 220197365.

E-mail address: [simon@vuv.cz](mailto:simon@vuv.cz) (O.P. Simon).

<sup>1</sup> These authors contributed equally to this work.

within Natura 2000. According to the national law of the Czech Republic, the species has been listed as critically endangered since 1992 but has been under legal protection since 1913, when it was declared a year-round protected species and harvesting of wild populations was banned. Mussels were allowed to be cultured for pearl production in artificial millraces. The last documented official pearl hunt occurred in 1944 in the millrace of Otava River in Horažďovice (Dyk, 1947; Dyk and Dyková, 1974). The conservation of the freshwater pearl mussel in the Czech Republic was covered by the nation's general environmental protection legislation announced in 1955.

Despite their protection over several decades, the freshwater pearl mussel is retreating from its natural range across Europe (Araujo and Ramos, 2001; Popov and Ostrovsky, 2013). Generally, the causes of declines have been eutrophication, river regulations and changes in land use in catchments (Bauer, 1988; Hruška, 1999; Gumpinger et al., 2002; Geist, 2010). In the Czech Republic, the first documented massive die-out of freshwater pearl mussels occurred via the construction of paper mills and other industrial enterprises between 1850 and 1940 (Dyk, 1947). Subsequently, the discharge of untreated sewage water, the construction of dams, and the regulation of stream canals had additional profound negative impacts on this species. Land use changes also occurred; for example, traditional farming on less productive land was gradually abandoned such that former fields and meadows returned to natural succession, and agriculture on more productive fields was intensified (Dyk, 1992; Hruška, 1991b). Forest diversity was modified when the proportion of spruce monocultures increased. The water course within the landscape was managed via the massive construction of drainage systems, which caused the physical destruction of many natural streams due to digging and elevated levels of erosion (NCA CR, 2013).

These cumulative effects had a significant impact on the temperature regime, erosion patterns, and water chemistry, which resulted in changes in the aquatic food webs of individual river basins. A distinct lack of detritus particles with sufficient nutrient and calcium content (Hruška, 1991a; Tichá et al., 2012) are considered to be the main factors preventing the reproduction and survival of juveniles in most of the residual Czech populations (Hruška, 1991a, 1991b; NCA CR, 2013). The absence of regular population recruitment led to population declines. Conservation efforts for remaining freshwater pearl mussel populations and research on the causes of reproductive failure began in the 1980s (Bauer et al., 1980; Young, 1991). The freshwater pearl mussel is currently recognised as a flagship species for the complex protection of oligotrophic catchments due to its importance as a sensitive species (Buddensiek, 1995; Hruška, 1999; Geist, 2010). Despite the conservation and protection efforts of this mussel species, few action plans in Europe have resulted in significant population increases or improvements in the age structure, apart from the Lutter River in Germany (Buddensiek and Ratzbor, 1995; Altmüller and Dettmer, 2006).

In the Czech Republic, systematic activities to protect the freshwater pearl mussels have been conducted since 1982 (Hruška, 1985), and a comprehensive action plan is currently being conducted. The main conservation and protection efforts focus on habitat protection combined with direct population support measures, including breeding mussels and providing optimal conditions and special management in specially built side-arms of the river (Hruška, 1999).

The aim of this study is to summarise the current status of populations of freshwater pearl mussels in the Czech Republic compared with historical populations. We provide an overview of the population reinforcement over the past 25 years and the presence of juveniles in these populations. In addition, we discuss the effectiveness of the conservation measures and evaluate the

initial results of the long-term attempts to augment the residual populations.

## Methods

### *The study area*

The study area is located on the southeast edge of the freshwater pearl mussel range in Europe. The area includes the following river catchments: the Vltava and Saale Basins of the upper Elbe River, which drains into the North Sea; the Oder and Nisa Basins of the upper Oder River, which drains into the Baltic Sea; and the Morava Basin of the Danube River, which drains into the Black Sea. The original range of the freshwater pearl mussel is relatively sparsely settled and is characterised by a high percentage of forested areas, with a current predominance of spruce monocultures. In the bedrock, crystalline rocks (granite, granodiorite, and diorite) are dominant.

The conservation of freshwater pearl mussels in the study area is managed by the governmental Nature Conservation Agency (NCA CR) in the form of a national action plan. The action plan categorises localities with viable populations according to their current and predicted statuses (Supplement A). An ecosystem-oriented conservation approach is used to reflect the complex processes in oligotrophic waters that are key to freshwater pearl mussels' survival and reproduction.

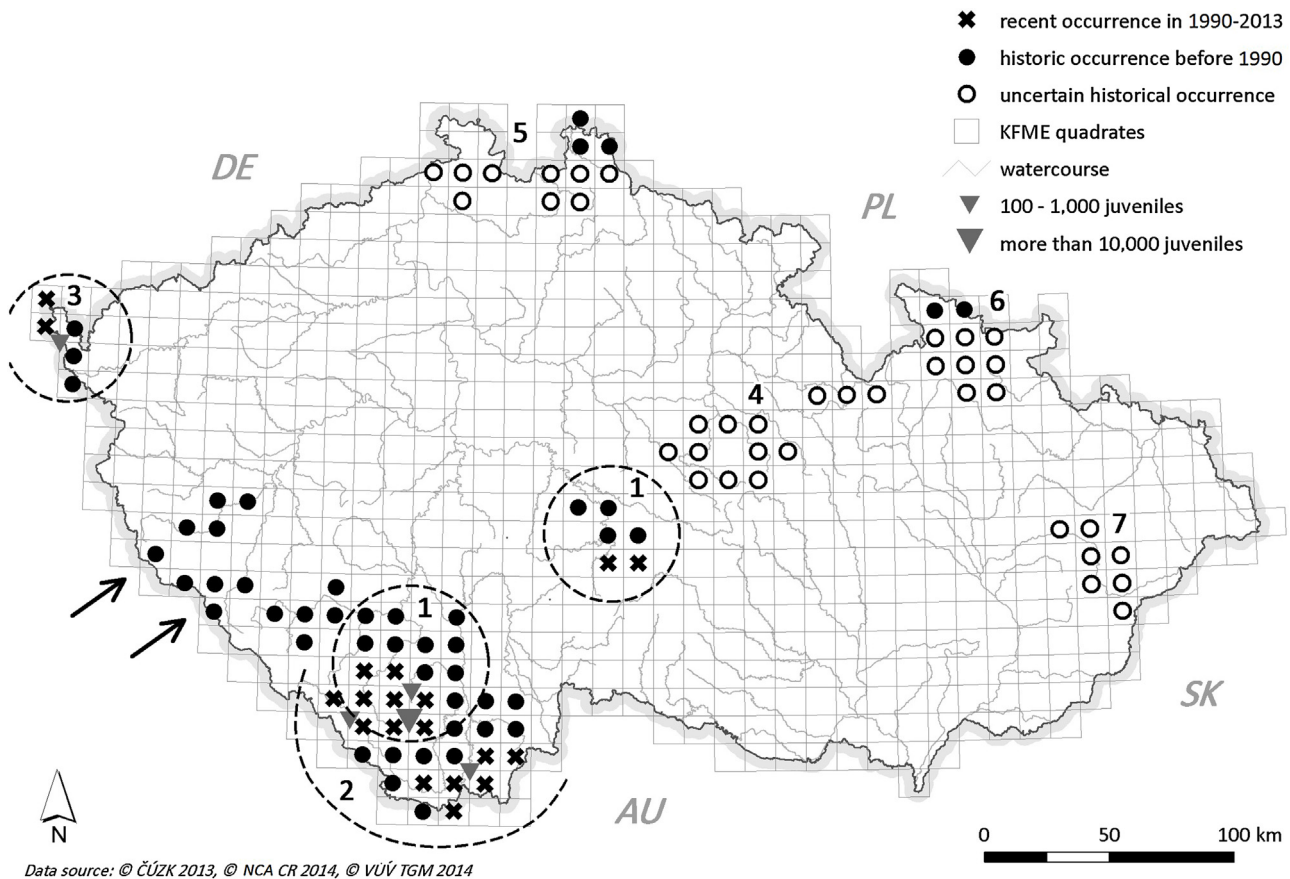
### *Analysis of available data on historic freshwater pearl mussel occurrence*

The data of the historical occurrence of freshwater pearl mussels in Czech rivers and streams were summarised from various reports (Schubert, 1933; Nowak, 1936; Dyk, 1947; Podubský and Štědrónský, 1955; Svatoš, 1971; Dyk and Dyková, 1974; Flasar, 1992). Historical occurrences obtained from secondary sources were marked as unreliable records. Unfortunately, historical sources only considered the occurrence of freshwater pearl mussels in rivers and streams, rather than the quantitative estimates of the populations. In addition, because surveys before 1950 were conducted for economic purposes, minor populations were likely overlooked. Current populations located in small streams may also have been overlooked. Nevertheless, all current mussel localities were presumed to have had populations in the past.

### *Analysis of the present occurrence and abundance of freshwater pearl mussels*

The freshwater pearl mussel is listed as critically endangered in the Czech Republic; thus, it is protected by a law that prohibits disturbing *M. margaritifera* in its natural habitat, handling mussels during any phase of their life cycle, manipulating individuals, extracting individuals from stable positions, and killing mussels. Therefore, research must follow the restriction under the conservation law. For example, screening of the habitat for the presence of mussels can be performed only by counting mussels visible on the bottom surface because disturbing their habitat by ransacking or sieving of the sediment (Hastie et al., 2004; Young et al., 2001) is illegal. These research restrictions limit the accuracy of population size and age structure estimates.

Current abundance data were obtained from the survey database of the action plan and the authors' observations. A summary of the knowledge regarding mussel occurrence was plotted in standard KFME squares (Ehrendorfer and Hamann, 1965).



**Fig. 1.** Comparison of the historical and present occurrence of freshwater pearl mussels in the Czech Republic and the recent population reinforcement. The network of standard KFME squares and main river systems is indicated. Recently extinct and uncertain historic localities of *M. margaritifera* are as follows: No. 4 Orlice, Doubrava, Chrudimka; No. 5 Lužická Nisa/Lausitzer Neisse, Ploučnice; No. 6 Kladská Nisa/Nysa Klodzka; and No. 7 Bečva. Current populations are labelled according to their affiliation with the conservation units (CU). No. 1 Blanice CU comprises populations in Blanice, Zlatý potok, part of Teplá Vltava (southwestern Czech Republic) and Jankovský potok (central Czech Republic). No. 2 comprises Malše/Maltsch and part of Teplá Vltava. No. 3. Saale comprises populations in Lužní potok/Zinnbach and Bystřina/Wolfsbach. More details regarding the CUs are given in Fig. 5. Population reinforcement with grown juveniles according to their numbers is indicated by the symbol size (triangles). The arrows indicate the streams of Švarcava/Schwarzbach, Kamenný potok/Bieberbach and Kouba/Chamb (Danube Basin) that flow from the Czech Republic to Bavaria and Germany, where significant populations still occur.

Streams were usually inspected at the beginning of the growing season after the water had receded from the elevated spring levels but before the foliage grew on bank-shore trees and before the periphyton overgrowth reduced the visibility within the stream. The abundance of pearl mussels in smaller, shallower streams, order II – IV according to Strahler (Strahler, 1957), with relatively lower numbers of individuals (Bauer, 1992; Hastie and Cosgrove, 2002) was assessed by complete screening as counting from the shore or carefully wading directly through a particular stream. Using this approach, all mussels visible on the sediment surface were directly counted using an aquascope ( $\varnothing$  12 cm) with additional lighting for shadowed microhabitats or using a magnifying glass for detecting juveniles. This methodology was repeatedly conducted in Blanice, Lužní potok, and Bystřina (Fig. 1 localities no. 1 and 3). In the other locations, the complete screening approach was not used due to the habitat size. The occurrence of mussels was screened only in habitats that were presumed suitable, and shells and mussel remains were noted where mussels may have been overlooked upstream. Therefore, mussel abundances in larger habitats should be considered minimum estimates of the likely abundances.

We distinguished between the following two types of localities: localities with living individuals and extinct localities with no signs of freshwater pearl mussels. As such, we assessed localities with previously known freshwater pearl mussel populations but repeatedly found no individuals or only empty shells (Young

et al., 2001). Reliable evidence of extirpation is available only at a few sites because the streams with severely altered habitats that are not expected to significantly improve are not priorities of the national action plan.

A reconstruction of the historical areal distribution for comparison with the current distribution of pearl mussel populations was conducted in South Bohemia (southwest of the Czech Republic), where the historical distribution was sufficiently described due to previous pearl fishing. We compared the occurrence in streams of order IV and higher according to Strahler because the data on smaller streams may have been underestimated.

Comparative analysis of the distributions of both historical and current localities based on stream-order flow (Strahler, 1957) and altitude was conducted using a GIS tool (MapInfo) at a map scale of 1:10,000. The term “locality” refers to a site with freshwater pearl mussel presence within a stream or stream section (the stream section should be at least 10 km in length; we used this approach for localities with continuous occurrences of mussels). Localities with a total abundance of less than 10 individuals and artificial habitats (millraces) were not included in the analysis. Elevations above sea level (m a.s.l.) were determined in the middle section of the stream section, and the data were then categorised into 50 m intervals. Because the historical data actually underestimated the occurrence of freshwater pearl mussels in streams of order III and lower, we used absence–presence records.

**Table 1**

Overview of the recent localities, population sizes and reinforcements of freshwater pearl mussels in the Czech Republic. Border streams and recently extinct localities were included. For levels of legal protection, the following abbreviations were used: EVL (EC Habitats Directive Natura 2000 protected area); I – IV (national protected area according to the IUCN classification), BG (Biogenetic Reservation of the Council of Europe id CZ930001). For population reinforcement, F is fish infestations (for upper Blanice see details in Table 2) and the numerical value is the number of released grown juvenile mussels. For population screening, the year and discovered size of the mussel population ( $N_{ind}$ ) are indicated. The number of juveniles (out of all individuals) was underestimated because we only counted individuals visible on the sediment surface; in some localities, this information was not available (n.a.).

Basin	Local basin	River	Locality	Country	Legal protection	Population reinforcement ( $N_{ind}$ , year)	Population screening (year)	Population size ( $N_{ind}$ )	Subadults		
Elbe (CZ/DE)	Vltava (CZ)	Blanice	Blanice upper	CZ	EVL, IV, BG	F (1984 – 1995); 49,468 (1995 – 2005)	2010	10,120	>1%; locally >10%		
			Blanice lower and Zlatý potok lower	CZ	EVL, IV	0	2011	358	>1%		
			Zlatý potok upper	CZ	EVL	887 (2002 – 2003)	2005	1,720	>10% 184 ind.		
			Dluhoštský potok	CZ	IV	0	2011	0	0		
			Chvalšinský potok	CZ	IV	0	2006	6	n.a.		
			Křemžský potok	CZ	IV	0	2005	50	n.a.		
			Malše upper	CZ/AU	EVL, IV	438 (2005)	2012	>440 <sup>a</sup>	>10% 49 ind.		
			Malše lower	CZ	EVL	0	1996	202	n.a.		
			Teplá Vltava	CZ	EVL,II	F (1999 – 2003); 1180 (1998)	2013	>331 <sup>a</sup>	>1% 18 ind.		
			Sázava	CZ	EVL,IV	42 (2005)	2012	2	2 ind.		
			Saale (DE)	Regnitz (DE)	Jankovský potok and Kladinský potok	CZ	EVL,IV	34 (2003)	2009	594	n.a.
					Bystřina	CZ/DE	EVL, III	0	2013	1	1 ind.
					Rokytnice upper	CZ/DE	EVL, IV	1,329 (1995 – 2001)	2013	2,034	1% 19 ind.
					Lužní potok	CZ/DE	EVL, IV	0	2012	12	0
					Újezdský potok	CZ/DE	–	0	2012	0	0
Order (CZ/PL)	Odra (PL)	Nysa Klodzka (PL)	Černý potok	CZ	–	0	1992	0	0		
			Kočíč potok	CZ/PL	–	0	1977	0	0		
			Smědá	CZ	–	0	1977	0	0		
Lausitzer Neisse (CZ/PL/DE)	Smědá	Smědá	Černý potok	CZ	–	0	1992	0	0		
			Kočíč potok	CZ/PL	–	0	1977	0	0		
			Smědá	CZ	–	0	1977	0	0		

<sup>a</sup> Indicates that the method of complete screening could not be used due to the habitat size (see Methods).

### Analysis of the freshwater pearl mussel population genetic structure

To describe the genetic structure of Czech freshwater pearl mussel populations, we analysed 134 individuals at 10 localities: two locations at the upper Blanice (20 and 15 ind.), two locations at the lower Blanice (9 and 8 ind.), the upper Zlatý potok (16 ind.), the upper Malše (15 ind.), Teplá Vltava (15 ind.), Bystřina (15 ind.), Lužní potok (15 ind.), and Jankovský potok (6 ind.). DNA was extracted using the DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen) from the haemolymph of living adult and subadult individuals, except for one sample that was obtained from a deceased adult. Haemolymph was sampled non-invasively and under a special permit following the protocol of Geist and Kuehn (Geist and Kuehn, 2005).

All individuals were genotyped for 12 microsatellite loci (MarMa 1632, MarMa 2671, MarMa 3050, MarMa 3621, MarMa 4322, MarMa 4726, MarMa 5167, MarMa 5280, MarMa 3116, MarMa 4277, MarMa 4315, and MarMa 4859; Geist et al., 2003) using the Multiplex PCR kit (Qiagen), followed by a fragment analysis on an automatic sequencing machine (ABI 3130 Genetic Analyser, Applied Biosystems). The genotypes were scored using GeneMapper Software 3.7 (Applied Biosystems). To assess the relationship among individuals, we performed a factorial correspondence analysis (FCA) using the program Genetix 4.05.2 (Belkhir et al., 2004).

### Age structure assessment

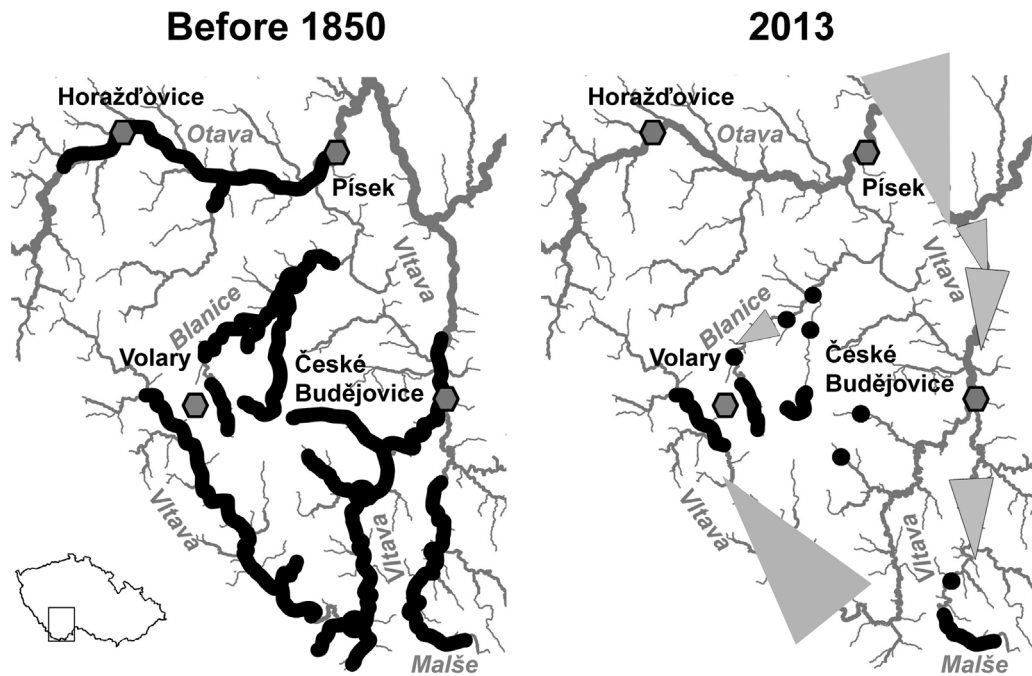
The laws forbidding the handling of mussels in their natural habitat prevented the possibility of construction of cohort diagrams

and the exact determination of the age structure of Czech freshwater pearl mussel populations. However, living individuals were measured during emergency transfers due to habitat loss, such as drought or construction in streams. Such transfers were conducted recently at two localities, Blanice and Zlatý potok, in 2000 and 2002, respectively, on sets of 1408 and 87 individuals.

An individual assessment of the age of living freshwater pearl mussels was possible due to the knowledge of size-to-age relationships previously determined using deceased individuals. Shells of various sizes were collected from particular localities and were analysed using the ligament-sectioning technique according to Hendelberg (Hendelberg, 1961). The annuli were counted, and a regression curve specific to each locality was computed (archived by NCA CR) using the measured length (i.e., length of shell, length of ligament, and length of corroded ligament). Each living individual was measured with an accuracy of 0.1 mm (length of shell, length of ligament, and length of corroded ligament). By comparing the data obtained with the regression curve for each particular locality, we determined the age of the individual to a decadal accuracy.

The approximate dates of the ceased natural reproduction were based on cohort diagrams. Alternatively, we used knowledge of the last known occurrences of small individuals under 6.5 cm that were presumably juveniles (Young et al., 2001).

To estimate the proportion of juveniles in the current populations, the age classes (adult/subadult) of smaller mussels were assessed by inspecting the distance between the outer edges of exhalant and inhalant apertures. Individuals with both siphons within a 3 cm distance were included in the subadult category (Matasová et al., 2013). Because no overlap occurs in the sizes of



**Fig. 2.** Detailed overview of the range reduction of the *M. margaritifera* in the southwest part of the Vltava River Basin between 1850 and 2013. The presence of mussels is indicated with a black line or points in streams that are order IV and higher (according to [Strahler, 1957](#)). The triangles show constructed dam reservoirs.

adult and subadult mussels, we could distinguish younger mussels with a high level of accuracy.

#### Population reinforcement

Population reinforcement of *M. margaritifera* was conducted in all remaining localities within the last three decades. To avoid genetic transfers between areas of population reinforcement, the identity of the local population was strictly respected, and only local genotypes for each particular locality were used. Czech population reinforcement efforts were conducted via two approaches: the release of glochidia-infected fish or the release of captive-bred juveniles (the ages varied between 3 and 5 years on average). The year(s) of the population reinforcements are summarised in [Tables 1 and 2](#). In Blanice, Lužní potok and Zlatý potok, juveniles were released into specially built side-arms with special meadow management to provide optimal habitat conditions ([Hruška, 1999](#)).

## Results

#### The historic occurrence of freshwater pearl mussels

The range of the historical occurrence of freshwater pearl mussels in the Czech Republic is depicted in [Fig. 1](#). *M. margaritifera* historically lived in the drainage areas of the North Sea, and abundant populations lived in the mountainous streams south of the Elbe Basin (Vltava, Saale). The most abundant populations were found in the catchment area of the Vltava (Moldau) in South Bohemia (southwest of the Czech Republic), primarily in large rivers, such as Otava to Písek, Blanice, and Malše (Maltsch) and Vltava to České Budějovice ([Fig. 2](#)). The species was also occasionally found in upper streams of the Odra Basin bordering Poland (northeast of the Czech Republic; drainage of the Baltic Sea; [Table 1](#)). These populations (Lužická Nisa: no. 5 in [Fig. 1](#); Kladská Nisa no. 6 in [Fig. 1](#)) were isolated, sparse, and located at lower altitudes. These populations are currently extinct. The last known evidence of mussels living within the Lužická Nisa catchment was in Kočičí potok, where two individuals were found in 1940. In 1977,

only shell remains were found. The last known populations in the Kladská Nisa Basin (Černý potok near village Vidnava) had disappeared by 1991.

Other traditionally listed but uncertain historical occurrences of freshwater pearl mussels were in the Danube Basin (no. 7 in [Fig. 1](#); southeast of the Czech Republic; Black Sea) and Elbe localities, such as Orlice, Doubrava, and Chrudimka (no. 4, Central Czech Republic; [Dyk, 1947](#)).

#### The present status of freshwater pearl mussel populations

The current total size of *M. margaritifera* populations in the Czech Republic was estimated as 16,000 individuals ([Table 1](#)). The freshwater pearl mussel has disappeared from all localities at altitudes below 500 m a.s.l. and from large rivers and streams (order V and higher). Therefore, most of the current localities can be found near the upper limit of the mussel's historical range at altitudes of approximately 700 m a.s.l. and in streams of order III – IV ([Fig. 3](#)).

The most abundant populations in South Bohemia, which is known in the catchment area of the Vltava River, disappeared from 90% of the localities between 1850 and 2012; an estimated 99% of the population died out ([Fig. 2](#)). The current populations are mainly preserved in river systems of Blanice, Zlatý potok and Teplá Vltava. Freshwater pearl mussels can also be found in the Malše River on the Czech-Austrian border. The second largest zone of freshwater pearl mussels in the Czech Republic is located in the western Saale Basin in the connected system of Lužní potok, Bystřina and Rokytnice on the Czech – Germany border.

A specific feature of the Czech mussel populations is the large number of localities at state borders in transboundary river basins ([Fig. 1](#), [Table 1](#)), such as at Malše/Maltsch or other sites on the border of Germany. The Švarcava/Schwarzbach, Kamenný potok/Bieberbach and Kouba/Chamb streams flow from the Czech Republic to Bavaria, Germany where there are significant mussel populations ([Fig. 1](#)). Similarly, Rokytnice/Regnitz, Pekelský potok/Höllbach and Újezdský potok/Mähringsbach host populations near state borders and downstream in Bavaria ([Fig. 1](#)).

**Table 2**  
Summary of the release of fish (*Salmo trutta m. fario*) infected with glochidia of *M. margaritifera* at the upper Blanice between 1984 and 1995.

Year	1984	1985	1986	1987	1988	1989	1990	1991	1992	1993	1994	1995	Total
Number of host fish	665	600	235	400	609	320	690	443	430	510	484	423	5809
Average N glochidia per fish (ind. 10 <sup>3</sup> )	1.5	1.5	3.2	3.0	1.3	3.0	3.5	1.0	1.5	2.0	2.0	2.0	2.125
Proximate total N glochidia (ind. 10 <sup>6</sup> )	1.00	0.90	0.75	1.20	0.79	0.96	2.42	0.44	0.65	1.02	0.97	0.85	10.09

In the Sázava Basin, central Czech Republic (i.e., Jankovský potok and its tributary Kladinský potok), mussels are threatened because of significantly altered habitats (see characteristics in Supplement A). The last fragment of the population has only two individuals, which were found during a population screening in 2012 (Table 1).

#### Genetic structure of populations

The genetic analysis of the current population structure showed three distinct groups, referred to as conservation units (CU), in the Czech Republic (Fig. 5). CU 1 contains the populations that inhabit the majority of the Vltava Basin (Blanice, Zlatý potok and Teplá Vltava) and, surprisingly, the population from the remote locality of the Sázava Basin (Jankovský potok). CU 2 includes individuals from Malše that belong also to the Vltava Basin and some of the individuals originating from Teplá Vltava, where both CU 1 and CU 2 individuals are present (Fig. 2). CU 3 comprises mussels from the geographically distant localities of the Saale Basin in the western Czech Republic. This genetic structure was respected during population reinforcement efforts.

#### Age structure of Czech populations and efforts for population rejuvenation

In most of the Czech populations of *M. margaritifera*, only adult and elderly individuals are present. Detailed information regarding age structure is available only for Blanice and Zlatý potok, which both show a lack of natural recruitment during the last three decades (Fig. 4). The most recent records of juveniles in the Czech

Republic were as follows: upper Blanice, decline from 1965 to 1977; lower Blanice, last recorded in 1952; upper Zlatý potok, between 1965 and 1975; and Křemežský potok, 1971. In western localities, the last juveniles were recorded in Lužní potok between 1965 and 1975 and in Bystřina between 1970 and 1980. In summary, interruption of the reproductive cycle began in the third quarter of the 20th century.

Nevertheless, in recent years, we came across evidence of active (or recently active) natural reproduction in two localities. We found juveniles in the lower Blanice (in an artificial locality of a millrace in 2011; 15 ind.) and in the upper Malše (2012; 38 ind.) These localities were never supported by artificial rejuvenation efforts (see below).

The impaired age structure of the Czech mussel populations led to measures aimed at improving the proportion of the juveniles in populations with respect to local genotypes (see above). Juveniles and subadults are currently present in several populations that were reinforced via the release of infested trout and/or the release of grown juveniles reared through semi-natural breeding methods in recent decades (Table 1). Trout with attached glochidia on their gills were stocked in two localities: the upper Blanice and Teplá Vltava. In the upper Blanice, approximately 6000 fish were released between 1984 and 1995; in total, the fish carried approximately 10 million glochidia (Table 2). Between 1999 and 2002, 415 trout with an average of 2000 glochidia were released in Teplá Vltava, carrying in a total of 0.83 million freshwater pearl mussel glochidia.

Five localities (upper Blanice, upper Zlatý potok, upper Malše, Teplá Vltava and Lužní potok) were significantly enhanced by the release of grown juveniles. A total of 53,302 individuals were released, with a minimum of several hundred mussels in each location (Table 1). Two other localities (Jankovský potok and Bystřina) received fewer juveniles, with tens of individuals at most (see Table 1 for detailed information).

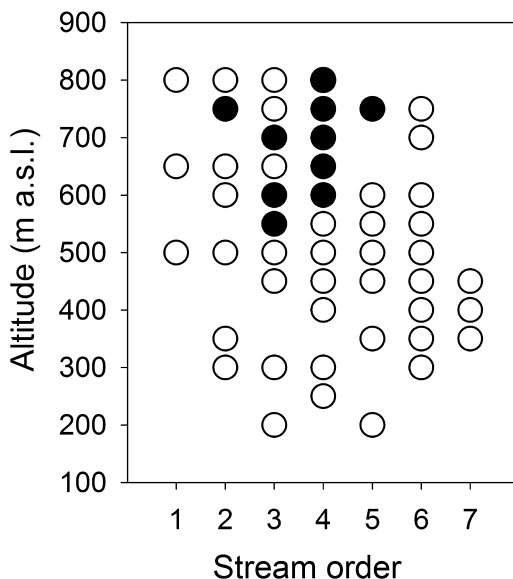
After completing the hidden hyporheal life phase, juveniles emerge at the sediment surface in respective time. However, no cohort was found after the release of the infested fish in Blanice. Similarly, we did not see any results in Teplá Vltava yet. In contrast, we detected juveniles at the grown juvenile release sites at all reinforced localities. The most significant proportion of juveniles was observed in the upper Blanice and upper Zlatý potok, where younglings composed 10% of the population (Table 1). Because of the small size of mussels and their partially hidden life cycle, the estimated abundances are likely underestimated.

## Discussion

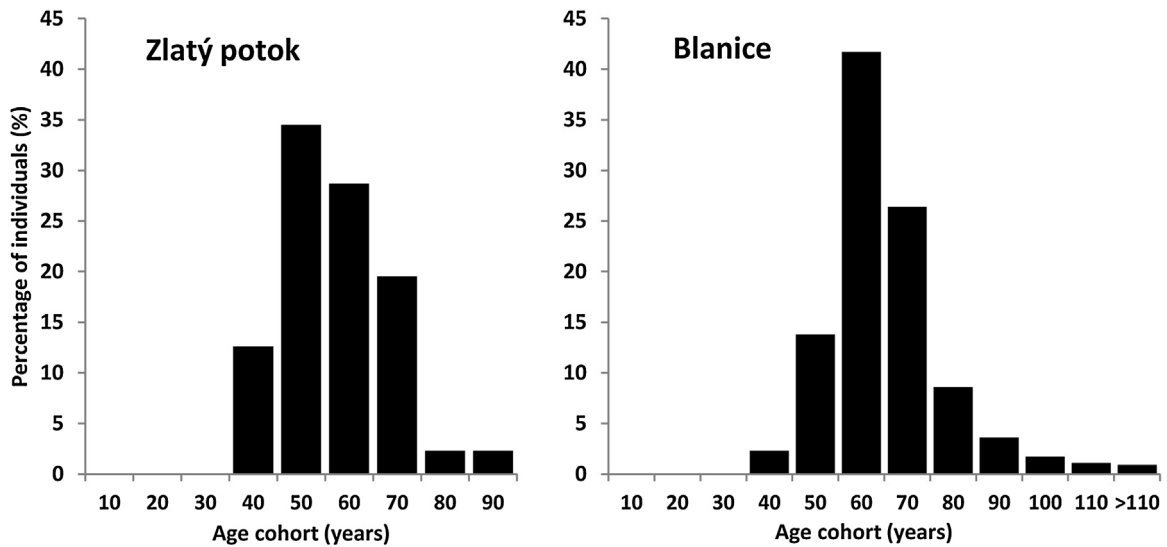
### Historic range of freshwater pearl mussels and possible transfers

The reconstruction of the original range of the mussels in the Czech Republic was based on a number of well-documented reports on their occurrence or on pearl fishing. The species was economically important, particularly in South Bohemia (Dyk, 1992); thus, the occurrence data presented here is considered valid. Nevertheless, less numerous populations or upstream populations were likely overlooked. This is evidenced by the fact that most of the current localities lack historical data.

Some records of *M. margaritifera* in the central Elbe Basin and in the Moravian area of the Danube Basin are uncertain (no. 4 and



**Fig. 3.** Altitudinal distribution of freshwater pearl mussel localities in the Czech Republic with respect to stream order, according to Strahler. Historic extinct localities (open circles) and current localities (full circles) are indicated. The term locality refers to a site where *M. margaritifera* is present in a stream or a 10 km section of a stream where localities are continuous at longer distances. The elevation was determined in the middle of the transect and then categorised into 50 m intervals.

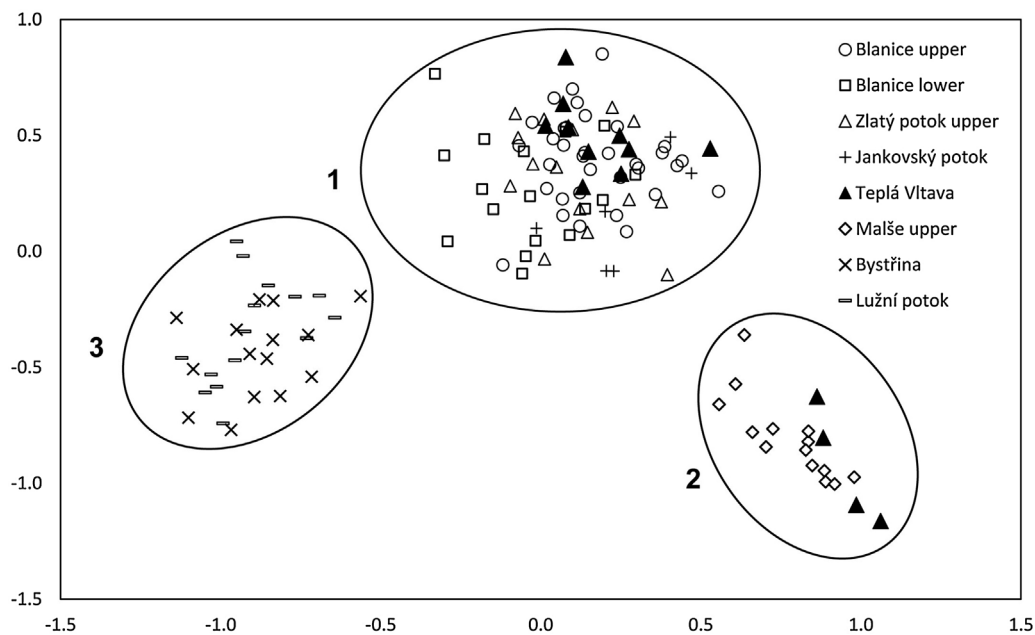


**Fig. 4.** Age cohort diagram (using the ligament-sectioning technique) for two Czech freshwater pearl mussel populations. The data were obtained during emergency transfers of the populations in Zlatý potok in 2002 ( $N_{ind} = 87$ ) and in Blanice in 2000 ( $N_{ind} = 1408$ ). The data originated from the archive of NCA CR (J. Hruška).

7, Fig. 1). However, the streams flowing from the Danube – Elbe drainage divide to the Danube are inhabited by freshwater pearl mussels at a number of localities in northern Bavaria, Germany, and Austria (Geist and Kuehn, 2005; Gumpinger et al., 2002). In addition, reports of freshwater pearl mussel occurrence in the Morava Basin may have resulted from confusion with the thick shelled river mussel (*Unio crassus*), which is similar in morphology and still occurs in many river basins (Douda et al., 2012). Additionally, the Czech scientific name did not distinguish between the genera *Unio* and *Margaritifera* until the 1950s. Further detailed research on historical data is therefore needed.

A special feature of the occurrence of freshwater pearl mussels in Central Europe is that they are present despite the major drainage divide of the Elbe – Danube – Oder (Geist and Kuehn, 2005). One

possible explanation is that the flow path within the watershed changed in the geological past (Geist and Kuehn, 2005). Nevertheless, some populations may have been established as a result of the deliberate transfer of infected fish or *M. margaritifera* individuals for subsequent pearl harvesting. In the Czech Republic, such profit-motivated attempts were documented within the basin of the Vltava River in the 18th and 19th centuries (Štěpán, 1927 in Dyk and Dyková, 1974). Similar effects in the Middle Ages when fish-pond culturing and intense pearl fishing were frequent cannot be ruled out (Dyk, 1947). Therefore, some isolated Czech populations of *M. margaritifera* could have come from human activities. This might explain why mussels from the geographically remote locality of Jankovský potok (Fig. 1) are attributed genetically to the South Bohemian CU 1 Blanice. Further research on the genetic



**Fig. 5.** The genetic structure of the Czech freshwater pearl mussel population as determined by microsatellite analysis. The results of the factorial correspondence analysis are shown, and each genotyped individual is displayed as a point in a two-dimensional space, which is defined by two factorial axes that represent factors explaining the majority of the variability in the given dataset. The individuals analysed form three clusters, referred to as conservation units (CU), CUs are labelled as follows: No. 1 refers to Blanice CU, No. 2 is Malše CU, and No. 3 is Saale CU. The numbers correspond to Fig. 1.



structure could determine whether the Jankovský potok population was established through a few founders and could provide evidence of the founder effect documented in Waldaist, Austria, and other localities in Germany and Luxemburg (Geist and Kuehn, 2005). Alternatively, the population may have descended from a more abundant and widespread metapopulation in the past. A similar history was suggested for a number of currently small populations in the Danube Basin whose genetic markers indicated their natural origin (Geist and Kuehn, 2005). However, it may never be possible to reveal the true origin of freshwater pearl mussels in this locality due to their rapid population decline (Table 1).

#### Current range and fragmentation

Current populations of freshwater pearl mussels in the Czech Republic are located at high altitudes near the upper limit of the historical range and in minor upper streams (Figs. 2 and 3). Certain populations were likely maintained due to pronounced changes in the settlement after 1945 that significantly reduced human pressure on the ecosystem: a military training area is upstream of Blanice; Malše, Lužní potok and Bystřina are in the former Iron Curtain border zone. Elimination of human settlements allowed mussel populations to survive until conservation efforts were initiated in the 1980s (Hruška, 1985), while other once abundant populations in lowlands, such as lower Vltava and Otava (Fig. 2), completely died out in the first half of the 20th century.

The current range is also significantly fragmented. Rivers were transformed by damming (Fig. 2) and weirs that both block natural fish migrations (Musil et al., 2012). For example, salmon was a possible host for glochidia and was previously abundant in all localities with freshwater pearl mussels, except at Blanice (Frič, 1894). However, the first dam built on the lower Elbe in 1939 eliminated salmon occurrence in the Czech Republic. In addition to physical barriers in the streams, fragmentation of the habitat may arise from industrial and agricultural pollution (Dyk, 1992; Hruška, 1999). Poor conditions reduced the survival of trout and mussels and led to the separation of upstream and downstream localities.

Vltava populations (Blanice, Teplá Vltava, and Otava) were likely connected to other populations within the drainage divide of the North Sea (i.e., metapopulation occurrence). This hypothesis was supported by a microsatellite analysis when the relatively distant populations were clustered into one CU (Fig. 5). However, this system is no longer connected (Fig. 2). Western localities, including Lužní potok and Bystřina in the Saale Basin, which form one CU, are still interconnected. The Malše CU, which is relatively close to the Blanice CU but is distinct, is analogical to other localities found in Europe (Geist and Kuehn, 2005; Geist et al., 2010) where genetically unique populations are still present despite the connectivity of river systems and short distances.

#### Lack of natural reproduction

Long-term failure in completing the reproductive cycle is probably connected to poor habitat quality due to anthropogenic changes or the range limits of the species. For example, high altitudes (Figs. 2 and 3) with lower temperatures may prevent completion of the parasitic glochidial phase of the life cycle (Hruška, 1992). Two documented populations with scarce natural production of juveniles (lower Blanice and Malše) thrive in altered habitats. Despite a small proportion of younglings present, the populations never increased in abundance or experienced improved age structures (Absolon and Hruška, 1999).

Nearly all current localities where *M. margaritifera* occur are in protected areas (Table 1) that are intended to restrict the intensity of building, farming, timber industry and sewage water management (NCA CR, 2013). However, significant improvements in river

health and declines in pollution in the last decade have not yet resulted in the restoration of the mussels' natural reproduction in the Czech Republic. At all localities, some parameters of the habitat are unsuitable for *M. margaritifera*, as defined by the action plan (Supplement A); therefore, passive protection of areas without active restoration of complex habitat features does not result in the desired improvement of the habitat quality (Maiorano et al., 2008; Geist, 2011; Laurance et al., 2012) that would subsequently lead to successful reproduction and juvenile survival.

#### Effectiveness of breeding efforts

The release of infected trout and grown juveniles is among the most frequently used techniques to enhance natural populations of freshwater pearl mussels (Gum et al., 2011). In this context, it is important to be aware of the quality of the environment at the release sites for survival of the youngest individuals. Experience and bioindicator tests from the Czech Republic showed that environmental quality meets the requirements of first stage juveniles at one location only (NCA CR, 2013). Thus there is no evidence of juvenile emergence from sediment at Blanice after 10 million glochidia (on trout) were released between 1984 and 1995, even though their proper development on gills was monitored by fish recapture (Hruška, 2000). Subsequent bioindicator tests at this site identified insufficient trophic conditions for the earliest and most sensitive life stages after metamorphosis and the beginning of hyporheal life (Hruška, 1999). Since then, infected trout have not been released at Blanice because the method is assumed to be inefficient. In contrast, at Teplá Vltava, where infested fish were released between 1999 and 2003, there are suitable conditions for the survival and growth of the youngest individuals, as suggested by bioindicator tests. Nevertheless, direct evidence of recruitment, such as the occurrence of juveniles and subadults (Matasová et al., 2013), is still missing. To evaluate the true effect of this measure, we must wait for the completion of the hyporheal life phase, which can take up to 20 years.

The release of juveniles (ages 3 – 5) showed more promising results. The population at Blanice was greatly enhanced as a result of the release of nearly 53,000 juveniles over 11 years into specially built side-arms in managed meadows adjacent to streams, which provided optimal habitat conditions for juveniles (Hruška, 1999). Similarly, in Zlatý potok, the proportion of subadults in the population has increased 10%, but the population rejuvenation is not yet sufficient to ensure the future persistence of freshwater pearl mussels. Therefore, the sole release of tens of thousands of grown juveniles that undergo natural mortality may not be adequate measure to keep freshwater pearl mussel in a particular streams and rivers. This highlights the urgent need for active habitat improvement that will allow natural reproduction in the near future; this improvement is included in the Czech action plan for freshwater pearl mussels.

#### Conclusions

All Czech populations of *M. margaritifera* are highly skewed towards old individuals and fragmented altered habitats. Conservation efforts for preserving this species in the Czech Republic began approximately 30 years ago. The critical factors were identified as the poor habitat quality, which is manifested in the failure of the complete reproductive cycle, and juvenile survival. Long-term breeding activities involving either the release of infected trout or grown juveniles have resulted in partial rejuvenation of several populations. Nevertheless, the proportion of young mussels is still below the levels of intact, self-recruiting populations. Based on these results, the Czech action plan has not yet been successful,

and further significant improvements in environmental conditions are the key to the future survival and natural recruitment of the freshwater pearl mussel in the Czech Republic.

### Acknowledgements

O.P.S and M.B. were supported by grant from the Czech Ministry of Environment (MZP 0002071101). I.V. received institutional support RVO:60077344. Support for K.D. was obtained from the Czech Science Foundation (13-05872S) and ESF/MSMT (CZ.1.07/2.3.00/30.0040). H.P. was supported by a grant from the EEA and Norway Grants (no. 009/2). Data on the present occurrence and proportion of juveniles were collected during the run of the action plan for the freshwater pearl mussel (available at [www.zachranneprogramy.cz](http://www.zachranneprogramy.cz)) managed by the Nature Conservation Agency of the Czech Republic, which is funded by the government of the Czech Republic. We would like to thank the two reviewers whose valuable comments improved an earlier version of this manuscript. We would also like to thank Karel Absolon, Mojmir Eliáš, Ondřej Volf, Tereza Mináriková, Jan Švanyga, Ondřej Spisar, Denisa Blažková, Richard Faina, Dětmár Jäger, Eva Zelenková and Bohumil Dort for their long-term cooperation during the action plan. Ondřej Spisar also assisted with the haemolymph sampling in the microsatellite analysis. Jan Vrba helped with the GIS analysis. We also thank Josef Rebec and Vojtěch Mrázek for their support in the field work. Věra Kladivová helped gather the historical information.

### Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.limno.2014.11.004>.

### References

- Absolon, K., Hruška, J., 1999. Záchraný program perlorodky říční (*Margaritifera margaritifera* Linnaeus, 1758) v České republice (Action plan for freshwater pearl mussel (*Margaritifera margaritifera* Linnaeus, 1758) in the Czech Republic). NCA CR, Prague, pp. 1–27.
- Altmüller, R., Dettmer, R., 2006. Successful species protection measures for the freshwater pearl mussel (*Margaritifera margaritifera*) through the reduction of unnaturally high loading of silt and sand in running waters. Inform. D. Naturschutz Niedersachsen 26, 192–204.
- Araujo, R., Ramos, M.A., 2001. Action plan for *Margaritifera margaritifera* in Europe. Nat. Environ. 117, 29–66.
- Bauer, G., 1988. Threats to the freshwater pearl mussel *Margaritifera margaritifera* L. in Central Europe. Biol. Conserv. 45, 239.
- Bauer, G., 1992. Variation in the life span and size of the freshwater pearl mussel. J. Anim. Ecol. 61, 425–436.
- Bauer, G., Schrimpf, E., Thomas, W., Herrmann, R., 1980. Relations between the decline of the freshwater pearl mussel (*Margaritifera margaritifera*) in the Fichtelgebirge and the water quality. Archiv. für Hydrobiol. 88, 505–513.
- Bauer, G., Wächtler, K., 2001. Ecology and evolution of the freshwater mussels Unionida. Ecol. Stud. 145, 1–394.
- Belkhir, K., Borsari, P., Chikhi, L., Raufaste, N., Bonhomme, F., 2004. GENETIX 4.05, Logiciel Sous Windows TM Pour la Génétique des Populations, Montpellier (France).
- Buddensiek, V., Ratzbor, G., 1995. Restoration of sedimental quality in a small brook of the Lüneburger Heide, Northern Germany. Folia 91, 19–24.
- Buddensiek, V., 1995. The culture of juvenile freshwater pearl mussels *Margaritifera margaritifera* L. in cages: a contribution to conservation programmes and the knowledge of habitat requirements. Biol. Conserv. 74, 33–40.
- Douda, K., Horký, P., Bílý, M., 2012. Host limitation of the thick-shelled river mussel: identifying the threats to declining affiliate species. Anim. Conserv. 15, 536–544.
- Dyk, V., 1947. České perly (život, ochrana a národohospodářský význam perlorodek) (Czech pearls – Life, Protection and National Economic Importance of Pearl Mussels). Josef R. Vilímek, Praha (in Czech).
- Dyk, V., 1992. Profilová ohrožovatelé lokalit perlorodky říční (Main threats to freshwater pearl mussel localities). Erica, Plzeň 1, pp. 21–38 (in Czech).
- Dyk, V., Dyková, S., 1974. The pearl oyster (*Margaritifera margaritifera* Linnaeus 1758) a neglected indicator of the pollution of mountain and submountain water flows of the crystalline region in Czechoslovakia. Acta Veterinaria 43, 287–304.
- Ehrendorfer, F., Hamann, U., 1965. Vorschläge zu einer floristischen Kartierung von Mitteleuropa. Ber. Deutsch. Bot. Ges. 78, 35–50.
- Flasar, I., 1992. Frühere Verbreitung der Flußperlmuschel (*Margaritifera margaritifera* (L.)) im Friedländer Gebiet in Nordböhmen (Eulamellibranchiata: Margaritiferidae). Malakologische Abh. 16, 83–87.
- Frič, A., 1894. Losos labský—biologická a anatomická studie (Elbe Salmon—A Biological and Anatomical Study). František Rývnáč, Praha (in Czech).
- Geist, J., 2010. Strategies for the conservation of endangered freshwater pearl mussels (*Margaritifera margaritifera* L.): a synthesis of conservation Genetics and ecology. Hydrobiologia 644, 69–88.
- Geist, J., 2011. Integrative freshwater ecology and biodiversity conservation. Ecol. Indic. 11, 1507–1516.
- Geist, J., Kuehn, R., 2005. Genetic diversity and differentiation of central European freshwater pearl mussel (*Margaritifera margaritifera* L.) populations: implications for conservation and management. Mol. Ecol. 14, 425–439.
- Geist, J., Rottmann, O., Schröder, W., Kühn, R., 2003. Development of microsatellite markers for the endangered freshwater pearl mussel *Margaritifera margaritifera* L. (Bivalvia: Unionoidea). Mol. Ecol. Notes 3, 444–446.
- Geist, J., Söderberg, H., Karlberg, A., Kuehn, R., 2010. Drainage-independent genetic structure and high genetic diversity of endangered freshwater pearl mussels in northern Europe. Conserv. Genet. 11, 1339–1350.
- Gum, B., Lange, M., Geist, J., 2011. A critical reflection on the success of rearing and culturing juvenile freshwater mussels with a focus on the endangered freshwater pearl mussel (*Margaritifera margaritifera* L.). Aquatic Conserv.: Mar. Freshw. Ecosyst. 21, 743–751.
- Gumpinger, K., Heinisch, W., Moser, J., Ofenböck, T., Stundner, C., 2002. Die Flußperlmuschel in Österreich. Umweltbundesamt—Federal Environmental Agency Austria, Wien, pp. 1–55.
- Hastie, L.C., Cooksley, S.L., Scougall, F., Young, M.R., Boon, P.J., Gaywood, M.J., 2004. Applications of extensive survey techniques to describe freshwater pearl mussel distribution and macrohabitat in the River Spey, Scotland. River Res. Appl. 20, 1001–1013.
- Hastie, L.C., Cosgrove, P.J., 2002. Intensive searching for mussels in a fast-flowing river: an estimation of sampling bias. J. Conchol. 37, 309–316.
- Hendelberg, J., 1961. The Freshwater Pearl Mussel *Margaritifera margaritifera* (L.). Report of the Institute of Freshwater Research, Drottingholm, vol. 41 pp. 149–171.
- Hruška, J., 1985. Ochrana perlorodky říční v CHKO Šumava-jih. (Conservation of freshwater pearl mussel in a southern region of Bohemian Forest protected landscape area). Památky a příroda 9, 559–562 (in Czech).
- Hruška, J., 1991a. Projekt Záchrana perlorodky říční v České republice 2. část Biotop perlorodky říční (The freshwater pearl mussel conservation project in the Czech Republic. Part 2: freshwater pearl mussel biotopes). Památky a příroda 16, 609–612 (in Czech).
- Hruška, J., 1991b. Projekt Záchrana perlorodky říční v České republice 1.část. Základní charakteristika a příčiny ohrožení (The freshwater pearl mussel conservation project in the Czech Republic. Part 1.: Basic characteristic and causes of a threat). Památky a příroda 12, 545–548 (in Czech).
- Hruška, J., 1992. The freshwater pearl mussel in South Bohemia: evaluation of the effect of temperature on reproduction, growth and age structure of the population. Arch. Hydrobiol. 126, 181–191.
- Hruška, J., 1999. Nahrungsansprüche der Flußperlmuschel und deren halbnatürliche Aufzucht in der Tschechischen Republik. Helldia 4, 69–79.
- Hruška, J., 2000. Experience of semi-natural breeding programme of freshwater pearl mussel in the Czech Republic. Ergebnisse des Kongresses vom 16.-18.10.2000 in Hof. Die Flußperlmuschel in Europa: Bestandssituation und Schutzmaßnahmen, pp. 69–75.
- Laurance, W.F., Useche, C.D., Rendeiro, J., et al., 2012. Averting biodiversity collapse in tropical forest protected areas. Nature 489, 290–294.
- Maiorano, L., Faluccci, A., Boitani, L., 2008. Size-dependent resistance of protected areas to land-use change. Proc. R. Soc. B: Biol. Sci. 275, 1297–1304.
- Matasová, K., Simon, O.P., Dort, B., Douda, K., Bílý, M., 2013. Recent distribution of freshwater pearl mussel (*Margaritifera margaritifera*) at historical localities in the upper part of the Vltava River basin (Czech Republic). Silva Gabreta 19, 139–148.
- Musil, J., Horký, P., Slavík, O., Zbořil, A., Horká, P., 2012. The response of young of the year fish to river obstacles: functional and numerical linkages between dams, weirs, fish habitat guilds and biotic integrity across large spatial scale. Ecol. Indic. 23, 634–640.
- NCA CR, 2013. Záchraný program pro perlorodku říční v ČR (Action plan for the endangered freshwater pearl mussel in the Czech Republic). NCA CR, 1–76 (in Czech).
- Nowak, W., 1936. Perlorodka říční a její perly (se zvláštním zřetelem k poměrům v republice Československé) (Freshwater pearl mussel and its pearls (with respect to the Czechoslovak Republic conditions). Sborník vědeckých ústavů zemědělských ČSR 146, 1–76 (in Czech).
- Popov, I.Yu., Ostrovsky, A.N., 2013. Survival and extinction of the southern populations of freshwater pearl mussel *Margaritifera margaritifera* in Russia (Leningradskaya and Novgorodskaya oblast). Hydrobiologia 735, 161–177.
- Podubský, V., Štědrónský, E., 1955. Doplňky k biologii perlorodky (*Margaritifera margaritifera* L.). (Supplements to Freshwater pearl mussel (*Margaritifera margaritifera* L.) biology). Živa 3, 155–156 (in Czech).
- Schubert, O., 1933. Über die Perlmuschel – und Perlen – Vorkommen in Böhmen. Landeskulturat für Böhmen, Prag.
- Strahler, A.N., 1957. Quantitative analysis of watershed geomorphology. Trans. Am. Geophys. Union 38, 913–920.
- Strayer, D.L., 2006. Challenges for freshwater invertebrate conservation. J. N. Am. Benthol. Soc. 25, 271–287.

- Svatoš, I., 1971. Výskyt perlorodky říční na úpatí Blanského lesa (Freshwater pearl mussel occurrence in the Blanský les mountains foothills). *Ochrana Přírody* 26, 220–221 (in Czech).
- Tichá, K., Simon, O.P., Douda, K., Kubíková, L., 2012. Detrital components in submontane organogenic springs in relation to their morphology, microhabitats and macroinvertebrates. *Polish J. Ecol.* 60, 163–175.
- Young, M.R., 1991. Conserving the freshwater pearl mussel (*Margaritifera margaritifera* L.) in the British Isles and Continental Europe. *Aquat. Conserv.: Mar. Freshw. Ecosyst.* 1, 73–77.
- Young, M.R., Cosgrove, P.J., Hastie, L.C., Henninger, B., 2001. A standardised method for assessing the status of freshwater mussels in clear, shallow rivers. *J. Molluscan Stud.* 67, 395–396.

## Recent distribution of freshwater pearl mussel (*Margaritifera margaritifera*) at historical localities in the upper part of the Vltava River basin (Czech Republic)

Klára Matasová<sup>1,2,\*</sup>, Ondřej P. Simon<sup>2,3</sup>, Bohumil Dort<sup>4</sup>, Karel Douda<sup>1</sup>  
& Michal Bílý<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup>Faculty of Agrobiolgy, Food and Natural Resources, Czech University of Life Science, Kamýcká 129, CZ-16521 Prague 6, Czech Republic

<sup>2</sup>T. G. Masaryk Water Research Institute, Podbabská 30, CZ-16000 Prague 6, Czech Republic

<sup>3</sup>Faculty of Environmental Sciences, Czech University of Life Sciences Prague, Kamýcká 129, CZ-16521 Prague 6, Czech Republic

<sup>4</sup>Gammarus s.r.o., Za Baštou 349, CZ-38301 Prachalice, Czech Republic  
\*klara.matasova@gmail.com

### Abstract

This article summarises data on the presence of the freshwater pearl mussel (*Margaritifera margaritifera*) in the upper part of the Vltava River basin in the Bohemian Forest (Šumava in Czech) and the Novohradské Hory mountains. The data gathering was based on standard Czech methods. Apart from the well-documented situation in the protected National Nature Monuments Blanice and Zlatý Potok, the presence of this species was recently demonstrated based on observations of live individuals in the Teplá Vltava stream in the Šumava National Park and at the Horní Malše Site of Community Importance. In both localities, adult mussels occur in a scattered distribution or in small colonies. Moreover, the presence of young living individuals or their shells was confirmed. Additional isolated findings come from the Blanice River under the Husinec reservoir, and we found older shells in the Otava River in the millrace at Malé Hydčice. All of the recently documented findings were recorded in localities where the presence of the freshwater pearl mussel was confirmed in the 20<sup>th</sup> century. It follows that the populations of the upper and middle parts of the Vltava River basin have survived at several sites, but at highly reduced densities.

**Keywords:** bivalves, Bohemian Forest, Šumava Mts., Novohradské Hory Mts.

### INTRODUCTION

The freshwater pearl mussel (*Margaritifera margaritifera* Linnaeus, 1758) is a highly endangered species, not only in the southern part of Bohemia but throughout its whole distribution area (BAUER & WACHTLER 2001, GEIST 2010). The main factors affecting the situation of the pearl mussel in southern Bohemia are water pollution (BÍLÝ & SIMON 2007, DOUDA 2010), long term changes in land use and temperature decreases in the upper parts of streams (HRUŠKA 1992), problems with the supply of detrital particles (ABSOLON & HRUŠKA 1999, TICHÁ et al. 2012) and changes in populations of its fish hosts (DUŠEK et al. 2010).

Most of the localities, where the mussels are found are protected by existing or planned management schemes for small specially protected areas or core zones in the Šumava National Park. In general, the protection of this species is based on an Action plan approved by

the Ministry of the Environment of the Czech Republic and pursued by the Nature Conservation Agency of the Czech Republic (ABSOLON & HRUŠKA 1999, ŠVANYGA et al. 2013).

Although the historical distribution of the freshwater pearl mussel in the Vltava River, Otava River, and Malše River and their tributaries is documented (SHUBERT 1933, NOWAK 1936, DYK & DYKOVÁ 1974, HRUŠKA 1991, 1992), comprehensive data on the recent distribution of this species in the upper Vltava River basin is not available.

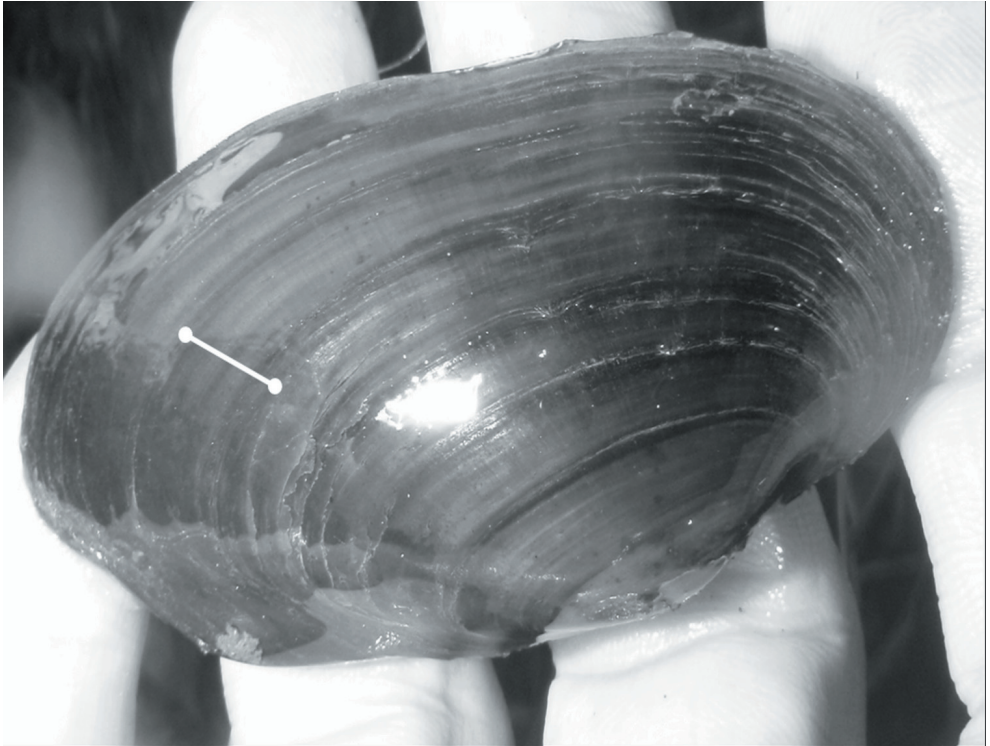
The aim of this report was to summarise recent (2003–2012) published and unpublished data for the freshwater pearl mussel distribution in southern Bohemia.

## MATERIAL AND METHODS

Data about distribution of this species were collected according the recommendations in Action plan for endangered freshwater pearl mussel in Czech Republic (ŠVANYGA et al. 2013).

Live freshwater pearl mussels could not be removed and measured because of the Czech rules regarding the monitoring of protected animals. The character of the collected specimens is described as live adult, live subadult, shell, old shell, or shell fragments. The existence of clearly defined cohorts of old populations permits to distinguish the presence of subadults (Fig. 1). The character (with abbreviation in parentheses) is defined as follows:

Live adult (L) – specimen positioned in the river bed, visible part (open siphos) wider than 3 cm (Fig. 2).



**Fig. 1.** The shell of the first subadult of *Margaritifera margaritifera* found in the Malše River; its total length is 38 mm, the bar (ca. 6 mm) indicates the last completed growth period (photo by J. Hruška).

Live subadult (Ls) – specimen positioned in the river bed, visible part (open siphons) smaller than 3 cm (Fig. 2, live specimens were observed by magnifying aquascope or the photo was taken).

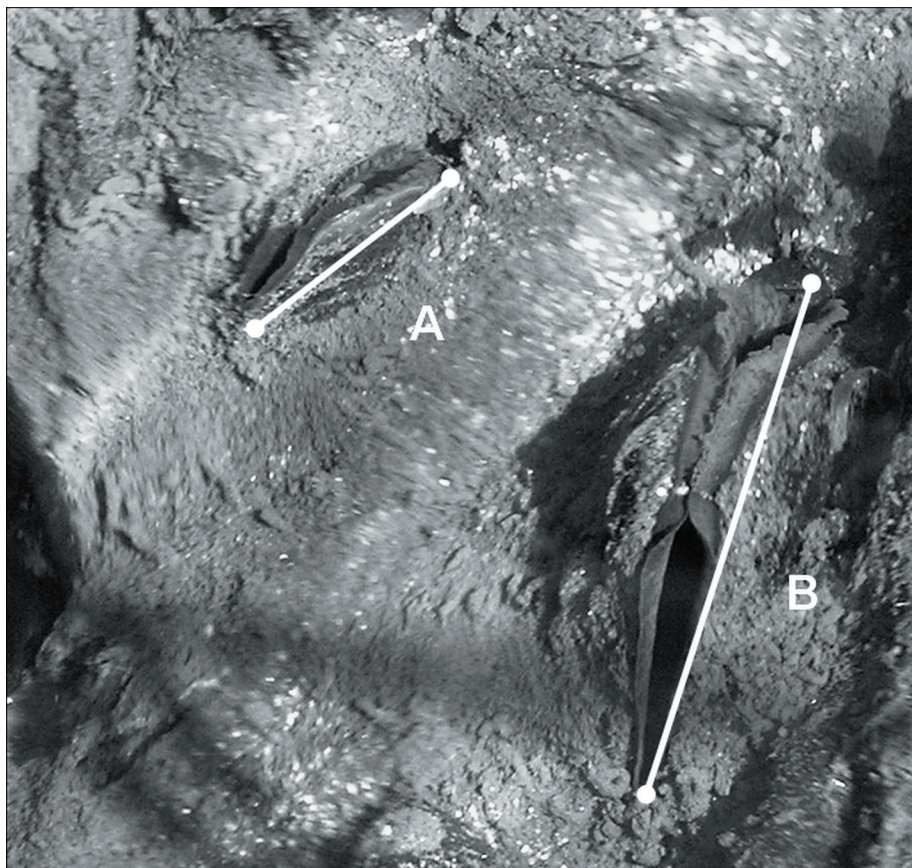
Shell (S) – specimen without any soft tissue, shell not substantially corroded or only in the part of ligament, nacre layer maintained in the whole of surface.

Old shell (OS) – shell markedly corroded in the whole of surface or particularly destroyed, more than half part of one shell.

Shell fragments (SF) – less than half part of one shell.

The juvenile phase in the shells is defined by the length of yearly shell growth wider than 4 mm (Fig. 1). The length of yearly shell growth of adults is less than 1 mm in the Czech Republic. The length of the last completed period is noted because of the risk of mortality during growth in the last period. The shells were measured lengthwise (anterior-posterior) to the nearest 0.1 mm with vernier callipers.

Published data are listed in the Results in the following order: code of the faunistic mapping grid of the Czech Republic (PRUNER & MÍKA 1996), locality GPS (WGS84) coordinates marking borders of the observed parts of stream, character of the specimens, and source; whereas unpublished data are listed as follows: code of the faunistic mapping grid, locality,



**Fig. 2.** The comparison of adult (B) and subadult (A) specimen according to the length of siphons, bars: A = 22 mm, B = 47 mm (photo by O.P. Simon).

GPS coordinates marking borders of the observed parts of stream, number of individuals, character of the specimens, length of the shell (in parenthesis), year of collection, and collector.

## RESULTS

All known published and unpublished recent data (2003–2012) on the freshwater pearl mussel distribution are listed below. The data are divided into the results of detailed monitoring performed in the Blanice River, Zlatý Potok stream, Teplá Vltava stream, and the Malše River, and coincidental findings from the middle part of the Blanice River, lower Zlatý Potok stream, millraces in the middle Malše River, and the Otava River. Data are presented in the same form as other faunistic data about distribution in this contribution. For clarity data are also presented in grid map of the Czech Republic, focused on area of South Bohemia (Fig. 3).

### Published data

6850:

Blanice River at Blanička (49°5'55.516"N, 14°4'21.644"E–49°6'4.137"N, 14°4'46.735"E), 1 L (PELTÁNOVÁ & ŠVANYGA 2013).

7049:

Blanice River between ruins of tower house Hus and Spálenec (48°57'24.289"N, 13°55'45.326"E–48°54'0.822"N, 13°58'55.945"E), 23 332 L (HRUŠKA 2003) and 10 154 L+Ls (SPISAR 2010).

7050:

Zlatý Potok stream millrace at Frantoly (48°59'35.024"N, 14°4'57.329"E–48°59'24.858"N, 14°4'53.579"E), 307 L, (HRUŠKA 2005).

Zlatý Potok stream between Frantoly and Miletínky (48°59'24.858"N, 14°4'53.579"E–48°55'34.074"N, 14°5'4.817"E), 338 L (HRUŠKA 2005).

Zlatý Potok stream between Miletínky and Skfíněřov (48°55'34.074"N, 14°5'4.817"E–48°56'41.696"N, 14°0'53.426"E), 231 L (HRUŠKA 2005).

7149:

Teplá Vltava stream (48°54'13.088"N, 13°49'32.915"E–48°48'23.910"N, 13°56'49.406"E), 35 L, 20 S (BÖHM 2008).

7353:

Malše River at Dolní Příbrání (48°37'28.388"N, 14°36'53.360"E–48°37'30.787"N, 14°35'57.062"E), 11 Ls, 2 L (DORT & HRUŠKA 2009).

Malše River between Leopoldschlag and the confluence with the Felberbach stream (48°36'12.045"N, 14°33'40.954"E–48°36'59.919"N, 14°30'14.998"E), 14 OS (DORT & HRUŠKA 2009).

### Unpublished data

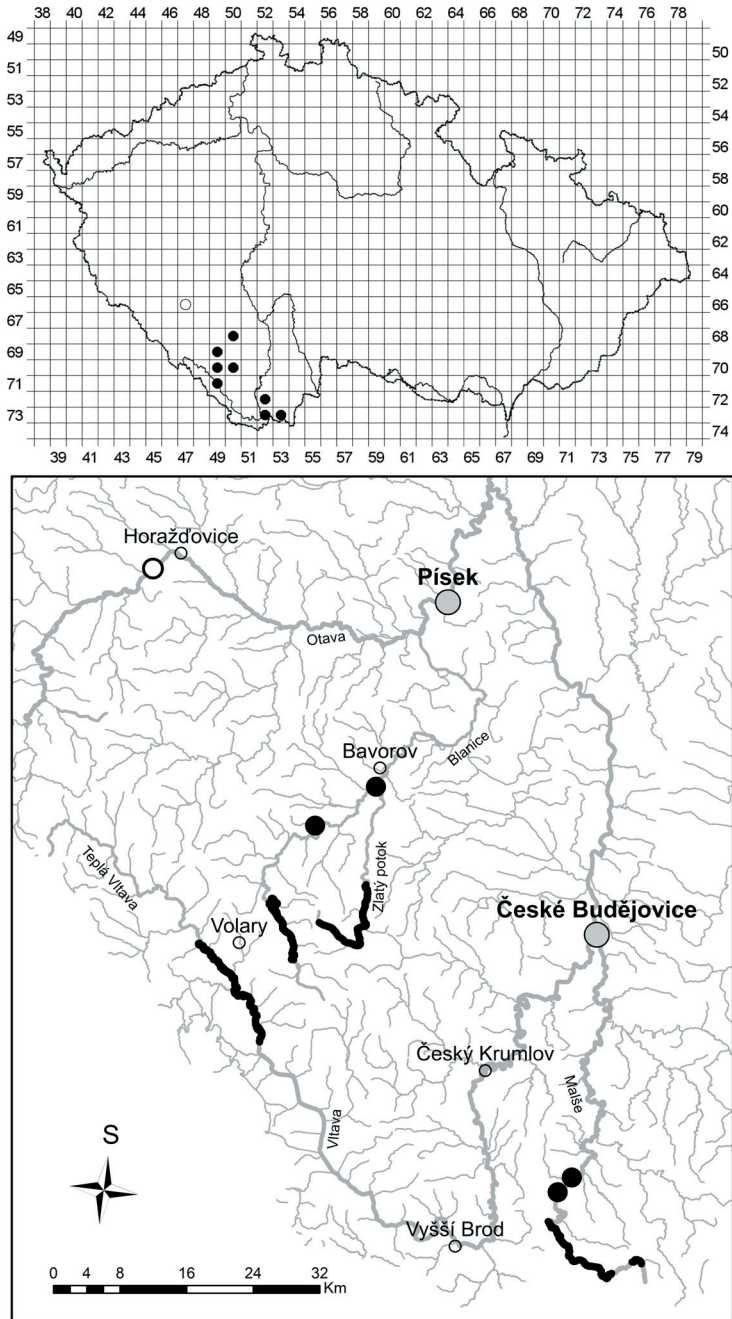
6647:

Otava River millrace at Malé Hydčice (49°17'56.470"N, 13°39'27.562"E–49°18'5.219"N, 13°39'44.756"E), 3 S (116, 103, 120 mm), OS, 2012, Bílý.

6850:

Blanice River millrace at Blanička (49°5'56.730"N, 14°4'19.550"E–49°6'13.071"N, 14°4'30.096"E), unknown number of OS, 2011, Douda.

Zlatý Potok stream up to the inflow to the Blanice River at Čichtice (49°6'3.891"N, 14°4'48.416"E–49°5'50.076"N, 14°4'46.008"E), 1 S (105 mm), 2012, Simon & Douda.



**Fig. 3.** Grid map of the distribution of *Margaritifera margaritifera* in the Czech Republic – a detailed insert shows localities in south Bohemia, where freshwater pearl mussel has been found recently (2003–2012): black thick line indicates its occurrence along a stream stretch, solid circles show localities of its limited distribution, and an open circle (o) only shells found in the Otava River at Malé Hydčice.



6949:

Blanice River millrace at Husinec (49°2'42.662"N, 13°59'1.859"E–49°3'6.991"N, 13°59'13.779"E), 5 L, 4 S (78, 102, 63, 52 mm), OS, 2010, Douda.

7049:

Blanice River between Zbytiny and Spálenec (48°55'41.283"N, 13°58'5.148"E–48°56'24.227"N, 13°57'14.905"E), 2 S (97, 96 mm), 2008, Tichá; 1 S (100 mm), 2011, Simon.

Blanice River between Zbytiny and Blažejovice (48°57'2.813"N, 13°56'30.434"E–48°57'12.270"N, 13°56'2.303"E), 3 S (84, 89, 83 mm), 2012, Simon.

7050:

Zlatý Potok stream at Plánská, Tisovka (48°56'35.821"N, 14°4'43.039"E–48°55'51.185"N, 14°5'6.274"E), 10 L, 2012, Simon.

7149:

Teplá Vltava stream at Dobrá (48°54'11.207"N, 13°49'26.278"E–48°52'56.514"N, 13°51'53.772"E), 4 Ls, 2009, Dort; 45 L, 14 Ls, 2011, Dort; 8 L, 8 Ls, 2 OS, 2012, Dort.

Teplá Vltava stream close to Chlum (48°52'56.514"N, 13°51'53.772"E–48°51'10.973"N, 13°53'57.868"E), 17 L, 2009, Dort; 267 L, 6 S (101, 112, 94, 101, 98, 107 mm), 2 OS, 2011, Dort.

Teplá Vltava stream close to Volary (48°51'32.522"N, 13°53'35.406"E–48°52'54.824"N, 13°52'6.381"E), 14 S (100, 99, 104, 96, 68, 90, 96, 88, 101, 103, 91, 95, 102 mm), 2012, Simon; 1 S (97 mm), OS, 2011, Simon; OS, 2012, Douda.

7252:

Malše River millrace at Ješkov (48°42'26.011"N, 14°28'52.916"E–48°42'32.035"N, 14°29'7.339"E), 2 S (66, 65 mm), 2 OS, 2007, Bílý; 2 L, 1 S (64 mm), 1 OS, 2012, Simon.

7352:

Malše River at Hiltshen Leopoldschlag (48°37'59.828"N, 14°29'29.067"E–48°37'34.768"N, 14°29'45.344"E), SF, 2012, Simon.

Malše River between Leopoldschlag and Dolní Dvořiště (48°37'3.008"N, 14°30'10.278"E–48°39'23.940"N, 14°27'15.648"E), 2 S, (93, 91 mm), 4 OS, 2011, Dort; 81 L, 14 Ls, 2011, Dort; 286 L, 38 Ls, 2012 Dort; 1 L 2007, Bílý & Rebec; 7 L, 2012, Simon & Douda; 1 S (75 mm), 1 OS, 2012, Simon & Douda.

Malše River millrace at Nažidla (48°41'17.806"N, 14°27'42.201"E–48°41'27.435"N, 14°27'51.491"E), 1 S (73 mm), 2012, Simon.

Malše River millrace at Stiegersdorf (48°38'30.014"N, 14°28'31.684"E–48°38'37.492"N, 14°28'23.983"E), 1 S (37 mm), 2012, Dort.

7353:

Malše River at Dolní Příbrání (48°37'33.674"N, 14°36'7.592"E–48°37'40.867"N, 14°36'27.664"E), 1 OS, 2012, Douda; 10 L, 2012, Dort.

Malše stream at Mairspindt (48°36'13.093"N, 14°33'44.070"E–48°36'34.938"N, 14°34'5.371"E), 1 S (92 mm), 2012, Douda.

### Comments to selected localities

#### Teplá Vltava stream

Only data on the presence of the freshwater pearl mussel in the Teplá Vltava stream before the floods in 2002 are documented in BERAN (1994). The sporadic presence of the mussel from the inflow of the Jedlový Potok stream to the inflow of the Korunáč stream was confirmed by BÖHM (2008) during monitoring performed of the Teplá Vltava stream (between Dobrá na Šumavě and Nová Pec).

Later, detailed monitoring of the stream was performed under the direction of the National Park Authorities between 2009 and 2012. This monitoring was focused on live adult and subadult individuals (DORT 2009, 2010). In total, 288 live animals and 27 shells were found in the map grid no. 7149.

The occurrence of *M. margaritifera* in localities in the Teplá Vltava stream was highly scattered. The size of some live individuals corresponded to the expected size of juveniles. One of the juvenile shells collected showed that this individual was still growing intensively (approximately 8 mm in last completed growth period, total length 68 mm). Detailed monitoring of the whole length of the Teplá Vltava stream is necessary.

#### Malše River

Older data on the presence of numerous populations of adult freshwater pearl mussels close to the Czech–Austrian border have been documented (ABSOLON & HRUŠKA 1999). Subsequently, 36 adult individuals were found in a disturbed millrace near the Velišek's mill in Ješkov (DORT & HRUŠKA 2009). Additional data on the presence of the species in the Malše River before the floods that occurred in 2002 are summarised in ŠIMEK et al. (2013).

Later, 2009–2012, detailed monitoring was performed on the request of both Nature Conservation Agency of the Czech Republic and Technisches Büro für Gewässerökologie by DORT (2012). A total of 444 live individuals and 34 shells were found in faunistic mapping grids 7352, 7252, and 7353.

The occurrence of the freshwater pearl mussel is scattered in the Malše River. Data suggest that the population in the Stiegersdorf millrace also includes live subadults. One subadult shell collected (Fig. 1) showed that this individual still grew intensively (approximately 6 mm in the last completed growth period, total length 38 mm).

The area below the town of Rychnov nad Malší has not yet been monitored in detail. However, downstream, in the Nažidla and Ješkov mill races, both shells and live adult individuals were found (shells at Nažidla, two adults at Ješkov). Shells found in the millrace in Ješkov showed characteristics of stunted growth, but according to last finished growth line they were adults. Detailed monitoring of the remainder of the Malše River is necessary to determine the status of this population.

#### Blanice River and Zlatý Potok stream

The occurrence of the freshwater pearl mussel in the Blanice River and Zlatý Potok stream are well documented within National Nature Monuments Blanice and Zlatý Potok (HRUŠKA 2003, 2005, SPISAR 2010) and the abundance of freshwater pearl mussels there are definitely higher than in other localities. This part of catchment area could be feasible for next spreading of population (ŠVANYGA et al. 2013). Issues of limiting factors for spread and distribution of freshwater pearl mussel are described in BÍLÝ & SIMON (2007).

The presence of specimens in the part of the Blanice River between the Husinec reservoir and Blanička (Husinec millrace, Blanice River close to Blanička, and Zlatý Potok stream close to Čichtice; out of NNM Blanice) demonstrated the survival of the species under some level of eutrophication. In the past, there were numerous populations at these localities (DYK & DYKOVÁ 1974).

#### Otava River

Data on old shells in the Otava River in the Malé Hydčice millrace pointed to an earlier occurrence of the species (DYK & DYKOVÁ 1974). This locality is currently totally unsuitable for the survival of the freshwater pearl mussel, and its shells most likely decompose slowly at this site due to high conductivity levels (HRUŠKA 1991).

## DISCUSSION

The presence of the freshwater pearl mussel was confirmed in nine faunistic mapping grids in the Vltava River basin up to the Lipno reservoir, in the Blanice River up to Čichtice, and in the Malše River up to Skoronice. Isolated individuals were also found in middle stretches of the Blanice River and Malše River. The presence of *M. margaritifera* is widespread, but its populations are less numerous than in the past (DYK & DYKOVÁ 1974, NOWAK 1936). Due to the nature of the data (being collected by different persons in different years), some uncertainty in terms of the population assessments remains. In total 60 shells were found and their lengths varied between 37 and 120 mm. Live mussels could not be removed, so that data about size range of whole populations are not yet available.

A considerable portion of the findings were recorded in millraces. Millraces may provide suitable hydraulic conditions for the survival of adult mussels. However, mussels in millraces are considered to originate from drift from main streams (HRUŠKA 1991). In millraces in the middle parts of both the Blanice and Malše rivers, smaller shells were found that showed signs of stunted growth (Blanice River 52–119 mm, Malše River 64–73 mm). All these specimens were adults.

Monitoring in the Malše River and Teplá Vltava stream confirmed the recent occurrence of live, rapidly growing subadults. In the both localities, juveniles from breeding programs were released within the framework of the Action plan for *M. margaritifera* (ŠVANYGA et al. 2013). The existence of natural reproduction should be confirmed via detailed long-term monitoring.

The action plan for the Czech Republic puts emphasis on several localities in upper stretches of the streams (ABSOLON & HRUŠKA 1999) and positive results of protection of freshwater pearl mussel are significant. Recent findings also demonstrate the importance of populations in the middle parts of stream, which are characterised by the presence of different stunted forms, adapted to these habitats. However, it is not clear if these forms are genetically fixed or if they only represent individual local adaptation to unsuitable conditions (water pollution, eutrophication, long-term land use changes in all catchment).

The abundance of the populations of freshwater pearl mussels was observed to have decreased in all of the monitored localities, and implementation of specific measures from the endangered species action plan for *M. margaritifera* is necessary (ŠVANYGA et al. 2013).

## REFERENCES

- ABSOLON K. & HRUŠKA J., 1999: *Záchranný program Perlorodka říční v České republice* [Action plan Freshwater pearl mussel in the Czech Republic]. Nature Conservation Agency of the Czech Republic, Praha, 28 pp. (in Czech).
- BAUER G. & WÄCHTLER K., 2001: *Ecology and evolution of the freshwater mussels Unionida*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 364 pp.
- BERAN L., 1994: Zprávy o výsledcích průzkumu vodních měkkýšů vybraných úseků Vltavy [Results of the survey of freshwater mussels in selected parts of the Vltava River]. Ms., unpublished report, 29 pp. (in Czech). (deposited at the Šumava National Park Authorities, Vimperk)
- BILÝ M. & SIMON O., 2007: Water quality issues in the protection of oligotrophic streams with the occurrence of pearl mussel (*Margaritifera margaritifera*) in the Czech Republic. *Acta Universitatis Carolinae Environmentalica*, 21: 21–30.
- BÖHM M., 2008: Výsledky průzkumu adultní populace perlorodky říční (*Margaritifera margaritifera* L.) ve vybraném úseku Vltavy a Teplé Vltavy ř.km. 370,45–390,0 [The results of exploration of adults in population freshwater pearl mussel (*Margaritifera margaritifera*) in the selected part between 370<sup>th</sup> and 390<sup>th</sup> river kilometres of the Vltava River and Teplá Vltava stream]. Ms., unpublished report, 33 pp. (in Czech). (deposited in the Šumava National Park Authorities, Vimperk)
- DORT B., 2009: Perlorodka říční (*Margaritifera margaritifera* L.) v povodí horního toku Teplé Vltavy . [Freshwater pearl mussel (*Margaritifera margaritifera* L.) in the upper part of Teplá Vltava stream basin in 2009]. Ms.,

- unpublished report, 16 pp. (in Czech). (deposited in the Šumava National Park Authorities, Vimperk)
- DORT B., 2012: Flussperlmuschel (*Margaritifera margaritifera* L.) im oberen Flusslauf der Maltsch. Ms., Technisches Büro für Gewässerökologie, DI Clemens Gumpinger, 13 pp. (deposited in the Nature Conservation Agency of the Czech Republic, Prague)
- DORT B., 2010: Perlorodka říční (*Margaritifera margaritifera* L.) v povodí horního toku Teplé Vltavy 2010 [Freshwater pearl mussel (*Margaritifera margaritifera* L.) in the Teplá Vltava basin in 2010]. Ms., unpublished report, 38 pp. (in Czech) (deposited in the Šumava National Park Authorities, Vimperk)
- DORT B. & HRUŠKA J., 2009: Perlorodka říční (*Margaritifera margaritifera* L.) v povodí horního toku Malše [Freshwater pearl mussel (*Margaritifera margaritifera* L.) in the upper part of the Malše River basin in 2008]. Ms., unpublished report, 37 pp. (in Czech). (deposited in the regional office of southern Bohemia)
- DOUDA K., 2010: Effects of nitrate nitrogen pollution on Central European unionid bivalves revealed by distributional data and acute toxicity testing. *Aquatic Conservation-Marine and Freshwater Ecosystems*, 2: 189–197.
- DUŠEK J., MARHOUL P., VONDRUŠKOVÁ J., SPISAR O., PITHART D. & JIRUŠKOVÁ L., 2010: Návrh optimalizace rybářského hospodaření s ohledem na ochranu populací perlorodky říční (*Margaritifera margaritifera*) [Plan of optimization of fish management considering protection of freshwater pearl mussel (*Margaritifera margaritifera*)]. Ms., Daphne, 132 pp. (in Czech). (deposited in the Nature Conservation Agency of the Czech Republic, Prague)
- DYK V. & DYKOVÁ S., 1974: The pearl oyster (*Margaritifera margaritifera* Linnaeus 1758) a neglected indicator of the pollution of mountain and submontane water flows of the crystalline region in Czechoslovakia. *Acta Veterinaria*, 43: 287–304.
- GEIST J., 2010: Strategies for the conservation of endangered freshwater pearl mussels (*Margaritifera margaritifera* L.): a synthesis of conservation genetics and ecology. *Hydrobiologia*, 644: 69–88.
- HRUŠKA J., 1991: Projekt: záchrana perlorodky říční v České republice [Project Rescue of freshwater pearl mussel in Czech republic]. *Památky a Příroda*, 16: 545–548, 609–612 (in Czech).
- HRUŠKA J., 1992: Projekt: Záchrana perlorodky říční v České republice [Project Rescue of freshwater pearl mussel in Czech republic]. *Ochrana Přírody*, 47: 7–11 (in Czech).
- HRUŠKA J., 1992: The freshwater pearl mussel in South Bohemia: Evaluation of the effect of temperature on reproduction, growth and age structure of the population. *Archiv für Hydrobiologie*, 126: 181–191.
- HRUŠKA J. 2003: Komplexní vyhodnocení vlivu povodně na přírodu a krajinu – Záchraný program perlorodky říční – Hodnocení vlivu povodně v roce 2002 na biotop a populaci perlorodky říční na horním toku řeky Blanice nad vodní nádrží Husinec [A comprehensive evaluation of the impact of floods on nature and landscape – Action plan for endangered freshwater pearl mussel in Czech Republic – Evaluation of impact of the floods in 2002 on the habitat and population of freshwater pearl mussels in the upper reaches of the Blanice River upstream the Husinec reservoir]. AOPK ČR Praha: 23 pp. (in Czech). (deposited in the Nature Conservation Agency of the Czech Republic)
- HRUŠKA J. 2005: Perlorodka říční (*Margaritifera margaritifera* L.) na Zlatém potoce – stav populace v roce 2005 [The freshwater pearl mussel (*Margaritifera margaritifera* L.) in the Zlatý Potok stream – the population state in 2005]. AOPK ČR Praha: 29 pp. (in Czech). (deposited in Nature Conservation Agency of the Czech Republic, Praha)
- NOWAK W., 1936: Perlorodka říční a její perly (se zvláštním zřetelem k poměrům v republice Československé) [Freshwater pearl mussel and its pearls (focused on conditions in Czechoslovakia)]. *Sborník Výzkumných Ústavů Zemědělských ČSR*, 146, 76 pp. (in Czech).
- PELTANOVÁ A. & ŠVANYGA J., 2013: Vyhodnocení realizačního projektu záchraného programu perlorodky říční v ČR pro rok 2012 [Evaluation of action plan of protection of freshwater pearl mussel in Czech Republic in 2012]. Ms., unpublished report, 49 pp. (in Czech). (deposited in the Nature Conservation Agency of the Czech Republic, Praha)
- PRUNER L. & MÍKA P., 1996: Seznam obcí a jejich částí v České republice s čísly mapových polí pro síťové mapování fauny [List of settlements in the Czech republic with associated map field codes for faunistic grid mapping system]. *Klapalekiana*, 32 (supplementum): 1–175 (in Czech, English summary).
- SCHUBERT O., 1933: *Über die Perlmuschel- und Perlen-Vorkomen in Böhmen*. Publikation des Zentralkollegiums des Landeskulturrates für Böhmen, Prag, 36 pp.
- ŠIMEK L., SIMON O., DORT B., KOUTECKÝ B. & BRŮČKOVÁ M., 2013: Plán péče o EVL/ZCHÚ Horní Malše [Action plan for the Site of Community Importance Horní Malše]. Ms., unpublished report, 77 pp. (in Czech). (deposited in the Southbohemian Regional Office, České Budějovice)
- SPISAR O., 2010: Závěrečná zpráva – Monitoring 2010 – Záchraný program perlorodky říční v České republice. [Final report – Monitoring 2010 – Action plan for endangered freshwater pearl mussel in Czech Republic]. Ms., unpublished report, 18 pp. (in Czech). (deposited in the Nature Conservation Agency of the Czech Republic, Praha)
- ŠVANYGA J., SIMON O., MINÁRIKOVÁ T., SPISAR O. & BILÝ M., 2013: Záchraný program pro perlorodku říční v ČR

[Action plan for the endangered freshwater pearl mussel in the Czech Republic]. Ms., unpublished report, 76 pp. (in Czech). (deposited in the Nature Conservation Agency of the Czech Republic, Praha)

TICHÁ K., SIMON O.P., DOUDA K. & KUBÍKOVÁ L., 2012: Detrital components in submontane organogenic springs in relation to their morphology, microhabitats and macroinvertebrates. *Polish Journal of Ecology*, 60: 163–175.

*Received: 17 April 2013*  
*Accepted: 21 February 2014*

running head: **Nutrient rich FPOM in helocrenes**

**title: The reversal of a river continuum at the origin: nutrient-rich fine particulate organic matter exported from helocrene springs**

authors: Kamila Tichá<sup>1,2\*</sup>, Ondřej P. Simon<sup>1,2</sup>, Jakub Houška<sup>3</sup>, Karel Douda<sup>4</sup>

<sup>1</sup>T.G.M. Water Research Institute, Podbabská 2582/30, CZ-16062 Praha 6, Czech Republic

e-mail: kamila\_ticha@vuv.cz

<sup>2</sup>Czech University of Life Sciences Prague, Faculty of Environmental Sciences, Kamýcká 129, CZ-165 21 Praha 6 - Suchbát, Czech Republic

<sup>3</sup>Department of Soil Science and Soil Protection, Czech University of Life Sciences Prague, Faculty of Agrobiological Sciences and Natural Resources, Kamýcká 129, CZ-165 21, Prague, Czech Republic

<sup>4</sup>Department of Zoology and Fisheries, Czech University of Life Sciences Prague, Faculty of Agrobiological Sciences and Natural Resources, Kamýcká 129, CZ-165 21, Prague, Czech Republic

\* corresponding author

**Abstract:**

Despite the large number of studies devoted to organic matter dynamics in fluvial ecosystems, the detrital pathways of spring headwater systems remain neglected. In particular, spring wetlands (helocrenes) might have considerable influence on downstream headwater stream systems due to the alteration of the nutrient and organic matter content of the water. In this study, we examined fine particulate organic matter (FPOM) drained from helocrene springs to describe its downstream transport. We studied the quantity, nutrient content and physical components of FPOM gathered from the outflowing water using continuous sediment samplers. The nutrient content of local leaf litter deposits, residence time of water in the springs and concentration of dissolved nutrients in spring sources and outflows were also measured to characterize the inputs and outputs of the studied system. The results show that headwater spring wetlands represent a significant source of high-quality FPOM for downstream river networks. The estimated concentration of FPOM (<1000  $\mu\text{m}$ ) in the 11 investigated springs was  $3.1 \pm 2.5 \text{ mg.L}^{-1}$ . In general, the FPOM was relatively nutrient-rich (N =  $19.25 \pm 4.73 \text{ mg.L}^{-1}$ ; P =  $2.04 \pm 0.78 \text{ mg.L}^{-1}$ ; Ca =  $9.65 \pm 2.63 \text{ mg.L}^{-1}$ ; S =  $4.07 \pm 1.16 \text{ mg.L}^{-1}$ ; C =  $278.68 \pm 80.81 \text{ mg.L}^{-1}$ ). The C:N and C:P ratios in the local leaf litter deposits were higher than in FPOM ( $41.04 \pm 14.32$  vs.  $14.70 \pm 2.46$  and  $591.7 \pm 168.83$  vs.  $154.77 \pm 64.73$ , respectively), indicating that suspended detritus is more nutritious for consumers. In terms of size fractions of FPOM was identified a significant trend: with decreasing C:N and C:P ratios decreases the particle size as well. Overall, the data suggest that the relatively small helocrenes serve as a "detrital reactor", receiving primary particles and dissolved organic matter, transforming them and transporting them downstream. These biotopes may represent a substantial discontinuity of the river continuum at its origin, important for the food supply of associated biotic communities.

**Keywords:** organic matter, nutrients, springs, river continuum, helocrene, detritus, freshwater ecosystem



## Introduction:

1  
2 The physical variables within a river system from the headwaters to the mouth are changing  
3 along a continuous gradient. This gradient results in a continuum of biotic variables and  
4 organic matter quality, quantity, utilization and transport along the length of a river (Vannote  
5 et al. 1980). Lotic systems are open and have a high capacity to retain nutrients from the  
6 watershed (Newbold 1992). Considerable work has been done to investigate organic matter  
7 transport and nutrient cycling and processing in stream systems (e.g., Wallace et al. 1991,  
8 Newbold 1992, Cushing et al 1993) and research into organic matter cycling continues due to  
9 its theoretical and applied importance (Thomas et al. 2001, Newbold 2005, Webster 2007,  
10 Hoover et al. 2010). While the continual downstream transport (i.e. cycling and spiraling) of  
11 nutrients influences the abundance and distribution of stream biota, the biota can, in turn,  
12 affect organic matter processing and nutrient concentrations in the water (Newbold 1992).

13 One of the fundamental attributes of the continuous gradient of a stream ecosystem are  
14 detrital pathways that determine the availability of organic matter as a food source for  
15 particular functional feeding groups (Kominoski & Rosemond 2012). In general, mean  
16 detrital particle size decreases with increasing stream size (Vannote et al. 1980), although the  
17 supply of organic particles can be replenished from the riparian zone in downstream reaches  
18 (Stanford and Ward 1993) and the processes that transform suspended matter may increase  
19 the size of the particles by aggregation (Wotton 2007). Headwater streams, especially those in  
20 forested landscapes, are considered heterotrophic and depending primarily on coarse  
21 particulated organic matter entering the stream from adjacent terrestrial communities  
22 (Anderson and Sedell 1979). Nevertheless, several studies suggest that organic matter fluxes  
23 in stream ecosystems may be more complex than previously supposed (Cross et al. 2007,  
24 Webster 2007). For example, fine particulate matter (FPOM) export may be dramatically  
25 affected by nutrient levels even in headwater streams (Benstead et al. 2009). Additionally,

1 extreme discharges and invertebrate removal can substantially increase the outflow of FPOM  
2 (Wallace et al. 1991).

3 Despite an increasing focus on organic matter fluxes in stream ecosystems, detrital pathways  
4 in spring areas remain relatively neglected. River Continuum Concept operates with the idea  
5 of spring ecosystems with rapidly-emerging nutrient-poor water, which is associated with a  
6 limited biodiversity composed of species that can function on a restricted nutritional base  
7 (Vannote et al. 1980). Such rheocrene-like springs (small streams of running water emerging  
8 directly at the point of the source) are, however, not very common in many areas. Instead,  
9 helocrene-like springs (water seeping through a soil layer in a spring wetland) are often  
10 widespread in moderately steep and non-forest landscapes (Zollhöfer et al 2000, Audorff et al.  
11 2011). Helocrenes (spring wetlands) are, despite their abundance, often neglected in research  
12 because of their semiaquatic character and the difficulty of identification during the summer  
13 (Kubíková et al 2012). This type of spring ecosystem often has considerable primary  
14 production of macrophytes and algae due to its semiaquatic character (Ilmonen & Paasivirta  
15 2005). Temperature fluctuations are limited and helocrenes do not freeze in the winter. During  
16 the summer, their temperature increases only in open-water areas (Tichá et al 2012). In view  
17 of the spatial extent and specific conditions of helocrenes, this type of spring area may have  
18 considerable effects on the downstream headwater systems. Nevertheless, the effect of  
19 helocrene spring areas on the nutrient cycles and the processing and transport of detrital  
20 particles has not been sufficiently investigated to date.

21 Organic matter in springs is generally plant detritus of various origins, size fractions, and  
22 levels of decomposition (Tichá et al. 2012). Springs in forested watersheds are dominated by  
23 coarse particulate organic matter (CPOM) from leaf litter. In contrast, the leaf litter source in  
24 open-canopy areas is compensated by instream primary production (Cushing 1997, Meyer et  
25 al. 2007). The subsurface input of FPOM can also be appreciable (Iversen et al. 1982). In

1 addition to the particle size, which determines the possible intake by consumers, their  
2 nutritional value is also critical. Wood, leaf litter, and green leaves, like other terrestrial input,  
3 usually have substantially higher C: nutrient ratios than periphyton and FPOM (Sterner &  
4 Elser 2002). Additionally, the C: nutrient ratios of organic matter are strongly influenced by  
5 the microbial colonization of the particles (Cross et al. 2005). Generally, organic matter  
6 decomposition in benthic systems is accompanied by significant changes in the elemental  
7 composition of organic matter (Cross et al. 2005). For filter-feeders, most of the energy  
8 income from this food source originates from the bacterial film of the detrital particle. Only a  
9 small fraction of the total energy income is from the particle itself, which is digestible only  
10 with difficulty (Mann 1988). This component is excreted and reused several times until it is  
11 completely decomposed (Mann 1988).

12 As a whole, these resources of FPOM are considered to provide food that supports many  
13 functional groups of organisms in spring areas (Gerecke et al. 2011, Kubíková et al. 2012)  
14 and most likely also supplies a substantial amount of organic matter to downstream  
15 ecosystems (Meyer et al. 2007). Research on the possible role of spring-derived detritus from  
16 headwater streams downstream may thus help in understanding whole-system of organic  
17 matter dynamics, a critical topic for the conservation of freshwater ecosystems (Kominoski &  
18 Rosemond 2012).

19 In this study, we address this question by examining helocrene-like Central European springs.  
20 It is known that certain helocrene springs may be a source FPOM (Iversen 1982) or even that  
21 the concentration of FPOM in the spring source is higher than the concentration downstream  
22 (Barquín & Death 2011). We were particularly focused on nutritional value of this spring  
23 FPOM.

24 The aim of this study was to assess the role of helocrene springs in terms of organic matter  
25 flows within a river network. Specifically, we characterize the quality of FPOM (in three size

1 fractions) exported from helocrene springs, specifically nutrient content, their concentration in  
2 the outflowing water and the microscopic physical components. The nutritional value of the  
3 constituent size fractions of detritus was evaluated based on the C: nutrient ratios together  
4 with simultaneously measured values of the dissolved nutrients, water retention times, and  
5 nutrient content in the leaf litter of the surrounding vegetation.

6

7

## Methods

### Study sites

8  
9 In 2009-2010, we examined 11 coldwater springs in the watershed of the Blanice River in the  
10 Šumava foothills, Czech Republic (Central Europe). The altitude of the area ranges from 790  
11 to 1020 m above sea level; for a detailed description of the region, see Kubíková et al. (2011).  
12 The investigated springs have small temperature fluctuations (the differences between the  
13 winter and summer temperatures were 0.5 to 5.6°C) and a neutral or slightly acidic pH ( $5.85 \pm$   
14  $0.16$ ; mean  $\pm$  SD). Most of the springs were situated in an open-canopy landscape, and the  
15 dominant trees in the surroundings were spruce, birch and willow. The springs were chosen  
16 from a set of undisturbed, permanent, and non-freezing springs listed in the extensive  
17 database of springs maintained by the Agency for Nature Conservation and Landscape  
18 Protection of the Czech Republic. Because we aimed to include both nutrient-rich and  
19 nutrient-poor springs in our study, we selected the study sites by stratified random sampling  
20 on the basis of the nitrogen concentration in the outflowing water recorded by pilot sampling  
21 in 2007. The initial set of 92 springs with available information on  $\text{NO}_3^-$  concentration was  
22 scaled by the  $\text{NO}_3^-$  concentration gradient (N-rich springs:  $\text{NO}_3^- > 5 \text{ mg.l}^{-1}$ ; N-poor springs:  
23  $\text{NO}_3^- < 3 \text{ mg.l}^{-1}$ ), and the studied set of springs was randomly selected from both the nitrate-  
24 rich (n=6) and nitrate-poor (n=5) sites. The springs were mostly in pastures, meadows or on  
25 the forest margin and rarely in the open-canopy forest. All springs were of the helocrene type

1 except two, which showed a transitional rheo-helocrene character (running water directly  
2 from the point of the source, in combination with a spring wetland). The slope of the sites was  
3 moderate to strong (9-30%).

4

#### 5 FPOM quality and quantity

6 We sampled the suspended FPOM draining from the 11 springs in four seasons: the spring  
7 sampling was performed in June after the growth of vegetation, summer sampling was  
8 conducted in August during the peak of vegetation growth, the autumn sampling in November  
9 after the decline of the vegetation and the leaf fall and winter sampling in February during a  
10 period of snow cover.

11 We used a modification of the approach of Cuffney and Wallace (1988) adapted to our  
12 low-slope spring areas to capture FPOM with flow-through settlement vessels (Fig. 1). The  
13 apparatus consists of a suction basket (polyethylene-PE-coated wire mesh – 10 mm loop size;  
14 inside the PE mesh – 1 mm loop size; Fig. 1-1), a flexible intake pipe (inside diameter 4 mm,  
15 polyvinyl chloride-PVC; Fig. 1-2), a settling vessel (volume 5 L, polyethylene terephthalate-  
16 PET; Fig. 1-3), equipped with an intake basket with openings limiting short-circuiting) and a  
17 discharge pipe (4 mm) with a PE mesh of 1 mm loop size in four layers, ending with a free  
18 tube (Fig. 1-4). The sampling apparatus is suited for small sloping water flows; it is based on  
19 connected vessels (gravity fed) and does not use external energy source. The detritus  
20 transported by the spring water was concentrated in the settling vessel during the exposure  
21 period. The size of the retained particles was restricted by a screen of 1-mm mesh mounted on  
22 the suction basket. We exposed these continuous sediment samplers in each spring area at the  
23 point where the outflow trickle below the helocrene wetland was formed (6 - 43 meters from  
24 the spring's source point). The samplers were exposed for a period of 1 week during each  
25 season. We used the 1 week exposure period and two parallel samplers at each site because

1 our pilot experiments showed that a long exposure increase the risk of clogging of the intake  
2 pipe with debris (clogged samplers were excluded from the analysis). If both devices  
3 functioned properly during the whole exposure period, we processed both samples and used  
4 the higher values for statistical analyses (measured as the total dry mass retained in each  
5 sampler). At the beginning and the end of the sampling period, the average flow through the  
6 sampler was measured with a graduated cylinder and stopwatch. The samples were kept at 5-  
7 7°C under dark conditions and processed within 1 week after the collection period.

8 In the laboratory, the detritus was pressureless sieved into three size fractions (1000-250 µm,  
9 250-63 µm and smaller than 63 µm). Only the fine fraction was vacuum filtered. The fractions  
10 were dried at 105°C, and weighed. The samples were analyzed, for C, N, P, S and Ca  
11 according to standard methods: determination of TOC in the solid matrix, Ca and P ICP-OES  
12 in the acidic leachate and N and S in a Variomax CNS analyzer (ISO 11885:2007, ISO  
13 10694:1995).

14 A microscopic analysis of the constituent size fractions was also done on samples collected in  
15 June 2010. The percentage of physical components (plant residues, fecal pellets and  
16 amorphous matter) was determined microscopically at 20 x – 100 x magnification according  
17 to Tichá et al. (2012).

18

#### 19 Water discharge and FPOM concentration

20 A small spillway was installed under each spring outflow. The discharge was measured by  
21 trapping the water in a plastic bag for a defined time unit (Zollhöfer et al. 2000). The  
22 discharge was measured twice during each period, namely, at the times of installation and  
23 removal of the continuous sampler. For further calculations, the average values were used to  
24 represent the sampling period because the fluctuations were small. The concentration and  
25 output of suspended detritus were estimated according to the following formulas:

1 detrital concentration [ $\text{g.L}^{-1}$ ] = sum of dry mass of all three fractions of detritus [g] / (average  
2 flow through the sampler [ $\text{L.hr}^{-1}$ ] \* exposure [hr])  
3 output [ $\text{g.day}^{-1}$ ] = concentration [ $\text{g.L}^{-1}$ ] \* discharge of the spring [ $\text{L.day}^{-1}$ ].  
4

#### 5 Retention time

6 The retention time of the studied helocrenes was measured by pouring a 1% solution of NaCl  
7 (5l, conductivity  $1700 \mu\text{S.cm}^{-1}$ ) into the spring source. The solution was poured slowly into  
8 the springs (approx. 1 min.) due to their low discharges. Simultaneously, the conductivity in  
9 the outflow was measured in a continuous manner. The peak value of the conductivity was  
10 used as a measure of the retention time (Leibundgut et al. 2009). The values were measured  
11 during the spring (April, before the growth of the vegetation) and summer (August, when the  
12 vegetation cover was well developed).  
13

#### 14 Leaf litter quality

15 The leaf litter from the spring surface was sampled in November 2009. Two squares, each  
16 with an area of  $1 \text{ m}^2$ , were marked on each spring surface, and all the leaf litter was removed.  
17 In the laboratory the samples were air-dried, separated to genera, and separately weighed as  
18 the total dry mass of each tree species. Then they were merged into the original samples. One-  
19 tenth of every sample dry mass was then pulverized and chemically analyzed using  
20 techniques identical to those used with the detritus samples.  
21

#### 22 Water chemical analysis

23 Samples of water from the source and outflow of the springs were taken simultaneously  
24 before the installation of the samplers.  $\text{NO}_3$ , ortho- $\text{PO}_4$  and Ca were determined according to  
25 standard methods (ISO 11885:2007) in the laboratory.

1

## 2 Statistical analyses

3 Paired t-tests were used to test the differences in water quality between the source and  
4 outflow sites of the studied set of springs (data from all sampling occasions were pooled). The  
5 nutrient content of each size fraction of FPOM (dependent variables) was analyzed with a  
6 general linear model (GLM) with season and site (explanatory variables). If necessary, the  
7 data were log-transformed to meet normality assumptions. All statistical analyses were  
8 performed with R 2.11.0 software (R Development Core Team 2008).

9

10

## **Results**

### 11 Detritus quality and quantity

12 FPOM samplers captured, on average, 2610 mg of dry mass (min = 68, max = 12,864). In 88  
13 1-week measurements, the sampler was clogged only eight times. The samples from the  
14 clogged samplers were excluded from the analyses.

15 The average discharge of 11 selected springs was  $0.53 \pm 0.37 \text{ L}\cdot\text{s}^{-1}$  (mean  $\pm$  SD). The  
16 concentration of FPOM was  $3.10 \pm 2.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ . The specific concentrations for the separate  
17 fractions were  $0.85 \pm 1.75 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  (1000-250  $\mu\text{m}$ , coarse fraction),  $1.93 \pm 1.36 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  (250-63  
18  $\mu\text{m}$ , intermediate fraction) and  $0.32 \pm 0.28 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  ( $< 63 \mu\text{m}$ , fine fraction).

19 The microscopic analysis of physical components identified three principal constituents: plant  
20 residues, faecal pellets of macroinvertebrates and amorphous matter. The amorphous matter  
21 was most likely composed of very fine coagulated detritus with bound microorganisms. On  
22 average, the coarse fraction (N = 18) consisted of  $17.4 \pm 6.7\%$  plant residues,  $20.7 \pm 13.9\%$   
23 faecal pellets and  $61.9 \pm 15.4\%$  amorphous matter. The intermediate fraction (N = 16)  
24 consisted of  $42.5 \pm 20.8\%$  plant residues,  $37.5 \pm 21.8\%$  faecal pellets and  $20.0 \pm 12.6\%$



1 amorphous matter. A microscopic analysis of the fine fraction was not performed due to the  
2 use of vacuum filtration.

3 The GLM model incorporated the effects of site, sampling season and size fraction. The  
4 nutrient contents of the three size fractions of FPOM were significantly different for all  
5 measured elements, except of P (Figure 2, Table 1). There were also significant differences in  
6 detritus nutrient content between sampling seasons for C ( $p < 0.001$ ) and for P, Ca, and dry  
7 mass ( $p < 0.01$ ) (Table 1) with highest mean nutrient content recorded in November. For N and  
8 S the season was not significant. However, the measurements were performed during one  
9 year, so the effect of seasonality can not be interpreted in detail. All measured elements were  
10 significantly site-specific ( $p < 0.001$ ) (Table 1). The same GLM model, comparing the various  
11 size fractions, showed significant differences of nutrient ratios for C:P, C:Ca, and N:P  
12 ( $p < 0.001$ ) and for C:N ( $p < 0.01$ ). For C:S the results were not significant (Figure 3, Table 1).  
13 In general, the content of C, N, Ca and S decreased with decreasing particle size. However,  
14 such a dependence was not observed for phosphorus. The C: nutrient (except C:S) ratios also  
15 decreased with the particle size.

16

### 17 Water quality sampling

18 In general, the mean values of dissolved nutrients ( $\text{NO}_3$ ,  $\text{o-PO}_4$ ) were higher in source,  
19 compared to the outflow. While in the source the  $\text{NO}_3$  and  $\text{o-PO}_4$  concentrations were  $5.8 \pm$   
20  $5.5 \text{ mg.L}^{-1}$ , resp.  $0.06 \pm 0.03 \text{ mg.L}^{-1}$ , in the outflow it was  $4.7 \pm 4.7 \text{ mg.L}^{-1}$ , resp.  $0.04 \pm 0.03$   
21  $\text{mg.L}^{-1}$ . No difference between the source and the outflow was found for Ca (see Table 2)

22

### 23 Retention time

24 The retention time was successfully measured in eight springs (the concentration of tracer in  
25 the outflow water was undetectable in three springs). The retention times varied markedly. It

1 was very short (3 - 14 min) in stronger springs with a clear outflow trickle and a small  
2 wetland component. The retention time was noticeably longer (33 - 41 min) in weak springs  
3 with an extensive wetland component. The average velocity of the water passing through the  
4 spring was  $0.024 \pm 0,021 \text{ m}\cdot\text{sec}^{-1}$ , in dependence to the total length of the spring.

5

#### 6 Leaf litter quality

7 The amount of leaf litter deposited in the springs was highly variable and relatively low; on  
8 average,  $43.0 \pm 44.7 \text{ g}\cdot\text{m}^{-2}$  (mean and SD) of leaf litter was recorded during the autumn.  
9 Overall, the leaf litter was dominated by deciduous trees: birch (23.1%), willow (18.7%),  
10 beech (15.6%) and maple (9.5%), accompanied by less frequent deciduous trees such as alder,  
11 cherry tree, aspen, rowan and lime (4.8%, 4.7%, 3.6%, 1.6% and 0.1%, respectively).  
12 Coniferous pine (7.5%) and spruce (3.6%) litter, as well as grasses (8.3%) and other herbs  
13 (2.6%), were also present.

14 The average content of nutrients in the leaf litter at the spring surface (Table 3) did not show  
15 so much variability as nutrient content in detritus. The content of basic nutrients was for C =  
16  $541 \pm 30$ , for N  $14.87 \pm 5.61$  and for P  $0.968 \pm 0.223 \text{ g/kg}$ . The calculated values of the  
17 nutrient ratios in the leaf litter were C:N  $37.1 \pm 14.0$ , C:P  $548.4 \pm 167.7$ , C:Ca  $39.8 \pm 11.7$  and  
18 C:S  $403.9 \pm 119.4$ .

19

20

## Discussion

#### 21 Sources of FPOM

22 Since the introduction of the River Continuum Concept (Vannote et al. 1980), many studies of  
23 the properties and transport of detrital particles have been conducted in first- and second-order  
24 headwater streams. Surprisingly, a very small number of studies have focused on FPOM in  
25 spring areas. Suspended detritus is sometimes considered to be absent from springs.

1 According to this view, the headwaters below the springs are essentially supplied by  
2 allochthonous matter. Headwater streams are predominantly viewed as accumulators,  
3 processors and transporters of materials from terrestrial systems (Vannote et al. 1980, Pozo  
4 1994). In contrast, our study indicates that the search for the origin of FPOM should begin at  
5 the origin of a river network.

6 The results demonstrate that a substantial amount of FPOM originates directly from wetland  
7 springs. The average concentration of suspended FPOM in the water was estimated to be 3.1  
8 mg.L<sup>-1</sup> in our samples, whereas the average concentration of FPOM in a typical second-order  
9 stream in a forested catchment was calculated as 2 mg.L<sup>-1</sup> (Webster et al. 1999). The principle  
10 that the particle size of the transported organic material should become progressively smaller  
11 along the continuum (Vannote et al. 1980) implies that the concentration of the fine particles  
12 will be lowest below the spring. However, substantial concentrations of all size fractions of  
13 FPOM were recorded below all the wetland springs that we investigated. The most well-  
14 represented fraction was the intermediate fraction (250-63 µm), with a concentration of 1.93  
15 mg.L<sup>-1</sup>. Moreover, because we used a sediment sampler system, only the depositable particles  
16 were successfully recorded in our experiments, and our estimates of the total amount of  
17 FPOM should be considered conservative. We suggest that, due to the low deposition rates  
18 and long transport distances of small particles of FPOM in mountain streams (Thomas et al.  
19 2001), the particles from springs may travel relatively long distances and are used as a food  
20 source for downstream benthic communities.

21 Large volumes of leaf litter input are produced in the riparian zones of forested headwaters.  
22 This production fuels the spiraling of organic matter down the river continuum (Webster  
23 2007). Hence, leaf decomposition contributes large amounts of FPOM to the stream's detrital  
24 supply (Fisher and Likens 1973, Graça 2001), although other sources of FPOM could be of  
25 equal or greater magnitude in some systems (Allan & Castillo 2007). These sources are

1 probably also very important in case of helocrene springs we examined. FPOM can arise from  
2 dissolved organic matter (DOM) by physicochemical processes, such as flocculation and  
3 adsorption (Wotton 2007), or by microbial uptake. There is little information about the  
4 sloughing of algal mats and other organic layers or about the role of detritus produced from  
5 the floor litter and the soil (Allan & Castillo 2007). Obviously, many of these sources could  
6 form detrital particles just before the water emerges from the ground. In the work of Iversen  
7 (1982), the groundwater input of FPOM in one spring was determined as 68 kg.yr<sup>-1</sup>. Our  
8 observation show that the fine detritus in helocrene springs can also emerge partly just from  
9 the groundwater, because in some sampled springs, fine detritus was collected directly at the  
10 spring source.

11 In addition to the groundwater processes, it is necessary to consider the processes occurring in  
12 the springs. In general, the transport rates of detrital particles in streams (measured for three  
13 categories: sticks, leaves and FPOM) are substantially higher than the breakdown rates for  
14 these types of particles (Webster et al. 1999). For this reason, an FPOM particle on the stream  
15 bottom is more likely to be transported downstream than decomposed (Webster et al. 1999).  
16 Our results show, that the transport velocity of FPOM in wetland springs can be lower than in  
17 the average headwater stream, as referred in Newbold et al. (1991). The spring area,  
18 vegetation cover, slope and other variables vary in ways that produce water retention periods  
19 of considerably different lengths. In the studied helocrenes, the estimated retention period  
20 varied from 3 to 41 minutes. Despite this variation, the retention times in spring wetlands are  
21 markedly longer then the reaches downstream. As a result, the relatively small helocrenes  
22 could serve as "detrital reactors", receiving DOM and primary particles from the subsurface,  
23 transforming them as FPOM and transporting them downstream.  
24 Naturally, the leaf litter and woody debris also enter these "detrital reactors". However, we  
25 suppose that the input of these allochthonous material into our springs is variable and relatively

1 low because the study sites were primarily on pastures or forest margins and only a few of  
2 them were in the forest (we recorded only  $43.0 \pm 44.7 \text{ g.m}^{-2}$  of leaf litter deposits for the  
3 autumn study season). In the forested or partially forested catchments the input of organic  
4 matter shows a strong seasonal variability (Iversen et al. 1982). But, the amount of deposited  
5 organic matter in the stream is not very different in the non-forested catchments compared to  
6 the catchment covered with the deciduous forest (Menninger & Palmer 2007). Non-forested  
7 catchments with higher primary production, dwelled by rich planktonic and benthic  
8 community can produce more faecal pellets and parts of macrophytes (Zimmermann-Timm  
9 2002). High production of FPOM in our springs with a low input of allochthonous organic  
10 matter, is likely subsidized with organic material from the subsurface and primary production.

11

#### 12 Nutritional value of FPOM

13 In general, it is considered that the nutritional value of FPOM in terms of headwater stream, is  
14 low, and consumers must consume a large amount to meet their nutritional needs (Fisher and  
15 Likens 1973, Marcarelli et al. 2011). The variability of nutrient content in FPOM particles is  
16 remarkable. For example, a FPOM particle from the stream bottom is qualitatively different  
17 from a fresh FPOM particle from the water column (Anderson & Sedell 1979). The FPOM  
18 particles from second-order streams with forested watersheds are created from refractory  
19 material (Webster et al. 1999). This material is not as easily decomposed as the leaf litter.  
20 These refractory characteristics enable the relatively long-distance transport of these particles  
21 to higher-order streams (Webster et al. 1999). The content of dissolved nutrients in this type  
22 of headwater stream is correspondingly low (Benstead et al. 2009). Consequently, filter  
23 feeders are generally rare in headwater streams (Vannote et al. 1980). In contrast, our study  
24 area, with a predominantly treeless sloping landscape, represents a different situation. The  
25 spring water contains markedly more dissolved nutrients than the water in the downstream

1 brooks and rivers (Table 2). In contrast to the results of previous studies (Cross 2005,  
2 Benstead et al. 2009), FPOM immediately below the helocrene springs is relatively rich in  
3 nutrients. The invertebrate assemblage in helocrenes (Kubíková et al. 2011, 2012) does not  
4 correspond to the River Continuum Concept (RCC) projection for headwaters because strict  
5 filter feeders (*Pisidium casertanum*, *Pisidium personatum*) are often present in substantial  
6 amounts. Similarly, as for large river habitats (Thorp & DeLong 1994), we consider the spring  
7 assemblages to be richer in functional feeding groups than might be supposed based on the  
8 RCC.

9 Our study found a significant difference in nutrient content among the three constituent size  
10 fractions measured; the finest fraction had the lowest concentration of nutrients, except of  
11 phosphorus that prevails mostly in anionic form and is chemically bounded in different way.  
12 We suppose that with finest fraction the inorganic substances predominate. The size-fractions  
13 used in our study and the measured velocity of flow enable the entraining and transport of silt  
14 and finer particles as shows the Hjulström curve (Heise et al., 2010). On the other hand, the  
15 C: nutrient ratios decreased significantly with the decreasing size of the particle, a result that  
16 is in good agreement with previous studies (Sinsabaugh & Linkins 1990). The smaller  
17 particles, with their lower C: nutrient ratio, could be more favorable for consumers, whereas  
18 the larger fractions serve as a "storage" compartment for food. Most likely, this stored food  
19 could be used by filter feeders in downstream reaches after this material is further processed.  
20 Decreasing particle size is accompanied by a relative increase in surface area and thus by a  
21 higher capacity for microbial colonization and nutrient adsorption (Cross et al. 2005).

22 The comparison of C:N and C:P ratios in the recorded autumn leaf litter deposits and in  
23 suspended FPOM below the springs shows lower ratios (higher nutritional value) of both the  
24 characteristics in FPOM. Obviously, detritus exported from the helocrene springs originates  
25 not only from poorly decomposable remains but also from other components, such as the

1 nutrient-rich microbial coat. The average leaf C:N found by our study is in good accordance  
2 with previous studies (Sollins et al. 1985, Cross et al. 2005), but the detrital C:N is  
3 substantially different.. In Sollins et al. (1985), heavy detrital particles with a low C:N ratio  
4 included a substantial amount of crystalline mineral matter and had a C:N similar to  
5 floodplain soil. It is probable that the particles in our samples also originate, in part, from soil  
6 horizons, but they are most likely mixed with other particles with a higher C content because  
7 the C:N was almost twice as high, compared to floodplain soil. Conversely, in Cross et al.  
8 (2005) the C:N and C:P values for all size fractions examined were generally higher than  
9 those found by our study. In Cross (2005), the C: nutrient data were based on an extensive  
10 search of literature sources, and the analyzed FPOM originated from different freshwater  
11 systems. Therefore, we consider that the lower C:N found by our research was specific for  
12 spring areas. However, it appears evident that substantial variability occurs among catchments  
13 and is, most likely, caused by differences in local conditions. In this case, we consider that the  
14 helocrene spring type and its specific environmental conditions and ongoing chemical  
15 processes represent a very important factor.

16

### 17 Concepts and conclusions

18 We generally found large amounts of fine, nutrient-rich suspended material in the helocrene  
19 springs we examined. These findings are further supported by the presence of invertebrate  
20 assemblages (Kubíková et al. 2012) typical of up to third- to fourth-order streams, a result that  
21 contrasts with the assumptions of the RCC. The stream hydraulics concept (SHC) (Statzner  
22 and Higler 1985), an early criticism of the RCC, represents one possible explanation of this  
23 contrast. The SHC invokes water velocity as the main controlling factor of organic matter  
24 distribution. The low velocity of helocrene springs allows the accumulation of fine sediments  
25 and the occurrence of sediment burrowers, as is also the case in slowly flowing lowland

1 rivers. The hyporheic corridor concept (Stanford and Ward 1993) is another "post-RCC"  
2 concept that could be useful for the description of spring function. Helocrenes represent a  
3 semi-aquatic environment that is strongly bound to groundwater. Therefore, not only  
4 longitudinal connectivity but also the connection with the hyporheal environment (both the  
5 anoxic organic bed and shallow subsurface oxygenated groundwater) and the transverse  
6 linkage to the banks and their wetland and vegetation terrestrial assemblages becomes  
7 important. The influence of this vertical and lateral connectivity in helocrenes with low  
8 velocity can outweigh the longitudinal connectivity from the source to the outflow trickle. In  
9 the riverine productivity model (RPM), designed for large rivers (Thorp and DeLong 1994),  
10 the authors emphasized the importance of ongoing processes and nutrient cycles on the  
11 microbial level (autotrophic bacteria, heterotrophic bacteria, bacteriophages, protozoans). It  
12 appears that bacteria and fungi also play a crucial role at the very beginning of the river  
13 network, i.e., in the metabolism of springs. This principle is also supported by the marked  
14 decreases in dissolved forms of nitrogen and phosphorus reported in our study.

15 Most likely, the nutrient-rich fine particles initially input into first-order streams can be  
16 frequent in diverse biotope types. The RCC primarily involves the concept of a primary river  
17 network associated with forested mountains (Webster 1999, Marxsen 2006). In a global  
18 context, however, a great portion of the primary river network feature open canopies, either  
19 for natural reasons (tundra or semiarid regions) or due to the increasing pressure of human  
20 populations (pasture grasslands, meadows) (Menninger & Palmer 2007). Therefore, a typical  
21 origin of a river net might not have forest rheocrene characteristics, but could be also a spring  
22 wetland, e.g. helocrene. Because of their considerable semiaquatic character, helocrenes are  
23 often overlooked in hydrobiological and ecological research. However, they are very common  
24 in open landscapes with gentle slopes (Kubíková 2012). In the area of about 60 km<sup>2</sup> where we  
25 were doing the research has been mapped about 1100 springs (Dort & Hruška 2007). If only



1 half of them were helocrenes connected to the river network, their production of FPOM  
2 would be about 70 kg of dry mass per year. What is the real production of these springs and  
3 how big is their impact on spring and downstream ecosystems, is still unknown. But it is  
4 necessary to take the spring production into account in the annual organic matter budgets.  
5 Consequently, from a global perspective, these biotopes may represent a relatively common  
6 discontinuity of the river continuum at its origin. This characteristic would have important  
7 implications for the functions of organic matter pathways within the river network, as recently  
8 noted by several authors (Chadwick & Huryń 2003, Rosemond et al. 2008, Kominoski &  
9 Rosemond 2012). Therefore, further research is needed in the field of spring-originated  
10 FPOM and on the processes of downstream transport and utilization of nutrients.

## **Acknowledgements**

The research was funded by grants from the Ministry of Environment of the Czech Republic (MZP 0002071101) and an IGA grant from the Czech University of Life Sciences Prague (2010/42110/019). Support to KD and JH came from the Czech Science Foundation (13-05872S)..

## References

- Allan, J.D., Castillo, M. M, 2007. Stream ecology, Structure and function of running waters, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands, 1-338 pp.
- Anderson, N.H. and Sedell, J.R., 1979. Detritus processing by macroinvertebrates in stream ecosystems. *Annual Review of Entomology* 24: 351-377.
- Audorff V., Kapfer J., Beierkuhnlein C., 2011. The role of hydrological and spatial factors for the vegetation of Central European springs. *Journal of Limnology* 70: 9-22.
- Barquín, J., Death R.G., 2011: Downstream changes in spring-fed stream invertebrate communities: the effect of increased temperature range? *Journal of Limnology* 70: 134-146.
- Benstead, J.P., Rosemond, A.D., Cross, W.F., Wallace, J.B., Eggert, S.L., Suberkropp, K., Gulis, V, Greenwood, J.L., Tant, C.J, 2009. Nutrient enrichment alters storage and fluxes of detritus in a headwater stream ecosystem. *Ecology* 90: 2556-2566.
- Cross, W.F., Benstead, J.P., Frost, P.C., Thomas, S.A., 2005. Ecological stoichiometry in freshwater benthic systems: Recent progress and perspectives. *Freshwater Biology* 50: 1895-1912.
- Cross, W.F., Wallace, J.B, Rosemond, A.D., 2007. Nutrient enrichment reduces constraints on material flows in a detritus-based food web. *Ecology* 88: 2563-2575
- Cuffney, T.F., Wallace, J.B., 1988. Particulate Organic Matter Export from Three Headwater Streams: Discrete versus Continuous Measurements. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 45: 2010-2016.
- Cushing, C.E., 1997. Organic matter dynamics in Rattlesnake Springs, Washington, USA. *Journal of the North American Benthological Society*, 16: 39-43.
- Cushing, C.E., Minshall, G.W., Newbold, J.D., 1993. Transport dynamics of fine particulate organic matter in two Idaho streams. *Limnology & Oceanography*, 38: 1101-1115.

- Chadwick, M.A, Hurny, A.D., 2003. Effect of a whole-catchment N addition on stream detritus processing. *Journal of the North American Benthological Society*, 22: 194-206.
- Dort, B. and J. Hruška, 2007. Speciální revitalizační studie Blanice a Zlatého potoka. [A special revitalization study of Blanice and Zlatý potok], Nature Conservation Agency of the Czech Republic. Report, not published (in Czech).
- Fisher, S.G., Likens, G.E., 1973. Energy Flow in Bear Brook, New Hampshire: An Integrative Approach to Stream Ecosystem Metabolism. *Ecological Monographs*, 43: 421-439.
- Gerecke, R., Cantonati, M., Spitale, D., Stur, E., Wiedenbrug, S., 2011. The challenges of long-term ecological research in springs in the northern and southern Alps: indicator groups, habitat diversity, and medium-term change, *Journal of Limnology*, 70: 168-187.
- Graça, M.A.S., 2001. The role of invertebrates on leaf litter decomposition in streams- A review . *Internat.Rev.Hydrobiol.*, 86: 383-393.
- Heise, B., Harff, J., Ren, Jie, Liang, K., 2010. Patterns of potential sediment erosion in the Pearl River Estuary. *Journal of Marine Systems*, 82, Supplement: S62-S82.
- Hoover, T.M., Marczak, L.B., Richardson, J.S., Yonemitsu, N., 2010. Transport and settlement of organic matter in small streams. *Freshwater Biology*, 55: 436-449.
- Ilmonen J., Paasivirta L. 2005. Benthic macrocrustacean and insect assemblages in relation to spring habitat characteristics: patterns in abundance and diversity - *Hydrobiologia*, 533: 99–113.
- ISO 10694:1995: Soil quality - Determination of organic and total carbon after dry combustion (elementary analysis)  
[http://www.iso.org/iso/iso\\_catalogue/catalogue\\_tc/catalogue\\_detail.htm?csnumber=18782](http://www.iso.org/iso/iso_catalogue/catalogue_tc/catalogue_detail.htm?csnumber=18782)
- ISO 11885:2007: Water quality - Determination of selected elements by inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES),

[http://www.iso.org/iso/catalogue\\_detail.htm?csnumber=36250](http://www.iso.org/iso/catalogue_detail.htm?csnumber=36250)

- Iversen, T.M., Jensen, T., Skriver, J., 1982. Inputs and transformation of allochthonous particulate organic matter in a headwater stream. *Holarctic ecology* 5: 10-19.
- Kominoski, J.S., Rosemond, A.D., 2012. Conservation from the bottom up: forecasting effects of global change on dynamics of organic matter and management needs for river networks. *Freshwater Science*, 31: 51-68.
- Kubíková, L., Simon, O.P, and Fricová, K., 2011. The occurrence of *Pisidium* species, *Bivalvia: Sphaeriidae*: in oligotrophic springs of the Blanice River catchment, Czech Republic: in relation to ecological conditions. *Biologia*, 66: 299-307.
- Kubíková, L., Simon, O.P, Tichá, K., Douda, K., Maciak, M., Bílý, M., 2012. The influence of mesoscale habitat conditions on the macroinvertebrate composition of springs in a geologically homogeneous area. *Freshwater Science*, 31: 668-679.
- Leibundgut, Ch., Maloszewski, P., Külls, Ch., 2009. *Tracers in Hydrology*. Wiley-Blackwell: 415 pp.
- Mann, K.H., 1988. Production and use of detritus in various freshwater, estuarine, and coastal marine ecosystems. *Limnology & Oceanography*, 33: 910-930.
- Marcarelli, A.M., Baxter, C.V., Mineau, M.M., Hall, R.O., 2011. Quantity and quality: unifying food web and ecosystem perspectives on the role of resource subsidies in freshwaters. *Ecology*, 92: 1215-1225.
- Marxsen, J., 2006. Bacterial production in the carbon flow of a central European stream, the Breitenbach. *Freshwater Biology*, 51: 1838-1861.
- Menninger, H.L., Palmer, M.A., 2007. Herbs and grasses as an allochthonous resource in open-canopy headwater streams. *Freshwater Biology*, 52: 1689-1699.

- Meyer, J.L., Strayer, D.L., Wallace J.B., Eggert, S.L., Helfman, G.S., and Leonard, N.E., 2007. The contribution of headwater streams to biodiversity in river networks<sup>1</sup>. *Journal of the American Water Resources Association* 43: 86-103.
- Newbold, J.D., 1992. Cycles and spirals of nutrients. In: P.Calow and G.E.Petts, eds.; *The Rivers Handbook, Hydrological and Ecological principles*, Blackwell Scientific Publications, Oxford, pp. 379-408.
- Newbold, J.D., Thomas, S.A., Minshall, G.W., Cushing, C.E., and Georgian, T., 2005. Deposition, benthic residence, and resuspension of fine organic particles in a mountain stream. *Limnology and Oceanography* 50: 1571-1580.
- Pozo, J., Elosegui, A., Basaguren A., 1994. Seston transport variability at different spatial and temporal scales in the Agüera watershed (North Spain). *Water Research* 28, 125–136.
- Rosemond, A.D., Cross, W.F., Greenwood, J.L., Gulis, V., Eggert, S.L., Suberkropp, K., Wallace, J.B., Dye, S.E., 2008. Nitrogen versus phosphorus demand in a detritus-based headwater stream: what drives microbial to ecosystem response?, *Verhandlungen des Internationalen Verein Limnologie*, 30: 651-655.
- Sinsabaugh, R.L., Linkins, A.E., 1990. Enzymic and chemical analysis of particulate organic matter from a boreal river. *Freshwater Biology*, 23: 301-309.
- Sollins, P., Glassman, C.A., and Dahm, C.N., 1985. Composition and Possible Origin of Detrital Material in Streams. *Ecology* 66: 297-299.
- Stanford, J.A., Ward, A.K., 1993. An Ecosystem Perspective of Alluvial Rivers: Connectivity and the Hyporheic Corridor. *Journal of the North American Benthological Society*, 12: 48-60.
- Statzner, B., Higler, B., 1985: Questions and comments on the River Continuum Concept. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 42: 1038-1044.

- Sterner, R.W., Elser, J.J., 2002. Ecological stoichiometry. The biology of elements from molecules to the biosphere. Princeton University Press, Princeton: 439 pp.
- Thomas, S.A., Newbold, J.D., Monaghan, M.T., Minshall, G.W., Georgian, T., Cushing, C.E., 2001. The influence of particle size on seston deposition in streams. *Limnology and Oceanography*, 46: 1415-1424.
- Thorp, J.H., Delong, M.D., 1994. The Riverine Productivity Model - An Heuristic View of Carbon Sources and Organic Processing in Large River Ecosystems. *Oikos*, 70: 305-308.
- Thorp, J.H., Delong, M.D., 2002. Dominance of autochthonous autotrophic carbon in food webs of heterotrophic rivers. *Oikos*, 96: 543-550.
- Tichá, K., Simon, O.P, Douda, K., Kubíková, L., 2012. Detrital components in submontane organogenic springs in relation to their morphology, microhabitats and macroinvertebrates. *Polish Journal of Ecology* 60, 163-175.
- Vannote, R.L., Minshall, G.W., Cummins, K.W., Sedell, J.R., Cushing, C.E., 1980. The river continuum concept. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 37: 130-137.
- Wallace, J.B., Cuffney, T.F., Webster, J.R., Lugthart, G.J., Chung, K., Goldowitz, B.S., 1991. Export of fine organic particles from headwater streams: effects of season, extreme discharges, and invertebrate manipulation. *Limnology & Oceanography*, 36: 670-682.
- Webster, J.R, 2007. Spiraling down the river continuum: stream ecology and the U-shaped curve. *Journal of the North American Benthological Society* 26: 375-389.
- Webster, J.R, Benfield, E.F., Ehrman, T.P., Schaeffer, M.A., Tank, J.L., Hutchens, J.J., Di Angelo D.J., 1999. What happens to allochthonous material that falls into streams? A synthesis of new and published information from Coweeta. *Freshwater Biology*, 41: 687-705.

Wotton, R.S., 2007. Do benthic biologists pay enough attention to aggregates formed in the water column of streams and rivers? *Journal of the North American Benthological Society* 26: 1-11.

Zimmermann-Timm, H., 2002. Characteristics, Dynamics and Importance of Aggregates in Rivers – An Invited Review, *International Review of Hydrobiology* 87: 197–240.

Zollhöfer, J.M., Brunke, M., Gonsler, T., 2000. A typology of springs in Switzerland by integrating habitat variables and fauna. *Archiv für Hydrobiologie* 121: 349-376.



Tables:

Parameter	Fraction (DF=2)		Season (DF=3)		Site (DF=9)	
	F	p	F	p	F	p
N	54.3	<0.001	0.4	n.s.	23.8	<0.001
P	0.7	n.s.	4.2	<0.01	24.5	<0.001
S	34.4	<0.001	0.7	n.s.	25.8	<0.001
Ca	17.8	<0.001	5.5	<0.01	41.8	<0.001
C	102.8	<0.001	10.6	<0.001	19.3	<0.001
Sus.	55.3	<0.001	4	<0.01	5.6	<0.001
C/N	5.7	<0.01	6.2	<0.001	4.7	<0.001
C/P	50.1	<0.001	1.2	n.s.	28.5	<0.001
C/S	2.2	n.s.	9.1	<0.001	10.2	<0.001
C/Ca	49.9	<0.001	5.1	<0.01	12.5	<0.001
N/P	38.7	<0.001	2	n.s.	32.4	<0.001

Table 1: Summary of the significant GLM results for nutrient content (C, N, P, Ca and S), detritus concentration, and C:N, C:P, C:Ca and C:S ratios in the constituent size fractions of detritus.

Parameter	Position	Mean $\pm$ SD (mg/l)	Range (mg/l)	t	DF	p
NO <sub>3</sub>	source	5.8 $\pm$ 5.5	0.7 - 19.1	2.8	43	<0.01
	outflow	4.7 $\pm$ 4.7	0.1 - 16.4			
o-PO <sub>4</sub>	source	0.06 $\pm$ 0.03	0.01 - 0.13	6.38	43	<0.001
	outflow	0.04 $\pm$ 0.03	0.0025* - 0.11			
Ca	source	6.1 $\pm$ 3.0	3.2 - 15.7	-0.03	43	n.s.
	outflow	6.2 $\pm$ 3.4	2.4 - 19.4			

\* *under detection limit*

Table 2: Dissolved nutrients in the spring source and outflow and the significance of paired t-tests of these data (N= 44).

<b>Parameter</b>	<b>Mean <math>\pm</math> SD</b>	<b>Range</b>
	(g/kg)	(g/kg)
C	541 $\pm$ 30	488 - 616
N	14.87 $\pm$ 5.61	8.5 - 30.3
P	0.968 $\pm$ 0.223	0.552 - 1.4
Ca	14.1 $\pm$ 3.6	8.77 - 21.1
S	1.32 $\pm$ 0.32	0.89 - 1.97

Table 3: Average content of nutrients in leaf litter deposits at the spring surface (N=22).

Figure legends:

Figure 1: Scheme of detrital sampler: suction basket (1), discharge pipe (2), settling vessel (3) discharge pipe (4). The arrows indicate the difference of the water surface levels.

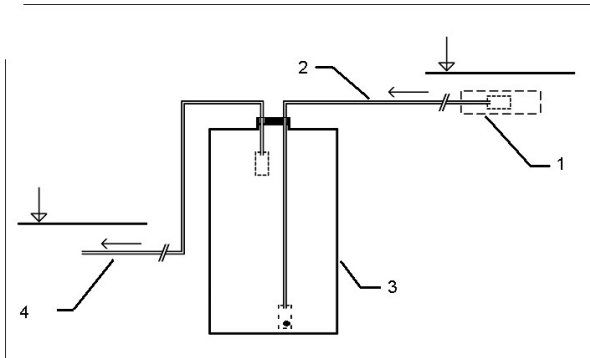


Figure 2: Nutrient content and the estimated dry mass concentration of the constituent size fractions of detritus sampled from outflowing spring water. Median, 1st and 3th quartile, extremes and outliers are indicated.

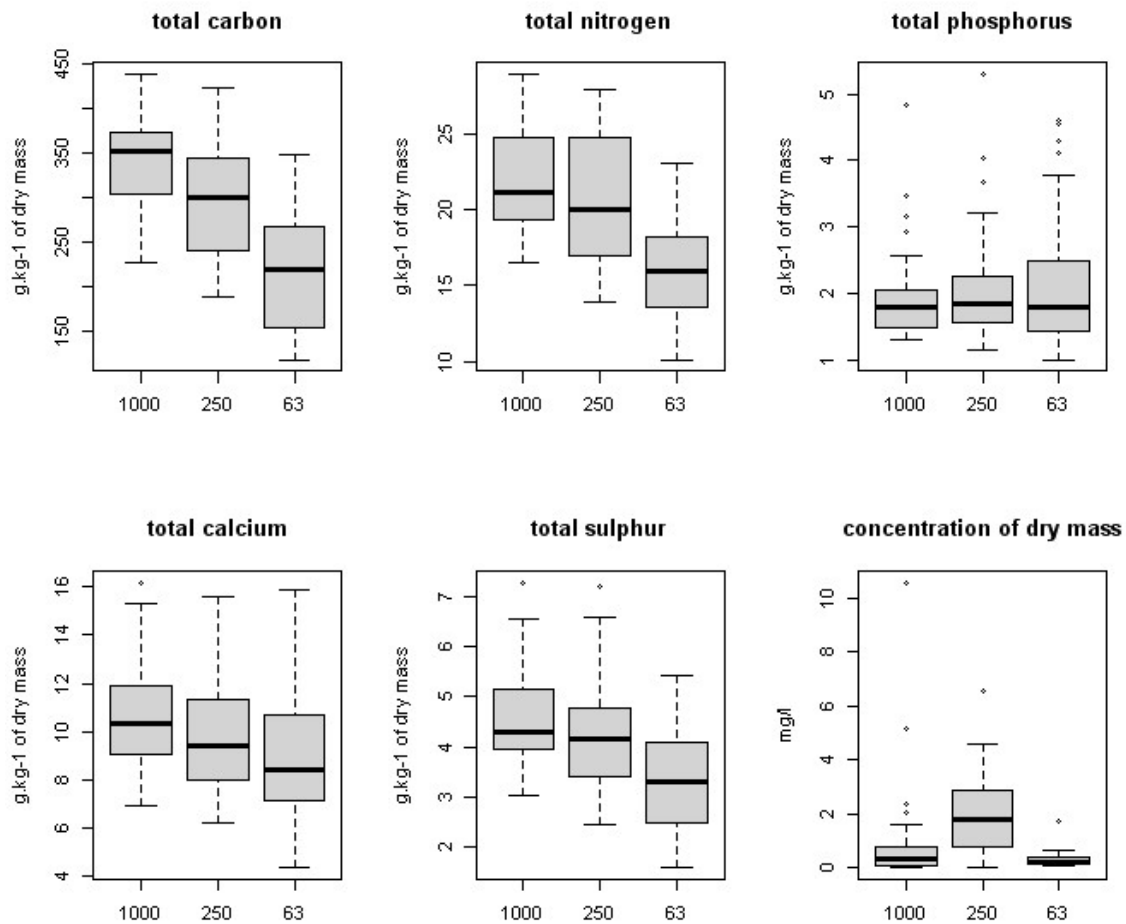
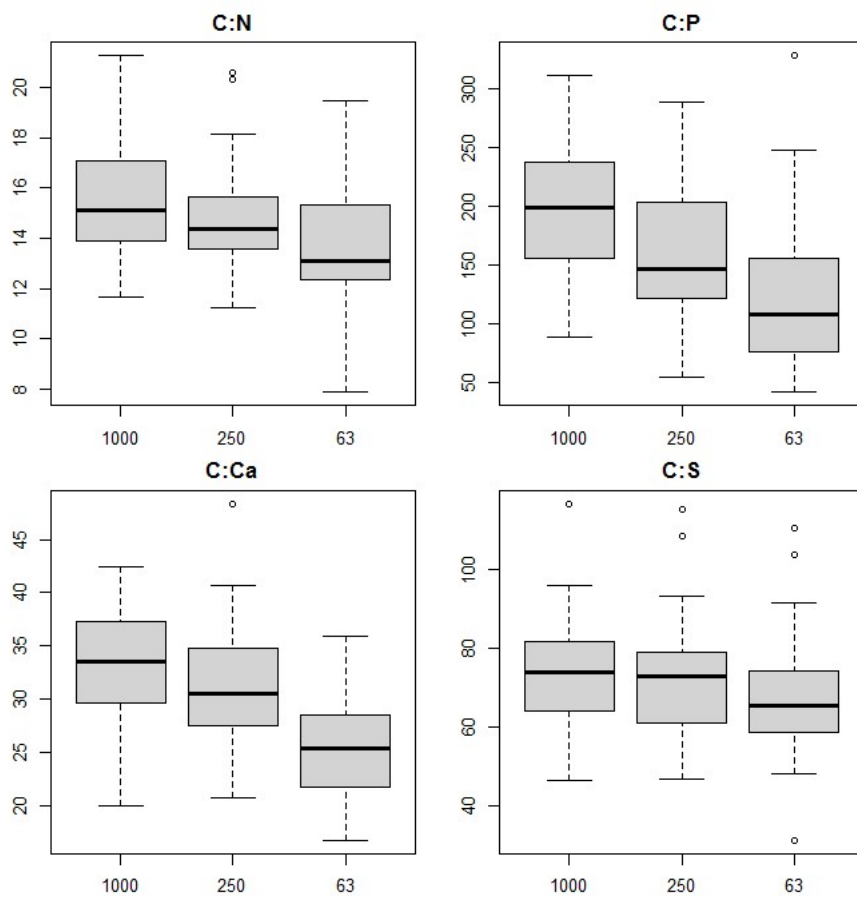


Figure 3: C:N, C:P, C:Ca and C:S ratios in the constituent size fractions of detritus. Median, 1st and 3rd quartile, extremes and outliers are indicated.



[Click here to view linked References](#)

1 **Growth and survival of juvenile freshwater pearl mussels: a type of bioindication**  
2 **method, hyporheic oxygen saturation and a locality position within a catchment have an**  
3 **effect**

4 **Michaela Černá<sup>1</sup>, Ondřej P. Simon<sup>1, 2</sup>, Michal Bílý<sup>1</sup>, Karel Douda<sup>3</sup>, Bohumil Dort<sup>4</sup>,**  
5 **Michaela Galová<sup>3, 5</sup>, Miriam Volfová<sup>2</sup>**

6 *<sup>1</sup>Faculty of Environmental Sciences, Czech University of Life Sciences Prague, Kamýcká 129, CZ-16521 Prague*  
7 *6, Czech Republic*

8 *<sup>2</sup>T. G. Masaryk Water Research Institute, Podbabská 30, CZ-16000 Prague 6, Czech Republic*

9 *<sup>3</sup>Department of Zoology and Fisheries, Faculty of Agrobiolgy, Food and Natural Resources, Czech University*  
10 *of Life Science, Kamýcká 129, CZ-16521 Prague 6, Czech Republic*

11 *<sup>4</sup>Bohumil Dort, Za Baštou 349, Prachatice, 383 01*

12 *<sup>5</sup> Department of Ecology and Environmental Sciences, Faculty of Science, Palacký University, Šlechtitelů*  
13 *241/27, Olomouc, 783 71*

14 Author for correspondence: cernamichaela@fzp.czu.cz

15 Keywords: longitudinal profile, *Margaritifera margaritifera*, substrate types, bioindications, conservation,  
16 hyporheal

17 **Introduction**

18 The reproduction of freshwater pearl mussels has stagnated in many European localities in recent decades. A  
19 number of factors which can negatively affect reproduction have been identified, such as the absence of suitable  
20 host fish (Bauer et al., 1991), deficient permeability of the hyporheic interstitial and substrate quality (Geist &  
21 Auerswald, 2007), or low temperatures for juvenile growth (Hruška, 1992). Nevertheless, there has been no  
22 detailed description of the most favourable environment for the development of juveniles.

23 Finding unionid juveniles in a large volume of sediment under natural conditions is possible but very uncommon  
24 (Neves & Widlak, 1987). Field data from ecological studies are primarily available for species that grow up to  
25 several centimetres during the first years of their life (Jones & Neves, 2011). The freshwater pearl mussel

26 (*Margaritifera margaritifera*) has very small juveniles that inhabit substrates with a comparable grain size (the  
27 size of individuals in semi-natural breeding conditions in Czech localities during their second year of life is  
28 approximately 0.6 – 1.1 mm). But finding juveniles up to one cm in size is rare and random, even in localities  
29 with natural reproduction (Hastie et al., 2010). Finding *M. margaritifera* juveniles is complicated also due the  
30 very long life span of the species, which can be 80 – 140 years (Bauer, 1992; Hruška, 1991) or perhaps even 200  
31 years (Helama & Halovirta 2008). This species only requires sufficient conditions for successful reproduction in  
32 a few years during the lifespan of one age cohort (Jones & Neves, 2011). Often, juvenile life history can be  
33 deduced only from the occurrence of older cohorts over a longer timeframe (Englund et al., 2008; Hastie & Toy,  
34 2008; Hastie et al., 2000; Outeiro et al., 2008). Thus, most of the knowledge about juveniles biology comes from  
35 the evaluation of breeding practices or from various types of bioindication experiments (Gum et al., 2011;  
36 Hruška, 1999; Lavictoire et al., 2015).

37 Based on the use of bioindication methods in situ, our study is focused on the Vltava River in Šumava National  
38 Park (Czech Republic), where a very diffuse and small population (up to 1000 individuals) occurs in an  
39 approximately 30-km long stretch above Lipno reservoir. This population is probably not reproducing naturally  
40 and has stagnated since the 1970s. One of the possible factors preventing natural reproduction is the low number  
41 of host fish; this is the result of dam construction, which has prevented fish migration (Simon et al., 2015;  
42 Švanyga et al., 2013). However, according to previous bioindication testing, the growth of juveniles is not  
43 impeded in the Vltava River. Moreover, some individuals originating from semi-natural breeding that were  
44 stocked here in 1998 successfully completed all developmental phases (Simon et al., 2015). In contrast, juveniles  
45 placed in the neighbouring Blanice River, where the largest Czech population occurs, have a low growth rate and  
46 usually die during their first two years of life. The mountain river floodplain ecosystem is only slightly  
47 anthropogenically modified in the Vltava basin compared to the surrounding Central European landscape  
48 (Bufková & Rydlo 2008), and the river is not substantially damaged by eutrophication and acidification (Oulehle  
49 et al. 2006). Thus, a detailed study focusing on the conditions for juvenile development within the catchment  
50 was feasible here.

51 The Vltava River has a great potential for *M. margaritifera* conservation, including supporting a population  
52 using juveniles originated from a semi-natural breeding location. Therefore, the first aim of our study was to  
53 answer the question of how the locality position within a river longitudinal profile affected a juvenile  
54 development and what is the role of key environmental factors (such as temperature, water chemistry or the  
55 composition of detritus particles) differing between the localities.

56 It is assumed that juveniles, which fall into bottom sediments after leaving a host fish live many years thereafter  
57 in the hyporheic zone (Bauer & Wächtler, 2001). The length of this period is estimated to be 10 – 20 years in  
58 Czech localities, which are relatively cold (Simon et al., 2015). The type of preferred habitat and ecological  
59 requirements (movement possibility, food composition) of this life phase are not well described. As such, the  
60 second questions investigated in this research aimed to determine the factors that influenced juvenile  
61 development in different habitats in selected localities, as well as in a microhabitat scale, reflecting hyporheic  
62 oxygen conditions in the core locality. In all probability this study represents the first example of a detailed  
63 assessment of a freshwater mussel biotope with generally favourable habitats that used a bioindication method  
64 which was hierarchized in three spatial scales: 1) position in the longitudinal profile of the river, 2) microhabitats  
65 within the river bottom, 3) microhabitats in the hyporheic environment.

66 Bioindication methods that evaluate the growth and survival rates of juvenile individuals exposed to the natural  
67 environment are often used in conservation biology. The most common method is based on the containment of  
68 individual specimens in small meshed chambers placed in a set within a plastic cage (Buddensiek, 1995). This  
69 method has been used for 20 years in Central Europe and allows results across studies to be compared  
70 (Buddensiek 1995, Schmidt & Vandr e 2010, Gum et al., 2011, Scheder et al., 2014). Other systems have been  
71 used to better imitate natural conditions, such as sandy cages (Hruška, 1999) or mesh tubes placed in the river  
72 substrate. Because the environment in certain types of experimental devices does not perfectly correspond with  
73 natural conditions (Gum et al. 2011), our study focused simultaneously on two bioindication methods.  
74 Bioindication experiments were performed using both standard Buddensiek mesh cages with individual  
75 containment (Buddensiek, 1995, modified) and sandy cages with at least 100 juveniles (Hruška, 1999). The  
76 comparison of suggested possibilities for both of the described methods represented the third and equally  
77 important aim of our study.

## 78 **Methods**

### 79 **Study site and localities**

80 The studied stretch of the Vltava River is 30 km long, from river kilometre 366 to 396 (counting upstream), and  
81 is at an altitude of 728 – 758 m a.s.l. Ten localities (9 + 1) were evaluated, nine of which are located within a  
82 catchment of this stretch of the Vltava River and the tenth one situated in the Blanice River (also in the Vltava  
83 River basin). Both rivers host the same *M. margaritifera* conservation unit (CU Blanice, Simon et al. 2015). In  
84 the main stream of the Vltava River, four sites were investigated where mussels still occur (I-Pod Jedlovym, II-



85 Meandr, III-Pekna and Ovesna – those marked by Latin numbers represent a core area of recent occurrence) and  
86 one at the upper end of its historical distribution (Lenora). Moreover, the mouths of some tributaries without  
87 documented occurrence of the species were investigated (localities T-Olsinka, T-Rasnice, T-Volarsky, T-  
88 Studena). The neighbouring basin of the Blanice River was represented by one locality (Blanice) situated in a  
89 river stretch containing the main species colony (782 m a.s.l.). This was used as a control site because the parents  
90 of the experimental juveniles originated here. Fig. 1 describes the spatial distribution of the localities. For water  
91 chemistry parameters, see Tab. 1.

92 The localities I-Pod Jedlovym, II-Meandr, and III-Pekna represent the core segment of freshwater pearl mussel  
93 distribution in the Vltava River. A good juvenile growth rate was presumed to occur here; thus, these localities  
94 were chosen for more detailed study. The upper two localities (I-Pod Jedlovym, II-Meandr) have identical open  
95 water quality conditions. The localities II-Meandr and III-Pekna have identical temperature conditions, but their  
96 chemistry and flow dynamics differ slightly.

#### 97 **Experimental animals**

98 All experimental juveniles originated from a semi-natural breeding programme conducted annually within the  
99 Czech Action Plan for Freshwater Pearl Mussels (Švanyga et al., 2013). This programme breeds juveniles  
100 according to standard methods using brown trout (*Salmo trutta*), a suitable local host fish. The juveniles had the  
101 same origin as the existing population in the Vltava basin (CU Blanice, Simon et al. 2015). The individuals were  
102 fed detritus from helocrene springs during the first year after excystment (Švanyga et al. 2013, Tichá et al. 2012).  
103 Freshwater pearl mussel juveniles were used that were 1+ years of age (juveniles within the second year of life  
104 after the parasitic stage). In some experimental units, juveniles in the first age period (0+) were also used. After  
105 the experiment, all survivors were reintroduced into the breeding programme (Švanyga et al., 2013).

#### 106 **Bioindication study using mesh cages with individual chambers**

107 Randomly chosen juveniles that were 1+ years of age were used. Body size was determined as the maximum  
108 total shell length using a trinocular stereomicroscope (magnification 8x; calibration grid) and ImageJ software  
109 (Abramoff et al. 2004). Afterwards, juveniles were placed into mesh cages with one individual per chamber  
110 according to Buddensiek (Buddensiek, 1995). Each mesh cage contained six individuals. The chamber volume  
111 was 226 mm<sup>3</sup> and the mesh size of the chamber-closing mesh was 340 µm. The mesh cages were exposed to the  
112 stream water and were anchored to the bottom with steel spikes (hereafter “open water mesh cages”). All cages

113 were situated 10 cm above the bottom surface. The angle between the thalweg, i.e., a line with highest velocity  
114 in deep part of channel (Fryirs & Brierle 2013) and the mesh cage surface was 45%.

115 The mesh cage experiment lasted 30 days. This duration was chosen based on experience from the Czech Action  
116 Plan for Freshwater Pearl Mussels (Švanyga et al., 2013) where a one month period proved to be sufficient to  
117 recognize differences in growth. During the experiment, the mesh cages were checked after 14 days and were  
118 cleared of drifting material. After the experiment, the individuals were measured again using image analysis  
119 software, and a growth rate (%) was calculated for every surviving juvenile. For a longitudinal profile effect,  
120 absolute values of growth ( $\mu\text{m}$ ) were also used. The survival rate was calculated as the ratio of the number of  
121 survivors to the total number of juveniles in every mesh cage. The average growth rate for the three best growing  
122 individuals per mesh cage (3 MAX) was used for the analyses. Alternatively, the average growth rate of all  
123 surviving individuals from the mesh cages was used for the analyses.

124 Where the study was most detailed (II-Meandr), a bioindication experiment was performed using mesh cages  
125 situated in the hyporheic environment (hereafter “*within-bed mesh cages*”). Mesh cage construction, exposure  
126 time, and all the evaluation processes were analogous to the method used for open water mesh cages; the only  
127 difference was their position. The cages were placed under the bottom surface by a diver and were fixed with  
128 iron pins. The sites were chosen with respect to studied substrates (see below) and oxygen saturation (over 85%  
129 up to the first 13 cm of sediment depth). There was a minimum distance of 2 m between the sites within one  
130 locality. The within-bed mesh cages were placed in three types of substrate: sand, gravel and stones. They were  
131 located 3 cm under the bottom surface in all of these substrates. In additional, cages were also placed at a depth  
132 of 13 cm in the gravel substrate. After the within-bed mesh cages were installed, they were covered with the  
133 original bottom substrate. Each cage was equipped with a PVC tube for water sampling from the hyporheic zone  
134 at a depth of 3 cm (or 13 cm for the gravel substrate).

### 135 **Bulk bioindication in sandy cages**

136 Juveniles (1+ age) were placed in plastic boxes with mesh (size of boxes:  $170 \times 100 \times 70$  mm, mesh size: 340  
137  $\mu\text{m}$ ) that were filled to 30% volume with sorted local river sand (Hruška 1999). A grain size of 1 – 2 mm was  
138 selected as a favourable environment (Lavictoire et al. 2015). This method better imitates the natural habitat. All  
139 these sandy cages were primarily intended for breeding within the Czech Action Pearl Mussel Plan and were  
140 identical in shape and size.

141 The standard number was 100 individuals per sandy cage for the bioindication study. Because of the loss of  
142 some cages, additional sandy cages with 500 – 2000 individuals were included in the analysis. Sandy cages were  
143 placed 10 cm above the bottom and were fixed to a flat stone with a fishing net (hereafter “*open water sandy*  
144 *cages*”). The cages were positioned in the base flow area where the stream speed reached up to  $0.2 \text{ m s}^{-1}$  during  
145 exposure. The angle between the thalweg and the longer edge of the sandy cage was  $45^\circ$ .

146 At the three localities that were studied in more detail (I-Pod Jedlovym, II-Meandr, and III-Pekna), sets of sandy  
147 cages were also located outside the thalweg. The cages were placed either downstream of a bigger stone or in  
148 narrow spaces between stones. In the first case, a slight turbulent flow occurred, whereas almost still water  
149 occurred in the second case. Sets of sandy cages were also installed in the hyporheic environment (hereafter  
150 “*within-bed sandy cages*”). The sandy substrates therein corresponded with the level of the surrounding gravel  
151 substrate. Fixing stones were placed above the sandy cages. All individuals were photographed together before  
152 being placed into the sandy cages (magnification, 10x; calibration grid). Subsequently, the ten largest individuals  
153 (10 MAX) were measured using the image analysis software.

154 The experiment was conducted over three months. The sandy cages were checked at two-week intervals or after  
155 a storm-induced flood had subsided. Maintenance included cleaning the cage mesh area with a brush, sediment  
156 elutriation, and position correction if necessary. The sandy cages were not taken out of the water during these  
157 procedures.

158 At the end of the experiment, the juveniles were separated from the sand by elutriation – the repeated swirling  
159 and pouring of water to remove lighter particles including live organisms. When the last individual was found,  
160 the whole process was repeated ten times to minimize mistakes due to missed individuals. The number of  
161 surviving individuals per sandy cage varied from 0 to 694. Dead shells were not included in the analysis due to  
162 their varied stages of decomposition and the inability to objectively compare growth.

163 All surviving individuals were collectively photographed and the ten largest individuals were measured as at the  
164 beginning of the experiment. Based on prior experience with the Czech Action Plan for Freshwater Pearl  
165 Mussels (Švanyga et al., 2013), low mortality for faster growing individuals was assumed as well as a higher  
166 chance of achieving maturity (Barnhart, 2006). At the end of this experiment, the total number of individuals  
167 was determined to calculate the survival rate. In addition, sandy cages with juveniles in their first year of life  
168 after excystment (0+) were assessed in three core localities.

169 **Experimental design**

170 The river environment was investigated at three spatial scales: 1) over the longitudinal river profile and its  
171 tributaries (ten localities in total); 2) within different habitat types at the three basic localities; and 3) within  
172 different hyporheic microhabitats at one selected locality. The experiment took place over a two-year period  
173 (2014 and 2015). For spatial design, see Fig. 2.

174 1) Six open water mesh cages per locality were installed at eight localities in 2014, whereas only four were  
175 installed at each of the six localities in 2015. In addition, a total of 20 open water sandy cages were distributed at  
176 the five main stream localities and at two tributaries (T-Rasnice, T-Volarsky) in 2014. In 2015, a total of 16 open  
177 water sandy cages were distributed within the localities I-Pod Jedlovym, II-Meandr and III-Pekna.

178 2) The three main localities (I-Pod Jedlovym, II-Meandr, III-Pekna) were chosen for a more detailed habitat  
179 study during 2014 and 2015. In addition to the basic sets of open water sandy cages, 17 open water sandy cages  
180 together were installed at two different positions in relation to the thalweg (eleven sandy cages behind a bigger  
181 stone and six in narrow spaces between stones. Because of a low number of repeating occurrences, both  
182 positions were statistically evaluated together as one group. Moreover, two within-bed sandy cages were  
183 installed at each of these three localities for maximal imitation of the natural environment of juveniles.

184 To test the effect of environmental conditions on different age cohorts, sandy cages with juveniles (0+) were  
185 assessed in these three localities. At each locality, three to four replicates of open water sandy cages and two  
186 replicates of within-bed sandy cages were located in 2014.

187 3) At the core locality (II-Meandr) a detailed study of the hyporheic environment was carried out in 2014. In  
188 addition to the six open water mesh cages, 28 additional within-bed mesh cages were simultaneously installed.  
189 These cages were situated in four different environments characterized by substrate type and the depth of  
190 chambers (3 or 13 cm under the bottom surface). The environments were sand (3 cm), gravel (3 cm), gravel (13  
191 cm), and stony bottom (3 cm). Seven mesh cages were installed in each environment and were evaluated  
192 together with the basic set of six open water mesh cages installed here. An overall set of 34 mesh cages  
193 represented five environments for comparison.

194 The Vltava River is popular for canoeing, so several losses of mesh cages and sandy cages were recorded due to  
195 disturbance from canoeists. In addition, two mesh cages shifted at III-Pekna in 2015. These two cages were  
196 excluded from data analyses.

197 **Physical and chemical measurements**

198 Water temperature and light exposure were continuously measured by HOBO temperature/light data loggers  
199 (HOBO Pendant, Onset) at every locality in 2014. In 2015, the HOBO data loggers were located at each mesh  
200 cage because of possible local variability. However, there were no deviations in temperature between mesh cages  
201 within a locality; thus, temperature data from the first mesh cage (in the downstream direction) from every  
202 locality were used for analysis.

203 Open water samples for chemical analysis were taken from the studied localities at monthly intervals over the  
204 duration of the bioindication experiments across both years. For a general overview of the water chemistry in the  
205 catchment, monthly chemical monitoring was carried out at the six main localities from II 2014 to IX 2015. In  
206 2015, chemical data are missing from the later-added comparative T-Olsinka.

207 Point samples were taken from a 10 cm depth in the thalweg. In addition, pH, conductivity and dissolved oxygen  
208 were measured in the field using a mobile oximeter (Hach). Common values of approximately 100% oxygen  
209 saturation indicated that oxygen saturation was not a limiting factor in the environment of open water across the  
210 catchment.

211 Water samples were collected in 1 l PE bottles and were transported to the laboratory in a cooler. Nitrates,  
212 ammonium ions, total phosphorus, calcium, undissolved substances, and absorbance at 254 nm (as an indicator  
213 of dissolved organic substances) were measured using standard laboratory methods.

214 Hyporheic water was sampled from the plastic tubes in close proximity to every within-bed mesh cage five times  
215 per month during the exposure period. Nitrate and ammonia ions were quantified in the laboratory by standard  
216 laboratory methods, whereas conductivity and oxygen saturation were measured in the field using a mobile  
217 oximeter (WTW). Water was taken from the tubes using a 200 ml syringe; the first batch (ca 75 ml) was poured  
218 out. The next sample (75 ml) was drained into plastic bottle and measured by the oxygen sensor. Oxygen  
219 saturation was registered just after value stabilisation. Our methodical experiment showed that the value  
220 remained stable ( $\pm 1\%$ ) in the sample for at least 15 minutes, even when the saturation was below 50%.

221 Detritus from the bottom was sampled in the plastic pipes at every locality three times during the bioindication  
222 experiment. Detritus samples were filtered through a 0.1 mm meshwork, dried at 105 °C and homogenized. The  
223 ratio of ash-free dry mass (AFDM), the C/N ratio, and phosphorus and calcium concentrations were measured by  
224 standard laboratory methods.

## 225 **Statistical analysis**

226 Statistical analysis was conducted in R, version 3.1.0 (R Core Team 2014). Kruskal-Wallis, Kruskal-Nemenyi,  
227 and Wilcoxon-Mann-Whitney tests were used. For data with a normal distribution, linear or quadratic regression  
228 was carried out.

## 229 **Results**

### 230 **Water and detritus chemistry in the catchment**

231 Generally, water chemistry in the catchment is within the limits reported for freshwater pearl mussels in the  
232 literature, except for the stream T-Volarsky (Tab. 1). A table summarizing the values measured during the  
233 bioindication experiments in summer 2014 and 2015 (Tab. 2) supports this assumption. The five localities of the  
234 longitudinal profile resembled each other in chemistry, although some non-significant trends are apparent  
235 (phosphorus increased downstream in yearly average values). However, the tributaries and the comparative  
236 Blanice differed more, especially T-Olsinka (dystrophic, small tributary poor in calcium and phosphorus) and T-  
237 Volarsky (a nutrient rich stream that is permanently polluted because of an obsolete sewage treatment plant).  
238 Blanice differed to a lesser extent (increased phosphorus level).

239 In the tributary T-Volarsky, the concentrations of phosphorus and ammonia varied strongly. An ammonium ion  
240 concentration of 1.22 mg l<sup>-1</sup> and a total phosphorus concentration of 0.51 mg l<sup>-1</sup> were measured during the sandy  
241 cage experiment on 30. 7. 2014. The sewage treatment plant is situated 2 km upstream of the studied site. A  
242 malfunction at the plant was the cause of this sudden chemical increase. Nevertheless, the influence of this  
243 problem in the T-Volarsky tributary was only slight in the main stream (Fig. 3).

244 The detritus chemistry analysis did not show considerable differences between localities except for the localities  
245 I-Pod Jedlovym and T-Olsinka, where lower concentrations of calcium and phosphorus were measured  
246 compared to the next localities in the longitudinal profile. Moreover, the average AFDM ratio decreased  
247 downstream (Fig. 4). Because of the low number of replicates, a statistical analysis was not performed.

### 248 **Open water sandy cages in the longitudinal profile and tributaries**

249 In both years, juveniles 1+ were used. Within the main course of the river evaluated by open water sandy cages  
250 in 2014, the growth rate increased downstream from Lenora (52%) through the middle locality, II-Meandr  
251 (153%), and thereafter decreased again until Ovesna (46%) (Fig. 5a). This trend is significant if absolute growth

252 values ( $\mu\text{m}$ ) are evaluated (quadratic regression:  $r^2_{\text{adj}} = 0.77$ ,  $F_{2,13} = 25.66$ , d.f. = 16,  $P < 0.001$ ). According to a  
253 post-hoc test, the significance decreased by two outlying values representing two cages with very high mortality  
254 (the lowest, Ovesna, with survival below 10%). Apart from this locality, differences in survival rate between  
255 localities in the main course were only small (approximately 25% in the three main localities I-Pod Jedlovym, II-  
256 Meandr and III-Pekna). The average temperature only varied from 13.9 to 15.5 °C between the localities in the  
257 longitudinal profile during the three-month experiment (Tab. 3). Therefore, the average growth and survival rates  
258 in individual profiles do not show any visible dependencies on the average temperature.

259 In 2015, the greatest growth rate from the three studied localities was recorded at II-Meandr (123%). Although  
260 the 2015 season was extremely warm, the average water temperature at the localities did not differ from that  
261 measured in 2014 (Tab. 3). The average growth rate was similar in both years, but the survival rate was higher in  
262 2015, with average values from 48 to 72%. However, the data from 2014 and 2015 cannot be simply compared  
263 due to the different timings of the three-month experiments (Jul-Aug 2014, May-Jul 2015).

264 The two tributaries evaluated in 2014 differ from each other (Fig. 5b). While 0% survived in T-Volarsky, the  
265 upper tributary (T-Rasnice) had maximal survival (90%) with a not very large growth rate (73%).

#### 266 **Sandy cages: comparison of the three main localities.**

267 The age cohorts 1+ and 0+ in open water sandy cages and within-bed sandy cages were tested in the three main  
268 localities in 2014. Compared to open water sandy cages, within-bed sandy cages showed more distinct  
269 differences in terms of survival rate between the localities (Fig. 5 b, Tab. 4). Both 0+ and 1+ individuals  
270 completely died in the lower locality of III-Pekna, while the upper locality I-Pod Jedlovym had the highest  
271 survival rate (49% on average). In one case, a within-bed sandy cage (I-Pod Jedlovym, +1) reached a greater  
272 survival rate than any open water sandy cage in 2014. Generally, the survival rate within the river bed decreased  
273 downstream across the three tested localities. Although this trend is highly apparent, a statistical analysis was not  
274 performed because the number of within-bed mesh cages per locality was too low.

275 For all the within-bed sites having a non-zero rate of survival, the growth rates were lower when compared to  
276 open water. These values reached one third to two thirds of those measured in open water mesh cages at the  
277 same localities (Tab. 4). Nevertheless, this trend was not statistically tested due a low number of repetitions.

#### 278 **Comparison of 0+ and 1+ age cohorts**

279 The effect of age cohorts was apparent in open water sandy cages. The freshly excysted individuals (0+) had a  
280 somewhat faster average growth rate (158 %) compared to the 1+ individuals (126 %), but this difference only  
281 approached the level of significance (Wilcoxon-Mann-Whitney test,  $p=0.06$ ). Nevertheless, the survival rate  
282 differed significantly (Wilcoxon-Mann-Whitney test,  $p<0.001$ ) achieving 51% (SD = 8.5) for the 0+ age cohort  
283 but only 26% (SD = 12.8) for the 1+ cohort.

284 In the within-bed sandy cages, the survival rate was higher for older individuals (1+) (Tab. 4), but the difference  
285 was not significant (Wilcoxon-Mann-Whitney test,  $p=0.68$ ). There was also no difference between the 0+ and 1+  
286 cohorts for growth rate (Wilcoxon-Mann-Whitney test,  $p=0.81$ ).

### 287 **Open water sandy cages in different stream conditions**

288 Open water sandy cages differed between one another in terms of survival rate in relation to their positions;  
289 however, variability was large at all localities. The greatest survival rate was reached in the sandy cages placed  
290 in the base flow area (Fig. 6). Evaluated together, the other two position types (out of the thalweg and in the  
291 narrow space between stones) showed distinctly higher mortality (Wilcoxon-Mann-Whitney test,  $p<0.001$ ).

### 292 **Open water mesh cages in the longitudinal profile and tributaries**

293 In both years, juveniles 1+ were used. In 2014, survival was relatively high in open water mesh cages (Fig. 7a,  
294 Tab. 5) compared to the sandy cages. The survival rate oscillated near 90% and varied only slightly within a  
295 locality. The tributary T-Studena was the only one which showed a somewhat lower survival (survival rate 72%)  
296 and very high differences between mesh cages. The growth rate was generally low across all the localities, being  
297 close to zero in two tributaries (T-Rasnice, T-Studena) and in Blanice. As in the sandy cages, the greatest growth  
298 rate was observed at II-Meandr (over 10% growth). Surprisingly, the T-Volarsky tributary also showed an  
299 equivalently high growth rate and only low mortality (survival rate 83%), although no juveniles survived at the  
300 same locality during the three-month sandy cage experiment. The growth rate differed significantly between  
301 some localities in the main stream (Kruskal–Nemenyi test, Tab. 6a), but no longitudinal trend was detected.

302 In 2015, the survival rate was equivalently high compared with the previous year (from 83%). Survival was even  
303 100% in the newly added tributary T-Olsinka, located in the upper stretch of the studied portion of the basin.  
304 However, the growth rate (19.3 – 41.8%) was much higher compared to 2014 in all five of the repeatedly tested  
305 localities. Only the T-Olsinka tributary showed a low growth rate of approximately 5%. Within the four  
306 localities of the main stream, the growth rate increased downstream in 2015 (Kruskal-Wallis test,  $p<0.001$ ) and



307 differed significantly between most localities (Kruskal-Nemenyi test, Tab. 6b). In addition, average temperatures  
308 were evaluated as the factor best explaining growth rate, and they also differed between years (Fig. 7b). Higher  
309 temperatures were accompanied by higher growth rates (Kruskal-Wallis test  $p < 0.001$ ).

### 310 **Mesh cages in different environments**

311 The detailed study of 28 hyporheic sites at II-Meandr (evaluated together with the six open water mesh cages at  
312 the same locality) showed an effect of microhabitat conditions on juvenile development. The highest survival  
313 rate was in open water and the worst was in the sandy hyporheic zone (Kruskal-Wallis test,  $p < 0.05$  and Kruskal-  
314 Nemenyi test, Tab. 7). The highest growth rates were in open water and in the microhabitat of a stony bottom.  
315 These two environments differed from the other environment categories (Kruskal-Nemenyi test, Tab. 7). The  
316 decrease in both survival rate and growth rate was accompanied with declining oxygen saturation, which was the  
317 worst in sand (differing from the other environments) and the best in open water (differing from sand and both  
318 depth levels of gravel) (Kruskal-Nemenyi test, Tab. 7). Thus, a gradient of environmental preference is implied  
319 in the following order: open water, stony bottom, gravel, and sand (Fig. 8). Sites with a problematic oxygen  
320 regime showed both a reduced survival rate and reduced growth. Even microhabitat categories of different  
321 oxygen regimes can be distinguished (Fig. 9). The most oxygenated environment (above 95% saturation)  
322 differed from the other environment categories in terms of the growth rate (Kruskal-Nemenyi test, Fig. 9) and  
323 from the most oxygen-poor environment (below 65% saturation) in terms of survival rate (Kruskal-Nemenyi  
324 test, Fig. 9).

325 The water chemistry data that were collected from repeated sampling of all 28 within-bed microhabitats showed  
326 only slight differences. A higher conductivity (up to  $130 \mu\text{S cm}^{-1}$ ) was only recorded by three mesh cages placed  
327 in the sandy microhabitat compared to values of  $50 - 97 \mu\text{S cm}^{-1}$  from the other hyporheic sites and from the  
328 surface water. All three mesh cages also showed a decrease in oxygen and a 100% mortality. For two of them,  
329 increased ammonium ion concentrations ( $0.14$  and  $0.09 \text{ mg.l}^{-1}$ ) were also measured, and nitrate values were  
330 below the detection level, indicating that a microaerobic environment occurs at these sandy sites.

331

## 332 **Discussion**

### 333 **Mesh cages versus sandy cages**

334 The different results given by sandy cages and mesh cages in the longitudinal profile prompt the question of  
335 what these methods actually indicate. For locality evaluation, mesh cages have limited use (Gum et al., 2011).  
336 Sandy cages are probably more representative. Open water mesh cages are not limited by oxygen, the deficiency  
337 of which is probably responsible for many juvenile deaths. Thus, open water mesh cages can show successful  
338 development even in localities where open water sandy cages have declining survival and growth rates (Ovesna  
339 and III-Pekna). In fact, open water mesh cages provide a *maximum growth potential* for the localities, but this  
340 actual potential may not be achieved depending on the hyporheic microhabitats available within the locality.  
341 Sandy cages most probably represent natural conditions better than mesh cages; thus, more natural factors are  
342 more apparent here, including predation (possibly due to carnivorous invertebrates entering the cage) or easier  
343 transmission of infection among juveniles. The movement of juveniles between grains is possible, which helps to  
344 reduce biofilm growth on the shell. Where a deficiency in hyporheic oxygen is caused by the activity of  
345 microbes colonizing sand grains, this effect can also occur in these cages when placed above the bottom.

#### 346 **Influence of longitudinal profile location on growth rate**

347 Mesh cages placed in open water in the main stream showed increasing growth rates downstream in the more  
348 favourable year, 2015, whereas such a longitudinal gradient was not observed in 2014, when the mean monthly  
349 growth rate was only about 10%. In contrast, no direct correlation between growth rate and longitudinal profile  
350 was identified in sandy cages, in which the highest growth rate was observed in the middle stretch (II-Meandr) in  
351 both 2014 and 2015. In either case, the role of position is evident.

352 Temperature is the first factor that could explain differences across localities. The temperature differences  
353 between localities were small in both years: 0.6 K in 2014 and 1.2 K in 2015 for the month-long experiment with  
354 mesh cages; 1.6 K in 2014 and 0.5 K in 2015 for the three-month experiment with sandy cages. However, the  
355 growth rates indicate a positive dependency on temperature in mesh cages. An important role of temperature in  
356 juvenile growth rate is assumed (Hruška 1992); however, it has been questioned by Täubert et al. (2013) for the  
357 parasitic phase. Despite this, temperatures above 15 °C for a continual period seem to be crucial for successful  
358 reproduction (Hruška, 1992). This is reflected in our results, when only minimal growth was recorded in mesh  
359 cages under 14 °C in 2014. Denic et al. (2015) also addressed differences between localities in Central Europe  
360 and identified temperature as a factor correlating with growth rate in the first growth period, even though the  
361 differences in temperature were small (1.5 °C). Thus, temperature may be one of the factors affecting growth  
362 rate and developmental success in the longitudinal gradient of the Vltava River.

363 Nevertheless, temperature alone cannot explain the spike in growth rate in the sandy cages along the longitudinal  
364 gradient. The composition of detritus is the next factor suggested as being variable across the longitudinal  
365 profile. The proportion of AFDM in detritus decreased slightly downstream, while concentrations of phosphorus  
366 and calcium changed more unpredictably. The apparently intensive autochthonous production of detritus and its  
367 transformation occurs here because of a high abundance of submerged macrophytes and the distinctly  
368 meandering character of the river. Thus, food conditions can differ even within a relatively short river stretch,  
369 such as between localities that are only 8 km apart (I-Pod Jedlovym and II-Meandr) without any tributary  
370 influence. However, our dataset does not have a sufficient temperature or detritus chemistry scale nor enough  
371 localities for more detailed conclusions. Moreover, a description of detritus chemistry in freshwater pearl mussel  
372 streams has not been published, despite the importance of filtration performed by the species.

373

#### 374 **Relationship between survival rate and locality in the river basin**

375 The survival rate was more variable than the growth rate within individual localities. The highest survival rate  
376 was recorded in the upper stretch of the basin. In T-Rasnice it was 90% survival rate, n = 200 individuals in two  
377 sandy cages, and in T-Olsinka it was 100% survival rate, n = 24 individuals together in four mesh cages. Both  
378 localities represent the coldest of those within our dataset. Scheder et al. (2014) also presented similar survival  
379 rates under geographically and ecologically comparable conditions. Relatively lower values of survival were  
380 observed in the downstream stretch of the river (Ovesna). The habitat's role is also evident because very low  
381 survival rate (below 10%) was observed in sandy cages situated outside the thalweg.

382 Mesh cages showed a low survival rate with very high variability in the Studena tributary. The factors affecting  
383 mortality are unclear here. In contrast, an accident at the sewage treatment plant caused the 0% survival rate in  
384 the sandy cages in the T-Volarsky tributary, whereas juveniles had a survival rate over 80% in mesh cages here  
385 14 days after the accident. Thus, long-term bioindication system experiments seem to be very important in the  
386 true characterization of localities. Even a month-long experiment may not be able to register unpredictable  
387 changes, such as the impact of an accident which lasts several weeks.

388 Experiences using natural food during the breeding of freshwater pearl mussels (Švanyga et al., 2013, Hruška,  
389 unpublished) point to visible differentiation that occurs during the intensive growth phase if conditions are  
390 generally good. There are relatively fast growing individuals as well as lagging individuals that subsequently die.

391 Our results do not conflict with these observations. The average survival rates were 23% (2014) and 48% (2015)  
392 over three months in II-Meandr, which was best for growth in the sandy cages. A significantly higher survival  
393 rate was observed at a locality with a low growth rate that is probably the result of low temperatures. In contrast,  
394 a high mortality rate may have other causes, such as eutrophication or variability in the oxygen regime within  
395 microhabitats.

396 Evaluation of the survival rate in relation to the growth rate for each year and for the three main localities only  
397 found an interdependence in the profile for II-Meandr in 2015 (Fig. 10). This finding suggests that both a high  
398 growth rate and a high survival rate could be reached under conditions with a suitable temperature (warm year),  
399 a suitable composition of food particles, and good water chemistry. Lower success in some sandy cages may be  
400 caused by predation; infection could be another cause. When the juveniles were contained separately in mesh  
401 cages in the same profile, the monthly mortality was minimal (survival rate: 97% in 2014 and 92% in 2015).  
402 Nevertheless, caution is needed when generalizing these results due to the specific conditions of the river. This  
403 topic requires the evaluation of larger datasets from a greater number of basins.

#### 404 **The effect of microhabitats**

405 Large differences in the survival rate were observed between open water sandy cages installed in different  
406 positions. Nevertheless, only within-bottom bioindication systems can reflect real conditions within a site.

407 Survival was very unpredictable in within-bed sandy cages. In some cases, these cages had a greater survival rate  
408 than those in open water at the same locality. However, all juveniles died in within-bed sandy cages at the lowest  
409 assessed locality. If the possibility of death due to infection is disregarded, low oxygen concentration is the  
410 probable cause. The importance of hyporheic water movements could be illustrated by the high survival rate in I-  
411 Pod Jedlovym in 2014. The local temperature (11.2 °C) was markedly lower compared to other sites (Tab. 3),  
412 probably due to an upwelling.

413 The total number of sandy cages was too low for definite conclusions across all the localities, but the more  
414 numerous set of within-bed mesh cages of a single locality (II-Meandr) gives more significant results. In a  
415 hyporheal space of each mesh cage location, oxygen saturation close to 100% was measured just before mesh  
416 cage installation. Even so, all six individuals died in three cages (always in sand). A low survival rate (only three  
417 surviving individuals) was only recorded where the average oxygen saturation decreased below 85%. In contrast,  
418 mesh cages with zero mortality always exceeded this level, but most were at 95%.

419 An evaluation of the direct influence of oxygen is difficult because oxygen measurement in juvenile  
420 microhabitats is still rare (Englund et al., 2008), and the redox measurement established by Geist & Auerswald  
421 (2007) is more common. A distinctly increased level of ammonium ions, as well as nitrate values under the  
422 detection level, was measured in two microhabitats with oxygen under 65%. Both indicate a reducing  
423 environment. Not only is oxygen deficiency a possible cause of mortality here, but possibly also the direct effect  
424 of toxic ammonia. Chen et al. (2001) addressed this topic for mussel species that perform optimally in warm  
425 water, but detailed data about ammonia concentrations in freshwater pearl mussel habitats is still missing.  
426 Therefore, a thorough study on this topic is necessary.

427 Generally, only a few studies map oxic conditions in a series of microhabitats, although hyporheic oxygenation  
428 correlates well with the occurrence of viable populations (Moorkens & Killeen, 2014). Geist & Auerswald  
429 (2007) emphasized the importance of adequate permeability of the bottom for this species. Our results note the  
430 crucial importance of oxygen in juvenile survival as well as the occurrence of sudden decreases in short-term  
431 oxygen concentration within a microhabitat. These factors may be crucial for juvenile mortality, especially in the  
432 Vltava River because its hyporheic zone is relatively oxygen-poor in comparison with some other freshwater  
433 pearl mussel streams in the Czech Republic (Bílý et al. 2008).

#### 434 **Suitability of conditions for juvenile development in the Vltava River basin in Šumava NP**

435 The monitored stretch of the river proved to be acceptable for freshwater pearl mussel development after the age  
436 of 0+. This result is in accordance with procedures of population supplementation in the past in which not only  
437 older individuals were deployed, but also artificially infected fishes (Simon et al., 2015).

438 Location within the river network affects the growth rate and survival of juveniles, but microhabitat conditions  
439 within the river bed substrate is the probable key factor. The bioindication systems were placed primarily in sites  
440 with expected favourable biotope conditions (Švanyga et al. 2013) within a current species distribution area  
441 (Matasová et al., 2013) or on its periphery. Good hyporheic oxygen conditions together with favourable water  
442 chemistry were the main guidelines for the choice of locality. Hence, many localities with unfavourable  
443 conditions were initially eliminated (e.g. eutrophication, erosion, acidity rising from peat bogs, or very low  
444 temperatures in the upper reaches of the basin). Moreover, suitable microhabitat sites for within-bed  
445 bioindication systems were also chosen based on good oxygen conditions. Generally, microhabitats with an  
446 unsuitable oxygen regime within the river bed prevailed in the entire basin (data not shown). Thus, very suitable  
447 localities are apparently uncommon. In contrast, suitable conditions for individuals 1+ years of age were

448 confirmed both in sandy and in gravel or stone substrates. In addition, two sites with a gravel substrate in I-Pod  
449 Jedlovym were tested for conditions for 0+ individuals in sandy cages, with a positive result.

450 In the longitudinal profile, the growth potential increased downstream to the lowest locality (Ovesna) in the  
451 warm year (2014). On the other hand, the growth detected in the sandy cages increased downstream to II-Meandr  
452 and thereafter decreased again to Ovesna. The total mortality rate in within-bed sandy cages exposed in the  
453 lower locality III-Pekna indicate even rarer occurrences of favourable bed conditions than in the upper stretches.  
454 In summary, the middle stretch between the profiles of II-Meandr and III-Pekna can be considered the most  
455 suitable part of the river for juvenile development. The most probable risk factors are more frequent in the  
456 downstream stretch of the river. Because of the occurrence of a part of the population here, other studies of these  
457 factors are necessary.

458 No suitable conditions were found in the tested tributaries. Two of these (T-Rasnice, T-Olsinka) are probably too  
459 cold for juveniles to complete development; the cause of the unsuitability of T-Studena remains unresolved. The  
460 Volarsky tributary showed a high growth rate in mesh cages, but all individuals died due to a sudden  
461 eutrophication event and perhaps acute toxicity (ammonium) during the three-month experiment. Continual  
462 pollution coming from this stream could also explain the slightly lower growth rate in Pekna compared to II-  
463 Meandr because of the T-Volarsky estuary occurring between these two localities.

#### 464 **Conclusions**

465 This study represents the first example of a detailed assessment of a freshwater mussel biotope with generally  
466 favourable habitats that used a bioindication method and was hierarchized in both the longitudinal profile and the  
467 detail of the bottom microhabitat scale.

468 Suitable conditions for juvenile development were confirmed at selected localities in the Vltava River; some  
469 unsuitable localities were also determined. Bioindication is a good tool to distinguish localities with strongly  
470 negative influences, such as temperature limitation or water toxicity; however, environmental conditions within  
471 experimental devices always differ from natural conditions.

472 The results showed the influence of locality, the importance of microhabitat conditions, and the role of some  
473 physical and chemical factors (especially temperature and oxygen saturation). Nevertheless, microhabitat  
474 specificity and large variability call for caution in the generalization of results.

475 **Acknowledgements:**

476 M.Č., O.P.S and M.B. were supported by grants from the Czech University of Life Science (Internal Grant  
477 Agency of Faculty of Environmental Sciences, CULS Prague (42110 1312 3175)). Support for K.D. came from  
478 the Czech Science Foundation (13-05872S) and O.P.S from Technological Agency of the Czech Republic  
479 (TB050MZP006). Data on the bioindication and present occurrence of pearl mussels were collected during the  
480 implementation of the Czech Action Plan for Freshwater Pearl Mussels managed by the Nature Conservation  
481 Agency of the Czech Republic, which is funded by the government of the Czech Republic and is available at  
482 [www.zachranneprogramy.cz](http://www.zachranneprogramy.cz). The administrations of the National Park and Protected Landscape Area granted  
483 their permission to work in the area. We would also like to thank Jan Švanyga, Eva Zelenková, Josef Mayer,  
484 Veronika Hodaňová, Lenka Myslivečková, Kateřina Rambousková, Simona Němčíková, Kamila Tichá, and  
485 Vojtěch Mrázek for their support in the field work.

486

487 **References**

- 488 Abramoff, M. D., Magalhães, P. J., & Ram, S. J., 2004. Image processing with ImageJ. *Biophotonics*  
489 *international*, 11: 36-42.
- 490 Barnhart, M. C., 2006. Buckets of muckets: A compact system for rearing juvenile freshwater mussels.  
491 *Aquaculture*, 254: 227-233.
- 492 Bauer, G., Hochwald, S., & Silkenat, W., 1991. Spatial distribution of freshwater mussels: the role of host fish  
493 and metabolic rate. *Freshwater biology*, 26: 377-386.
- 494 Bauer, G., 1992. Variation in the life span and size of the freshwater pearl mussel. *Journal of Animal Ecology*  
495 61: 425-436.
- 496 Bauer, G. & K. Wächtler, 2001. Ecology and Evolution of the freshwater Mussels Unionida. *Ecological Studies*  
497 145: 1-394.
- 498 Bílý, M., J. Hruška, O. P. Simon, Š. Hřebík, D. Jäger, P. Horký, M. Rulík & J. Křivánek, 2008. Effects of  
499 environmental factors on the freshwater pearl mussel population in the National nature monument  
500 Lužní Potok. VUV TGMVVI, Prague.
- 501 Buddensiek, V., 1995. The culture of juvenile freshwater pearl mussels *Margaritifera margaritifera* L. in cages:  
502 A contribution to conservation programmes and the knowledge of habitat requirements. *Biological*  
503 *Conservation* 74: 33-40.

504 Bufková, I. & J. Rydlo, 2008. Water macrophytes and wetland vegetation in old cut meanders of the Upper  
505 Vltava River (Šumava National Park). *Silva Gabreta* 14: 93-134.

506 Chen, L. Y., A. G. Heath & R. J. Neves, 2001. Comparison of oxygen consumption in freshwater mussels  
507 (Unionidae) from different habitats during declining dissolved oxygen concentration. *Hydrobiologia*  
508 450: 209-214.

509 Denic, M., J. E. Taeubert, M. Lange, F. Thielen, C. Scheder, C. Gumpinger & J. Geist, 2015. Influence of stock  
510 origin and environmental conditions on the survival and growth of juvenile freshwater pearl mussels  
511 (*Margaritifera margaritifera*) in a cross-exposure experiment. *Limnologica* 50: 67-74.

512 Englund, D., A. Brunberg & G. Jacks, 2008. A Case Study of A Freshwater Pearl Mussel (*Margaritifera*  
513 *Margaritifera*) Population in Central Sweden. *Geografiska Annaler Series A-Physical Geography* 90A:  
514 251-258.

515 Fryirs, K.A., and Brierle, G.J. 2013 *Geomorphic Analysis of River Systems: An Approach to Reading the*  
516 *Landscape*, Wiley - Blackwell, Oxford. 345 p.

517 Geist, J. & K. Auerswald, 2007. Physicochemical stream bed characteristics and recruitment of the freshwater  
518 pearl mussel (*Margaritifera margaritifera*). *Freshwater Biology* 52: 2299-2316.

519 Gum, B., M. Lange & J. Geist, 2011. A critical reflection on the success of rearing and culturing juvenile  
520 freshwater mussels with a focus on the endangered freshwater pearl mussel (*Margaritifera margaritifera*  
521 L.). *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems* 21: 743-751.

522 Hastie, L. C., E. C. Tarr, B. Al Mousawi & M. R. Young, 2010. Medium-term recruitment patterns in Scottish  
523 freshwater pearl mussel *Margaritifera margaritifera* populations. *Endangered Species Research* 11: 21-  
524 33.

525 Hastie, L. C. & K. A. Toy, 2008. Changes in density, age structure and age-specific mortality in two western  
526 pearlshell (*Margaritifera falcata*) populations in Washington (1995-2006). *Aquatic Conservation:*  
527 *Marine and Freshwater Ecosystems* 18: 671-678.

528 Hastie, L. C., M. R. Young & P. J. Boon, 2000. Growth characteristics of freshwater pearl mussels, *Margaritifera*  
529 *margaritifera* (L.). *Freshwater Biology* 43: 243-256.

530 Helama, S & I. Valovirta 2008. The oldest recorded animal in Finland: ontogenetic age and growth in  
531 *Margaritifera margaritifera* (L. 1758) based on internal shell increments. *Memoranda Soc. Fauna Flora*  
532 *Fennica* 84: 20-30.



533 Hruška, J., 1991. Projekt záchrana perlorodky říční v České republice 1.část. Základní charakteristika a příčiny  
534 ohrožení. (The freshwater pearl mussel conservation project in the Czech Republic. Part 1.: Basic  
535 characteristic and causes of a threat) Památky a příroda 12: 545-548. (in Czech).

536 Hruška, J., 1992. The freshwater pearl mussel in South Bohemia: Evaluation of the effect of temperature on  
537 reproduction, growth and age structure of the population. Archiv für Hydrobiologie 126: 181-191.

538 Hruška, J., 1999. Nahrungsansprüche der Flußperlmuschel und deren halbnatürliche Aufzucht in der  
539 Tschechischen Republik. Heldia 4:69-79.

540 Jones, J. W. & R. J. Neves, 2011. Influence of life-history variation on demographic responses of three  
541 freshwater mussel species (Bivalvia: Unionidae) in the Clinch River, USA. Aquatic Conservation-  
542 Marine and Freshwater Ecosystems 21: 57-73.

543 Lavictoire, L., E. Moorkens, A. D. Ramsey, W. Sinclair & R. A. Sweeting, 2015. Effects of substrate size and  
544 cleaning regime on growth and survival of captive-bred juvenile freshwater pearl mussels, *Margaritifera*  
545 *margaritifera* (Linnaeus, 1758). Hydrobiologia 766: 89-102.

546 Matasová, K., O. P. Simon, B. Dort, K. Douda & M. Bílý, 2013. Recent distribution of freshwater pearl mussel  
547 (*Margaritifera margaritifera*) at historical localities in the upper part of the Vltava River basin (Czech  
548 Republic). Silva Gabreta 19: 139-148.

549 Moorkens, E. A. & I. J. Killeen, 2014. Assessing near-bed velocity in a recruiting population of the endangered  
550 freshwater pearl mussel (*Margaritifera margaritifera*) in Ireland. Aquatic Conservation: Marine and  
551 Freshwater Ecosystems 24: 853-862.

552 Neves, R. J. & J. C. Widlak, 1987. Habitat Ecology of Juvenile Fresh-Water Mussels (Bivalvia, Unionidae) in A  
553 Headwater Stream in Virginia. American Malacological Bulletin 5: 1-7.

554 Oulehle, F., J. Hofmeister, P. Cudlin & J. Hruska, 2006. The effect of reduced atmospheric deposition on soil  
555 and soil solution chemistry at a site subjected to long-term acidification, Nacetin, Czech Republic.  
556 Science of The Total Environment 370: 532-544.

557 Outeiro, A., P. Ondina, C. ndez, R. Amaro & E. S. Miguel, 2008. Population density and age structure of the  
558 freshwater pearl mussel, *Margaritifera margaritifera*, in two Iberian rivers. Freshwater Biology 53: 485-  
559 496.

560 Scheder, C., B. Lerchegger, M. Jung, D. Csar & C. Gumpinger, 2014. Practical experience in the rearing of  
561 freshwater pearl mussels (*Margaritifera margaritifera*): Advantages of a work-saving infection  
562 approach, survival, and growth of early life stages. Hydrobiologia 735: 203-212.

563 Schmidt, C. & R. Vandre, 2010. Ten years of experience in the rearing of young freshwater pearl mussels  
564 (*Margaritifera margaritifera*). *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems* 20(7):735-  
565 747. Simon, O. P., I. Vaničková, M. Bílý, K. Douda, H. Patzenhauerová, J. Hruška & A. Peltánová,  
566 2015. The status of freshwater pearl mussel in the Czech Republic: Several successfully rejuvenated  
567 populations but the absence of natural reproduction. *Limnologica* 50: 11-20.

568 Švanyga, J., O. P. Simon, T. Mináriková, O. Spisar & M. Bílý, 2013. Záchraný program pro perlorodku říční v  
569 ČR (Action plan for the endangered freshwater pearl mussel in the Czech Republic). NCA CR, Prague  
570 1-76. (in Czech). Available via [http://www.nature.cz/publik\\_syst2/files/perla\\_novy\\_zp.pdf](http://www.nature.cz/publik_syst2/files/perla_novy_zp.pdf).

571 Taeubert, J. E., B. Gum & J. Geist, 2013. Variable development and excystment of freshwater pearl mussel  
572 (*Margaritifera margaritifera* L.) at constant temperature. *Limnologica - Ecology and Management of*  
573 *Inland* 43: 319-322.

574 **Fig. 1** A map of the studied areas of the Vltava River catchment and neighbouring Blanice River catchment.  
575 Studied localities are marked

576 **Fig. 2 Experiment design**

577 a) General experiment design in 2014. Only standard bioindication systems with individuals of age 1+ are  
578 described. Mesh cages were exposed for 30 days (JUL-AUG), whereas sandy cages were exposed for  
579 90 days (JUN, JUL, AUG). Water chemistry was measured monthly, whereas water temperature was  
580 measured continually in all localities. For every within-bed mesh cage, water temperature,  
581 conductivity and dissolved oxygen were measured five times, whereas  $\text{NH}_4^+$  and  $\text{NO}_3^-$  were measured  
582 once. The bioindications were repeated on a smaller scale in 2015.

583 b) Experiment design with sandy cages that were installed in habitats with reduced flow velocity and  
584 with sandy cages containing 0+ juveniles. The cages were exposed in the basic localities for 90 days  
585 (JUN, JUL, AUG) in 2014.

586 **Fig. 3** Fluctuation of ammonium ions and total phosphorus concentrations over two seasons. A polluted  
587 tributary T-Volarsky and in two localities in the main stream (II-Meandr, III-Pekna) located above and below this  
588 tributary. The three-month exposure of the sandy cages are marked by light grey stripes. The monthly exposure  
589 of mesh cages is marked by a dashed dark grey stripe

590 **Fig. 4** Distribution of AFDM, Ca, and TP concentrations in detritus within the four profiles of the longitudinal  
591 profile (in grey), tributary T-Olsinka (in white) and Blanice River (striped). Average values and SD (n=3 for every  
592 locality)

593 **Fig. 5** The growth rate for 10 MAX (columns, left axis) and the surviving rate (black points, right axis) in sandy  
594 cages. For numbers of bioindication units see Tab. 3

595 a) Evaluation of the longitudinal profile of the main course using open water sandy cages in 2014 (JUN-AUG) in  
596 light grey columns and 2015 (MAY-JUL) in grey columns

597 b) Evaluation of two tributaries by open water sandy cages and of three localities in the longitudinal profile by  
598 within-bed sandy cages (hyporheal) in 2014 (JUN –AUG)

599 **Fig. 6** Surviving rate differences among open water sandy cages in relation to a position against a thalweg at  
600 the three basic localities. Data from 2014 and 2015 are together. Sandy cages were placed: in the base flow (n  
601 = 36), behind a bigger stone (n = 11) and in narrow spaces between stones (n = 6). Minimal number of  
602 individuals at the start of the experiment = 100, exposure time = 3 months, age of individuals = 1+

603 **Fig. 7** An evaluation of the main river and tributaries using open water mesh cages in 2014 and 2015, exposure  
604 30 days. (July-August 2014, June-July 2015)

605 a) Surviving rate per mesh cage (black squares) and growth rate for 3 MAX (columns) – average and SD. The  
606 longitudinal profile in grey, tributaries in white, and Blanice River is striped. Lowercase letters mark a similarity  
607 between groups counted by Kruskal-Nemenyi test (Tab. 6). For numbers of bioindication units see Tab. 5

608 b) The inserted plot: a relationship between average temperature and growth rate for 3 MAX in localities (the  
609 colder year 2014 in diamonds, the warmer year 2015 in circles)

610 **Fig. 8** Surviving rate (per a cage), growth rate (3 MAX) and minimal values of oxygen saturation in within-bed  
611 mesh cages placed in different microhabitats of II-Meandr; n = 18-21 individuals per each type of microhabitat.  
612 Lowercase letters mark a similarity between groups counted by Kruskal-Nemenyi test (surviving rate), Kruskal-  
613 Nemenyi test (growth rate), and Kruskal-Nemenyi test (oxygen)

614 **Fig. 9** A relationship between survival rate and growth rate for three microhabitat categories based on oxygen  
615 regime (n = 28 mesh cages, each with six individuals, SD); 24, 42 and 102 individuals in the categories under  
616 65%, 65-95%, and over 95% oxygen saturation respectively (mean values) Lowercase letters mark a similarity  
617 between groups counted by Kruskal-Nemenyi test

618 **Fig. 10** Relationship between growth rate and surviving rate in sandy cages in Il-Meandr in 2014; the 10  
619 individuals that grew the most (10 MAX) for every sandy cage were included. N =10 sandy cages. Empty marks:  
620 sandy cages with an input value of 100 or 500 individuals; black marks: sandy cages with an input value of 1000  
621 or 2000 individuals. The ring marks sandy cages with both high survival rate (over 40%) and high growth rate  
622 (over 100%)

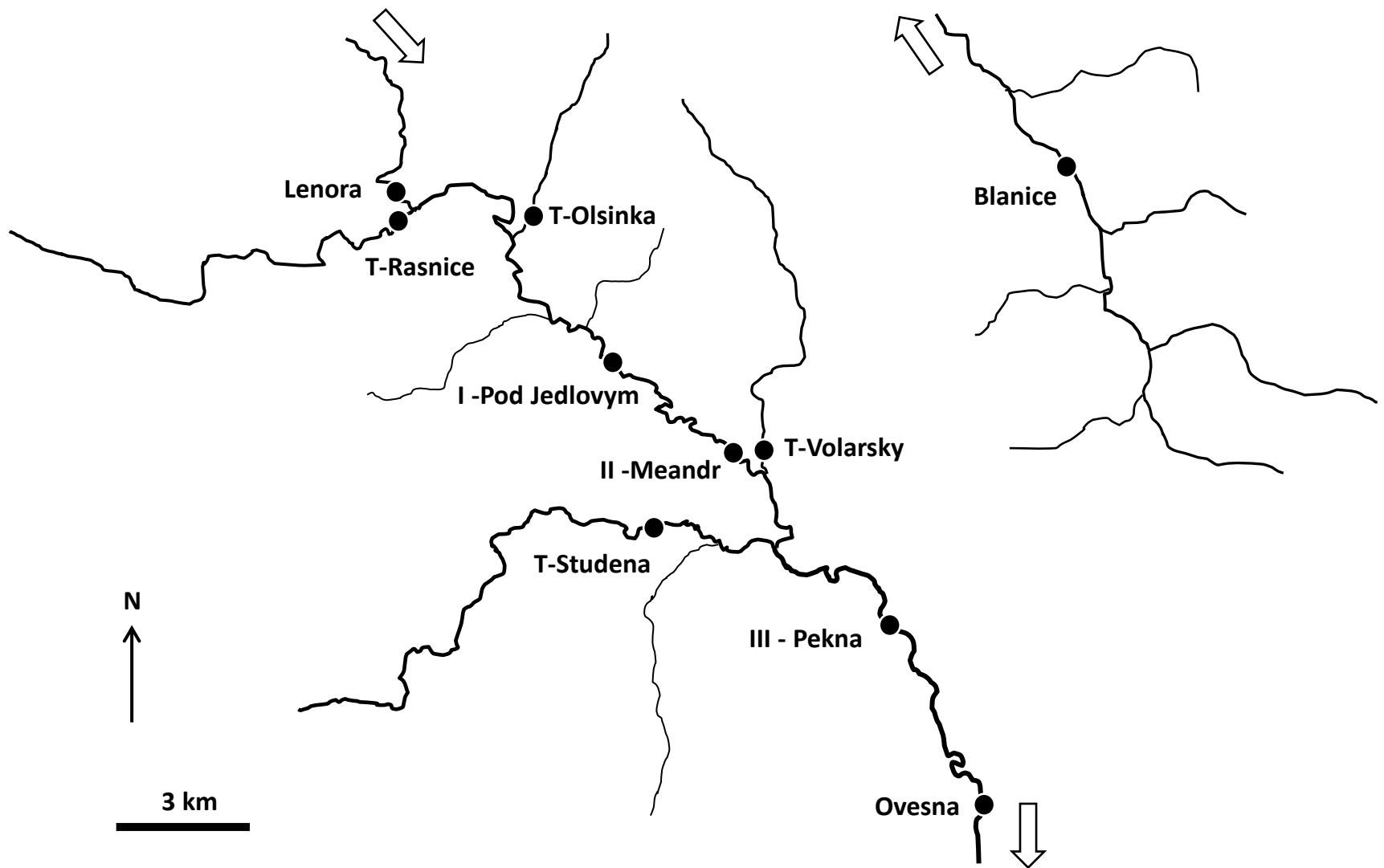
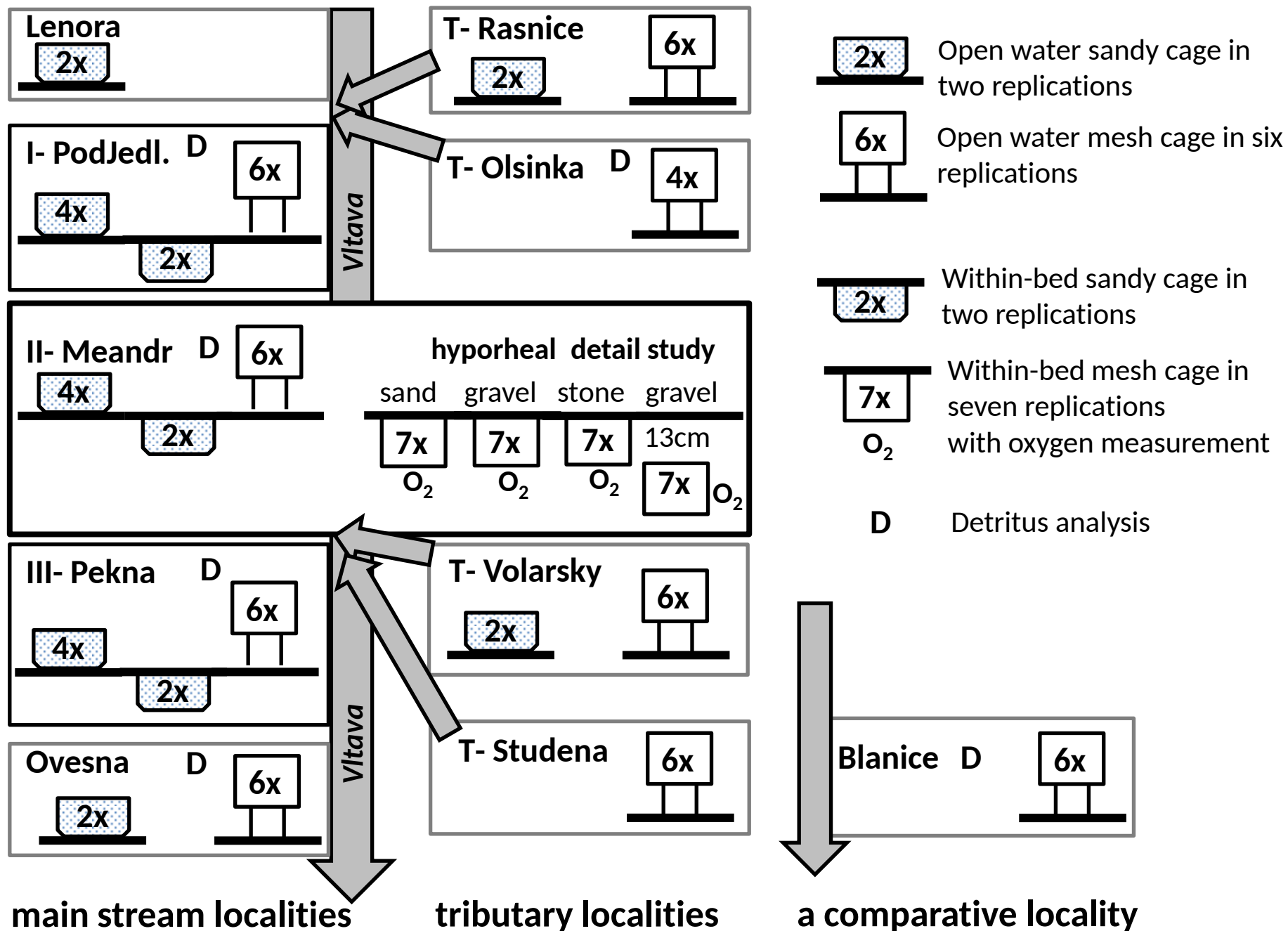
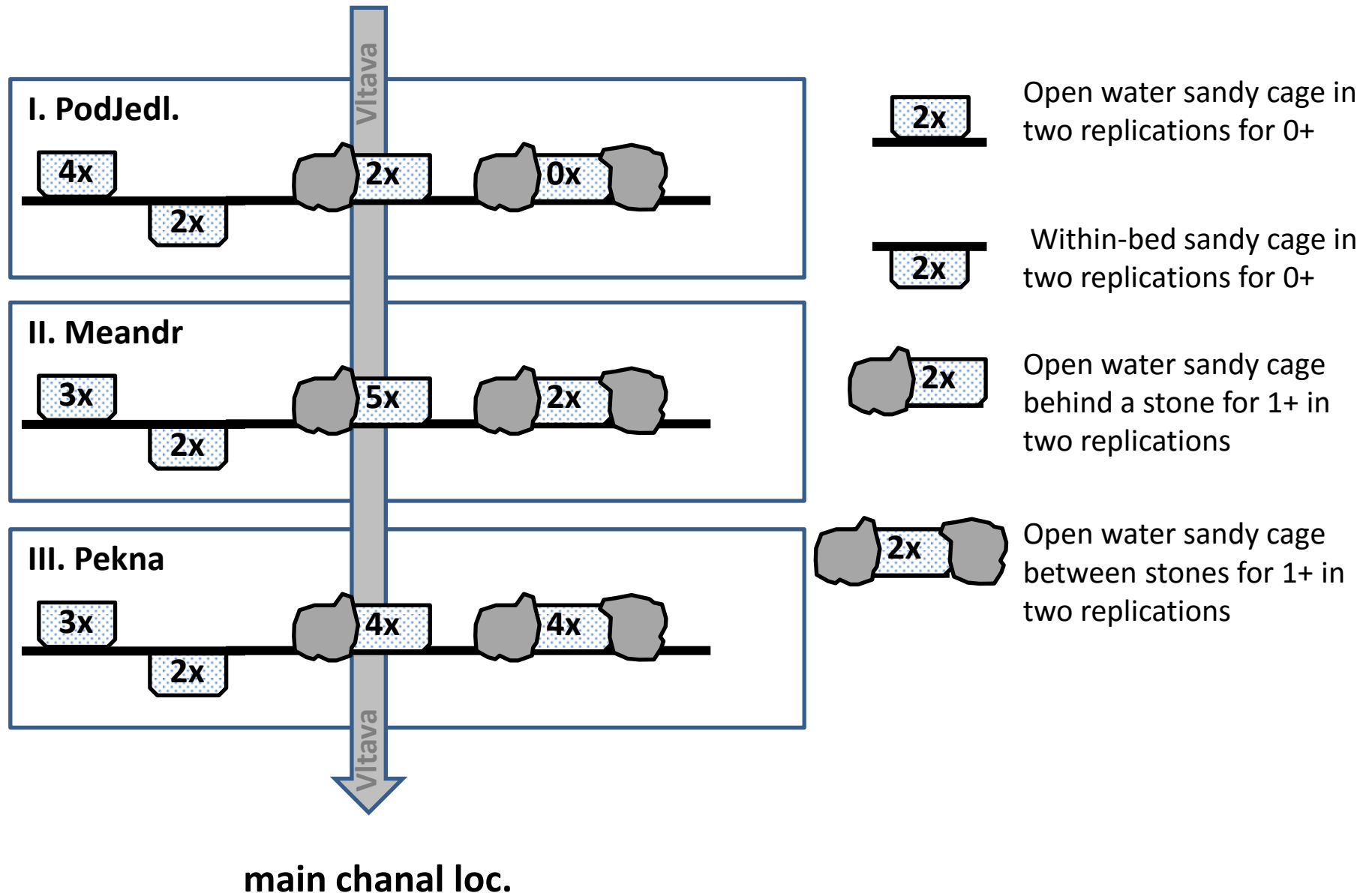
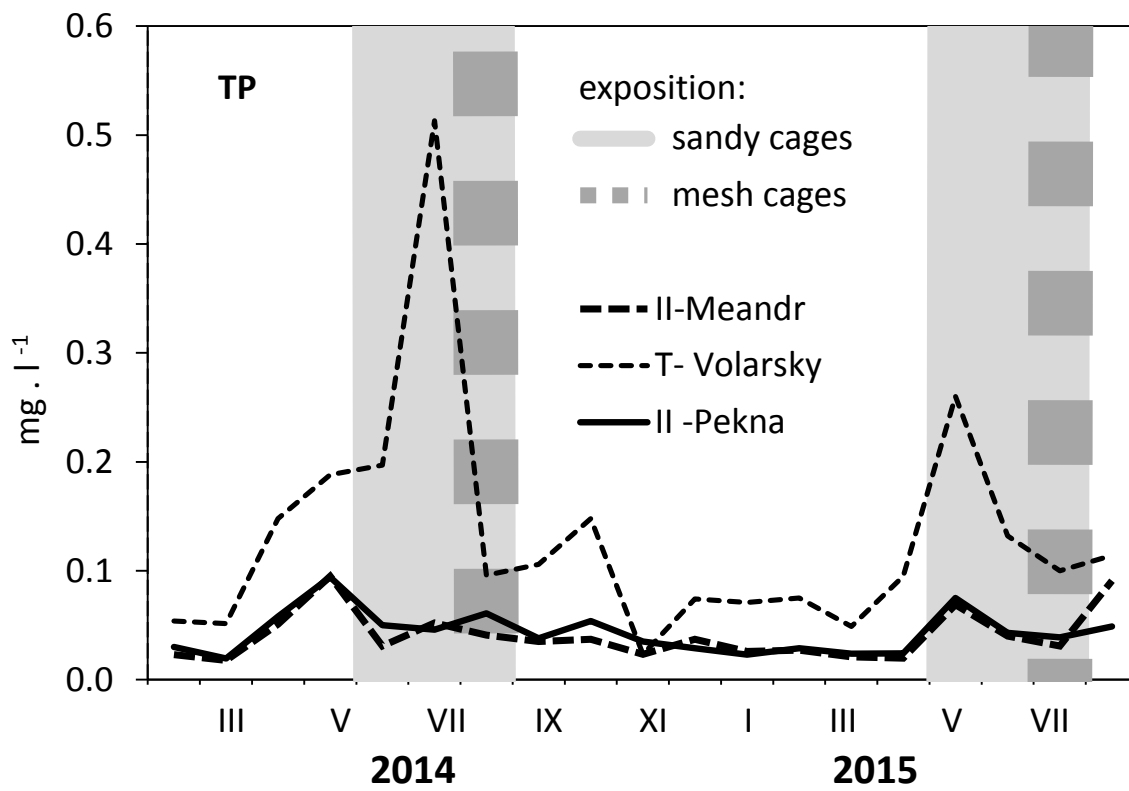
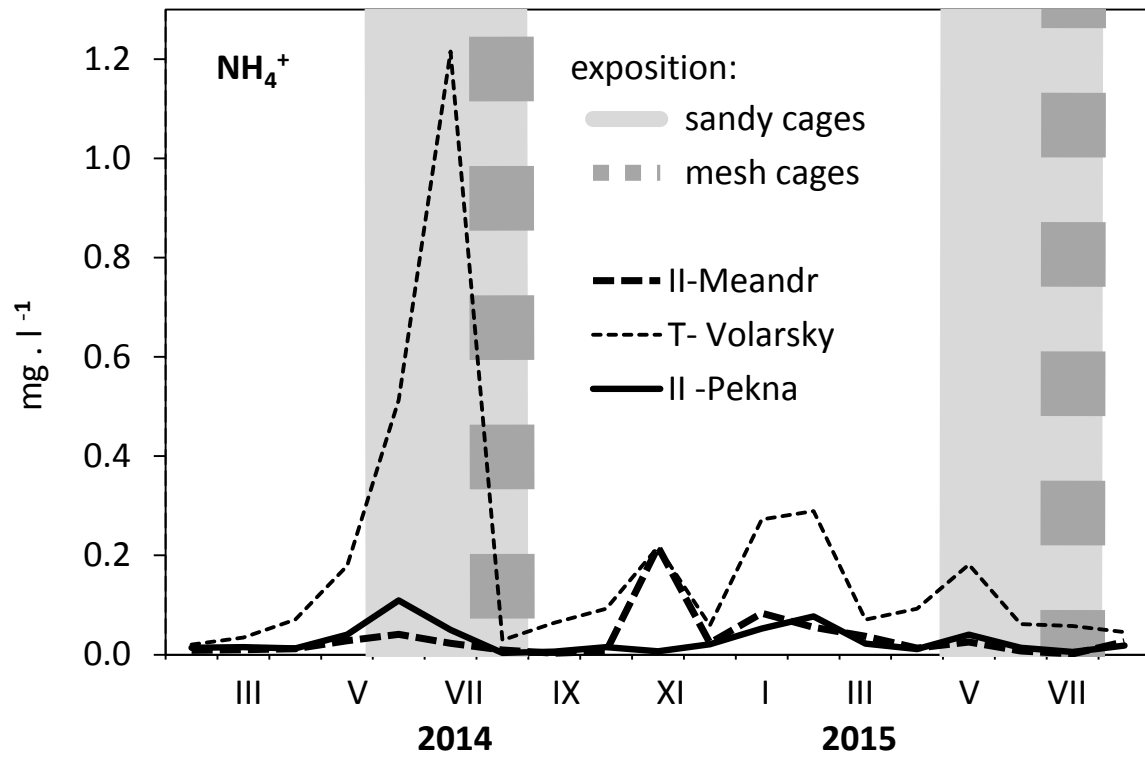


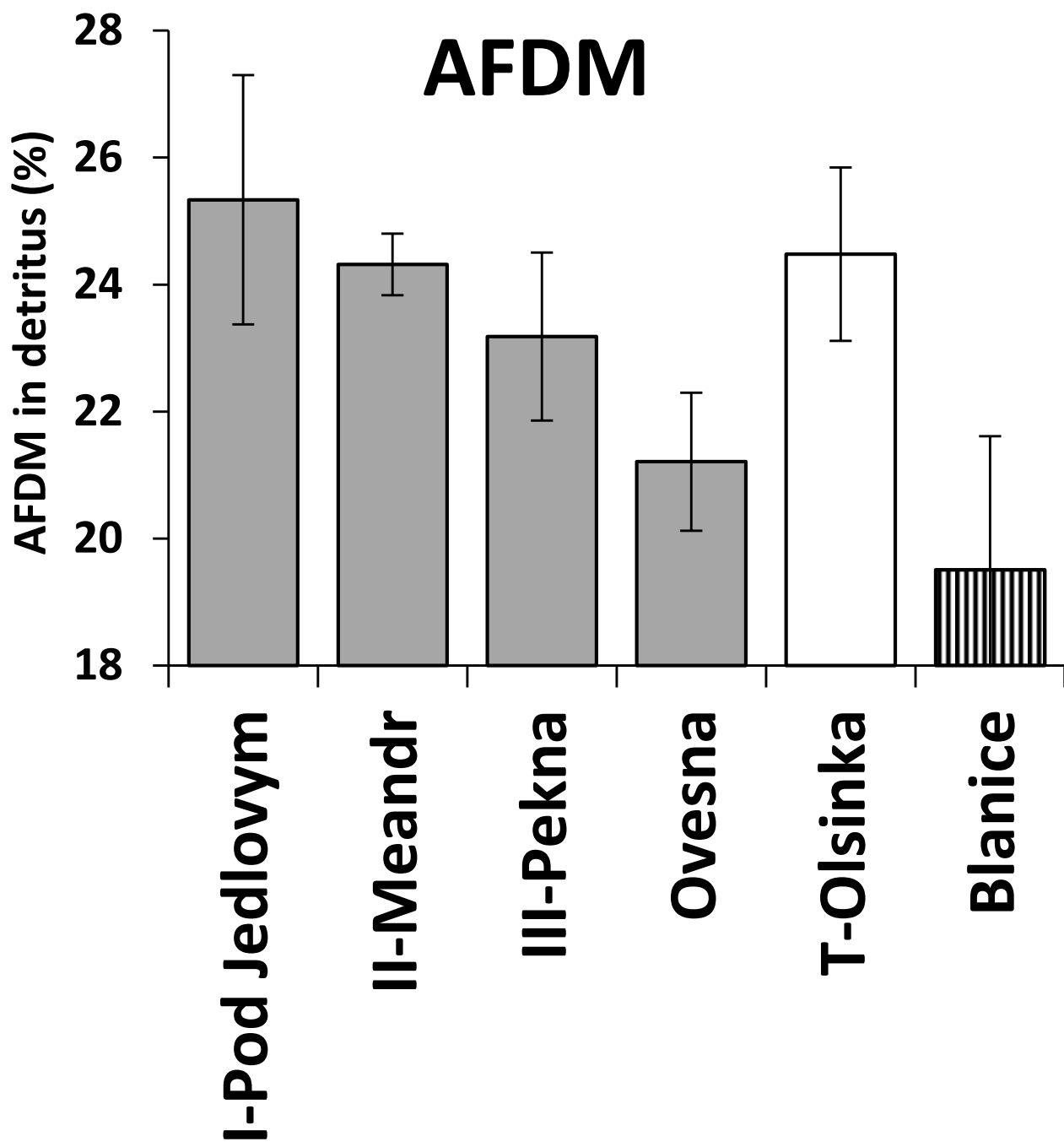
Figure2a

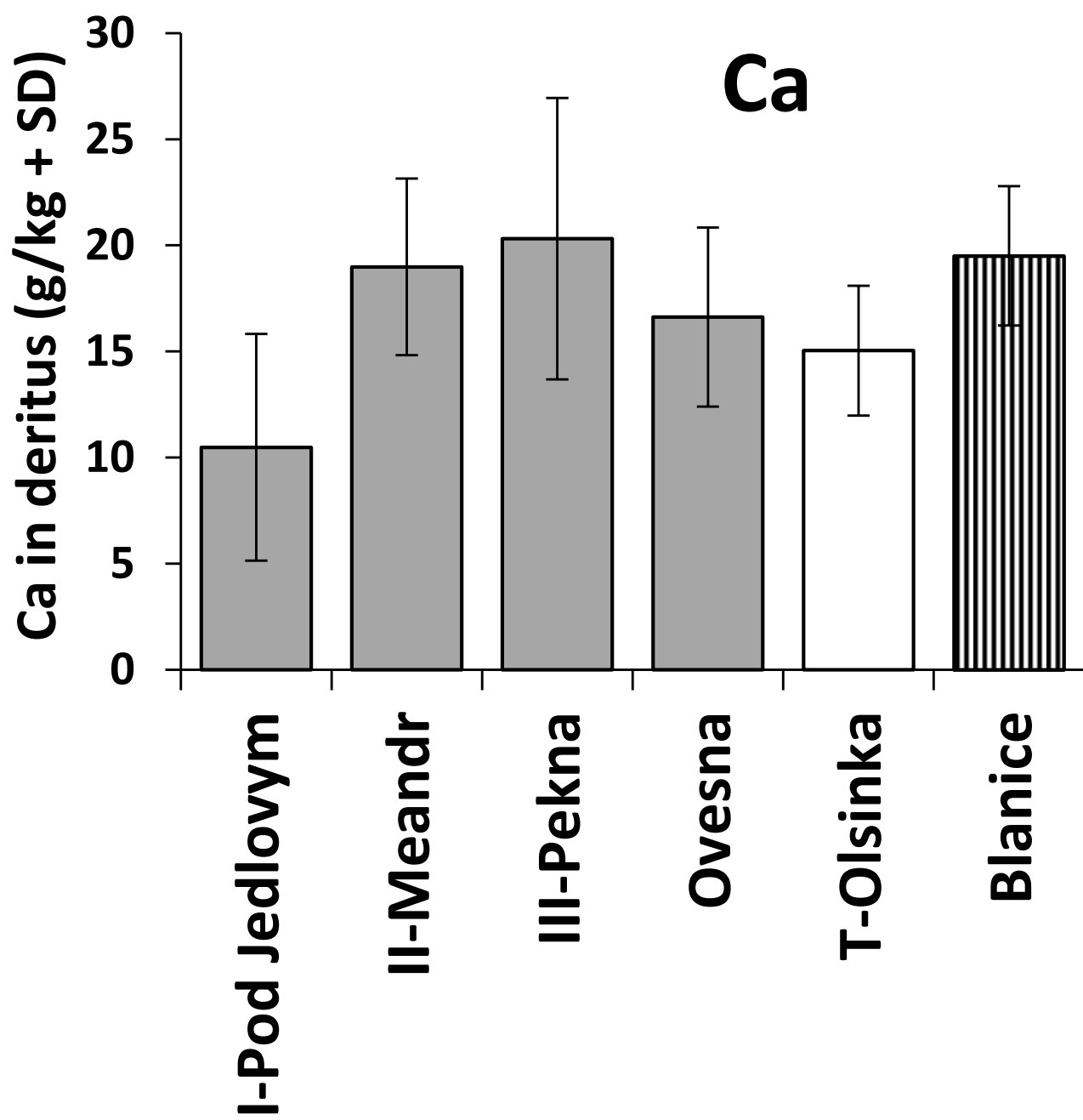


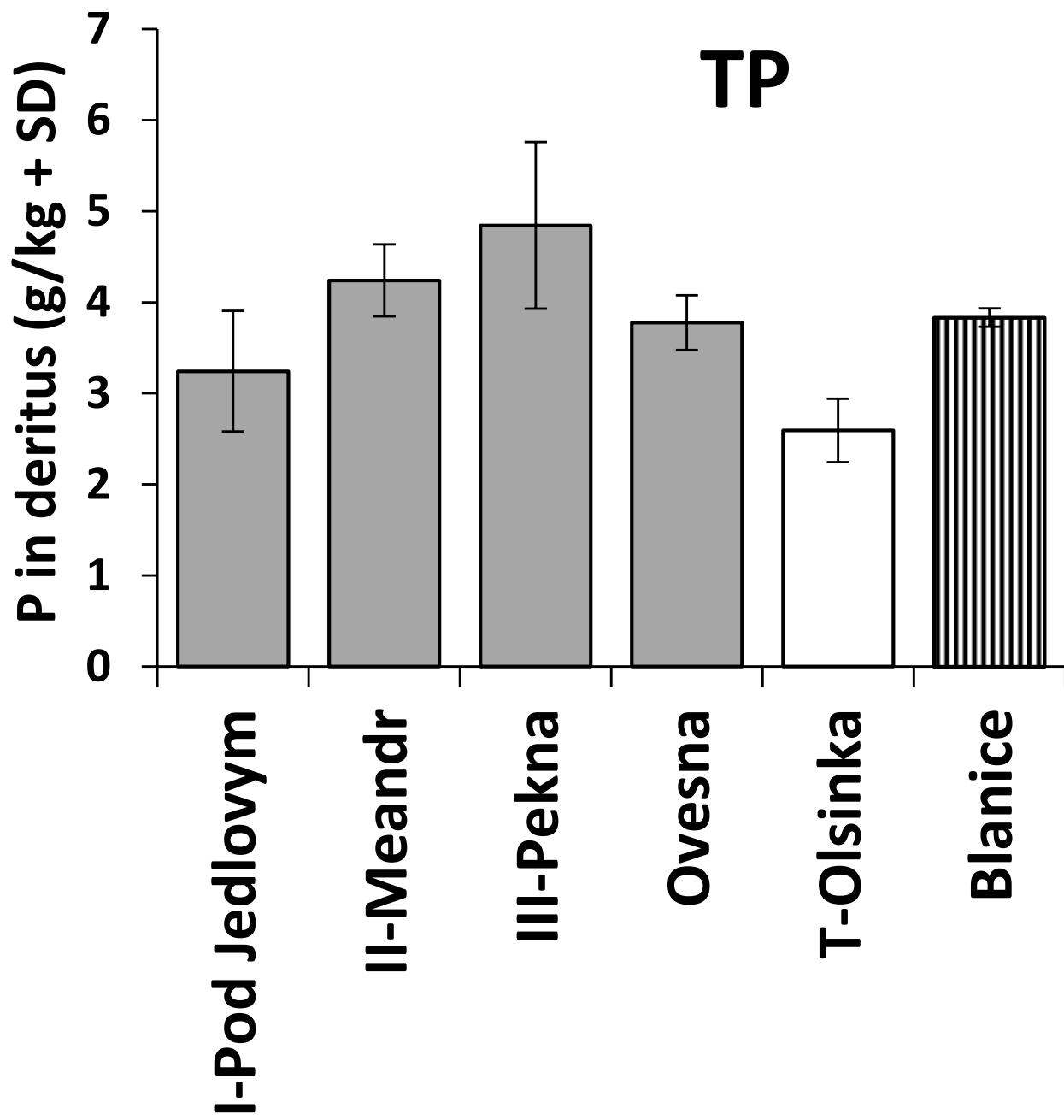


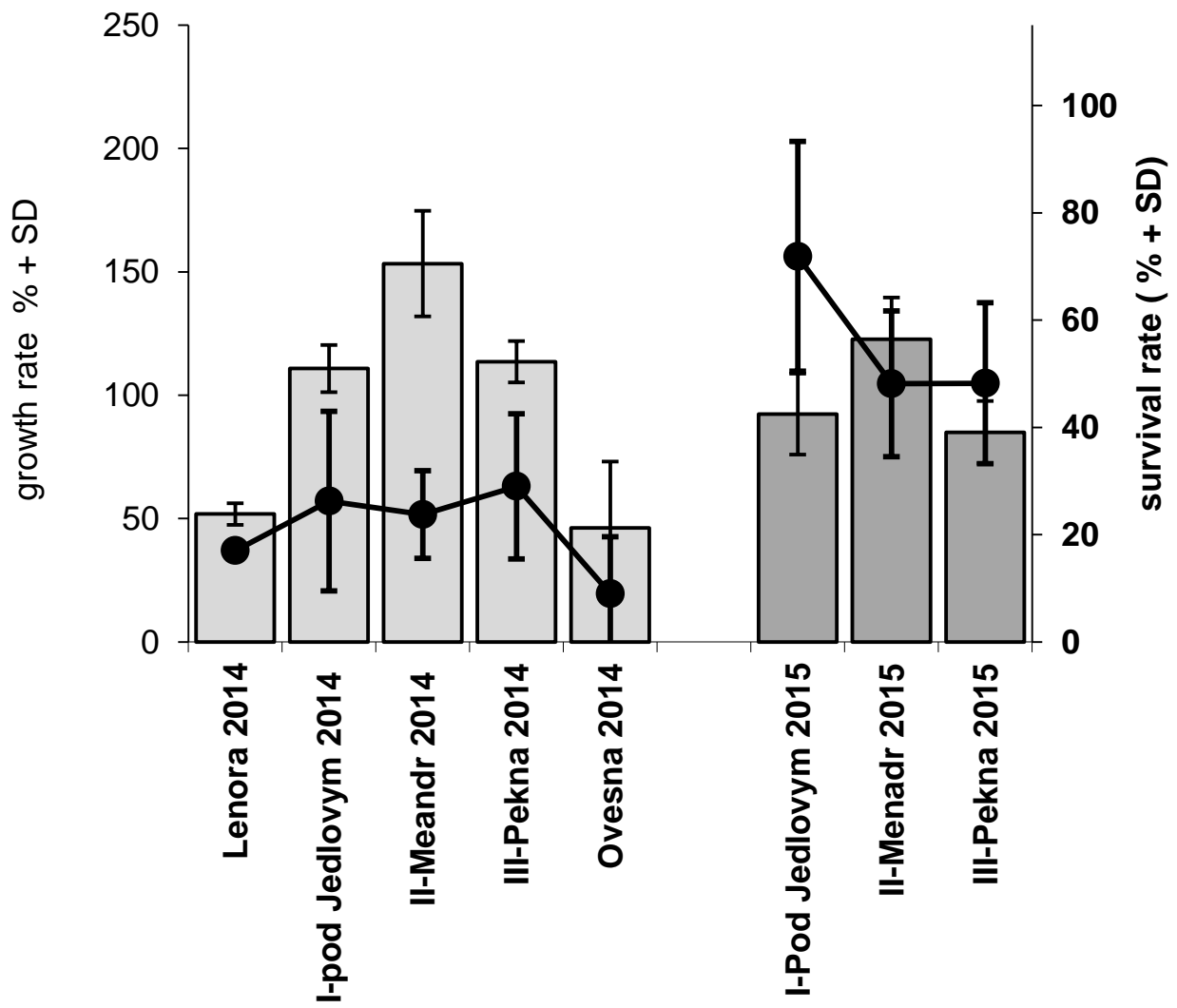


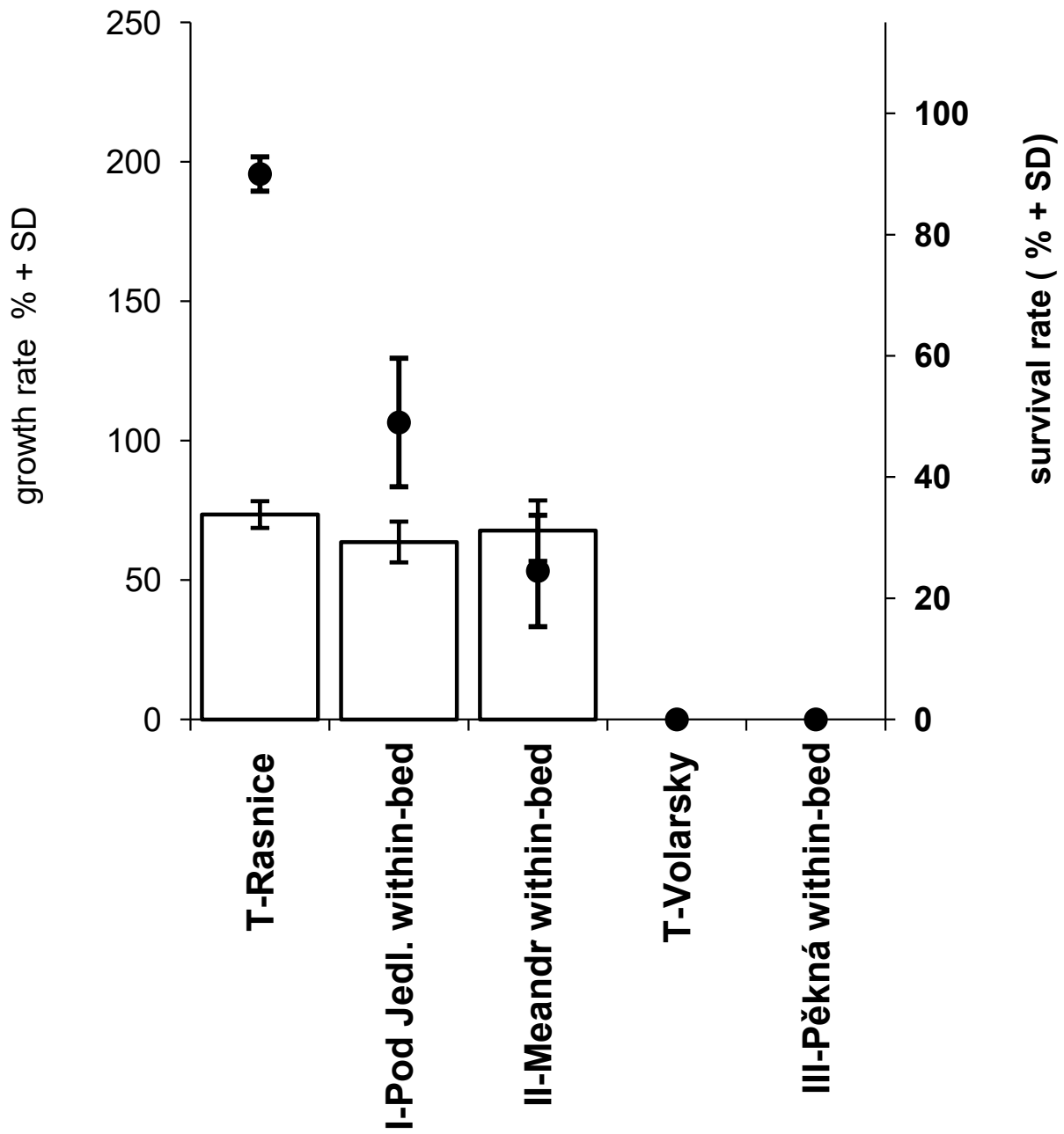


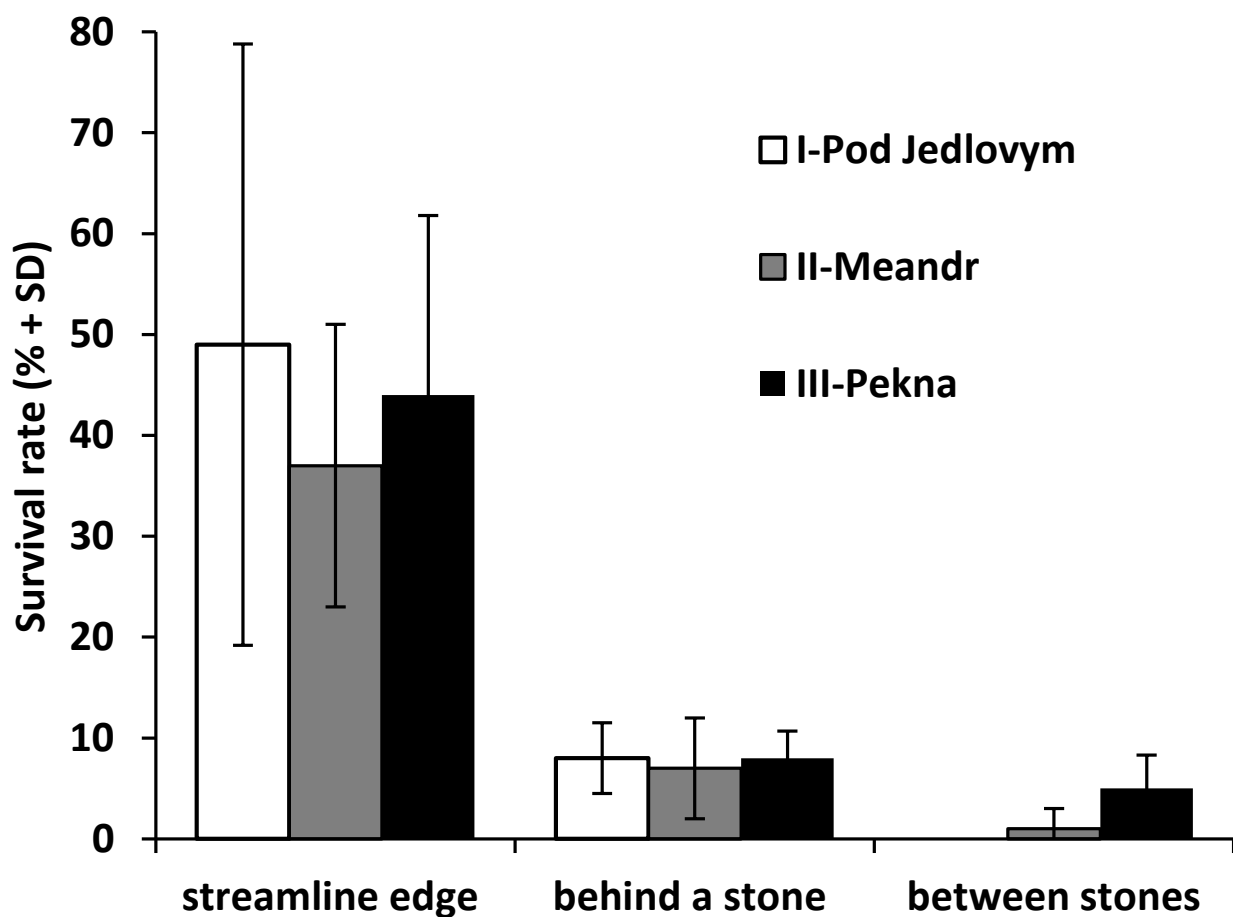


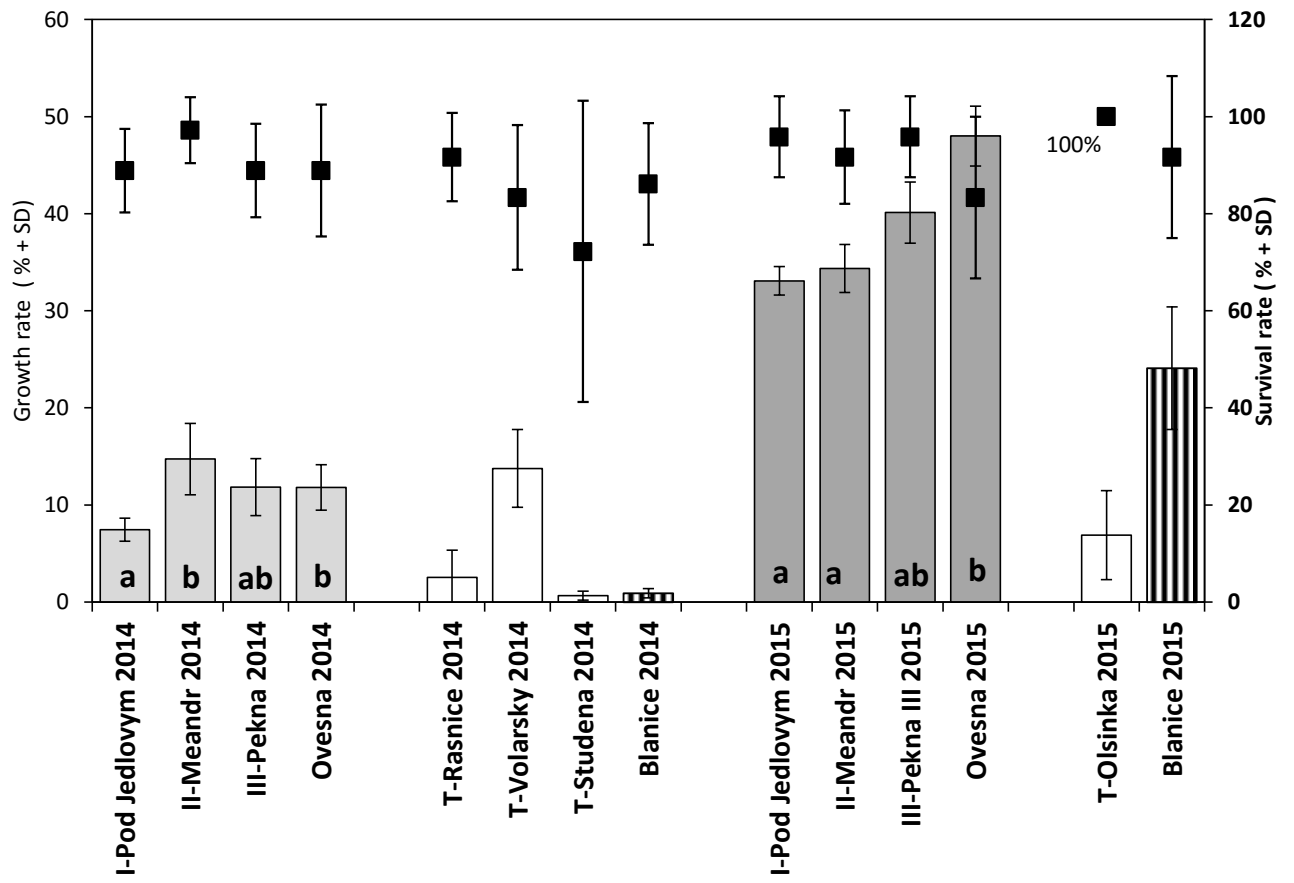












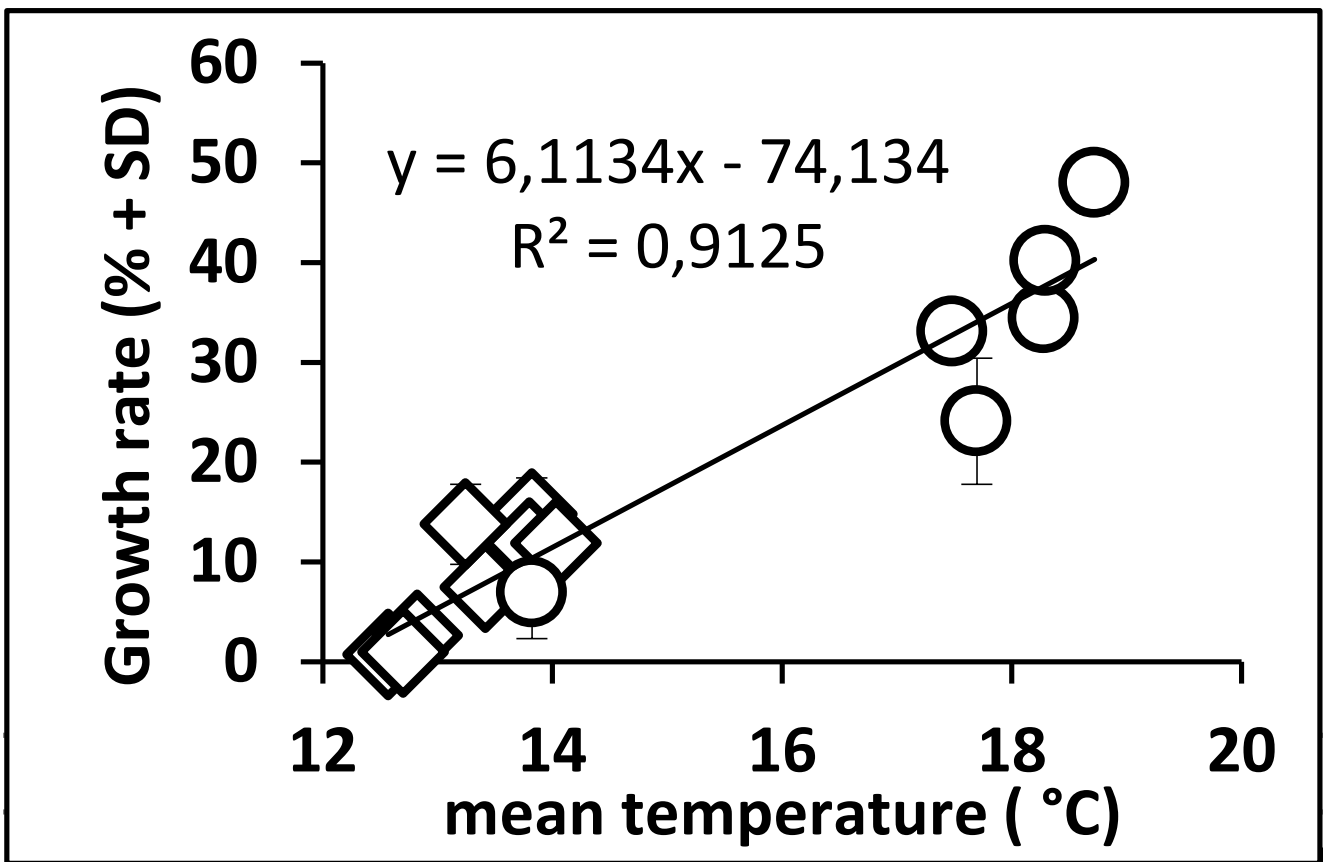




Figure 8

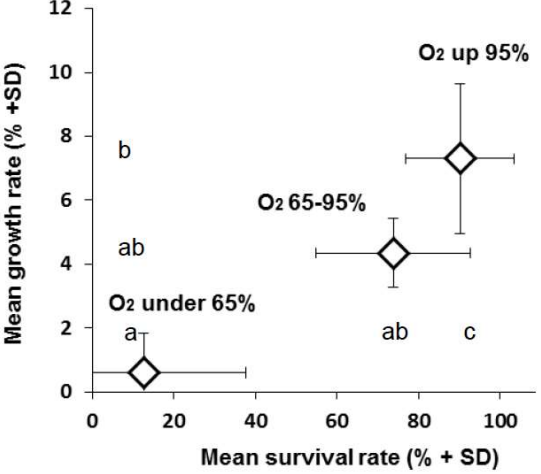
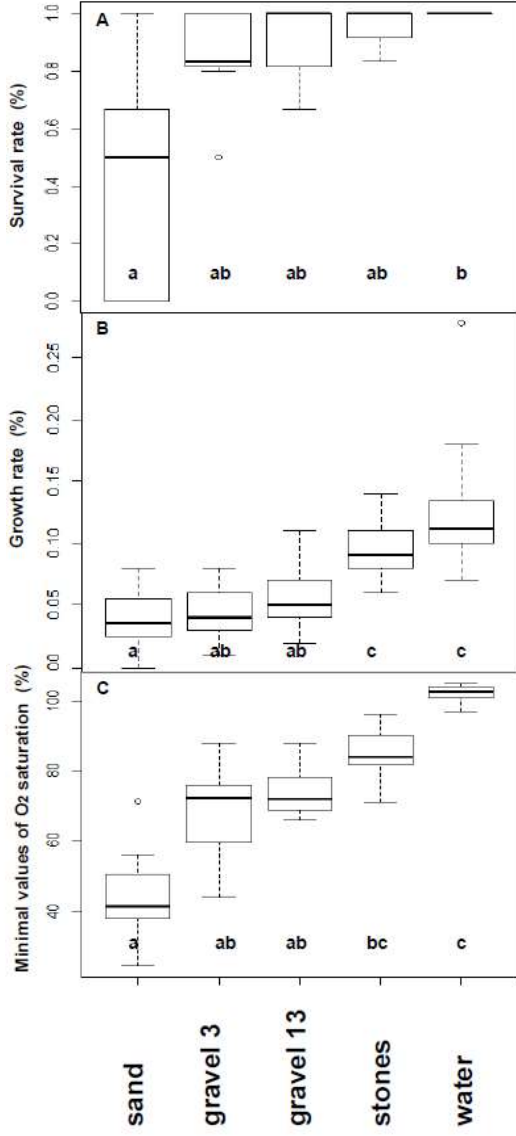
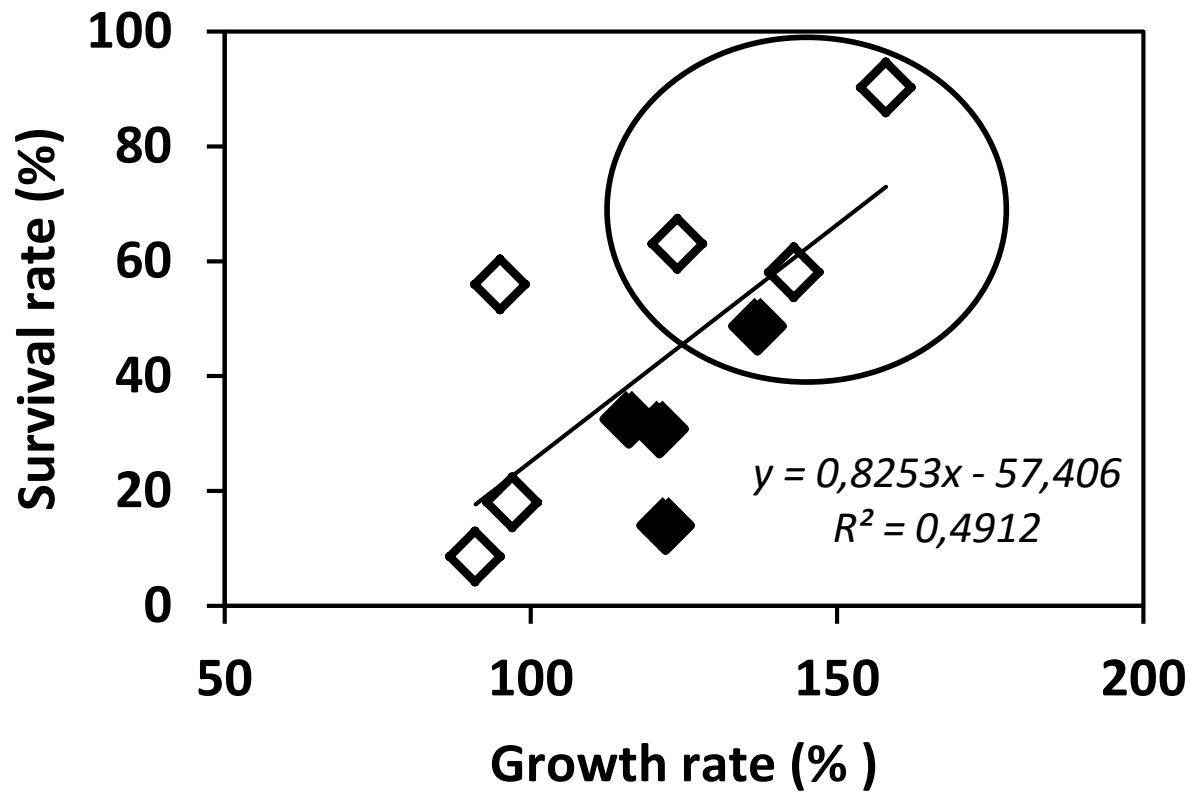
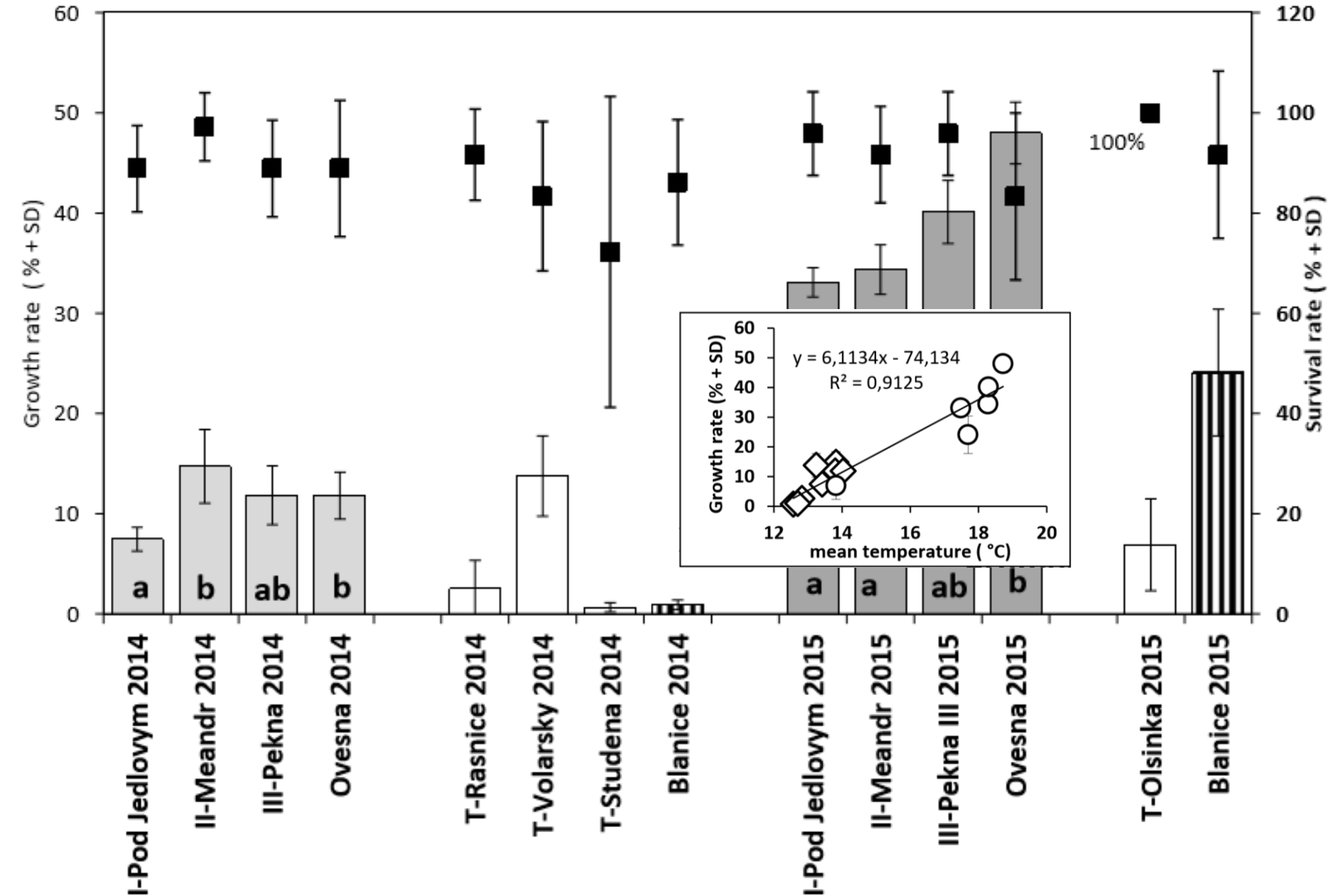


Figure 9







Tab 1: Water chemistry across ten studied localities during 2014 season. In nine localities, eleven samples were taken in monthly periods. In T-Olsinka locality, only one sample was taken on 27. 3. 2014.

	pH			cond ( $\mu\text{S.cm}^{-1}$ )			$\text{NO}_3^-$ ( $\text{mg.l}^{-1}$ )			$\text{NH}_4^+$ ( $\text{mg.l}^{-1}$ )			TP ( $\text{mg.l}^{-1}$ )			Ca ( $\text{mg.l}^{-1}$ )			A 254			US 105 ( $\text{mg.l}^{-1}$ )				
	min	max	aver.	min	max	aver.	min	max	aver.	min	max	aver.	min	max	aver.	min	max	aver.	min	max	aver.	min	max	aver.	min	max
Pod Lenorou	5.9	7.4	<b>6.7</b>	43	56	<b>51</b>	1.7	2.8	<b>2.3</b>	0.014	0.116	<b>0.035</b>	0.015	0.073	<b>0.034</b>	3.5	8.4	<b>5.2</b>	0.30	0.13	<b>0.62</b>	0.4	9.2	<b>2.7</b>		
I-Pod Jedlovym	6.3	7.6	<b>6.9</b>	53	72	<b>60</b>	1.5	2.7	<b>2.0</b>	0.002	0.035	<b>0.017</b>	0.016	0.080	<b>0.037</b>	3.6	7.6	<b>5.2</b>	0.15	0.48	<b>0.32</b>	0.8	14.0	<b>3.4</b>		
II-Meandr	6.1	7.6	<b>6.7</b>	54	67	<b>60</b>	1.4	2.8	<b>2.1</b>	0.003	0.051	<b>0.022</b>	0.018	0.095	<b>0.040</b>	4.1	6.5	<b>5.2</b>	0.15	0.49	<b>0.31</b>	0.4	18.0	<b>3.8</b>		
III-Pekna	6.0	7.4	<b>6.7</b>	50	66	<b>57</b>	1.8	2.8	<b>2.2</b>	0.003	0.109	<b>0.027</b>	0.020	0.094	<b>0.046</b>	3.4	5.6	<b>4.7</b>	0.18	0.6	<b>0.40</b>	0.8	18.0	<b>4.7</b>		
Ovesna	6.2	7.4	<b>6.8</b>	50	62	<b>57</b>	1.4	2.6	<b>2.0</b>	0.005	0.069	<b>0.022</b>	0.021	0.114	<b>0.049</b>	3.4	5.6	<b>4.5</b>	0.19	0.7	<b>0.40</b>	0.8	11.0	<b>4.8</b>		
T-Rasnice	6.0	7.6	<b>6.8</b>	63	86	<b>74</b>	1.7	2.7	<b>2.2</b>	0.004	0.457	<b>0.059</b>	0.021	0.132	<b>0.044</b>	3.9	6.9	<b>5.5</b>	0.15	0.54	<b>0.31</b>	0.4	17.0	<b>3.4</b>		
T-Olsinka *	-	-	5.6	-	-	49	-	-	2.3	-	-	0.018	-	-	0.008	-	-	3.9	-	-	0.84	-	-	1.2		
T-Volarsky	6.0	7.3	<b>6.8</b>	123	164	<b>136</b>	2.3	7.0	<b>5.5</b>	0.029	1.216	<b>0.235</b>	0.023	0.513	<b>0.062</b>	5.5	14.2	<b>11.0</b>	0.18	0.56	<b>0.40</b>	1.2	71.0	<b>15.3</b>		
T-Studena	5.4	7.6	<b>6.7</b>	32	49	<b>39</b>	1.6	2.5	<b>2.0</b>	0.005	0.057	<b>0.019</b>	0.021	0.078	<b>0.043</b>	1.8	3.9	<b>2.7</b>	0.15	0.71	<b>0.34</b>	0.4	11.0	<b>2.5</b>		
Blanice	6.3	7.6	<b>6.9</b>	53	72	<b>60</b>	1.5	2.7	<b>2.1</b>	0.002	0.035	<b>0.017</b>	0.016	0.080	<b>0.037</b>	3.6	7.6	<b>5.2</b>	0.15	0.48	<b>0.32</b>	0.8	14.0	<b>3.3</b>		

\* 27. 3. 2014

Tab. 2: Water chemistry in the localities during the bioindications in 2014 and 2015. The values were measured in month intervals.

	Lenora	I-Pod Jedlovým	II-Meандр	III-Pekna	Ovesna	T-Rasnice	T-Volarsky	T-Studena	Blanice		Lenora	I-Pod Jedlovým	II-Meандр	III-Pekna	Ovesna	T-Rasnice	T-Volarsky	T-Studena	Blanice
	<b>pH</b>										<b>cond (<math>\mu\text{S.cm}^{-1}</math>)</b>								
25.06.2014	6.3	7.1	6.4	6.4	6.5	6.5	6.5	6.6	7.1		55	62	63	66	62	86	164	43	64
30.07.2014	6.4	6.6	6.2	6.0	6.2	6.4	6.2	5.8	6		51	57	54	52	50	69	129	33	44
25.08.2014	7.4	7.6	7.2	7.4	7.3	7.6	7.2	7.3	-		52	72	64	61	62	84	153	41	-
20.05.2015	-	7.1	7.1	6.5	-	-	7.3	-	6.2		-	58	57	54	-	-	101	-	41
23.06.2015	-	7.0	7.0	7.0	-	-	6.9	-	7.3		-	55	54	50	-	-	139	-	48
08.07.2015	-	7.1	7.4	7.2	-	-	7.3	-	7.2		-	59	59	56	-	-	152	-	65
	<b>NO<sub>3</sub>- (mg.l-1)</b>										<b>NH<sub>4</sub>+ (mg.l-1)</b>								
25.06.2014	2.1	1.8	1.7	1.8	1.4	2.2	6.4	1.9	1.6		0.03	0.02	0.04	0.11	0.05	0.02	0.51	0.04	0.04
30.07.2014	2.4	2.1	2.2	2.4	1.9	2.1	4.7	1.9	2.0		0.02	0.01	0.02	0.05	0.01	0.02	1.22	0.01	0.03
25.08.2014	2.7	1.8	1.6	1.9	1.6	1.7	6.1	1.6	0.5		0.12	0.02	0.01	0.00	0.01	0.00	0.03	0.02	0.01
20.05.2015	-	1.6	1.6	1.7	-	-	2.9	-	0.7		-	0.02	0.03	0.04	-	-	0.18	-	0.04
23.06.2015	-	1.7	1.6	1.7	-	-	6.3	-	0.6		-	0.01	0.01	0.01	-	-	0.06	-	0.04
08.07.2015	-	1.7	1.8	1.7	-	-	5.5	-	1.4		-	0.00	0.00	0.01	-	-	0.06	-	0.05
	<b>Ca (mg.l-1)</b>										<b>TP (mg.l-1)</b>								
25.06.2014	6.0	5.8	6.2	5.4	4.9	6.9	14.2	3.0	6.88		0.04	0.03	0.03	0.05	0.05	0.04	0.20	0.04	0.08
30.07.2014	6.1	5.8	5.3	4.2	3.8	4.8	10.5	2.4	3.20		0.05	0.04	0.05	0.05	0.07	0.13	0.51	0.05	0.33
25.08.2014	5.0	4.9	4.9	4.4	4.6	6.0	13.4	2.2	5.12		0.04	0.04	0.04	0.06	0.04	0.03	0.10	0.04	0.05
20.05.2015	-	4.1	4.5	4.1	-	-	9.4	-	2.85		-	0.05	0.07	0.08	-	-	0.26	-	0.16
23.06.2015	-	4.1	4.5	2.5	-	-	11.8	-	2.85		-	0.04	0.04	0.04	-	-	0.13	-	0.05
08.07.2015	-	4.9	4.9	4.1	-	-	13.9	-	5.71		-	0.03	0.03	0.04	-	-	0.10	-	0.04
	<b>undissolved substances 105 °C (mg.l-1)</b>										<b>Absorbance 254</b>								
25.06.2014	3.4	1.2	2.0	2.4	4.8	2.0	23.0	2.0	13.0		0.53	0.42	0.28	0.29	0.63	0.15	0.48	0.15	0.18
30.07.2014	6.0	4.8	2.4	7.2	11.0	17.0	71.0	3.2	44.0		0.29	0.46	0.49	0.61	0.66	0.52	0.49	0.71	1.66
25.08.2014	1.2	0.8	2.0	6.4	0.8	1.6	3.6	0.8	2.0		0.16	0.19	0.20	0.24	0.26	0.21	0.23	0.26	0.43
20.05.2015	-	9.2	13.0	15.0	-	-	52.0	-	35.0		-	0.38	0.43	0.41	-	-	0.59	-	0.75
23.06.2015	-	2.4	4.8	3.6	-	-	8.4	-	3.6		-	0.33	0.34	0.38	-	-	0.25	-	0.55
08.07.2015	-	3.6	2.8	3.6	-	-	7.2	-	1.6		-	0.22	0.22	0.28	-	-	0.23	-	0.33

Tab. 3: Growth rate and surviving rate in the open water sandy cages and the within-bed sandy cages with minimum 100 individuals in 2014 (VI-VIII) and 2015 (V-VII). 10 the most growing individuals (10 MAX) in every cage were included. Open water sandy cages in the longitudinal profile of Vltava River in bold. Within-bed sandy cages in italic. Sandy cages in tributaries in standard. Average temperature during the exposure in the last column. N= number of sandy cages.

		N	average growth rate 1 %	SD	surviving rate(%)	SD	average temperature during exposure
localities in downstream order							
2014	T-Rasnice	2	73	4.8	90	2.8	13.5
	<b>Pod Lenorou</b>	<b>2</b>	<b>51</b>	<b>4.4</b>	<b>17</b>	<b>1.4</b>	<b>13.9</b>
	<b>I-Pod Jedlovym</b>	<b>4</b>	<b>110</b>	<b>9.5</b>	<b>26</b>	<b>16.7</b>	<b>14.4</b>
	<i>I- Pod Jedlovym hyporheal</i>	2	63	7.3	49	10.6	11.2
	<b>II - Meandr</b>	<b>4</b>	<b>153</b>	<b>21.4</b>	<b>26</b>	<b>8.2</b>	<b>15.0</b>
	<i>II- Meandr hyporheal</i>	2	68	10.8	25	9.2	15.1
	T-Volarsky	2			0	0.0	14.0
	<b>III- Pekna</b>	<b>4</b>	<b>113</b>	<b>8.4</b>	<b>29</b>	<b>13.5</b>	<b>15.0</b>
	<i>III -Pekna hyporheal</i>	2			0	0.0	-
	<b>Ovesna</b>	<b>2</b>	<b>46</b>	<b>26.9</b>	<b>8</b>	<b>10.6</b>	<b>15.5</b>
2015	<b>I- Pod Jedlovym</b>	<b>3</b>	<b>85.5</b>	<b>16.5</b>	<b>72</b>	<b>21.4</b>	<b>13.9</b>
	<b>II-Menadr</b>	<b>6</b>	<b>122.7</b>	<b>16.9</b>	<b>48</b>	<b>13.6</b>	<b>14.4</b>
	<b>III-Pekna</b>	<b>7</b>	<b>85.0</b>	<b>12.7</b>	<b>48</b>	<b>16.2</b>	<b>14.3</b>

Tab. 4: Comparison of mean growth rate and mean survival rate for 10 MAX in within-bed sandy cages (within-bed) and open water sandy cages (open water) in three main profiles in 2014. Two age cohorts (0+, 1+) are compared. Exposition = three months, n = at least 100 individuals per sandy cage, number of mesh cages (N) in the last column.

		survival rate	s.r. SD	growth rate	g.r. SD	N
open water 1+	I-Pod Jedlovym	26	16,7	111	9,5	4
open water 1+	II-Meandr	24	8,2	153	21,4	4
open water 1+	III-Pekna	29	13,5	114	8,4	4
open water 1+	mean	<b>26</b>	<b>12,8</b>	<b>126</b>		
open water 0+	I-Pod Jedlovym	53	2,6	173	26,2	4
open water 0+	II-Meandr	59	9,1	110	16,6	3
open water 0+	III-Pekna	43	13,7	190	22,3	3
open water 0+	mean	<b>51</b>	<b>8,5</b>	<b>158</b>		
within-bed 1+	I-Pod Jedlovym	49	10,6	64	7,3	2
within-bed 1+	II-Meandr	25	9,2	68	10,8	2
within-bed 1+	III-Pekna	0	0,0	-		2
within-bed 1+	mean	<b>25</b>	<b>4,0</b>	<b>66</b>		
within-bed 0+	I-Pod Jedlovym	37	7,1	119	15,9	2
within-bed 0+	II-Meandr	7	8,4	37	42,3	2
within-bed 0+	III-Pekna	0	0,0	-		2
within-bed 0+	mean	<b>15</b>	<b>5,2</b>	<b>78</b>		

Tab. 5 Temperature, growth rate and survival rate in the open water mesh cages exposed for 30 days in 2014 (July-August) and 2015 (June-July). The longitudinal profile of Vltava River in bold. Tributaries and Blanice River in standard. N: mesh cages number per a locality.

Localities 2014	temperature			average growth rate per a mesh cage (%)								N	Survival rate (%)	
	mean	imin	imax	D1	D2	D3	D4	D5	D6	mean	SD		Survival rate (%)	SD
T-Rasnice	12.8	9.4	17.9	0.7	4.7	3.8	1.1	0.0	0.0	1.7	2.0	6	92	9.1
<b>I-Pod Jedlovym</b>	<b>13.4</b>	<b>10.2</b>	<b>18.5</b>	<b>6.3</b>	<b>4.0</b>	<b>6.5</b>	<b>5.8</b>	<b>3.8</b>	<b>7.0</b>	<b>5.6</b>	<b>1.4</b>	<b>6</b>	<b>89</b>	<b>8.6</b>
<b>II- Meandr</b>	<b>13.8</b>	<b>10.5</b>	<b>19.1</b>	<b>12.1</b>	<b>11.5</b>	<b>7.1</b>	<b>11.0</b>	<b>8.9</b>	<b>17.1</b>	<b>11.3</b>	<b>3.4</b>	<b>6</b>	<b>97</b>	<b>6.8</b>
Volarsky	13.2	9.3	18.3	14.4	6.4	6.9	8.0	11.1	14.9	10.3	3.8	6	83	14.9
Studena	12.6	9.2	17.0	1.1	0.0	0.1	0.7	0.5	0.8	0.5	0.4	6	72	31.0
<b>II- Pekna</b>	<b>13.8</b>	-	-	<b>7.2</b>	<b>6.0</b>	<b>12.4</b>	<b>x</b>	<b>x</b>	<b>x</b>	<b>8.5</b>	<b>3.4</b>	<b>3</b>	<b>89</b>	<b>9.6</b>
<b>Ovesna</b>	<b>14.0</b>	<b>11.1</b>	<b>18.6</b>	<b>7.5</b>	<b>11.9</b>	<b>11.0</b>	<b>9.2</b>	<b>10.7</b>	<b>6.3</b>	<b>9.4</b>	<b>2.2</b>	<b>6</b>	<b>89</b>	<b>13.6</b>
Blanice	12.7	8.9	17.0	0.9	0.3	0.1	1.0	0.7	0.5	0.6	0.4	6	86	12.5
<b>Localities 2015</b>														
Olsinka	13.8	7.5	23.6	9.1	3.3	3.4	4.5			5.1	2.7	4	100	0.0
<b>I-Pod Jedlovym</b>	<b>17.5</b>	<b>10.4</b>	<b>23.7</b>	<b>29.8</b>	<b>29.1</b>	<b>25.1</b>	<b>26.3</b>			<b>27.6</b>	<b>2.3</b>	<b>4</b>	<b>96</b>	<b>8.3</b>
<b>II-Meandr</b>	<b>18.3</b>	<b>12.0</b>	<b>24.3</b>	<b>26.9</b>	<b>29.6</b>	<b>29.3</b>	<b>34.7</b>			<b>30.1</b>	<b>3.3</b>	<b>4</b>	<b>92</b>	<b>9.6</b>
<b>III-Pekna</b>	<b>18.3</b>	<b>11.0</b>	<b>24.5</b>	<b>xx</b>	<b>xx</b>	<b>38.5</b>	<b>30.6</b>			<b>34.5</b>	<b>5.5</b>	<b>2</b>	<b>92</b>	<b>11.8</b>
<b>Ovesna</b>	<b>18.7</b>	<b>11.6</b>	<b>24.6</b>	<b>46.5</b>	<b>x</b>	<b>40.2</b>	<b>38.6</b>			<b>41.8</b>	<b>4.2</b>	<b>3</b>	<b>83</b>	<b>16.7</b>
Blanice	17.7	10.0	25.5	13.6	19.3	23.6	20.7			19.3	4.2	4	92	16.7

x lost mesh cage

xx damaged mesh cage



Tab. 6: Results of statistical analysis of growth rate differences among four localities evaluated by open water mesh cages in the longitudinal profile of Vltava River in two seasons. a: 2014, Kruskal-Nemenyi test, b: 2015, Kruskal-Nemenyi test. Significant results in bold.

a	I- Pod Jed.	II-Meandr	Ovesna
II-Meandr	<b>&lt;0.001</b>		
Ovesna	<b>&lt;0.001</b>	0.66	
III-Pekna	0.07	0.33	0.88

b	I- Pod Jed.	II-Meandr	Ovesna
II-Meandr	0.76		
Ovesna	<b>&lt;0.001</b>	<b>&lt;0.05</b>	
III-Pekna	0.051	0.29	0.54

Tab. 7: Results of statistical analysis of survival rate, minimal values of oxygen saturation and growth rate for 3MAX among different microhabitats of the locality II-Meandr evaluated by mesh cages. A: survival rate, Kruskal-Nemenyi test, B: growth rate of 3MAX, Kruskal-Nemenyi test, C: minimal values of oxygen saturation, Kruskal-Nemenyi test. Significant results in bold.

A	stony bottom	sand	gravel_3cm	gravel_13cm
sand	0.07			
gravel_3cm	0.87	0.49		
gravel_13cm	0.98	0.27	0.99	
open water	0.97	<b>0.02</b>	0.51	0.74

B	stony bottom	sand	gravel_3cm	gravel_13cm
sand	<b>&lt;0.001</b>			
gravel_3cm	<b>&lt;0.001</b>	0.99		
gravel_13cm	<b>&lt;0.05</b>	0.71	0.84	
open water	0.57	<b>&lt;0.001</b>	<b>&lt;0.001</b>	<b>&lt;0.001</b>

C	stony bottom	sand	gravel_3cm	gravel_13cm
sand	<b>&lt;0.05</b>			
gravel_3cm	0.51	0.44		
gravel_13cm	0.61	0.34	0.99	
free water	0.52	<b>&lt;0.001</b>	<b>&lt;0.05</b>	<b>&lt;0.05</b>

The effect that river bottom habitat and physico-chemical parameters of the environment has upon juvenile pearl mussels (*Margaritifera margaritifera*) in a catchment of the Vltava River (Czech Republic) were tested using in situ bioindication methods; growth and survival rates of one and two years old juveniles were measured. Three spatial scales were studied: a longitudinal river profile, bottom habitat types, and hyporheic microhabitats. Two bioindication methods yielded different results. Mesh cages with an individual holding of the juveniles in free-floating water conditions identified the best growth and a good survival rate in a lower reaches of the experimental river stretch. However, this method does not reflect the influence of bottom oxygenation. The evaluation in sandy cages demonstrated a better rate of growth in the middle reaches yet a higher rate of mortality in the lower reaches. The microhabitat study in a shallow hyporheal location yielded a significant decrease of both growth and survival, when oxygenation decreased below 65%. An episodic pollution by  $\text{NH}_4^+$  above 1,2 mg/l caused an absolute mortality in the sandy cages. In contrary to an input hypothesis, neither growth nor survival showed any clear correlation with organic matter, TP and Ca in detritus occurring in the localities.

## Příloha 5 Seznam publikací Ondřeje Simona za posledních 6 let

### Vědecké články

- Simonová, J., **Simon, O. P.**, Kapic, Š., Nehasil, L. and M. Horský (2016). "Medium-sized forest snails survive passage through birds' digestive tract and adhere strongly to birds' legs: more evidence for passive dispersal mechanisms." *Journal of Molluscan Studies* **82**(3): 422-426.
- Simon O. P.**, Vaničková I., Bílý M., Douda K., Patzenhauerová H., Hruška J. and A. Peltanová (2015). "The status of freshwater pearl mussel in the Czech Republic: several successfully rejuvenated populations but the absence of natural reproduction." *Limnologica – Ecology and Management of Inland Waters* **50**: 11-20.
- Matasová, K., **Simon, O. P.**, Dort, B., Douda, K. and M. Bílý (2013). "Recent distribution of the freshwater pearl mussel (*Margaritifera margaritifera*) in historical localities in the upper part of the Vltava river basin." *Silva Gabreta* **19**: 139-148.
- Kubíková, L., **Simon, O. P.**, Tichá, K., Douda, K., Maciak, M. and M. Bílý (2012). "The influence of mesoscale habitat conditions on the macroinvertebrate composition of springs in a geologically homogeneous area." *Freshwater Science* **31**: 668-679.
- Tichá, K., **Simon, O. P.**, Douda, K. and L. Kubíková (2012). "Detrital components in submontane organogenic springs in relation to their morphology, microhabitats and macroinvertebrates." *Polish Journal of Ecology* **60**: 163-175.
- Wanner, F., **Simon, O. P.** and V. Kladivová (2012). "Decrease in the trophic status of a second-order stream (Zbytinský Potok) by a new wastewater treatment plant with two low-loaded stabilisation ponds." *Silva Gabreta* **18**(1): 23-34.
- Kubíková L., **Simon O. P.** and K. Fricová (2011). "The occurrence of Pisidium species (Sphaeriidae, Bivalves) in oligotrophic springs of the Blanice river catchment (Czech Republic) in relation to ecological conditions." *Biologia* **66**(2): 299-307.

### Patenty s vazbou na téma disertace

- Simon, O.** and Douda, K. (originators), T.G.M. WRI, p.r.i. (applicant): Pressure-type continuous sampler for flowing water. Patent No. 303836, *The Industrial Property Office of Czech Republic* 26.10.2009.
- Simon, O.** and Douda, K. (originators), T.G.M. WRI, p.r.i. (applicant): Continual sediment sampler for small sloping flows. Utility model No. 18924, *The Industrial Property Office of Czech Republic* 29.9.2008.

### Příspěvky na konferencích (zahraniční tučně)

- Simon, O., Douda, K., Bílý, M., Fricová, K., Kladivová, V., Kubíková, L. (2011): Syntetický pohled na limitující faktory evropských populací perlorodky říční (*Margaritifera margaritifera* L.) a specifický případ českých zbytkových populací. In Bryja, J., Řehák, Z., Zukal, J. (Eds.): Zoologické dny Brno 2011. Sborník abstraktů z konference. 17.–18. února 2011, Brno, s. 202 (přednáška, abstrakt)
- Simon, O., Bílý, M., Douda, K., Dort, B., Kladivová, V. (2011): Limitující faktory pro populaci perlorodky říční (*Margaritifera margaritifera* L.) v povodí Šumavské Blanice. In Kopsová, L. (Ed.): Sborník 3. konference České společnosti pro ekologii „Ekologie 2011“. 21.–23. října 2011, Kostelec nad Černými Lesy, s. 21 (plenární přednáška, abstrakt)
- Simon, O., Douda, K., Kožený, P., Kladivová, V. a kol. (2011): Možnosti územní ochrany oligotrofních říčních sítí – chránit vlastní toky, nivní koridory nebo celá povodí? In Petřivalská, M., Měkotová, J., Pithart, D. (Eds.): Říční krajina 7. 5.–7. října 2011, Olomouc, s.160 (plenární přednáška, abstrakt)
- Kubíková, L., Simon, O., Tichá, K., Maciak, M. (2011): The community of springs – continuum or clearly defined units? In Sborník abstraktů z konference 3rd Aquatic Biodiversity International Conference, 4.–7. října 2011, Sibiu, Rumunsko (přednáška Kubíková, abstrakt)**
- Bílý M., Simon, O. (2012): Problematika managementu vodních toků s výskytem kriticky ohrožených druhů. In Romportl D. & Chuman T. (Eds.): Geo/biodiverzita - Management chráněných území. Sborník abstraktů z výroční konference CZ-IALE 2012. 2012, PŘF UK v Praze, s. 3 (přednáška Bílý, abstrakt)
- Kladivová V., Simon, O. (2012): Ochrana makrofyt v oligotrofních horských tocích jako zvláštní případ managementu chráněných území. In Romportl D. & Chuman T. (Eds.): Geo/biodiverzita - Management chráněných území. Sborník abstraktů z výroční konference CZ-IALE 2012. PŘF UK v Praze, s. 16 (přednáška Kladivová, abstrakt)
- Simon, O. P., Tichá, K., Kubíková, L., Douda, K., Baudyšová, A. (2012): Detritus from springs as a possible food source for freshwater pearl mussel (*Margaritifera margaritifera*): composition, quantity and**

- origin. In Teixeira, A., Lopes-Lima, M., Varandas, S. (Eds.): **International Meeting of Biology and Conservation of Freshwater Bivalves Braganca, Portugal, 4th-7th September 2012, Book of Abstracts Polytechnic Institute of Braganca. Braganca, 137 p. (poster)**
- Simon, O., Douda, K., Dort, B. (2012): Proč dosud nikdo nenalezl desetitisícové populace juvenilních perlorodek (čel. Margaritiferidae)? In Bryja J., Albrechtová J. & Tkadlec E. (Eds.): **Zoologické dny Olomouc 2012. Sborník abstraktů z konference. 9.–10. února 2012, Olomouc, 177 s. (přednáška, abstrakt)**
- Peltanová, A., Hruška, J., Simon, O. P., Dort, B., Spisar, O., Bílý, M., Kladivová, V., Patzenhauerová, H., Douda, K. (2012): **Action plan for Margaritifera margaritifera in the Czech Republic (Central Europe) – concepts, targets and realization. In Teixeira, A., Lopes-Lima, M., Varandas, S. (Eds.): International Meeting of Biology and Conservation of Freshwater Bivalves Braganca, Portugal, 4th-7th September 2012, Book of Abstracts Polytechnic Institute of Braganca. Braganca, 130 p. (poster)**
- Simon, O. (2012): Limits of freshwater pearl mussel occurrence in South Bohemian residual sites: eutrophication or oligotrofication? In Poláková, S., Pithart, D. a Simon, O. (Eds.): **Biology, ecology and conservation of freshwater pearl mussel in Central Europe. 2012, Prachatice. (oral presentation)**
- Simon, O. P., Douda, K., Peltanová, A., Patzenhauerová, H., Spisar, O., Hruška, J. (2012): **The situation of Margaritifera margaritifera in the Czech Republic – several successfully rejuvenated populations but the absence of natural reproduction. In Teixeira, A., Lopes-Lima, M., Varandas, S. (Eds.): International Meeting of Biology and Conservation of Freshwater Bivalves Braganca, Portugal, 4th-7th September 2012, Book of Abstracts Polytechnic Institute of Braganca. Braganca, 138 p. (poster)**
- Douda, K., Simon, O. P., Dort, B., Švanyga, J. (2012): **The relative importance of temperature and food to juvenile growth of Margaritifera margaritifera in its natural habitat. In Teixeira, A., Lopes-Lima, M., Varandas, S. (Eds.): International Meeting of Biology and Conservation of Freshwater Bivalves Braganca, Portugal, 4th-7th September 2012, Book of Abstracts Polytechnic Institute of Braganca. Braganca, 102 p. (poster)**
- Bílý, M., Simon, O., Kladivová, V. (2012): **Water Chemistry in Czech Localities of Freshwater Pearl Mussel (Margaritifera margaritifera) as a Factor Limiting the Species on a Border of its Distribution Area. In Čiamaporová-Zaťovičová (Ed.): XVI. Konferencia Slovenskej limnologickej spoločnosti a České limnologické společnosti - Zborník príspevkov, 25.–29. jún 2012, Jasná, 16 p. (přednáška Bílý, abstrakt)**
- Simon, O., Douda, K., Bílý, M. (2013): **Antropogenní zátěž ekosystému dusíkem jako hlavní ireverzibilní příčina vymírání perlorodky říční (Margaritifera margaritifera)? In Bryja, J., Řehák, Z., Zukal, J. (Eds.): Zoologické dny Brno 2013. Sborník abstraktů z konference. 7.–8. února 2013, Brno, 211 s. (přednáška, abstrakt)**
- Tichá, K., Simon, O., Kubíková, L., Maciak, M. (2013): **Typ prameniště jako určující faktor společenstva prameništních chrostíků. In Bryja, J., Řehák, Z., Zukal, J. (Eds.): Zoologické dny Brno 2013. Sborník abstraktů z konference. 7.–8. února 2013, Brno, 234 s. (poster)**
- Reslová, M., Simon, O. (2013): **Ploštenky v ČR s důrazem na výzkum potravního chování ploštenky horské (Crenobia alpina) v pramenech. In Bryja, J., Řehák, Z., Zukal, J. (Eds.): Zoologické dny Brno 2013. Sborník abstraktů z konference. 7.–8. února 2013, Brno, 195 p. (poster)**
- Bílý, M., Simon, O., Wanner, F., Kaňková, P. (2013): **Funkce biocenózy pro transformaci a retenci živin v experimentální soustavě dvou nízkozatěžovaných biologických rybníků. In Růžičková I., Wanner J., Fuka T. (Eds.): 10. bienální konference Voda 2013. Sborník přednášek a posterových sdělení. 18. září 2013, Poděbrady. Brno: Tribun EU, s.r.o., 2013, s. 293–296. (článek ve sborníku, poster)**
- Douda, K., Simon, O., Dort, B., Švanyga, J. (2013): **Faktory ovlivňující růst a přežívání juvenilních jedinců perlorodky říční (Margaritifera margaritifera) – co nám říkají bioindikační metody? In Bryja, J., Řehák, Z., Zukal, J. (Eds.): Zoologické dny Brno 2013. Sborník abstraktů z konference. 7.–8. února 2013, Brno, 57 s. (přednáška, abstrakt)**
- Švanyga J., Simon O. P., Dort, B., Douda, K. (2013): **Application of special meadow management within the measures of Action Plan for Freshwater Pearl mussel (Margaritifera margaritifera) in the Czech Republic. In Martins, A. M. F. et al. (Eds.): World Congress of Malakology, Ponta Delgada, Azores, July 22-28 2013, Book of abstracts Sociedade Alfonso Chaves. Ponta Delgada, 216 p. (poster)**
- Simon, O. P., Tichá, K., Bílý, M., Kladivová, V., Kožený, P., Kubíková, L., Douda, K. (2013): **Funkce pramenišť v říční síti: transformace živin, produkce detritu, tepelný regulátor a refugium biodiverzity. In Schlaghamerský, J., Chytrý, M., Horsák, M. (Eds.): Sborník abstraktů Výroční konference ČSPE Ekologie 2013. 18.-20. října, Brno, s. 29 (plenární přednáška)**
- Simon, O., Tichá, K., Kubíková, L., Douda, K., Bílý, M., Matasová, K. (2013): **Detritové partikule z pramenišť jako potravní zdroj pro perlorodku říční (Margaritifera margaritifera) - jejich složení, množství a původ. In Schlaghamerský, J., Chytrý, M., Horsák, M. (Eds.): Sborník abstraktů Výroční konference ČSPE Ekologie 2013. 18.-20. října 2013, Brno. s. 54 (abstrakt)**
- Douda, K., Simon, O. P., Dort, B., Švanyga, J. (2013): **Evidence based approach to the restoration of Margaritifera margaritifera habitats in the Czech Republic. In Lerchegger, B., Scheder, Ch., Gumpinger, C. (Eds.): International meeting on improving the environment for the freshwater pearl**

**mussel Kefermarkt, Austria, 13th-17th November 2013, Book of Abstracts Abteilung Naturschutz, Linz, 29 p. (oral presentation Douda and abstrakt)**

- Bílý, M., Simon, O., Wanner, F., Kaňková, P. (2013): Funkce biocenózy pro transformaci a retenci živin v experimentální soustavě dvou nízkozatěžovaných biologických rybníků. In Růžičková I., Wanner J., Fuka T. (Eds.): 10. bienální konference Voda 2013. Sborník přednášek a posterových sdělení. 18. září 2013, Poděbrady, Brno: Tribun EU, s.r.o., 2013, s. 293–296. (článek ve sborníku, poster)
- Kapic, Š., Nehasil, L., Simonová, Jas., Halda, M., Kadlecová, B., Simon, O., Simonová, Joh., Hegrlík, J. (2014): I čeští plži mohou létat! Experimentální důkaz možnosti pasivní ornitodisperze pro plže *Cochlodina laminata*, *Alinda biplicata* a *Discus rotundatus*. In Bryja J. & Drozd P. (Eds.): Sborník abstraktů z konference. Zoologické dny Ostrava 2014. 6.–7. února, Ostrava, 2014, s. 88–89. (poster)
- Nehasil, L., Simonová, Jas., Kadlecová, B., Kapic, Š., Halda, M., Uličná, T., Simonová, Joh., Hegrlík, J., Semotánová, M., Simon, O. (2014): Bazické výchozy v okolí Ralska: ornitodisperzní výsadky, nebo relikty postglaciální malakofauny? In Bryja J. & Drozd P. (Eds.): Sborník abstraktů z konference Zoologické dny Ostrava. Sborník abstraktů z konference. 6.–7. února 2014: s. 88–89. (přednáška Jasna Simonová)
- Simon, O., Matasová, K., Douda, K., Bílý, M., Dort, B., Rambousková, K., Kladivová, V. (2014): Co říkají nálezy schránek o výskytu perlorodky říční? In Bryja J. & Drozd P. (Eds.): Zoologické dny Ostrava 2014. Sborník abstraktů z konference. 6.–7. února, Ostrava, 2014, s. 181 (poster)
- Simon, O. (2014): Bioindikace a hodnocení biotopu perlorodky říční (*Margaritifera margaritifera* L.) se zaměřením na mikrohabitat a potravní partikule v EVL Šumava. In Solský, M. (Ed.): Sborník abstraktů z konference Biodiverzita 2014. 8.–9. března 2014, Mělník-Chloumek, s. 21 (přednáška)
- Wanner, F., Simon, O., Kladivová, V. (2014): Poloprovozní experimenty s nízkozatěžovanými dočišťovacími nádržemi – rychlý nástup efektu i bez zaočkování. Odpadové vody 2014. 22.–24. 10. 2014, Štrbské Pleso (článek ve sborníku a přednáška)
- Simon, O., Simonová, Jas., Bílý, M. (2015): Limity dálkové ornitodisperze bezobratlých: velikost přenášených živočichů a vzdálenost transportu překonává všechny naše představy. In Bryja, J., Řehák, Z. & Zupal, J. (Eds.): Zoologické dny Brno 2015. Sborník abstraktů z konference. 12.–13. února 2015, Brno, s. 223
- Simon, O. P., Švanyga, J., Hruška, J., Douda, K., Vaničková, I., Tichá, K., Bílý, M., Jandáková M., Dort, B. (2015): Conservation of freshwater pearl mussel (*Margaritifera margaritifera*) as the flagship species for oligotrophic catchment areas: Achievements and failures of 30 year action plan in the Czech Republic. 27th International congress for Conservation Biology, Montpellier, France, 2.–6. August 2015, p. 58 (poster)**
- Tichá K., Simon O., Peláková, L. (2015): Spring wetlands – their role in nutrient cycling and maintaining local biodiversity. 27th International congress for Conservation Biology, Montpellier, France, 2.–6. August 2015, p. 61 (poster)**
- Simon, O., Simonová, Jas., Bílý, M. (2015): Limity dálkové ornitodisperze bezobratlých: velikost přenášených živočichů a vzdálenost transportu překonává všechny naše představy. In Bryja, J., Řehák, Z. & Zupal, J. (Eds.): Zoologické dny Brno 2015. Sborník abstraktů z konference. 12.–13. února 2015, Brno, s. 223 (přednáška, abstrakt)
- Tichá, K., Simon, O. P., Peláková, L. (2015): Rolle von Quellmooren beim Erhalt der Biodiversität und in Nährstoff-Zyklen [Spring wetlands in Blanice River catchment– their role in nutrient cycling and maintaining local biodiversity]. Aktuelle Ergebnisse der Böhmerwaldforschung, Haus zur Wildnis, 9.–10. 9. 2015, p. 94 (poster)**
- Simon, O. P., Švanyga, J., Hruška, J., Douda, K., Vaničková, I., Douda, K., Kladivová, V., Tichá, K., Bílý, M., Dort, B., Zelenková, E., Peltánová, A. (2015): Erfolge und Misserfolge des Flussperlmuschel-Rettungsprogrammes nach 30 Jahren des systematischen Schutzes dieser Flaggschiffart von oligotrophen Einzugsgebieten [Achievements and failures of Czech Action plan for freshwater pearl mussel (*Margaritifera margaritifera*) 30 years of systematic conservation of this oligotrophic catchment areas flagship species]. Aktuelle Ergebnisse der Böhmerwaldforschung, Haus zur Wildnis, 9.–10. 9. 2015, p. 77 (poster)**
- Wanner, F., Simon, O., Kladivová, V., Plotěný, M., Jiráň, V. (2015): Biologické dočišťovací rybníky. In Benáková, A., Johanidesová, I., Wanner, J. (Eds.): Voda 2015 - Sborník přednášek a posterových sdělení. 16. září 2015, Poděbrady. Brno: Tribun EU, s.r.o., 2015, s. 159-166 (článek ve sborníku, přednáška)
- Kladivová, V., Simon, O. P., Simonová, Joh., Dvořáková, E., Svobodová, J. (2015): Der Fluss Teplá Vltava: Naturschutz versus Wassertouristik [Teplá Vltava River: Nature conservation versus canoeing]. Aktuelle Ergebnisse der Böhmerwaldforschung, Haus zur Wildnis, 9.–10. 9. 2015, p. 48 (poster)**
- Jandáková, M., Simon, O. P., Švanyga, J., Bílý, M., Douda, K., Hodaňová, V., Černá, M. (2015): Distribution der adulten Flussperlmuschelindividuen und die bioindikativ bewertete Standorteignung im Längsprofil der Flussströme von Šumava [Distribuce adultních jedinců perlorodky říční a bioindikačně hodnocená vhodnost stanovišť v podélném profilu toku šumavských řek]. Aktuelle Ergebnisse der Böhmerwaldforschung, Haus zur Wildnis, 9.–10. 9. 2015, p. 42 (poster)**

- Bílý, M., Simon, O. P., Kladivová, V. (2015): Results of a long-term water quality monitoring in catchments with freshwater pearl mussel occurrence in Šumava Mountains. Aktuelle Ergebnisse der Böhmerwaldforschung, Haus zur Wildnis, 9.–10. 9. 2015, (poster)**
- Rambousková, K., Simon, O., Švanyga, J. (2015): Úskalí monitoringu velkých mlžů na příkladu podrobného mapování perlorodky říční (*Margaritifera margaritifera*) v NP Šumava. In Harabiš, F., Solský, M. (Eds.): Sborník abstraktů 7. ročníku konference Kostelecké inspirování. 19. – 20. listopadu 2015, s. 15 (přednáška a abstrakt)
- Jandáková, M., Simon, O. P., Švanyga, J., Bílý, M., Douda, K., Černá, M., Hodaňová, V. (2015): Distribution of adult pearl mussel (*Margaritifera margaritifera*) individuals and location suitability bioindictively assessed in the longitudinal stream profile on the border of a natural area. In Mehler, K., Burlakova, L. E., Karatayev, A. Y., Dickinson, S. (Eds.): Second International Meeting on Biology and Conservation of Bivalves, October 4-8, 2015, Buffalo, New York, USA. p. 88 (poster)**
- Černá, M., Rambousková, K., Simon, O., Jandáková, M., Barák, V., Bílý, M., Tichá, K., Švanyga, J. (2016): Hot news from the pearl mussel river Teplá Vltava in the Czech Republic. In Móra, A., Csabai, Z. (Eds.): Book of abstracts and programme. 2nd Central European Symposium for Aquatic Macroinvertebrate Research (CESAMIR), July 3–8 2016, Pécs, Hungary Carpathes Nature Foundation, Mohács – Pécs, p. 118 (poster)**
- Simon, O., Bílý, M., Staponites, L. (2016): Where natural communities were able to spontaneously regenerate from forcibly depopulated Central European landscapes after World War II, restoration of river networks is still needed. Nature Culture Heritage in Context - 7th Annual Conference on Heritage Issues in Contemporary Society, May 16–19, 2016, Czech University of Life Sciences, Prague, p. 56 (poster)

## Popularizační články

- Kožený, P., Balvín, P., Sucharda, M., Máčka, Z., Simon, O. (2011): Možnosti a rizika nakládání s dřevní hmotou v tocích – návrh metodiky pro monitoring, management a využití dřevní hmoty v tocích. VTEI - Vodohospodářské technicko-ekonomické informace, roč. 2011, č. 6, s. 8-11.
- Fiala, D., Fučík, P., Hruška, J., Rosendorf, P., Simon, O. (2013): Fosfor v centru pozornosti. Vodní hospodářství, roč. 2013, č. 8, s. 247–250.
- Vaničková, I., Simon, O., Dort, B. (2014): Omlazení populací perlorodky říční. Ochrana přírody 6, s. 11-15.
- Reslová, M., Simon, O. (2015): Ploštěnky – opomíjené obyvatelé našich vod. Živa č. 5, s. 254-256.

## Metodiky a koncepční dokumenty celostátního charakteru s vazbou na téma disertace

- Kožený, P., Sucharda, M., Máčka, Z., Kult, A., Balvín, P., Zapletal, J., Simon, O. (2011) Metodika pro monitoring, management a využití dřevní hmoty ve vodních tocích. Ministerstvo životního prostředí ČR. Praha. 86 s. (certifikovaná metodika, nepublikováno)
- Švanyga, J., Simon, O., Mináriková, T., Spisar, O., Bílý, M. (2013) Záchranný program perlorodky říční v ČR. AOPK ČR. Nepublikovaná koncepce státní ochrany přírody, deponováno na AOPK ČR. Praha. 77 str., přílohy 1-10. (elektronický dokument, připravována česko-anglická kniha)
- Rambousková, K., Kladivová, V., Švanyga, J., Simon, O. (2016) Zásady péče a využívání povodí s perlorodkou říční - Metodiky podpory perlorodky říční oddíl A. Ministerstvo životního prostředí ČR. Praha. 50 s. (certifikovaná metodika, nepublikováno)
- Simon, O., Černá, M., Hruška, J., Dort, B., Rambousková, K. (2016) Metodika postupů na zajištění potravní nabídky pro perlorodku říční speciálními revitalizacemi - Metodiky podpory perlorodky říční oddíl C. Ministerstvo životního prostředí ČR. Praha. 37 s. (certifikovaná metodika, nepublikováno)
- Simon, O., Dort, B., Hruška, J. (2016) Metodika odchovů - Metodiky podpory perlorodky říční oddíl E. Ministerstvo životního prostředí ČR. Praha. 37 s. (certifikovaná metodika, nepublikováno)
- Simon, O., Rambousková, K., Dort, B., Bílý, M. (2016) Metodika bioindikací - Metodiky podpory perlorodky říční oddíl F. Ministerstvo životního prostředí ČR. Praha. 27 s. (certifikovaná metodika, nepublikováno)
- Tichá, K., Simon, O., Hruška, J., Švanyga, J. (2017) Speciální revitalizace, obnova vodního režimu a protierozní opatření - Metodiky podpory perlorodky říční oddíl D. Ministerstvo životního prostředí ČR. Praha. 50 s. (certifikovaná metodika, nepublikováno)

## Plány péče o chráněná území a zřizovací vyhlášky s vazbou na téma disertace

- Simon, O., Kožený, P. a kol. (2011). Návrh plánu péče o NPP Blanice a NPP Prameniště Blanice. Nepublikovaná zpráva pro ČHKO Šumava, 82 s. (spojený platný plán péče o 2 stávající NPP)
- Simon, O., Dort, B., Šimek a kol. (2013). Návrh plánu péče o PP Horní Malše. Nepublikovaná zpráva pro Jihočeský kraj, 75 s. (návrh na vyhlášení NPP + platný plán péče)

Simon, O., Dort, B. a kol. **(2013)**. Návrh plánu péče o PP Blanice. Nepublikovaná zpráva pro Jihočeský kraj, 35 s.  
(návrh na vyhlášení PP + platný plán péče)

Hruška, J., Simon, O., Dort a kol. **(2015)**. Návrh plánu péče pro NPP Zlatý potok. Nepublikovaná zpráva pro CHKO  
Blanský les. 58 s. (schvalovací proces na vyhlášení NPP + návrh plánu péče)



## **Příloha 6 Odborný životopis**

# ONDŘEJ PROKOP SIMON

## PROFILE

I am a hydrobiologist, a conservation biologist and a teacher. I am a researcher at T.G. Masaryk Water Research Institute and CULS. I have taught university and grammar school students part-time for a long time. My discipline is nature management, conservation hydrobiology and malacology. I design nature reserve management plans, river restoration projects and action plans for endangered species.

## CURRENT EMPLOYMENT

**Apr 2012 – to date researcher and teacher.** *The Faculty of Environment, CULS Prague (part-time job and 4th year of Ph.D. study programme)*

I teach landscape nature protection and partially conservation biology lessons, hydrobiology and zoology fieldwork lessons. I have obtained 2 projects (TAČR grant agency) and led the first of them in 2016. I also do fundraising work (6 project Applications) and leadership of students (consultant 10 Bc., Mgr. and PhD. works)

**Apr 1997 – to date researcher and department lead.** *The Department of Conservation Hydrobiology, T.G. Masaryk Water Research Institute, Prague (part-time job)*

I lead or corroborate research projects (TAČR, OPŽP, INTEREG agencies), lead working groups and a department with 6 researchers. I also do fundraising work (16 project Applications), invention patents (1 patent, 1 European patent application, 4 utility models) and leadership of students (tutor or consultant 2 Bc., Mgr. works in Faculty of Science, Charles University in Prague)

Websites: [http://www.researchgate.net/profile/Ondrej\\_Simon](http://www.researchgate.net/profile/Ondrej_Simon),  
<http://vuv.academia.edu/OndrejPSimon>

## PREVIOUS EMPLOYMENT AND EXPERIENCE

**2003 – 2010 Landscape engineer GIS spol. s r.o. (part-time job)**

Projecting in landscape planning, focused on biocorridors and comprehensive land adjustment projects

**2000 – 2015 Teacher and lecturer (grammar school level),** *The Přírodní Škola grammar school, Prague and The Sněm dětí pro životní prostředí – Koniklec NGO (part-time jobs)*

Fieldwork projects, leadership of student works and working groups (science, ecology, biology, geography)

**2006 – 2007 Hydrobiology expert and teaching material author** *CENIA - Czech Environmental Information Agency (part-time job)*

Concept and “water section” of multimedia version of Environmental Yearbook  
[vitejtenazemi.cenia.cz](http://vitejtenazemi.cenia.cz)

**1984 – 2014 Landscape planning, environmental education and conservation works**  
*various agencies, mostly volunteer work*

Scout troop leading, scout camp leading, environmental education lectures, local community environmental projects, SAPARD projects, tree planting projects, Flood Protection Plans, training groups and individuals in conservation management (theory and practical work) and many more.

## EDUCATION

- 1988–1994: **Charles University in Prague, MSc. Biology and Ecology**, *Diploma thesis in Department of Hydrobiology (Chairman of the Student Chamber of the Academic Senate Faculty of Science in 1990-91)*
- 1984 -1988: **Grammar school Praha Botičská – 4-year study**, (*The Biologická olympiáda knowledge competition - international round in 1987*)

## CONTACT DETAILS

E-mail: [simon@fzp.czu.cz](mailto:simon@fzp.czu.cz)

Telephone: (00420) 602 767 250

## PORTFOLIO OF RECENT WORK

- Simonová, J., Simon, O.P., Kopic, Š., Nehasil, L., Horsák, M. (2016) Medium-sized forest snails survive passage through birds' digestive tract and adhere strongly to birds' legs: more evidence for passive dispersal mechanisms. Journal of Molluscan Studies 82 (3): 422-426
- Simon O. P., Vaničková I., Bílý M., Douda K., Patzenhauerová H., Hruška J. & Peltanová A. (2015): The status of freshwater pearl mussel in the Czech Republic: several successfully rejuvenated populations but the absence of natural reproduction. – Limnologica – Ecology and Management of Inland Waters 50, 11-20
- Matasová, K., Simon, O., Dort, B., Douda, K., Bílý, M. (2013) Recent distribution of the freshwater pearl mussel (*Margaritifera margaritifera*) in historical localities in the upper part of the Vltava river basin. Silva Gabreta 19, 139-148
- Kubíková, L., Simon, O. P., Tichá, K., Douda, K., Maciak, M. & Bílý, M. (2012). The influence of mesoscale habitat conditions on the macroinvertebrate composition of springs in a geologically homogeneous area. Freshwater Science 31, 668-679.
- Tichá, K., Simon, O. P., Douda, K. & Kubíková, L. (2012). Detrital components in submontane organogenic springs in relation to their morphology, microhabitats and macroinvertebrates. Polish Journal of Ecology 60, 163-175
- Wanner, F., Simon, O., Kladiwová, V. (2012) Decrease in the trophic status of a second-order stream (Zbytinský Potok) by a new wastewater treatment plant with two low-loaded stabilisation ponds. Silva Gabreta 18 (1) 23-34
- Kubíková L., Simon O.P., Fricová K. (2011): The occurrence of *Pisidium* species (Sphaeriidae, Bivalves) in oligotrophic springs of the Blanice river catchment (Czech Republic) in relation to ecological conditions. Biologia, 66 (2), 299-307

## Patents

- Simon, O. and Douda, K. (originators), T.G.M. WRI, (applicant): Pressure-type continuous sampler for flowing water - patent No. 303836, The Industrial Property Office of Czech Republic 26.10.2009.
- Simon, O. and Douda, K. (originators), T.G.M. WRI, (applicant): Continual sediment sampler for small sloping flows.- Utility model No. 18924, The Industrial Property Office of Czech Republic 29.9.2008.

## Membership of scientific societies

[Society for Conservation Biology](#) (SCB), [Česká společnost pro ekologii](#) (ČSPE), [Česká limnologická společnost](#) (LIMNOSPOL),